

Estimación del contenido de fenoles totales en aceite esencial de Caléndula (*Calendula officinalis* L) obtenido mediante OAHD

Estimation of the content of total phenols in calendula essential oil (*Calendula Officinalis* L) obtained by OAHD

Estimativa do conteúdo de fenóis totais em óleo essencial de calêndula (*calendula Officinalis* L) obtido Por OAHD

Golda Meyer Torres; Olga Isabel Sarmiento; Ruth Isabel Ramírez; Osvaldo Guevara

Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)
Kilómetro 1 vía Pántano de Vargas, Duitama, Colombia.

golda.torres@unad.edu.co

Fecha recepción: 27 de diciembre de 2017

Fecha aceptación: 23 de mayo de 2018

Resumen

Este trabajo hace parte de la caracterización preliminar del aceite esencial de caléndula (*Calendula officinalis* L.) obtenido mediante dos métodos: hidrodestilación (HD) e hidrodestilación asistida por calentamiento óhmico (OAHD); se emplearon flores en estado fresco (Ff) y seco (Fs). Se realizó una estimación del contenido de fenoles totales, con el reactivo de Folin Ciocalteu, empleando ácido tánico como estándar ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Se evaluó el efecto de los métodos y tratamientos sobre el contenido de fenoles totales ($\mu\text{g}/\text{mL}$); los resultados obtenidos relacionaron diferencias significativas ($p < 0,05$), al comparar la interacción entre el estado de la flor, para un mismo método de extracción, pero no fue así cuando se comparó el estado de la flor independiente del método de extracción ($p \geq 0,05$); por lo tanto, los métodos de extracción empleados no registraron efectos sobre el contenido de fenoles en cada una de las muestras de aceite. El proceso de secado es el que ejerce un efecto sobre el desarrollo de estructuras fenólicas sobre las muestras de aceite. Se debe continuar con la caracterización del aceite esencial de la flor de caléndula obtenido por HD y OAHD, en relación con la composición química de cada una de las fracciones, al igual que la medición de la actividad antioxidante, empleando técnicas analíticas de mayor sensibilidad.

Palabras clave: *cuantificación de fenoles, aceite esencial de caléndula, hidrodestilación de aceites esenciales, calentamiento óhmico en aceites esenciales.*

Abstract

This work forms part of the preliminary characterization of calendula (*Calendula officinalis* L.) essential oil obtained by two methods: hydrodistillation (HD) and ohmic-assisted hydrodistillation (OAHD); fresh flowers (Ff) and dried flowers (Fs) were used. Total phenols content was estimated with Folin-Ciocalteu reagent using tannic acid as standard ($\mu\text{g}/\text{mL}$). The effect of the methods and treatments on the total phenols content ($\mu\text{g}/\text{mL}$) was evaluated; results obtained showed significant differences ($p < 0.05$) when comparing the interaction between flower states for the same extraction method, but this was not the case when flower states were compared irrespective of the extraction method ($p \geq 0.05$); therefore, the extraction methods used did not show effects on the content of phenols in each of the oil samples while the drying process does have an impact on the development of phenolic structures in the oil samples. It is necessary to continue working on the characterization of calendula flower essential oil obtained by HD

and OAHD with regard to the chemical composition of each of the fractions as well as the measurement of the antioxidant activity using higher sensitivity analytical techniques.

Keywords: *quantification of phenols and flavonoids, content of total phenols, calendula essential oil, hydrodistillation of essential oils, ohmic heating.*

Resumo

Este trabalho faz parte da caracterização preliminar do óleo essencial de calêndula (*Calendula officinalis* L.) obtido por dois métodos: hidrodestilação (HD) e hidrodestilação assistida por aquecimento ôhmico (OAHD); flores frescas (Ff) e flores secas (Fs) foram utilizadas. O conteúdo total de fenóis foi estimado com o reagente de Folin-Ciocalteu usando ácido tânico como padrão ($\mu\text{g/mL}$). Avaliou-se o efeito dos métodos e tratamentos no conteúdo total de fenóis ($\mu\text{g/mL}$); os resultados obtidos mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando se comparou a interação entre os estados da flor para o mesmo método de extração, mas não foi o caso quando os estados da flor foram comparados, independentemente do método de extração ($p \geq 0,05$); portanto, os métodos de extração usados não mostraram efeitos sobre o conteúdo de fenóis em cada uma das amostras de óleo, enquanto o processo de secagem tem um impacto sobre o desenvolvimento de estruturas fenólicas nas amostras de óleo. É necessário continuar trabalhando na caracterização do óleo essencial de calêndula obtido por HD e OAHD, no que diz respeito à composição química de cada uma das frações, bem como a medição da atividade antioxidante utilizando técnicas analíticas de maior sensibilidade.

Palavras-chave: *quantificação de fenóis e flavonóides, teor de fenóis totais, óleo essencial de calêndula, hidrodestilação de óleos essenciais, aquecimento ôhmico.*

Introducción

Los fenoles son compuestos aromáticos que están formados por uno o varios grupos funcionales hidroxilo. Son metabolitos vegetales secundarios que se sintetizan mediante diferentes rutas como la del shikimato. Se les clasifica en taninos, ligninas y flavonoides. Son agrupados por el número de sustituyentes fenólicos dentro de la molécula (tabla 1).

Los fenoles están asociados a un gran número de propiedades fisiológicas, incluyendo antiinflamatorias, antidepresivos, antotumorales y antilipídicos [1], control de diabetes [2], antimicrobianos y antioxidantes [3]; los antioxidantes constituyen un sistema de defensa para las plantas; por lo tanto, exhiben la misma función en el organismo humano. La capacidad antioxidante de los aceites esenciales puede aumentar si contiene este tipo de estructuras fenólicas.

La calêndula pertenece a la familia *Asteraceae*, que es una planta anual. Esta planta ha sido tradicionalmente utilizada por sus efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antifúngicos, antiedemas, antidiabéticas y propiedades curativas [4]. Presenta propiedades antioxidantes (carotenos, flavonoides y compuestos fenólicos),

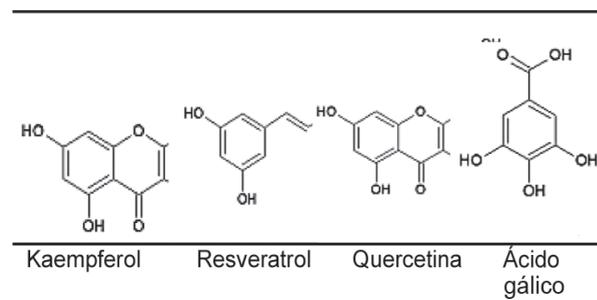
también contiene compuestos como esteroides, triterpenoides, ácidos fenólicos carotenos (β -caroteno, α -caroteno), rutinósido, flavoxantina, entre otros [5], compuestos que se pueden encontrar en su aceite esencial y, por ende, ejerce un alto número de propiedades farmacológicas y funcionales.

Se han empleado varios métodos para la extracción de aceites esenciales, en cada uno de ellos se ha determinado el rendimiento de extracción y la calidad del aceite obtenido. El método más empleado es la hidrodestilación (HD), y es tomado como referente. Aparecen técnicas emergentes como la hidrodestilación asistida por calentamiento ôhmico (OAHD); esta presenta grandes ventajas, en cuanto al tiempo de extracción y calidad del aceite esencial, porque que no hay degradación térmica, y la temperatura dentro del sistema aumenta rápidamente, debido a fenómenos de electroporación y la forma de transmisión del calor, en ésta se registran mínimas pérdidas por degradación térmica, esto hace que el aceite obtenido conserve su bioactividad [6,7].

El método de Folin Ciocalteu, es una técnica espectrofotométrica, basado en una reacción redox [8]; se emplea para predecir la cantidad de compuestos aromáticos hidroxilados y es un método no específico. Los resultados son expresados como mg de equivalentes de ácido

gálico (EAG) (como estándar) / 100g de muestra, pero otros fenoles, como la catequina o los ácidos tánico, clorogénico, caféico, vanílico y ferúlico, pueden ser empleados.

El objetivo de este trabajo fue estimar el contenido total de fenoles, por el método de Folin Ciocalteu, sobre muestras de aceite esencial de caléndula obtenido a través de dos técnicas de extracción: hidrodestilación (HD) e hidrodestilación asistida por calentamiento óhmico (OAHD), como parte de la caracterización preliminar del aceite.



Parte experimental

Las plántulas de caléndula (*Calendula officinalis* L), se adquirieron en el invernadero del SENA CEDAGRO Duitama Boyacá, con 68 días de germinación; luego fueron trasplantadas con los requerimientos climáticos y agronómicos respectivos hasta la semana 16, tiempo en el que el cultivo presentó la máxima floración. Las flores frescas se secaron en horno a 52°C, por 72 horas. Para extraer el aceite fueron empleados dos métodos de extracción: hidrodestilación (HD) y la hidrodestilación asistida calentamiento óhmico (OAHD). Se realizó extracción de aceite con flores frescas (Ff) y secas (Fs).

La hidrodestilación (HD) se llevó a cabo usando un equipo destilador, con trampa de Clevenger, de acuerdo con la United States Pharmacopoeia, USP 32 NF27. 300 gramos de flores frescas (Ff) y secas (Fs), se colocaron en 500mL de agua destilada respectivamente. En la primera hora de extracción, la cantidad de aceite fue recogida cada 5 minutos, posteriormente cada 15 y la última hora cada 30min. El sistema de calentamiento óhmico (OAHD) fue diseñado y fabricado por el equipo de ingenieros de la Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería (ECBTI) UNAD Duitama. Este consistió en un cilindro en nailon

cuyo diámetro interno 30,5 mm y longitud 168 mm para una capacidad de 490 mL, y un soporte en acero inoxidable con referencia comercial 304. Se adaptaron dos electrodos de acero inoxidable de la misma referencia. Para la hermeticidad del equipo, se adaptaron empaques siliconados y unas abrazaderas en acero inoxidable. El equipo operó a 166 V, un amperaje en promedio de 1,9 A y como medio conductor se empleó una solución de NaCl al 1%. En la parte superior se adaptó la trampa de Clevenger. Se trabajó con 100 gramos flores frescas (Ff) y 150 mL de solución salina, así como con 50 gramos de flores secas (Fs) y 150 mL de solución salina. Luego que el proceso alcanzó la temperatura de ebullición, se recolectó el aceite esencial durante los primeros 15 minutos en intervalos de 4 minutos, y después cada 8 minutos hasta terminar la extracción.

La determinación de fenoles totales en µg/ml, se realizó por el método de Folin-Ciocalteu, con ácido tánico como estándar; para proceder a elaborar la curva de calibración, se siguieron los parámetros establecidos por Paladino S [9] y se hicieron algunos ajustes al método de acuerdo con lo establecido en PNT n.º19 [10] y en Ainsworth y Gillespie [11]. Las medidas de absorbancia se hicieron a una longitud de onda de 760 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UVmini-1240, para las medidas de absorbancia en el rango visible, se utilizaron cubetas (1cmx1cmx4cm) de cuarzo. El diseño de la investigación empleó dos tipos de aceite esencial, obtenido mediante HD y OAHD, con dos tratamientos (estado de la flor: frescas [Ff] y secas [Fs]) y tres réplicas por tratamiento. Los datos se procesaron a través del programa SPSS 24 para el ANOVA. Las diferencias significativas se evaluaron a través de la prueba de Tukey; el nivel de significancia fue del 95% ($\alpha = 0,05$).

Resultados

Los resultados obtenidos en la determinación de fenoles totales (µg/mL) del aceite esencial caléndula (*Calendula officinalis* L) obtenido mediante hidrodestilación (HD) e hidrodestilación asistida calentamiento óhmico (OAHD) se presentan en la tabla 2. Los resultados fueron procesados mediante la ecuación de la figura 1, obtenida a partir de los datos de la curva patrón, empleando como estándar diferentes soluciones de ácido tánico (50mg/L).

Tabla 2. Contenido total de fenoles ($\mu\text{g/mL}$) del aceite esencial de caléndula (*Calendula officinalis* L)

Método de extracción	Muestra	Concentración fenoles ($\mu\text{g/mL}$)
HD	Aceite Ff	25,25 ^{a, c}
	Aceite Fs	59,98 ^{b, c}
OAHD	Aceite Ff	28,60 ^{a, d}
	Aceite Fs	60,02 ^{b, d}

^{a-b} indica que no hay diferencias significativas $p \geq 0,05$, ($n=3$) según estado de la flor.

^{c-d} indica que hay diferencias significativas entre las medias de los grupos estimadas al nivel de 0,05 según interacción estado de la flor-método de extracción. Test de Tukey: con $\alpha=0,05$ y $f=8$ grados de libertad para el error. $q=(3,8)=4,53$. $T=14,56$.

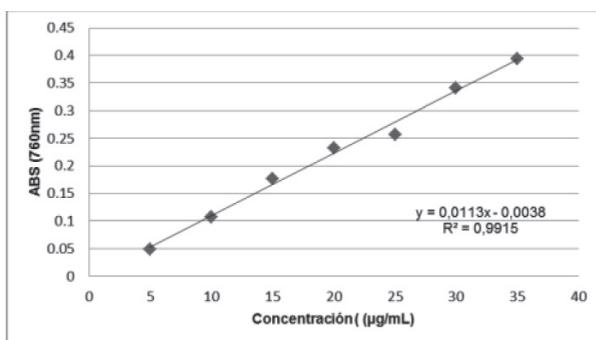


Figura 1. Curva de calibración fenoles totales ($\mu\text{g/mL}$), empleando ácido tánico como estándar.

Discusión

En flores secas para un mismo estado de la flor, independiente del método de extracción, se llega a duplicar la concentración de fenoles totales (tabla 2). Esto indica que el tiempo y temperatura de secado puede generar variabilidad en la composición química del aceite esencial dadas por las transformaciones químicas sobre los constituyentes del aceite [12], en donde, a partir de nuevos mecanismos, se pueden formar nuevos compuestos por reacciones de oxidación, glicosidación, esterificación, entre otros, que pueden potencializar la bioactividad de aceite esencial, como fue el caso del aumento en la concentración porcentual de bioactivos en procesos de secado de *Lippia* (familia *Verbenaceae*) [13] y en los resultados presentados por Kumar *et al.* [14] en el proceso de secado de *Acorus calamus* L., un análisis similar lo presentó Pirbalouti *et al.* [15].

El análisis de varianza (tabla 2) indica que se obtiene el mismo contenido de fenoles totales en el aceite esencial, para un mismo estado de la flor, independiente del método de extracción ($p \geq 0,05$; $T < 14,56$); la cantidad de fenoles presentes en el aceite esencial de caléndula (*Calendula officinalis* L) es el mismo, cuando se emplea cualquiera de los dos métodos de extracción. Existe significancia estadística ($p < 0,05$) entre grupos, para el contenido total de fenoles, cuando se analiza el efecto combinado entre el estado de la flor, para un mismo método de extracción, sobre el contenido de fenoles totales presentes en cada fracción de aceite (tabla 2).

Son escasas las publicaciones bibliográficas que hay en relación a la medición del contenido total de fenoles y la actividad antioxidante del aceite esencial caléndula y de otras asteráceas; por ejemplo, en los estudios de Johnson *et al.* [16], el valor fue cercano al obtenido en muestras secas (Fs); en los reportes de Sytar *et al.* [17] presentan similitud con los valores registrados en flores frescas (Ff). Estos resultados indican que se debe continuar con la investigación en cuanto a la caracterización de los aceites obtenidos por cada método y tratamiento, para conocer la composición química y la evaluación de la capacidad antioxidante, aplicando métodos específicos como aquellos que evalúan la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o transferencia de electrones (ET).

La literatura da cuenta de una amplia investigación sobre el contenido de fenoles totales en los extractos florales de caléndula. El contenido promedio de compuestos fenólicos indica que el aceite obtenido por cualquiera de los métodos y estado de la flor es bajo, con respecto a los extractos florales [18,19] pero los mismos varían de acuerdo al método de extracción y solvente utilizado (etanol, metanol, etc.). De acuerdo a esto, se puede inferir qué solventes polares favorecen la solubilización de fenoles, y aumentan la concentración en la muestra. En el caso de esta investigación, las estructuras aromáticas hidroxiladas presentes en cada uno de las fracciones de aceite pueden exhibir baja concentración, esto debido al solvente utilizado tanto en la DH como en la OAHD, que genera mayor migración de estas a la fase polar de la extracción (hidrolato o extracto acuoso) y no en la fase apolar (aceite esencial); en éste sentido, es importante analizar la composición química

de cada muestra de aceite, y determinar cuáles son las estructuras presentes y que pueden ejercer alguna bioactividad (por ejemplo, terpenos y terpenoides) como también incluir dentro del contexto de la investigación la capacidad antioxidante del hidrolato, o extracto acuoso, que se genera en cada método de extracción (DH y OAHD) y estado de la flor de Caléndula (Ff y Fs).

Conclusiones

El contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/mL}$) en cada una de las muestras de aceite obtenidos por HD e OAHD no registró efectos sobre el contenido de fenoles totales, para un mismo estado de la flor independiente del método de extracción, pero sí en la interacción estado de la flor (Ff- Fs), en un mismo método de extracción. El proceso de secado tiene un marcado efecto sobre el desarrollo de estructuras con capacidad antioxidante; por lo tanto, se concluye que el estado de la flor es quien condiciona el contenido de los fenoles totales ($\mu\text{g/mL}$) y no el método de extracción.

Se debe continuar con la caracterización de cada muestra aceite obtenido por HD e OAHD, en relación a la composición química y actividad antioxidante empleando técnicas analíticas de mayor sensibilidad. De igual manera, es relevante incluir en estos objetivos la evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato o extracto acuoso, si bien, una gran cantidad de metabolitos polares con actividad biológica pueden migrar a esta fase y no estar presentes en el aceite esencial de flores Ff y Fs de caléndula (*Calendula officinalis* L) condiciona el contenido de los fenoles totales ($\mu\text{g/mL}$) y no el método de extracción, pero se debe continuar con la caracterización del aceite esencial obtenido por HD y OAHD, en relación a la composición química y actividad antioxidante, empleando técnicas analíticas de mayor sensibilidad.

Agradecimientos

Al Ingeniero Claudio Camilo González, Decano de la ECBTI de la UNAD, a los docentes de Programa de Ingeniería de Alimentos y Electrónica.

Referencias bibliográficas

[1] Cong-Cong XU, Bing W, Yi-Qiong P, Jian-Sheng TAO, Tong Z. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant

- materials. Chin J Nat Med. 2017;15(10):721-31.
- [2] Guoyuan Q, Yashi M, Rong F, Beita Z, Bo R, Xuebo L. Tea polyphenols ameliorates neural redox imbalance and mitochondrial dysfunction via mechanisms linking the key circadian regular Bmal1. Food Chem Toxicol. 2017;(18):125-218.
- [3] Bento C, Gonçalves AC, Silva B, Silva LR. Assessing the phenolic profile, antioxidant, antidiabetic and protective effects against oxidative damage in human erythrocytes of peaches from Fundão. J Funct Foods. 2018;43:224-33.
- [4] Paolini J, Barboni T, Desjobert JM, Djabou N, Muselli A, Costa J. Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. Francia. Biochem. Syst. Ecol. 2010;38(5):865-74.
- [5] Loescher C, Morton D, Razic S, Kustrin S. High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*—Advantages and limitations. J Pharm Biomed Anal. 2014;98:52-9.
- [6] Damyeh M, Niakousari M. Impact of ohmic-assisted hydrodistillation on kinetics data, physicochemical and biological properties of *Prangos ferulacea* Lindle. Essential oil: Comparison with conventional hydrodistillation. Innov Food Sci Emerg Technol. 2016;33:387-96.
- [7] Gavahian M, Farahnaky A, Farhoosh R, Javidnia K, Shahidi F. Extraction of essential oils from *Mentha piperita* using advanced techniques: Microwave versus ohmic assisted hydrodistillation. Food Bioprod. Process. 2015;94:50-8.
- [8] Qarah NAS, Basavaiah K, Abdulrahman SAM. Spectrophotometric determination of ethionamide in pharmaceuticals using Folin-Ciocalteu reagent and iron(III)-ferricyanide as chromogenic agents. J Taibah Univ Sci. 2017;11(5):718-28.
- [9] Paladino S. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). Mendoza, Argentina: Universidad Nacional de Cuyo. 2008.
- [10] Determinación colorimétrica de fenoles solubles en material vegetal mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (sitio en internet). Disponible en: <http://www.mncn.>

- csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/fenoles_en_planta.pdf. Acceso el 12 de octubre de 2017.
- [11] Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc.* 2007;2(4):875-7.
- [12] Memarzadeh SM, Pirbalouti AG, Adibnejad M. Chemical composition and yield of Essential oils from Bakhtiari savory (*Satureja bachtiarica* Bunge.) under different extraction methods. *Ind Crops Prod.* 2015;76:809-16.
- [13] Delgado J, Sánchez MS, Bonilla CR. Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson y *Lippia origanoides* Kunth. *Acta Agron.* 2016;65(2):170-5.
- [14] Kumar R, Sharma S, Sharma S, Kumar N. Drying methods and distillation time affects essential oil content and chemical compositions of *Acorus calamus* L. in the western Himalayas. *J Appl Res Med Aromat Plants.* 2016;3(3):136–41.
- [15] Pirbalouti AG, Salehi S, Craker L. Effect of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil from the aerial parts of coriander. *J Appl Res Med Aromat Plants.* 2017;4:35-40.
- [16] Johnson CE, Oladeinde FO, Kinyua AM, Michelin R, Makinde JM, Jaiyesimi AA, et al. Comparative assessment of total phenolic content in selected medicinal plants. *Niger J Nat Prod Med.* 2008;12:40.
- [17] Sytar O, Hemmerich I, Zivcak M, Rauh C, Brestic M. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi J Biol Sci.* 2016.
- [18] Domínguez Marín L. Utilización de flores de caléndula (*Calendulae flos*) en salsa para carnes (Tesis Especialización). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional; 2009.
- [19] Abudunia AM, Marmouzi I, Faouzi MEA, Ramli Y, Taoufik J, El Madani N, et al. Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. *J Mycol Med.* 2017;27(1):90-7.