

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST GRADO

Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray “arrayán”.

TESIS Para optar al grado académico de MAGÍSTER EN RECURSOS VEGETALES Y TERAPÉUTICOS

AUTOR

Mario Carhuapoma Yance

LIMA – PERÚ 2006

DEDICATORIA

A la Tierra, al Perú y al hombre que con justicia
demandan un derecho de existencia sostenible.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y
a la memoria de sus verdaderos Insignes.

Especialmente a la biodiversidad peruana
y a su Magnificante Creador.

AGRADECIMIENTO

A las autoridades, profesores, personal administrativo y estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, quienes me facilitaron la ejecución del presente trabajo.

Al Dr. Salvador Cañigüeral y Roser Vila de la Universidad de Barcelona, a la Mg. Silvia Suarez y Elena Li por sus valiosas colaboraciones.

A los miembros del Jurado Examinador: Dra. Luisa Negrón B., Dr. Jorge Arroyo A., Dr. Pablo Bonilla R., Mg. César Fuertes R. y Mg. Arilmi Gorriti G.

A mi familia, de manera especial a Miriam y Sofía. Gracias por creer en mí.

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3
2.1. Antecedentes generales referentes a la especie	3
2.1.1. Taxonomía	3
2.1.2. Descripción botánica	3
2.1.3. Distribución geográfica	5
2.1.4. Investigación fitoquímica	5
2.1.5. Investigación etnobotánica, etnofarmacológica y farmacológica	6
2.2. Radicales libres y sus repercusiones	7
2.2.1. Fuentes biológicas de radicales libres	9
2.2.2. Factores para la producción de radicales libres	11
2.2.3. Estrés oxidativo	12
2.2.4. Sistema de defensa biológico	14
2.3. Sistemas de defensas antioxidantes	16
2.3.1. Antioxidantes en la prevención de enfermedades	17
2.3.2. Antioxidantes y cáncer	17
2.4. Recursos vegetales aromáticos con actividad antioxidante	17
2.4.1. Aceite esencial	18
2.4.2. Actividad antioxidante de aceites esenciales	19
III. PARTE EXPERIMENTAL	21
3.1. Metodología de trabajo	21
3.1.1. Colecta de la muestra vegetal	21
3.1.2. Procesamiento de la muestra	21
3.1.3. Extracción de aceite esencial	21
3.1.4. Rendimiento de aceite esencial	21
3.1.5. Constantes físicas	21
3.1.6. Caracterización química del aceite esencial	21
3.1.7. Análisis de la actividad antioxidante	22
3.1.7.1. Actividad secuestradora de radicales usando DPPH	22
3.1.7.2. Actividad secuestradora de radical hidroxilo	22
3.1.7.3. Actividad anti-peroxidación lipídica en hígado de rata	22

3.1.8. Toxicidad por el método de dosis límite	23
3.1.9. Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	24
3.2. Análisis estadístico de resultados	24
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	38
VI. CONCLUSIONES	43
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
VIII. ANEXOS	

RESUMEN

El estrés oxidativo genera diversas enfermedades inflamatorias con carcinogénesis y muerte celular. *Luma chequen* (Molina) A. Gray es una especie nativa con virtudes antiinflamatorias, antimicrobianas y conservante de tejidos *postmortem*. Con el objetivo de caracterizar la composición química y determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de *L. chequen*, se realizó el presente trabajo. El aceite esencial reporta un rendimiento (1.25%v/p), rotación óptica (+6 a -8), densidad (0.9044) e índice de refracción (1.470). Por CG-SM y RMN-¹³C se elucidó las estructuras de 40 compuestos al 93.6% de la muestra total: hidrocarburos monoterpénicos (68.8%), conteniendo α -pineno (57.3%) y β -pineno (6.2%); hidrocarburos oxigenados (18.9%), destacando 1,8 cineol (7.5%), linalol (3.7%) y *trans*-verbenol (2.2%); sesquiterpenos (3.0%), con el β -selineno (1.3%) y óxido de α -cariofileno (0.9%); y fracción no terpénica (3.0%). Se ensayó en 3 modelos la actividad antioxidante: **1)** En el modelo DPPH, resultó muy cercano a la vitamina C, captando al radical DPPH en 63.5600% y la vitamina C en 69.7767%; tiene una concentración media (IC₅₀) de 43.3571 ug/mL y la vitamina C de 36.4090 ug/mL; **2)** la captación de radical hidroxilo a concentraciones de 100, 50 y 10 ug/mL, resultan en 67.2033, 51.9633 y 31.2767%, respectivamente; a mayor concentración de aceite hay mayor capacidad antioxidante; y **3)** inhibe la formación del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico en 0.117 Umoles/mL y la vitamina C 0.103 Umoles/mL, comparando con el control negativo que exhibe 0.540 Umoles/mL; el aceite esencial resulta con menor capacidad antioxidante en este modelo. La dosis letal media (DL₅₀), ensayados en ratones albinos, del aceite es 906.1140 mg/kg; su CL₅₀ es 28.9013 ug/mL, ensayados en *Artemia salina* Leach. Los resultados, sugieren que el aceite esencial de *L. chequen* posee actividad antioxidante, debido a la estructura de sus constituyentes químicos.

Palabras clave: *Luma chequen*, aceite esencial, constituyentes químicos, actividad antioxidante.

SUMMARY

Oxidative stress generates several inflammatory diseases with cell death and carcinogenesis. *Luma chequen* (Molina) A. Gray is a native species with anti-inflammatory and antimicrobial virtues and corpse (post mortem tissue) preservative. With the goal of characterizing the chemical composition and determining antioxidant activity of essential oil of *L. chequen*, it was carried out the present work. The essential oil reports a (1.25 % v/p) performance, (+6 a -8) optical rotation, (0.9044 g/mL) density and a (1.470) refraction index. By means of CS-SM and RMC-¹³C, it was elucidated the structures of 40 compounds at a 93.6 % of the whole sample, monoterpene hydrocarbons (68.8 %), containing α -pinene (57.3 %) and β -pinene (6.2 %) oxygenated hydrocarbons (18.9 %), emphasizing 1,8 cineol (7.5 %), linalool (3.7 %), and *trans*-verbenol (2.2 %), sesquiterpenes (3.0 %), with α -selinene (1.3 %) and β -cariofilene oxide (0.9%), and a non terpenic fraction (3.0%). It was assayed 3 models of antioxidant activity, 1) resulted very near to vitamin C, gaining over of the DPPH radical in 63.5600% and the vitamin C in 69.7767%, it has an CI_{50} of 43.3571 μ g/mL and the vitamin C of 36.4090 μ g/mL, 2) the winning of hydroxyl radical at concentrations of 100, 50, and 10 μ g/mL, resulting in 67.2033 and 31.2767%, respectively, at a greater concentration of oil, there is a greater antioxidant capacity and 3) it inhibits the formation of malondialdehyde-thiobarbituric acid complex in 0.117 μ mol/mL and the vitamin C, 0.103 μ mol/mL, comparing with negative control that exhibits 0.540 μ mol/mL; essential oil results with minor antioxidant capacity in this model. LD_{50} of the oil is 906.1140 mg/kg that was assayed in albino mice; its LC_{50} is 28.9013 μ g/mL, that was assayed in *Artemia salina* Leach. The results suggest that the essential oil of *L. chequen* has antioxidant activity, due to structure of their chemical constituent.

Key words : *Luma chequen*, essential oil, chemical constituent, antioxidant activity.

I. INTRODUCCIÓN

En nuestros días aumenta el número de enfermedades en cuya etiología estaría involucrado el estrés oxidativo, producido cuando el ataque oxidativo de los radicales libres supera las defensas antioxidantes del cuerpo.

Las patologías atribuidas parcial o totalmente a los radicales libres son: el envejecimiento, Alzheimer, aterosclerosis, procesos autoinmunes, lupus eritomatoso sistémico, cataratas, dermatitis de contacto, gota, enfermedades inflamatorias, esclerosis múltiple, pancreatitis, Parkinson, artritis reumatoide, demencia senil, talasemias, colitis ulcerosa y cáncer.

Los prooxidantes actúan en sustratos macromoleculares oxidables, como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, produciendo cambios en la conformación química o en la estructura de los elementos celulares que los hacen compatibles con la vida.

El tejido nervioso parece ser un blanco propicio para los compuestos prooxidantes, por el alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, altas concentraciones de hierro y bajo contenido en enzimas antioxidantes. Hay investigaciones que demuestran una clara intervención del estrés oxidativo en la degeneración neuronal, como Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden generar la carcinogénesis por su virtud de reaccionar con el ADN y causar mutaciones. Recientemente se ha sugerido que el óxido nítrico y sus derivados producidos en tejidos inflamados pueden contribuir al proceso de carcinogénesis.

Numerosas investigaciones han demostrado los efectos antioxidantes de compuestos fitoquímicos, estos incluyen vitaminas (A, C y E), minerales (zinc, selenio, calcio, etc), isotiocianatos, esteroides, fenoles, cumarinas, flavonoides, inhibidores de proteasas, indoles, clorofila y aceites esenciales. Muchos de estos fitoconstituyentes son antioxidantes potentes.

Los aceites esenciales son en su mayoría sustancias terpénicas y fenilpropánicas, que se almacenan en los tejidos secretores de vegetales aromáticos. Una especie aromática puede contener más de 150 componentes como parte de su aceite esencial. Ruberto *et al.* en 2000, demostraron la actividad antioxidante de aproximadamente 100 compuestos puros de aceites

esenciales, con una diferencia significativa de timol, carvacrol y eugenol⁴⁵. Asimismo, Choi *et al.* en 2000, evidenció la actividad antioxidante de más de 20 compuestos puros, entre las que destaca el geraniol, terpinoleno y γ -terpineno⁵⁰.

El Perú es conocido como el tercer país megadiverso del mundo, algunos científicos lo catalogan como el segundo o primero, porque posee una extraordinaria riqueza biológica, fuente natural de moléculas bioactivas. En cuanto a la diversidad vegetal llega, aproximadamente a unas 50 000 especies detectadas, mientras que todo el continente europeo posee 12 000 especies. Razones nos sobran para maximizar el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales, validándolos científica y tecnológicamente.

En cuanto a plantas aromáticas nativas tenemos numerosas, una de ellas es ***Luma chequen*** “arrayán”, que reporta virtudes terapéuticas en enfermedades de las vías respiratorias y digestiva, como conservante de tejidos *postmortem* por sus propiedades antimicrobiana e hipocolesterolemica, entre otras.

Por tal razón, se realizó el presente trabajo planteándose el siguiente objetivo: caracterizar los componentes químicos del aceite esencial de ***Luma chequen*** (Molina) A. Gray y determinar su actividad antioxidante.

II. GENERALIDADES

2. 1. Antecedentes generales referentes a la especie.

2.1.1. Ubicación Taxonomía

Según el sistema de clasificación de A. Cronquist (1981), determinados por Beltrán SH y Soria LR, se ubica en la siguiente categoría taxonómica¹:

DIVISIÓN : Magnoliophyta
CLASE : Magnoliopsida
SUBCLASE : Rosidae
ORDEN : Myrtales
FAMILIA : MYRTACEAE
GÉNERO : *Luma*
ESPECIE : *Luma chequen* (Molina) A. Gray.
SINONIMIA VULGAR : “arrayán”, “wallpuma”, “rayán castilla” y “luma”.

SINONIMIA CIENTÍFICA: *Eugenia chequen* Molina, *Eugenia myrtomimeta* Diels, *Myrceugenella chequen* (Molina) Kausel, *Myrceugenella chequen* var. *myrtomimeta* (Diels) Kausel².

2.1.2. Descripción botánica

Planta arborescente, con altura entre los 5 a 6 m y cobertura de 5m de diámetro. **Tallo** erguido, leñoso, ramificado desde la base. **Hojas** opuestas, sin estípulas, pecioladas, limbo ovoide y coriáceo, 0.5 a 2.5 cm de longitud y 0.3 a 1.5 cm de ancho. **Flores** solitarias, axilares, hermafroditas, blancas, actinomorfas y tetrámeras; estambres numerosos, libres, en varios verticilios, filamentos inflexos en el capullo, anteras versátiles introsas; ovario ínfero con placenta axilar, óvulos anátropos, estilo simple y estigma capitado. **Fruto**: drupa, con escasas semillas y escaso endosperma^{3,4}.



Figura 1.- Planta de *Luma chequen* “arrayán”.



Figura 2.- Detalles de la floración y flor de *Luma chequen*.

2.1.3. Distribución geográfica

Crece desde los 2500 a los 4000 m.s.n.m., en los Andes de Sudamérica Central, entre Perú, Bolivia y Chile. En el Perú, se distribuye entre los departamentos de Ancash, Pasco, Lima, Junín, Ayacucho, Arequipa y Cusco, con predilección hacia el Sur. Su población se ve favorecido en lugares de alta humedad, a orillas de los ríos¹.

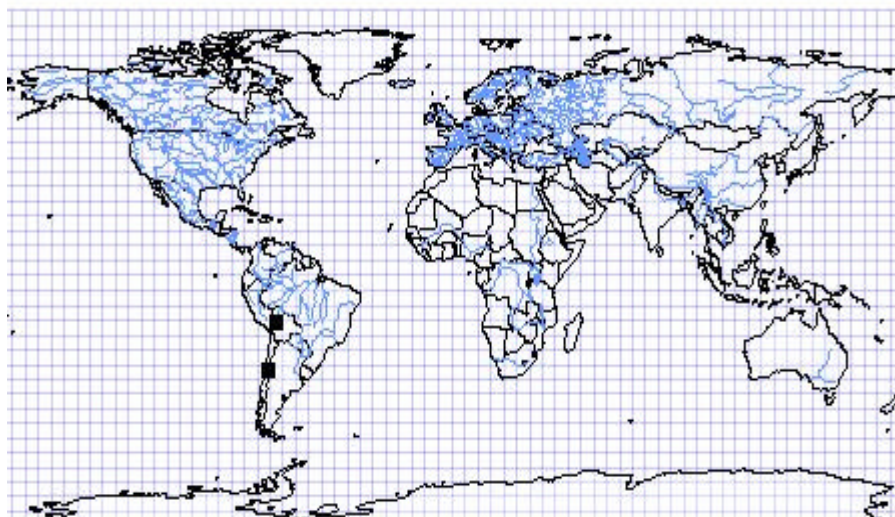


Figura 3.- Mapa de distribución de *Luma chequen* "arrayán".

2.1.4. Investigación fitoquímica

De acuerdo a los estudios realizados, contiene los siguientes metabolitos^{3,5,6}: flavonoides (quercetina, rutina y quercetin-3-metil éter), taninos, triterpenos y esteroides, aceites esenciales (1,8-cineol, mirtol), leucoantocianidinas y catequinas, fenoles libres, resinas, principio amargo, vitamina C, ácidos (cítrico, tánico y málico), hidrocarburos cafeínico y heterósidos.

Goncalves *et al.* (2001), reporta los componentes del aceite esencial de *Luma chequen*. En mayor cantidad están presente los monoterpenos con 90.1%, de los cuales α -pineno (57.1%), 1,8-cineol (12.1%) y linalol (5.5%); y en caso de los sesquiterpenos sólo hay 3.1%⁷.

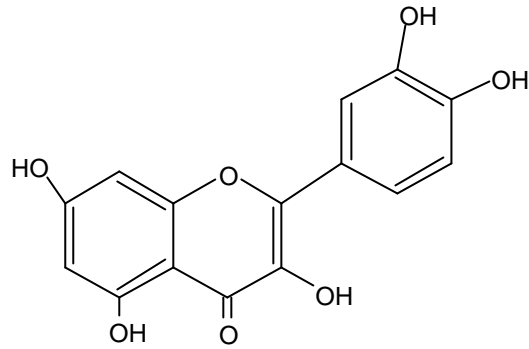


Figura 4: Quercetina presente en *Luma chequen*.

2.1.5. Investigación etnobotánica, etnofarmacológica y farmacológica

Según Goncalves *et. al* (2001), el *Luma chequen* es una planta nativa de Perú, que sus hojas y meristemas apicales de tallo son usados por los locales para los tratamientos de la tos, dolores de muela, desórdenes gastrointestinales e infecciones posparto⁷.

Muñiz (1992), en un trabajo etnobotánico menciona sus propiedades antirreumática, antidiarreico, antiséptico, astringente, balsámico, hemostático, vasoconstrictor, antineurálgico, antiinflamatorio y analgésico⁵.

Sotta (2000), afirma que en el departamento de Arequipa las ramas se usan para baños en caso de “mal de aire” y después del parto. Asimismo, refiere que sus hojas frescas son usadas como condimento y aromatizante para preparar embutidos⁴.

En algunos pueblos del departamento de Ayacucho, sus hojas y ramas jóvenes son usadas bajo la forma de cocción, llamado “agua de arrayán”, para evitar la putrefacción de tejidos *postmortem* conservándolas por años, dicha actividad podría deberse a los constituyentes químicos de la planta y del aceite esencial. También se le da un uso costumbrista, para armar coronas en todo los santos, acompañar ramos de flores para ofrendar a ídolos y en ceremonias nupciales³.

Según Mostacero y col. (2002), las hojas aromáticas son usadas en forma de infusión debido a sus propiedades carminativas⁸.

Labbe et al. (2002), en un estudio químico bioguiado del extracto metanólico de hojas frescas, condujo al aislamiento de tres tipos de

flavonoides, llamados lumaflavonoides A (1), B (2) y C (3). Las fracciones 1 y 2 mostraron mejor actividad fungistática frente a la cepa de *Botrytis cinerea*⁹.

Goncalves *et al.* (2001), reporta que el aceite esencial de esta especie posee actividad antimicrobiana, específicamente frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Cladosporium cladosporioides* y *Aspergillus fumigatus*⁷.

Jaramillo, Macha y Guillen (2004), demostraron la actividad hipocolesterolemica del extracto de acetato de etilo a una dosis de 200mg/Kg/día. A partir de este extracto obtuvieron una fracción activa B, después de la administración diaria de 100mg/Kg observaron una disminución del colesterol total de 36.8%; correspondiendo al HDL 24.6% y al LDL colesterol en 37.5%. Los constituyentes flavónicos responsables de esta actividad, serían la quercetina, rutina y quercetin-3-metil eter. Siendo la primera la más activa, disminuyendo el colesterol total en 100mg/Kg/día, HDL colesterol 21.5% y el LDL colesterol en 39.4%, observándose la mejoría del perfil lipídico en ratas albinas macho, raza Holtzman⁶.

2.2. Radicales libres y sus repercusiones

Los radicales libres son aquellas moléculas que en su estructura presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad¹⁰.

Según Halliwell (1991), los radicales libres pueden llevar a cabo uno de los siguientes tipos de reacciones¹⁰.

- (i) Ceder su electrón desapareado (radical reductor).
- (ii) Aceptar un electrón de la molécula estable para estabilizar el electrón desapareado (radical oxidante).
- (iii) Unirse a una molécula estable.

En cualquiera de los tres casos, la situación resultante es la génesis de otro radical químicamente agresivo:



Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la

mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados en cada una de estas macromoléculas¹¹.



Figura 6. El átomo de oxígeno pierde un electrón y queda como radical libre.

Los radicales libres son elaborados continuamente como producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Son componentes normales de células y tejidos, existiendo una poza de radicales libres particular en cada grupo celular y en algunos tipos celulares permiten la mejor adaptación a su hábitat. Al elevarse o disminuir las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (EROS) puede acarrear desastrosas alteraciones funcionales. La aterosclerosis, el envejecimiento y el cáncer, por citar algunos ejemplos, son un tercio de la enorme lista de problemas fisiopatológicos ocasionados por los radicales libres^{12,13}.

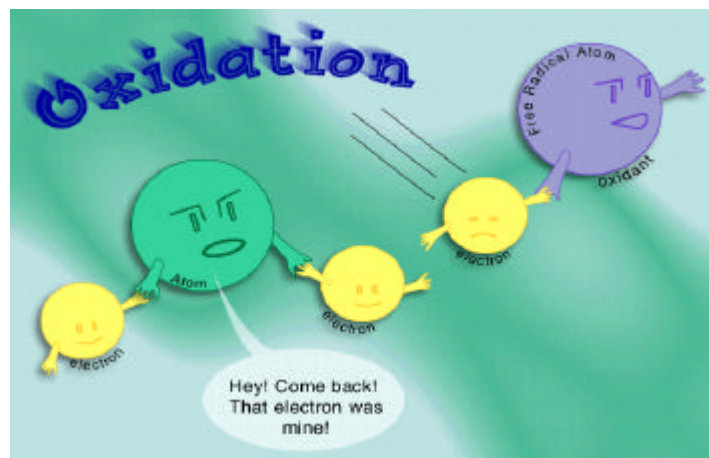


Figura 7. El radical libre sustrae un electrón de moléculas

El oxígeno molecular (O₂) es fundamentalmente birradical ya que tiene 2 electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro paralelo, impidiendo que capte 2 electrones simultáneamente en las reacciones que interviene. El oxígeno solo puede intervenir en reacciones univalentes y aceptar los electrones de uno en uno.

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a la forma de molécula de agua por acción del complejo citocromo-oxidasa (citocromo A+a3) de la cadena respiratoria mitocondrial, según la reacción global siguiente:



El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) no es estrictamente un radical libre pero por su capacidad de generar el [•]OH en presencia de metales como el hierro, se le incorpora como tal.

La sangre, fluido biológico compuesto por eritrocitos, leucocitos y plaquetas como elementos celulares, cumple entre otras funciones la de transportar el oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, y es aquí donde este actúa como sustrato en diversas reacciones bioquímicas intracelulares y como resultado se desencadena una gran producción de H₂O₂ y superóxido (O₂^{•-}), entre otras especies reactivas de oxígeno (ROS).

2.2.1. Fuentes biológicas de radicales libres

a) Mitocondrias

Constituye la fuente principal de radicales libres. Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar adenosina trifosfato (ATP)¹⁵.

En este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo en más del 95 % de estas reacciones un total de 4 electrones de moléculas con producción de 2 moléculas de H₂O. Una

consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas puede entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres¹⁶.

Cuadro 1. Clasificación de especies reactivas de oxígeno, cloro y nitrógeno.

CLASES	RADICALES	NO RADICALES
Especies reactivas de oxígeno (ROS)	Superóxido $O_2^{\bullet-}$ (*)	Peróxido de hidrógeno H_2O_2 (*)
	Hidroxilo $\bullet OH$ (*)	Ácido hipobromoso HOBr
	Hidroperóxido HO_2^{\bullet} (*)	Ozono O_3
	Peroxilo RO_2^{\bullet} (*)	Oxígeno singlete $g^1\Delta^1O_2$ (*)
	Peroxilo de lípido LO_2^{\bullet} (*)	Peróxido de lípidos LOOH(*)
	Alcoxilo de lípido LO^{\bullet} (*)	Productos de la reacción de Maillard(*)
Especies reactivas de cloro (RCS)	Cloro atómico Cl^{\bullet}	Ácido hipocloroso $HOCl$ (*)
		Cloruro de nitrilo NO_2Cl
		Cloraminas
Especies reactivas de nitrógeno (RNS)	Óxido nítrico NO^{\bullet} (*)	Ácido nitroso HNO_2 (*)
	Dióxido de nitrógeno NO_2^{\bullet} (*)	Catión nitrosilo NO^+
		Anión nitrosilo NO^-
		Tetróxido dinitrógeno N_2O_4
		Trióxido dinitrógeno N_2O_3
		Peróxinitrito $ONOO^-$
		Ácido peroxinitroso $ONOOH$
		Catión nitronium NO_2^+
		Peroxinitritos de alquilo $ROONO$
		Cloruro de nitrilo NO_2Cl

Fuente: Cadenas *et al.* (2002)¹⁴.

(*) Especies reactivas con presencia frecuente en alimentos.

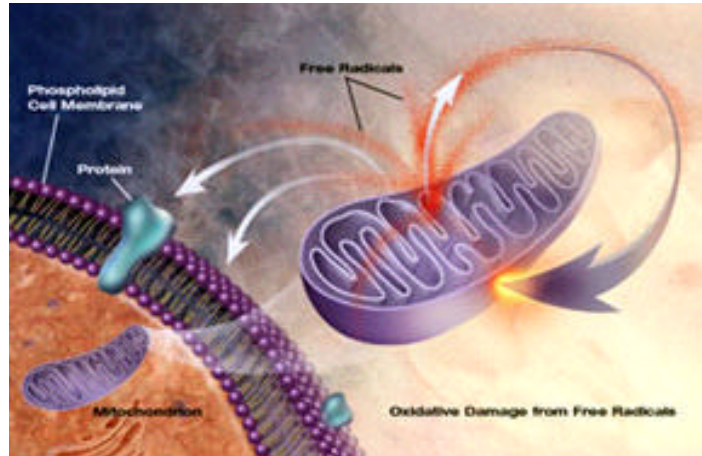


Figura 8. Producción de radicales libres mitocondriales y estrés oxidativo.

b) Peroxisomas

Organelas del citosol muy ricas en oxidasas y que generan H_2O_2 , el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en agua¹⁷.

c) Leucocitos polimorfonucleares

Constituyen una fuente importante, cuando se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleukinas, etc). Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de O_2^- que en presencia de hierro se transforma en el altamente tóxico $\cdot OH$. Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios¹⁷.

d) Xantina deshidrogenasa

Predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas (isquemia, entre otros), genera O_2^- .

2.2.2. Factores para la producción de radicales libres

- . **Químicos:** aumento de metales pesados, xenobióticos, componentes del tabaco.
- . **Drogas:** adriamicina.
- . **Físicos:** radiaciones ultravioleta, hiperoxia.

- **Orgánicos y metabólicos:** dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia - reperfundión y ejercicios extenuantes.

2.2.3. Estrés oxidativo

La exposición de la materia viva a diversas fuentes producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno¹⁸.

Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado. El estrés oxidativo ocasiona el daño oxidativo, que conlleva a un estado patológico y la muerte celular.

En 1954, Gerschman, sugirió por primera vez que los RL eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades¹⁵. Los RL dañan diversas estructuras moleculares de la célula:

a) Carbohidratos

Los radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$), reaccionan con los carbohidratos secuestrando al azar un hidrógeno de un átomo de carbono, produciendo de esta manera un radical de carbono que ocasionaría la ruptura de importantes moléculas biológicas, tales como el ácido hialurónico^{14,19}.

b) Peroxidación lipídica

Los lípidos están constituidos por ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son parte constitutiva de las estructuras celulares. Si se dañan las estructuras ricas en lípidos, como las membranas celulares y las lipoproteínas, se presentan dos posibilidades: en las primeras se altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular; y en la segunda, la oxidación de la LDL genera la placa ateromatosa¹⁸.

La característica de la oxidación lipídica por los RL, es la producción de una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina.

Este proceso genera numerosos subproductos, muchos de ellos como el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos de evaluar el estrés oxidativo^{15,18}.

Cuando hay una peroxidación lipídica en alimentos, se producen fenómenos de rancidez, reversión y otros tipos de sabores y olores indeseados¹⁴.

c) Proteínas

En caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc)²⁰.

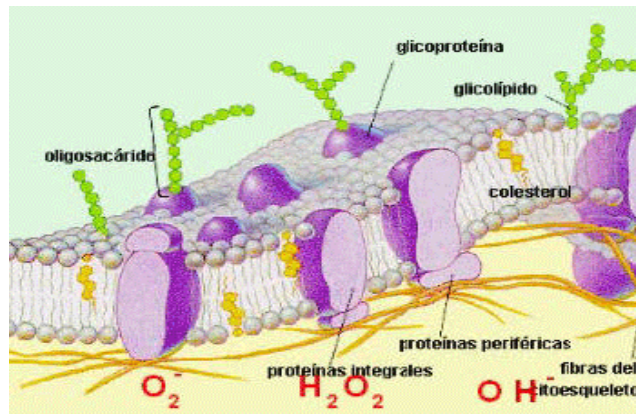


Figura 9. Daño a nivel de la membrana celular por radicales $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\bullet OH$.

d) ADN

El daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, generando serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una

parte, o la pérdida de expresión por daño al gen específico. El más afectado es el ADN mitocondrial, debido a que no posee proteínas protectoras.

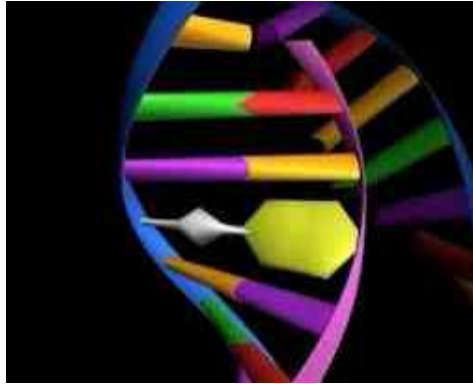


Figura 10. Modificación de bases nitrogenadas del ADN por radicales libres.

Los daños a niveles moleculares, ocasionado por los radicales libres, implica la génesis o exacerbación de numerosos procesos patológicos:

- **Aparato cardiovascular:** aterosclerosis, infarto del miocardio, cirugía cardíaca, diabetes, cardiopatía alcohólica.
- **Sistema neurológico:** enfermedad de Parkinson, alzheimer, neuropatía alcohólica, hiperoxia, isquemia o infarto cerebral, traumatismos craneales.
- **Aparato ocular:** cataratas, daño degenerativo de la retina, fibroplasia retrolental.
- **Aparato respiratorio:** distrés respiratorio (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), tabaquismo, cáncer de pulmón, enfisema.
- **SOMA:** artritis reumatoidea.
- **Riñón:** síndrome autoinmune, nefrotoxicidad por metales.

2.2.4. Sistema de defensa biológico

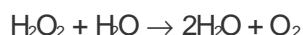
Si bien todos los organismos vivos soportan numerosos factores endógenos y exógenos de estrés oxidativo, al mismo tiempo poseen numerosos sistemas de defensas antioxidantes regulables, enzimáticos y no enzimáticos²¹.

En esta protección contra la agresión celular actúan en cinco niveles de defensa antioxidante²²⁻²⁶.

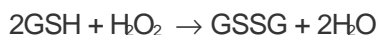
a) **Primer nivel:** Consiste en la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial responsable de más del 90 % de la reducción del oxígeno en el organismo humano.

b) **Segundo nivel:** Lo constituyen enzimas especializadas en captar el radical anión superóxido.

c) **Tercer nivel:** Dado por un grupo de enzimas especializadas en neutralizar el peróxido de hidrógeno. La catalasa, que se encuentra en los peroxisomas y cataliza la reacción de dismutación siguiente:



- **Superóxido dismutasa (SOD)**, una familia de enzimas antioxidantes responsables para la dismutación de los radicales superóxidos y la formación de peróxido de hidrógeno.
- **Glutación peroxidasa (GSH-Px)** dependiente del Se) y la catalasa (CAT dependiente del Fe), ambos reducen el peróxido de hidrógeno hasta H_2O . Como resultado, la reacción de superóxidos con moléculas biológicas y el potencial para la producción de radicales más poderosos, se encuentra enormemente reducido.



GSH: glutación reducido

GSSG: glutación oxidado

d) **Cuarto nivel:** Aquí el radical hidroxilo producido en el ciclo de Haber-Weiss puede ser neutralizado por la vitamina E (tocoferol), que es un antioxidante efectivo y que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas donde su protección es particularmente importante. También la vitamina C o ácido ascórbico es un agente reductor o donador de electrones y reacciona rápidamente con el radical $\cdot\text{OH}$.

e) Quinto nivel: Una vez producido el daño molecular, existe un quinto nivel de defensa que consiste en la reparación. Está demostrado que los radicales libres son capaces de provocar rupturas de la cadena de ADN y aun de inducir mutagénesis, pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten restablecer la información genética^{27 - 30}.

2.3. Sistemas de defensas antioxidantes

Según Halliwell (1991), define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato¹¹.

El antioxidante al colisionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico y que en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma original por la acción de otros antioxidantes. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los RL.

De las numerosas clasificaciones de los antioxidantes, se recomienda adoptar la que los divide en: exógenos o antioxidantes que ingresan a través de la cadena alimentaria y endógena que son sintetizados por la célula.

Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios. La vitamina E, el betacaroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula y su absorción y transporte se hallan muy vinculados con el de los lípidos. La vitamina E es considerada la más importante protectora de las moléculas lipídicas.

a) Vitamina C: neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales hidroxilos, captura anión superóxidos y regenera la forma oxidada de vitamina E³¹.

b) Vitamina E: neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres hidroxilos, neutraliza peróxidos y captura anión superóxido.

c) Betacaroteno: neutraliza el oxígeno singlete.

e) **Polifenoles:** interfiere en la oxidación de los lípidos o de otras biomoléculas por la rápida donación de un átomo de hidrógeno a los RL. El fenol por sí mismo es inactivo como antioxidante, pero, los compuestos *orto-* y *para-*difenólicos poseen actividad antioxidante, la cual incrementa con la sustitución de sus átomos de hidrógeno por grupos *etil-* o *n-butil*¹⁹.

2.3.1. Antioxidantes en la prevención de enfermedades

Antioxidantes y enfermedad cardiovascular: la enfermedad cardiovascular secundaria al proceso conocido como aterosclerosis constituye la primera causa de mortalidad e invalidez en la cuarta década de la vida. La modificación oxidativa de las lipoproteínas, particularmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los RL, sería uno de los mecanismos básicos de la aterogénesis. El colesterol y los fosfolípidos de las LDL se encuentran protegidos de la oxidación por varios agentes antioxidantes lipofílicos: vitaminas E, β -carotenos y ubiquinol. El antioxidante más importante en la protección de las lipoproteínas es la vitamina E, calculándose que cada molécula de ésta es capaz de proteger 500 moléculas de fosfolípidos³²⁻³⁴.

2.3.2. Antioxidantes y cáncer

Más de 150 estudios epidemiológicos evidencian una correlación inversa entre la ingesta de antioxidantes y el riesgo de adquirir diversos tipos de tumores y tienden a señalar al β -caroteno como el agente protector en enfermedades tumorales. Como posible mecanismo se reconoce que el ADN puede dañarse y por ende, sufrir mutaciones por lesión directa de los RL sobre las bases, o en forma directa afectando la actividad de las proteínas específicas que lo repara (proto-oncogen), o lo frena (supresores). También el tabaquismo produce un alto grado de estrés oxidativo por diversos mecanismos, ocasionando al mismo carcinogénesis a nivel pulmonar^{31,35-38}.

2.4. Recursos vegetales aromáticos con actividad antioxidante

En la permanente búsqueda de antioxidantes naturales, muchos investigadores han detectado la presencia de la vitamina E en el germen de *Triticum sp.* “trigo”, la vitamina A y carotenoides en *Daucus carota* “zanahoria”, vitamina C en cítricos (género Citrus, Familia Rutaceae), licopeno en

Lycopersicum esculentum “tomate”, frutillas y verduras, todas éstas recomendadas para una dieta humana saludable³⁹.

Los flavonoides son polifenoles antioxidantes, presentes en diversas plantas medicinales, las cuales neutralizan la acción de los radicales libre⁴⁰.

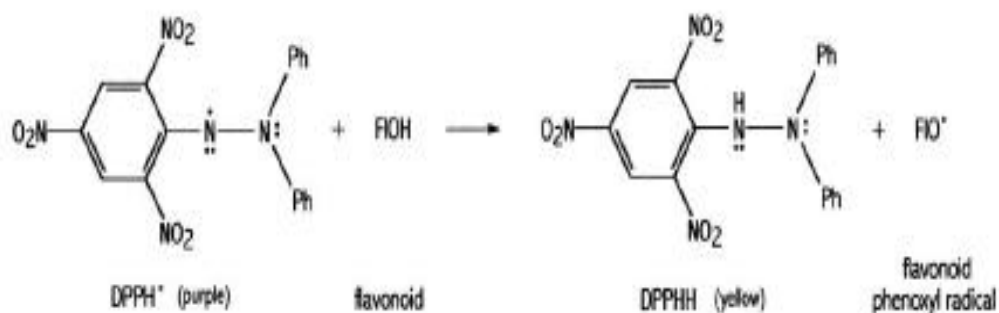


Figura 11. Acción de los flavonoides frente al radical libre DPPH.

Sin embargo, existen pocos estudios sobre la actividad antioxidante de los principales constituyentes químicos de las plantas aromáticas, que son los aceites esenciales.

2.4.1. Aceite esencial

También llamada esencia o aceite volátil, que le da un carácter de aroma a la planta que lo contiene.

Son fitoconstituyentes con predominio volátil y odorífero, de composición química compleja, se originan a partir de los tejidos secretores, almacenándose en pelos glandulares, cavidades esquizógenas o lisigénas. Generalmente son líquidos fluidos, más livianos que el agua, de olor fuerte y penetrante que recuerda a la planta de origen, incoloras o amarillentas translúcidas, solubles en alcohol, éter, cloroformo e insoluble en agua, dejan manchas sobre el papel que desaparecen con el tiempo^{41 - 43}.

La clasificación de aceites esenciales se basa en diferentes criterios: de acuerdo a su consistencia (esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas), de acuerdo a su origen (naturales, artificiales y sintéticos) y desde el punto de vista químico (esencias monoterpénicas, sesquiterpénicas y fenilpropánicos)⁴².

2.4.2. Actividad antioxidante de aceites esenciales

Las plantas aromáticas y sus aceites esenciales han mostrado acción antioxidante y anticancerígena, incluyendo terpenos fenólicos, como el caso del ácido carnosico, carnosol, rosmarindifenol y rosmarinquinona del **Rosmarinus officinalis**, **Salvia officinalis** y otras hierbas aromáticas^{44,45}.

El timol, componente principal del aceite esencial de **Thymus vulgaris** (Lamiaceae) y del **Thymus serpyllum** (Lamiaceae), presentan actividad antioxidante, por la estructura insaturada, de función fenol. Lo mismo ocurre con el carvacrol y el eugenol que son de tipo fenólico, componentes mayoritarios del aceite esencial de **Origanum vulgare** (Lamiaceae) y en **Syzygium aromaticum** (Myrtaceae), respectivamente^{46,47}.

Existen monoterpenos antioxidantes de acción anticancerígena como el limoneno y los pinenos, éstas inhiben la producción de colesterol y ayudan en la protección de la actividad de ciertas enzimas⁴⁸.

Zygadlo y col. (1995), demostraron el efecto antioxidante de los aceites esenciales de **Thymus vulgaris**, **Laurus nobilis**, **Foeniculum vulgare**, **Eucalyptus globulus**, **Tagetes minuta**, **Satureja parvifolia** y **Lippia polystachya** en el aceite de “soja”. Los aceites esenciales de **T. vulgaris** y **L. nobilis** exhibieron una significativa acción antioxidante seguidos, en orden decreciente, por **F. vulgare** y **E. globulus**. Las esencias de **T. minuta**, **S. parvifolia** y **L. polystachya** no mostraron efecto antioxidante y su contribución a la estabilidad oxidativa del aceite de “soja” fue despreciable⁴⁹.

Choi *et al.* (2000), ensayó la actividad antioxidante de los aceites esenciales de 34 plantas del género Citrus por el método de 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), todas ellas presentaron dicha actividad en un rango de 17.7 a 64%, comparado con el trolox⁵⁰.

Rekka *et al.* (1996), han investigado el efecto del *chamazuleno*, componente activo del aceite esencial de las flores de **Matricaria chamomilla** “manzanilla”, y encontraron que inhibió la lipoperoxidación en una manera dependiente del tiempo y la concentración, presentando un IC₅₀ de 18mM después de 45 minutos de incubación⁵¹.

El eugenol y la vainillina, componentes de aceites esenciales de **Syzygium aromaticum** “clavo de olor”, **Cinnamomum verum** (Lauraceae) “canela” y

Vanilla planifolia (Orquidaceae) “vainilla”, se usan como antioxidantes naturales y tienen amplia aceptación en la industria de los alimentos¹⁴.

Asimismo Ricci *et al.* (2005), realizó un estudio de la composición química, actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial de ***Teucrium marum*** (Lamiaceae), la que mostró una actividad antioxidante en los ensayos de DPPH, radical superóxido y en la formación del radicales de lipoperoxidación. Ellos hipotéticamente responsabilizan dicha actividad a uno de los 30 componentes que identificaron, la dolichodial (9.38%)⁵².

También algunos componentes de aceites esenciales reportan actividad anticancerígeno, y ésta está correlacionada por la producción de radicales libres. Silvestre *et. al* (2005), realizó un análisis de los componentes y la actividad anticancerígeno del aceite esencial de ***Croton flavens*** (Euphorbiaceae), la cual mostró citotoxicidad en líneas celulares de tumor A-549 y DLD-1. Ellos correlacionan que esta actividad, posiblemente, se debe a los componentes llamados α -cadinol, β -elemeno y α -humeleno⁵³.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Métodos

3.1.1. Colecta de material vegetal: Las hojas de *Luma chequen* “arrayán” se colectaron de aquellas plantas que crecían a la rivera del río del distrito de Tambo, a una altitud de 2800m.s.n.m., según dato registrado en altímetro, de la provincia de La Mar, departamento de Ayacucho.

3.1.2. Procesamiento de la muestra: Las hojas se desecaron bajo sombra a 21°C y 0.72 atm, por 07 días, hasta obtener una muestra seca que fácilmente se triturara al frotar con la mano, luego se guardó en bolsas de papel, hasta su utilización.

3.1.3. Extracción de aceite esencial: Aproximadamente de 5 Kg de hojas secas de la muestra seca se sometió a extracción, por el método de arrastre por vapor de agua. Una vez destilado se separó por diferencia de densidades, utilizando una pera de decantación, se trató con sulfato de sodio anhidro, se filtró, este filtrado es el aceite esencial puro, guardándolo en frasco de vidrio de color ámbar bajo refrigeración⁴¹.

3.1.4. Rendimiento de aceite esencial (%RAE): Se determinó mediante la técnica gravimetría-volumétrico. Esta valoración se efectuó por simple lectura del volumen de AE acumulado en una probeta-florentino graduada.

3.1.5. Constantes físicas: Se determinó por métodos físicos e instrumentales: rotación óptica, por polarimetría; densidad, por picnometría; índice de refracción, por refractometría.

3.1.6. Caracterización química del aceite esencial: Se realizó por técnicas cromatográficas y espectroscópicas. Empleando cromatógrafo de gas- detector de ionización de llama (GC-FID) y cromatógrafo de gas-espectrómetro de masa (GC-MS). Se usó dos columnas capilares de silica de diferente fase estacionaria: supelcowaxTM 10 y metilsilicona SE-30 (30m x 0.25 mm i.d.; 0.25 um de grosor de película). El análisis por GC-FID fue ejecutada en un Hewlett-Packard 6890 computarizado con un procesador de software, en las siguientes condiciones analíticas: corriente de gas, helio; porcentaje de flujo, 1mL/min; sobre una temperatura programada a 60°C (5min), 60-220°C (10min); temperatura de inyección, 250°C; temperatura de detector, 270°C; dividido en una proporción de

1:60. El espectro de masa fue obtenido con un sistema computarizado constituido por un cromatógrafo de gas Hewlett-Packard 5890 series II acoplado a un detector selectivo de masa Hewlett-Packard 5971, usando las mismas condiciones analíticas mencionadas arriba. El espectro de masa fue tomado sobre 35-400 m/z, usando un voltaje de ionización de 70 eV.

Se complementó con espectro de resonancia magnética nuclear-¹³C (¹³C-NMR), en un espectrómetro transformador Fourier Bruker AC 200, operando a 50.323 MHz por ¹³C, equipado con una computadora Aspect 3000 y un registrador de 10 mm, en cloroformo deuterado con todo los cambios internos en tetrametil silano. Los parámetros analíticos fueron: amplitud de pulsación 5.0 μ s; ángulo de golpe 45°; tiempo de adquisición 1.3 seg por 32K tabla de dato con una amplitud de espectro de 250 ppm. El número de exámenes acumulados fue 10000 por muestra de aceite esencial. El ¹³C-NMR fue constatado con un decodificador modelo CPD y una resolución digital de 0.763 Hz/pt. La multiplicación exponencial de la inducción libre decae con una línea ensanchada de 1 Hz, fue usada antes del transformador Fourier. La identificación se basa en la comparación de las señales en la mezcla espectral, con estos datos compilados se acudió a una librería referente y con la ayuda de un software *laboratory-made*. Estos ensayos se realizaron en los laboratorios de la facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, España.

3.1.7. Análisis de la actividad antioxidante

3.1.7.1. Actividad secuestradora de radicales libres usando DPPH: Se utilizó el método de Joyeux *et al.* (1995), se adicionó 0.75 mL de aceite esencial a concentraciones de 100, 50 y 10 μ g/mL por 1.5 mL de volumen de solución de DPPH (radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil) (0.1mM en etanol al 95%). Luego de haber dejado la mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos, la absorbancia se registró a 517 nm. La actividad secuestradora de radicales libres es expresada como una concentración efectiva 50% (CE 50; la concentración de sustancia de prueba requerida para reducir la absorbancia de la solución blanco de DPPH en 50%). La vitamina C se utilizó como patrón de referencia⁵⁴.

3.1.7.2. Actividad secuestradora de radical hidroxilo: Se utilizó la metodología de Klein *et al.* (1981), el formaldehído producido durante la oxidación del dimetilsulfoxido (DMSO) por el sistema Fe³⁺-ácido ascórbico es usado para detectar radicales hidroxilo. La mezcla de reacción contiene EDTA,

Fe³⁺ 0.1 mM (1:2); DMSO 167 uM (33 mM) en buffer fosfato (50 mM, pH 7.4). El aceite esencial de *Luma chequen* fue adicionada a 100, 50 y 10 ug/mL. La reacción fue iniciada por la adición de ácido ascórbico 2 mM. La mezcla es incubada a 37 °C por 30 minutos y luego la reacción fue detenida por la adición de 125 uL de ácido tricloroacético (17.5% p/v). El formaldehído formado es ensayado espectrofotométricamente a 412 nm. El porcentaje de inhibición se determinó con la siguiente fórmula⁵⁵:

$$\% \text{ Inhibición de } ^\bullet\text{OH} = C - P / C \times 100$$

Donde:

C: Reacción control

P: Reacción con la muestra problema

3.1.7.3. Actividad anti-peroxidación lipídica en hígado de rata: Se utilizó hígado de rata Wistar macho de 160-190g, mantenida en jaula acrílica y se le permitió alimento y agua a voluntad. La rata dejó de ser alimentada 12 horas antes del experimento. Para preparar el homogenizado del hígado (10%); la rata fue sacrificada por punción cardiaca seguida por perfusión del hígado con solución salina. El hígado fue separado y luego homogenizado en 10 volúmenes de KCl 0.15M. Se utiliza el método de Buege y Aust (1984), con las concentraciones de 100, 50 y 10 ug/mL del aceite esencial, luego se mide la producción del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico a 535 nm en un espectrofotómetro. La inhibición se evidencia por una disminución en la producción del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico, producto de la peroxidación lipídica⁵⁶. La siguiente fórmula permitió hacer los cálculos:

$$A = \epsilon \times l \times C \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$C = A / l \times \epsilon \quad \dots\dots\dots (2)$$

Donde:

A: Absorbancia

l = 1cm

C: concentración

E = 1.56 x 10⁵

3.1.8. Toxicidad aguda oral del aceite esencial: Se determinó la toxicidad aguda del aceite esencial empleando 06 ratones albinos Suizos, por cada grupo de tratamiento, procedentes de la colonia del Laboratorio de Control Biológico del Instituto Nacional de Salud-Chorrillos, con una masa corporal comprendida entre 18.1520 a 21.2122 g los cuales fueron mantenidos a una temperatura

controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ con un ciclo de luz/oscuridad de 12-12h. La alimentación consistió en ración peletizada y agua a voluntad. Se confeccionaron grupos de 06 ratones, identificados individualmente para su dosificación exacta mediante un sistema de marcaje con ácido pícrico. Se administró el aceite esencial por vía oral mediante cánula intragástrica, con previo ayuno de 4h; se ensayaron 03 niveles de dosis: 50 mg/kg (mínima), 200 mg/kg (media) y 2000 mg/kg (máxima), con el propósito de determinar la dosis letal media (DL_{50}). Los animales fueron observados constantemente durante las primeras 24h, continuando la misma diariamente durante un período de 14 días, registrando cualquier síntoma tóxico. Después de los 14 días se sacrificaron por tracción de la nuca para realizarles la necropsia, y se efectuó un examen macroscópico de órganos y tejidos principalmente corazón, riñón, bazo, pulmón, hígado. El peso corporal se controló al inicio y al final del experimento⁵⁷.

El valor de la DL_{50} se estimó mediante el método estadístico de los *Probits*.

3.1.9. Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina*: Este bioensayo se realizó para determinar la CL_{50} del aceite esencial en larvas de *Artemia salina*. Con 50 mg de huevos de *A. salina* puestos en un erlenmeyer con 350 mL de agua de mar, colocando en un lugar con luz permanente y bombeo de oxígeno con burbujeo lento. 20 mg de aceite esencial se disolvió en 0.5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) y en 1.5 mL de agua destilada. A partir de esta solución, se preparan diluciones de 1000, 100 y 10 ppm, transfiriendo a cada vial 500, 50 y 5 uL respectivamente. Se empleó 03 viales por cada concentración (09 en total) más 03 viales de control con 50 uL DMSO. En cada vial se colocan 10 nauplios y la dilución del aceite esencial requerida, agregando agua de mar hasta 5 mL por vial, adicionándole 1 gota de levadura como alimento. Después de 24 h se contó el número de sobrevivientes en cada dilución⁵⁸.

El valor de la CL_{50} se estimó mediante el método estadístico de los *Probits*.

3.2. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se presentan en tablas y gráficos sometidas al análisis de varianza y a la prueba de Tukey para comprobar las diferencias entre las medias, a un 95% de confianza⁵⁹.

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Principales constantes físicas del aceite esencial de *Luma chequen*.

CONSTANTES FÍSICAS	VALORES
Rendimiento en seco	1.25 %v/p
Rotación óptica (21°C)	+6 a -8
Densidad (21°C)	0.9044 g/mL
Índice de refracción (21°C)	1.470

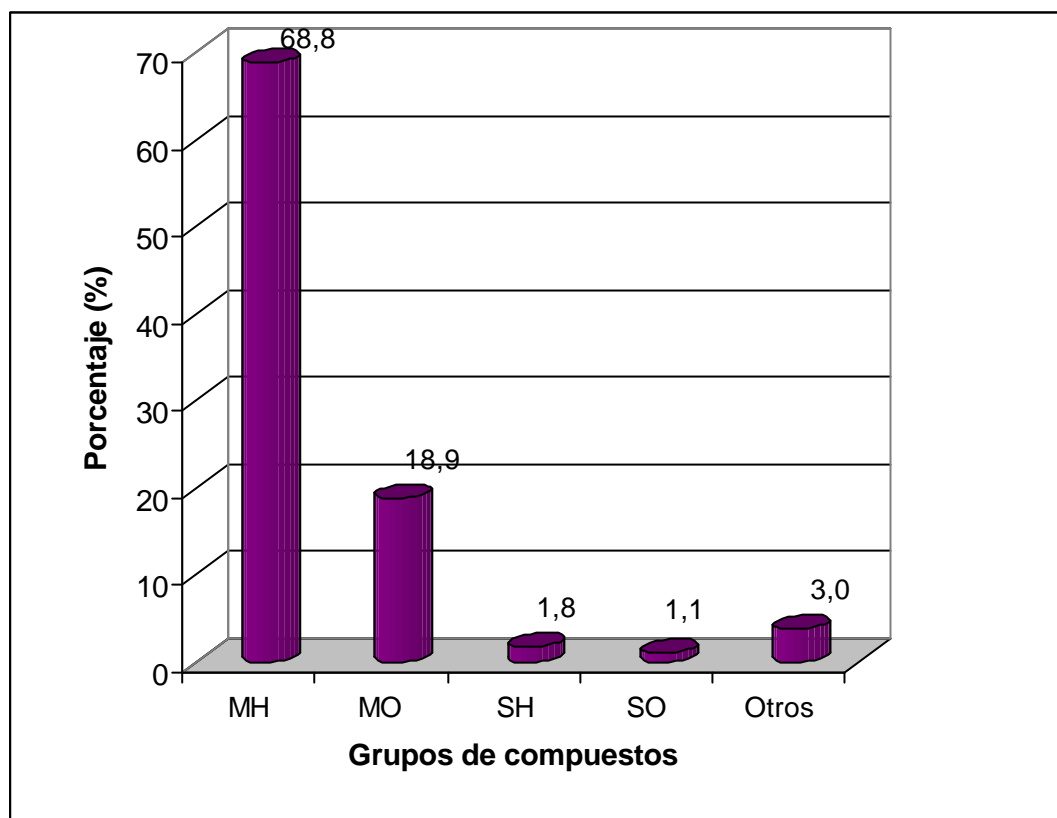
Tabla 2. Composición química del aceite esencial de *Luma chequen*.

CONSTITUYENTES	%	RI ₁	RI ₂	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
2-metilbutirato de etilo	0.1	152	121	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
Isobutirato de isobutilo	1.1	195	137	GC-MS, ¹³ C-NMR
α-tuyona	0.3	208	-	RI ₁ , GC-MS
α-pineno	57.3	215	113	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
Canfeno	0.2	219	126	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
β-pineno	6.2	231	147	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
Isobutirato de 2-metilbutilo	1.7	247	-	GC-MS, ¹³ C-NMR
p-cimeno	0.9	251	238	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
1,8-cineol	7.5	256	209	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
Limoneno	3.8	251	204	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
Óxido de <i>cis</i> -linalol	0.2	273	322	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
Óxido de <i>trans</i> -linalol	0.2	281	336	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
Linalol	3.7	289	377	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
Fenchol	0.2	293	391	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
Camfolenal	0.4	296	345	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
<i>Trans</i> -Pinocarveol	0.7	306	424	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
<i>Trans</i> -Verbenol	2.2	310	437	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
Pinocarvona	0.4	313	380	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
Borneol	0.3	319	447	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
Terpinen-4-ol	0.2	325	398	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
Mirtenal	0.4	329	409	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR

CONSTITUYENTES	%	RI ₁	RI ₂	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
α -Terpineol	0.6	332	446	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
Myrtenol	0.6	335	490	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
Verbenona	0.9	337	451	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
<i>Trans</i> -carveol	0.3	345	512	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
Isobutirato de bencilo	0.1	379	486	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
β -elemeno	tr	437	394	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
β -selineno	1.3	483	454	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
α -selineno	0.4	488	456	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
Óxido de β -cariofileno	0.9	527	577	RI ₁ , RI ₂ , GC-MS, ¹³ C-NMR
Viridiflorol	0.1	533	627	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
Cubenol	0.1	549	619	RI ₁ , RI ₂ GC-MS
Myrceno	tr	-	180	RI ₂ , GC-MS
Isobutirato de <i>cis</i> -3-hexenilo	tr	-	298	RI ₂ , GC-MS
α - <i>p</i> -dimetilestireno	tr	-	320	RI ₂ , GC-MS
Mentona	tr	-	334	RI ₂ , GC-MS
<i>allo</i> -aromadendreno	0.1	-	417	RI ₂ , GC-MS
Pulegona	tr	-	418	RI ₂ , GC-MS
Geraniol	tr	-	517	RI ₂ , GC-MS
<i>p</i> -cimen-8-ol	0.1	-	519	RI ₂ , GC-MS
Total de identificación	93.6			

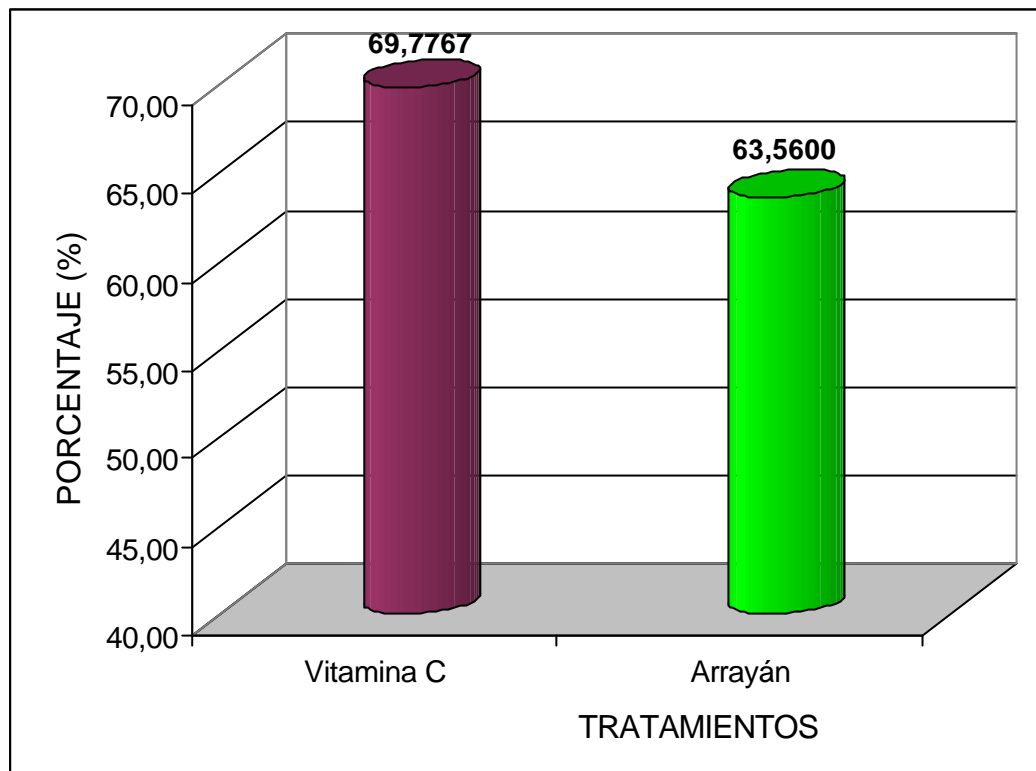
Legenda:

Tr : Trazas \leq 0.05%
 IR₁ : Índice de retención en metilsilicona SE-30
 IR₂ : Índice de retención en SupelcowaxTM 10



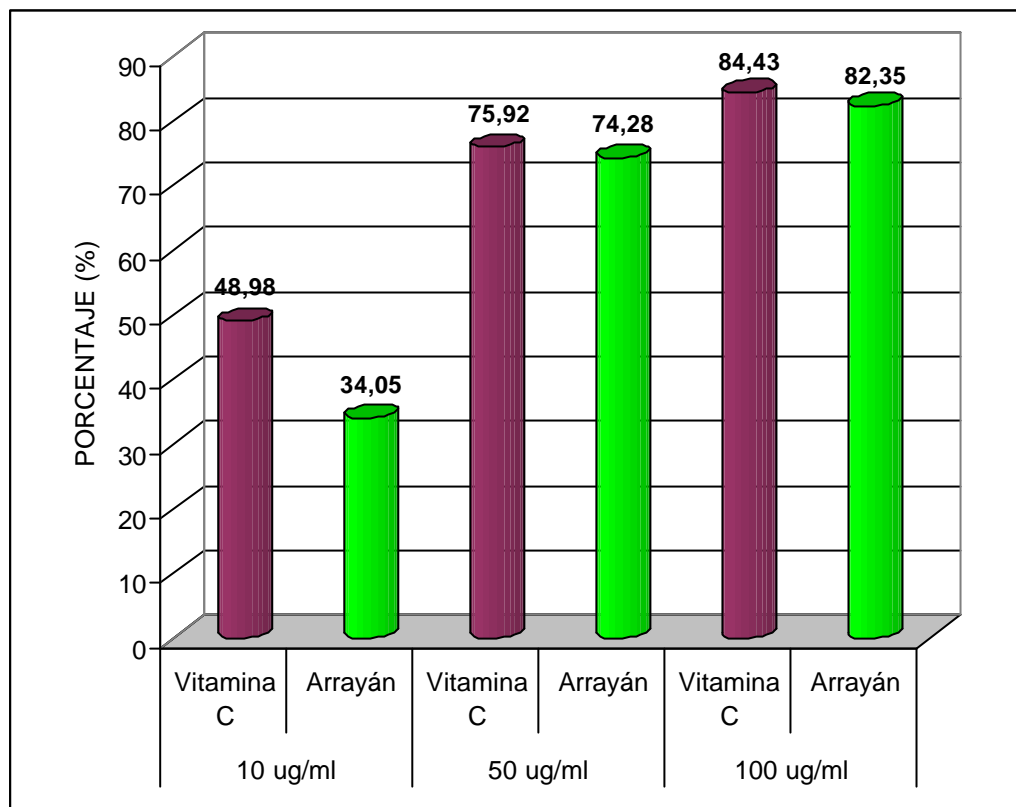
MH : Hidrocarburos monoterpénicos; MO : Monoterpenos oxigenados;
SH : Hidrocarburos sesquiterpenos; SO : Sesquiterpenos oxigenadas.

Gráfico 1. Grupos de compuestos químicos presentes en el aceite esencial de *Luma chequen*.



$t_c = 0,6757$; $g_l = 16$; $P = 0,1162$; NO SIGNIFICATIVO.

Gráfico 2. Capacidad de captación de radical DPPH del aceite esencial de *Luma chequen* comparada con la vitamina C.



10 µg/ml

tc = 12,905; gl = 4; P= 0,0002; SIGNIFICATIVO

50 µg/ml

tc = 6,3581; gl = 4; P= 0,0031; SIGNIFICATIVO

100 µg/ml

tc = 1,3302; gl = 4; P= 0,2542; NO SIGNIFICATIVO

Gráfico 3. Comparación de la actividad antioxidante por concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* y la vitamina C frente al DPPH.

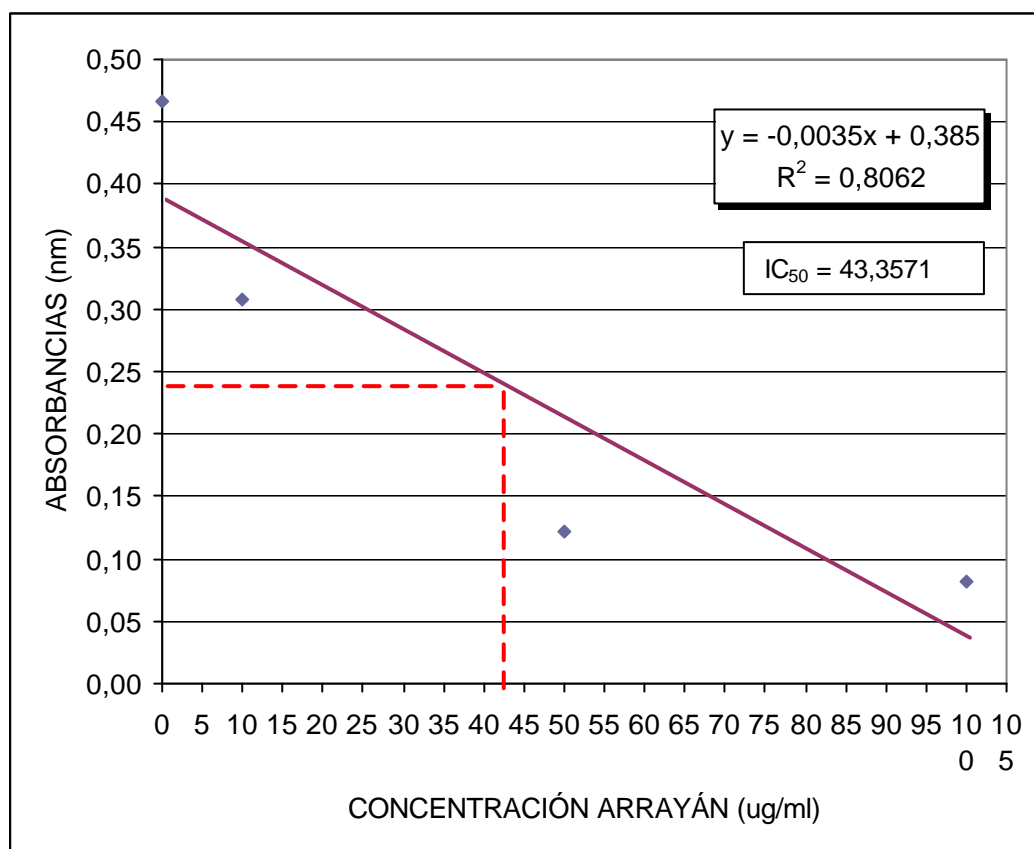


Gráfico 4. Concentración de inhibición 50 del aceite esencial de *Luma chequen* frente al DPPH.

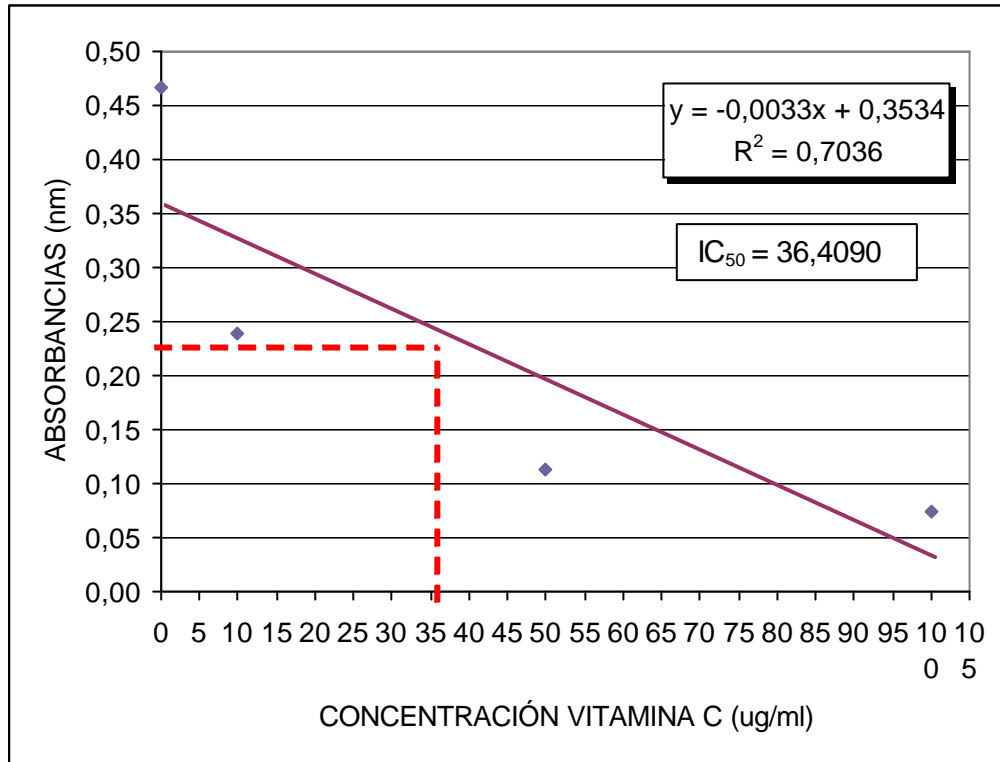


Gráfico 5. Concentración de inhibición 50 de la vitamina C frente al DPPH.

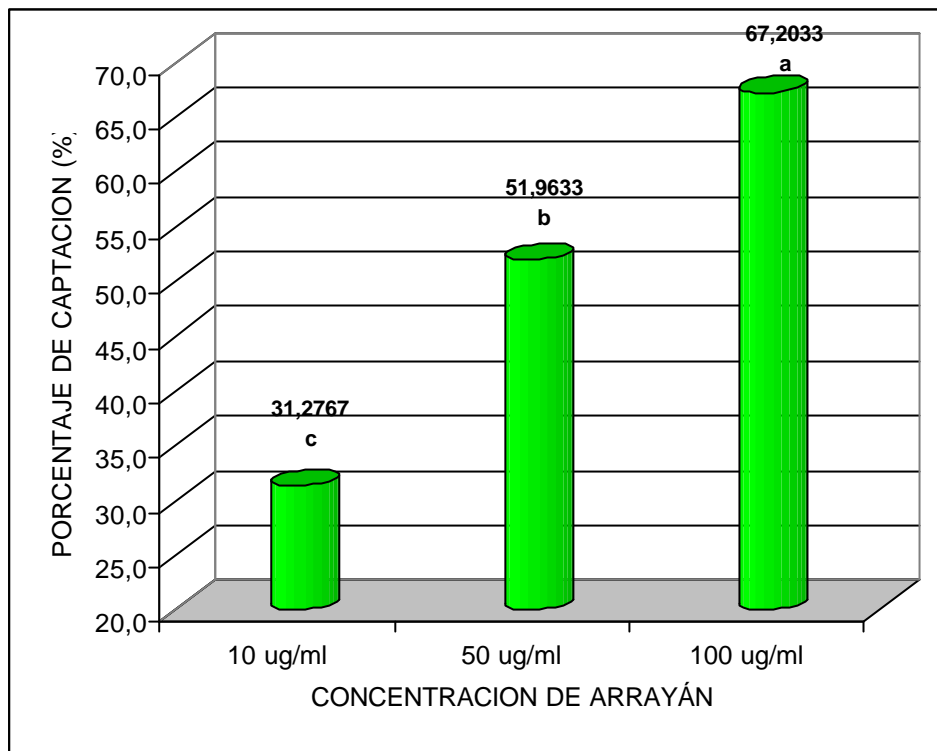


Gráfico 6. Capacidad de captación de radical hidroxilo por el aceite esencial de *Luma chequen*.

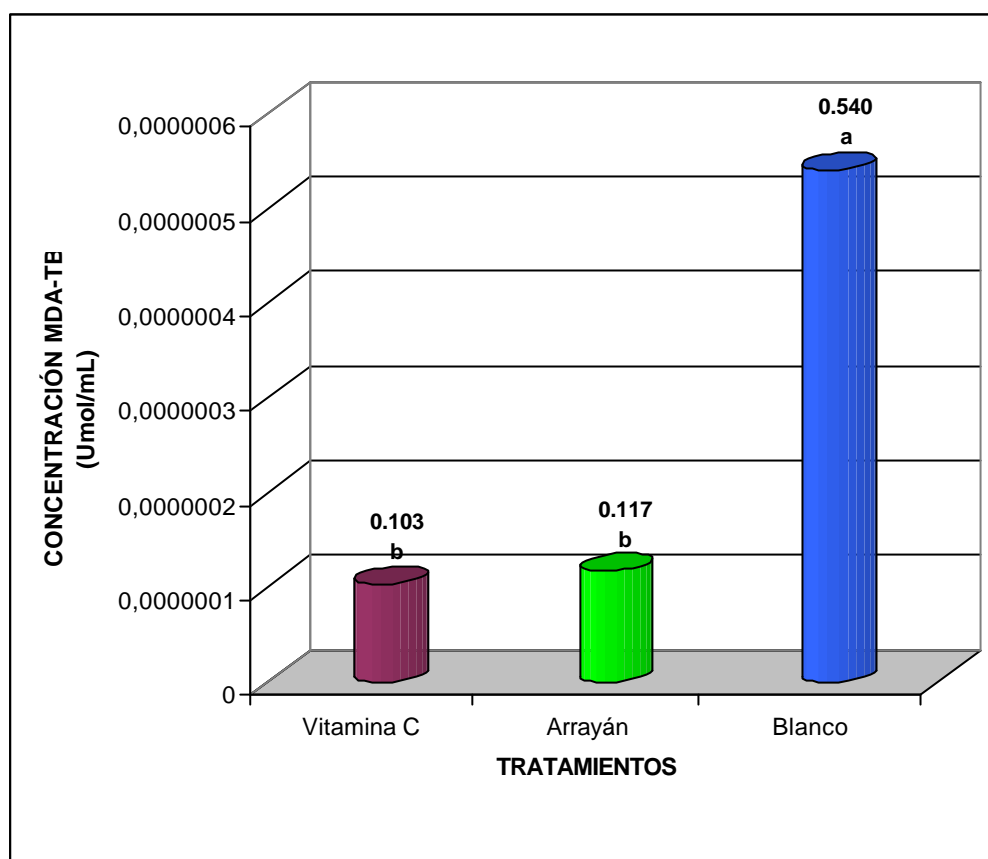
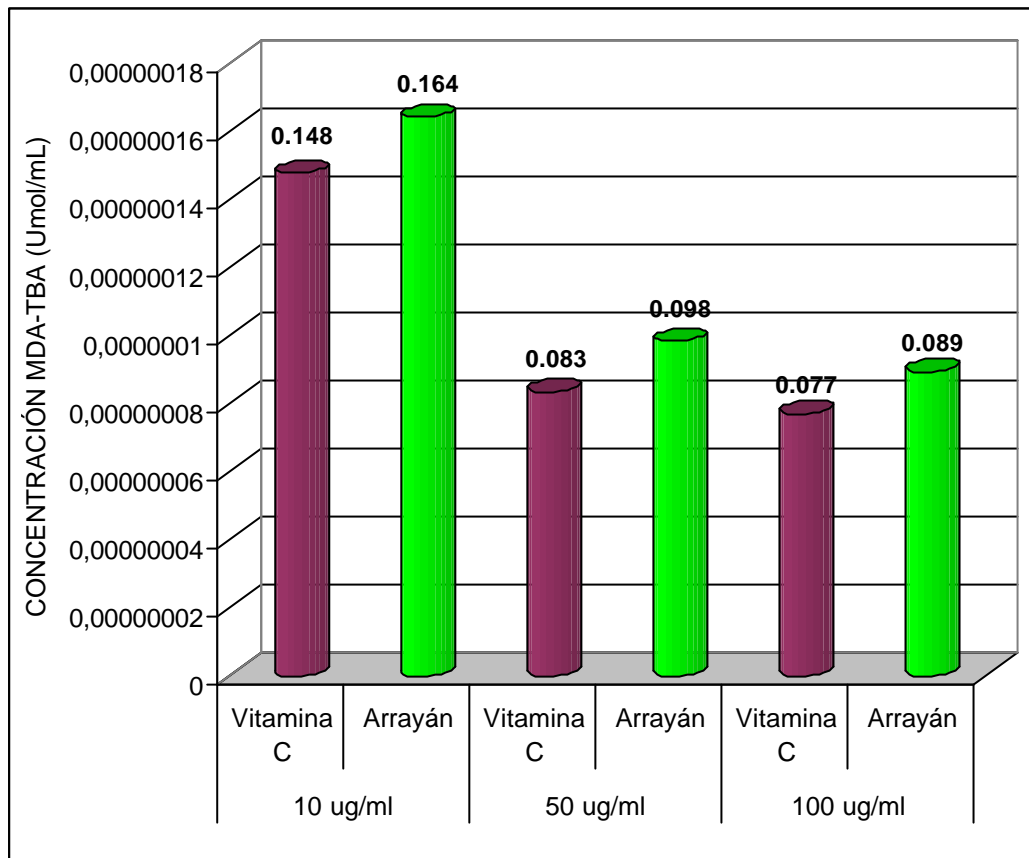


Grafico 7. Inhibición del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico por el aceite esencial de *Luma chequen* comparado con la vitamina C.



10 ug/ml

tc = -9,4783; gl = 4; P= 0,0007; SIGNIFICATIVO

50 ug/ml

tc = -27,8155673; gl = 4; P= 0,0000; SIGNIFICATIVO

100 ug/ml

tc = -41,4862; gl = 4; P= 0,0000; SIGNIFICATIVO

Gráfico 8 Inhibición del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico por el aceite esencial de *Luma chequen* y vitamina C en tres concentraciones.

Tabla 3. Ensayo de toxicidad oral del aceite esencial de *Luma chequen* en ratones albinos.

Concentración (mg/kg)	Síntomas	DL ₅₀ (mg/kg)
2000, 200 y 50	Depresión profunda, incoordinación motora, respiración acelerada, piloerección, arrastra el tren posterior, sedación, reestablecimiento y muerte de un número parcial.	906.1140

Tabla 4. Bioensayo de citotoxicidad del aceite esencial de *Luma chequen* método de *Artemia salina* Leach.

Concentración (ug/ml)	LC ₅₀ (ug/ml)
1000, 100 y 10	28.9013

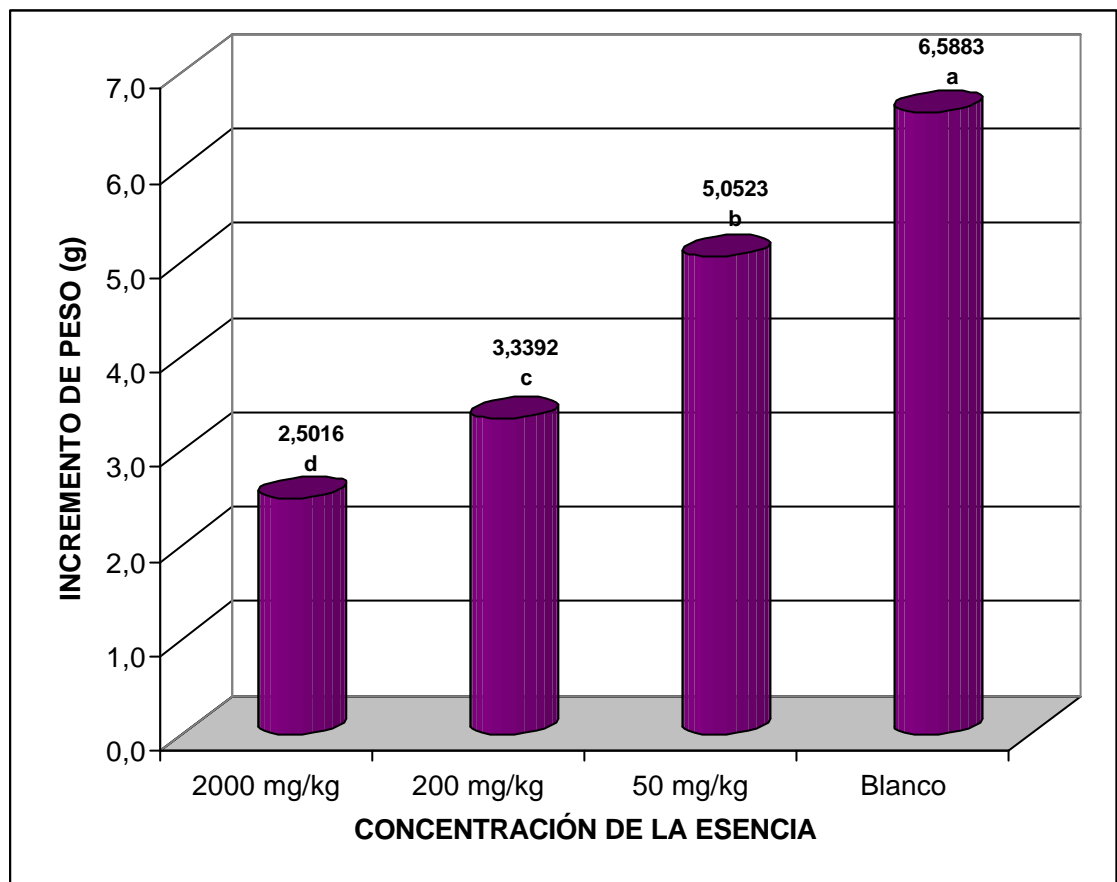


Gráfico 9. Variación en el incremento de peso corporal a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* según la prueba de Tukey.

V. DISCUSIÓN

No existen antecedentes de los valores de las constantes físicas del aceite esencial de *L. chequen*, esto se debe a que es una planta poco conocida en el ámbito científico, y también debido a su condición de especie nativa altoandina, existiendo mayormente informaciones etnobotánicas y etnofarmacológicas; por lo tanto, los reportes de sus principales constantes físicas presentadas en este trabajo serían datos iniciales, según la tabla 1.

En el análisis cualitativo y cuantitativo, tabla 2 y gráfico 1, de la composición química del aceite esencial de *L. chequen*, resultó 40 constituyentes, que representan el 93.6% del total de la muestra. La esencia está constituido principalmente por monoterpenos (87.7%). La fracción de monoterpeno de tipo hidrocarburo (68.8%), presenta al α -pineno (57.3%) y al β -pineno (6.2%), como los componentes mayoritarios; mientras que los monoterpenos oxigenados representan 18.9% del aceite, entre estos tenemos al 1,8-cineol (7.5%), linalol (3.7%) y *trans*-verbenol (2.2%). La fracción de sesquiterpenos representa menos del 3.0% del aceite, los constituyentes que destacan son el β -selineno (1.3%) y óxido de β -cariofileno (0.9%). La fracción no terpénica comprende 5 componentes, constituyendo el 3.0% del aceite, entre ellos, el isobutirato de 2-metilbutilo (1.7%) e isobutirato de isobutilo (1.1%).

Goncalves *et al.* (2001), reportó en un análisis del aceite esencial de esta especie 90.1% de fracción monoterpénica, de los cuales el α -pineno (57.1%), 1,8-cineol (12.1%) y linalol (5.5.%); y en el caso de los sesquiterpenos (3.1.%), mas no reportó la fracción no terpénica⁷.

Estos datos estarían confirmando el predominio del α -pineno, como el mayor constituyente del aceite, caracterizándose por su efecto farmacológico estimulante sobre las células epiteliales, incrementando la motilidad del epitelio ciliado de los bronquios, más el 1,8-cineol que también es conocido por su actividad antiséptica y expectorante, ambos estarían actuando en sinergismo. Estos resultados sustentan su uso popular como expectorante, antiinflamatoria y conservante^{3,4,7,60}.

El aceite esencial de *L. chequen* presenta actividad antioxidante en el modelo del radical DPPH (1,1-diphenyl -2-picryl hydrazyl) comparado con la vitamina C.

En el gráfico 2, se observa los análisis estadísticos de t de Student, con n-1 de grados de libertad, el aceite esencial tiene 63.5600% de capacidad de captación del radical DPPH comparada con la vitamina C con 69.7767%, estadísticamente no existe diferencias significativas; es decir, que el aceite esencial tiene similar capacidad antioxidante que la vitamina C, aunque numéricamente existen diferencias.

En el gráfico 3, se analiza el tratamiento de 3 concentraciones, observándose que de 10 y 50 ug/mL presentan diferencias en su capacidad de captación de radical DPPH, donde la vitamina C tiene mayor capacidad captadora en ambas concentraciones. En 100 ug/mL el aceite y la vitamina C, tienen similar capacidad de captación de radical DPPH, esto estaría indicando que cuanto mayor es la concentración del aceite esencial de "arrayán", tiene mayor potencia antioxidante.

En los gráficos 4 y 5, se presentan las concentraciones de inhibición 50 (IC₅₀). El aceite esencial de "arrayán" presenta 43.3571 ug/mL, y la vitamina C 36.4090 ug/mL, estos valores son próximos, lo cual confirmaría que el aceite esencial de *L. chequen* posee una significativa actividad antioxidante comparada con la vitamina C.

Basándose en este mismo modelo, realizaron un estudio de los aceites esenciales de 34 especies del género Citrus, reportando una significativa actividad antioxidante, encabezada dicha actividad por el geraniol con 87.7% de capacidad de captación del radical DPPH, seguido por terpinoleno (87.4%) y γ -terpineno (84.7%), usando como patrón de comparación al trolox. El aceite esencial de *L. chequen* posee geraniol, que posiblemente sea uno de los componentes que esté dotándole de actividad antioxidante, debido a las instauraciones que presenta dicha estructura molecular⁵⁰.

En el gráfico 6, se estima la actividad captadora de radical hidroxilo, expresado como porcentaje de inhibición de la producción de formaldehído respecto de la reacción de control, presentando diferencias en los porcentajes de inhibición. Según el análisis de varianza, estadísticamente hay diferencias en su capacidad de captación de radical hidroxilo en las tres concentraciones. El de 50 ug/mL y 100 ug/mL, están por encima del 50% de inhibición de la producción de formaldehído. Mientras que de 10 ug/mL se encuentra por debajo de del 50% de capacidad de captación de radical hidroxilo. En este modelo, también, se puede

notar que cuanto mayor es la concentración del aceite esencial, potencia su capacidad antioxidante.

En el gráfico 7, inhibición de producción del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA), resulta que hay diferencias de inhibición, tanto del aceite esencial y la vitamina C frente al control que no posee ningún agente antioxidante, este último se dispara en la concentración del complejo MDA-TBA, llegando hasta 0.540 Umoles/mL. Casi no hay diferencias numéricas de inhibición del complejo MDA-TBA entre el aceite esencial y la vitamina C, el primero presenta 0.117 Umoles/mL frente al 0.103 Umoles/mL de la vitamina C. Estos resultados se estimaron realizando un análisis de varianza y la prueba de Tukey.

En el gráfico 8, se compara los efectos antioxidantes de 3 concentraciones de aceite esencial y vitamina C, a 100, 50 y 10 ug/mL. Estadísticamente hay diferencias en la capacidad de inhibición del complejo MDA-TBA frente a la vitamina C, este último exhibe mayor capacidad de inhibición en cada concentración.

En este modelo, que emplea microsoma hepático de rata, el aceite esencial estaría protegiendo de la peroxidación lipídica, por ello se observa la disminución de concentración del complejo MDA-TBA en los tratamientos que tienen agente antioxidante.

El aceite esencial de *L. chequen*, en los tres modelos ensayados, muestran capacidad antioxidante muy cercana a la vitamina C, que se deben a las estructuras moleculares de sus constituyentes químicos, siendo 40, como se muestra en la tabla 2 y sus espectros en el anexo.

Choi *et al.* (2000), reportó la actividad antioxidante de varios componentes del aceite esencial de 34 especies del género Citrus, revelando que el geraniol es el constituyente químico que más destaca por su actividad antioxidante, pero no es el único. Según este mismo investigador y sus colaboradores, reporta que el α -pineno y linalol posee una capacidad de captación de radical DPPH entre 18.7 – 22.4%, y estas dos moléculas están presentes en el aceite esencial de “arrayán”, el primero constituyendo el principal componente (57.3%) y el linalol (3.7%). Pero además el β -pineno, myrceno, limoneno, p-cimeno, terpinen-4-ol y α -terpineol también están presentes en el aceite esencial ensayado, Choi *et al.* dicen que estos compuestos tienen una capacidad antirradicalaria frente al DPPH entre 8.8 – 16.5% de captación⁵⁰.

Ruberto y Baratta (2000), ensayaron 100 compuestos puros de aceites esenciales en dos modelos de actividad antioxidante, el primero compuesto por ácido tiobarbitúrico y yema de huevo como sustrato oxidable, el segundo haciendo una peroxidación del ácido linoleico en un sistema micelar; en ambos casos usaron el 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) como un radical iniciador, usaron de referente al α -tocoferol. Reportaron que sólo tres de los 100 compuestos no presentaron actividad antioxidante. En estos dos modelos se aprecian que algunos componentes presentes en el aceite esencial de "arrayán" contiene poseen actividad antioxidante dentro de los rangos de captación antirradicalaria 3.2 - 34.9%, en orden ascendente, desde el óxido de *cis*-linalol, óxido de *trans*-linalol, borneol, canfeno, verbenona, pulegona, 1.8-cineol, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, terpinen-4-ol, myrceno, α -tuyona y geraniol⁴⁵.

Sylvestre *et al.* (2005), analizaron el aceite esencial y su actividad anticancerígeno del ***Croton flavens***, mostrando citotoxicidad en líneas celulares de tumor A-549 (de pulmón) y DLD-1 (de colon). Ellos correlacionan que esta actividad, posiblemente, se debe a los componentes llamados α -cadinol (3.97%), β -elemeno (1.53%) y α -humeleno (1.06%)⁵³. Se puede observar que el aceite esencial de ***L. chequen*** tiene β -elemeno, además los radicales libres constituyen uno de los factores condicionantes del cáncer, posiblemente esta molécula sea un potencial anticancerígeno del aceite esencial de "arrayán".

De esta manera estaría justificándose la estructura y actividad antioxidante del aceite esencial de ***L. chequen***. En los 3 modelos, todas las moléculas del aceite esencial actúan en sinergismo, potenciando su capacidad antirradicalaria, dando una protección a las macromoléculas biológicas, como las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos.

Como parte complementaria, se ensayó la toxicidad aguda oral y bioensayo de citotoxicidad del aceite esencial.

En ratones albinos, tabla 3, el aceite esencial demostró efectos fisiológicos de depresión profunda, incoordinación motora, respiración acelerada, piloerección, arrastre del tren posterior, sedación y reestablecimiento de la mayoría de los animales tratados. Murieron 2 ratones tratados a 2000 mg/kg, 1 de 200 mg/kg y 1 de 50 mg/kg. En la observación macroscópica de los

principales órganos: corazón, riñón, bazo, hígado y pulmón, no se apreciaron diferencias significativas de toxicidad frente al control.

La DL₅₀ determinada para el aceite de “arrayán” ha sido 906.1140 mg/kg, siendo ligeramente tóxica según la tabla de Williams⁵⁸; que indicaría que dicha concentración mata el 50% de los ratones en un experimento farmacológico; se justificaría, porque todo aceite esencial purificado es un concentrado potente que contiene componentes de diferentes funciones orgánicas; es más, el uso de un aceite esencial sólo es en gotas. Existen pocos estudios de la toxicidad aguda de los aceites esenciales. Suarez *et al.* (2003), determinó la DL₅₀ para el aceite esencial de **Satureja viminea**, que resultó en 556.8 mg/kg⁶¹.

En el gráfico 9, se aprecia que a diferentes concentraciones de esencia los ratones varían de peso corporal, es así que a 2000 mg/kg de concentración sólo incrementa en 2.5016 g frente al control que incrementa en 6.5883 g. A 200 y 50 mg/kg, incrementa en 3.3392 y 5.0523 g, respectivamente. Dicho resultado, indicaría que el aceite esencial de **L. chequen** inhibe el incremento de peso corporal proporcionalmente al incrementar su concentración. Podría estar relacionado con su actividad hipocolesterolemica de sus extractos, como lo demuestran Jaramillo y col. (2004)⁶.

En la tabla 4, el aceite esencial de **L. chequen** presenta una concentración letal 50 (CL₅₀) de 28.9013 ug/mL, indicando que a esta concentración mata al 50% de los nauplios de **Artemia salina**. Estos resultados también sustentan la capacidad bioactiva del aceite esencial de “arrayán”.

Se puede afirmar que **Luma chequen** “arrayán”, es una especie nativa de los Andes peruanos, con actividad antioxidante y que esta actividad se debe a la concentración y propiedades de sus estructuras moleculares, como el alto porcentaje de α -pineno y 1,8-cineol, que además de haberse detallado sus efectos farmacológicos, son usados para tratamientos de afecciones de las vías respiratorias. El α -pineno es una molécula importante en la semisíntesis de vitamina A y E, esta última es una estructura de elevada capacidad antioxidante. El linalol, fenchona y camfor son usados en la industria farmacéutica y cosmética⁶².

VI. CONCLUSIONES

1. Se elucidó la estructura de 40 compuestos al 93.6% de la muestra total: fracción de hidrocarburos monoterpénicos (68.8%), con sus mayores componentes el α -pineno (57.3%) y β -pineno (6.2%); fracción de hidrocarburos oxigenados (18.9%), destacando 1,8 cineol (7.5%), linalol (3.7%) y *trans*-verbenol (2.2%); fracción sesquiterpénica (3.0%), con el β -selineno (1.3%) y óxido de β -cariofileno (0.9%); y la fracción no terpénica (3.0%).
2. El aceite esencial tiene similar actividad antioxidante que la vitamina C, captando al radical DPPH en 63.5600% frente a la vitamina C que lo hace en 69.7767%; tiene un IC₅₀ de 43.3571 ug/mL frente a la vitamina C de 36.4090 ug/mL. A mayor concentración el aceite esencial posee mayor capacidad captadora de radical hidroxilo, según el modelo ácido ascórbico-hierro-EDTA, inhibiendo la producción de formaldehído, en concentraciones de 100, 50 y 10 ug/mL, que resultan en 67.2033, 51.9633 y 31.2767%, respectivamente. En el modelo de la inhibición de la peroxidación lipídica, reduce la formación del complejo malondialdehido-ácido tiobarbitúrico en 0.117 Umoles/mL y la vitamina C 0.103 Umoles/mL, comparando con el control negativo que exhibe 0.540 Umoles/mL.
3. La DL₅₀ del aceite esencial corresponde 906.1140 mg/kg ensayados en ratones albinos, siendo ligeramente tóxica; su CL₅₀ es 28.9013 ug/mL, ensayados en *Artemia salina* Leach.
4. El aceite esencial de *Luma chequen* tiene un rendimiento de 1.25%v/p, rotación óptica de +6 a -8, densidad de 0.9044 g/mL e índice de refracción 1.470.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Cronquist A.** An integrated system of classification of flowering plants. Edit. Columbia University Press. New York; 1981.
2. **Brako L, Zarucchi J.** Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Perú. Missouri Botanical Garden. Missouri; 1993.
3. **Carhuapoma YM.** Plantas Medicinales Aromáticas Nativas de la Provincia de Huamanga y sus Perspectivas Económicas. UNSCH. Ayacucho; 2002.
4. **Sotta N.** Plantas aromáticas y medicinales de la región de Arequipa. Edit. Akuarella. Arequipa; 2000.
5. **Muñiz M.** Etnobotánica de la flora medicinal de la provincia de Paruro. UNSAAC. Cusco; 1992.
6. **Jaramillo VH, Macha GM, Mejía QM.** Determinación de la actividad hipocolesterolémica en extractos de parte aérea de *Luma chequen* "rayán castilla". UNICA. Ica; 2004.
7. **Goncalves MJ, Calvaleiro C, Salgueiro LR, Proenca AC.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Luma chequen*. University of Coimbra. Portugal; 2001.
8. **Mostacero LJ, Mejia CF, Gamarra TO.** Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Edit. Normas Legales. Trujillo; 2002.
9. **Labbe C, Coll J, Connolly JD, Faine F, Farrugia LJ, Rycroft S.** Bioactive flavanones from *Luma chequen*. Glasgow University library. Scotland; 2002.
10. **Halliwell B, Gutterioge JMC.** Free radical in biology and medicine. Oxford: Clarendon, 1989;1:142.
11. **Halliwell B.** Reactive oxygen species in living systems: Sources, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*, Oxford: Clarendon; 1991.
12. **Freeman BA, Crapo JD.** Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47:412-5.
13. **Basaga HS.** Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1989;68:989-98.
14. **Cadenas E, Packer L.** Handbook of antioxidants. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002.
15. **Rodríguez PJM, Mendez LJR, Trujillo LY.** Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cubana Med Milit* 2001;30(1):15-20.

16. **Turrens J.** Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. Antioxidante y calidad de vida. La Habana; 1994;1:16-9.
17. **Market M, Andrew PC, Babiar BM.** Measurement of superoxide production by human neutrophils. Methods Enzimol. La Habana; 1994;105:358-65.
18. **Venero GJ.** Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cubana Med Milit 2002; 31(2): 126-33.
19. **Miranda ZML.** Influencia de los procesos de germinación y fermentación en la capacidad antioxidante y contenido en vitamina C y E de *Lupinus albus* var. Multolupa. Fac. FyB-UNMSM. Lima; 2003.
20. **Oteiza PA.** Modificación activa de las proteínas. Antioxidante y Calidad de Vida. Rev. Cubana Med Milit; 1995;2:12-20.
21. **Cranfor DR, Davies KJA.** Adaptative response and oxidative stress. Enviñ. Health Perspect. 1994; 102: 25-28.
22. **Surai, P.** Protección antioxidante en el intestino: un buen comienzo es la mitad de la batalla. Centro de investigación de Ciencias Aviar, SAC, Auchincruive. Ayr, Scotland; 2000.
23. **Tosaki A, Droy-Lefaix MI, Pali L, Das DK.** Effects of SOD, catalase and a novel antiarrhythmic drug; EGB 761 on reperfusion induced arrhythmias in isolated rat hearts. Free Radic Biol Med 1993;14:361-70.
24. **Left JA, Parson PE, Day CE.** Increased serum catalase activity in septic patients with the adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 1992;146:985-9.
25. **Kawada T, Kambara K, Arakawa M.** Pretreatment with catalase of dimethyl sulfoxide protects alloxan-induced acute lung edema in dog. J Appl Physiol 1992;73:1326-33.
26. **Zini A, De Lamirande E, Gagnon C.** Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxi dismutase and catalase like activitier in seminal plasma and spermatozoa. Int J Androl 1993;16:183-8.
27. **Salonen JJ.** Risk of cancer in relation to serum concentrations of selenium and Vit. A and E. Matched case control analysis of prospectivedata. Br Med J 1985;290:417-20.
28. **Black G.** Fruit vegetables and cancer prevention: a review of epidemiological evidence. Nutr Cancer 1992;18:1-29.
29. **Burr ML.** Antioxidants and cancer. J Human Nutr Dietetics 1994;7:409-16.

30. **Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G.** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radial Biol Med* 1992;13:341-90.
31. **Packer L.** Vitamin E is nature's master antioxidant. *Sci Am Sci Med* 1994;1:54-63.
32. **Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick R.** Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996;334:1156-62.
33. **Hodis HN, Mack WJ, Labreel C, Hemphill L, Sevanian A, Johnson R, et al.** Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *JAMA* 1995;273:1849-54.
34. **Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheesman K, Mitchison MJ, et al.** Randomised controlled trial of Vit. E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996;347:781-6.
35. **Seddon JM, Ajani VA, Sperduto RD.** Dietary carotenoids, Vit. A, C, and E and advance age-related macular degeneration. *JAMA* 1994;272:1413-20.
36. **Aejmelaus RT, Holm P, Kauskinen U.** Age related changes in the peroxyl radical scavenging capacity of human plasma. *Free Rad Biol Med* 1997;23:69-75.
37. **Wei YH, Kad SH, Lee HC.** Simultaneous increase of mitochondrial DNA deletion and lipid peroxidation in human aging. *Ann NY Acad Sci* 1996;786:23-34.
38. **Luscesoli F, Fraga CG.** Evaluación del estrés oxidativo. *Antioxidante y calidad de vida* 1995;1:8-13.
39. **Potter JD.** Cancer prevention: epidemiology and experiment. *Cancer Lett.* 1997; 114: 7-9.
40. **Amié D, Davidovic-Amié D, Beslo D, Trinajstic N.** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemica acta CCACAA* 2003; 76 (1): 55-61.
41. **Bandoni, A.** Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Edit. UNLP-CYTED. Bs. As.; 2000 .

42. **Bruneton, J.** Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2da. Edición. Zaragoza – España: Acribia S.A.; 2001.
43. **Lahlou M.** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *J Phytother Res* 2004; 18:435-448.
44. **García BL, García GL, Rojo DD, Sánchez GE.** Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001; 20(3): 231-5.
45. **Ruberto G, Baratta MT.** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *J Food chemistry* 2000; 69: 167-174.
46. **Radonic A, Milos M.** Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L. *J Free Radical Research* 2003; 37 (69): 673-679.
47. **Juliani HR, Simon JE.** Antioxidant activity of basil. ASHS Press, Alexandria VA; 2002.
48. **Vasconcellos A.** Alimentos funcionales. Consejos y beneficios para la salud. Depart de Ciencias de Alimentos y Nutrición, Universidad Chapman, California; 2000.
49. **Zygodlo J, Lamarque A, Maestri D, Grosso N.** Empleo de aceites esenciales como antioxidantes naturales. Instituto de la Grasa, Ministerio de Ciencia y Tecnología. España; 1995.
50. **Choi H, Song SH, Ukeda H, Sawamura M.** Radical-Scavenging activities of Citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 4156-4161.
51. **Rekka EA, Kourounakis AP, Kourounakis PN.** Investigation of the effect of chamazulene on lipid peroxidation and free radical proceses. *Rev. Commun Mol Pahtol Pharmacol* 1996; 92 (3): 361 4.
52. **Ricci D, Fraternali D, Giamperi L, Bucchini A, Epifano F, Burini G, Curini M.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium morum* (Lamiaceae). *J Ethnopharmacology* 2005; 98: 195-200.
53. **Sylvestre M, Pichette A, Longtin A, Nagau F, Lagault J.** Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. 2005; xxx:xxx-xxx.
54. **Joyeux M, Lobtein A, Antón R, Mortier F.** Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Gingo and some flavonoids. *Planta Med.* 1995; 61: 126-129.

- 55. Klein SM, Cohen G, Cederbaum AI.** Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems. *Biochemistry* 1981; 20:6006-6012.
- 56. Buege JA, Aust SD.** Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology* 1978; 52: 302-310.
- 57. Lagarto PA, Tillan CJ, Vega MR, Cabrera GY.** Toxicidad aguda oral de extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales. *Rev. Cubana Plant Med* 1999; 1(4): 26-8.
- 58. CYTED.** Manual de técnicas de investigación. Sub programa X. Química Fina Farmacéutica. Panamá; 1995.
- 59. Wayne D.** Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta. Edición. Edit. Limusa Wiley. México; 2002.
- 60. Kuklinski, C.;** Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona – España: Ediciones Omega, S.A.; 2003.
- 61. Suarez A, Echando MM, Ulate G.** Pharmacological activity of the essential oil of *Satureja viminea* (Lamiaceae). *Rev. boil. Trop. Mar.* 2003; 51 (1): 247-257.
- 62. Hänsel R, Sticher O.** Pharmakognosie – phytopharmazie. 7th edn. Springer-Verlag. Berlin, 2004.

ANEXOS