

**ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Plectranthus amboinicus*
(Lour.) Spreng. AISLADOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN
Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

SAMIR SUÁREZ TORRENEGRA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2017

**ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Plectranthus amboinicus*
(Lour.) Spreng. AISLADOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN
Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

SAMIR SUÁREZ TORRENEGRA

**Trabajo de investigación como requisito parcial para optar
por el título de Químico**

Directora

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph. D.

Co-directores

JAIRO R. MARTÍNEZ MORALES, Químico, Ph. D.

YURI CÓRDOBA CAMPO, Química, M. Sc.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2017

DEDICATORIA

A las mujeres que amo, mi santísima trinidad: a mi madre, a Lila y a Zuu.

A mis hermanos: Fefi, Brey y Salmito.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por ser mi apoyo incondicional.

A la Profesora Elena por insistir en motivarme a perseverar, salir adelante, persistir sin decaer y por compartir sus conocimientos y enseñanzas. De igual manera al Profesor Jairo René por sus aportes y recomendaciones.

A todos y cada uno de los miembros del equipo de trabajo de CENIVAM y CROM-MASS, por la camaradería y experiencias académicas y de vida compartidas.

A la Universidad Industrial de Santander, fue un honor el haber tenido la oportunidad de formarme académicamente en su claustro.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	21
1. MARCO TEÓRICO	23
1.1. GÉNERO <i>Plectranthus</i>	23
1.1.1. <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	23
1.2. METABOLITOS SECUNDARIOS	25
1.2.1. Terpenoides	26
1.2.2. Compuestos fenólicos	29
1.3. SECADO DE MATERIAL VEGETAL	32
1.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	33
1.4.1. Métodos destilativos	33
1.4.2. Métodos extractivos	33
1.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	37
1.5.1. Estrés oxidativo	37
1.5.2. Antioxidantes	38
1.5.3. Antioxidantes sintéticos	39
1.5.4. Antioxidantes naturales	40
1.5.5. Capacidad antioxidante	41
1.6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	45
1.6.1. Cromatografía de gases	45
1.6.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia	47
2. CIENCIOMETRÍA	50
3. PARTE EXPERIMENTAL	55
3.1. REACTIVOS, SOLVENTES, MATERIALES Y EQUIPOS	55
3.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	57

3.3. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	57
3.4. AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	59
3.4.1. Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.....	59
3.4.2. Extracción con CO ₂ supercrítico	60
3.4.3. Microextracción en fase sólida con muestreo en espacio de cabeza	62
3.4.4. Extracciones hidroalcohólicas.....	63
3.4.5. Dispersión de matriz en fase sólida.....	65
3.5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	66
3.5.1. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	66
3.5.2. Análisis por cromatografía de gases con detector de ionización en llama	68
3.5.3. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia con analizador de tiempo de vuelo	70
3.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	72
3.6.1. Ensayo de la absorción de radicales de oxígeno.....	73
3.6.2. Ensayo de la decoloración del catión-radical ABTS ⁺	74
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	75
4.1. SECADO DEL MATERIAL VEGETAL	75
4.2. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE Y LOS EXTRACTOS DE <i>P. amboinicus</i>	76
4.2.1. Caracterización química del AE aislado por MWHD.....	76
4.2.2. Caracterización química del extracto obtenido con CO ₂ supercrítico	80
4.2.3. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico.....	88
4.2.4. Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto obtenido por dispersión de matriz en fase sólida.....	93
4.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL Y LOS EXTRACTOS AISLADOS DE <i>P. amboinicus</i>	96
CONCLUSIONES	99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

BIBLIOGRAFÍA..... 111

ANEXOS..... 122

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng. Fuente: Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 27 de enero de 2015.	24
Figura 2. Esquema de la biosíntesis de acetil coenzima A en plantas [17].	26
Figura 3. Estructuras moleculares de la unidad isoprénica C ₅ y del isopreno [17].	27
Figura 4. Rutas metabólicas para la biosíntesis de los precursores de terpenoides [16.].	28
Figura 5. Estructura general y clasificación de los flavonoides [18].	30
Figura 6. Rutas para la biosíntesis de compuestos fenólicos en plantas [16].	31
Figura 7. Dispositivo utilizado en microextracción en fase sólida con muestreo en espacio de cabeza. Modificado de [40].	35
Figura 8. Estructuras moleculares de algunos de los antioxidantes sintéticos más utilizados comercialmente.	39
Figura 9. Estructuras moleculares de los terpenoides fenólicos carvacrol y timol.	40
Figura 10. (A) Descomposición térmica del AAPH, generador de radicales. (B) Reacción de la fluoresceína con los radicales generados y formación de productos no fluorescentes y no radicales.	42

- Figura 11.** Curvas de decaimiento de la fluorescencia por oxidación de la fluoresceína en un blanco y en presencia de un antioxidante en una muestra. 43
- Figura 12.** Estructuras químicas del catión-radical ABTS⁺ y de su forma neutra [66]. 44
- Figura 13.** Relación de publicaciones por año. Fecha de realización: 7 de julio de 2016. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de de observación: 2007-2016 Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY("Plectranthus amboinicus")*. 50
- Figura 14.** Material vegetal de *P. amboinicus* dispuesto en bandejas (A) cubiertas de papel en las estanterías del vivero (B) para su secado a la sombra. Fuente: Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 10 de abril de 2015. 58
- Figura 15.** Balón fondo redondo de 2L con material vegetal a hidrodestilar (izquierda). Montaje de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (derecha). Fuente: Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 11 de septiembre de 2015. 59
- Figura 16.** Equipo Thar SFE-2000-2-FMC50 Fuente: Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 31 de octubre de 2016. 61
- Figura 17.** Montaje utilizado para la microextracción en fase sólida con monitoreo en espacio de cabeza de los extractos obtenidos con CO₂ de *P. amboinicus*. Fuente: Autor, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS. Bucaramanga, 17 de diciembre de 2017. 62
- Figura 18.** Montaje utilizado para la obtención de extractos hidroalcohólicos. Fuente: Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 19 de diciembre de 2016. 63
- Figura 19.** Mortero con pistilo, dispersante y material vegetal utilizados para la obtención de extractos por dispersión de matriz sólida. Fuente: Autor, CENIVAM. UIS, Bucaramanga, 10 de noviembre de 2016. 65

- Figura 20.** Cromatógrafo de *AT 6890 Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *AT MDS 5973 Network*. Fuente: Autor, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, 9 de septiembre de 2015. 66
- Figura 21.** Cromatógrafo de gases *AT 6890N Series*, acoplado a un detector de ionización en llama (FID). Fuente: Autor, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, 9 de septiembre de 2015. 69
- Figura 22.** Cromatógrafo líquido *AT 1200 Series* con analizador de tiempo de vuelo *AT TOF-MS 6210 Series*. Fuente: Autor, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS. Bucaramanga, 17 de diciembre de 2016. 71
- Figura 23.** Lector de microplacas *Turner Biosystems Inc. Modulus™ II Microplate Multimode Reader*. Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 26 de julio de 2016. 73
- Figura 24.** Curva de secado a la sombra de *P. amboinicus*. 75
- Figura 25.** Perfil cromatográfico del AE de *P. amboinicus* aislado por MWHD. Columna DB-5MS, 60 m. *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). 78
- Figura 26.** Ruta de fragmentación (EI, 70 eV) del carvacrol. 79
- Figura 27.** Perfiles cromatográficos del extracto supercrítico de *P. amboinicus*. A. Fracción 1 y B. Fracción 2. Columna DB-5MS, 60 m. *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). 82
- Figura 28.** Estructura molecular de la α -amirina. 83
- Figura 29.** Perfiles cromatográficos de los volátiles aislados por HS-SPME de las fracciones 1 (A) y 2 (B) del extracto supercrítico de *P. amboinicus*. Columna DB-WAX, 60 m. *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). 85
- Figura 30.** Estructuras químicas de los flavonoides aislados en el extracto etanólico de *P. amboinicus*. 91

Figura 31. Cromatograma de corriente iónica extraída (LC-ESI+-TOF-MS) del extracto etanólico de <i>P. amboinicus</i> .	92
Figura 32. Cromatograma de corriente iónica extraída (LC-ESI+-TOF-MS) del extracto MSPD de <i>P. amboinicus</i> .	93
Figura 33. Curva de calibración para la cuantificación de luteolina.	94
Figura 34. Curva de calibración para la cuantificación de apigenina.	95

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Identificación taxonómica de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	23
Tabla 2. Especies reactivas de nitrógeno y oxígeno que intervienen en los mecanismos de señalización celular.	37
Tabla 3. Resultados de los estudios de la composición del AE de <i>P. amboinicus</i> reportados por Velasco y colaboradores [13]; Senthilkumar y colaboradores [79]; Kweka y colaboradores [80]; y Costa y colaboradores[81], junto con sus respectivos colaboradores.	52
Tabla 4. Variaciones en el rendimiento y la composición del AE de <i>P. amboinicus</i> obtenido por hidrodestilación [83].	53
Tabla 5. Reactivos, solventes, materiales y equipos auxiliares de laboratorio utilizados en el desarrollo de esta investigación.	55
Tabla 6. Identificación taxonómica de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	57
Tabla 7. Variables y niveles evaluados en el diseño factorial 2 ⁴ para las extracciones hidroalcohólicas de <i>P. amboinicus</i> .	63
Tabla 8. Diseño experimental 2 ⁴ para las extracciones hidroalcohólicas.	64
Tabla 9. Caracterización química del AE de <i>P.amboinicus</i> .	78
Tabla 10. Caracterización química del extracto supercrítico de <i>P.amboinicus</i> .	82

Tabla 11. Caracterización química de la fracción volátil del extracto supercrítico de <i>P.amboinicus</i> .	86
Tabla 12. Resultados del diseño experimental propuesto para las extracciones hidroalcohólicas.	88
Tabla 13. Análisis de varianza para los valores ORAC del diseño experimental.	89
Tabla 14. Combinación de los niveles de los factores que maximizan el valor ORAC.	90
Tabla 15. Identificación de metabolitos secundarios no volátiles presentes en el extracto etanólico de <i>P. amboinicus</i> .	92
Tabla 16. Identificación de metabolitos secundarios no volátiles presentes en el extracto MSPD de <i>P. amboinicus</i> .	94
Tabla 17. Cuantificación por LC-ESI ⁺ -TOF-MS de los extractos etanólicos y MSPD de <i>P. amboinicus</i> .	95
Tabla 18. Valores de capacidad antioxidante del aceite esencial y los extractos de <i>P. amboinicus</i> .	96

ANEXOS

Pág.

- Anexo 1.** Espectro de masas experimental del carvacrol obtenido por GC-MS. Impacto de electrón, EI (70 eV). 123
- Anexo 2.** Espectros de masa de la luteolina. A. Patrón certificado de luteolina, B. Luteolina en el extracto etanólico y C. Luteolina en el extracto MSPD de *P. amboinicus* (LC-ESI⁺-TOF-MS). 124
- Anexo 3.** Espectros de masas de la apigenina. A. Patrón certificado de apigenina, B. Apigenina en el extracto etanólico y C. Apigenina en el extracto MSPD de *P. amboinicus* (LC-ESI⁺-TOF-MS). 125

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. AISLADOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE*

AUTOR: SAMIR SUÁREZ TORRENEGRA**

PALABRAS CLAVE: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., metabolitos secundarios, GC-MS, HPLC-ESI⁺-TOF, capacidad antioxidante, ORAC, ABTS⁺

DESCRIPCIÓN:

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng. (*P. amboinicus*), planta comúnmente conocida como falso orégano, es un arbusto de floración perenne originaria del continente africano que crece de manera silvestre a lo largo y ancho de la región intertropical del globo.

En este trabajo de investigación se determinó la composición química del aceite esencial (AE) obtenido por hidrodestilación asistida por radiación de microondas y los extractos aislados con CO₂ supercrítico (SFE), mezclas hidro-etánolicas y por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), a partir de material vegetal seco de las partes aéreas de *P. amboinicus*. La identificación de los compuestos presentes se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con interfaz de electronebulización operada en modo positivo y analizador de tiempo de vuelo (HPLC-ESI⁺-TOF). La evaluación de la capacidad antioxidante de los metabolitos aislados se realizó por medio de los ensayos de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y la decoloración del catión-radical ABTS⁺.

Se identificaron 24 compuestos en el AE, 26 en el extracto SFE y dos en los extractos etánolicos y en el extracto MSPD.

Los valores de la capacidad antioxidante evaluada por el ensayo ORAC para el AE y todos los extractos obtenidos, fueron mayores que los determinados para los antioxidantes de referencia BHT y α -tocoferol. En cuanto al ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺, tan sólo el valor determinado para el AE fue mayor que el que se determinó para los antioxidantes de referencia, mientras que el determinado para los diferentes extractos, fue menor.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Dra. Elena E. Stashenko y Dr. Jairo R. Martínez.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF SECONDARY METABOLITES OF *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. ISOLATED BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS AND EVALUATION OF THEIR ANTIOXIDANT CAPACITY*

AUTHOR: SAMIR SUÁREZ TORRENEGRA**

KEYWORDS: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., secondary metabolites, antioxidant capacity, ORAC, ABTS⁺

DESCRIPTION:

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng. (*P. amboinicus*), a plant commonly known as Indian borage, is a perennial shrub native to the African continent that grows wildly throughout the intertropical region of the globe.

This research determined the chemical composition of the essential oil (EO) obtained by microwave-assisted hydrodistillation and the extracts isolated by supercritical fluid extraction (SFE), ethanolic extractions and matrix solid-phase dispersion extraction (MSPD), from the dried aerial parts of *P. amboinicus*. The identification of the compounds was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (HPLC-ESI⁺-TOF). The evaluation of the antioxidant capacity of the isolated metabolites was evaluated by the oxygen radical absorption capacity (ORAC) and the ABTS⁺ radical-cation decolorization essays.

A total of 24 compounds were identified in the EO, 26 in the SFE extract and two in the ethanolic and MSPD extracts.

The values of the antioxidant capacity evaluated by the ORAC essay and all the extracts were higher than those determined for the reference antioxidants BHT and α -tocopherol. By the ABTS⁺ radical-cation decolorization essay, only the value of antioxidant capacity of the EO higher than the ones determined for the reference antioxidants BHT and α -tocopherol, the ones determined for all the extracts were lower.

* Undergraduate final project

** Science Faculty, Chemistry School. Tutors: Dr. Elena E. Stashenko and Dr. Jairo R. Martínez.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAPH	<i>2,2' - Azobis (2-amidopropano) dihydrochloride</i> [Cloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)]
ABC	Área bajo la curva
ABTS	<i>2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i> [Ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Aceite(s) esencial(es)
AO	Antioxidante(s)
BHA	<i>Butylated hydroxyanisole</i> (Hidroxibutilanisol)
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i> (Hidroxitolueno butilado)
ca.	<i>Circa</i> (aproximadamente)
CAR/PDMS	<i>Carboxen®/Polydimethylsiloxane</i> (Carboxen®/Polidimetilsiloxano)
CENIVAM	Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
CV	Coeficiente de variación
d_f	Grosor de la fase estacionaria
D. I.	Diámetro interno
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
EI	<i>Electron Impact</i> (Impacto de electrones)
EIC	<i>Extracted Ion Current</i> (Corriente iónica extraída)
ERN	Especies radicales de nitrógeno
ERO	Especies radicales de oxígeno
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)
ET	<i>Electron Transfer</i> (Transferencia de electrón)
eV	Electronvoltio
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)

GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i> (Transferencia de átomo de hidrógeno)
HD	<i>Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HS-SPME	<i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida con monitoreo en espacio de cabeza)
<i>i.e.</i>	<i>Id est</i> (Es decir)
IPP	Isopentenil pirofosfato
<i>Istd</i>	<i>Internal standard</i> (Patrón interno)
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de matriz en fase sólida)
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por radiación microondas)
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorption Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales oxígeno)
PPP	Prenil difosfato
RL	Radical libre
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
TEAC	<i>Trolox® Equivalent Antioxidant Capacity</i> (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox®)
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)
TOF	<i>Time of Flight</i> (Tiempo de vuelo)
t_R	Tiempo de retención
Trolox®	<i>6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid</i> (Ácido 6-hidroxi-2,4,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)
UV-vis	Ultravioleta-visible

INTRODUCCIÓN

Las plantas son uno de los recursos naturales más antiguos utilizados por el hombre en el tratamiento de muchas enfermedades. La medicina tradicional utiliza plantas tanto nativas como introducidas en diversas preparaciones, para curar y prevenir todo tipo de dolencias [1].

El poder curativo de las plantas, se encuentra directamente ligado a la presencia de compuestos biológicamente activos producidos en sus procesos metabólicos [2].

Durante el metabolismo primario de las plantas, se producen compuestos químicos que juegan un papel crucial en la supervivencia de las mismas; es decir, en la producción de nutrientes, la respiración y el transporte de fluidos desde y hacia todas sus partes. A estos compuestos, se les denomina metabolitos primarios [3].

Los metabolitos secundarios se sintetizan para intervenir en el mecanismo de interacción de la planta con su medio circundante: por un lado, les permiten establecer relaciones simbióticas, y por el otro, protegerse de agentes externos que puedan alterar sus funciones básicas [4].

El estudio de las diferentes propiedades de estos compuestos no sólo ha favorecido mejorar la comprensión de la dinámica de los sistemas biológicos vegetales, sino que también ha permitido su aplicación en campos como la toxicología, la farmacología, la biotecnología y la tecnología de alimentos, entre otros [5].

Una de las propiedades interesantes de las plantas es la capacidad antioxidante de sus metabolitos secundarios [6, 7]. Esta característica se aprovecha a nivel industrial en la formulación de productos de consumo, razón por la cual, muchas investigaciones centran su interés en la búsqueda y la evaluación del efecto antirradicalario de los compuestos de origen natural contra agentes oxidantes [6].

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng. (*P. amboinicus*), planta con un uso etnobotánico ampliamente conocido, es una especie promisoría como fuente

de antioxidantes naturales que puedan reemplazar a compuestos de origen sintético [8-10].

Este trabajo tiene como fin la evaluación de la capacidad antioxidante de algunos de los metabolitos secundarios de *P. amboinicus* presentes en el aceite esencial (AE) y en diferentes extractos, mediante ensayos como la decoloración del catión-radical ABTS^{•+} y la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).

1. MARCO TEÓRICO

1.1. GÉNERO *Plectranthus*

El género *Plectranthus* pertenece a la familia Lamiaceae, se encuentra constituido por aproximadamente unas 300 especies que pueden encontrarse principalmente en África, al sur del desierto del Sahara, en la península Arábiga, India y Australasia [11]; cerca de 62 de estas especies se utilizan en diversas aplicaciones a nivel medicinal, ornamental, alimenticia, como saborizante e incluso forraje [12].

1.1.1. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

P. amboinicus es un arbusto perenne que puede llegar a alcanzar una altura entre 1 y 1,5 m, posee tallos algo leñosos en la base, cerca de la raíz (**Figura 1**); sus hojas son de color verde un poco pálido, carnosas, gruesas, ligeramente aromáticas y están cubiertas de vellosidades muy finas [11]. En la **Tabla 1**, se muestra la clasificación botánica de *P. amboinicus* [2].

Tabla 1. Identificación taxonómica de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

Dominio	Eucariota
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Plectranthus</i>
Especie	<i>amboinicus</i>

En el estado de floración, *P. amboinicus* presenta inflorescencias terminales en una espiga que mide entre 10 y 30 cm de largo, de la que se desprenden racimos densos de pequeñas flores que no superan los 0,5 cm y que poseen una coloración

blanca o violácea [11]; crece de manera silvestre a lo largo y ancho de la franja intertropical del globo (África, el Sudeste Asiático, India, las Antillas, Centro y Sudamérica). A *P. amboinicus* se le conoce popularmente con los nombres de orégano, falso orégano, orégano francés, borraja india, entre otros [2,9] y es sinónimo taxonómico de: *P. aromaticus*, *Coleus amboinicus* y *C. aromaticus*, por mencionar los más conocidos [12-14].



Figura 1. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Fuente: Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 27 de enero de 2015.

La planta es originaria de una amplia región del continente africano comprendida desde Kenia, se extiende hacia el sur hasta Natal en Sudáfrica, y llega hasta Angola en el suroccidente. Los registros históricos indican que, gracias a sus propiedades medicinales, primero se introdujo en el Lejano Oriente e India por colonizadores y viajeros portugueses provenientes de puertos coloniales africanos como Lourenço Marques, hoy Maputo, capital de Mozambique, y luego, se llevó a América [11].

En los diferentes lugares del mundo donde se encuentra, tiene varios usos: a nivel ornamental, como alimento y aditivo para comidas; en la elaboración de materiales y en medicina tradicional para el tratamiento de diversas patologías dermatológicas y de los sistemas digestivo, respiratorio, genital y urinario, muscular y esquelético; además, se usa en el tratamiento para aliviar el dolor, tratar infecciones y el síndrome febril [2,12,14].

1.2. METABOLITOS SECUNDARIOS

Se denomina metabolismo primario al conjunto de reacciones de síntesis, degradación e interconversión de compuestos que son comunes a todos los seres vivos. Todas estas reacciones se encuentran directamente ligadas al crecimiento, desarrollo y reproducción de cualquier organismo viviente. A todos los compuestos involucrados en tales reacciones se les conoce como metabolitos primarios. La **Figura 2** muestra un esquema general de la síntesis en plantas de acetil coenzima A, metabolito primario y precursor de muchas rutas metabólicas [15-19].

Los terpenoides y los compuestos fenólicos son biosintetizados por las plantas en diferentes rutas metabólicas [15-19].

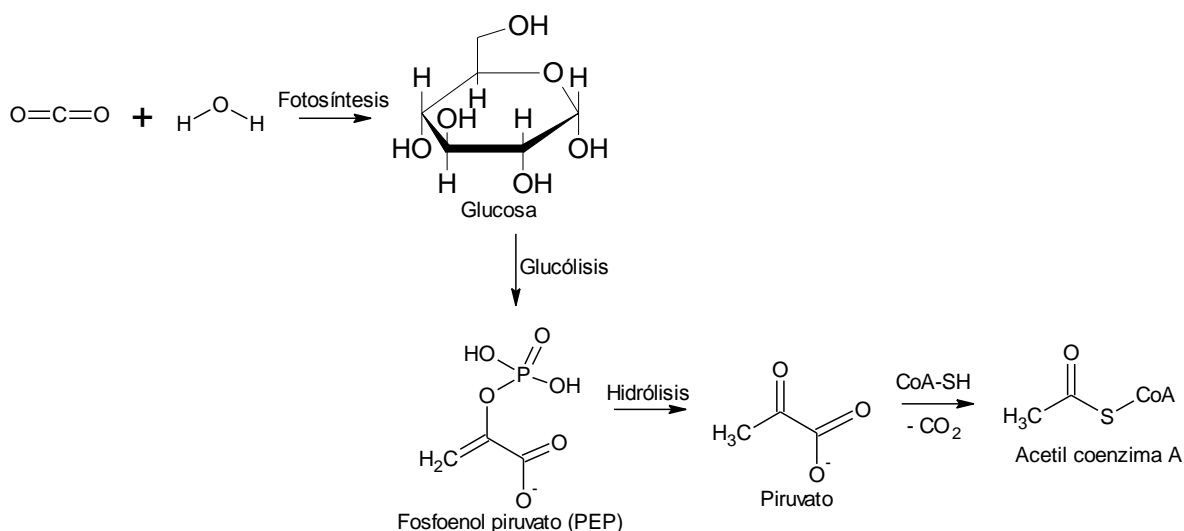


Figura 2. Esquema de la síntesis de acetil coenzima A en plantas [17].

Durante el metabolismo secundario, se sintetizan compuestos a partir de productos e intermedios del metabolismo primario; sin embargo, a diferencia de los metabolitos primarios, las funciones que desempeñan estas estructuras moleculares están directamente relacionadas con el mecanismo de defensa contra posibles predadores, atrayentes volátiles de la misma u otras especies, o agentes colorantes para atraer o advertir a otras especies, entre otras [15]. Los metabolitos secundarios, se pueden clasificar en tres grandes grupos: (1) terpenoides, (2) compuestos fenólicos y (3) compuestos nitrogenados. Estos compuestos se sintetizan en las plantas a través de diferentes rutas metabólicas [15-19].

1.2.1. Terpenoides

Los terpenoides son compuestos con estructuras moleculares conformadas por unidades isoprénicas, las cuales son similares a la estructura del isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Cada unidad isoprénica se encuentra constituida por cinco átomos de carbono (C_5), de ahí que el número total de carbonos en cualquier terpenoide sea múltiplo de cinco (**Figura 3**) [17].

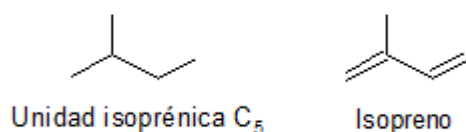


Figura 3. Estructuras moleculares de la unidad isoprénica C₅ y del isopreno [17].

Estos compuestos pueden ser lineales o cíclicos, ello depende de que su estructura molecular sea abierta o de que haya presencia de uno o varios anillos. El número de unidades de isopreno (C₅) presentes en un terpenoide, también permite clasificarlo como: monoterpénico (C₁₀), sesquiterpénico (C₁₅), diterpénico (C₂₀), sesterpénico (C₂₅), triterpénico (C₃₀) o tetraterpénico (C₄₀) [15-17].

1.2.1.1. Rutas del ácido mevalónico y del metileritritol fosfato

En las rutas del ácido mevalónico y del metileritritol fosfato se forman los precursores de las unidades isoprénicas C₅: el isopentil difosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP), conforman las estructuras moleculares de los terpenoides [15].

La ruta del ácido mevalónico (**Figura 4**) inicia con la unión en dos pasos sucesivos de tres moléculas de acetil coenzima A para formar el mevalonato, que luego de fosforilarse produce el IPP, que, a su vez puede isomerizarse en DMAPP [17].

En la ruta metabólica del metileritritol fosfato, el ácido pirúvico (producto final de la glucólisis) reacciona con el gliceraldehído 3-fosfato (intermediario en varias rutas metabólicas) para generar 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato, posteriormente se produce 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (metileritritol fosfato), a partir del cual se sintetiza el IPP y su isómero DMAPP [15].

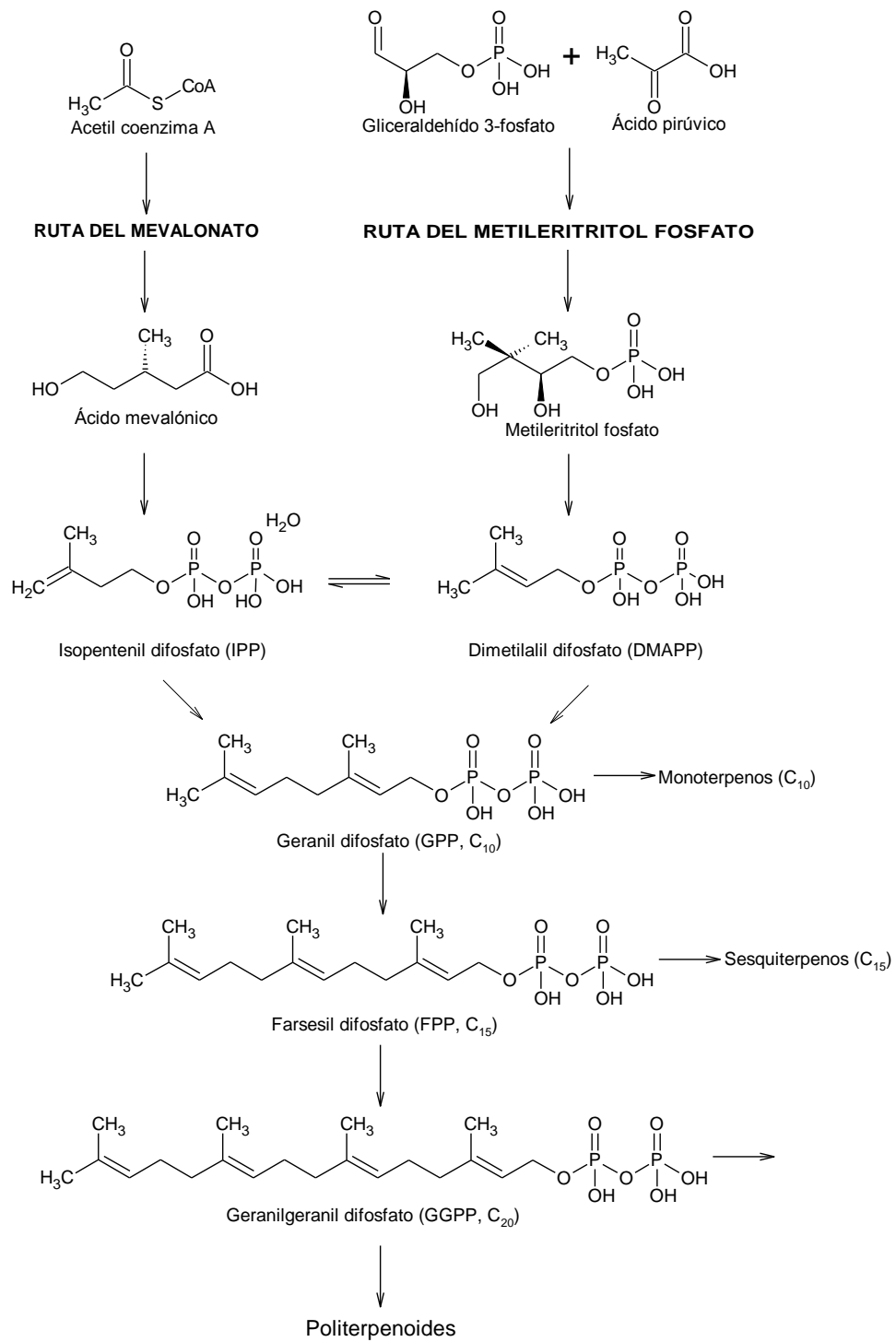


Figura 4. Rutas metabólicas para la biosíntesis de los precursores de precursores de terpenoides [16].

El enlace de una unidad precursora IPP (“cabeza”) con una unidad precursora DMAPP (“cola”), conocido como uniones “cabeza-cola” produce geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenoides lineales. La adición sucesiva de unidades precursoras a las uniones “cabeza-cola”, previamente formadas, produce precursores de terpenoides de cadenas más largas, como el geranil difosfato (GPP), el farnesil difosfato (FPP) y el geranilgeranil difosfato (GGPP) [17].

1.2.1.2. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son mezclas líquidas y lipofílicas, aisladas de material vegetal (raíces, tallos, hojas, flores e incluso semillas) por medio de técnicas destilativas de separación [20]. Las sustancias que los componen (terpenoides en su mayoría) son las responsables de su olor particular, poseen pesos moleculares que no superan los 300 Da y sus presiones de vapor son muy altas [21]. Los AE se encuentran constituidos en menor proporción por compuestos orgánicos de diferente naturaleza química, tales como: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos que al igual que los terpenoides, son productos del metabolismo secundario de las plantas [22].

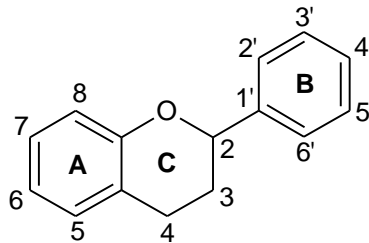
1.2.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sustancias que tienen uno o varios grupos hidroxilo unidos a los anillos aromáticos de sus estructuras moleculares [18].

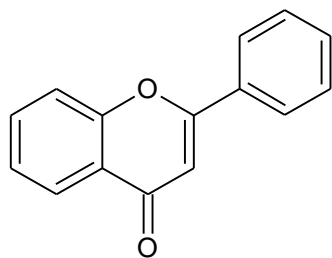
Pueden clasificarse en varios grupos, de los cuales, entre los principales y los más abundantes, se destacan los ácidos fenólicos y los flavonoides. Por otro lado, las cumarinas, naftoquinonas, xantonas y estilbenos se encuentran en menores cantidades. En las plantas, todas las clases de compuestos fenólicos hacen parte de una misma mezcla y no se encuentran como componentes separados [23].

Los flavonoides son compuestos que contienen 15 átomos de carbono distribuidos en dos anillos bencénicos (A y B), unidos entre sí por tres átomos de carbono (C),

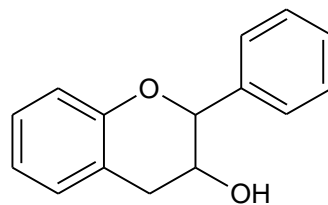
en una configuración C₆-C₃-C₆ [18]. Se han reportado cerca de 8000 estructuras diferentes y su clasificación depende de las posibles variaciones estructurales por la presencia de sustituyentes en distintas posiciones (**Figura 5**) [24]. Entre los diferentes tipos de flavonoides se encuentran flavonas, flavanos, flavonoles, flavononas, las antocianidinas e isoflavonas [18, 23-25].



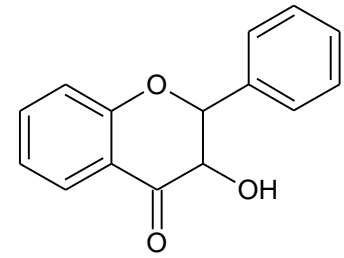
Estructura general de los flavonoides



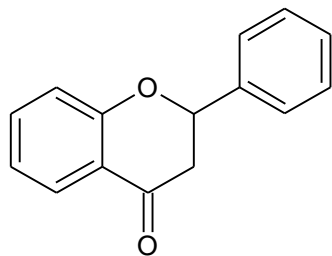
Flavonas



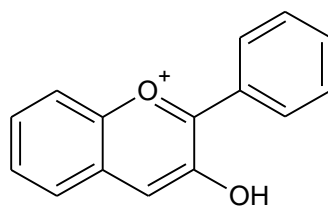
Flavanos



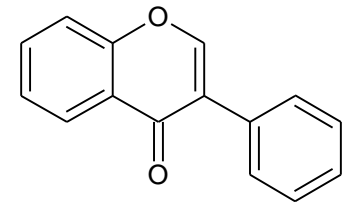
Flavonoles



Flavononas



Antocianidinas



Isoflavonoides

Figura 5. Estructura general y clasificación de los flavonoides [18].

1.2.2.1 Rutas biosintéticas de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos y los flavonoides se sintetizan en las plantas superiores a través de dos rutas metabólicas principalmente, a saber: (1) la ruta del ácido shiquímico y (2) la ruta del ácido mevalónico (**Figura 6**) [16, 19].

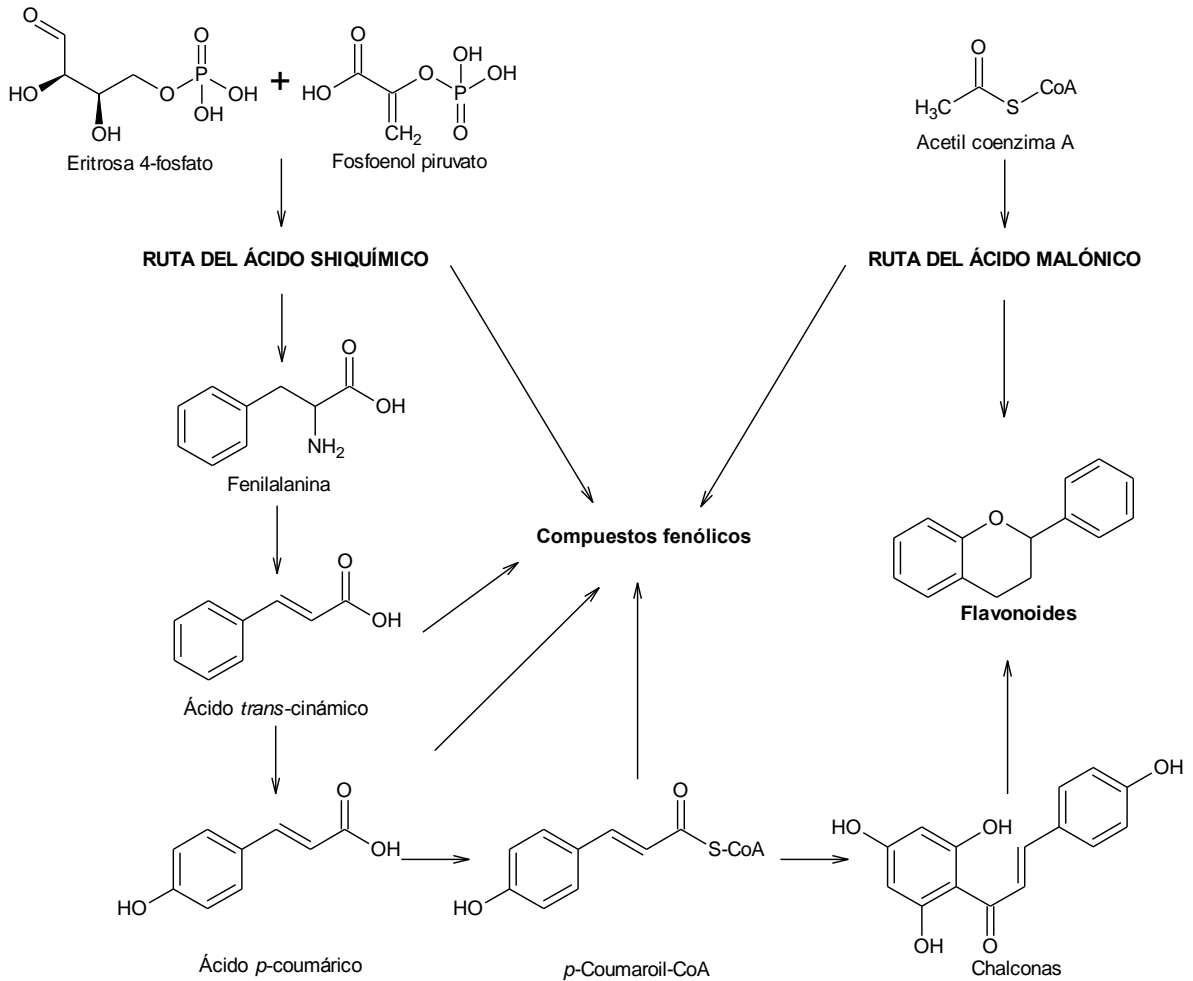


Figura 6. Rutas para la biosíntesis de compuestos fenólicos en plantas [16].

La ruta del ácido shiquímico tiene como precursores la eritrosa 4-fosfato (proveniente de la ruta de las pentosas fosfato) y fosfoenol piruvato (producto de la ruta glucolítica); a partir de ellos se sintetiza la fenilalanina, que, al perder el

grupo amino (-NH₂) de su estructura molecular, produce el ácido *trans*-cinámico y, posteriormente, se sintetiza la coenzima *p*-coumaroil-CoA, precursora de todos los flavonoides [15, 24-25].

Por otro lado, la ruta del ácido malónico tiene como precursor la acetil coenzima A y es considerada una vía de biosíntesis alterna en plantas [16, 19].

1.3. SECADO DE MATERIAL VEGETAL

El secado, es un proceso que busca conservar, estabilizar y reducir la actividad enzimática, responsable de los procesos de descomposición y degradación de compuestos de interés en el material vegetal inmediatamente después de haber sido cortado. El contenido de agua de una planta recién cosechada puede llegar a superar hasta en un 70% su peso, valor que puede llegar a reducirse hasta por debajo de un 15%, sin alterar la calidad [22].

Un proceso de secado se debe realizar en un lugar donde se garantice la circulación continua de aire y que esté alejado de posibles fuentes contaminantes; este proceso puede llegar a preservar el contenido de compuestos volátiles y otros compuestos de interés presentes en el material vegetal fresco [22, 26, 27]. El secado a la sombra y a temperatura ambiente es un método que resulta efectivo para la conservación de plantas que contienen compuestos cuyas propiedades químicas pueden verse fácilmente afectadas, si al momento de secarse se exponen a temperaturas elevadas [26, 27].

1.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

1.4.1. Metodos destilativos

Hidrodestilación asistida por radiación de microondas

La hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD, *Microwave-Assisted Hydrodistillation*) es una variación de la hidrodestilación, técnica con la cual se obtienen los AE a partir de material vegetal fresco o seco.

La matriz vegetal que contiene los volátiles se sumerge en agua, que al calentarse y ebulir genera vapores enriquecidos con los compuestos contenidos en los reservorios del AE que se rompen por el aumento de la temperatura [28, 29]. La diferencia entre la MWHD y la hidrodestilación convencional radica en la fuente de calor [29, 30]. En esta última, el calentamiento se realiza directamente sobre una placa o manta, mientras que en hidrodestilación asistida por microondas se utiliza un horno casero que emite este tipo de radiación, dentro del cual se coloca un balón con el material a destilar. A través de un orificio perforado en el horno doméstico, se adapta un aparato tipo *Clevenger* con una trampa *Dean-Stark*, en donde ocurre la condensación de los vapores ricos en compuestos volátiles y se recolecta el AE [31, 32].

1.4.2. Métodos extractivos

Los extractos vegetales son mezclas complejas que, a diferencia de los AE, generalmente se encuentran constituidas por metabolitos secundarios de menor volatilidad y mayor peso molecular, que se obtienen de las plantas por métodos no destilativos [33].

Extracción con fluido supercrítico (CO₂)

La extracción con fluido supercrítico (SFE, *Supercritical Fluid Extraction*), es una técnica que aprovecha tanto la difusión propia de los gases como la capacidad disolutiva característica de los líquidos que presentan algunas sustancias sometidas a condiciones por encima de su presión y su temperatura críticas. Debido a su baja toxicidad y no inflamabilidad, precio y condiciones supercríticas asequibles (7,4 MPa, 305 K), el dióxido de carbono (CO₂) es el compuesto más utilizado como solvente en la extracción con fluido supercrítico [34].

La extracción ocurre dentro de una cámara por la que circula el CO₂, que al interactuar con la matriz (material vegetal) disuelve y lleva consigo los compuestos afines presentes [35].

Este método permite obtener extractos libres de solventes, y compuestos no polares solubles en CO₂ [36]. Sin embargo, la extracción no es selectiva, y por esta razón el extracto que se obtiene es una mezcla de diferentes compuestos volátiles, semi-volátiles y no volátiles [37].

Microextracción en fase sólida con muestreo en espacio de cabeza

La microextracción en fase sólida con muestreo en espacio de cabeza (HS-SPME, *Head-Space Solid-Phase Microextraction*) es una técnica de preparación de muestra que permite la adsorción de los componentes volátiles de una matriz en fase sólida o condensada, sobre la superficie de un polímero orgánico que recubre una fibra de sílice fundida (**Figura 7**), que se expone a la muestra contenida en un recipiente cerrado durante un tiempo determinado y a una temperatura específica [38,39].

La extracción con la fibra facilita el análisis de volátiles que sean difíciles de separar de la matriz mediante otros métodos extractivos y que por su alta volatilidad puedan perderse [38].

Los volátiles dispersos en el espacio de cabeza, se concentran al adherirse en la superficie de la fibra, lo que facilita su transferencia hasta el puerto de inyección del equipo instrumental donde ocurre la desorción de los analitos de interés para su análisis cromatográfico [39].

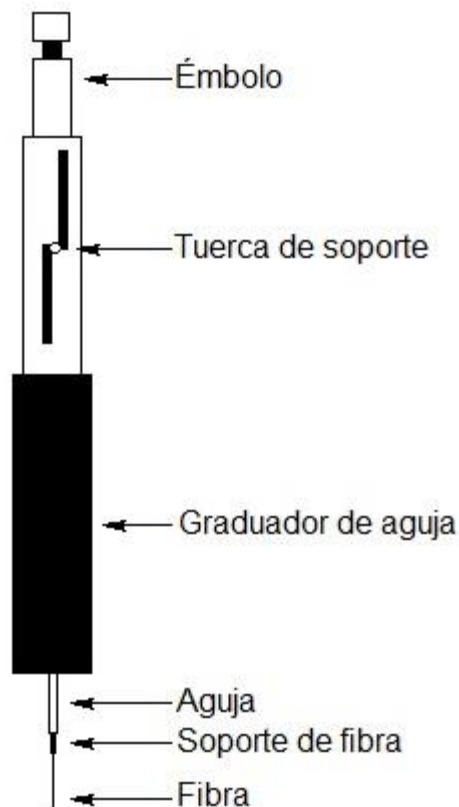


Figura 7. Dispositivo utilizado en microextracción en fase sólida con muestreo en espacio de cabeza. Modificado de [40].

Extracción hidroalcohólica asistida por ultrasonido

La extracción hidroalcohólica asistida por ultrasonido combina dos técnicas de extracción: (1) la extracción con solventes (SE, *Solvent Extraction*; solvente que en este caso alcohol o una solución acuosa del mismo) y (2) la extracción por ultrasonido, conocida también como extracción ultrasónica o simplemente, sonicación [¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.,41].

En la extracción con solventes, la fase líquida se utiliza como medio para separar los analitos solubles de la matriz sólida que los contiene [41]. Mientras que la sonicación utiliza la vibración producida por las ondas mecánicas de ultrasonido (frecuencias mayores que 20000 Hz) para asegurar el contacto entre la muestra y el solvente, y garantizar la extracción por solvatación de los analitos de interés de la matriz que los contiene [40].

Aunque es un método fácil, su eficiencia depende de factores tales como, por ejemplo, la solubilidad de los compuestos de interés en la mezcla hidroalcohólica o alcoholes utilizados, el tiempo de extracción y la temperatura. Además, el solvente se puede remover del extracto obtenido mediante rotoevaporación a presión reducida, lo que facilita el análisis de los compuestos aislados [42].

Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida

La extracción por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, *Matrix Solid Phase Dispersion Extraction*) es un método basado en la dispersión en fase sólida de la muestra para la posterior separación de varios analitos [43].

Este método de extracción incluye en un solo paso la homogeneización de la muestra y la extracción de las moléculas de interés [44]. El proceso implica la maceración de la muestra en fase condensada con un soporte sólido o material abrasivo químicamente modificado, con una fase orgánica, la cual actúa

como medio dispersante de los compuestos presentes. Luego, los analitos se aislan de la mezcla homogeneizada y macerada por medio del lavado o elución con un solvente adecuado [45].

Para llevar a cabo este método, no se necesitan cantidades de muestra grandes, dispersantes o solventes; es una técnica económica, rápida, poco laboriosa y funciona a condiciones normales de extracción, es decir, a temperatura ambiente y presión atmosférica. [43, 46].

1.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

1.5.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un desequilibrio provocado por el aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de especies reactivas de nitrógeno (ERN), compuestos que intervienen en los diferentes mecanismos de señalización celular y la homeostasis (**Tabla 2**) [7, 47].

Tabla 2. Especies reactivas de nitrógeno y oxígeno que intervienen en los mecanismos de señalización celular.

Especies reactivas de nitrógeno	Radicales	Óxido nítrico Dióxido de nitrógeno	NO^\cdot NO_2^\cdot
	No radicales	Anión peroxinitrito	ONOO^-
Especies reactivas de oxígeno	Radicales	Oxígeno (birradical)	$\text{O}_2^{\cdot\cdot}$
		Anión superóxido	$\text{O}_2^{\cdot-}$
		Hidroxilo	OH^\cdot
		Peroxilo	ROO^\cdot
	No radicales	Alcoxilo	RO^\cdot
		Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
		Peroxilo	ROO^\cdot
		Ozono	O_3
		Oxígeno singulete	$^1\text{O}_2$

Estos oxidantes altamente reactivos son especies químicas que se generan naturalmente en diferentes reacciones metabólicas; algunos de ellos presentan electrones desapareados y reciben el nombre de radicales libres (RL) [7,47,48].

Cuando la concentración de estas especies aumenta al punto de no ser controladas por los mecanismos celulares, que se encargan de regular su proliferación; estos compuestos comienzan a reaccionar con moléculas biológicas como enzimas, lípidos de las membranas y el ácido desoxirribonucleico (ADN), al punto de degradarlas y causar daños que de no ser prevenidos o controlados a tiempo, pueden llegar a ser desencadenantes de procesos biológicos asociados con el desarrollo de mutaciones, carcinogénesis, enfermedades degenerativas (entre otros tipos de enfermedades), inflamación y envejecimiento [6-7, 47,49].

1.5.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que presentes en concentración baja respecto a cualquier compuesto fácilmente oxidable, retardan o previenen significativamente su oxidación [50]; es decir, que estas sustancias son capaces de evitar la degradación oxidativa de compuestos como ácidos grasos, proteínas y detener o retardar cualquier tipo de proceso biológico degenerativo de biomoléculas tales como lípidos, enzimas e incluso el ADN [50, 51]. Esta propiedad es bastante útil a nivel industrial, puesto que la incorporación de antioxidantes en diferentes productos de consumo, como los alimentos, evita su descomposición y posibles efectos nocivos por ingestión de los mismos [49].

Los antioxidantes pueden clasificarse, según el mecanismo de su acción. Los antioxidantes que actúan como atrapadores capaces de convertir los RL en moléculas estables, se denominan antioxidantes primarios. Mientras que los antioxidantes que actúan como agentes secuestradores o quelantes, capaces de disminuir la velocidad de reacciones oxidantes, se denominan antioxidantes

secundarios. Estos últimos son capaces de proveer de hidrógenos lábiles a los antioxidantes primarios (sinergismo), descomponen los radicales hidroperóxidos en especies no radicales, desactivan el oxígeno singulete, absorben radiación ultravioleta y actúan como atrapadores de oxígeno [52].

1.5.3. Antioxidantes sintéticos

Para aumentar el periodo de caducidad y disminuir el efecto de los agentes oxidantes, las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica utilizan antioxidantes sintéticos en sus formulaciones para garantizar que las propiedades organolépticas y funcionales de sus productos de consumo se mantengan estables desde el momento de su producción hasta que el consumidor haga su uso. Los compuestos sintéticos incorporados en estos productos de consumo, reaccionan con las especies oxidantes que se generan por proceso normal de descomposición de los demás ingredientes, disminuyen su reactividad y evitan que éstos oxiden a las otras moléculas presentes [53,54].

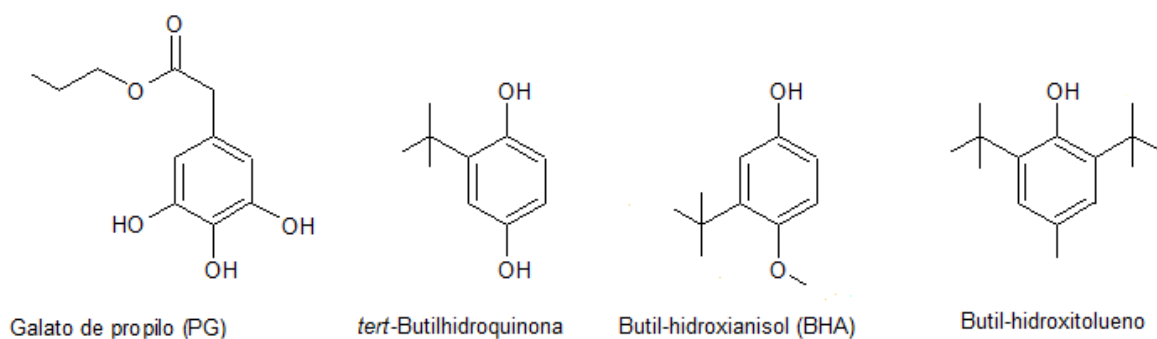


Figura 8. Estructuras moleculares de algunos antioxidantes sintéticos más utilizados comercialmente.

Entre los antioxidantes sintéticos más utilizados se destacan el galato de propilo (PG), *tert*-butil hidroquinona (TBHQ), butil-hidroxianisol (BHA), y el butil-hidroxitolueno (BHT) (**Figura 8**), los cuales sin embargo, pueden tener efectos

secundarios nocivos para la salud humana y actúan como promotores de crecimiento tumoral y otros fenómenos asociados con la aparición y desarrollo de cáncer [55-58].

1.5.4. Antioxidantes naturales

En su metabolismo secundario, las plantas producen compuestos que han demostrado reducir significativamente la actividad de agentes oxidantes [6]. Varios estudios han demostrado los beneficios que los antioxidantes de origen natural aportan a la salud humana [59]. El consumo regular de frutas y verduras ayudan a mejorar y fortalecer la defensa antioxidante del organismo debido a que son fuente de muchos de antioxidantes naturales entre los cuales se destacan el ácido ascórbico [60], la vitamina E [61], compuestos fenólicos [62,63] y terpenoides [64].

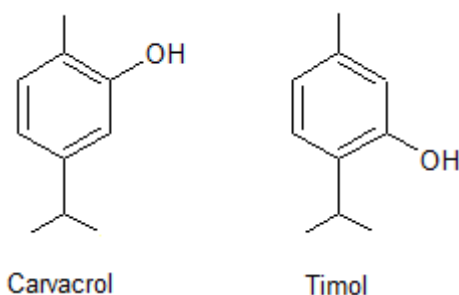


Figura 9. Estructuras moleculares de los terpenoides fenólicos carvacrol y timol.

La actividad antioxidante de los terpenoides y los compuestos fenólicos resulta de la combinación de varios mecanismos de acción. Los terpenoides fenólicos, e. g., carvacrol y timol (**Figura 9**), son capaces de donar hidrógenos lábiles y actuar como antioxidantes primarios en diferentes ensayos *in vitro* [64]. Por otro lado, los flavonoides pueden actuar como regeneradores de otros antioxidantes naturales

como la vitamina E, y gracias a la distribución espacial de su estructura molecular son capaces de inhibir enzimas como las oxidasas y atrapar RL [25, 65].

Debido a los efectos secundarios nocivos reportados de varios de los antioxidantes sintéticos antes mencionados [55-58], las regulaciones de varios países prohíben o restringen su uso e incorporación en productos de consumo humano [52]. Es por ello, que en los últimos años las industrias han centrado su atención e interés en formular productos con antioxidantes de origen natural que suplan la demanda de aquellos que son formulados con antioxidantes sintéticos.

Por tanto, se hace necesaria la búsqueda y el estudio de nuevos aceites y extractos de origen vegetal como fuentes naturales promisorias de antioxidantes a ser utilizados como alternativa a los sintéticos existentes [57].

1.5.5. Capacidad antioxidante

La medición de la actividad antioxidante de un compuesto permite hacer un seguimiento de su reactividad química del mismo, única y exclusivamente bajo las condiciones específicas del ensayo utilizado; no es correcto, y mucho menos apropiado, considerar los resultados obtenidos como indicadores de actividad antioxidante total, es por ello, que el término “capacidad” hace referencia al resultado que se obtiene al llevar a cabo diferentes métodos de ensayo que evalúan la actividad antioxidante, *i.e.*, a qué tanto un compuesto antioxidante es capaz de inhibir la oxidación de un compuesto de referencia [66].

Según el tipo de reacción involucrada en la prueba que se utilice, la gran mayoría de los ensayos que se emplean para evaluar la capacidad antioxidante, se pueden clasificar en dos categorías diferentes, a saber: (1) ensayos basados en reacciones que implican la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, *Hydrogen Atom Transfer*) y (2) ensayos en los que la reacción involucrada ocurre a través de la transferencia de un electrón (ET, *Electron Transfer*). Por lo general, en los ensayos HAT se lleva un registro de la cinética de una reacción en la que los

antioxidantes evaluados y un sustrato con alguna propiedad luminiscente compiten por reaccionar con RL, e.g., radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) generados por la descomposición de azocompuestos (generadores de radicales). Mientras que los ensayos ET, involucran una reacción de óxido-reducción en la que el sustrato que se monitorea es el agente oxidante [66].

Capacidad de absorción de los radicales de oxígeno

La capacidad de absorción de los radicales de oxígeno (ORAC, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) es un ensayo en el que se mide la disminución de la intensidad de la fluorescencia respecto al tiempo, de un compuesto fluorescente (fluoresceína) que reacciona con radicales peroxilo producidos por la descomposición térmica del AAPH [por las siglas en inglés del hidrocloreuro de 2,2'-azobis(2-aminopropano)] [67].

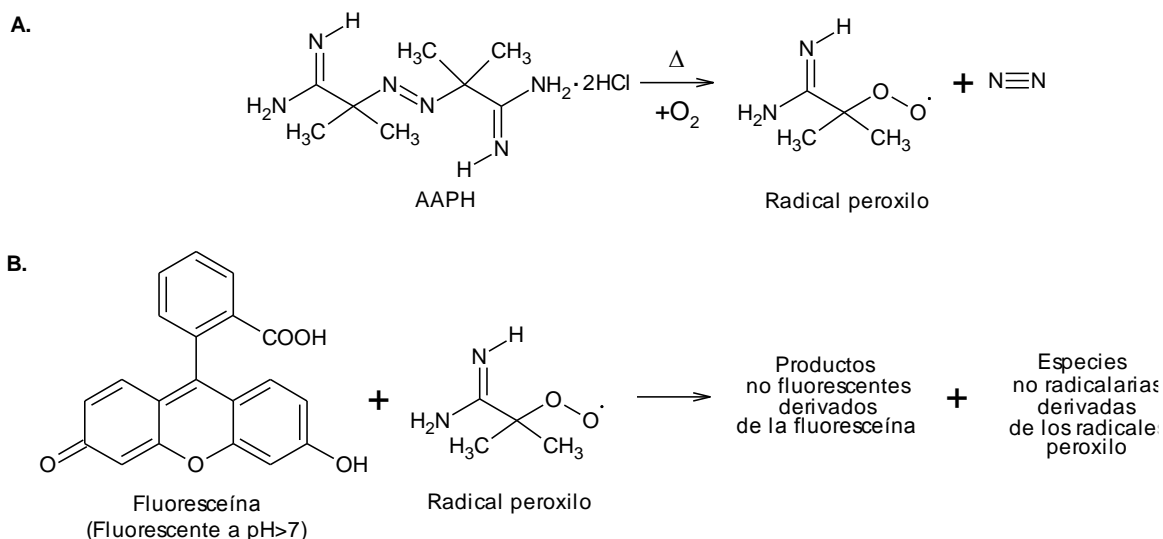


Figura 10. (A) Descomposición térmica del AAPH, generador de radicales. (B) Reacción de la fluoresceína con los radicales formados y formación de productos no fluorescentes y no radicales.

En presencia de los radicales formados, la fluoresceína, sustrato que pierde un hidrógeno lábil, se oxida y pierde sus propiedades de emisión (apagamiento o *quenching*) (**Figura 10**). Esta disminución en la intensidad de la fluorescencia se puede hacer más lenta o incluso detener en presencia de compuestos cuyos hidrógenos lábiles puedan ser donados a una velocidad mayor que la velocidad de oxidación de la fluoresceína [66-68].

El efecto protector del antioxidante evaluado se determina por el área bajo la curva (ABC), registro del decaimiento en la intensidad de la fluorescencia respecto al tiempo, que se compara con el de un blanco (**Figura 11**) [66-68].

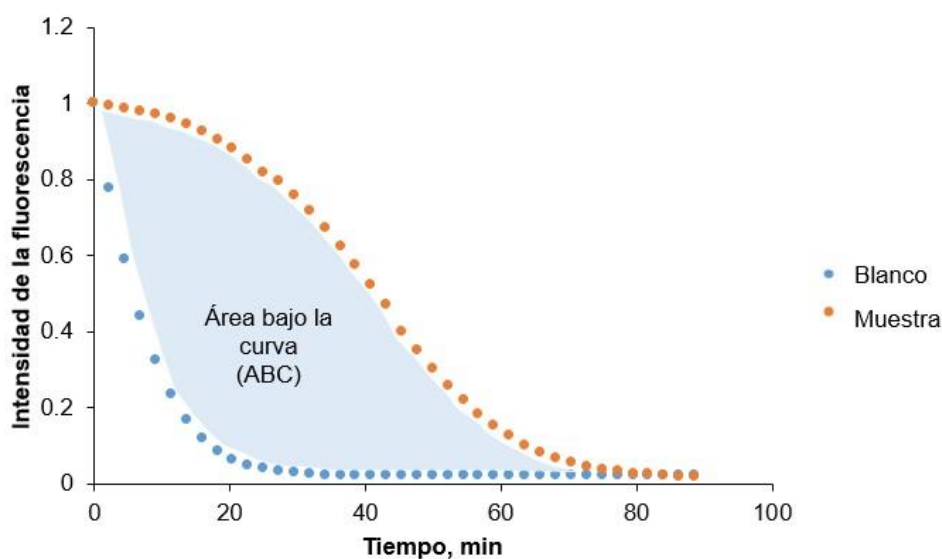


Figura 11. Curvas de decaimiento de la fluorescencia por oxidación de la fluoresceína en un blanco y en presencia de un antioxidante en una muestra.

Los resultados obtenidos se expresan en unidades de μmol de Trolox[®]/g de sustancia, medida que resulta de la comparación entre el ABC de las muestras analizadas y el ABC de una curva de calibración de Trolox[®], antioxidante sintético y análogo hidrosoluble de la vitamina E, que se utiliza como patrón o estándar

de referencia en diferentes ensayos en los que se determina la capacidad antioxidante [66].

Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺

El ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺ [ABTS, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] permite determinar la capacidad que tiene un antioxidante para reducir a un agente oxidante que cambia de color al ser reducido; este agente oxidante se forma por la reacción entre el ABTS con persulfato de sodio (K₂S₂O₈), para la formación de una especie radicalaria altamente reactiva que presenta máximos de absorción a los λ=415, 645, 735 y 815 nm de longitud de onda, y que genera una coloración azul. La adición de un antioxidante a la mezcla coloreada provoca la reducción paulatina del catión-radical y, por ende, su interconversión al compuesto neutro incoloro, lo que indica su regeneración (**Figura 12**). Por lo anterior, la interacción del radical formado con los antioxidantes presentes en una muestra puede ser monitoreada espectrofotométricamente [69, 70].

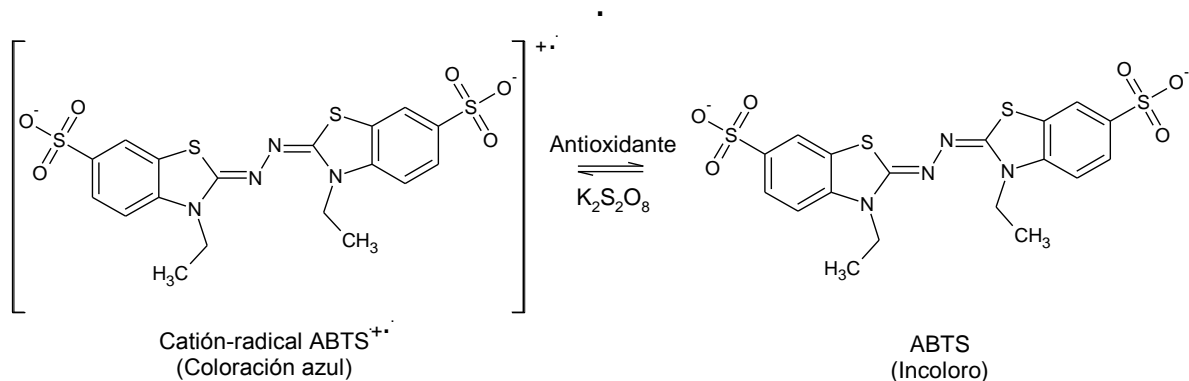


Figura 12. Estructuras químicas del catión-radical ABTS⁺ y de su forma neutra [66].

El porcentaje de inhibición del RL depende de qué tanto este se decolore, de la concentración del antioxidante evaluado y del tiempo de reacción. Dicho valor se deduce luego de graficar la absorbancia registrada *versus* la concentración del antioxidante evaluado, el resultado se reporta por comparación con cantidades de Trolox[®] en unidades TEAC (TEAC, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) que equivalen a la concentración milimolar de una solución de Trolox[®], que posee la capacidad antioxidante equivalente a una solución 1 mM de la muestra que se analice [66,70].

1.6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

La cromatografía es una técnica analítica que permite separar mezclas en sus componentes individuales, esto posibilita la identificación y la determinación de la cantidad de los compuestos presentes. La separación ocurre por la repetición sucesiva de etapas de reparto entre dos fases: una fase fija, denominada fase estacionaria, y otra fase móvil [71].

1.6.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*) consiste en la separación de mezclas complejas de compuestos neutros, volátiles, termoestables y de bajo peso molecular (300 Da), gracias a la diferencia en sus puntos de ebullición [72].

La separación de los compuestos se lleva a cabo en una columna cromatográfica, a la que ingresan los analitos volatilizados provenientes del puerto de inyección [71-72]. Las columnas modernas son capilares huecos de sílice fundida (de 10-60 m de longitud y de 0,20-0,53 mm de diámetro interno), cuya pared interna se encuentra recubierta por un material térmicamente resistente y de polaridad determinada,

i.e., la fase estacionaria. Los analitos interactúan con la fase estacionaria por medio de repetidos, sucesivos y continuos pasos de absorción y desorción (repartición).

Para que ocurra la separación, cada compuesto presente en la mezcla debe interactuar de manera diferente con la fase estacionaria antes de eluir y ser detectado [72].

Desde el puerto de inyección del equipo hasta el detector, los analitos son arrastrados por la fase móvil, un gas inerte *e.g.* helio (He) o nitrógeno (N₂), que tiene como función transportar los compuestos a través de la columna y hacer posible su elución [72].

El tiempo que transcurre entre la inyección de la muestra y la detección de cada sustancia separada se denomina tiempo de retención (t_R), tiempo que tardan todos los analitos en atravesar toda la columna. Los t_R dependen de variables operacionales de cada análisis cromatográfico *e.g.*, el flujo del gas de arrastre, las variaciones de temperatura programadas o el modo de inyección. El t_R de cada analito permite la determinación de su índice de retención lineal (IRL), parámetro utilizado para su identificación tentativa, que se compara con valores disponibles en la literatura y en bases de datos [72].

1.6.1.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS, *Mass Spectrometry*) es una técnica que permite la identificación de un compuesto mediante la obtención de su espectro de masas, gráfico que muestra la abundancia relativa de cada ion que resulta de la fragmentación de una molécula ionizada y que permite establecer cómo se disocia, lo que hace posible elucidar su estructura, y por ende, facilitar su identificación [73].

El acoplamiento "gases-masas" (GC-MS) facilita el análisis cualitativo e incluso cuantitativo de mezclas complejas. Al salir de la columna cromatográfica, las moléculas de la sustancia que eluye, atraviesan una interfase que consiste

en un tubo termostataado que evita su condensación, entran luego en la cámara de ionización, parte del espectrómetro de masas donde tiene lugar un proceso muy energético en el que gran parte de las moléculas se ioniza. Luego, los iones que se forman, se separan en función de su relación masa/carga (m/z), antes de llegar al detector y generar una señal [72, 73].

1.6.1.2. Cromatografía de gases con detector de ionización en llama

Este método instrumental de análisis permite la separación y cuantificación de cada uno de los constituyentes de una mezcla separada por cromatografía de gases [71]. El funcionamiento del detector de ionización en llama (FID, *Flame Ionization Detector*) se basa en la detección de los productos de descomposición de compuestos en una llama de hidrógeno (H_2) y aire. La llama, ubicada entre dos electrodos polarizados por un voltaje constante, se forma en presencia de aire, con una corriente de H_2 , el gas de arrastre y la sustancia que eluye. Los iones formados por la combustión del compuesto que sale de la columna, migran desde la llama hacia un electrodo colector, en donde se genera una corriente en el orden de picoamperios (pA), la cual se amplifica y produce la correspondiente señal cromatográfica. La magnitud de la señal que se obtiene es directamente proporcional a la cantidad de analito presente en la fracción que eluye, lo que permite determinar la concentración de cada componente separado [71, 72].

Este detector tiene la ventaja de que es casi universal, puesto que es sensible a la mayoría de compuestos orgánicos [71].

1.6.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) es un método analítico de separación utilizado para separar, identificar y cuantificar cada uno de los compuestos que constituyen matrices que contienen analitos que no son volatilizables, se descomponen a temperaturas

normales para un equipo de GC o que simplemente no pueden ser analizadas por esta técnica [71,74].

En cromatografía líquida (LC, *Liquid Chromatography*, del inglés) la fase móvil se encuentra constituida por un solvente (elución isocrática) o mezcla de solventes cuya relación de proporción puede programarse para que varíe durante la corrida cromatográfica (elución en gradiente). El solvente o la solución resultante y de polaridad variable se bombea mecánicamente a través de una columna de acero inoxidable empaquetada con gel de sílice o algún polímero que funciona como la fase estacionaria, la cual suele escogerse según el tipo de analito que se quiera separar y analizar. Para el caso de compuestos fenólicos, se emplean fases no polares ya que sirven para separar compuestos con grupos hidrofóbicos [74].

Existen diferentes tipos de LC, que se denominan según el tipo de interacción que predomine entre el analito y la fase estacionaria. En la cromatografía en fase normal, la polaridad del solvente es menor que la de la fase estacionaria, mientras que en la cromatografía en fase reversa la polaridad del solvente es mayor que la de la fase estacionaria [71, 74].

1.6.2.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo

Este método de acoplamiento LC-MS es una herramienta poderosa y bastante útil para la caracterización de productos naturales, que permite la medición de la masa exacta de moléculas y la determinación de su fórmula molecular, lo que facilita su identificación [75].

En un analizador de tiempo de vuelo (TOF, *Time-of-Flight*), los iones son acelerados en un campo eléctrico de fuerza conocida, de tal manera que todos tengan la misma energía cinética y que la única diferencia entre ellos sea la velocidad con la que se mueven, variable que aumenta proporcionalmente con la carga

de cada ion y que depende directamente de la relación m/z , lo que hace posible determinaar el tiempo en que tarda cada ion en llegar al detector. Por tanto, es posible determinar la masa exacta tanto de iones precursores, como de iones producto (fragmento) y, con esto, se pueden diferenciar compuestos con la misma masa nominal, pero diferente composición elemental [76].

La interfaz bastante utilizada en este acoplamiento es la electronebulización (ESI, *Electrospray Ionization*), un método de ionización suave, *i.e.*, no destructivo [75], que produce iones cuasi-moleculares, $[M+H]^+$ o $[M-H]^+$, según el modo, positivo o negativo, que se usa en la interfaz de ESI.

2. CIENCIOMETRÍA

La bibliometría consiste en hacer un seguimiento a la actividad científica por medio de indicadores numéricos y el análisis estadístico de las diferentes fuentes bibliográficas. Con ello, se pueden hacer comparaciones dentro de la producción científica existente, para evaluar la utilidad y facilitar la comunicación en el ámbito científico [77].

Con el propósito de hacer una relación del número de publicaciones científicas sobre *P. amboinicus* en función del tiempo, se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos *Scopus* (*Elsevier*).

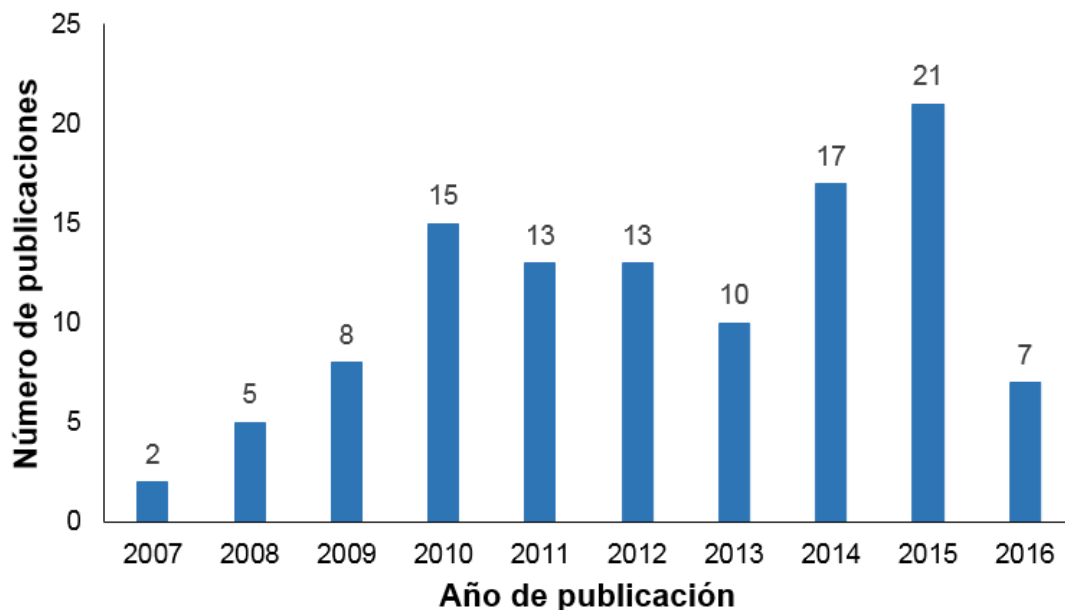


Figura 13. Relación de publicaciones por año. Fecha de búsqueda: 7 de julio de 2016. Fuente: *Scopus* (*Elsevier*). Periodo de de observación: 2007-2016 Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY* (“*Plectranthus amboinicus*”).

La **Figura 13** muestra la relación de publicaciones por año durante la última década se utilizó como ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY* ("*Plectranthus amboinicus*"), y se encontró un total de 111 artículos publicados. La producción científica en los últimos 5 años alcanza a duplicar el número de trabajos publicados en la primera mitad de la década; en el año 2015, se publicó la mayor cantidad de artículos, 21 en total, mientras que en 2007 tan sólo 2.

Uno de los primeros trabajos publicados sobre la composición química de *P. amboinicus* lo realizaron Pino y colaboradores [78], quienes hicieron un estudio comparativo entre la composición química de los extracto supercrítico, el extracto *Soxhlet* usando hexano como solvente y el AE aislado por destilación con vapor de hojas secadas a 40 °C. Reportaron rendimientos en peso de 0,55 % para el AE, 6,52% para el extracto *Soxhlet* y 1,40% para el extracto supercrítico. Por medio del análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) identificaron en el aceite los siguientes compuestos: carvacrol (51,04%), α -terpineno + *p*-cimeno (10,34%), *trans*- β -cariofileno (8,11%), γ -terpineno (5,81%), *trans*- β -bergamoteno (5,21%), α -humuleno (3,15%), como los mayoritarios, entre otros. En los extractos *Soxhlet* y supercrítico, el carvacrol fue el compuesto mayoritario con el 89,21 y un 90,41%, respectivamente.

Velasco y colaboradores [13]; Senthilkumar y colaboradores [79]; Kweka y colaboradores [80]; y Costa y colaboradores [81], llevaron a cabo estudios de la composición química del AE de *P. amboinicus* obtenido por hidrodestilación convencional de material vegetal fresco. En la **Tabla 3** se muestran los rendimientos en peso del AE y las cantidades relativas de los compuestos mayoritarios de estos aceites.

Tabla 3. Resultados de los estudios de la composición del AE de *P. amboinicus* reportados por Velasco [13], Senthilkumar [79], Kweka [80], y Costa [81], y sus respectivos colaboradores.

Autores		Velasco <i>et al.</i> [13]	Senthilkumar <i>et al.</i> [79] y Kweka <i>et al.</i> [80]	Costa <i>et al.</i> [81]
Rendimiento, % (p/p)		0,50	0,17	0,13
Compuestos totales identificados		15	26	10
Compuestos mayoritarios, %	Carvacrol	65,2	28,65	-
	<i>trans</i> - β -Cariofileno	5,0	-	2,8
	<i>p</i> -Cimeno	8,5	-	10,3
	α -Humuleno	-	9,67	-
	γ -Terpineno	10,0	-	9,9
	Timol	-	21,66	64,30
	Undecanal	-	8,29	-

Said y colaboradores [82] obtuvieron el AE por hidrodestilación de hojas secas de *P. amboinicus*, determinaron un rendimiento volumen/masa del 1,25% (1,25 mL de AE/100 g de material vegetal) e identificaron carvacrol (23,0%), alcanfor (22,2%), Δ^3 -careno (15,0%) y γ -terpineno (8,4%) como compuestos principales, entre un total de 27 identificados.

Khalid y El-Gohary [83] estudiaron el efecto de las estaciones sobre las variaciones en el rendimiento y la composición química del AE de *P. amboinicus*, obtenido por hidrodestilación convencional. Determinaron la composición y la variación porcentual de la cantidad relativa de 18 compuestos, para cada estación. Los resultados que obtuvieron, se encuentran en la **Tabla 4**. Del estudio que realizaron, concluyeron que el rendimiento de extracción y la composición del AE de *P.*

amboinicus dependen de las condiciones externas de cultivo: tiempo de exposición a la radiación solar y la temperatura del medio.

Tabla 4. Variaciones en el rendimiento y la composición del AE de *P. amboinicus* obtenido por hidrodestilación [83].

Estación		Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Rendimiento, %		0,1	0,2	0,1	<0,1
Compuesto, %	1-Octeno	1,0	1,6	3,2	8,8
	β -Mirceno	0,9	0,8	0,8	0,8
	α -Terpineno	5,0	1,4	5,2	6,0
	<i>p</i> -Cimeno	0,8	1,4	7,3	6,9
	β -Felandreno	1,1	1,5	7,3	6,4
	γ -Terpineno	0,8	1,6	2,1	2,5
	Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	0,6	0,6	0,5	0,6
	Octanoato de metilo	1,5	1,9	5,6	2,1
	Borneol	1,3	9,5	0,4	5,9
	α -Terpineol	5,3	4,3	5,9	0,5
	Dihidrocarveol	6,8	5,6	0,5	4,7
	Estragol	7,2	6,3	4,4	3,9
	Timol	12,7	11,7	9,1	9,3
	Carvacrol	13,2	13,4	15,9	15,2
	Undecanal	11,3	9,0	2,4	6,5
	α -Humuleno	10,0	11,5	11,1	8,2
β -Selineno	10,7	6,0	10,9	3,4	
Óxido de cariofileno	8,2	11,5	2,8	8,2	

García y colaboradores [8] estudiaron el efecto antioxidante del extracto alcohólico (etanol al 30%) sobre un modelo de peroxidación lipídica de tejido cerebral. El extracto *P. amboinicus* mostró un porcentaje de inhibición mayor que el del α -tocoferol, compuesto de referencia usado en el ensayo.

Kumaran y Kuranakaran [9] evaluaron la capacidad antioxidante del extracto acuoso de *P. amboinicus* obtenido de hojas frescas en varios ensayos: en un sistema modelo de β -caroteno-linoleato, en la protección del radical DPPH \cdot (2,2-difenil-1-

picrilhidrazilo), protección del radical superóxido, protección del óxido de nitrógeno, poder reductor y actividad quelante de metales; encontraron diferentes valores, pero en general, la actividad antioxidante del extracto acuoso fue superior a la de los compuestos de referencia.

El-Hawary y colaboradores [84] determinaron el contenido de polifenoles en tallos hojas y raíces de *P. amboinicus*, a partir de material vegetal seco. Los extractos obtenidos con etanol al 70% se caracterizaron por diferentes técnicas como: espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis), resonancia magnética nuclear de protones y carbono-13 (RMN ^1H y ^{13}C) y cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas (UPLC-MS, *Ultra Performance Liquid Chromatography*). Los siguientes compuestos fueron identificados en los extractos: 3-metoxi-genkwanina, crisimaritina, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, taxifolina, ácido rosmarínico, apigenina, y 5-*O*-metil-luteolina, entre otros.

Bhatt y colaboradores [10] estudiaron la composición química del extracto metanólico de los tallos secos de *P. amboinicus*, e identificaron: ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, rutina, ácido rosmarínico y quercetina. Además realizaron ensayos de actividad antioxidante, tales como: el ensayo del radical DPPH', ensayo de poder reductor, ensayo del radical superóxido y ensayo de actividad antioxidante total. Los valores de la capacidad antioxidante del extracto metanólico fueron superiores a los de los compuestos de referencia. En este estudio, también se puso en evidencia el potencial anticancerígeno, antimicrobiano y la capacidad como antiagregante plaquetario de los extractos evaluados.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REACTIVOS, SOLVENTES, MATERIALES Y EQUIPOS

Los reactivos, solventes, materiales y equipos auxiliares de laboratorio utilizados en el desarrollo de este trabajo de investigación se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Reactivos, solventes, materiales y equipos auxiliares de laboratorio utilizados en el desarrollo de este trabajo de investigación.

NOMBRE	ESPECIFICACIONES
Reactivos	
Sulfato de sodio	Anhidro; <i>J.T. Baker</i> (Phillisburg, NJ, EE.UU.).
<i>n</i> -Tetradecano	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (Milwaukee, WI, EE.UU.).
Trolox®	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
α -Tocoferol	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Butil hidroxitolueno	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Carvacrol	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Timol	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
ABTS	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
AAPH	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Persulfato de sodio	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Fluoresceína	<i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Fosfato dipotásico	Pureza: 99,1%; <i>J.T. Baker</i> (Phillisburg, NJ, EE.UU.).
Acetato de sodio	Pureza 99,95%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Pinocembrina	Pureza 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Apigenina	Pureza 95%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Naringenina	Pureza 95%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Luteolina	Pureza 95%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).

Tabla 5. Continuación.

Kaempferol	Pureza 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
Quercetina	Pureza 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
Rutina	Pureza 95%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
Quercetrina	Pureza 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
Solventes	
Diclorometano	Grado naltico; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania)
Etanol	Pureza 99.8%; <i>J.T. Baker</i> (Phillisburg, NJ, EE.UU.)
Metanol	Pureza 99.8%; <i>J.T. Baker</i> (Phillisburg, NJ, EE.UU.)
Materiales y equipos auxiliares de laboratorio	
Viales cromatográficos	2 mL; <i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, CA, EE.UU.)
Micropipetas	2-20, 20-200, 100-1000 μ L; <i>Brand</i> (Wertheim, Alemania)
Frascos ámbar	2 y 4 mL
Consumibles	Cónicos, jeringas plásticas 10 mL, <i>septa</i> y microviales
Balones aforados	2, 5, 25, 100 mL; <i>Scott</i> (TX, EE.UU.)
Vasos de precipitados	59, 100, 250 mL; <i>Scott</i> (TX, EE.UU.)
<i>Transferpipette</i>	Multicanal, 10-200 μ L; <i>Brand</i> (Wertheim, Alemania)
Microplacas	96 pozos; <i>Thermo Fisher Scientific</i> (Sunnyvale, CA, EE.UU.)
Lector de microplacas	<i>Turner Biosystems Inc.</i> , <i>Modulus TM II Microplate Multimode Reader</i> (Sunnyvale, CA, EE.UU.)
Balanza analítica	<i>Mettler Toledo</i> PB1502-S (Nänicon, Suiza)
Fibra SPME	<i>Carboxen</i> [®] /polidimetilsiloxano de 75 μ m de grosor
Ultrasonido	<i>Elmasonic</i> E30H (Elma, Alemania)
<i>Minishaker</i>	<i>IKA</i> (Hofheim, Alemania)
Equipo de hidrodestilación	Balón fondo redondo (2L), reductor 45/50 a 24/40, alargadera, trampa tipo <i>Dean-Stark</i> , condensadores de bolas y espiral.

3.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La identificación botánica y taxonómica de la especie bajo estudio se llevó a cabo en el Herbario Nacional del Instituto de Ciencias en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por el doctor Jose Luis Fernández Alonso, así: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae), número COL 523701 (Tabla 6).

Tabla 6. Identificación taxonómica de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

Género	Especie	Familia	Nº COL
<i>Plectranthus</i>	<i>amboinicus</i>	Lamiaceae	523701

3.3. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se recolectó en los jardines experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto, del Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), ubicada en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

Las partes aéreas de la planta, *i.e.*, solo las hojas y los tallos se cosecharon (ca. 16 kg). Los tallos se picaron en pequeños trozos y, junto con las hojas intactas, se colocaron sobre bandejas forradas con papel periódico para su secado (Figura 17).



Figura 14. Secado de material vegetal. A. Material vegetal de *P. amboinicus* dispuesto en bandejas cubiertas de papel y B. Vivero de secado a la sombra. Fuente: Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 10 de abril de 2015.

El proceso de secado se monitoreó diariamente durante 50 días (ca. 1 kg) según la **Ecuación 1**.

$$\text{Material vegetal, \%} = 100 - [(W_x/W_i) \times 100] \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

W_x : Peso de la pérdida diaria de agua, g.

W_i : Peso inicial del lote representativo, g.

El material vegetal seco se trituró en una licuadora *Oster® Heritage Blend™ 400*, luego se tamizó con una malla de 2 mm, y finalmente se almacenó en un frasco de vidrio.

3.4. AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

3.4.1. Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

El AE de *P. amboinicus* se obtuvo por hidrodestilación del material vegetal (ca.100 g) seco y triturado. Una vez dentro de un balón de 2 L, se adicionó agua (600 mL) y se adaptó a un aparato tipo *Clevenger* con trampa *Dean-Stark*. Como sistema de calentamiento se utilizó un horno de microondas doméstico *Samsung* AMW0113M, con potencia de salida de 1200 W y 2,5 GHz de frecuencia de radiación, el cual se ajustó a 600 W, para someter a 3 periodos de extracción de 15 min, con 5 min de reposo entre cada encendido (**Figura 15**) [31].

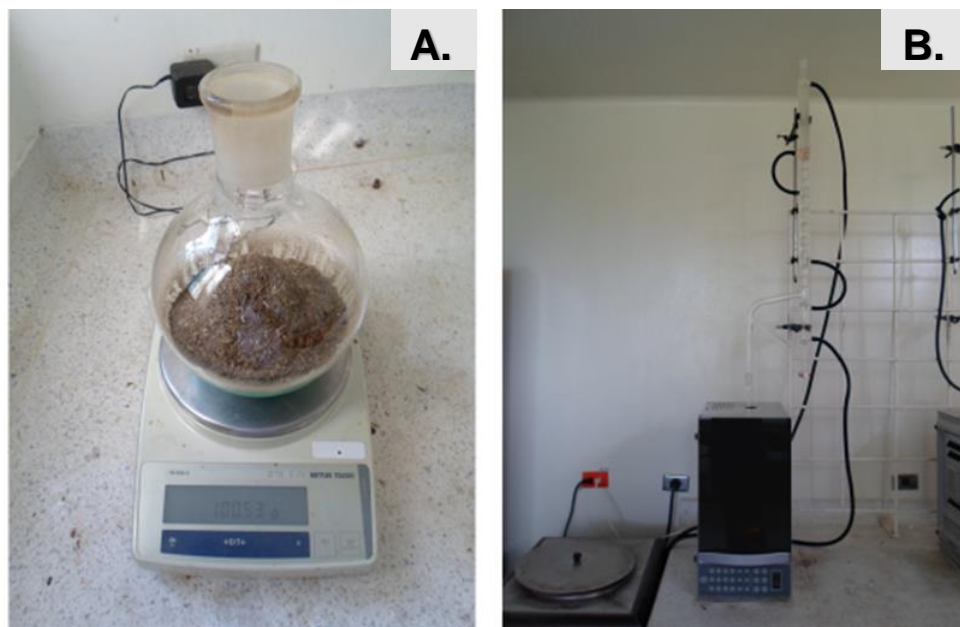


Figura 15. Obtención del AE de *P. amboinicus*. A. Balón de fondo redondo de 2 L con material vegetal para hidrodestilar y B. Montaje de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Fuente: Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 11 de septiembre de 2015.

Este procedimiento de extracción se realizó por triplicado y se calculó el porcentaje de rendimiento según la **Ecuación 2**.

$$\text{Rendimiento, \%} = [W_{AE}/W_{MV}] \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

W_{AE} : Peso del aceite esencial, g.

W_{MV} : Peso del material vegetal, g.

El AE aislado se separó por decantación y se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4). Luego, se pesó y guardó en un frasco ámbar de 2 mL y se almacenó bajo refrigeración hasta la preparación de muestras para su análisis cromatográfico y la realización de los diferentes ensayos de capacidad antioxidante.

3.4.2. Extracción con CO_2 supercrítico

El extracto supercrítico de *P. amboinicus* se obtuvo en un equipo a escala piloto *Thar SFE-2000-2-FMC50* (*Thar Instruments, Inc.* Pittsburg, PA, EE.UU.), equipado con dos cámaras extractoras de 0,42 m de alto, diámetro interno de 0,076 m y volumen de $2 \times 10^3 \text{ m}^3$, cuyas cámaras están conectadas a dos colectores en serie, cada uno con una capacidad de $5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$, que cuentan con controles de temperatura y una válvula de aguja automática de estrangulamiento que controla la presión (**Figura 16**). Para la extracción se cargó el material vegetal seco y molido (250 g) en una canasta de malla metálica con un diámetro de 0,2 mm y un volumen de $1,78 \times 10^{-3} \text{ m}^3$. El CO_2 se tomó de cilindros de 25 kg con un grado de pureza del 95,5 % (PRAXAIR, Bucaramanga, Colombia) enfriado a 3 °C, que por medio de bomba de desplazamiento positivo y comprimido en la cámara de extracción, alcanzó la presión de operación. La presión del CO_2 se reguló en los dos colectores, uno, a 80 bar y otro, a 40 bar, respectivamente.



Figura 16. Equipo *Thar SFE-2000-2-FMC50* usado para extracción con fluido supercrítico (CO_2). Fuente: Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 31 de octubre de 2017.

La presión de extracción fue 300 bar, con un flujo total de 50 g/min con 10% de co-solvente (etanol al 96%), a 40 °C durante 1,5 h.

3.4.3. Microextracción en fase sólida con muestreo en espacio de cabeza

Para el análisis de la fracción volátil contenida en el extracto supercrítico de *P. amboinicus*, se utilizó la técnica de microextracción en fase sólida con muestreo en espacio de cabeza, y se usó una fibra recubierta con el polímero Carboxen®/Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) con 75 μm de grosor. El extracto se pesó (25 mg) en un vial ámbar de de 4 mL que luego se calentó (60 $^{\circ}\text{C}$) durante 10 min. Posteriormente la fibra se expuso al espacio de cabeza (previamente presaturada durante 5 s en de *n*-hexadecano, 2 mg) por 30 min. Luego, se inyectó al equipo GC-MS, en el puerto de inyección del cual, se dejó desorber por 15 min (Figura 17).

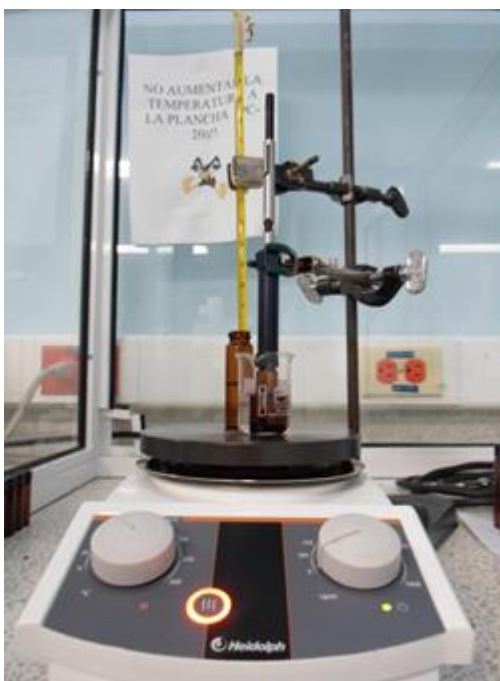


Figura 17. Montaje utilizado para la microextracción en fase sólida con muestreo en espacio de cabeza de los extractos obtenidos con CO_2 supercrítico de *P. amboinicus*. Fuente: Autor, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS. Bucaramanga, 17 de diciembre de 2017.

3.4.4. Extracciones hidroalcohólicas

Los extractos hidroalcohólicos (**Figura 18**) de *P. amboinicus* se obtuvieron mediante un diseño experimental 2^4 [85].



Figura 18. Montaje utilizado para la obtención de extractos hidroalcohólicos. A. Etanol (96%); B. Material vegetal de *P. amboinicus* tamizado; C. Baño de ultrasonido y D. Experimentos según el diseño 2^4 . Fuente: Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 19 de diciembre de 2016.

La **Tabla 7** muestra las variables y los niveles evaluados en el diseño experimental utilizado para las extracciones hidroalcohólicas.

Tabla 7. Variables y niveles evaluados en el diseño factorial 2^4 para las extracciones hidroalcohólicas de *P. amboinicus*.

Variable	Niveles		
	+1	0	-1
Concentración del solvente, % (v/v)	50	75	100
Volumen del solvente, mL	40	30	20
Temperatura, °C	50	40	30
Tiempo, min	60	40	20

En total, se realizaron 16 experimentos con cinco réplicas en el centro, para determinar la varianza del espacio experimental [85].

La **Tabla 8** muestra los 16 experimentos llevados a cabo. El experimento 17 corresponde al de las cinco réplicas.

Tabla 8. Diseño experimental 2^4 para las extracciones hidroalcohólicas.

Experimento	Concentración de solvente, % v/v	Volumen de solvente, mL	Temperatura, °C	Tiempo, min
1	100	20	50	60
2	50	20	50	60
3	100	20	30	60
4	50	20	30	60
5	100	40	50	60
6	50	40	50	60
7	100	40	30	60
8	50	40	30	60
9	100	20	50	20
10	50	20	50	20
11	100	20	30	20
12	50	20	30	20
13	100	40	50	20
14	50	40	50	20
15	100	40	30	20
16	50	40	30	20
17	75	30	40	30

En cada experimento, el material vegetal se extrajo dos veces bajo las mismas condiciones. Una vez filtradas, las porciones obtenidas para un mismo experimento se mezclaron.

La evaluación estadística de las variables se llevó a cabo con el *software STATGRAPHICS Centurion XV.II*.

3.4.5. Dispersión de matriz en fase sólida

El extracto por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) se obtuvo de material vegetal (0,5 g), el cual se maceró durante 15 min con un agente dispersante C₁₈ (1 g) en un mortero con pistilo (**Figura 19**) [86]. Una vez homogeneizada, la mezcla resultante se transfirió a una jeringa plástica de 10 mL con una capa de algodón, en la cual se adicionaron 5 ml de metanol para eluir.

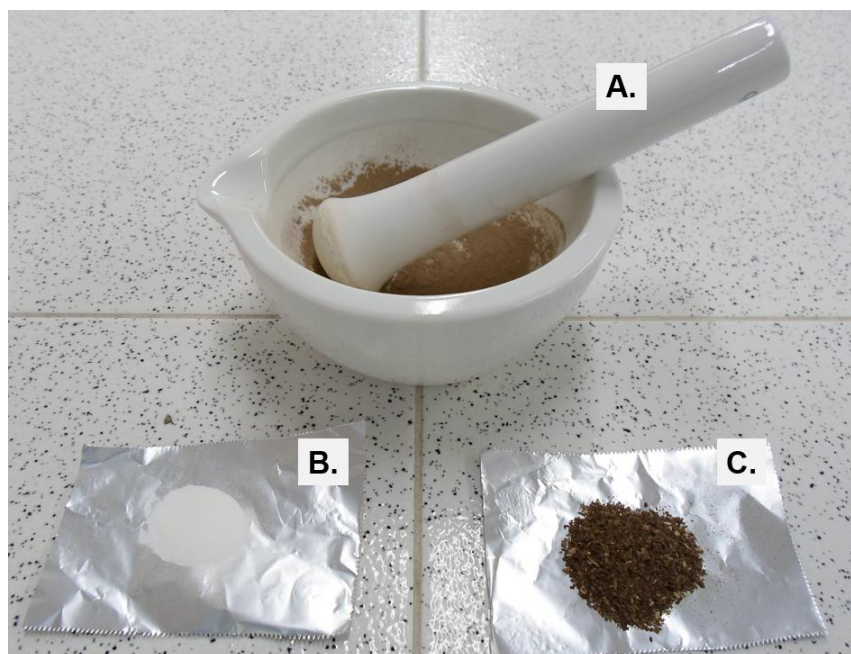


Figura 19. Obtención de extractos por dispersión de matriz en fase sólida. A. Mortero con pistilo, B. Dispersante y C. Material vegetal utilizado. Fuente: Autor, CENIVAM. UIS, Bucaramanga, 10 de noviembre de 2016.

Todos los extractos obtenidos se concentraron por rotoevaporación a 35 °C y 600 mbar, en un rotoevaporador *Heidolph* (*Heidolph Instruments GmbH & Co.*, Schwabach, Alemania) y luego se liofilizaron para eliminar posibles residuos de agua, y se almacenaron a 4 °C.

3.5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

3.5.1. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El análisis cromatográfico de los metabolitos secundarios volatilizables presentes en el AE y en el extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *P. amboinicus*, se llevó a cabo en un equipo GC *Agilent Technologies (AT) 6890 Plus* (Palo Alto, CA, EE. UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *ATMDS 5973 Network* (**Figura 20**).



Figura 20. Cromatógrafo de *AT 6890 Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *AT5973 Network*. Fuente: Autor, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, 9 de septiembre de 2015.

La separación de los compuestos presentes en las mezclas analizadas se realizó en dos columnas capilares: una, con una fase estacionaria apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, *J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) con dimensiones

de 60 m x 0,25 mm, d. i. x 0,25 μm dr; y la otra, con una fase estacionaria polar, de poli(etilenglicol) (DB-WAX, J & W *Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.), con dimensiones de 60 m x 0,25 mm, d. i. x 25 μm dr; en ambas columnas que se empleó helio (99,995%, Linde, Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre, con una presión de entrada de 16,47 psi y un flujo de 1 mL/min.

Se inyectó un volumen de 2 μL en modo *split* (1:30). La temperatura en el puerto de inyección fue de 250 °C. En el horno, la programación de temperatura fue de 45 a 150 °C, a 4 °C/min, luego, se aumentó a 250 °C (5 min), a 5 °C/min, y después a 275 °C (15 min), a 10 °C/min. La velocidad lineal media del gas fue de 26 cm/s. La temperatura de la línea de transferencia se mantuvo a 285° C, la fuente de ionización a 230° C, mientras que la del cuadrupolo, a 150° C. Los espectros de masa se obtuvieron por impacto de electrones (EI), con energía de 70 eV, con un barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*) de 3,58 *scans/s*, en un rango de masas de *m/z* 45 y 450.

La identificación de los analitos se realizó por comparación de sus índices de retención lineales (IRL) y los espectros de masas experimentales con los de las bases de datos (*Adams*, NIST y *Wiley*) y los reportados en la literatura [87-91].

Los IRL se calcularon con base en los tiempos de retención de patrones de hidrocarburos lineales desde C₆ hasta C₂₅, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas, por medio de la siguiente ecuación:

$$IRL_x = 100n + 100[(t_{Rx} - t_{Rn})/(t_{RN}-t_{Rn})]$$

Ecuación 3

Donde:

IRL_x : Índice de retención del compuesto de interés.

n : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés.

N : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye después del compuesto de interés.

t_{R_x} : Tiempo de retención del compuesto de interés.

t_{R_n} : Tiempo de retención del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés.

t_{R_N} : Tiempo de retención del n -alcano que eluye después del compuesto de interés.

3.5.2. Análisis por cromatografía de gases con detector de ionización en llama

La cuantificación de los componentes del aceite esencial se llevó a cabo por estandarización con n -tetradecano como patrón interno (*Istd*) en un cromatógrafo de gases AT 6890N (*Agilent*, Palo Alto, CA, EE. UU.) acoplado a un detector de ionización en llama (FID) (**Figura 21**).



Figura 21. Cromatógrafo de gases AT 6890N Series, acoplado a un detector de ionización en llama (FID). Fuente: Autor, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, 9 de septiembre de 2015.

La separación de los analitos se llevó a cabo en una columna capilar con una fase estacionaria apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) con dimensiones de 60 m x 0,25 mm, d.i. x 0,25 μm , d_f , en la que se empleó helio (99,995%, Linde, Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre, con una presión de entrada de 16,47 psi y un flujo de 1 mL/min.

Se inyectó 1 μL en modo *split* (1:30). La temperatura en el puerto de inyección fue de 250 °C. En el horno, la programación de temperatura fue la misma que se empleó para el análisis GC-MS (Véase **Sección 3.5.1.**).

La cuantificación de los compuestos presentes en el AE se realizó por el método de estándar interno, para ello, se utilizó *n*-tetradecano, como patrón de referencia [90,91], según la siguiente ecuación:

$$C_x = C_{Istd} \times A_x / A_{Istd}$$

Ecuación 4

Donde:

C_x : Concentración (g/L) del analito en la muestra.

A_x : Área del pico cromatográfica del analito (en cuentas)

C_{Istd} : Concentración (g/L) del patrón interno (*Istd*).

A_{Istd} : Área del pico cromatográfico del patrón interno (en cuentas).

3.5.3. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia con analizador de tiempo de vuelo

Para el análisis LC-MS de los extractos obtenidos, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia, *HPLC AT 1200 Series* (AT, Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con una unidad de desgasificación de disolvente al vacío G1379B, una bomba binaria de gradiente AT G1312A, un inyector automático de muestras AT G1367B y una unidad termostada para la columna AT G1316A (**Figura 22**).

La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna C_{18} *Kinetex* (*Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.*) de 100 mm x 4,6 mm d.i., 2.6 μ m de tamaño de partícula), a 35°C. La fase móvil fue una solución acuosa al 0,2% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo y ácido fórmico al 0,2% (B). La condición inicial del gradiente fue de 95% de A y 5% de B, que cambió linealmente hasta 10% de B en 3 min, luego, a 20% de B en 5 min, y 80% de B, en 10 min, se mantuvo durante 5 min; posteriormente, se cambió a 100% de B en 5 min, y se mantuvo durante 5 min, el retorno a las condiciones iniciales se hizo en 15 min. El tiempo total de la corrida fue de 40 min. El flujo fue de 0,2 mL/min y el volumen de inyección fue de 4 μ L.



Figura 22. Cromatógrafo líquido *AT 1200 Series* con analizador de tiempo de vuelo *AT TOF-MS 6210 Series*. Fuente: Autor, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS. Bucaramanga, 17 de diciembre de 2016.

El cromatógrafo líquido fue conectado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS 6210 *Series*; AT, Palo Alto, CA, EE.UU.), a través de una interfaz de electronebulización (ESI), operada en modo positivo. Se usó nitrógeno como gas secante (350°C, 7 L/min) y gas nebulizador (40 psi). El voltaje del capilar fue de 4000 V, fragmentador, 175 V; *skimmer* 65 V; octopolo 1, 200 V. Los espectros de masas se adquirieron en el rango de masas de m/z 100–950, con una velocidad de adquisición de 2 espectros/s. Se realizó la corrección de la masa en tiempo real utilizando una solución que tenía purina ($C_5H_4N_4$ m/z 121,05087) y hexaquis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropentoxi)- fosfazeno ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$ m/z 922,00980).

La identificación de los compuestos se confirmó, usando el modo de cromatograma de iones extraídos (EIC, *Extracted Ion Chromatogram*), *i.e.*, fragmentograma de masas, y medición de masas exactas.

La cuantificación se realizó por medio del método de estándar externo con patrones de referencia certificados. El rango de concentraciones, con las que se realizó cada curva de calibración, fue de 250 ppb a 10 ppm.

3.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de la capacidad antioxidante de los metabolitos aislados se realizó por medio de los ensayos de capacidad de absorción de los radicales de oxígeno y la decoloración de catión-radical ABTS⁺. La medición de la capacidad anti-radicalaria de los compuestos de referencia (α -tocoferol y Trolox[®]), el AE y los diferentes extractos de *P. amboinicus*, se llevó a cabo en un lector de microplacas *Turner Biosystems Modulus™ II Multimode* (*TURNER BIOSYSTEMS*, Sunnyvale, CA., EE.UU.) ((**Figura 23**) con microplacas en poli(estireno) de 96 pozos, provisto de un módulo de absorbancia UV-Vis y un módulo de fluorescencia con filtros que manejan longitudes de onda $\lambda=490$ nm, de excitación, y $\lambda=510-570$ nm, de emisión.



Figura 23. Lector de microplacas *Turner Biosystems Inc. Modulus™ II Microplate Multimode Reader*. Autor, CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 17 de diciembre de 2016.

3.6.1. Ensayo de la absorción de radicales de oxígeno

Para este ensayo, se adicionó fluoresceína (FL), en cada uno de los 96 pozos de una placa en la que previamente se prepararon las diferentes diluciones de las muestras para analizar y se incubó a una temperatura de 37 °C durante 18 min, de inmediato se adicionó rápidamente una solución de AAPH antes de iniciar el registro de la disminución de la fluorescencia en función del tiempo [92, 93]. Los datos se analizaron con un macro en *Microsoft Excel®* desarrollado en CENIVAM [93].

Para determinación del valor ORAC, se utilizaron las curvas de calibración de Trolox® como sustancia de referencia. Dicho valor se dedujo del área bajo la curva (ABC) (**Ecuación 4**), que, a su vez, resultó de la diferencia entre la respuesta en términos de la capacidad antioxidante de una muestra analizada y la de un blanco, el cual se expresa en μmol de Trolox®/ g de muestra así como sigue:

$$ABC = 0.5 + f_1/f_0 + \dots + f_i/f_0 + \dots + f_{34}/f_0 + 0.5 (f_{35}/f_0) \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

f_0 : Fluorescencia inicial medida a un tiempo de 0 min.

f_i : Fluorescencia medida a un tiempo i .

3.6.2. Ensayo de la decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

En este ensayo, se mezcló una solución de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2,45 mM), para preparar una solución del catión-radical ABTS^{•+}, la cual se homogeneizó y sonicó por 30 min, antes de dejar reaccionar por 24 h a 4 °C, en ausencia de luz. Luego, se prepararon las respectivas soluciones de trabajo, cuya absorbancia se verificó que fuera de $0,701 \pm 0,003$, y se adicionó a las diluciones de las muestras y sustancias de referencia hasta lograr una inhibición entre el 10 y el 80 % del blanco de absorbancia registrada a una longitud de onda de $\lambda=750$ nm (**Ecuación 6**) [93].

$$\% \text{ Inhibición } A_{\lambda=750\text{nm}} = [1 - A_f / A_0] \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde A_0 y A_f corresponden, respectivamente, a los valores de medida absorbancia del blanco de reacción y a la que se mide 30 min, después de la adición de la muestra.

Los valores de la capacidad antioxidante se determinaron por medio de la respectiva curva de calibración de Trolox[®], y se expresaron como $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

El desarrollo del presente trabajo de investigación implicó la extracción de diferentes tipos de metabolitos secundarios de *P. amboinicus*, por varias técnicas de aislamiento, la caracterización química de los compuestos aislados mediante su análisis instrumental y la evaluación de su capacidad antioxidante *in vitro*.

4.1. SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

Luego de someter las partes aéreas de *P.amboinicus* a un proceso de secado a la sombra durante 50 días, se obtuvieron los datos experimentales del registro de pérdida en peso del material vegetal. La **Figura 24** muestra la disminución del porcentaje en peso del material vegetal por la pérdida diaria de agua (Véase la **Ecuación 1** en la **Sección 3.3.**).

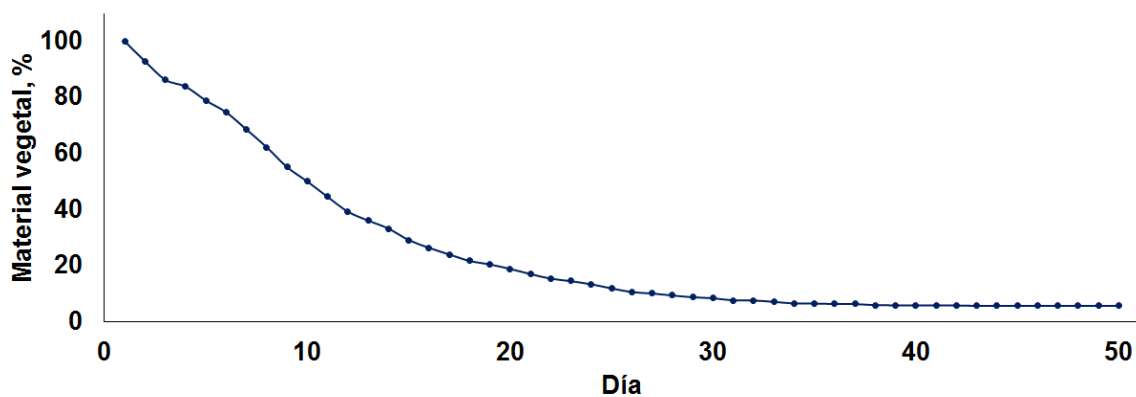


Figura 24. Curva de secado a la sombra de *P. amboinicus*.

En el día 50, al finalizar el proceso de secado, el porcentaje en peso del material vegetal, ahora seco, se redujo hasta un 5,75 % respecto al peso registrado el día 1, lo que indica un porcentaje de pérdida en peso del 94,25 %, valor que corresponde al porcentaje de agua contenido en el material vegetal en el momento cuando se recolectó.

4.2. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE Y LOS EXTRACTOS DE *P. amboinicus*.

Para aislar metabolitos secundarios de *P. amboinicus* y determinar su composición química, se utilizaron diferentes técnicas de separación: MWHD, SFE, extracciones hidroalcohólicas y MSPD, las cuales permitieron la obtención de metabolitos: volátiles y no volátiles.

Para la identificación por GC-MS de los compuestos presentes en el AE, en el extracto supercrítico y su fracción volátil, los siguientes fueron los parámetros de integración: umbral de integración (*Threshold*) de 18 y el área de rechazo del pico sobre la línea base igual a 0,1.

4.2.1. Caracterización química del AE aislado por MWHD

El AE de *P.amboinicus* obtenido por MWHD presentó una coloración amarilla opaca aunque translúcida, y un olor fuerte, ligeramente amargo.

El rendimiento de extracción del AE de *P.amoinicus* por MWHD fue de $0,18 \pm 0,01\%$ ($\pm s$, $n=3$). Este rendimiento en peso es superior al reportado por da Costa (0,013%) [81], Velasco (0,05%) [13] y Muñoz (0,1 %) [94]. Sin embargo, fue inferior al obtenido por Pino (0,55 %) [78], Khalid y El-Gohary [83] (0,2%), Senthilkumar (0,19%) [79], y Kweka (0,19%) [80].

En el AE de *P. amboinicus* se identificaron 24 compuestos con cantidades relativas > 0,1%, representados por el 96 % del área cromatográfica total.

La **Figura 25** muestra el perfil cromatográfico del AE de *P. amboinicus*, aislado por MWHD. Los números sobre cada pico corresponden al orden de elución de cada compuesto en una columna apolar DB-5MS, tal y como se muestra en la **Tabla 9**.

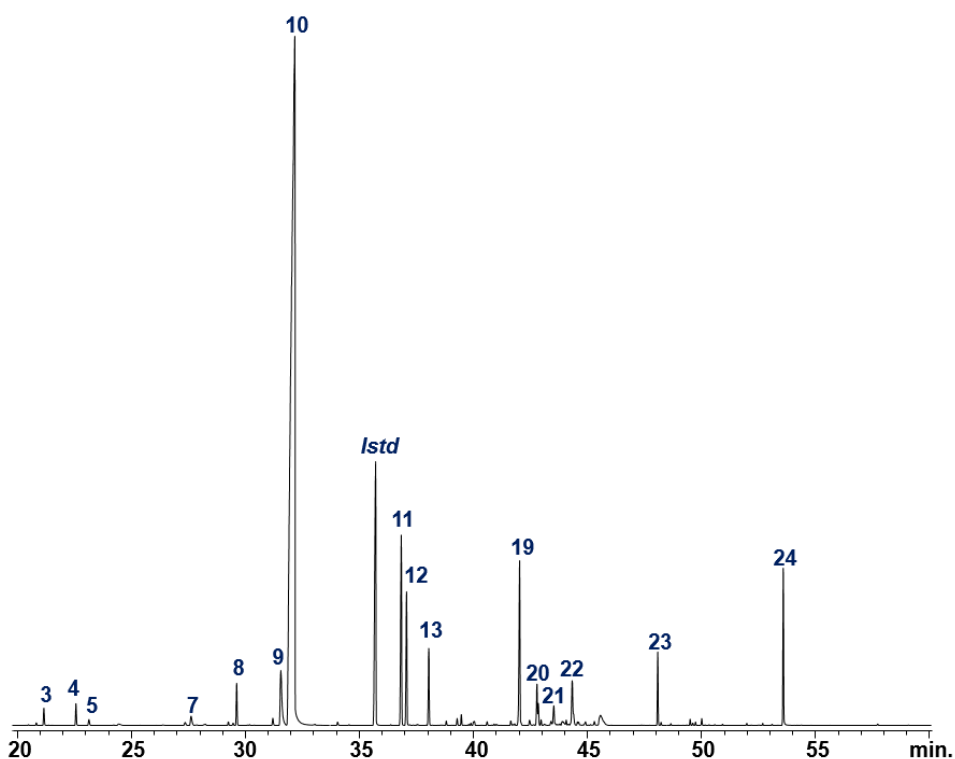


Figura 25. Perfil cromatográfico del AE de *P. amboinicus* aislado por MWHD. Columna DB-5MS, 60 m. *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

En la **Tabla 9**, se encuentran los compuestos identificados en el AE de *P. amboinicus*.

Tabla 9. Caracterización química por GC-MS del AE de *P.amboinicus*.

Nº Fig. 25	Compuesto	Índices de retención lineales				Cantidad relativa, % (±s, n=3)
		DB5-MS		DB-WAX		
		Exp.	Lit.	Exp.	Lit.	
1	Δ^3 -Careno	1011	1011 [87]	1138	1146 [88]	0,11 ± 0,03
2	α -Terpineno	1019	1017 [87]	1168	1177 [88]	0,18 ± 0,04
3	<i>p</i> -Cimeno	1027	1024 [87]	1272	1270 [89]	0,40 ± 0,02
4	γ -Terpineno	1067	1059 [87]	1234	1238 [88]	0,44 ± 0,07
5	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	1074	1070 [87]	1455	1460 [88]	0,24 ± 0,04
6	Borneol	1179	1169 [88]	1688	1699 [88]	0,11 ± 0,01
7	Terpinen-4-ol	1186	1177 [87]	-	1601 [88]	0,30 ± 0,03
8	Carvacril-metil-éter	1240	1244 [87]	1588	1598 [88]	0,54 ± 0,04
9	Timol	1293	1290 [87]	2154	2164 [88]	1,6 ± 0,3
10	Carvacrol	1309	1300 [88]	2188	2189 [88]	76,8 ± 0,4
11	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1423	1420 [87]	1598	1598 [88]	3,9 ± 0,2
12	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1440	1441 [89]	1582	1575 [88]	2,4 ± 0,1
13	α -Humuleno	1454	1453 [88]	1667	1666 [88]	1,4 ± 0,1
14	(<i>cis</i> , <i>trans</i>)- α -Farneseno	1491	1491 [88]	-	1728 [88]	0,16 ± 0,07
15	α -Muroleno	1506	1500 [87]	1716	1723 [88]	0,19 ± 0,04
16	β -Bisaboleno	1512	1508 [88]	1732	1727 [88]	0,14 ± 0,01
17	δ -Cadineno	1526	1523 [88]	-	1755 [88]	0,17 ± 0,06
18	β -Sesquifelandreno	1530	1523 [88]	1758	1771 [88]	0,12 ± 0,02
19	Óxido de cariofileno	1584	1583 [87]	1981	1986 [88]	3,1 ± 0,3
20	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1625	1619 [87]	2050	2056 [89]	0,8 ± 0,2
21	<i>epi</i> - α -Cadinol	1628	1637 [88]	-	2227 [88]	0,38 ± 0,07
22	<i>cis</i> -14-Hidroxi- cariofileno	1683	1682 [89]	2346	2357 [89]	0,5 ± 0,1
23	6,10,14-trimetil- 2-Pentadecanona	1841	1844 [89]	2134	2131 [89]	0,73 ± 0,04
24	Fitol	2108	2116 [88]	-	2613 [88]	1,53 ± 0,07
Monoterpenos						1,12 ± 0,01
Monoterpenos oxigenados						79,1 ± 0,3
Sesquiterpenos						8,5 ± 0,1
Sesquiterpenos oxigenados						4,8 ± 0,2
Diterpenos oxigenados						1,53 ± 0,07
Otros compuestos						1,27 ± 0,04

El número de compuestos identificados en el AE de esta investigación fue mayor que el reportado en las investigaciones de da Costa (10) [81] y de Velasco (15) [13]. Sin embargo, Pino *et al.* [78] reportaron un total de 27 compuestos, el número más alto identificado en el AE de *P. amboinicus*.

El carvacrol (76,8%) fue el compuesto mayoritario en el AE de *P. amboinicus* (Tabla 9).

La Figura 26 muestra la ruta de fragmentación del carvacrol (EI, 70 eV).

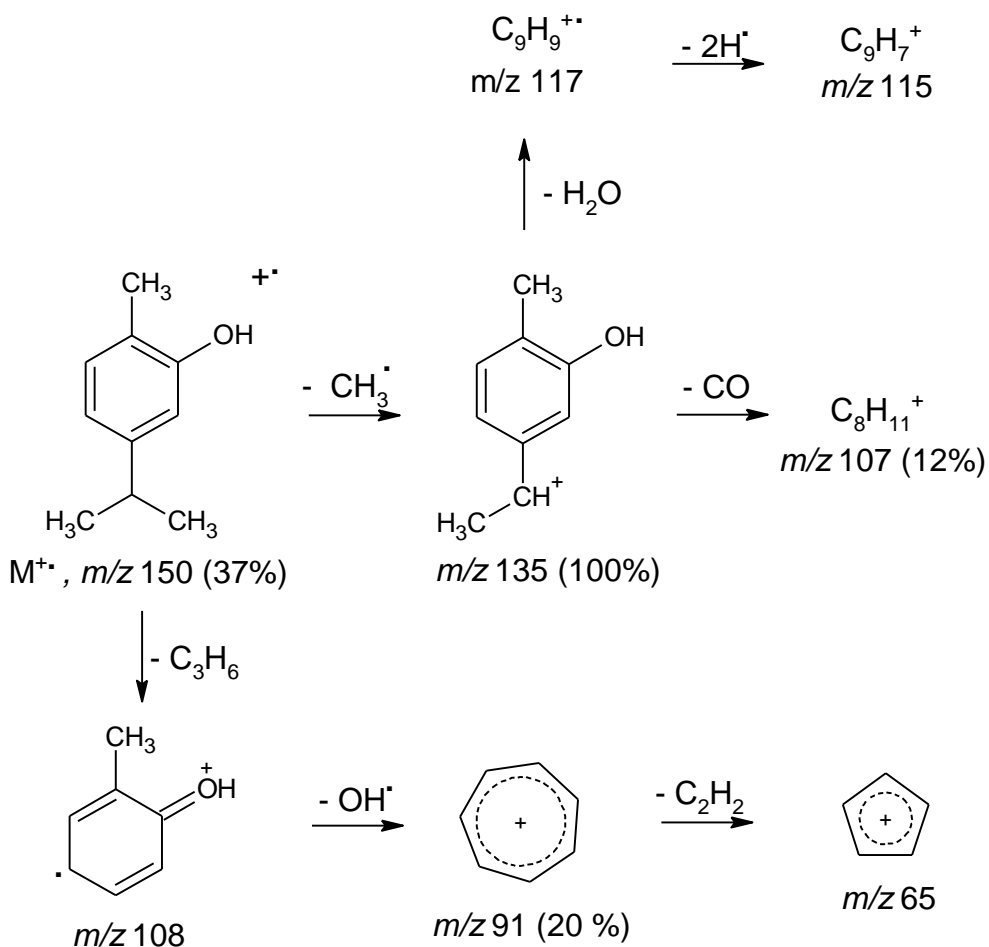


Figura 26. Ruta de fragmentación (EI, 70 eV) del carvacrol.

En la sección de **Anexos** se muestra el espectro de masas (EI, 70 eV) experimental del carvacrol.

El carvacrol es un compuesto con propiedades antifúngicas, antimicrobianas, y antioxidantes [64, 95-97].

Los siguientes son compuestos presentes en el AE de *P. amboinicus* en cantidad relativa >1%: *trans*- β -cariofileno (3,9 %), óxido de cariofileno (3,1%), *trans*- α -bergamoteno (2,4 %), timol (1,6 %), fitol (1,5%) y α -humuleno (1,4 %); a diferencia de los restantes 17, alcanzaron a superar el 10 % de área cromatográfica total.

De los estudios de la composición química del AE de *P. amboinicus* solo dos reportaron cantidades relativas de carvacrol superiores al 60%: Velasco *et al.* [13] reportaron un 65,2 % y Murthy *et al.* [98], carvacrol (70%) y *trans*- β -cariofileno (6,2%).

Los monoterpenos oxigenados (79,1%) constituyeron el grupo mayoritario de compuestos en el AE, esto debido, en gran medida, por la presencia de carvacrol (76,8%) y timol (1,6%). De los otros grupos de compuestos, el único que alcanza a superar una cantidad relativa del 5% es el de los sesquiterpenos (8,6%), constituido principalmente por *trans*- β -cariofileno (3,9 %), *trans*- α -bergamoteno (2,4 %) y α -humuleno (1,4 %).

4.2.2. Caracterización química del extracto obtenido con CO₂ supercrítico

Del extracto supercrítico de *P. amboinicus* se obtuvieron dos fracciones, ambas presentaron una coloración verde-amarilla, con una oloración herbal dulce y una consistencia pastosa.

El rendimiento de extracción en peso fue del 1,26%, este valor fue inferior al reportado por Pino *et al.* [78], quienes, a una presión de 27,6 MPa (276 bar), obtuvieron el rendimiento de extracción de 1,4%.

En el extracto supercrítico de *P. amboinicus*, se identificaron diez compuestos diferentes (nueve de ellos, estaban presentes en ambas fracciones), con cantidades relativas superiores al 0,1%, con lo cual se identificó el 98% (de la fracción 1) y 97% (fracción 2) del área cromatográfica total.

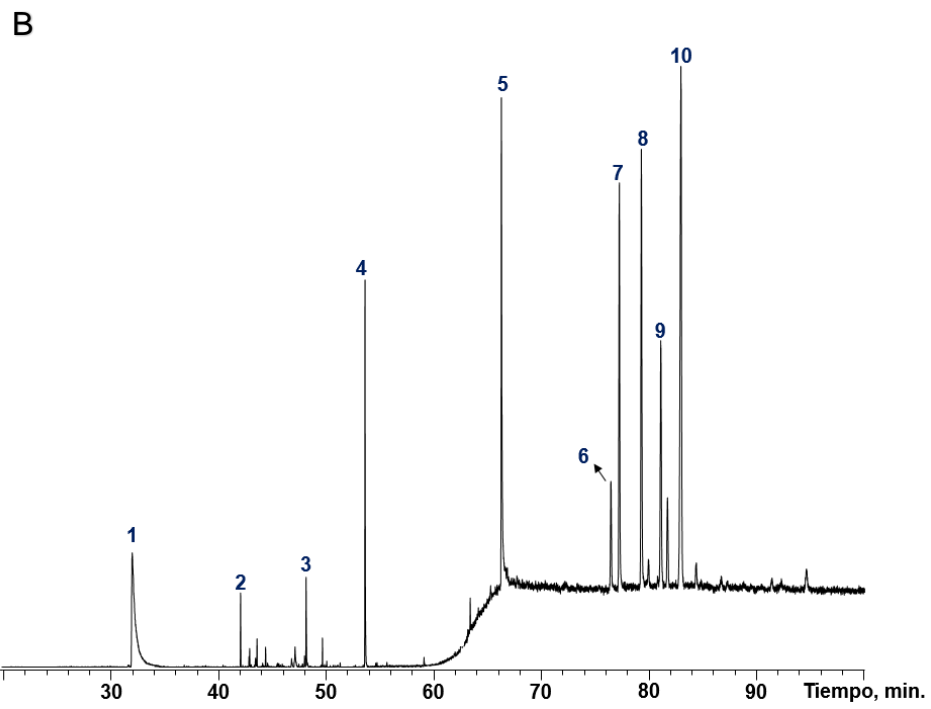
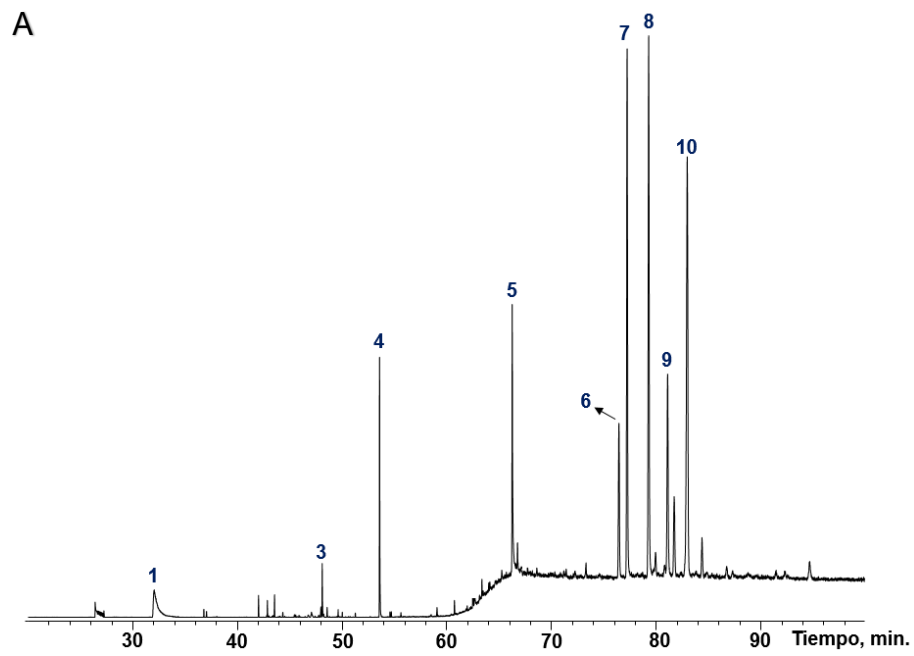


Figura 27. Perfiles cromatográficos del extracto supercrítico de *P. amboinicus*. A. Fracción 1 y B. Fracción 2. Columna DB-5MS, 60 m. *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

La **Figura 27** muestra los perfiles cromatográficos de las fracciones 1 y 2 del extracto supercrítico de *P. amboinicus*. Los números sobre cada pico corresponden al orden de elución de cada compuesto en la columna apolar DB5-MS, tal como se muestra en la **Tabla 10**.

En la **Tabla 10**, se registran los compuestos identificados en las fracciones 1 y 2 del extracto supercrítico de *P. amboinicus*, según el orden de elución en la columna apolar, DB-5MS. Además, se muestran los IRL experimentales calculados, los reportados en la literatura [87-89] y las cantidades relativas (%) de cada compuesto identificado.

Tabla 10. Caracterización química por GC-MS del extracto supercrítico de *P.amboinicus*.

Nº Fig. 27	Compuesto	IRL		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)	
		DB5-MS		Fracción 1	Fracción 2
		Exp.	Lit.		
1	Carvacrol	1306	1300 [88]	4,2 \pm 0,1	4,4 \pm 0,3
2	Óxido de cariofileno	1588	1583 [87]	-	1,4 \pm 0,1
3	6,10,14-Trimetil- 2-pentadecanona	1841	1844 [89]	0,85 \pm 0,06	1,9 \pm 0,2
4	Fitol	2108	2116 [88]	4,6 \pm 0,1	6,36 \pm 0,04
5	Escualeno	2804	2814 [89]	6,8 \pm 0,3	12,7 \pm 0,2
6	Campesterol	3139	3131 [89]	6,2 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1
7	Stigmasterol	3264	3248 [89]	19,4 \pm 0,2	13,6 \pm 0,2
8	γ -Sitosterol	3322	3351 [89]	22,4 \pm 0,1	15,2 \pm 0,4
9	β -Amirina	3339	3337 [89]	8,68 \pm 0,09	10,1 \pm 0,3
10	α -Amirina	3384	3376 [89]	25,2 \pm 0,1	26,8 \pm 0,7
Monoterpenos oxigenados				4,2 \pm 0,1	4,4 \pm 0,3
Sesquiterpenos oxigenados				-	1,4 \pm 0,1
Diterpenos oxigenados				4,6 \pm 0,1	6,36 \pm 0,04
Triterpenos				6,8 \pm 0,3	12,7 \pm 0,2
Triterpenos oxigenados				33,88 \pm 0,01	36,9 \pm 0,2
Fitosteroles				47,93 \pm 0,04	33,12 \pm 0,07
Otros compuestos				0,85 \pm 0,06	1,9 \pm 0,2

Según la **Tabla 10**, la composición química de ambas fracciones fue muy similar. Ambas fracciones se encuentran constituidas principalmente por fitosteroles y triterpenoides (triterpenos y triterpenos oxigenados). Estos últimos alcanzan a constituir el 40,68 % de la fracción 1 y el 3

9,6 % de la fracción 2.

Cabe resaltar, que los fitosteroles (campesterol, estigmasterol y γ -sitosterol) no son metabolitos secundarios, sin embargo, su carácter apolar y liposoluble pudo haber facilitado su extracción bajo las condiciones empleadas. Estos compuestos constituyeron el 47,93 y el 33,12% en cantidad relativa de las fracciones 1 y 2 respectivamente.

En ambas fracciones, el compuesto mayoritario fue la α -amirina (**Figura 28**), triterpeno oxigenado, cuyas cantidades relativas fueron de 25,2 y 26,8% en las fracciones 1 y 2 respectivamente.

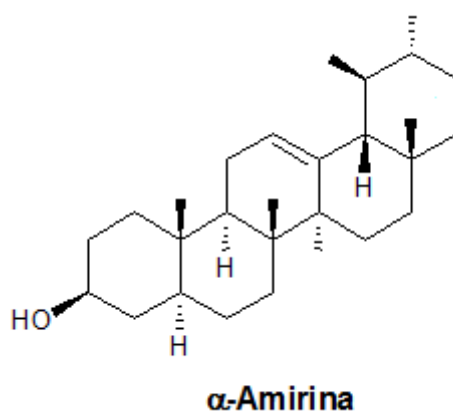


Figura 28. Estructura molecular de la α -amirina.

De este compuesto, no hay reportes en la literatura sobre su actividad biológica, sin embargo, este compuesto aparece reportado en estudios de la composición lipídica de matrices vegetales [99].

Muñoz [94] realizó una extracción con CO₂ supercrítico con una presión de 75,84 bar y determinó una composición porcentual relativa del 77,3% para compuestos con 20 o más átomos de carbono, que incluyen: α-tocoferol (6,5%), escualeno (0,9%), nonacosano (1,1%), γ-sitosterol (7,3) y compuestos no identificados C₂₀-C₃₀ (61,5%). En la presente investigación, las cantidades relativas de los compuestos con más de 20 átomos de carbono correspondieron al 93,28 y al 89,06 %, para las fracciones 1 y 2, respectivamente, esto puede deberse a que la extracción se realizó a una presión mayor (300 bar), lo cual pudo haber facilitado la extracción de compuestos de alto peso molecular.

Lo esperado era, al utilizar una presión de extracción de 300 bar y el etanol (96%) como co-solvente, extraer compuestos tipo flavonoide; sin embargo, estos compuestos no se detectaron en ninguna de las fracciones obtenidas.

La identificación y la determinación de la cantidad relativa de los volátiles presentes en las fracciones del extracto supercrítico se realizó por medio de la microextracción en fase sólida con muestreo en espacio de cabeza (HS-SPME), para la que se empleó una fibra CAR/PDMS.

Se identificaron 19 compuestos diferentes (11 de ellos, aparecían en ambas fracciones) con cantidades relativas superiores al 0,1%, con lo cual se identificó el 97% del área cromatográfica total, para ambas fracciones.

En la **Figura 29**, se muestran los perfiles cromatográficos de los compuestos volátiles aislados por HS-SPME de las fracciones del extracto obtenido con CO₂ de *P.amboinicus*.

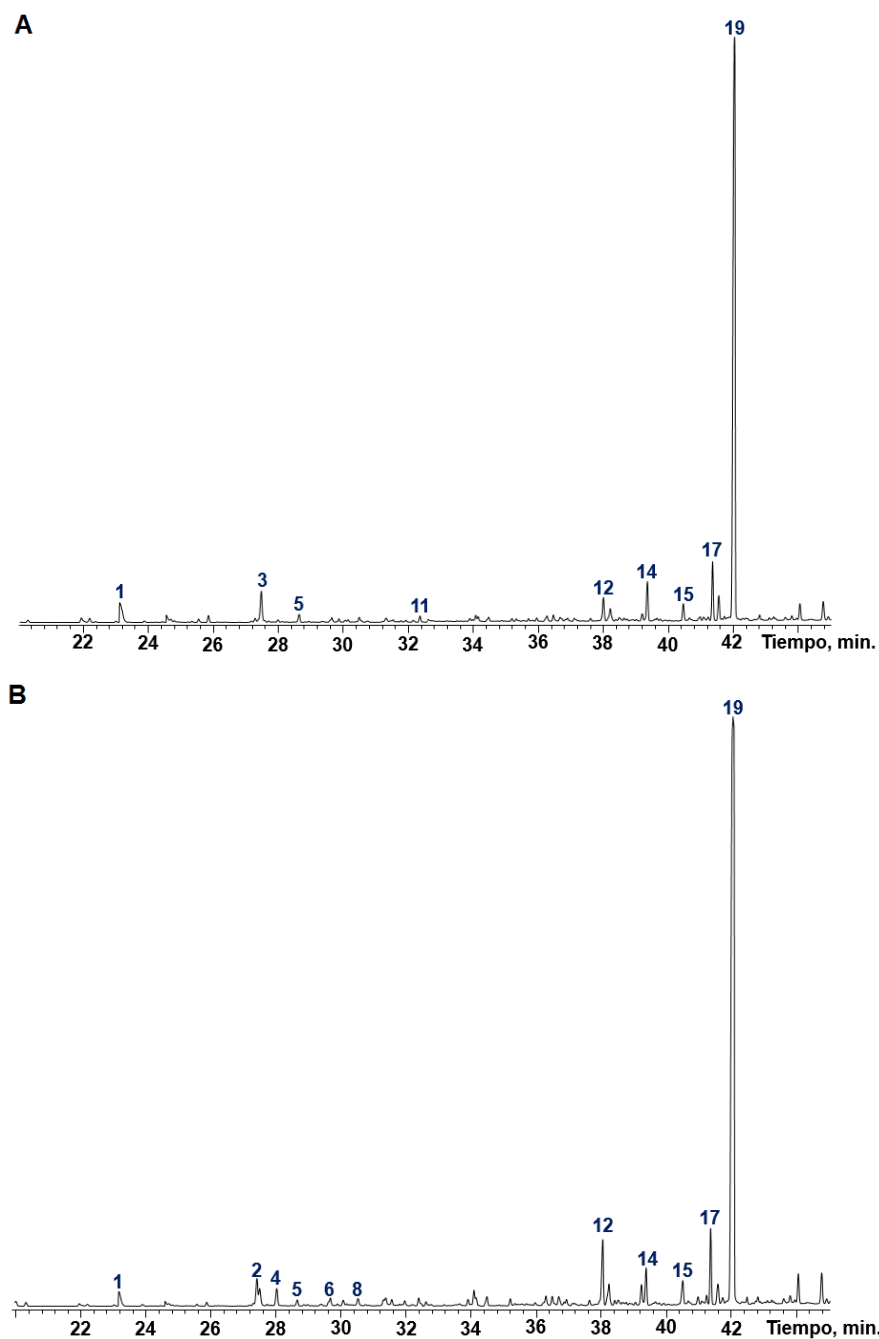


Figura 29. Perfiles cromatográficos de los volátiles aislados por HS-SPME de las fracciones 1 (A) y 2 (B) del extracto supercrítico de *P. amboinicus*. Columna DB-WAX, 60 m. *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

En la **Tabla 11**, se muestran los compuestos volátiles aislados por HS-SPME de las fracciones 1 y 2 del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *P. amboinicus*.

Tabla 11. Caracterización química por GC-MS de la fracción volátil del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *P.amboinicus*.

Nº Fig. 29	Compuesto	IRL		Cantidad relativa, %(±s, n=3)	
		DB-WAX		Fracción 1	Fracción 2
		Exp.	Lit.		
1	Ácido acético	1435	1446 [88]	2,98 ± 0,03	1,17 ± 0,02
2	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	1592	1578 [88]	-	1,79 ± 0,02
3	6-Metil-3,5-heptadien-2-ona	1595	1582 [89]	3,55 ± 0,07	1,19 ± 0,02
4	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1603	1598 [89]	-	1,05 ± 0,04
5	γ-Butirolactona	1636	1636 [89]	0,8 ± 0,03	0,3 ± 0,01
6	Estragol	1672	1676 [89]	-	0,64 ± 0,01
7	α-Humuleno	1686	1685 [88]	-	0,32 ± 0,03
8	α-Terpineol	1702	1694 [88]	-	0,45 ± 0,02
9	β-Bisaboleno	1732	1727 [88]	-	0,27 ± 0,01
10	α-Muroleno	1734	1723 [88]	-	0,46 ± 0,02
11	δ-Cadineno	1773	1756 [88]	0,53 ± 0,03	0,56 ± 0,04
12	Óxido de cariofileno	1989	1987 [89]	3,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1
13	Epóxido de humuleno II	2057	2047 [88]	0,62 ± 0,01	1,53 ± 0,02
14	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	2074	2074 [88]	3,34 ± 0,03	2,07 ± 0,05
15	6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	2129	2131 [89]	3,5 ± 0,2	1,52 ± 0,04
16	Eugenol	2165	2162 [88]	-	0,38 ± 0,02
17	Timol	2174	2164 [88]	4,42 ± 0,04	3,58 ± 0,09
18	<i>epi</i> -α-Cadinol	2183	2170 [88]	2,0 ± 0,2	1,36 ± 0,06
19	Carvacrol	2206	2210 [88]	72,7 ± 0,1	73,9 ± 0,8
Monoterpenos oxigenados				79,09 ± 0,02	80,3 ± 0,6
Sesquiterpenos				0,53 ± 0,03	4,46 ± 0,06
Sesquiterpenos oxigenados				7,16 ± 0,03	7,55 ± 0,02
Otros compuestos				10,76 ± 0,01	4,18 ± 0,03

La fracción volátil de las fracciones 1 y 2 del extracto obtenido con CO₂ supercrítico tuvo como compuesto mayoritario el carvacrol, con cantidades relativas del 72,7 y al 73,9 %, respectivamente. En cuanto a los demás volátiles presentes, ninguno

alcanzó a superar una cantidad relativa del 5% en las dos fracciones; sin embargo, entre los compuestos con cantidades relativas superiores al 2%, se destacaron: el timol (4,42 y 3,58%), el óxido de cariofileno (3,2 y 4,2%) y el 1,10-di-*epi*- cubenol (3,34 y 2,07%), respectivamente. En cuanto a familias de compuestos, el mayor porcentaje correspondió a los monoterpenos oxigenados, que constituyeron el 79,09 y al 80,3% de las fracciones 1 y 2, respectivamente, seguido por los sesquiterpenos oxigenados con cantidades relativas del 7,16 y el 7,55%; y por último, el grupo de los sesquiterpenos que constituyeron el 0,53 y el 4,46 %, respectivamente.

Es importante destacar que la caracterización de la fracción volátil del extracto obtenido con CO₂ supercrítico por medio de HS-SPME permitió la identificación de cinco compuestos volátiles que no se identificaron en el AE, a saber: epóxido de humuleno II (0,62 y 1,53%), 6-metil-3,5-heptadien-2-ona (3,55 y 1,19%) en ambas fracciones, y en la fracción 2, estragol (0,64%), eugenol (0,38%) y α -terpineol (0,45 %). Esto puede sugerir que las condiciones de extracción con CO₂ permitieron la obtención de metabolitos que no fueron aislados por MWHD, lo que demostró la efectividad de HS-SPME para extraer y concentrar analitos presentes en bajas concentraciones en muestras complejas y permitir su identificación.

Cabe resaltar, que la presencia de ácido acético y γ -butirolactona en las fracciones volátiles del extracto obtenido, se debe, posiblemente, a los procesos naturales de descomposición de algunos metabolitos secundarios.

Estos resultados son comparables con los reportados por Pino [78], quien para el extracto supercrítico de *P. amboinicus* reporta la identificación de diez volátiles por medio del análisis por GC-MS, entre los cuales figuran el carvacrol (90,41%), compuesto mayoritario, seguido por el timol (2,90 %) y el óxido de cariofileno. En cuanto a familias de compuestos, el autor reporta un 94,81% de cantidad relativa para los monoterpenos oxigenados; 2,6%, de sesquiterpenos y 2,6%, de sesquiterpenos oxigenados.

4.2.3. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico

Para de la identificación de los metabolitos secundarios no volátiles presentes en el extracto hidroalcohólico de *P. amboinicus*, primero, se determinaron las condiciones de extracción que maximizaran el valor ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de extracto). Para ello, se realizó un diseño experimental factorial 2^4 , con cinco réplicas en el centro para calcular la varianza. El propósito de este diseño fue establecer los factores o variables, *i.e.*, concentración de las diluciones acuosas del solvente, volumen del solvente, tiempo de extracción con sonicación, y temperatura de extracción, que tuvieron influencia significativa sobre el observable, el valor ORAC, variable de respuesta [85].

Los resultados obtenidos en el diseño experimental se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Resultados del diseño experimental propuesto para las extracciones hidroalcohólicas de *P. amboinicus*.

Experimento	Concentración, % v/v	Volumen, mL	Temperatura, °C	Tiempo, min	Valor ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de extracto)
1	100	20	50	60	1300 \pm 136
2	50	20	50	60	840 \pm 10
3	100	20	30	60	2200 \pm 205
4	50	20	30	60	1060 \pm 48
5	100	40	50	60	2000 \pm 226
6	50	40	50	60	1000 \pm 154
7	100	40	30	60	2100 \pm 101
8	50	40	30	60	1890 \pm 8
9	100	20	50	20	1280 \pm 82
10	50	20	50	20	1100 \pm 32
11	100	20	30	20	2170 \pm 63
12	50	20	30	20	1180 \pm 37
13	100	40	50	20	1500 \pm 182
14	50	40	50	20	1100 \pm 94
15	100	40	30	20	1560 \pm 52
16	50	40	30	20	1400 \pm 76

La evaluación estadística de las variables tenidas en cuenta, se llevó a cabo con el software *STATGRAPHICS Centurion XV.II*.

En la **Tabla 13** se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) .

Tabla 13. Análisis de varianza para los valores ORAC del diseño experimental.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración	1289940	1	1,289940	24,55	0,0008
B:Volumen	106445	1	106445	2,03	0,1884
C:Temperatura	715097	1	715097	13,61	0,0050
D:Tiempo	81282,6	1	81282,6	1,55	0,2450
AA+BB+CC+DD	34141,1	1	34141,1	0,65	0,4410
AB	60456,5	1	60456,5	1,15	0,3113
AC	18378,1	1	18378,1	0,35	0,5688
AD	66264,5	1	66264,5	1,26	0,2905
BC	41554,4	1	41554,4	0,79	0,3970
BD	207931	1	207931	3,96	0,0779
CD	43630,4	1	43630,4	0,83	0,3859
Error total	472860,	9	52540,0		
Total (corr.)	3,137980	20			

El análisis de varianza permitió establecer que los factores del diseño experimental que tuvieron una influencia significativa sobre el valor ORAC de los extractos hidroalcohólicos, eran la concentración de la dilución etanólica y la temperatura de extracción. Con un nivel de probabilidad $P = 0,05$, valor crítico para el parámetro F con 1 y 9 grados de libertad fue de 5,12; como se puede observar en la **Tabla 13**, en la columna Razón-F; los únicos factores que superaron este valor fueron la concentración y la temperatura.

La ecuación del modelo ajustado que mejor describe el valor ORAC en función de las variables analizadas se muestra en la **Ecuación 7**.

$$\text{Valor ORAC} = 1453,52 - 283,938C - 160,063CTV - 64,5625Ct + 81,5625T + 113,938Tt - 211,563V + 71,1875t \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

C: Concentración.

V: Volumen.

T: Temperatura.

t : Tiempo de extracción.

Con base en los resultados del diseño experimental para las extracciones hidroalcohólicas, las condiciones bajo las cuales se maximiza el valor ORAC, se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Combinación de los niveles de los factores que maximizan el valor ORAC.

Variable	Nivel óptimo	Valor
Concentración, % v/v	-	100
Volumen, mL	+	40
Temperatura, °C	-	30
Tiempo, min	+	60

Al aplicar estas condiciones de extracción, el rendimiento en peso del extracto etanólico fue $16,7 \pm 0,31$ % ($\pm s$, $n=3$). Una vez liofilizado, el extracto obtenido presentó una coloración verde oscura, oloración herbal.

Debido a que los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico son compuestos de alto peso molecular y termolábiles, el análisis cromatográfico para su identificación y cuantificación se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS) con interfaz de electronebulización, operada en modo positivo ESI (+). La identificación de los compuestos se confirmó usando cromatogramas de iones extraídos (EIC) y la medición de masas exactas de los analitos.

Se detectaron dos flavonoides; a diferencia de El-Hawary [84] y Bhatt [10], quienes en sus investigaciones sobre extractos alcohólicos de *P.amboinicus* reportaron ocho y seis compuestos de esta naturaleza, respectivamente. Los compuestos identificados fueron del tipo flavona: apigenina y luteolina (**Figura 30**), el primero de ellos, reportado en el estudio realizado por El-Hawary y colaboradores [84], que además, reportaron la presencia de 5-O-metil-luteolina, derivado metilado de la luteolina.

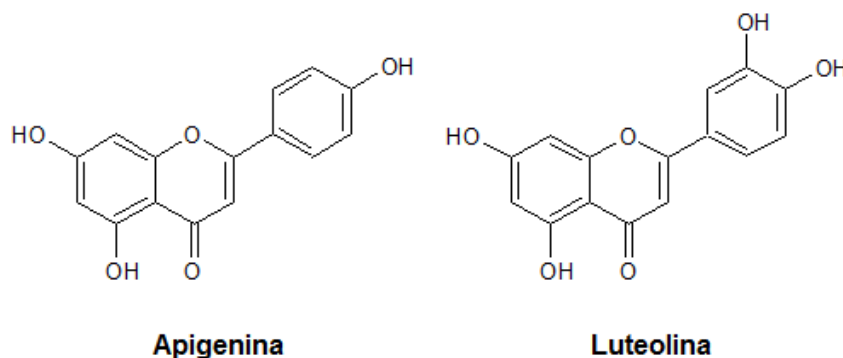


Figura 30. Estructuras químicas de los flavonoides identificados en el extracto etanólico de *P. amboinicus*.

En la **Tabla 15**, se muestran los metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico de *P. amboinicus*.

Tabla 15. Identificación de metabolitos secundarios no volátiles presentes en el extracto etanólico de *P. amboinicus*.

e	Fórmula	t _R , min	Masa [M+H] ⁺ *		Δppm**
			Calculada	Experimental	
Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	17,5	287,0550	287,0555	1,77
Apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	18,1	271,0601	271,0602	0,25

(*) Masa de ion molecular protonado.

(**) Error en el cálculo de las masas moleculares.

La **Figura 31** muestra el cromatograma de iones extraídos obtenido por LC-ESI⁺-TOF-MS del extracto etanólico de *P. amboinicus*.

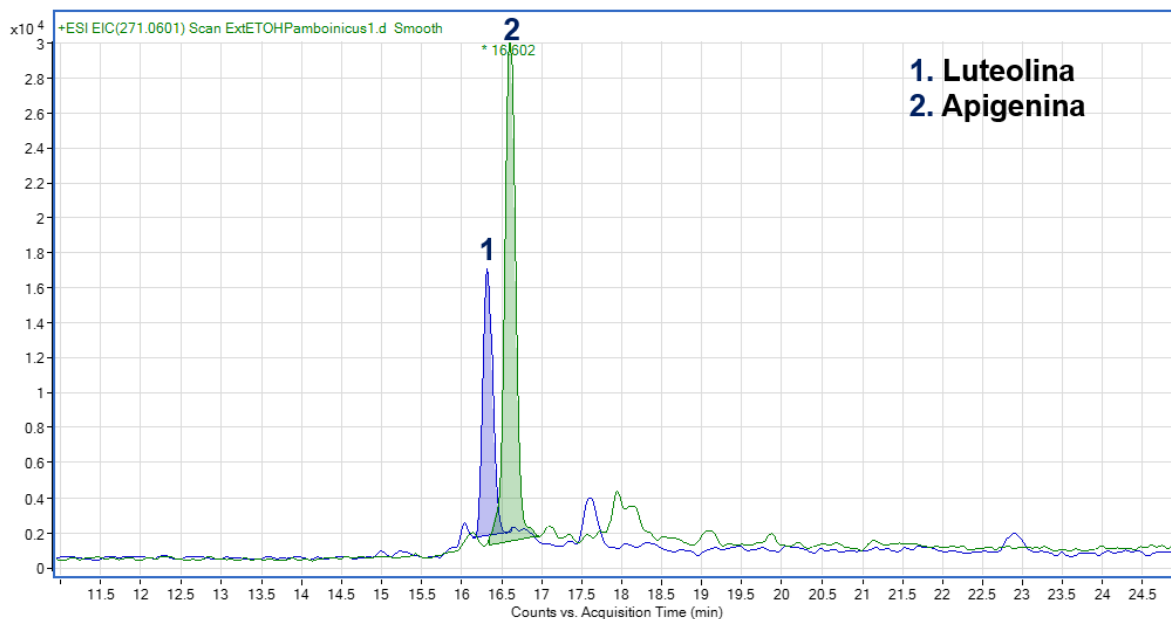


Figura 31. Fragmentograma de masas basado en la corriente iónica extraída (LC-ESI⁺-TOF-MS) del extracto etanólico de *P. amboinicus*.

4.2.4. Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto obtenido por dispersión de matriz en fase sólida

El rendimiento extracción por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) fue de $17,8 \pm 0,24\%$ ($\pm s$, $n=3$). El extracto obtenido presentó una coloración verde muy oscura, consistencia viscosa y oloración herbal.

Por medio del análisis por LC-ESI⁺-TOF-MS se identificaron los mismos compuestos presentes en en el extracto etanólico, *i. e.*, los flavonoides tipo flavona, apigenina y luteolina. Con la diferencia de que la línea base del cromatograma obtenido para el extracto MSPD no mostró tantos desniveles, lo que indica la limpieza del extracto, libre de interferencias presentes en el extracto etanólico.

La **Figura 32** muestra el cromatograma de iones extraídos obtenido por LC-ESI⁺-TOF-MS del extracto MSPD de *P. amboinicus*.

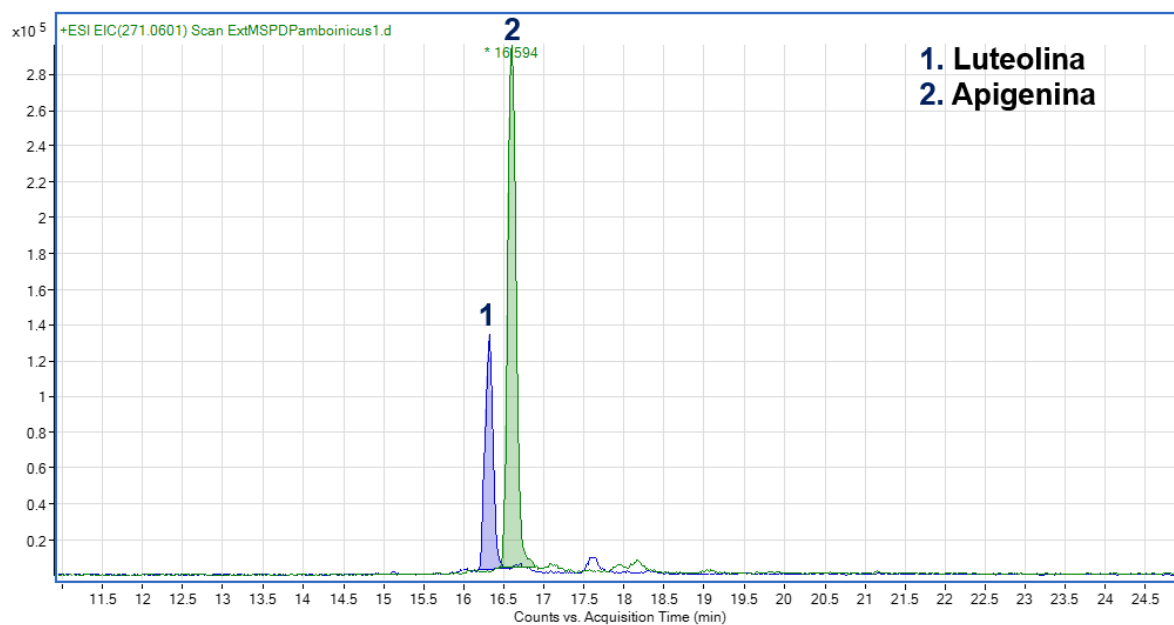


Figura 32. Fragmentograma de masas basado en la corriente iónica extraída (LC-ESI⁺-TOF-MS) del extracto MSPD de *P. amboinicus*.

En la **Tabla 16**, se muestran los metabolitos secundarios identificados en el extracto MSPD de *P. amboinicus*.

Tabla 16. Identificación de metabolitos secundarios no volátiles presentes en el extracto MSPD de *P. amboinicus*.

Compuesto	Fórmula	t _R , min	Masa [M+H] ⁺		Δppm
			Calculada	Experimental	
Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	17,5	287,0550	287,0556	2,15
Apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	18,1	271,0601	271,0604	0,96

La cuantificación de las flavonas presentes en los extractos etanólicos y MSPD, se realizó por medio del método del estándar externo, para lo cual se construyeron las curvas de calibración con los flavonoides identificados (**Figuras 33 y 34**).

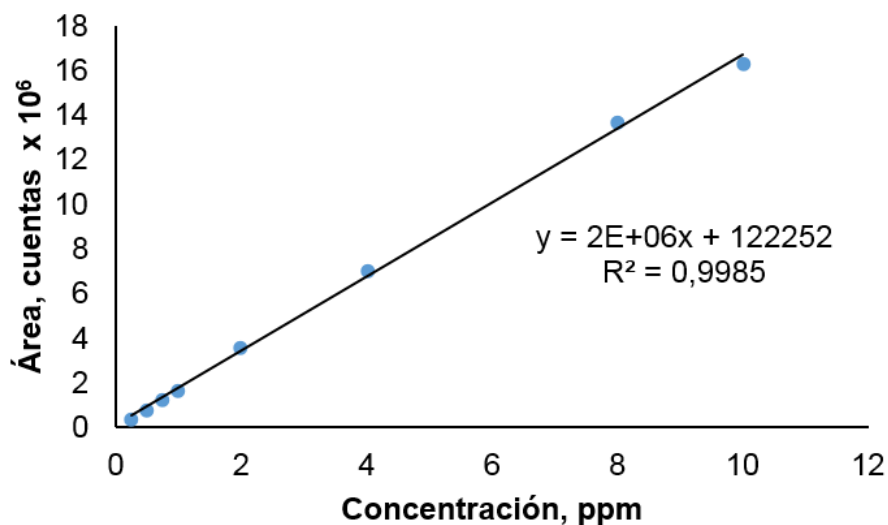


Figura 33. Curva de calibración para la cuantificación de la luteolina (LC-ESI⁺-TOF-MS).

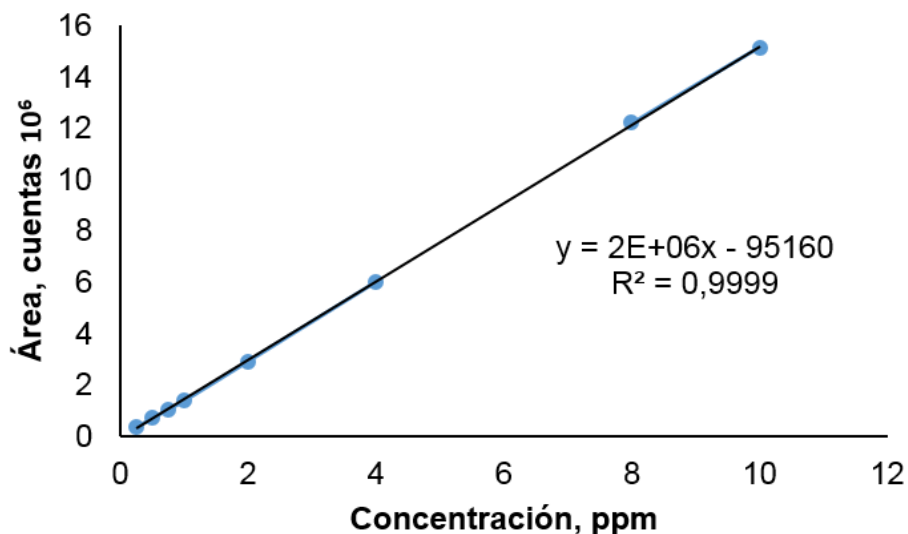


Figura 34. Curva de calibración para la cuantificación de la apigenina (LC-ESI⁺-TOF-MS).

En la **Tabla 17** se muestra la cuantificación de las flavonas presentes en los extractos etanólico y MSPD de *P. amboinicus*.

Tabla 17. Cuantificación de flavonoides por LC-ESI⁺-TOF-MS en los extractos etanólico y MSPD de *P. amboinicus*.

Compuesto	mg Compuesto/ g de extracto ($\pm s$, n=3)	
	Extracto etanólico	Extracto MSPD
Luteolina	0,21 \pm 0,02	1,11 \pm 0,04
Apigenina	0,10 \pm 0,02	0,38 \pm 0,02

En la **Tabla 17** se observa que la cantidad de las flavonas aisladas en el extracto obtenido por MSPD fue mayor que la cantidad presente en el extracto etanólico, lo que sugiere que la dispersión de matriz en fase sólida y la elución con metanol resultó ser comparativamente más efectiva para la extracción de flavonoides presentes en la matriz vegetal bajo de estudio.

En la sección de **Anexos** se muestran los espectros de masas de los flavonoides identificados y de los patrones certificados.

4.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL Y LOS EXTRACTOS AISLADOS DE *P. amboinicus*.

La evaluación de la capacidad antioxidante los metabolitos secundarios aislados en el aceite esencial y los extractos obtenidos de *P. amboinicus* se determinó por el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y la decoloración del catión-radical ABTS⁺, ensayos en los cuales se utilizaron butilhidroxitolueno (BHT), α -tocoferol y carvacrol como sustancias antioxidantes de referencia. Los resultados obtenidos se expresaron en equivalentes de μmol de Trolox[®]/g de muestra (**Tabla 18**).

Tabla 18. Valores de capacidad antioxidante (ORAC, ABTS⁺) del aceite esencial y los extractos de *P. amboinicus*.

Muestra evaluada	Método de medición (\pm s, n=3)	
	ORAC (μmol Trolox [®] / g de sustancia)	ABTS ⁺ (μmol Trolox [®] / g de sustancia)
Aceite esencial	5040 \pm 41	4900 \pm 234
Extracto supercrítico	Fracción 1	870 \pm 52
	Fracción 2	2070 \pm 36
Extracto etanólico	2000 \pm 109	689 \pm 8
Extracto MSPD	2500 \pm 134	1400 \pm 79
BHT	457 \pm 9	4760 \pm 23
α -Tocoferol	550 \pm 13	2429 \pm 7
Carvacrol	2900 \pm 100	5700 \pm 130

En la **Tabla 18** se puede observar que los valores ORAC del AE y todos los extractos de *P. amboinicus*, fueron mayores que los de los compuestos antioxidantes de referencia, BHT y α -tocoferol.

Esto se debe a la presencia de compuestos con hidrógenos lábiles disponibles en las estructuras moleculares de los metabolitos secundarios aislados, presentes en el AE y los extractos obtenidos, *i.e.*, en el grupo hidroxilo del carvacrol, compuesto mayoritario en el AE y la fracción volátil del extracto supercrítico, así como en los grupos hidroxilo de las flavonas apigenina y luteolina, presentes en el extracto etanólico y en el extracto MSPD. Estos hidrógenos lábiles serían los responsables de reaccionar con los radicales peroxilo formados como producto de la degradación térmica del AAPH, y de ejercer un efecto protector sobre la fluoresceína [66-68].

El AE de *P. amboinicus* esencial presentó el valor ORAC más alto de todas las muestras analizadas (5040 ± 41 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia), casi diez veces el valor registrado para el BHT (457 ± 9 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) y para el α -tocoferol (550 ± 13 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia). Este valor superó al valor ORAC obtenido para el carvacrol (2900 ± 100 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia), que se usó como patrón de referencia, y que además fue compuesto mayoritario en el AE ($76,81 \pm 0,44$ %). Lo anterior, se debe a que la actividad antirradicalaria puede ser favorecida o afectada por la presencia de compuestos que se encuentran en menor proporción, y no solamente se debe a un compuesto mayoritario en particular [66].

Respecto al ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺, el AE de *P. amboinicus* (4900 ± 234 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) presentó un valor de actividad antioxidante superior a la de los antioxidantes de referencia BHT (4760 ± 23 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) y α -tocoferol (2429 ± 7 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia). Este resultado es comparativamente similar al obtenido por Muñoz [94], quien para el AE aislado de hojas frescas obtuvo un valor de 5000 ± 130 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia.

Sin embargo, el valor de la actividad antioxidante del AE fue inferior a la del carvacrol ($5700 \pm 130 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia). Esto indica que para el ensayo de decoloración del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, el efecto entre el carvacrol y los demás compuestos que constituyen el AE de *P.amboinicus*, es agonista y desfavorece hasta cierto punto, la actividad antirradicalaria, *i.e.*, el mecanismo de transferencia de un electrón implicado en este método de evaluación de la capacidad antioxidante [66].

Por otro lado, el valor de la capacidad antioxidante, obtenido por medio del ensayo de la decoloración del catión-radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ de las fracciones del extracto supercrítico fue menor que el de los antioxidantes de referencia, lo que puede deberse al alto contenido de fitosteroles y triterpenos, cuya presencia pueden desfavorecer la transferencia de un electrón por parte de los antioxidantes presentes en el extracto. De igual manera, los valores obtenidos para los extractos etanólicos y MSPD fueron menores que los obtenidos para las sustancias de referencia.

CONCLUSIONES

1. Usando la hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD), la extracción con CO₂ supercrítico, la extracción con solventes (etanol) y la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), se obtuvieron el aceite esencial y los extractos de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. cultivada en los jardines experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM (UIS).
2. La composición química del aceite esencial y de los extractos de *P. amboinicus*, se determinó por cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo espectrometría de masas y a un detector de ionización en llama; y la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo. En el aceite esencial, se identificaron 24 compuestos, en el extracto obtenido con CO₂ supercrítico, 26 compuestos; en los extractos etanólico y obtenido por dispersión de la matriz en fase sólida, se identificaron dos flavonoides.
3. El carvacrol fue el compuesto mayoritario en el aceite esencial y la fracción volátil del extracto obtenido con CO₂ supercrítico. Su contenido fue mayor del 70 %. En el aceite esencial predominó la familia de los monoterpenos oxigenados (79,1%), seguidos de los sesquiterpenos (8,5%); la misma proporción se observó en la fracción volátil del extracto supercrítico; en él predominaron los monoterpenos oxigenados, con una cantidad relativa cercana 80% en ambas fracciones, seguidos de los sesquiterpenos oxigenados, con una cantidad relativa cercana al 7,2%.
4. La microextracción en fase sólida con muestreo en espacio de cabeza se usó para aislar la fracción volátil del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *P. amboinicus*, en la cual se identificaron 19 compuestos. El extracto supercrítico, además contenía triterpenoides y fitoesteroles.
5. Las mejores condiciones para la extracción con alcohol (etanol) asistido por ultrasonido fueron: concentración (v/v%) de etanol - 100%, volumen de solvente - 40 mL, temperatura de extracción - 30 °C y tiempo de extracción - 60 min; estas

condiciones permitieron aislar dos flavonas, apigenina y luteolina, sin embargo, el método de dispersión de matriz en fase sólida permitió aislar estos mismos compuestos en cantidad más alta, apigenina (0,1 mg/g de extracto vs 0,38 mg/g de extracto) y luteolina (0,21 mg/g de extracto vs 1,11 mg/g de extracto) para la extracción con alcohol y MSPD, respectivamente.

6. Los valores de la capacidad antioxidante evaluada por el método ORAC para el aceite esencial ($5040 \pm 41 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia), la fracción 1 ($870 \pm 52 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) y la fracción 2 ($2070 \pm 36 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) del extracto obtenido con CO_2 supercrítico, el extracto etanólico ($2000 \pm 109 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) y el extracto obtenido por dispersión de la matriz en fase sólida ($2500 \pm 134 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) de *P. amboinicus*, fueron mayores que los determinados para los antioxidantes de referencia BHT ($457 \pm 9 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) y α -tocoferol ($550 \pm 13 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia).
7. Los valores de la capacidad antioxidante evaluada por el ensayo de la decoloración del catión-radical ABTS^+ para el aceite esencial ($5040 \pm 41 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) fueron mayores que los determinados para los antioxidantes de referencia BHT ($4760 \pm 23 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) y α -tocoferol ($2429 \pm 7 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia), mientras que los valores determinados para la fracción 1 ($286 \pm 4 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) y la fracción 2 ($318 \pm 6 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) del extracto supercrítico, y los extractos etanólico ($689 \pm 8 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) y MSPD ($1400 \pm 79 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia), fueron más bajos que los valores obtenidos para BHT y α -tocoferol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fabricant, D. y Farnsworth, N. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*. **2001**. 109. 69-75.
2. Menéndez, R. y Pavón, V. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **1999**. 3. 110-115.
3. Stashenko, E. Aceites Esenciales. División de Publicaciones UIS. Bucaramanga. **2009**. 13-34.
4. Guenther, E. The Essential Oils. D. Van Nostrand Company Inc. Nueva York. **1948**. 77-83.
5. Putri, S; Nakayama, Y.; Matsuda, F.; Uchikata, T; Kobayashi, S.; Matsubara, A. y Fukusaki, E. Current metabolomics: practical applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **2013**. 115. 579-589.
6. Cefarelli, G.; D'Abrosca, B.; Fiorentino, A.; Izzo, A.; Mastellone, C.; Pacifico, S. y Piscopo, V. Free-radical-scavenging and antioxidant activities of secondary metabolites from reddened cv. Annurca apple fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**. 54. 803-809.
7. Kohen, R. y Nyska, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. **2002**. 30. 620-650.
8. García, J.; García, T.; Menéndez, R. y Buznego, M. Efecto antioxidante de los extractos fluidos del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (orégano francés). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **1996**. 1. 27-30.
9. Kumaran, A. y Kuranakaran, J. Antioxidant free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*. **2006**. 97. 109-114.
10. Bhatt, P.; Joseph, G.; Negi, P. y Varadaraj, M. Chemical composition and nutraceutical potential of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) stem extract. *Journal of Chemistry*. **2013**. 13. 1-7.

11. Codd, L. *Plectranthus (Labiatae)* and allied genera in Southern Africa. *Bothalia*. **1975**. 11. 371-442.
12. Lukhaba, C.; Simmonds, M. y Paton, A. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**. 103. 1-24.
13. Velasco, J.; Rojas L., B.; Díaz, T. y Usubillaga, A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* Lour., against enteric pathogens. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. **2009**. 12. 453-461.
14. Chen, Y.; Yu, H.; Shie, J.; Chung, R.; Wu, C.; Fang, J. y Wong, C. Chemical constituents of *Plectranthus amboinicus* and the synthetic analogs possessing anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2014**. 22. 1766-1772.
15. Dewick, P. M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. Tercera Edición. John Wiley & Sons. Chichester. **2009**. pp. 7-38, 137-184, 187-306.
16. Taiz, L. y Zeiger, E. Plant physiology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. Tercera Edición. **2002**. 283-308.
17. Sell, C. A fragrant introduction to terpenoid chemistry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. **2003**. 1-17, 19-42.
18. Vermeir, W. y Nicholson, R. Phenolic compound biochemistry. Springer. Nueva York. **2008**. 1-31, 35-60, 63-133.
19. Ávalos, A. y Pérez-Urria, E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. Madrid. **2009**. 2. 119-145.
20. Stashenko, E. y Martínez, J. Plantas aromáticas y aceites esenciales: Estudio y aplicaciones. División de Publicaciones UIS. Bucaramanga. **2012**. 15-31.
21. Hüsni, K. y Buchbauer, G. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton. **2010**. 121-122.
22. Bandoni, A. (Editor) Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Ciencia y tecnología para el desarrollo. Buenos Aires. **2002**. 27-38.

23. Bhat, S.; Nagasampagi, B. y Sivakumar, M. Chemistry of natural products. Springer. Nueva York. **2005**. 1-21.
24. Havsteen, B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. **2002**. 96. 67-202.
25. Andersen, Ø. y Markham, K. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton. **2006**. 144-201.
26. Chan, E.; Lim, Y.; Wong, S.; Lim, K.; Tan, S.; Lianto, M. y Yong, M. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry*. **2009**. 113. 166-172.
27. Hossain, M.; Barry, C.; Martin, A. y Brunton, N. Effect of the drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*. **2010**. 123. 85-91.
28. Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. y Martínez, J. R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*. **2004**. 1025. 93-103.
29. Paré, J.; Bélanger, J. y Stafford, S. Microwave-assisted process (MAPTM): a new tool for the analytical laboratory. *Trends in Analytical Chemistry*. **1994**. 13. 176-184.
30. Paré, J. y Bélanger, J. Microwave extraction of volatile oil and apparatus therefore. U.S. Patent Ep. 0485668 a1. **1992**.
31. Tsarkova, T. Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas. Tesis de Maestría. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. **1997**. 27-31.
32. Golmakani, M. y Rezaei, K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*. **2008**. 109. 925-930.

33. Stashenko, E. y Martínez, J. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*. **2011**. 3. 25-44.
34. Sosová, H. y Aleksovsky, S. Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. *Journal of Supercritical Fluids*. **2007**. 40. 239-245.
35. Stashenko, E.; Puertas, M. y Combariza, M. Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*. **1996**. 752. 223-232.
36. Stalikas, C. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavanoids. *Journal of Separation Science*. **2007**. 30. 3268-3295.
37. Stashenko, E.; Acosta, R. y Martínez J. High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **2000**. 43. 379-390.
38. Pawliszyn, J. y Zhang, Z. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*. **1993**. 65. 1843-1852.
39. Stashenko, E. y Martínez J. Sampling compounds from natural products with headspace/solidphase microextraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **2007**. 70. 235-242.
40. Mitra, S. Sample preparation techniques in analytical chemistry. John Wiley & Sons. Hoboken. **2003**. 122, 140-141, 145, 146.
41. Walton, N. y Irown, D. Chemicals from plants: perspectives on plants secondary products. Imperial College. Londres. **1999**. 95-113.
42. Hertog, M.; Hollman, P. y Venema, D. Optimization of a qualitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavanoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1992**. 40. 1591-1598.
43. Baker, S. Matrix solid-phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **2007**. 70. 151-162.

44. Baker, S. Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*. **2000**. 885. 115-127.
45. Baker, S. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A*. **2000**. 63-68.
46. Žiaková, A.; Brandšteterová, E. y Blahová, E. Matrix solid-phase dispersión for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Chromatography A*. **2003**. 271-275.
47. Finkel, T. y Holbrook, N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. **2000**. 408. 239-247.
48. Pacher, P.; Beckman, J. y Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiology Reviews*. **2007**. 87. 315-424.
49. Diplock, A.; Charleux, J.; Crozier, G.; Kok, F.; Rice, C.; Roberfroid, M.; Stahl, W. y Viña, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*. **1998**. 80. 77-112.
50. Halliwell, B. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. **1995**. 49. 1341-1348.
51. Halliwell, B. y Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*. **2004**. 142. 231-255.
52. Shahidi, F. Bayley's industrial oil and fat products. Sexta edición. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken. **2005**. 436-443, 492-503.
53. Schiallaci, C.; Nepravishta, R. y Bellomaria, A. Antioxidants in food and pharmaceutical research. *Albanian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2013**. 1. 9-15.
54. Saad, B.; Sing, Y.; Nawi, M.; Hashim, N.; Ali, A.; Saleh, M. Sulaiman, S.; Talib, K. y Ahmad, K. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chemistry*. **2007**. 105. 398-394.
55. Grice, H. Safety evaluation of buthylated anisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*. **1988**. 26. 717-723.

56. WITSCHI, H. Enhanced tumor development by butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastro-intestinal tract. *Food and Chemical Toxicology*. **1986**. 24. 1127-1130.
57. Kahl, R. y Kappush. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*. **1993**. 196. 329-338.
58. Noguera, J.; Villanueva, R. y Ramir, G. Direct injection of edible oils as microemulsions in micellar mobile phase applied to the liquid chromatographic determination of synthetic antioxidants. *Analytica Chimica Acta*. **1999**. 22. 127-134.
59. Osawa, T. y Kato, Y. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Annals New York Academy of Sciences*. **2005**. 1043. 440-451.
60. Asard, H.; May, J. y Smirnoff, N. Vitamin C: Functions and biochemistry in animals and plants. Garland Sciences/BIOS Scientific Publishers. Oxon. **2004**. 173-202.
61. Bramley, M.; Elmadfa, I.; Kafatos, A.; Kelly, F.; Manios, Y.; Roxborough, H.; Schuch, W.; Sheehy, P. y Wagner, K. Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**. 80. 913-938.
62. Parr, A. y Bolwell, G. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**. 80. 985-1012.
63. Pietta, P. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. **2000**. 63. 1035-1042.
64. Litwack, G. Plant hormones. Vitamins and hormones. Capítulo 15. Primera Edición. Academic Press. Londres. **2005**. 72. 505-535.
65. Rice-Evans, C.; Miller, N. y Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. **1996**. 20. 933-956.

66. Huang, D.; Ou, B. y Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**. 53. 1841-1856.
67. Cao, G.; Alessio, H. y Cutler, R. Oxygen- radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*. **1993**. 14. 303-311.
68. Ou, B.; Hampsch, M. y Prior, R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**. 49. 4619-4626.
69. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. y Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. **1999**. 26. 1231-1237.
70. Antolovich, M.; Prenzler, P.; Patsalides, E.; McDonald, S. y Robards, K. Methods of testing antioxidant activity. *The Analyst*. **2002**. 127. 183-198.
71. Ahuja, S. Chromatography and Separation Science. Academic Press. San Diego. **2003**. 1-16, 13-152, 153-241.
72. Grob, R. y Barry, E. Modern practice of gas chromatography. Cuarta Edición. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken. **2004**. 25-44, 277-337, 338-402.
73. Karasek, F. y Clement, R. Basic gas chromatography-mass spectrometry, principles and techniques. Primera Edición. Elsevier Science Publishers B. V. Nueva York. **1988**. 5-40, 79-159.
74. Waksmundzka-Hajnos, M. y Sherma, J. High performance liquid chromatography in phytochemical analysis. Academic Press. Boca Raton. **2010**. 3-12, 257-286, 331-350.
75. Quirantes, R.; Lozano, J.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Segura, A. y Fernández, A. HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. *Phytochemical Analysis*. **2012**. 1-11.
76. Guilhaus, M. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. **1995**. 30. pp. 1519-1532.

77. Moya, F y Arencibia, R. La evaluación de la investigación científica: una aproximación teórica desde la cienciometría. [En Línea] Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/28237129_La_evaluacion_de_la_investigacion_cientifica_una_aproximacion_teorica_desde_la_cienciometria (Fecha de consulta: junio 28 de 2016).
78. Pino, J.; García, J. y Martínez, M. Comparative chemical composition of the volatiles of *Coleus aromaticus* produced by steam distillation, solvent extraction and supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Essential Oil Research*. **1996**. 8. 373-375.
79. Sethilkumar, A. y Venkatesalu, V. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. against *Anopheles stephensi*: a malarial vector. *Parasitology Research*. **2010**. 107. 1275-1278.
80. Kweka, E.; Senthilkumar, A. y Venkatesalu, V. Toxicity of essential oil from Indian borage on the larvae of the African malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Parasites & Vectors*. **2012**. 5. 277-281.
81. Costa, J.; Pereira, C.; Rodrigues, F. y Lima, S. Chemical composition, antibacterial and fungicidal activities of leaf oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Journal of Essential Oil Research*. **2010**. 22. 183-185.
82. Saïd, H.; Zainati, I.; Zrira, S.; Mahdi, S. y Oukessou, M. Chemical composition and antimicrobial activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. essential oil from Archipelago of Comoros. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **2012**. 15. 637-644.
83. Khalid, A. y El-Gohary, A. Effect of seasonal variations on essential oil production and composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) grown in Egypt. *International Food Research Journal*. **2014**. 21. 1859-1862.
84. El-Hawary, S.; El-Sofany, R.; Abdel-Monem, A.; Ashour, R. y Sleem, A. Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng growing in Egypt (Lamiaceae). *Pharmacognosy Journal*. **2012**. 4. 45-54.

85. Gutiérrez, P. y de la Vara, R. Análisis y diseño de experimentos. Segunda Edición. McGraw-Hill. México D. F. **2008**. 126-220.
86. Xiao, H.; Kruker, M.; Albert, K. y Liang, X. Determination and identification of isoflavanoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. **2004**. 1032. 117-124.
87. Adams, R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4ª Edición. Allured Publishing Corporation. Carol Stream. **2007**. 125-830.
88. Babushok, V.; Lindstrom, P. y Zenkevich, I. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *The Journal of Physical and Chemical Reference Data*. **2011**. 40. 1-47.
89. NIST Chemistry WebBook Standard Reference Data Base [En línea] Disponible en: <https://www.nist.gov/srd> <http://webbook.nist.gov/chemistry/>.
90. Stashenko, E. y Martínez, J. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*. **2009**. 1. 29-45.
91. Stashenko, E. y Martínez, J. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatografica*. **2010**. 2. 29-47.
92. Huang, D.; Ou, B.; Hampsch, M.; Flanagan, J. y Prior, L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**. 50. 4437-4444.
93. Arias, G. Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citriodora*, cultivadas en el municipio de Sucre (Santander). Tesis de Maestría. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. **2012**. 66-70.

94. Muñoz, A. Estudio de especies aromáticas con alto contenido de timol, carvacrol, *trans*-anetol o estragol y empleo de fenoles y sus derivados en la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas y evaluación de sus actividades biológicas. Tesis de Doctorado. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. **2010**. 77-83, 253-255.
95. Abbaszadeh, S.; Sharifzadeh, A.; Shokri, H.; Khosravi, A. y Abbaszadeh, A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative to control the growth of food-relevant fungi. *Journal of Medical Mycology*. **2014**. 24. 51-56.
96. Ultee, A y Smid, E. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. **2001**. 64. 373-378.
97. Yanishlieva, N.; Marinova, E.; Gordon, M. y Raneva, V. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. **1999**. 64. 59-66.
98. Murthy, P.; Ramalakshmi, K. y Srinivas. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chemistry*. **2009**. 114. 1014-1018.
99. Bauer, S.; Schulte, E. y Their, H. Composition of the surface wax from tomatoes. *European Food Reseach and Technology*. 219. **2004**. 487-491.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbaszadeh, S.; Sharifzadeh, A.; Shokri, H.; Khosravi, A. y Abbaszadeh, A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative to control the growth of food-relevant fungi. *Journal of Medical Mycology*. **2014**. 24. 51-56.
- Adams, R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4ª Edición. Allured Publishing Corporation. Carol Stream. **2007**. 125-830.
- Ahuja, S. Chromatography and Separation Science. Academic Press. San Diego. **2003**. 1-16, 13-152, 153-241.
- Andersen, Ø. y Markham, K. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton. **2006**. 144-201.
- Antolovich, M.; Prenzler, P.; Patsalides, E.; McDonald, S. y Robards, K. Methods of testing antioxidant activity. *The Analyst*. **2002**. 127. 183-198.
- Arias, G. Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citriodora*, cultivadas en el municipio de Sucre (Santander). Tesis de Maestría. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. **2012**. 66-70.
- Asard, H.; May, J. y Smirnoff, N. Vitamin C: Functions and biochemistry in animals and plants. Garland Sciences/BIOS Scientific Publishers. Oxon. **2004**. 173-202.
- Ávalos, A. y Pérez-Urria, E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. Madrid. **2009**. 2. 119-145.
- Babushok, V.; Lindstrom, P. y Zenkevich, I. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *The Journal of Physical and Chemical Reference Data*. **2011**. 40. 1-47.

- Baker, S. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A*. **2000**. 63-68.
- Baker, S. Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*. **2000**. 885. 115-127.
- Baker, S. Matrix solid-phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **2007**. 70. 151-162.
- Bandoni, A. (Editor) Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Ciencia y tecnología para el desarrollo. Buenos Aires. **2002**. 27-38.
- Bauer, S.; Schulte, E. y Their, H. Composition of the surface wax from tomatoes. *European Food Research and Technology*. 219. **2004**. 487-491.
- Bhat, S.; Nagasampagi, B. y Sivakumar, M. Chemistry of natural products. Springer. Nueva York. **2005**. 1-21.
- Bhatt, P.; Joseph, G.; Negi, P. y Varadaraj, M. Chemical composition and nutraceutical potencial of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) stem extract. *Journal of Chemistry*. **2013**. 13. 1-7.
- Bramley, M.; Elmadfa, I.; Kafatos, A.; Kelly, F.; Manios, Y.; Roxborough, H.; Schuch, W.; Sheehy, P. y Wagner, K. Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**. 80. 913-938.
- Cao, G.; Alessio, H. y Cutler, R. Oxygen- radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*. **1993**. 14. 303-311.
- Cefarelli, G.; D'Abrosca, B.; Fiorentino, A.; Izzo, A.; Mastellone, C.; Pacifico, S. y Piscopo, V. Free-radical-scavenging and antioxidant activities of secondary metabolites from reddened cv. Annurca apple fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**. 54. 803-809.

- Chan, E.; Lim, Y.; Wong, S.; Lim, K.; Tan, S.; Lianto, M. y Yong, M. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry*. **2009**. 113. 166-172.
- Chen, Y.; Yu, H.; Shie, J.; Chung, R.; Wu, C.; Fang, J. y Wong, C. Chemical constituents of *Plectranthus amboinicus* and the synthetic analogs possessing anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2014**. 22. 1766-1772.
- Codd, L. *Plectranthus (Labiatae)* and allied genera in Southern Africa. *Bothalia*. **1975**. 11. 371-442.
- Costa, J.; Pereira, C.; Rodrigues, F. y Lima, S. Chemical composition, antibacterial and fungicidal activities of leaf oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Journal of Essential Oil Research*. **2010**. 22. 183-185.
- Dewick, P. M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. Tercera Edición. John Wiley & Sons. Chichester. **2009**. pp. 7-38, 137-184, 187-306.
- Diplock, A.; Charleux, J.; Crozier, G.; Kok, F.; Rice, C.; Roberfroid, M.; Stahl, W. y Viña, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*. **1998**. 80. 77-112.
- El-Hawary, S.; El-Sofany, R.; Abdel-Monem, A.; Ashour, R. y Sleem, A. Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng growing in Egypt (Lamiaceae). *Pharmacognosy Journal*. **2012**. 4. 45-54.
- Fabricant, D. y Farnsworth, N. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*. **2001**. 109. 69-75.
- Finkel, T. y Holbrook, N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. **2000**. 408. 239-247.
- García, J.; García, T.; Menéndez, R. y Buznego, M. Efecto antioxidante de los extractos fluidos del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (orégano francés). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **1996**. 1. 27-30.

Golmakani, M. y Rezaei, K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*. **2008**. 109. 925-930.

Grice, H. Safety evaluation of butylated anisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*. **1988**. 26. 717-723.

Grob, R. y Barry, E. Modern practice of gas chromatography. Cuarta Edición. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken. **2004**. 25-44, 277-337, 338-402.

Guenther, E. The Essential Oils. D. Van Nostrand Company Inc. Nueva York. **1948**. 77-83.

Guilhaus, M. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. **1995**. 30. pp. 1519-1532.

Gutiérrez, P. y de la Vara, R. Análisis y diseño de experimentos. Segunda Edición. McGraw-Hill. México D. F. **2008**. 126-220.

Halliwel, B. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. **1995**. 49. 1341-1348.

Halliwel, B. y Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*. **2004**. 142. 231-255.

Havsteen, B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. **2002**. 96. 67-202.

Hertog, M.; Hollman, P. y Venema, D. Optimization of a qualitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavanoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1992**. 40. 1591-1598.

Hossain, M.; Barry, C.; Martin, A. y Brunton, N. Effect of the drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*. **2010**. 123. 85-91.

Huang, D.; Ou, B. y Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**. 53. 1841-1856.

Huang, D.; Ou, B.; Hampsch, M.; Flanagan, J. y Prior, L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**. 50. 4437-4444.

Hüsni, K. y Buchbauer, G. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton. **2010**. 121-122.

Kahl, R. y Kappush. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*. **1993**. 196. 329-338.

Karasek, F. y Clement, R. Basic gas chromatography-mass spectrometry, principles and techniques. Primera Edición. Elsevier Science Publishers B. V. Nueva York. **1988**. 5-40, 79-159.

Khalid, A. y El-Gohary, A. Effect of seasonal variations on essential oil production and composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) grown in Egypt. *International Food Research Journal*. **2014**. 21. 1859-1862.

Kohen, R. y Nyska, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. **2002**. 30. 620-650.

Kumaran, A. y Kuranakaran, J. Antioxidant free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*. **2006**. 97. 109-114.

Kweka, E.; Senthilkumar, A. y Venkatesalu, V. Toxicity of essential oil from Indian borage on the larvae of the African malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Parasites & Vectors*. **2012**. 5. 277-281.

Litwack, G. Plant hormones. Vitamins and hormones. Capítulo 15. Primera Edición. Academic Press. Londres. **2005**. 72. 505-535.

Lukhaba, C.; Simmonds, M. y Paton, A. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**. 103. 1-24.

Menéndez, R. y Pavón, V. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **1999**. 3. 110-115.

Mitra, S. Sample preparation techniques in analytical chemistry. John Wiley & Sons. Hoboken. **2003**. 122, 140-141, 145, 146.

Moya, F y Arencibia, R. La evaluación de la investigación científica: una aproximación teórica desde la cienciometría. [En Línea] Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/28237129_La_evaluacion_de_la_investigacion_cientifica_una_aproximacion_teorica_desde_la_cienciometria (Fecha de consulta: junio 28 de 2016).

Muñoz, A. Estudio de especies aromáticas con alto contenido de timol, carvacrol, *trans*-anetol o estragol y empleo de fenoles y sus derivados en la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas y evaluación de sus actividades biológicas. Tesis de Doctorado. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. **2010**. 77-83, 253-255.

Murthy, P.; Ramalakshmi, K. y Srinivas. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chemistry*. **2009**. 114. 1014-1018.

NIST Chemistry WebBook Standard Reference Data Base [En línea] Disponible en: <https://www.nist.gov/webbook/chemistry/>.

- Noguera, J.; Villanueva, R. y Ramir, G. Direct injection of edible oils as microemulsions in micellar mobile phase applied to the liquid chromatographic determination of synthetic antioxidants. *Analytica Chimica Acta*. **1999**. 22. 127-134.
- Osawa, T. y Kato, Y. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Annals New York Academy of Sciences*. **2005**. 1043. 440-451.
- Ou, B.; Hampsch, M. y Prior, R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**. 49. 4619-4626.
- Pacher, P.; Beckman, J. y Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiology Reviews*. **2007**. 87. 315-424.
- Paré, J. y Bélanger, J. Microwave extraction of volatile oil and apparatus therefore. U.S. Patent Ep. 0485668 a1. **1992**.
- Paré, J.; Bélanger, J. y Stafford, S. Microwave-assisted process (MAPTM): a new tool for the analytical laboratory. *Trends in Analytical Chemistry*. **1994**. 13. 176-184.
- Parr, A. y Bolwell, G. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**. 80. 985-1012.
- Pawliszyn, J. y Zhang, Z. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*. **1993**. 65. 1843-1852.
- Pietta, P. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. **2000**. 63. 1035-1042.
- Pino, J.; García, J. y Martínez, M. Comparative chemical composition of the volatiles of *Coleus aromaticus* produced by steam distillation, solvent extraction and supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Essential Oil Research*. **1996**. 8. 373-375.

Putri, S.; Nakayama, Y.; Matsuda, F.; Uchikata, T.; Kobayashi, S.; Matsubara, A. y Fukusaki, E. Current metabolomics: practical applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **2013**. 115. 579-589.

Quirantes, R.; Lozano, J.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Segura, A. y Fernández, A. HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. *Phytochemical Analysis*. **2012**. 1-11.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. y Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. **1999**. 26. 1231-1237.

Rice-Evans, C.; Miller, N. y Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. **1996**. 20. 933-956.

Saad, B.; Sing, Y.; Nawi, M.; Hashim, N.; Ali, A.; Saleh, M. Sulaiman, S.; Talib, K. y Ahmad, K. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chemistry*. **2007**. 105. 398-394.

Saïd, H.; Zainati, I.; Zrira, S.; Mahdi, S. y Oukessou, M. Chemical composition and antimicrobial activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. essential oil from Archipelago of Comoros. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **2012**. 15. 637-644.

Schiallaci, C.; Nepravishta, R. y Bellomaria, A. Antioxidants in food and pharmaceutical research. *Albanian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2013**. 1. 9-15.

Sell, C. A fragrant introduction to terpenoid chemistry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. **2003**. 1-17, 19-42.

Sethilkumar, A. y Venkatesalu, V. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. against *Anopheles stephensi*: a malarial vector. *Parasitology Research*. **2010**. 107. 1275-1278.

Shahidi, F. Bayley's industrial oil and fat products. Sexta edición. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken. **2005**. 436-443, 492-503.

Sosová, H. y Aleksovsky, S. Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. *Journal of Supercritical Fluids*. **2007**. 40. 239-245.

Stalikas, C. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavanoids. *Journal of Separation Science*. **2007**. 30. 3268-3295.

Stashenko, E.; Puertas, M. y Combariza, M. Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*. **1996**. 752. 223-232.

Stashenko, E.; Acosta, R. y Martínez J. High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **2000**. 43. 379-390.

Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. y Martínez, J. R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*. **2004**. 1025. 93-103.

Stashenko, E. y Martínez J. Sampling compounds from natural products with headspace/solidphase microextraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **2007**. 70. 235-242.

Stashenko, E. Aceites Esenciales. División de Publicaciones UIS. Bucaramanga. **2009**. 13-34.

Stashenko, E. y Martínez, J. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*. **2009**. 1. 29-45.

Stashenko, E. y Martínez, J. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatografica*. **2010**. 2. 29-47.

Stashenko, E. y Martínez, J. Plantas aromáticas y aceites esenciales: Estudio y aplicaciones. División de Publicaciones UIS. Bucaramanga. **2012**. 15-31.

Stashenko, E. y Martínez, J. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*. **2011**. 3. 25-44.

Taiz, L. y Zeiger, E. Plant physiology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. Tercera Edición. **2002**. 283-308.

Tsarkova, T. Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas. Tesis de Maestría. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. **1997**. 27-31.

Ultee, A y Smid, E. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. **2001**. 64. 373-378.

Velasco, J.; Rojas L., B.; Díaz, T. y Usubillaga, A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* Lour., against enteric pathogenes. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. **2009**. 12. 453-461.

Vermerris, W. y Nicholson, R. Phenolic compound biochemistry. Springer. Nueva York. **2008**. 1-31, 35-60, 63-133.

Waksmundzka-Hajnos, M. y Sherma, J. High performance liquid chromatography in phytochemical analysis. Academic Press. Boca Raton. **2010**. 3-12, 257-286, 331-350.

Walton, N. y Irown, D. Chemicals from plants: perspectives on plants secondary products. Imperial College. Londres. **1999**. 95-113.

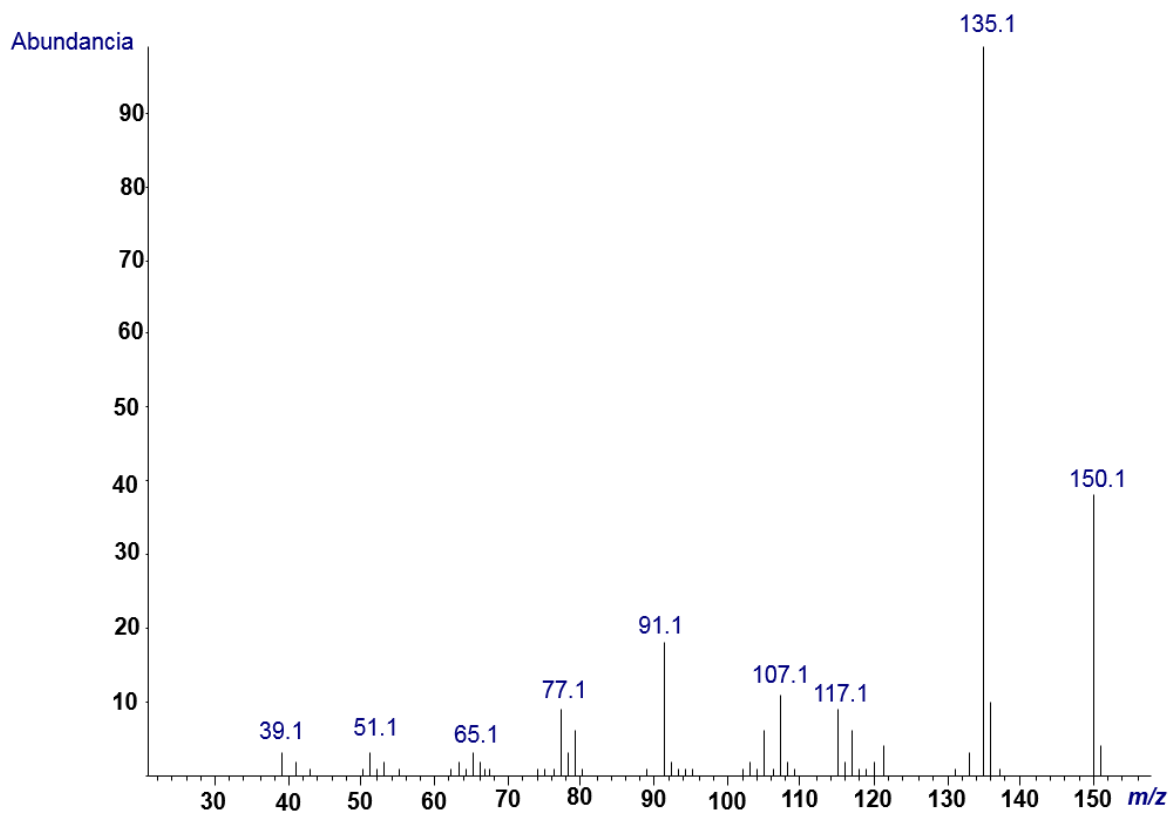
WITSCHI, H. Enhanced tumor development by butylated hydroxyatoluene (BHT) in the liver, lung and gastro-intestinal tract. *Food and Chemical Toxicology*. **1986**. 24. 1127-1130.

Xiao, H.; Kruker, M.; Albert, K. y Liang, X. Determination and identification of isoflaponoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. **2004**. 1032. 117-124.

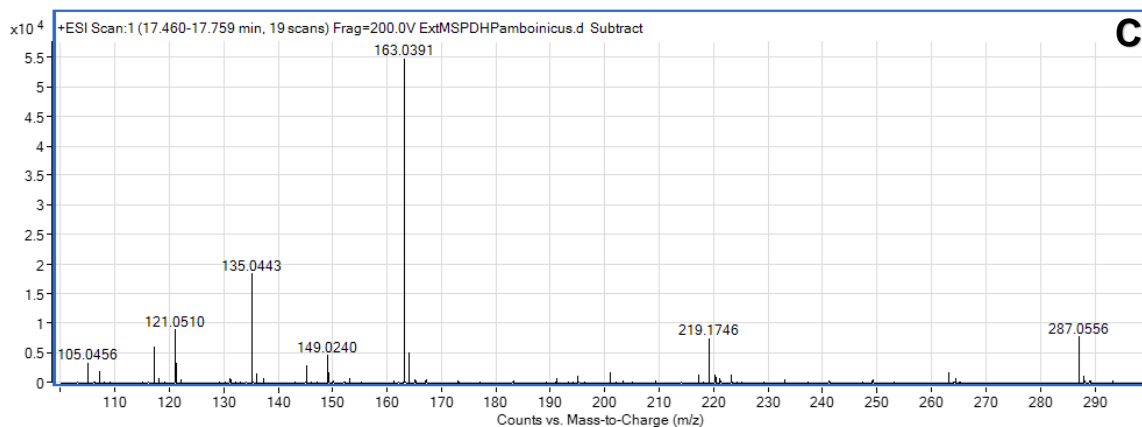
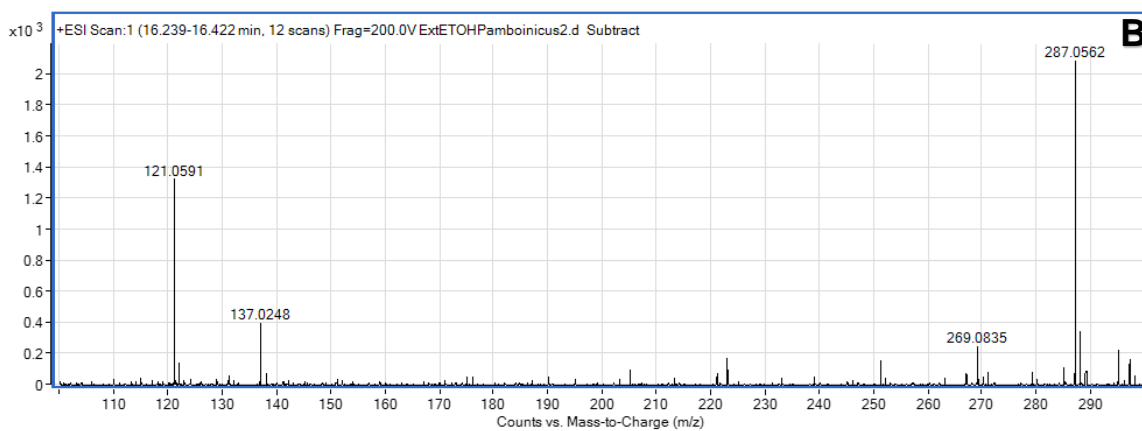
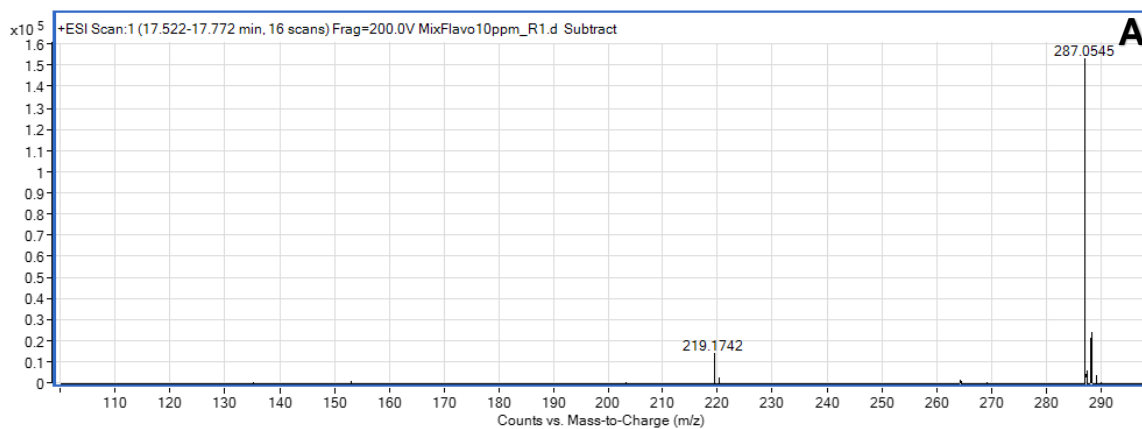
Yanishlieva, N.; Marinova, E.; Gordon, M. y Raneva, V. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. **1999**. 64. 59-66.

Žiaková, A.; Brandšteterová, E. y Blahová, E. Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Chromatography A*. **2003**. 271-275.

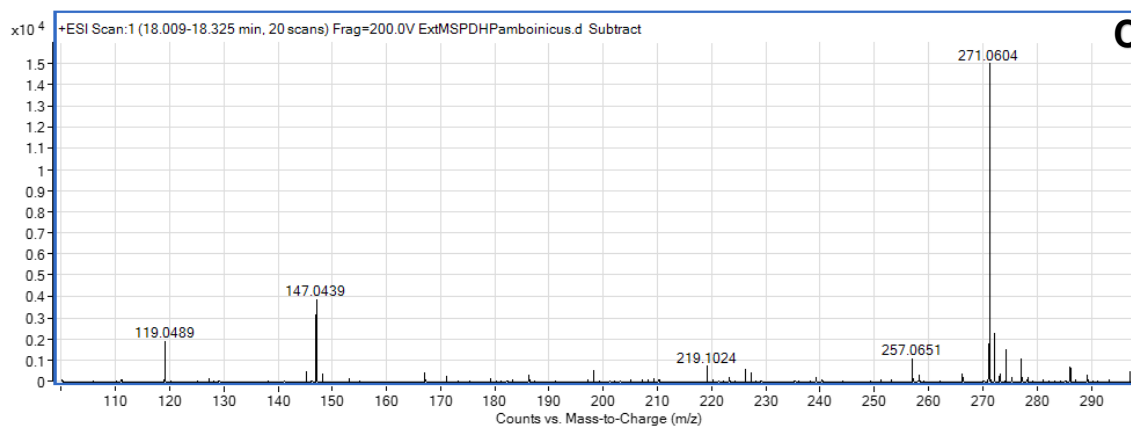
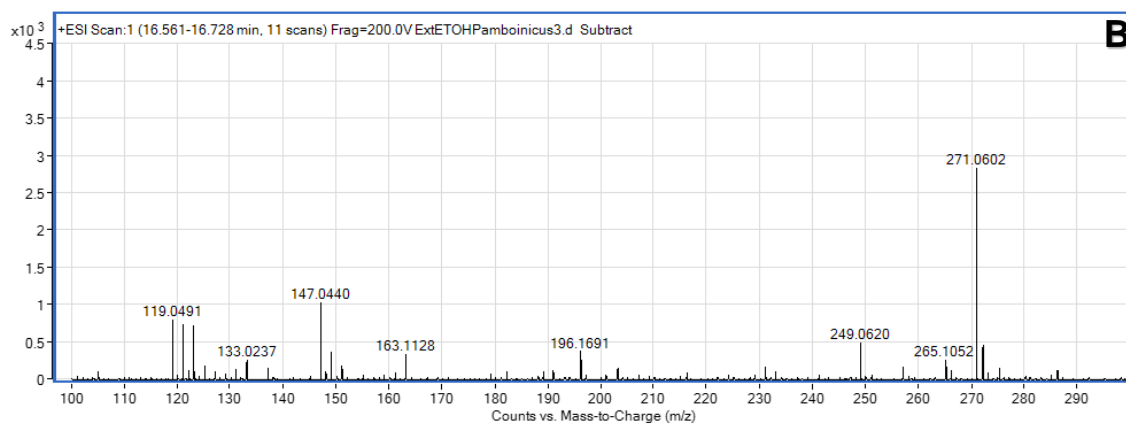
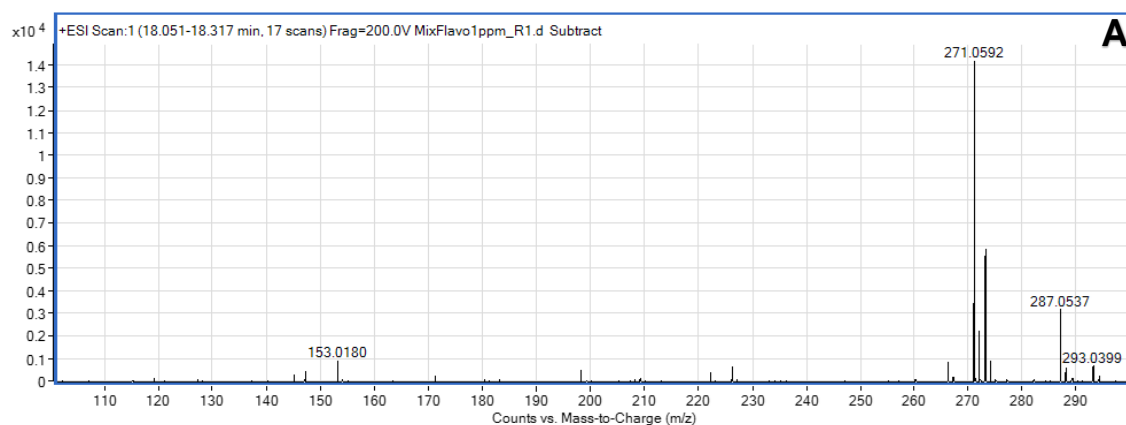
ANEXOS



Anexo 1. Espectro de masas experimental del carvacrol obtenido por GC-MS. Impacto de electrón, EI (70 eV).



Anexo 2. Espectros de masas de la luteolina. A. Patrón certificado de luteolina, B. Luteolina en el extracto etanólico y C. Luteolina en el extracto MSPD de *P.amboinicus* (LC-ESI⁺-TOF-MS).



Anexo 3. Espectros de masas de la apigenina. A. Patrón certificado de apigenina, B. Apigenina en el extracto etanólico y C. Apigenina en el extracto MSPD de *P. amboinicus* (LC-ESI⁺-TOF-MS).