

**IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES
DE *Plectranthus* sp. EN FUNCIÓN DE SU MÉTODO DE OBTENCIÓN**

RICHARD ALEXANDER TOVARÍA GARCÍA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2016**

IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE
Plectranthus sp. **EN FUNCIÓN DE SU MÉTODO DE OBTENCIÓN**

RICHARD ALEXANDER TOVARÍA GARCÍA

Proyecto de grado para optar el título de Químico

Directores

ELENA E. STASHENKO

Química, Ph. D.

JAIRO R. MARTÍNEZ

Químico, Ph. D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2016

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 16 |
| 1. MARCO TEORICO | 17 |
| 1.2. PLANTAS | 17 |
| 1.3. PLANTAS AROMÁTICAS | 18 |
| 1.4. FAMILIA DE LAS LABIADAS | 19 |
| 1.4.1. Distribución geografía y hábitat | 20 |
| 1.4.2. Usos más importantes | 21 |
| 1.5. <i>PLECTRANTHUS sp.</i> | 22 |
| 1.6. ACEITES ESENCIALES | 24 |
| 1.7. METABOLITOS SECUNDARIOS | 25 |
| 1.7.1. Terpenos y terpenoides | 27 |
| 1.8. TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL | 30 |
| 1.9. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS | 30 |
| 1.10. HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR LA RADIACIÓN DE MICROONDAS | 31 |
| 1.11. MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA | 32 |
| 1.12. EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO | 33 |
| 1.13. CROMATOGRAFÍA DE GASES | 35 |
| 1.14. ESPECTROMETRÍA DE MASAS | 36 |
| 1.15. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA MASAS 36 | |
| 1.16. INFORMETRÍA, BIBLIOMETRÍA Y CIENCIOMETRÍA | 36 |
| 2. CIENCIOMETRÍA | 39 |
| 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 46 |
| 3.1. EQUIPOS DE LABORATORIO, MATERIALES, REACTIVOS Y SOLVENTES | 46 |
| 3.2. MATERIAL VEGETAL | 48 |
| 3.3. AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS | 48 |
| 3.4. EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO | 49 |
| 3.5. Microextacción en fase sólida de espacio de cabeza (<i>HS-SPME</i>) | 50 |
| 3.6. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y PARÁMETROS TÉCNICOS DE OPERACIÓN DEL SISTEMA GC-MS | 51 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.7. | IDENTIFICACIÓN METABOLITOS SECUNDARIOS | 53 |
| 3.8. | CUANTIFICACIÓN METABOLITOS SECUNDARIOS..... | 54 |
| 4. | PRESENTACIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS..... | 55 |
| 4.1. | IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA ESPECIE VEGETAL..... | 55 |
| 4.2. | ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE..... | 56 |
| 4.3. | ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS POR SFE | 64 |
| 4.4. | CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS DIRECTAMENTE DE LAS HOJAS FRESCAS POR HS-SPME..... | 67 |
| 4.5. | COMPARACIÓN DE LAS FAMILIAS DE METABOLITOS Y METABOLITOS MAYORITARIOS DETERMINADOS EN FUNCIÓN DE LA TÉCNICA DE AISLAMIENTO | 71 |
| 5. | CONCLUSIONES..... | 75 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 76 |

LISTA TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Tipos de material vegetal empleados para la obtención de productos aromáticos [9]. | 19 |
| Tabla 2. Clases representativas de metabolitos secundarios [20]..... | 26 |
| Tabla 3. Estructuras celulares de algunas familias de plantas donde se acumulan los metabolitos aromáticos [6]. | 30 |
| Tabla 4. Usos etnobotánicos y domésticos de algunas especies del género <i>Plectranthus</i> [20,21]. | 45 |
| Tabla 5. Equipos de laboratorio..... | 46 |
| Tabla 6. Materiales de laboratorio utilizados | 47 |
| Tabla 7. Reactivo y solventes utilizados en el desarrollo de la parte experimental. | 47 |
| Tabla 8. Metabolitos identificados en el AE de <i>Plectranthus</i> sp., obtenidos por MWHD, correspondientes con los picos de los perfiles cromatográficos reportados en la Figura 16 A..... | 58 |
| Tabla 9. Metabolitos identificados en el AE, realizando muestreo por HS-SPME..... | 62 |
| Tabla 10. Metabolitos identificados en el extracto SFE, utilizando HS-SPME, correspondientes al perfil cromatográfico de la Figura 20 | 66 |
| Tabla 11. Metabolitos identificados en hojas frescas de <i>plectranthus</i> sp., | 69 |

LISTA FIGURAS

- Figura 1.** Vista simplificada de las principales rutas del metabolismo secundario y su interrelación con el metabolismo primario [32].27
- Figura 2.** . Se presentan Rutas de biosíntesis para terpenos y terpenoides. [32]29
- Figura 3.** Esquema de un equipo de MWHD para la extracción de AE utilizado a escala de laboratorio [35]......32
- Figura 4.** Modos de muestreo en SPME. (A) Inmersión directa; (B) extracción en espacio de cabeza; y (C) Inmersión con protección por membrana [37].33
- Figura 5.** Esquema de un equipo de SFE empleado a escala de laboratorio para obtener extractos de material vegetal. [35]34
- Figura 6.** Componentes principales de un Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. [36]......35
- Figura 7.** Numero de publicaciones por año, sobre el género *Plectranthus* período de observación 1986-2015 en la base de datos; *Science Direct*, *Scopus* (*Elsevier*), con la ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*essential oil and Plectranthus*) y TITLE-ABSTR-KEY (*extract and Plectranthus*) obteniendo un total de 393 artículos, consultado diciembre 9 de 2015.40
- Figura 8.** Principales áreas de investigación de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (*extract and Plectranthus*) en la base de datos; *Science Direct*, *Scopus* (*Elsevier*), consultado diciembre 9 de 2015.40
- Figura 9.** Principales revistas científicas de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (*extract and Plectranthus*) en la base de datos; *Science Direct*, *Scopus* (*Elsevier*), consultado diciembre 9 de 2015.41
- Figura 10.** Principales países de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (*essential oil and Plectranthus*) en la base de datos; *Science Direct*, *Scopus* (*Elsevier*), consultado diciembre 9 de 2015.42
- Figura 11.** Principales áreas de investigación de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (*essential oil and Plectranthus*) en la base de datos; *Science Direct*, *Scopus* (*Elsevier*), consultado diciembre 9 de 2015.42

| | |
|---|----|
| Figura 12. Principales revistas científicas de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (<i>essential oil and Plectranthus</i>) en la base de datos; <i>Science Direct, Scopus (Elsevier)</i> , consultado diciembre 9 de 2015. | 43 |
| Figura 13. Principales países de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (<i>essential oil and Plectranthus</i>) en la base de datos; <i>Science Direct, Scopus (Elsevier)</i> , consultado diciembre 9 de 2015. | 43 |
| Figura 14. Montaje <i>MWHD</i> , con detalle interior del horno y trampa <i>Dean-Stark</i> [57]. | 49 |
| Figura 15. Extractor <i>Soxhlet</i> de alta presión, introducido en el baño maría [57]. | 50 |
| Figura 16. Perfil cromatográfico del AE obtenido por <i>MWHD</i> de material vegetal fresco, de partes aéreas recolectadas de la especie <i>Plectranthus</i> sp., A, columna apolar (DB-5MS, 60 m, <i>Split</i> 1:30), B, columna polar (DB-WAX, 60 m, <i>Split</i> 1:30). | 57 |
| Figura 17. Variación de las familias de compuestos químicos presentes en el AE destilado por <i>MWHD</i> de partes aéreas frescas de <i>plectranthus</i> sp. | 60 |
| Figura 18. Perfil cromatográfico del AE, muestreo realizado por HS-SPME, usando columna polar (DB-WAX, 60 m, <i>Split</i> 1:30). | 61 |
| Figura 19. Variación de las familias de compuestos químicos presentes en el AE destilado por <i>MWHD</i> de partes aéreas frescas de <i>plectranthus</i> sp., muestreo realizado por HS-SPME. | 64 |
| Figura 20. Perfil cromatográfico del extracto SFE de <i>Plectranthus</i> sp., Columna DB-WAX, <i>Split</i> 1:30, MSD (70 Ev, IE). | 65 |
| Figura 21. Variación de las familias de compuestos químicos presentes en el AE destilado por SFE de partes aéreas frescas de <i>plectranthus</i> sp., muestreo realizado por HS-SPME. | 67 |
| Figura 22. Perfil cromatográfico de hojas frescas de <i>plectranthus</i> sp, obtenido por HS-SPME, Columna DB-WAX, <i>Split</i> 1:30, MSD (70 Ev, IE). | 68 |
| Figura 23. Variación de las familias de compuestos químicos presentes en el AE destilado por <i>MWHD</i> de partes aéreas frescas de <i>plectranthus</i> sp., muestreo realizado por HS-SPME. | 70 |
| Figura 24. Variación de las cantidades relativas de las familias de metabolitos secundarios determinados en función de su método de extracción. | 71 |

Figura 25. Composición porcentual de los compuestos mayoritarios detectados en el AE, extracto SFE y hojas frescas de *Plectranthus* sp.72

Figura 26. Estructura química del *trans*- β -Cariofileno.73

Figura 27. Posibles rutas de fragmentación del *trans*- β -cariofileno.....74

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.

| | |
|---------|--|
| AE | Aceite(s) esencial(es) |
| CENIVAM | Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales |
| D.I. | Diámetro interno |
| d_f | Espesor de la fase estacionaria |
| EI | Impacto de electrones |
| f.e. | Fase estacionaria |
| GC | Gas Chromatography (Cromatografía de gases) |
| GC-FID | <i>Gas Chromatography – Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases con detector de ionización de llama). |
| GC-MS | <i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas). |
| HS-SPME | <i>Head-space Solid-phase Micro-extraction</i> (Micro-extracción en fase sólida con espacio de cabeza) |
| IRL | Índice de retención lineal |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas) |
| MWHD | <i>Microwave-assisted Hidrodestillation</i> (Hidrodestilación asistida por radiación de microondas) |
| RE | Radiación electromagnética |
| SFE | <i>Supercritical Fluid Extraction</i> (extracción con fluido supercrítico) |
| t_R | Tiempo de retención |
| eV | Electrón voltios |

RESUMEN

TITULO: IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE *Plectranthus* sp. EN FUNCIÓN DE SU MÉTODO DE OBTENCIÓN*

AUTOR: Richard Alexander Tovaría García**

PALABRAS CLAVE: *PLECTRANTHUS*, METABOLITOS SECUNDARIOS, ACEITE ESENCIAL, MWHD, SFE, HS-SPME, CROMATOGRAFÍA GASES, ESPECTROMETRÍA MASAS.

DESCRIPCIÓN:

En este trabajo de investigación, se aislaron los metabolitos secundarios volátiles de la especie *Plectranthus* sp., para ello se utilizó hidrodestilación asistida por radiación microondas (MWHD), extracción con fluido supercrítico (SFE) y micro extracción en fase solida de espacio de cabeza (HS-SPME), la identificación de los metabolitos se realizó utilizando técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas (GC-MS) por medio de la comparación directa de los espectros de masas experimentales versus espectros de masas consignados en las bases de datos Adans, Wiley y NIST y los índices de retención lineales.

De otro modo, el AE y los extractos obtenidos se caracterizaron por presentar como componentes mayoritarios metabolitos de la familia de los sesquiterpenos, también se encontró el *trans*- β -cariofileno como metabolito mayoritario común en el AE y extractos, para el AE se determinaron como metabolitos mayoritarios los sesquiterpenos, *trans*- β -cariofileno (27%), germacreno D (12%), óxido de cariofileno (5.6%), δ -cadineno (5.3%), *trans*-nerolidol (4%), 1-octeno-3-ol (4%), β -bourboneno (3.2%), α -copaeno (3%), epi-cubebol (2.1%), α -humuleno (2%), estos diez metabolitos representan el 70% del área cromatográfica total, de identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *plectranthus* sp. en función de su método de obtención. *plectranthus*, metabolitos secundarios, aceite esencial, mwhd, sfe, hs-spme, cromatografía gases, espectrometría masas. Las plantas son seres vivos con quienes guardamos estrechos lazos de relación, una relación marcada por la dependencia biológica dentro del ciclo de la vida orgánica, por medio de ellas es transferida a los organismos la energía y materia necesaria para iniciar y sostener los procesos metabólicos de la mayoría de los seres vivos que habitan el planeta tierra.

*trabajo de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Elena Stashenko, Química, Ph. D. y Jairo René Martínez, Químico, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: IDENTIFICATION OF THE VOLATILE SECONDARY METABOLITES OF *Plectranthus* sp. IN FUNCTION OF METHOD EXTRACTION*

AUTHOR: Richard Alexander Tovaría García**

KEYWORDS: *PLECTRANTHUS*, SECONDARY METABOLITES. ESSENTIAL OIL, MWHD, SFE, HS-SPME, GAS, GAS CHROMATOGRAPHY, MASS SPECTROMETRY.

DESCRIPTION:

In this work of investigation, isolated the volatile secondary metabolites of the species *Plectranthus* sp., for this used hidrodestilación aided by radiation microwaves (MWHD), extraction with fluent supercrítico (SFE) and micro extraction in phase been used to of space of head (HS-SPME), the identification of the metabolites realized using technical chromatographic and of spectrometry of mass (GC-MS) by means of the direct comparison of the spectrums of experimental mass versus spectrums of mass consigned in the databases Adans, Wiley and NIST and the indexes of linear retention.

The AE and the extracts obtained characterized for presenting like majority components metabolites of the family of the sesquiterpene, also found the trans- β -caryophyllene Like common majority metabolite in the AE and extracts, for the AE determined like majority metabolites the sesquiterpene, trans- β - caryophyllene (27%), germacrene D (12%), oxide of caryophyllene (5.6%), δ -cadinene (5.3%), trans-nerolidol (4%), 1-octeno-3-ol (4%), β -bourbonene (3.2%), α -copaene (3%), epi-cubebol (2.1%), α -humulene (2%), these ten metabolites represent 70% of the total chromatographic area.

* Bacherlor Thesis

** Science Faculty, School of Chemistry. Directed by: Elena Stashenko, Chemist, Ph. D. and Jairo René Martínez, Chemist, Ph.D.

AGRADECIMIENTOS

A mi hermosa madre, por su sacrificio para darnos una mejor vida y por su lucha para que nosotros a diferencia de ella no tuvieramos que pasar por todas las humillaciones de aquellos que explotan y se aprovechan de los humildes desde la época de la colonia en esta sociedad de mierda.

A la profesora Elena Stashenko por todo su apoyo, solidaridad y consejos cuando la violencia institucional me atropello con todos sus súbditos y escuderos esclavos del capital, por ser, pensar y actuar diferente, al no dejarme llevar por las pútridas y efímeras aguas por las que navega la actual disociedad, causantes del sufrimiento y destrucción de la naturaleza.

A toda la familia CENIVAM por su calidez humana por todas sus enseñanzas, apoyo y momentos compartidos en aquel paraíso espacial, vegetal y científico en el cual desarrolle el trabajo de grado, mis sinceros agradecimientos.

DEDICATORIA

De manera especial para todos ustedes, al escribir estas líneas los recuerdo con amor, en los diferentes momentos de la vida son ustedes los artífices del rumbo que había tomado.

Para:

Clelia Eugenia García Navarro, Ginna y Jesús

Leonor Suarez

Imelda Piza

Angelmiro Arévalo q.p.d.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son seres vivos con quienes guardamos estrechos lazos de relación, una relación marcada por la dependencia biológica dentro del ciclo de la vida orgánica, por medio de ellas es transferida a los organismos la energía y materia necesaria para iniciar y sostener los procesos metabólicos de la mayoría de los seres vivos que habitan el planeta tierra. El conocimiento de sus propiedades medicinales y aplicaciones ha venido acumulándose y con la evolución misma de las sociedades su estudio sistemático se ha hecho necesario, se encuentran registros en antiguas civilizaciones como las asentadas en la región de Mesopotamia (sumerios, asirios, caldeos, babilónicos) del uso y estudio de las plantas en diferentes aplicaciones. Actualmente con el cambio y aplicación de modelos económicos y el desarrollo del método científico se buscan metabolitos con actividades biológicas, principios activos para fármacos, aplicación en cosméticos, perfumes, alimentos etc.

En el presente trabajo se presentan los resultados, discusión y soporte teórico de la identificación y cuantificación de los metabolitos secundarios de la especie vegetal *Plectranthus* sp., en función de su método de obtención, para ello se utilizaron técnicas destilativas y extractivas (MWHD, SFE Y HS-SPME), los extractos y el aceite esencial (AE) fueron posteriormente analizados utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) con la finalidad de realizar la identificación química y cuantificación de los metabolitos.

Los objetivos alcanzados en la investigación comprenden la identificación y cuantificación de los metabolitos secundarios obtenidos por diferentes técnicas, su comparación y posibles aplicaciones de los metabolitos de interés, la rama de aplicación del conocimiento corresponde a la química analítica.

Este estudio contribuye al conocimiento de las propiedades químicas y biológicas producto de la presencia de metabolitos de interés en el AE y extractos de la especie *Plectranthus* sp., se identifican las familias principales de metabolitos que la planta produce.

1. MARCO TEORICO

1.2. PLANTAS

Las plantas son seres vivos, responsables directamente de sostener la vida en el planeta tierra, son organismos autótrofos, obtienen la materia y energía suficiente para fabricar su propio alimento del suelo, aire y de la radiación electromagnética proveniente del sol. Desde el momento de la aparición de estos seres vivos en la tierra, han evolucionado a través del tiempo, logrando la adaptación a las condiciones cambiantes del medio ambiente, desarrollado sistemas de defensa frente a depredadores, sistemas de atracción de polinizadores y dispersores, producto de todas estas funciones de relación, las plantas producen una gran diversidad de metabolitos responsables de sus maravillosos aromas y sabores.

Las complejas reacciones de biosíntesis química que ocurren en las plantas se conocen con el nombre de fotosíntesis, la fotosíntesis es un importante proceso desarrollado en los plastidios especializados, llamados cloroplastos, ubicados principalmente en las células mesófilas de las hojas, son gigantes respecto a otros orgánulos de la célula, tienen una forma semejante a la de un cilindro, miden entre 2-4 μm de ancho y entre 5-10 μm de largo, se encuentran generalmente en cada célula entre 20-40 cloroplastos, solo hasta 1881 se comprobó experimentalmente por el biólogo alemán T. Engelmann que en el cloroplasto se realizaba todo el proceso de fotosíntesis [1].

Es importante resaltar que los extensos análisis de los genomas del cloroplasto sugieren que todos ellos evolucionaron a partir de una relación ancestral de simbiosis única entre una cianobacteria productora de oxígeno, la cual se alojó al interior de una célula proeucariota no fotosintética con mitocondrias [1].

Durante la fotosíntesis, se pueden diferenciar dos etapas diferentes en las que transcurre, en la **primera etapa** se realizan las reacciones dependientes de la luz, la RE es absorbida por los fotosistemas, para ser acumulada finalmente en el ATP y NADPH. En la **segunda etapa** se desarrollan las reacciones independientes de la RE, reacciones en las que se sintetizan los carbohidratos a partir del CO_2 atmosférico y la energía almacenada en el ATP y NADPH producidos durante la primera etapa [2].

Entre 1470 a 1670 aproximadamente, florecieron por toda Europa herbarios; lugares destinados para el estudio de las plantas, especialmente aquellas

consideradas como medicinales, durante esta época se publicaron gran cantidad de libros dedicados a su estudio, nuevo conocimiento que abrió una perspectiva diferente a los clásicos conceptos de Dioscorides y otros botánicos imperantes en la farmacología y Botánica por 1500 años, en 1753 con la publicación de *Species Plantarum* (Especies de Plantas) por el científico Carolus Linnaeus, donde expone un sistema binomial consistente, en el que se daba a cada planta un nombre genérico y uno específico, nomenclatura que dio origen a la actualmente usada [3].

También estimo que el reino vegetal estaba conformado por unas 10.000 especies, un siglo después con la exploración y estudio de las nuevas tierras sometidas y explotadas, el botánico Jonh Lindley estimo que existían alrededor de 100.000 especies agrupadas en 8.900 géneros, estimaciones actuales en promedio establecen que existen 500.000 especies diferentes [3].

1.3. PLANTAS AROMÁTICAS

Las plantas clasificadas como aromáticas, son aquellas que biosintetizan varias clases de compuestos orgánicos, conocidos como metabolitos secundarios, y que no intervienen en los diferentes procesos biológicos responsables de su crecimiento y desarrollo; (metabolismo primario), son metabolitos que cumplen importantes funciones ecológicas, como la protección ante herbívoros o microorganismos, son atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas, entre otras funciones. Muchos de estos metabolitos se caracterizan por sus olores; en muchos casos, agradables para el humano, también por ser de mediano y bajo peso molecular; en el caso de los terpenoides [4].

Se conocen alrededor de unas 60 familias de plantas aromáticas, de olor característico; como producto de su metabolismo secundario, estos compuestos responsables del olor, son almacenados en diferentes estructuras celulares, como lo son: glándulas aceitosas, venas, sacos o tricomas, ubicados en diferentes partes de la planta [5]. En la **Tabla 1**. Se presentan algunos tipos de material vegetal de donde es extraída la “quinta esencia” por la industria.

Tabla 1. Tipos de material vegetal empleados para la obtención de productos aromáticos [5].

| TIPO MATERIAL | EJEMPLO |
|-------------------|-------------------|
| Bálsamos | Bálsamo del Perú |
| Botones florales | Clavo |
| Bulbos | Cebolla |
| Cáscaras de fruta | Naranja, Limón |
| Corteza | Canela |
| Flores | Jazmín, Rosa |
| Frutas frescas | Lima |
| Frutos secos | Coriandro, Hinojo |
| Hojas | Eucalipto |
| Líquenes | Usnea |
| Madera | Sándalo |
| Plantas herbáceas | Salvia, Menta |
| Raíces | Angélica, Vetiver |
| Resinas | Pino, Algarrobo |
| Rizomas | Jengibre |
| Semillas | Zanahoria |

1.4. FAMILIA DE LAS LABIADAS

Es una de las familias de plantas con la mayor diversidad y dispersión en términos de sus usos medicinales y etnomedicinales, basado en la concentración de sus compuestos volátiles [6]. También es una de las mayores familias entre las dicotiledóneas, con muchas especies altamente aromáticas, debido a la presencia de estructuras glandulares secretoras de los metabolitos volátiles [7]. Estos metabolitos son importantes para las industrias de perfumes, aromas y sabores, cosmética, farmacéutica, pesticidas entre otras [8]. Es conocida con los nombres latinos *Lamiaceae* (debido al género tipo de la familia, *Lamium*) y *Labiatae* (por la presencia de labios en las flores).

Están conformadas por alrededor de 236 géneros distribuidos entre 6900 a 7200 especies, los géneros más importantes son: *Salvia* (900), *Scutelaria* (360), *Coleus* (325), *Plectranthus* (300), *Hiptis* (280), *Teucrium* (250), *Timus* (220) y *Nepeta* (200), *Vitex* (250), *Premna* (200), *Callicarpa* (150), *Clerodendrum* (400) [9].

Las labiadas están conformadas principalmente por hierbas o arbustos, rara vez árboles o enredaderas, perennes o anuales. Su **indumento**: con la presencia frecuente de pelos multicelulares (uniseriados), comúnmente con glándulas epidérmicas de pedúnculo corto; conteniendo un aceite etéreo característico, con **tallos**: cuadrangulares, colénquima presente, bien desarrollado en los ángulos; nudos uniloculares. **Hojas**: siempre opuestas, o en verticilos de tres o más por nudo, usualmente simples o raramente compuestas; pecíolo con líneas vasculares arqueadas o haces vasculares en un anillo (sección transversal). **Inflorescencias**: terminales o laterales; pueden ser espigas o panículas, constituidas por grupos de flores de tipo cimoso, que se ubican en cada par de brácteas [10].

Flores: usualmente zigomorfas o muy raramente actinomorfas, bisexuales o a veces funcionalmente unisexuales (plantas ginodioicas o raramente dioicas); cáliz actinomorfo o zigomorfo (frecuentemente bilabiado), persistente en el desarrollo de fruto, sépalos fusionados formando un tubo, el tubo frecuentemente acanalado, lobos usualmente 5, a veces más ó 0 ó 2; corola frecuentemente bilabiada, pétalos fusionados formando un tubo, labio superior usualmente con 2 lobos, estos frecuentemente unidos y formando una capucha, que puede ser entera, o labio superior ausente como en el género *Teucrium*, labio inferior usualmente con tres lobos, el lobo del medio usualmente más amplio o más largo; androceo frecuentemente didínamo [10,11].

Los **estambres** son siempre menos de cinco, por lo general cuatro o a veces sólo dos, por ejemplo en *Salvia* y en *Rosmarinus*. El ovario es súpero y de dos carpelos, desarrolla un nuevo tabique transversal el cual se conecta al ovario por su base, produciendo un fruto particular de tetranúcula, uno de los caracteres más distintivos de esta familia, por el que se diferencia de las familias cercanas como acantáceas, escrofulariáceas o verbenáceas. **Semillas**: una por mericarpo (óvulos a veces abortados); endospermo usualmente ausente o escaso, oleoso cuando está presente [12].

1.4.1. Distribución geografía y hábitat.

Distribución cosmopolita, pero especialmente abundante en el Mediterráneo y al este en Asia central. Otras áreas ricas en especies son China, África y Sudamérica. En Sudamérica la familia está dominada por dos géneros cosmopolitas, *Hyptis* y *Salvia*, que comprenden alrededor del 60% del número total de especies [12].

Hábitat: son típicamente encontradas en regiones sujetas a climas cálidos estacionales, especialmente en áreas rocosas abiertas, en matorrales, riberas y

lechos del río, en regiones tropicales y subtropicales en hábitat montañosos. En regiones templadas del norte puede ser encontrada en bosques. Mientras muchas especies herbáceas ocurren en hábitats húmedos, otras son típicas de áreas semiáridas. Varias herbáceas o especies anuales son muy comunes a lo largo de caminos, bordes de las carreteras o pastizales, algunos géneros se presentan en selvas tropicales [12].

En Colombia las Labiadas se encuentran representadas por 23 géneros y aproximadamente 203 taxones, de los cuales 186 son nativos y 17 son especies foráneas, que ya se naturalizaron. Hay además, otras 21 especies de labiadas exóticas, ampliamente cultivadas por sus usos como condimento, medicina, uso mágico-religioso u ornamental. Se distribuyen ampliamente por todo el territorio colombiano, con tendencias claras de distribución y hábitat en algunos géneros. *Salvia*, *Lepechinia*, *Stachys*, *Satureja* y *Obtegomeria* propios de las cordilleras, los dos primeros se encuentran con preferencia en las zonas de bosque altoandino o subandino y las restantes se desarrollan con preferencia en la región de paramo y subparamo [12].

1.4.2. Usos más importantes.

Muchas especies de las Labiadas son económicamente importantes en diferentes sectores con usos: ornamentales, especias, perfumes, objetos religiosos o medicinales. En los Neotrópicos, las especies de Labiadas son particularmente importantes localmente por proveer medicinas baratas. Algunas son cultivadas comercialmente a grandes escalas como *Mentha arvensis* subespecie *haplocalix* que produce el aceite de menta para saborizar, y especies de *Lavandula*, de donde se destila el aceite de lavanda, muy usado en el comercio de perfumería. Muchas especies de *Lamiaceae* de importancia económica son originalmente importadas del oriente, por ejemplo albahaca (*Ocimum basilicum*), y especialmente de la región Mediterránea, como menta (*Mentha*), orégano (*Origanum*), romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus*) y salvia (*Salvia officinalis*). Los tubérculos de algunas especies de *Stachys* son comestibles. *Tectona* (teca) es un importante árbol maderable [9,11,12].

Los AE y otros metabolitos bioactivos, son especialmente importantes en: *Hissopus*, *Lavandula*, *Salvia*, *Thymus*, *Plectranthus* y *Rosmarinus*, muy apreciados en la industria de perfumes, cosméticos, refrescos y medicinas. En 1998 se publicó un trabajo de prospección en labiadas nativas de Colombia, realizando la extracción y caracterización de lectinas y mucílagos en más de 50 taxones, encontrando interacciones específicas frente a antígenos específicos [13].

1.5. *PLECTRANTHUS* sp.



Figura 1. Fotos de *Plectranthus* sp. en el área de cultivo, fotos tomadas por Richard A. Tovaría.

El género *Plectranthus* pertenece a la familia *Lamiácea* (Labiadas), está conformado por alrededor de 350 especies y cientos de híbridos; se encuentran generalmente en regiones con climas tropicales y sub-tropicales de África, Asia, Australia e islas del Pacífico [14]. Son cultivadas con propósitos ornamentales, medicinales y comestibles, debido a sus vistosos colores de hojas y flores, ricas en aceites esenciales, con propiedades medicinales. Son hierbas anuales o arbustos perennes, caracterizados por tallos cuadrangulares, hojas quebradizas, opuestas, acerradas, presentan inflorescencias en espiga, forma de la cual recibe su nombre *Plectranthus*, el cual proviene del griego *plectrón*, que en español significa espolón y *anthos*, flor, varias especies producen tubérculos, que son aprovechados en diferentes latitudes como alimento [15].

Varias especies de este género son cultivadas como plantas ornamentales, otras como verduras o tubérculos comestibles, pero también como plantas medicinales debido a sus múltiples metabolitos con actividad biológica, algunas de ellas, son utilizadas para tratar un amplio rango de enfermedades, del sistema digestivo (antihelmíntico, diarrea, carminativo, náuseas y vomito), cutáneas (quemaduras, heridas, llagas, picaduras de insecto y alergias), respiratorias (tos, bronquitis y pulmonía), del sistema urinario, infecciones y fiebre [14].

También se han aislado diterpenos del tipo beyerano y abietano [16-18], neoclerodano, kauranos y labdano [19, 20], se ha reportado la determinación de la actividad antifúngica y antibacterial de sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados [21-26] y como repelente de insectos [26], algunos compuestos de naturaleza fenólica [26].

La especie *P. coleoides* Benth., es conocida como incienso y es utilizada como ornamental debido a su belleza, en la India se emplea en casos de escalofríos, analgésico, alopecia y en el tratamiento de heridas [27].

La especie más conocida y estudiada internacionalmente es la *P. barbatus* (*Coleus forskohlii*), cuyo componente principal es el diterpeno forskolina [14], la especie *Plectranthus amboinicus* Lour. (Orégano), es utilizada en resfriados, como diurética, en cálculos renales, antiespasmódica, antiinflamatoria, en artritis y expectorante [27]. *P. caramaticus*, empleado como diurético y carminativo y, *P. forskohlii*, que se usa contra males estomacales, como diurético, hipotensor y vasodilatador [28,29].

1.6. ACEITES ESENCIALES

El término “aceite esencial” (AE) hace referencia al líquido fragante, de intenso olor, obtenido por hidrodestilación, destilación con arrastre de vapor o destilación agua + vapor de plantas aromáticas, generalmente los AE son líquidos menos densos que el agua, incoloros y apolares lo que los hace poco solubles en el agua, exceptuando algunos de sus derivados oxigenados, son inestables a los rayos solares y algunos metabolitos se oxidan con el tiempo, por ello, es necesario almacenarlos protegidos de la luz y con atmósfera inerte [30].

Los aceites esenciales son mezclas complejas de entre 50 a 300 compuestos químicos diferentes, de bajo peso molecular, constituidos principalmente por terpenos y sus derivados oxigenados: cetonas, alcoholes, aldehídos, rara vez ácidos, éteres, ésteres, fenoles y fenilpropanoides, entre otros. Los aceites esenciales se encuentran en partes específicas de la planta, lugar, que varía dependiendo de cada familia o especie; se encuentran en células oleíferas, canales secretorios, glándulas o tricomas, ubicados en hojas, tallos, flores, raíces, frutos o semillas [30].

Debido a que los AE son producto de biosíntesis de la planta, su composición química cambia dependiendo de diferentes factores, entre los que se encuentran:

- Especie de planta, variedad, híbrido y quimiotipos.
- Condiciones geobotánicas del lugar de cultivo (clima, humedad del aire, altitud, irradiación solar, lluvia, suelo, etc.).
- Condiciones agrícolas de cultivo. (uso de abonos, dosificación, método de cultivo).
- Edad de la planta.
- Época de cosecha.
- Parte de la planta empleada para realizar la destilación.(raíz, tallos, hojas, flores, semillas).
- Manejo del material vegetal. (picado, secado, almacenamiento).
- Método de destilación.
- Condiciones de destilación o extracción. (temperatura y tiempo empleados en el proceso) [4,5].

Los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con los siguientes criterios:

- Consistencia: Esencias fluidas, Bálsamos y Oleorresinas.
- Origen: Natural, Artificial y Sintético.

- Naturaleza química componentes mayoritarios: Monoterpenoides (albahaca, salvia), Sesquiterpenoides (copaiba, pino, junípero), Fenilpropanoides (clavo, canela, anís).

El aceite esencial se puede obtener y separar del material vegetal por alguno de los siguientes procesos:

- Hidrodestilación.
- Destilación con agua + vapor. Cohobación.
- Arrastre con vapor.
- Expresión.

Una vez obtenido el aceite esencial de una planta aromática, debe ser deshidratado, almacenado en frío, protegido de la luz y, en lo posible, bajo atmosfera inerte [4].

1.7. METABOLITOS SECUNDARIOS

Las plantas construyen una inmensa variedad de compuestos orgánicos, se han identificado aproximadamente 100.000 diferentes compuestos [31], que al parecer no tienen relación directa con el crecimiento y su desarrollo, son conocidos como metabolitos secundarios, estos metabolitos no tienen una función reconocida en los procesos de fotosíntesis, asimilación de nutrientes, diferenciación, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas o translocación, realizados por las plantas, sin embargo desempeñan funciones necesarias para su supervivencia [4].

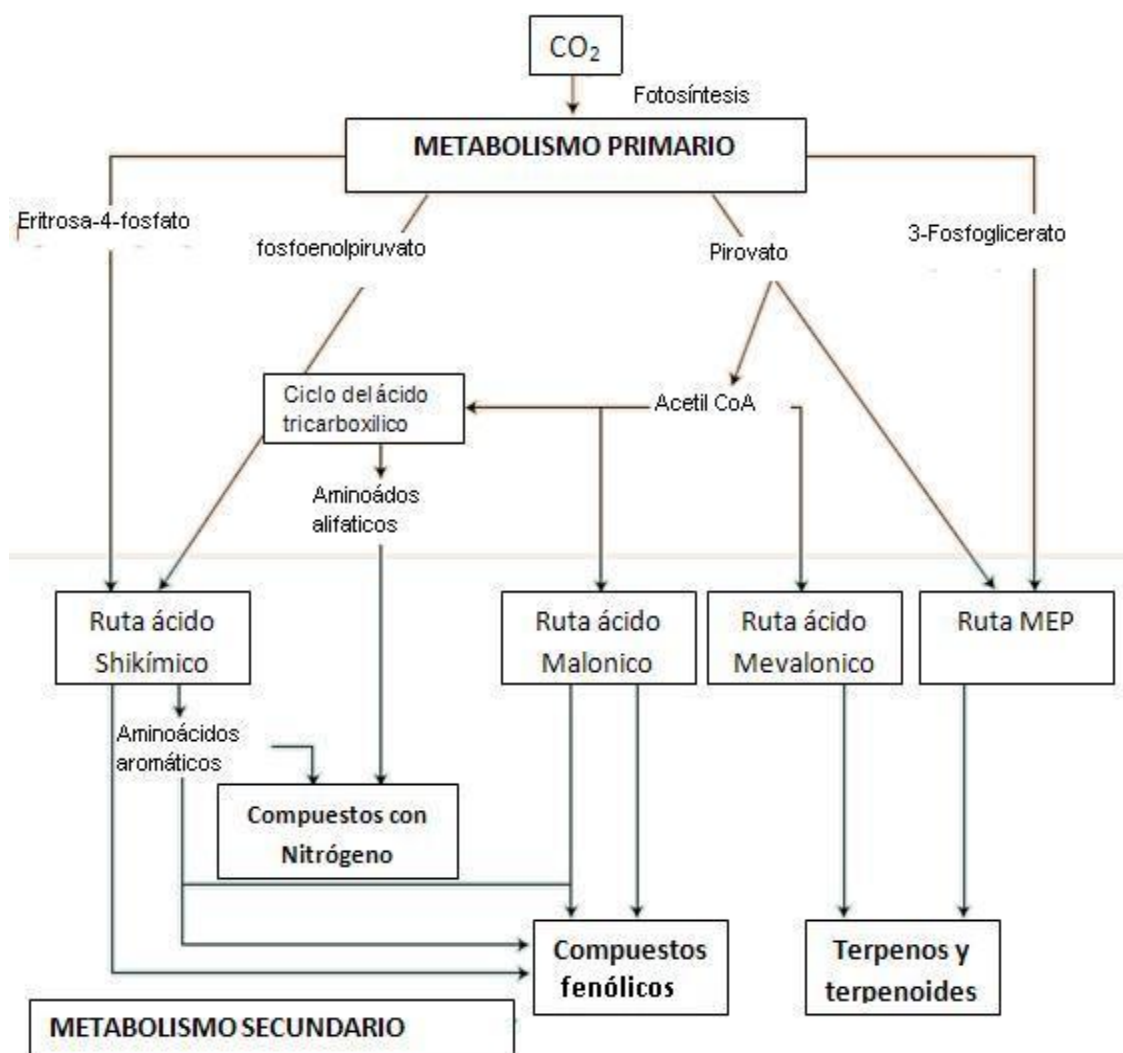
Los metabolitos secundarios en las plantas funcionan dando respuesta a cambios en los factores bióticos y abióticos del medio ambiente durante su desarrollo, siendo útiles en la atracción de polinizadores y dispersores, en la disminución de la evaporación de agua, como defensa química contra otros organismos, como herbívoros, virus, hongos o bacterias, para la comunicación química con otras plantas (alelopatía), entre otras [4], ejemplo de estas funciones contra herbívoros es la hinchazón causada en el ganado debido a la ingesta de saponinas, o la infertilidad en ovejas causada por los isoflavonoides. [5].

Tabla 2. Clases representativas de metabolitos secundarios [20].

| | |
|--|--|
| Artemisinas | Isoflavonoides |
| Acetofenonas | Isotiocianatos |
| Alcaloides (<i>imidazol, isoquinolina, piperidina/piridina, purinas, quinolina, quinolizidina, tropano...</i>) | Ligninas/Lignanós |
| Aminas | Aminoácidos no proteicos |
| Antraoides/Antraquinonas | Fenandrenos |
| Antocianidinas | Ácido Hidroxicinámico |
| Ácidos Aristoloquios | Fenoles |
| Azoxiglicosidos | Fenilpropanoides |
| Benzenoides | Poliacetilenos |
| Cumarinas | Polinas |
| Glicosidos Cianogenicos | Esteroidal y Triterpenoides |
| | Saponinas |
| Tanninos condensados | Stilbenos |
| Continuación Tabla2. | |
| Dibenzofuranos | Taxoles |
| Flavonoides (flavanoles, flavonas, flavanonas, etc.) | Terpenoides (<i>hemi, mono, sesqui, di, tri, tetra...</i>) |
| Glucosinolatos | Tiosulfinatos |
| Ácido Hidroxibenzoico | Xantonas |

La gran cantidad y diversidad de los metabolitos secundarios puede ser atribuida a la alta especificidad por el sustrato y la generación de múltiples productos de reacción generados por las reacciones enzimáticas, está característica aumenta la probabilidad de generar diversidad química, y por lo tanto compuestos benéficos. La selección y retención de la diversidad química es un factor muy importante en la adaptación y buen estado físico de las plantas [32]. Una lista representativa de las clases de metabolitos secundarios se encuentra en la **Tabla 2**

Figura 2. Vista simplificada de las principales rutas del metabolismo secundario y su interrelación con el metabolismo primario [32].



1.7.1. Terpenos y terpenoides.

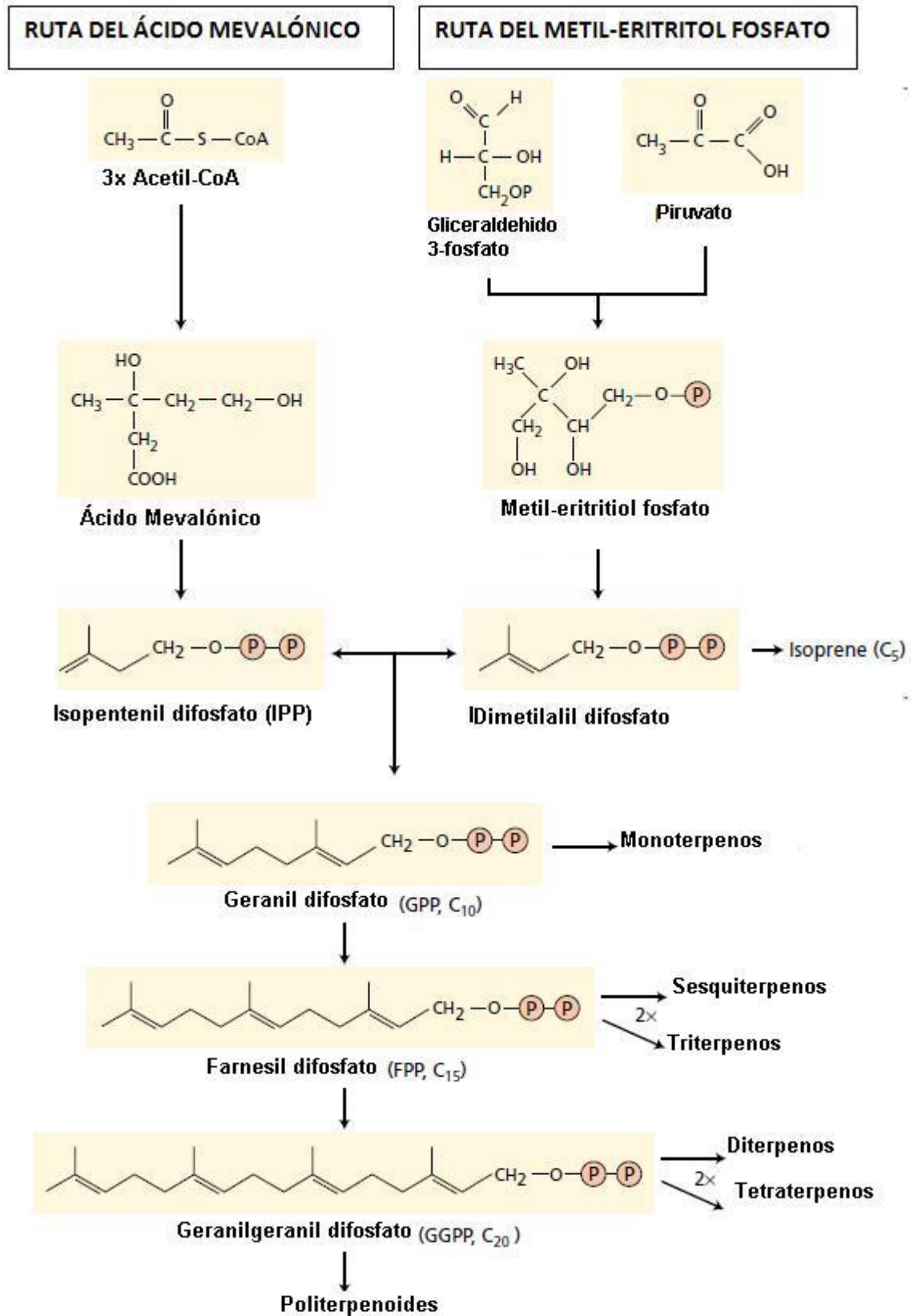
Los terpenos son clasificados según el número de unidades de isopreno (C_5H_8) que contenga la molécula, aquellos que contiene dos unidades de isopreno son llamados 27esquiterpén ($C_{10}H_{16}$), tres unidades isopreno, 27esquiterpénos ($C_{15}H_{24}$), cuatro unidades de isopreno son diterpenos ($C_{20}H_{32}$) también se encuentran triterpenos (30 Carbonos), tetraterpenos (40 carbonos) y politerpenoides ($[C_5]_n$ Carbonos, con $n > 8$) constituyen la familia de metabolitos secundarios más grande, presente en los aceites esenciales.

Los precursores de estos metabolitos son biosintetizados, a saber por dos vías demostradas de biosíntesis: primera, vía del ácido mevalónico (AMV) que se

realiza en el citosol y segunda, vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEF) que tiene lugar en el interior de los plastidios, la biogénesis de los aceites esenciales se puede estudiar en cuatro etapas: primera etapa, síntesis del isopentenil difosfato (IDF), segunda etapa, isomerización del IDF a dimetilalil difosfato (DMADF), tercera etapa, condensaciones consecutivas de IDF y DMADF y una cuarta etapa, la cual consiste en las modificaciones enzimáticas de los esqueletos carbonados, en la **Figura 2.**, se muestran las dos rutas de biosíntesis de terpenos y derivados [4,30].

La ruta del ácido mevalónico, inicia con tres moléculas de acetil-CoA, Este compuesto se convierte en pirofosfato de isopentilo, mediante un proceso de fosforilación y eliminación de oxígeno. Posteriormente se isomeriza para formar difosfato de prenilo. La unión entre una molécula de difosfato de pentilo y otra de difosfato de prenilo forma difosfato de geranilo, base estructural de 10 unidades de carbono, implicada en la síntesis de los terpenoides. Otras adiciones de difosfato de isopentilo conducen a la formación de estructuras de 15, 20, 25 y más unidades de carbono [33].

Figura 3. . Se presentan Rutas de biosíntesis para terpenos y terpenoides. [32]



1.8. TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Dentro de las consideraciones necesarias a tener en cuenta para seleccionar el método de extracción del AE, se encuentra el conocimiento del lugar de almacenamiento de los metabolitos de interés dentro de la estructura celular, la cual depende del tipo de material vegetal y familia botánica, si esta información se conoce se puede optimizar el proceso de extracción escogiendo la técnica y metodología más viable, según sea el caso, en la **Tabla 3**. Se muestran algunos ejemplos de familias del reino vegetal y la estructura celular donde son acumulados los metabolitos aromáticos.

Tabla 3. Estructuras celulares de algunas familias de plantas donde se acumulan los metabolitos aromáticos [5].

| ESTRUCTURA CELUAR | FAMILIA |
|--------------------------|------------------------------------|
| Pelos glandulares | Labiatae, Verbenaceae, Geraniaceae |
| Cavidades esquizógenas | Myrtaceae, Gramineae, Asteraceae |
| Canales lisígenos | Rutaceae |
| Canales resinosos | Coniferae |
| Canales gomosos | Cistaceae, Burseraceae |

El material cosechado, destinado para la destilación del aceite esencial, puede requerir de un proceso de secado o picado; el picado se efectúa para aumentar la superficie de contacto, entre el material vegetal y el agua, facilitando y optimizando la destilación, el secado se realiza principalmente para prevenir la descomposición enzimática y proliferación de hongos en el material vegetal, logrando su conservación por más tiempo [34].

1.9. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS

La preparación de la muestra es un procedimiento de muy alta importancia en cualquier técnica de análisis instrumental, ya que compromete la obtención de resultados confiables y el correcto desempeño del equipo, inicia con el muestreo, seguido de una extracción, limpieza y, en muchos casos, concentración y derivatización de los metabolitos, la preparación de la muestra tiene como finalidad separar los metabolitos de interés que pueden ser analizados por la(s) técnica(s) analítica(s) seleccionada(s).

En el caso del análisis por medio de cromatografía de gases, los metabolitos secundarios deben ser volátiles o volatilizables, estables hasta temperaturas de 350 °C, existir en fase gaseosa manteniendo su identidad química y, generalmente que su masa molecular no supere los 550 Da [4].

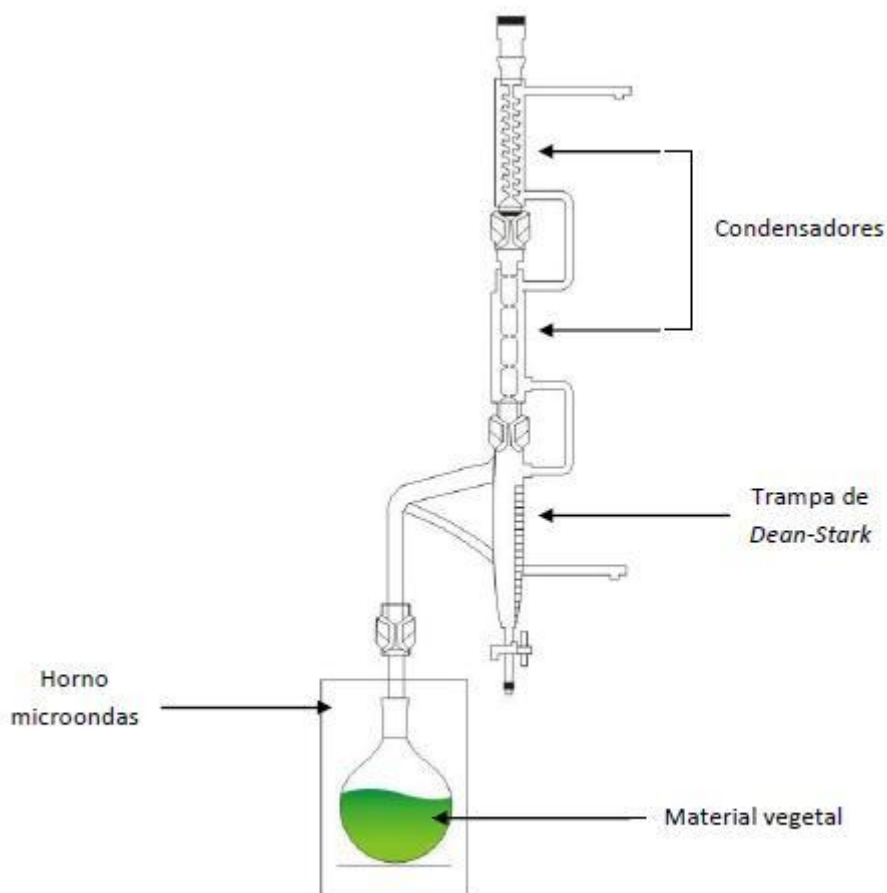
En el caso del material vegetal existen diferentes técnicas para la obtención de los metabolitos a saber: técnicas destilativas (hidrodestilación, destilación por arrastre con vapor y destilación agua +vapor) y técnicas extractivas (extracción con solventes, extracción con fluido supercrítico) [5].

1.10. HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR LA RADIACIÓN DE MICROONDAS

Es un proceso económico y eficiente de obtención de aceites esenciales en el laboratorio. En el que se sumerge el material vegetal en agua y se somete a la acción de la radiación microondas, el agua se calienta hasta temperatura de ebullición; causado por calentamiento con la radiación de microondas, los compuestos volátiles son arrastrados con ayuda del vapor de agua, para luego ser condensados y recolectados, se obtiene un destilado compuesto por dos fases, una fase polar acuosa y una apolar formada por el aceite esencial [4,5].

En general las técnicas destilativas ofrecen varias ventajas en la obtención de los metabolitos secundarios volátiles de plantas aromáticas, como la facilidad de la implementación de la técnica directamente en las zonas de producción del material vegetal, la obtención del AE libre de impurezas. Se debe tener en cuenta que algunos compuestos de los AE son sensibles a la hidrólisis otros son parcialmente solubles en agua [4].

Figura 4. Esquema de un equipo de MWHHD para la extracción de AE utilizado a escala de laboratorio [35].

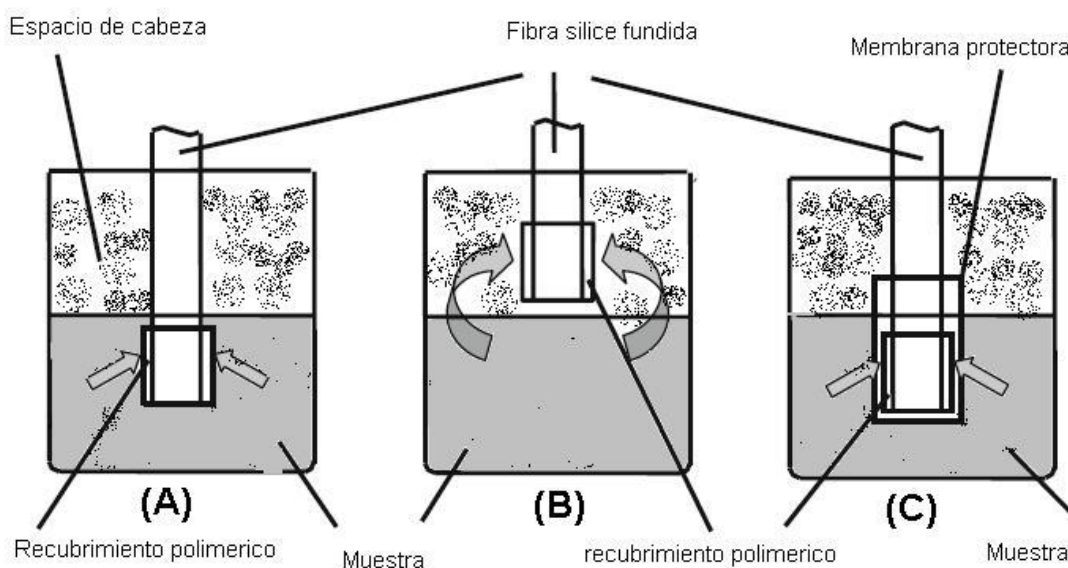


1.11. MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La SPME se basa en la extracción y concentración de los metabolitos por absorción en una fibra de sílice fundida recubierta por una película de un polímero sorbente, seguida de la desorción por acción de calentamiento o disolución en un solvente, el proceso de extracción termina en el momento que la concentración de los metabolitos ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra.

El muestreo se realiza de tres modos diferentes, **A)** inmersión directa de la fibra en la muestra, **B)** inmersión de la fibra en el espacio de cabeza del vial, sin entrar en contacto con la muestra **C)** inmersión directa con protección por membrana, en la **Figura 3**. Se muestran los tres modos de muestreo.

Figura 5. Modos de muestreo en SPME. (A) Inmersión directa; (B) extracción en espacio de cabeza; y (C) Inmersión con protección por membrana [37].



La HS-SPME se realiza en dos etapas: una primera etapa de extracción donde se expone la fibra dentro del espacio de cabeza durante un tiempo y temperatura determinadas, con ello se realiza la absorción y concentración de los metabolitos en la fibra y una segunda etapa de desorción donde los metabolitos son expulsados de la fibra.

Las fibras comerciales están recubiertas con una delgada capa de polímero con diferente polaridad, con la finalidad de absorber selectivamente los analitos, una fibra polar absorbe con preferencia analitos con momento dipolar y una fibra apolar absorbe preferencialmente analitos apolares [37,38].

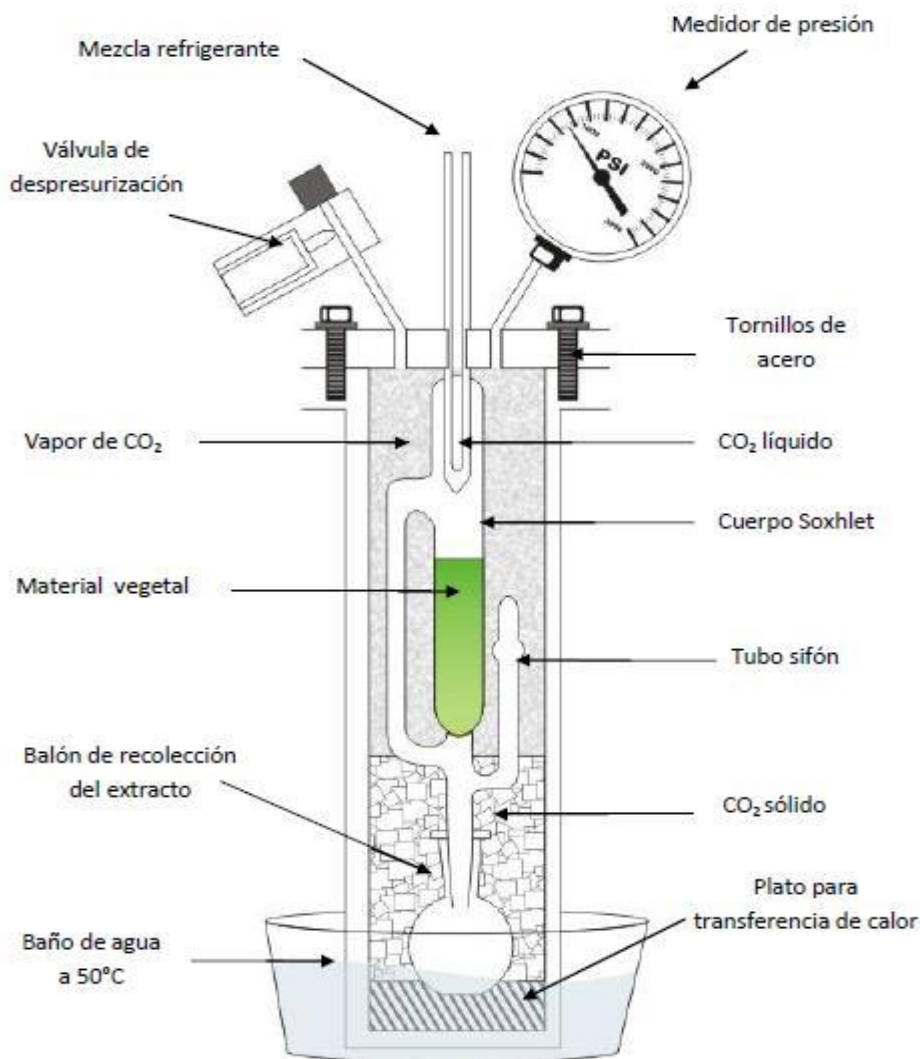
1.12. EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO

Es un proceso de extracción, en el cual se utiliza como disolvente un gas o líquido en condiciones supercríticas, con el objetivo de extraer analitos o metabolitos de interés. Un fluido en estado supercrítico cambia sus propiedades de transporte y de solubilidad, intensifica su poder disolvente, presenta alta difusividad, alta compresibilidad, aumenta la densidad y baja viscosidad, su aplicación logra una mejor penetración y difusión en el material de extracción.

En este proceso el material vegetal picado finamente, es licuado o molido, para poder ser empacado en una recámara de acero inoxidable, a través de la cual se hace circular un fluido en estado supercrítico, el cual penetra, disuelve y arrastra los metabolitos, para ser luego recogidos [4,5].

Las matrices vegetales contienen metabolitos que varían desde bajas hasta altas polaridades y presentan un amplio rango de masas moleculares. Comúnmente se emplea CO₂ como fluido supercrítico, ya que usado como solvente tiene una mayor afinidad hacia sustancias apolares y levemente polares, con masas moleculares pequeñas. Es común encontrar, con mayor frecuencia, en los extractos terpenos y lípidos [5]. Debido a la relativa facilidad para alcanzar las condiciones críticas del CO₂, la SFE permite la obtención de compuestos termolábiles.

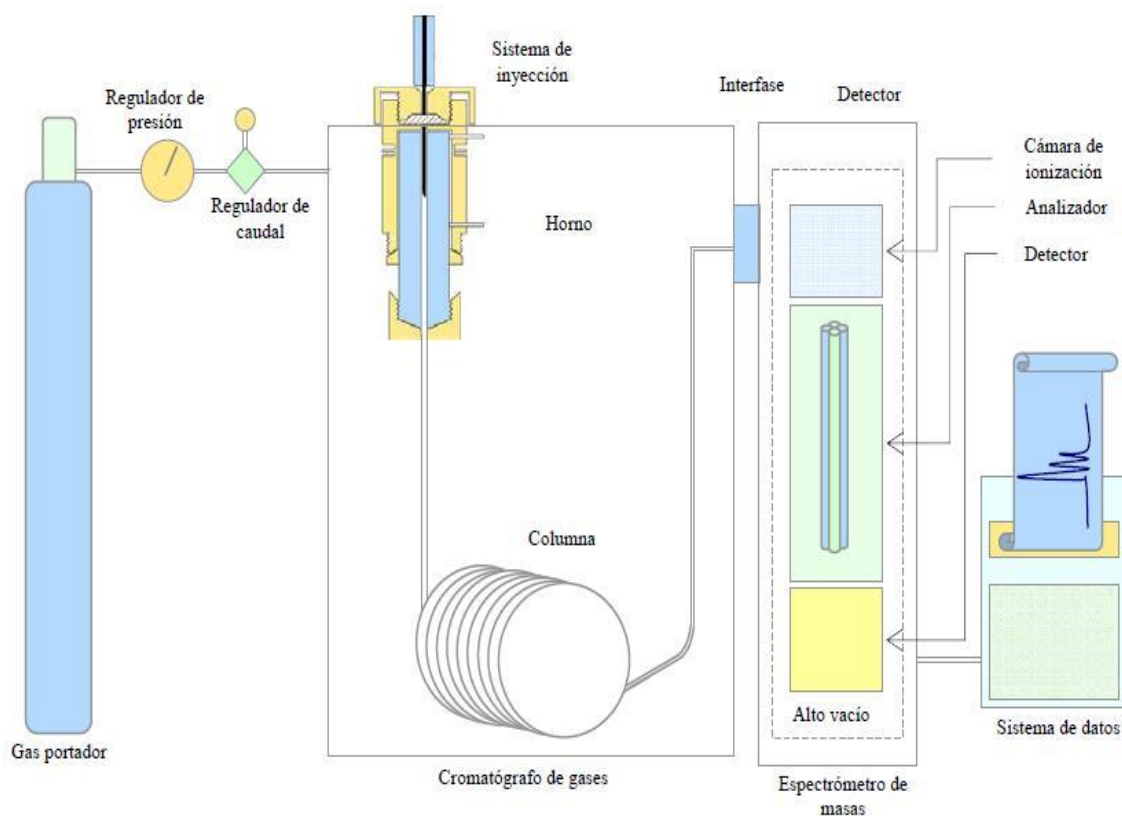
Figura 6. Esquema de un equipo de SFE empleado a escala de laboratorio para obtener extractos de material vegetal [35].



1.13. CROMATOGRAFÍA DE GASES

Técnica instrumental de separación e identificación de especies químicas presentes en mezclas multicomponente, el análisis inicia con la inyección de la muestra, en el puerto de inyección del equipo, la cual se volatiliza y es arrastrada por un gas inerte como helio o argón (fase móvil) a través de una columna capilar o columna empaquetada, que se encuentra dentro de un horno con temperatura programable. La columna está recubierta en su interior por un líquido, inmobilizado, que puede ser polar, apolar o de polaridad media, etc. (fase estacionaria). Las diferentes moléculas de la muestra en fase gaseosa interactúan electrostáticamente con las moléculas de la fase estacionaria, a medida que van recorriendo la columna y saliendo de ella, de acuerdo con sus presiones de vapor: primero, salen los compuestos más volátiles o de menor presión de vapor, seguidos consecutivamente por los compuestos de menor volatilidad; finalmente, los compuestos en orden de elución llegan al sistema de detección [4,39]. En la **Figura 6**. Se presenta un diagrama de un cromatógrafo.

Figura 7. Componentes principales de un Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas [35].



1.14. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es una técnica instrumental micro analítica, que presenta una alta sensibilidad en el manejo de los datos y que permite procesar una amplia variedad de compuestos. Con aplicación en todas las formas de análisis químico, biomedicina, estudio de reacciones ión-molécula, fitoquímica, determinación de parámetros termodinámicos (ΔG^0_f , K_a , etc.), entre otros. Puede ser usada para determinar o detectar selectivamente un analito, así como su composición elemental y posible estructura molecular del compuesto, masa nominal y en algunos casos la masa exacta del analito (espectrometría de masas de alta resolución).

La información se obtiene, previa interpretación y análisis de la medida de la relación masa/carga de los iones en fase gaseosa producto del fraccionamiento del ión molecular del analito, en un sistema controlado. En la Figura 2, se puede ver un diagrama de bloques de un espectrómetro de masas [41,42].

1.15. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA MASAS

La unión de estas dos técnicas permite separar, cuantificar e identificar las estructuras de mezclas complejas, por ejemplo productos naturales, el análisis se puede realizar de dos modos, en modo off-line, en el cual se recolectan uno a uno los compuestos eluidos de la columna capilar para ser posteriormente analizados por MS y en modo on-line, un espectrómetro de masas se acopla al cromatógrafo para obtener inmediatamente los espectros de masas generalmente por impacto electrónico [42].

1.16. INFORMETRÍA, BIBLIOMETRÍA Y CIENCIOMETRÍA

Los métodos matemáticos se han aplicado al estudio de la literatura científica desde inicio del siglo XX, convirtiéndose en una parte importante de la llamada bibliometría. La utilización de indicadores bibliométricos para medir los resultados de las ciencias en un país u organización, sin embargo, deben considerarse, a su vez, una serie de indicadores económicos, sociales y demográficos que aporten un enfoque más amplio a los análisis realizados. Para esto, la UNESCO, ha propuesto indicadores como el crecimiento del producto interno bruto (PIB), los gastos en educación, la cantidad de profesionales, el número de profesionales en I+D (investigación y desarrollo), y el número de publicaciones científicas por habitantes. La aplicación de estos indicadores ha contribuido al desarrollo de tres disciplinas básicas en el campo de las ciencias de la información: la informetría, la bibliometría y la cienciometría [49].

De acuerdo con lo anterior se identifican cuatro especialidades:

- a)** La **cienciometría**, el estudio de todos los aspectos cuantitativos de la literatura científica y tecnológica que funciona como herramienta para el desarrollo de políticas científicas de países y organizaciones.
- b)** La **bibliometría**, el método para analizar de manera cuantitativa la literatura científica.
- c)** La **cibermetría (webometría)**, el uso de métodos informétricos y cuantitativos de la World Wide Web.
- d)** La **altimetría**, la creación y estudio de nuevas mediciones basadas en el análisis del uso de la bibliografía en las redes sociales a partir de tweets, discusiones de blogs, notas, redes de investigadores, entre otras.

Así, cada una de estas disciplinas se encarga de estudiar los aspectos cuantitativos de la información, la ciencia, los documentos, las páginas electrónicas y la socialización de las referencias respectivamente.

Los análisis **cienciométricos** analizan a la ciencia como una disciplina o actividad económica, comparan las políticas de investigación desarrolladas por distintos países y sus resultados desde una perspectiva económica y social. Los temas de estudio de la **cienciometría** incluyen, entre otros:

- El crecimiento cuantitativo de la ciencia.
- El desarrollo de las disciplinas y subdisciplinas.
- La relación entre ciencia y tecnología.
- La obsolescencia de los paradigmas científicos.
- La estructura de comunicación entre los científicos.
- La productividad y creatividad de los investigadores.
- Las relaciones entre el desarrollo científico y el crecimiento económico.

La **cienciometría** estudia los aspectos cuantitativos de la ciencia como disciplina o actividad económica, forma parte de la sociología de la ciencia y encuentra aplicación en el establecimiento de las políticas científicas, donde incluye entre otras las de publicación. Emplea, al igual que otras disciplinas, técnicas métricas para la evaluación de la ciencia (tanto a las ciencias naturales como a las sociales), y examina el desarrollo de las políticas científicas de países y organizaciones. La **cienciometría** aplica técnicas **bibliométricas** a la ciencia.

El análisis **cienciométrico** aplicado, se puede dividir en cinco pasos [50]:

1. **Recuperación:** Consiste en la selección de las fuentes de información, esto es la colección bibliográfica digital (base de datos) que se utilizará, la búsqueda involucra el establecimiento de una consulta constituida por los términos, operadores y criterios adecuados para realizar la búsqueda (simple o avanzada) e implica seleccionar la literatura que constituirá el conjunto de estudio.
2. **Migración.** Comprende la extracción de meta-datos de los registros seleccionados, la transferencia de la información extraída y la carga de esta en una nueva base. En esta etapa los registros deben pasar por un proceso de curación para asegurarse que estén normalizados y depurados.
3. **Análisis.** Consiste en el procesamiento cuantitativo de la literatura. En esta etapa comúnmente se aplica uno o varios de los siguientes procedimientos: la obtención de indicadores bibliométricos, el uso de métodos estadísticos, el análisis de redes sociales, la minería de textos (text mining) o la semántica.
4. **Visualización.** Se refiere a la obtención de figuras, gráficos, esquemas y mapas que reflejen las tendencias y los resultados de los análisis aplicados de una manera sintética, atractiva, estética, integral y amigable. La visualización generalmente se concentra en aquello que se considera que tiene una mayor contribución más relevante, que conduce a una mayor comprensión del tema, o que simplemente sea muy utilizado en el área de estudio.
5. **Interpretación.** Mediante la contextualización e interpretación de los resultados es posible establecer tendencias de investigación, interacciones químicas o biológicas, relaciones farmacológicas, genético-patológicas, sociales e incluso establecer explicaciones históricas, representar influencias y comparaciones teóricas, metodológicas y/o sociales respecto a un grupo de investigación.

2. CIENCIOMETRÍA

De las principales consecuencias de la revolución informática en la ciencia fue la explosión de información de carácter técnico y científico, la producción acelerada de una gran variedad de programas, servicios, herramientas y aplicaciones electrónicas para la investigación científica disponibles a través de la Web de forma libre o privada, las ventajas del formato electrónico y la sistematización de información en las bases de datos fueron elementos que repercutieron en la formación de disciplinas producto de la colaboración entre la informática y las ciencias de la computación con las subdisciplinas científicas que permitieron la implementación de métodos y técnicas innovadoras para la obtención de teorías y métodos nuevos[51].

Como ejemplo de estas técnicas innovadoras lo constituye los estudios métricos de la información científica (infometrics, imetrics o information metrics), definida como el estudio de los aspectos cuantitativos de la información que aplica métodos matemáticos para recuperar, sistematizar, analizar, visualizar, evaluar, obtener tendencias y patrones de grandes cantidades de información.

Con el fin de estudiar en estado actual de las investigaciones sobre el AE y extractos del género *Plectranthus* (Lamiaceae), se realizó un estudio cuantitativo, de la producción científica publicada, utilizando la base de datos *Scopus* (*Elsevier*). Se realizó la consulta el 9 de diciembre de 2015.

Las ecuaciones de búsqueda utilizadas en la base de datos *Scopus* (*Elsevier*), fueron “essential oil and *Plectranthus*” y “extract and *Plectranthus*” búsqueda que encontró 393 publicaciones desde el año 1986 hasta 2015.

En la **Figura 7**, se observa el número total de publicaciones encontradas desde 1986 hasta 2015 encontrando un total de 101 reportes para AE y 292 para el extracto, lo cual demuestra un mayor interés por el estudio de los extractos por parte de la comunidad científica en los últimos años en contraste con el decrecimiento de las publicaciones para AE para el mismo periodo, a partir del año 2003 las publicaciones relacionadas con los extractos van en aumentando año a año en comparación con años anteriores donde se mantuvieron sin superar de cinco publicaciones por año a excepción del año 1999 donde se reportaron 7 publicaciones.

Las cinco áreas de mayor investigación de acuerdo a su número de publicaciones son Farmacología, Toxicología y Farmacéutica (142), seguida de Medicina (96), Agricultura y Ciencias Biológicas (77), Bioquímica, Genética y Biología Molecular (58) y Química (52) en la **Figura 8** se presentan los resultados de la consulta.

Figura 8. Numero de publicaciones por año, sobre el género *Plectranthus* período de observación 1986-2015 en la base de datos; *Science Direct*, *Scopus* (*Elsevier*), con la ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*essential oil and Plectranthus*) y TITLE-ABSTR-KEY (*extract and Plectranthus*) obteniendo un total de 393 artículos, consultado diciembre 9 de 2015.

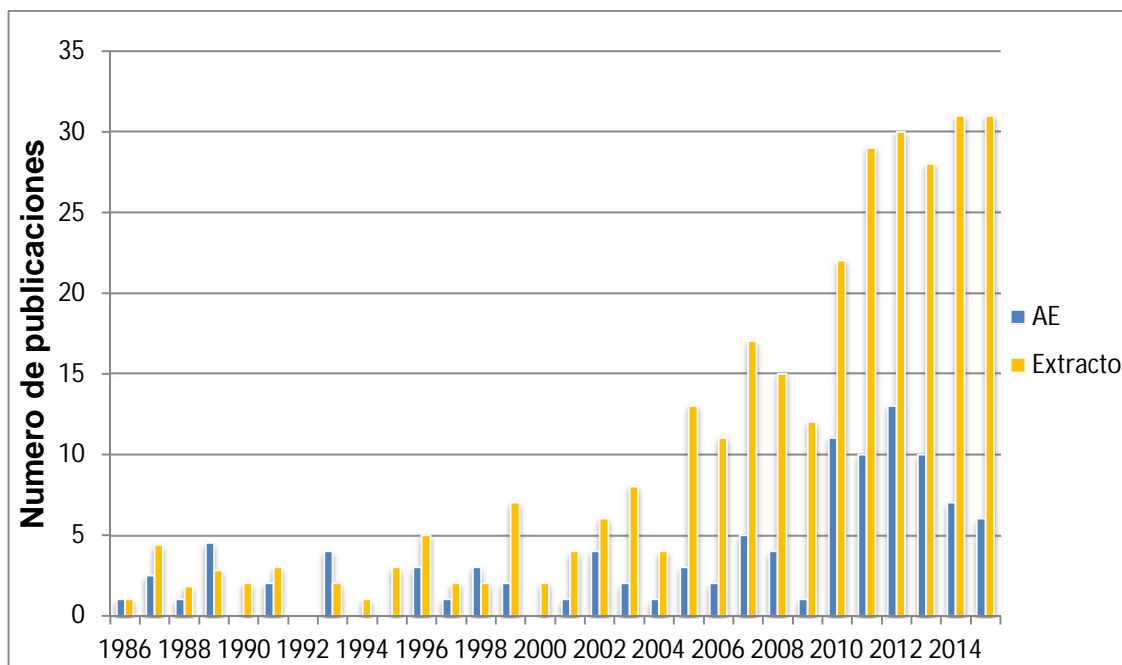
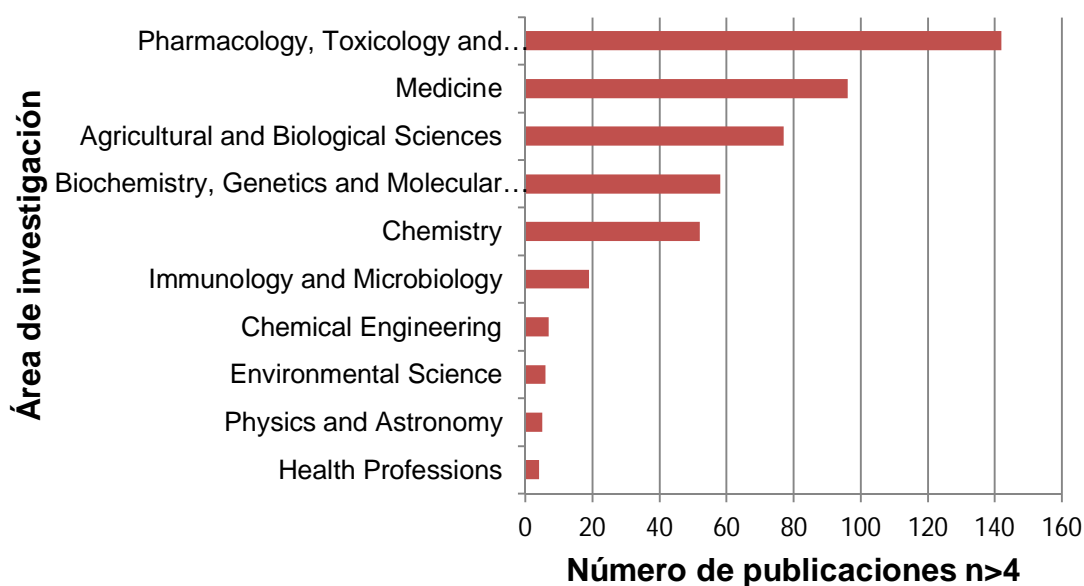


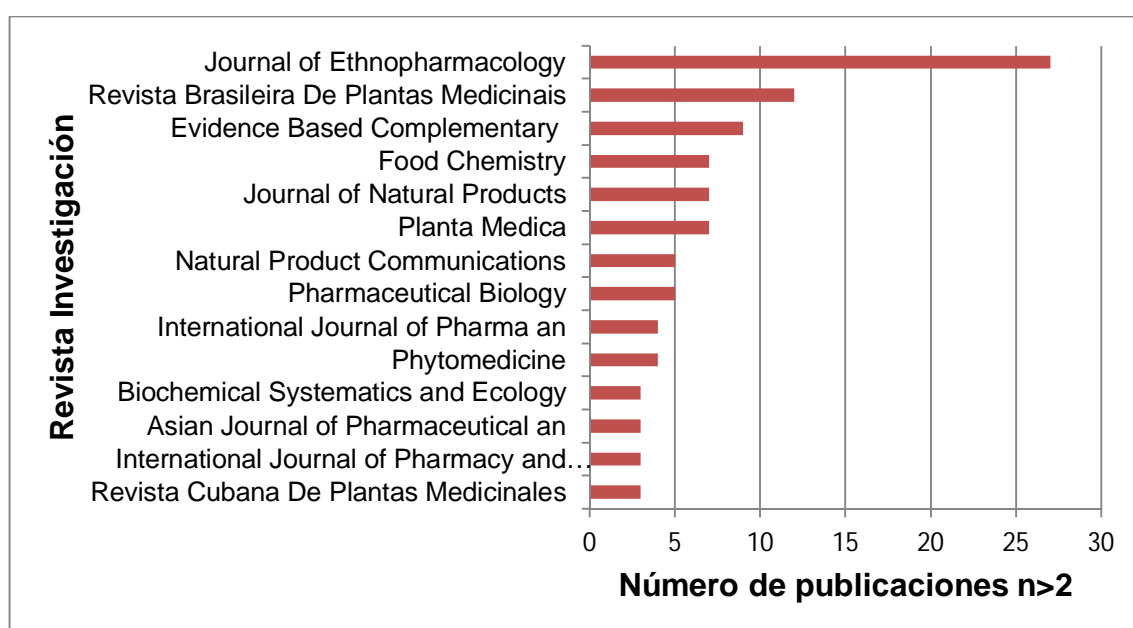
Figura 9. Principales áreas de investigación de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (*extract and Plectranthus*) en la base de datos; *Science Direct*, *Scopus* (*Elsevier*), consultado diciembre 9 de 2015.



Las revistas que más publicaron fueron las siguientes Journal of Ethnopharmacology (27), Revista Brasileira De Plantas Mediciniais (12), Evidence Based Complementary (9), Food Chemistry (7), Journal of Natural Products (7), y Planta Medica (7) ver **Figura 9**.

Los principales países donde se desarrollaron las investigaciones fueron India (72), Brazil (53), Portugal (26), Cuba (16), EEUU (15), España (15) y Sur África (14), ver **Figura 10**.

Figura 10. Principales revistas científicas de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (*extract and Plectranthus*) en la base de datos; *Science Direct, Scopus (Elsevier)*, consultado diciembre 9 de 2015.



Las cinco áreas de mayor investigación de acuerdo con su número de publicaciones son Agricultura y Ciencias Biológicas (34), Química (32), Medicina (30), Bioquímica, Genética y Biología Molecular (28), Farmacología, Toxicología y Farmaceutica (28), Inmunología y Microbiología (9), en la **Figura 11**, se presentan los resultados de la consulta.

Las revistas que generan mayor número de publicaciones son Journal of Essential Oil Bearing Pl. (6), Journal of Essential Oil Research (5), Planta Medica (5), Chemistry and Biodiversity (3), Flavour and Fragrance Journal (3) ver **Figura 12**. Los principales países donde se desarrollaron las investigaciones fueron Brazil (24), India (23), Francia (7), Sur África (14), Austria (5) y Alemania (5), en la **Figura 13**, se pueden observar los resultados de la consulta.

Figura 11. Principales países de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (*essential oil and Plectranthus*) en la base de datos; *Science Direct, Scopus (Elsevier)*, consultado diciembre 9 de 2015.

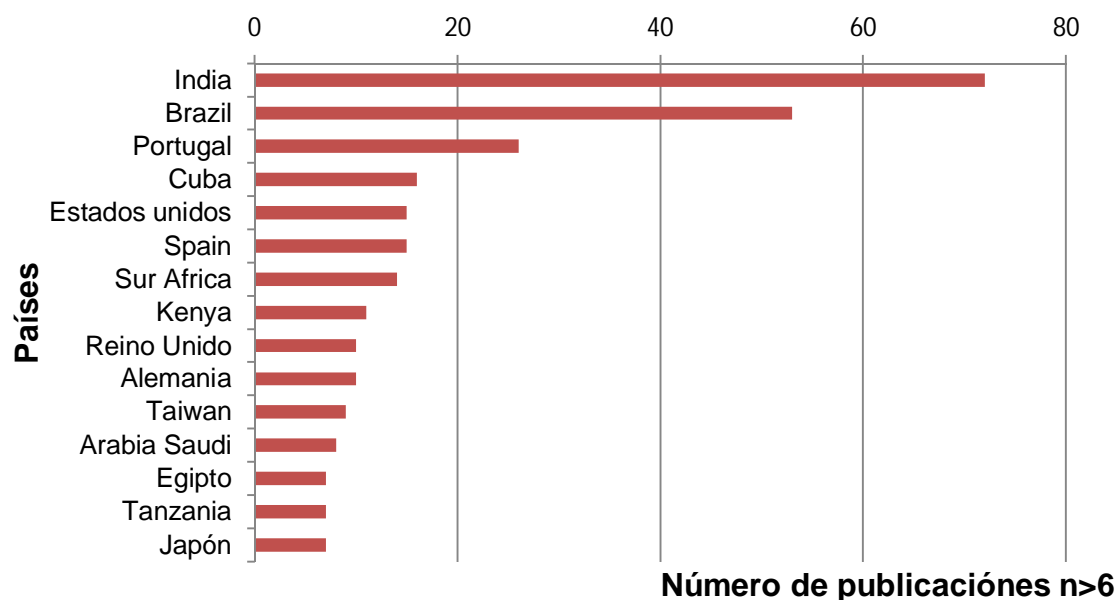


Figura 12. Principales áreas de investigación de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (*essential oil and Plectranthus*) en la base de datos; *Science Direct, Scopus (Elsevier)*, consultado diciembre 9 de 2015.

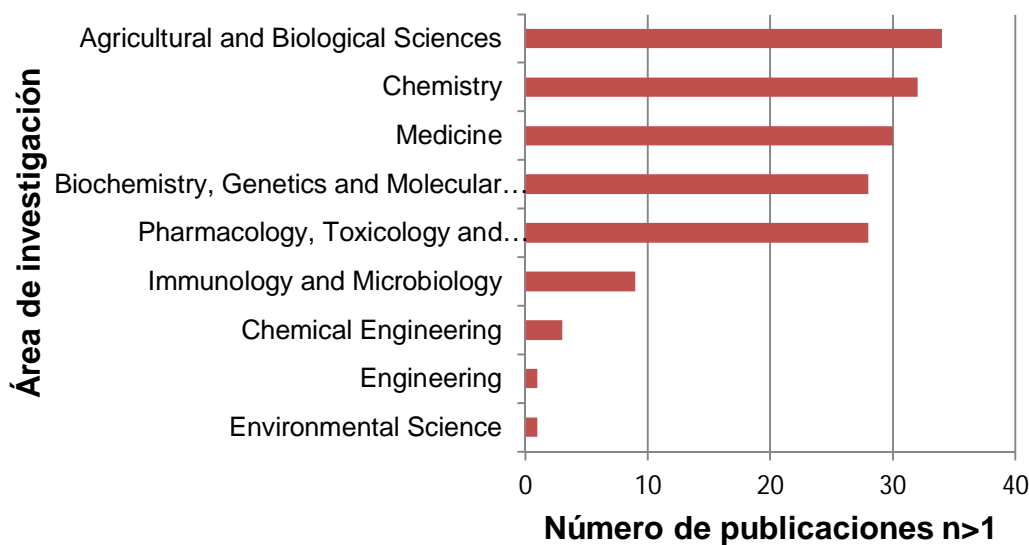


Figura 13. Principales revistas científicas de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (*essential oil and Plectranthus*) en la base de datos; *Science Direct, Scopus (Elsevier)*, consultado diciembre 9 de 2015.

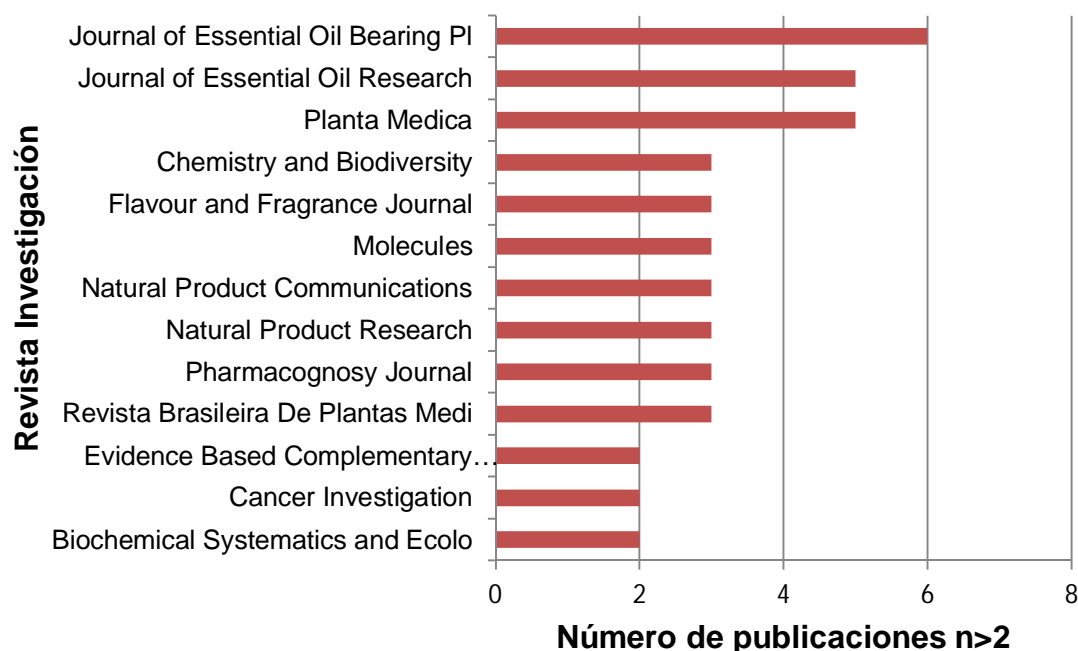
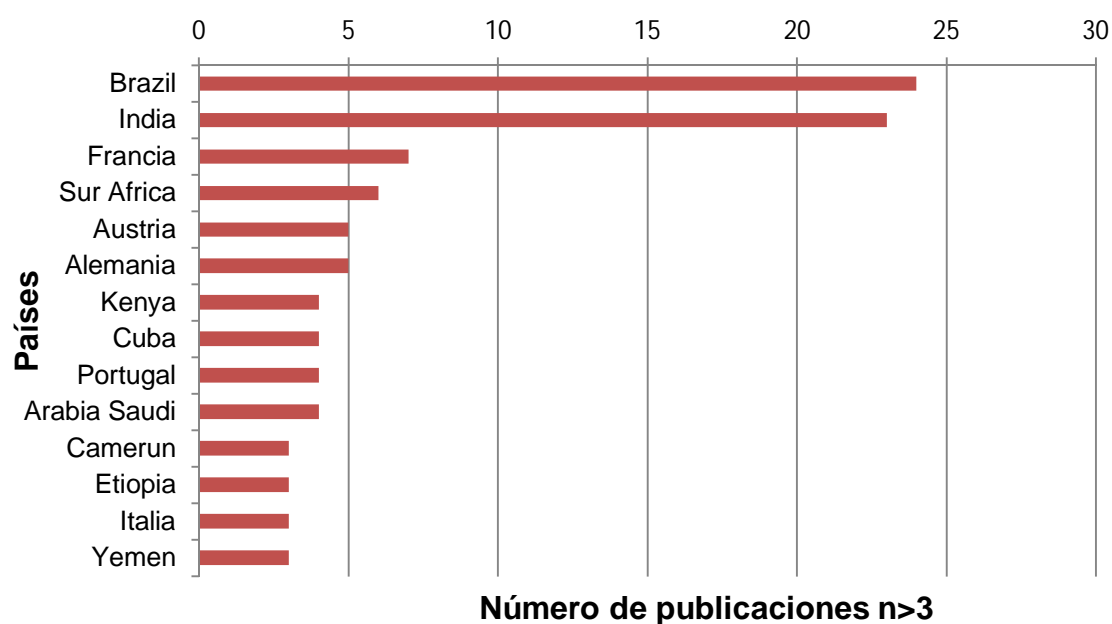


Figura 14. Principales países de acuerdo al número de publicaciones reportadas, en el periodo 2000-2015, ecuación de búsqueda TITLE-ABSTR-KEY (*essential oil and Plectranthus*) en la base de datos; *Science Direct, Scopus (Elsevier)*, consultado diciembre 9 de 2015.



El análisis de muestras complejas como los aceites esenciales (AE), es realizado cotidianamente en el laboratorio utilizando GC-FID y GC/MS, principalmente, debido a que los AE son sustancias volátiles, con temperaturas de ebullición inferiores a 300°C, de baja masa molecular. Con GC-FID se puede lograr (1) la separación completa de todos los componentes en la mezcla y (2) la cuantificación de los componentes del aceite, para ello, se emplean columnas largas de 30-60 m, con fases estacionarias polar y apolar. Del empleo de columnas con diferentes polaridades, se obtienen los índices de retención lineales, que ayudan a identificar los componentes en el AE, al ser comparados con los publicados en las bases de datos.

Bandeira y colaboradores [52], analizaron la composición química de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación, de cuatro especies del género *Plectranthus*: *P. amboinicus*, *P. barbatus*, *P. grandis* y *P. neochilus*, la cuantificación e identificación de los componentes volátiles en los aceites esenciales de cada especie fue realizado utilizando GC/FID y GC-MS, respectivamente, logrando la identificación de 14 compuestos químicos.

La identificación de los componentes se realizó por GC-MS, empleando la metodología descrita por Adams (2007), usando una columna DB-5HT (J & W Scientific®), 30 m de largo, 0.32 mm diámetro interno, 10 µm de espesor de la fase estacionaria. La cuantificación de los componentes del aceite esencial de las cuatro especies de *Plectranthus* fue realizada empleando GC-FID, utilizando un cromatógrafo modelo Shimadzu GC-17^a, acoplado a un detector de ionización de llama, empleando columnas SPB-5 (Supelco®) 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 µm de grosor fase estacionaria.

Gong y colaboradores [53], Obtuvieron (por hidrodestilación) y analizaron el aceite esencial de *Origanum vulgare*, de seis diferentes áreas de producción de China y Pakistán empleando cromatografía gas-liquido con detector de ionización de llama (GC-FID) y el acople Cromatografía gas-liquido con espectrometría de masas (CG-MS).

La identificación de los componentes y de los picos la realizaron mediante la comparación de los tiempos de retención con respecto a la serie *n*-alcanos (C₆-C₂₂) y con la utilización de estándares internos, analizados bajo idénticas condiciones experimentales. Los espectros de masas y los índices de retención relativos (IR) experimentales, fueron comparados con los consignados en la biblioteca espectral de masas (NIST 05) del NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, Gaithersburg, MD, EE.UU.).

Una amplia variedad de especies del género *Plectranthus* son usadas en medicina tradicional en Sur África. El potencial medicinal y comercial de

Plectranthus es de gran interés ya que muchos tratamientos para enfermedades se encuentran ocultos en este género [55]. Tallos, hojas, raíces y tubérculos de diferentes especies *Plectranthus* se utilizan para el tratamiento de las trece categorías de dolencias como se describe en la colección de datos de Botánica Económica [56].

En la **Tabla 4.** Se presentan los usos etnobotánicos y domésticos de algunas especies del género *Plectranthus*.

Tabla 4. Usos etnobotánicos y domésticos de algunas especies del género *Plectranthus* [14,15].

| Especies | Uso medicinal | Uso domestico |
|--------------------------------------|--|-----------------------------------|
| <i>Plectranthus ambiguus</i> | Sistema respiratorio | |
| <i>Plectranthus amboinicus</i> | S. respiratorio, veterinario | culinario |
| <i>Plectranthus barbatus</i> | digestivo, piel, infección, genito-urinario, fiebre, inflamación, circulación y sangre, nervioso | |
| <i>Plectranthus ecklonii</i> | dolor de cabeza, fiebre, piel, | |
| <i>Plectranthus elegans</i> | digestivo, respiratorio | |
| <i>Plectranthus esculentus</i> | digestivo, dolor | culinario, |
| <i>Plectranthus fruticosus</i> | piel | repelente |
| <i>Plectranthus grillatus</i> | indefinido | |
| <i>Plectranthus hadiensis</i> | respiratorio | veneno peces |
| <i>Plectranthus hereroensis</i> | digestivo | |
| <i>Plectranthus laxiflorus</i> | digestivo, piel, respiratorio, infección/fiebre, inflamación, musculoesquelético, nervioso | culinario, repelente de mosquitos |
| <i>Plectranthus dental</i> | | |
| <i>Plectranthus madagascariensis</i> | piel, respiratorio | |
| <i>Plectranthus ciliatus</i> | | lavar ropa |
| <i>Plectranthus neochilus</i> | | purificador aire |
| <i>Plectranthus petiolaris</i> | | ambientador |
| <i>Plectranthus rotundifolius</i> | | culinario |
| <i>Plectranthus unguentarius</i> | | pomada |

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPOS DE LABORATORIO, MATERIALES, REACTIVOS Y SOLVENTES

Tabla 5. Equipos de laboratorio utilizados en el desarrollo del proyecto.

| EQUIPO LABORATORIO | MARCA Y MODELO |
|--|---|
| Balanzas de precisión | Mettler Toledo AG258 \pm 0,00001 g, Zurich, Suiza. Y BA31os Sartorius Basis \pm 0,005 g, Göttingen, Alemania |
| Minishaker | IKA, JKMS, Hofheim, Alemania. |
| Plancha de calentamiento con agitación magnética | SCHOTT MR 065, Shott Geräte GmbH, D-65719 Hofheim, Alemania. |
| Extractor <i>Soxhlet</i> de alta presión 1500 psi | J&W <i>Scientific. Inc.</i> EEUU. |
| Baño circulatorio de refrigeración | <i>Fisher Scientific, Model 901</i> , Pittsburg, EEUU. |
| Baño ultrasonido | Ultrasonic LC 20 H. |
| Micropipeteadores 20 μ L, 200 μ L y 1000 μ L | BRAND GMBH Co., Wertheim, Alemania. |
| Cromatógrafo de gases con puerto de inyección <i>46esqu/splitless</i> e inyector automático, acoplado a un detector selectivo de masas | <i>Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System – Inyector Agilent 7863 – Agilent Technologies 5973 Network.</i> |
| Holder manual para SPME | Sigma Chemical Co., Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, EEUU. |
| Fibra para SPME de PDMS/DVB, 65 μ m 57310-U | Sigma Chemical Co., Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, EEUU. |

Tabla 6. Materiales de laboratorio utilizados en el desarrollo del proyecto.

| MATERIALES | MARCA O REFERENCIA |
|--|------------------------------------|
| Balón fondo redondo 2L, reductor 45/50 a 24/40, alargadera 24/40, trampa Dean-Stark, condensador de bolas y de espiras | SCHOTT Duran, Alemania |
| Viales de automuestreo 2 MI | Agilent Technology, EEUU. |
| Viales estándar para headspace 12 MI | |
| Pipetas Pasteur borosilicato 230 mm | BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania. |
| Tubos cónicos de poli(propileno) 1.5 MI | BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania. |
| Puntas plásticas para Micropipeteadores | BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania. |
| Consumibles cromatográficos (ferúlas, septa, liner, jeringas Hamilton de 10 µL) | BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania. |
| Horno microondas domestico 1600 W a 2,4 GHz | Samsung MS-1242zk |

Tabla 7. Reactivo y solventes utilizados en el desarrollo de la parte experimental.

| REACTIVOS Y SOLVENTES | MARCA O REFERENCIA |
|---|---|
| Sulfato de sodio anhidro, analítico | Merck.Schuchardt, 85662 Hohenbrum, Alemania |
| Diclorometano, analítico | Emscience, Merck KgaA, 41149122, Alemania |
| Agua destilada | |
| Gases (He, H ₂ , aire, mezcla Ar/CH ₄) | Linde Colombia S.A. Bogota |

3.2. MATERIAL VEGETAL

Las hojas y tallos de *Plectranthus sp.* se recolectaron por la mañana (8:00-10:00 am), de una parcela de 3 m² ubicada en el CENIVAM, únicamente se utilizaron tallos y hojas frescas sin daños, picadas en fresco y sometidas a la acción de técnicas destilativas y extractivas, con el fin de aislar los metabolitos secundarios.

3.3. AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

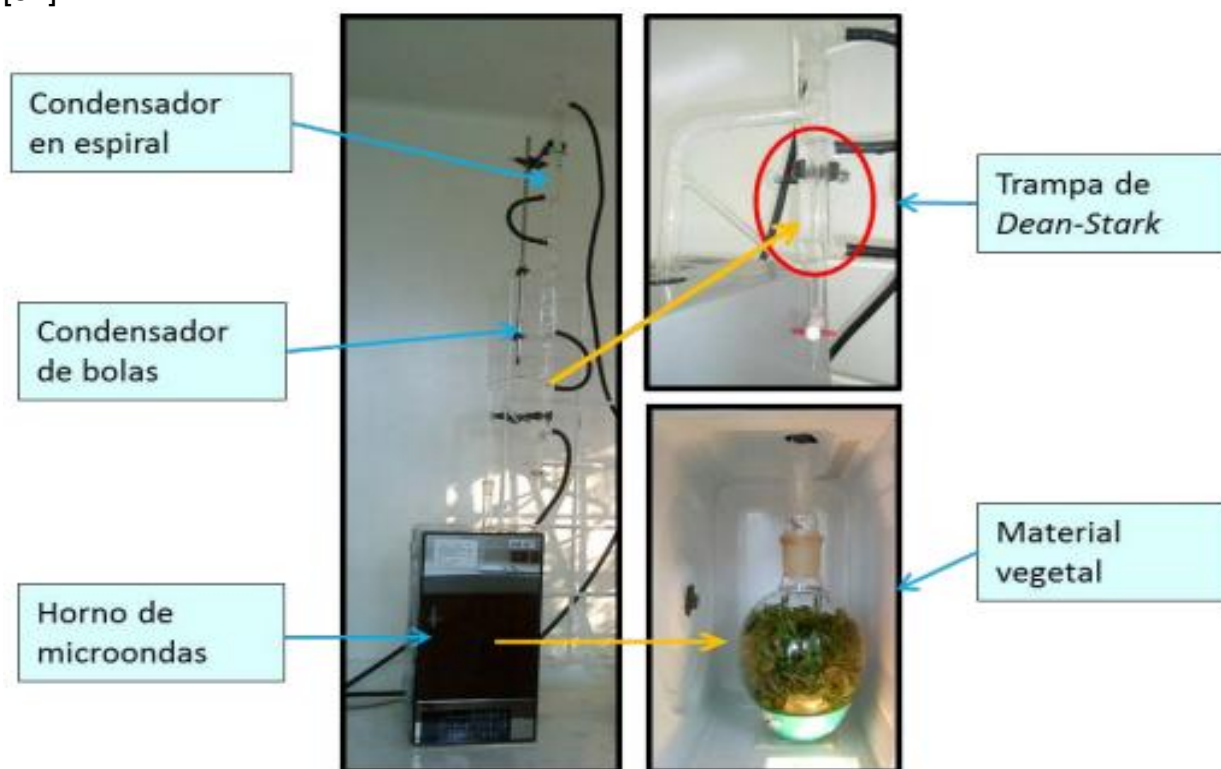
El AE de la especie *Plectranthus sp.*, fue obtenido por medio de la utilización de un hidrodestilador tipo Clevenger, con reservorio Dean-Stark, adaptado a un sistema de calentamiento por acción de la radiación de microondas; el montaje experimental utilizado se presenta en la **Figura 12**.

Para la destilación del AE. Obtenido a partir de dos muestras de material vegetal picado cada una con una masa de 1300 g, para cada destilación se depositaron 650 g de material vegetal en un balón fondo redondo de 2 L, posteriormente se adicionaron 450 ml de agua, el balón se introdujo dentro del horno y calentado hasta ebullición a intervalos de tiempo de 15 minutos con una pausa de 3 minutos, proceso de calentamiento realizado por 5 veces para sumar un total de 75 minutos de calentamiento.

El AE obtenido, se secó usando sulfato de sodio anhidro, fue pesado y almacenado en viales con atmosfera inerte (N₂), sellados con papel parafina y puestos en un refrigerador a 4° C, conservados para los estudios posteriores. La hidrodestilación del material vegetal se realizó por duplicado, el rendimiento el AE obtenido se calculó con base en la masa del material vegetal utilizado, para ello se usó la **Ecuación 1**.

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Masa AE obtenido}}{\text{masa material vegetal}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Figura 15. Montaje *MWHD*, con detalle interior del horno y trampa *Dean-Stark* [57].



3.4. EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO

El extracto obtenido del material vegetal se obtuvo a partir de 20 g de material vegetal finamente picado, utilizando 500 g de hielo seco (CO_2 sólido), para ello se depositó el material vegetal en el cuerpo del extractor, posteriormente se introdujo dentro del sistema *Soxhlet* de alta presión, al cual se le fue adicionando rápidamente los trozos de hielo seco hasta llenar completamente el cilindro, terminada la introducción del CO_2 se procedió a sellar completamente el sistema, el cilindro se introdujo dentro de un baño maría a 50°C , la extracción se realizó durante dos horas contadas a partir de la indicación de 1300 psi alcanzadas dentro del sistema, a continuación se procedió a enfriar el sistema en un baño refrigerante hasta alcanzar una presión de 500 psi para despresurizar lentamente, con el fin de evitar la expulsión de metabolitos y condensación simultánea de agua. En la **Figura 13**, Se puede apreciar el equipo utilizado.

El extracto obtenido, presentaba dos fases, una polar acuosa y la otra fase, apolar, orgánica con el fin de obtener los metabolitos de interés se realizó un proceso de extracción líquido-líquido *in situ* por triplicado con 1 ml de diclorometano, finalizado el anterior proceso se realizó un proceso de

concentración del extracto, realizado manualmente con una corriente de N₂, con el objetivo de evaporar el diclorometano, llevando casi a sequedad, finalmente el extracto es depositado en un vial de 2 ml, sellado con papel parafina, bajo atmosfera inerte y almacenado en un refrigerador a 4° C, para posterior caracterización analítica.

Figura 16. Extractor *Soxhlet* de alta presión, introducido en el baño maría [57].



3.5. Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (*HS-SPME*)

La *HS-SPME* se realizó a tres muestras diferentes a saber: AE obtenido por hidrodestilación, extracto obtenido por SFE y a material vegetal fresco, cada muestra fue depositada en viales ámbar para SPME de 10 ml, cada muestra fue sometida al siguiente procedimiento: se calienta el sistema durante 15 minutos a 60°C, fase de equilibrio térmico. Segunda fase absorción y concentración de la fracción volátil durante 30 minutos a 60°C, una vez finalizada la anterior fase, se introduce la fibra dentro del puerto de inyección de un equipo GC-MS, con el objetivo de realizar la desorción de los metabolitos, durante 15 minutos a 250°C. Para este procedimiento se usó una fibra PDMS/DVB, 65 µm de espesor del recubrimiento polimérico, se siguió la metodología descrita en [58].

En la **Figura 14**, Se observa el montaje experimental utilizado en la ejecución de la extracción.

Figura 14. Montaje experimental del procedimiento HS-SPME, para la extracción de volátiles, se muestra el proceso de absorción y concentración de los metabolitos [57].



3.6. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y PARÁMETROS TÉCNICOS DE OPERACIÓN DEL SISTEMA GC-MS

Con el objetivo de realizar la caracterización química de los metabolitos secundarios que componen el AE, extracto *SFE* y la fracción volátil aislada por *HS-SPME* de *Plectranthus* sp. Cada muestra fue sometida a un proceso cromatográfico de separación, utilizando columnas de diferente polaridad, e inyectando en iguales condiciones un patrón de hidrocarburos C_{10} - C_{25} , con el fin de calcular los índices de retención lineales (IRL). Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

- Para AE, se tomaron 50 mL del AE y se aforó con diclorometano a un 1 mL.
- Para el extracto *SFE*, se pesaron 5 mg en viales cónicos, se adicionó 1 ml de metanol, se puso en un baño de ultrasonido a una frecuencia de 35 KHz a una temperatura de 40°C por 15 min., posteriormente se agitaron durante 15 min a 2200 rpm, utilizando *minishaker* (IKA, JKMS, Hofheim, Alemania), las muestras

se centrifugaron a 3600 rpm durante 15 min, finalmente se filtraron usando micro filtro PVDF de 0.22 μm , no se observó la formación de precipitado.

- Para las muestras tomadas por *HS-SPME*, se pesaron aprox 10 mg de AE, para los extractos *SFE* se pesaron aprox. 5 mg, se pesaron aprox 3 g de hojas frescas, todas las muestras fueron depositadas en viales ámbar de 4 ml. La inyección se realizó directamente en el puerto de inyección, por desorción de la fibra a 250 °C durante 15 minutos.

El análisis cromatográfico fue realizado en un GC *Agilent Technologies 6890 Plus* (Palo Alto, California, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network*. Para la separación de los compuestos se usaron dos columnas capilares de diferente polaridad. Una columna cromatográfica con fase estacionaria (f.e.) apolar, de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, California, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, (d.i.), x 0.25 μm , (d_f), la otra con f.e. polar de poli(etilenglicol) (DB-WAX, *J & W Scientific*, Folsom, California, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, (d.i.), x 0.25 μm , (d_f).

Como gas de arrastré se utilizó helio (99.995%, gas AP, Linde Bogotá), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.43 psi y velocidad volumétrica de flujo de 1 ml/min. La temperatura del puerto de inyección se encontraba en 250 °C, se inyectaron 2 μL , la inyección se realizó en modo *split* (1:30), la programación de la temperatura del horno inició en 45°C durante 5 min, luego aumentó a 4 °C/min hasta alcanzar 150 °C manteniéndola constante por 2 min, posteriormente incrementó a 5 °C/min hasta alcanzar 250°C y se mantuvo constante por 5 min. Finalmente, luego se elevó hasta 275°C a 10 °C/min y se mantuvo constante por 50 min.

Para el análisis en columna polar, la temperatura del horno inició en 50°C durante 5 min, luego aumentó a 4 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 150°C y se mantuvo durante 7 min. Después se aumentó la temperatura a 4 °C/min hasta 230 °C y se mantuvo fija por 40 min.

Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con energía de 70 eV, las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de transferencia permanecieron a 230 y 285°C, los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron obtenidos en modo *full scan* en el rango de masas de 40-350 m/z.

3.7. IDENTIFICACIÓN METABOLITOS SECUNDARIOS

La identificación de los metabolitos constituyentes del AE, extracto SFE y hojas frescas, fue realizada por comparación directa de los índices de retención lineales (IRL) y de los espectros de masas obtenidos en el laboratorio, con IRL y espectros de masas reportados en las librerías de espectros Adams (2004), NIST (2008) y Wiley (2008) para ello se utilizó el *software Enhanced ChemStation MSD ChemStation E.02.02.1431 Copyright © 1989-2011 Agilent Technologies, Inc.*

Para el cálculo de los IRL se emplearon los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos lineales *n*-alcanos, C₆-C₂₅, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas utilizadas en las muestras. El cálculo se realizó teniendo en cuenta la **Ecuación 2**.

$$IRL = (100n) + 100 \left[\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad (Ecuación 2)$$

Donde:

IRL: índice de retención lineal 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_{RX}: tiempo de retención del compuesto de interés.

T_{Rn}: tiempo de retención del *n*-alcano que eluye antes.

T_{RN}: tiempo de retención del *N*-alcano que eluye después del compuesto de interés.

3.8. CUANTIFICACIÓN METABOLITOS SECUNDARIOS

La cuantificación de los metabolitos presentes en el AE se realizó utilizando n-tetradecano como estándar interno, según **Ecuación 3**.

$$C_x = \frac{C_{Istd} * A_x}{A_{Istd}} \quad (Ecuación 3)$$

Donde:

C_x : Concentración del analito en la muestra [g/l];

C_{Istd} : Concentración del patrón interno (Istd) en [g/l];

A_x : Área del pico cromatográfico del analito en [cuentas];

A_{Istd} : Área del pico cromatográfico del patrón interno en [cuentas].

4. PRESENTACIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS

El desarrollo experimental de la investigación se realizó en tres etapas, la primera consistió en la obtención del AE por MWHD, del extracto SFE y la extracción de la fracción volátil de hojas frescas por HS-SPME, la segunda etapa consistió en la caracterización de las diferentes muestras utilizando técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas y la tercera etapa consistió en el análisis de datos y consolidación de resultados. A continuación se presentan los resultados obtenidos en la investigación.

4.1. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA ESPECIE VEGETAL

La caracterización taxonómica de la especie vegetal se realizó en el Instituto de ciencias naturales, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá por el profesor Rubert Tulio González clasificándola como perteneciente al género *Plectanthus*, en la **Tabla 8**. Se presenta la identificación taxonómica de la especie.

La caracterización taxonómica de la especie vegetal se realizó en el Instituto de ciencias naturales, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá por el profesor Rubert Tulio González clasificándola como perteneciente al género *Plectanthus*. Los pliegos testigo quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Cenivam con código CE-484.

Tabla 8. Identificación taxonómica de la especie sujeta a estudio.

| | |
|--------------------|---------------------|
| Reino | Plantae |
| Phylum | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Lamiales |
| Familia | Lamiaceae |
| Género | <i>Plectranthus</i> |
| Epíteto específico | -- |

4.2. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE

A continuación se presentan los resultados obtenidos relacionados con la caracterización química de los metabolitos secundarios de la especie vegetal *Plectranthus* sp. Utilizando los métodos tradicionales de preparación de muestra requeridos para realizar la inyección en el equipo GC y se presentan los resultados obtenidos en la caracterización de los metabolitos utilizando HS-SPME.

La comparación de los espectros de masas (EI, 70 eV), se realizó por medio del software *Enhanced ChemStation MSD ChemStation E.02.02.1431 Copyright © 1989-2011 Agilent Technologies, Inc.*, programa informático que permite la comparación directa de los espectros de masas obtenidos experimentalmente contra los espectros consignados en las bases de datos, de las cuales se seleccionaba el metabolito con el espectro de masas con una coincidencia mayor a 95% e IRL con menor diferencia.

Se seleccionaron los siguientes parámetros de integración de los picos cromatográficos: área de rechazo del pico en la base igual a 0.1 y umbral de integración, thshd= 18.

El AE de *Plectranthus* sp., destilado por MWHD presenta las siguientes características organolépticas, una ligera coloración amarilla, y se obtuvo con un porcentaje de rendimiento de 0.025% y 0.027%.

Como resultados del análisis cromatográfico, se encontraron 52 picos, por inyección directa, ver **Figura 15**, de los cuales se lograron identificar 41 metabolitos, que representan un 92 % del área cromatográfica total y son presentados en la **Tabla 8**, junto con los IRL determinados en columna apolar (DB-5MS) y en columna polar (DB-WAX).

Los compuestos mayoritarios encontrados en el AE son los sesquiterpenos, *trans*- β -cariofileno (27%), germacreno D (12%), óxido de cariofileno (5.6%), δ -cadineno (5.3%), N.I. (4.6%), *trans*-nerolidol (4%), 1-octeno-3-ol (4%), β -bourboneno (3.2%), α -copaeno (3%), epi-cubebol (2.1%), α -humuleno (2%), estos once metabolitos representan el 73% del área cromatográfica total.

Figura 17. . Perfil cromatográfico del AE obtenido por *MWHD* de material vegetal fresco, de partes aéreas recolectadas de la especie *Plectranthus* sp., **A**, columna apolar (DB-5MS, 60 m, *Split* 1:30), **B**, columna polar (DB-WAX, 60 m, *Split* 1:30).

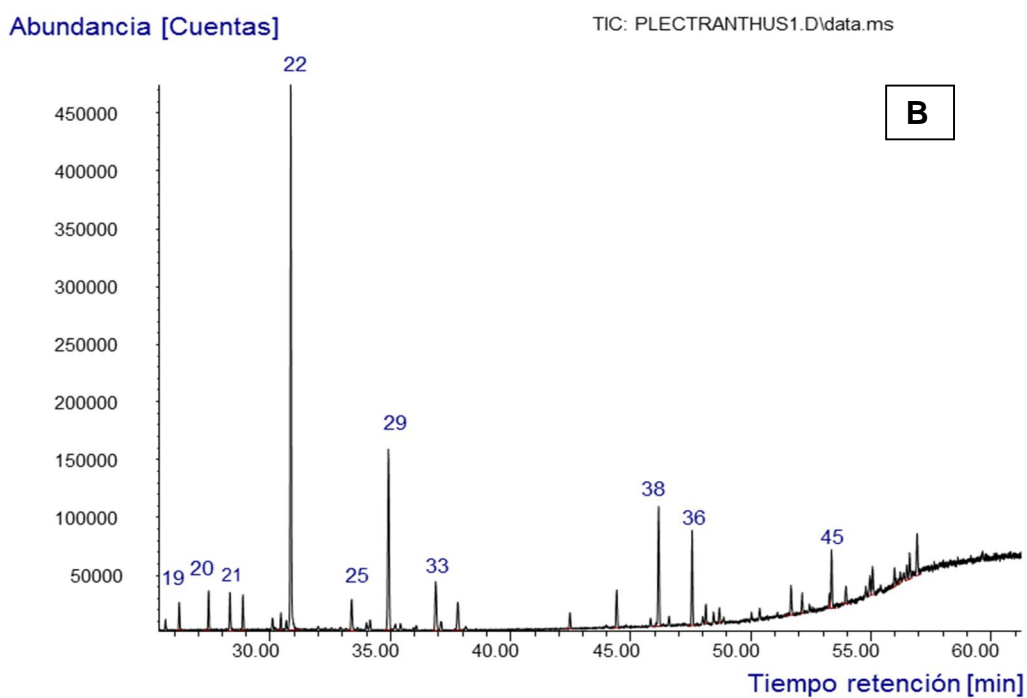
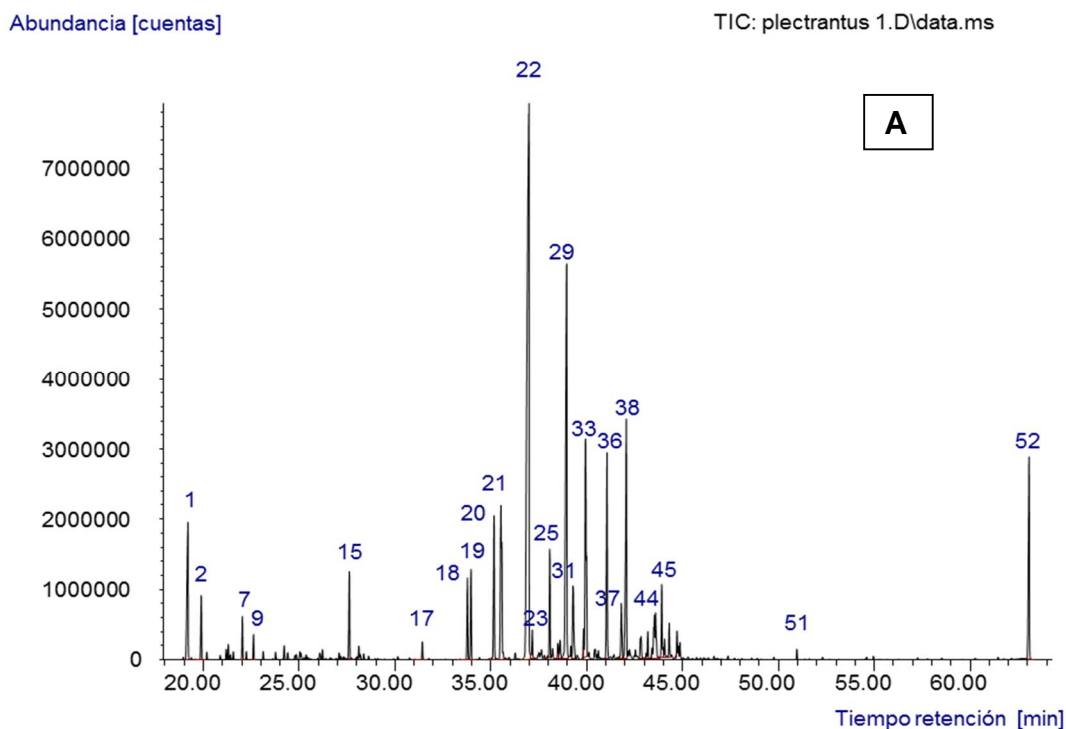


Tabla 9. Metabolitos identificados en el AE de *Plectranthus* sp., obtenidos por MWHD, correspondientes con los picos de los perfiles cromatográficos reportados en la **Figura 16 A.**

| N° Pico ^a | Compuesto | IRL ^b | | | | Área Relativa (%) |
|----------------------|---|------------------|----------|----------------|----------|-------------------|
| | | Columna DB-5MS | | Columna DB-WAX | | |
| | | EXP | REF | EXP | REF | |
| 1 | 1-Octeno-3-ol | 980 | 983 [3] | | | 3.91 |
| 2 | 3-Octanol | 995 | 996 [3] | | | 1.18 |
| 3 | (Z)-3-Hexeno-1-ol-acetato | 1002 | 1004 [1] | | | 0.12 |
| 4 | p-Cimeno | 1026 | 1020 [1] | | | 0.17 |
| 5 | 5-Isopropil-2-metilbicyclo [3.1.0]hex-3-en-2-ol | 1028 | 1039 [3] | | | 0.25 |
| 6 | <i>trans</i> -β-Ocimeno | 1035 | 1032 [1] | | | 0.15 |
| 7 | <i>cis</i> -β-Ocimeno | 1046 | 1044 [1] | | | 0.70 |
| 8 | N.I. (m/z 152) | 1051 | | | | 0.14 |
| 9 | γ-Terpineno | 1060 | 1054 [1] | | | 0.42 |
| 10 | Hidróxido <i>cis</i> -sabineno | 1072 | 1065 [1] | | | 0.14 |
| 11 | Terpinoleno | 1087 | 1086 [1] | | | 0.16 |
| 12 | Linalool | 1098 | 1095 [1] | | | 0.26 |
| 13 | -- | 1119 | - | | | 0.08 |
| 14 | <i>trans</i> -Verbenol | 1149 | 1140 [1] | | | 0.17 |
| 15 | Terpienen-4-ol | 1185 | 1174 [1] | | | 1.72 |
| 16 | α-Terpineol | 1198 | 1198 [3] | | | 0.19 |
| 17 | Acetato de bornilo | 1288 | 1287 [1] | | | 0.34 |
| 18 | α-Terpenil acetato | 1349 | 1346 [1] | | | 1.62 |
| 19 | α-Cubebeno | 1354 | 1345[1] | 1468 | 1460 [2] | 1.87 |
| 20 | α-Copaeno | 1385 | 1374 [1] | 1505 | 1491 [2] | 3.15 |
| 21 | β-Bourboneno | 1395 | 1387 [1] | 1533 | 1530 [3] | 5.34 |
| 22 | <i>trans</i> -β-Cariofileno | 1437 | 1417 [1] | 1613 | 1616 [3] | 26.73 |
| 23 | β-Copaeno | 1442 | 1430 [1] | | | 0.60 |
| 24 | Sesquiterpeno C15H24 | 1456 | - | | | 0.30 |
| 25 | α-Humuleno | 1469 | 1452 [1] | 1685 | 1670 [3] | 2.16 |
| 26 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 1473 | 1458 [1] | | | 0.27 |
| 27 | γ-Muuroleno | 1481 | 1478 [1] | | | 0.38 |
| 28 | γ-Muuroleno | 1484 | 1478 [1] | | | 0.50 |
| 29 | Germacreno D | 1494 | 1484 [1] | 1723 | 1716 [3] | 12.46 |
| 30 | -- | 1501 | - | | | 0.29 |
| 31 | epi-Cubebol | 155 | 1493 [1] | | | 2.16 |
| 32 | γ-Cadineno | 1523 | 1513 [1] | | | 0.51 |
| 33 | δ-Cadineno | 1527 | 1522 [1] | 1787 | 1769 [3] | 6.56 |
| 34 | Kessano | 1544 | 1529 [1] | | | 0.32 |
| 35 | <i>cis</i> -Hidrato de sesquisabineno | 1549 | 1542 [1] | | | 0.13 |

| | | | | | | |
|----|---|------|----------|------|----------|------|
| 36 | <i>trans</i> -Nerolidol | 1564 | 1561 [1] | | | 4.18 |
| 37 | Germacreno-D-4-ol | 1589 | 1574 [1] | | | 1.49 |
| 38 | Óxido de cariofileno | 1598 | 1582 [1] | 1999 | 1999 [3] | 5.80 |
| 39 | Sesquiterpeno C ₁₅ H ₂₆ O | 1604 | - | | | 0.29 |
| 40 | β -Oplopenona | 1616 | 1607 [1] | | | 0.34 |
| 41 | -- | 1627 | - | | | 0.78 |
| 42 | epi-Cubanol | 1640 | 1627 [1] | | | 0.60 |
| 43 | -- | 1648 | - | | | 0.24 |
| 44 | τ -Murrolol | 1651 | 1640 [1] | | | 2.24 |
| 45 | α -Cadinol | 1667 | 1652 [1] | 2244 | 2244 [3] | 1.50 |
| 46 | -- | 1673 | - | | | 0.36 |
| 47 | -- | 1682 | - | | | 0.60 |
| 48 | Germacra-4(15),5,10(14)- trien-1- α -ol | 1697 | 1685 [1] | | | 0.52 |
| 49 | -- | 1700 | - | | | 0.22 |
| 50 | -- | 1703 | - | | | 0.28 |
| 51 | E-Cembreno A | 1974 | 1965 [1] | | | 0.16 |
| 52 | -- | | - | | | 4.92 |

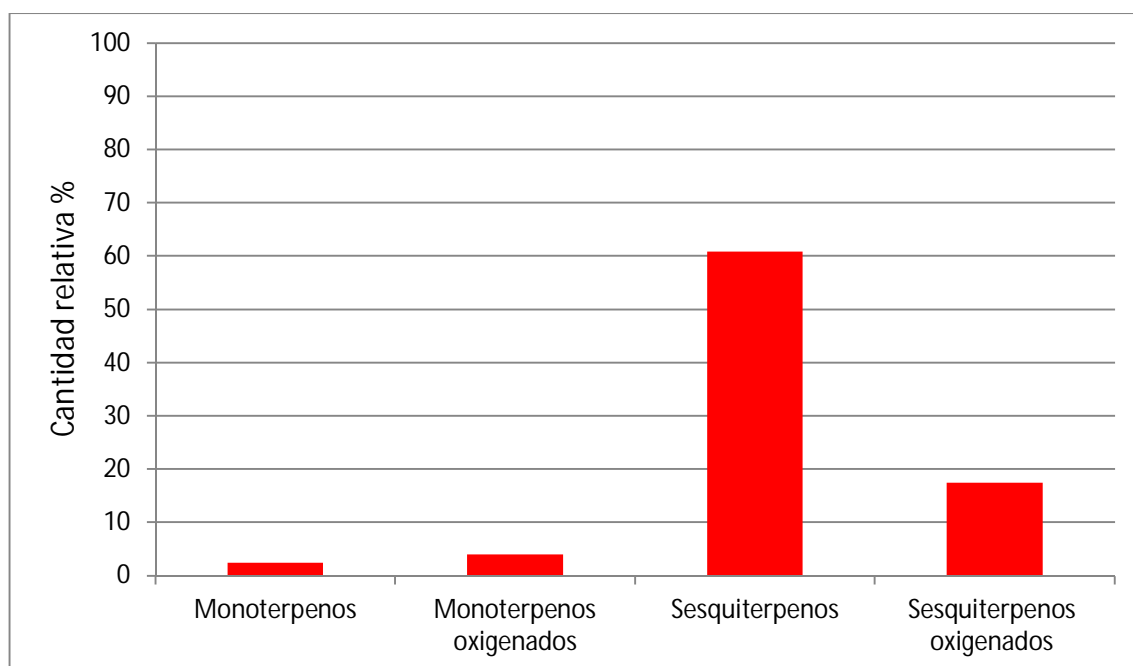
^a: Número de pico en la **Figura 8A**.

^b: Índices de retención lineales, experimental y referencia.

- 1) ADAMS, P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th edición, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 2004.
- 2) BABUSHOK, V. I., LINSTROM, P. J., ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. J. Phys. Chem. 2011. 40:4. pp. 1-47.
- 3) NIST Mass Spectrometry Data Center. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>.

En la **Figura 17**, se reportan las cantidades relativas de las familias de metabolitos determinados en el análisis, encontrando como componentes principales la familia de los sesquiterpénos, representando un 60.83%, con contribuciones altas de *trans*- β -cariofileno (27%), germacreno D (12%), oxido de cariofileno (5.6%), δ -cadineno (5.3%), seguido de los sesquiterpénos oxigenados que se encuentran presentes en un 17.46%, con contribuciones altas de *trans*-nerolidol (4.2%) y oxido de cariofileno (5.8%).

Figura 18. . Variación de las familias de compuestos químicos presentes en el AE destilado por MWHD de partes aéreas frescas de *Plectranthus* sp.



Las hojas y tallos de *Plectranthus* sp., tienen la cualidad de presentar un intenso olor característico, el análisis por *HS-SPME* permite retener y concentrar en la fibra los metabolitos más volátiles, generadores del olor característico.

Utilizando una fibra *SPME*, con recubrimiento polimérico de *PDMS/DVB* para el análisis de la fracción volátil del AE de *Plectranthus* sp., se pesó una muestra de 10.2 mg de AE dentro de un vial ámbar de 4 mL, el cual se llevó a calentamiento durante 15 minutos a 60° C, posteriormente se introdujo la fibra dentro del vial y se expuso para realizar la absorción y concentración de la fracción volátil durante 30 minutos a 60° C, finalmente, se retira la fibra y se inyecta dentro del puerto de inyección de un equipo GC-MS, la desorción de los metabolitos se realiza durante 15 minutos a 250° C.

Bajo los mismos parámetros de integración, se detectaron 90 picos cromatográficos, de los cuales se lograron identificar 53 metabolitos, correspondientes al 93% del área cromatográfica total, el aumento en la cantidad de metabolitos detectados es debido a la absorción y concentración de los metabolitos dentro del recubrimiento polimérico, en la **Figura 18**, se presenta el perfil cromatográfico de los metabolitos volátiles de *Plectranthus* sp., obtenido en columna polar *DB-WAX*, aislados por *HS-SPME* y en la **Tabla 9**, se encuentran los metabolitos identificados para cada pico.

Figura 19. Perfil cromatográfico del AE, muestreo realizado por *HS-SPME*, usando columna polar (DB-WAX, 60 m, Split 1:30).

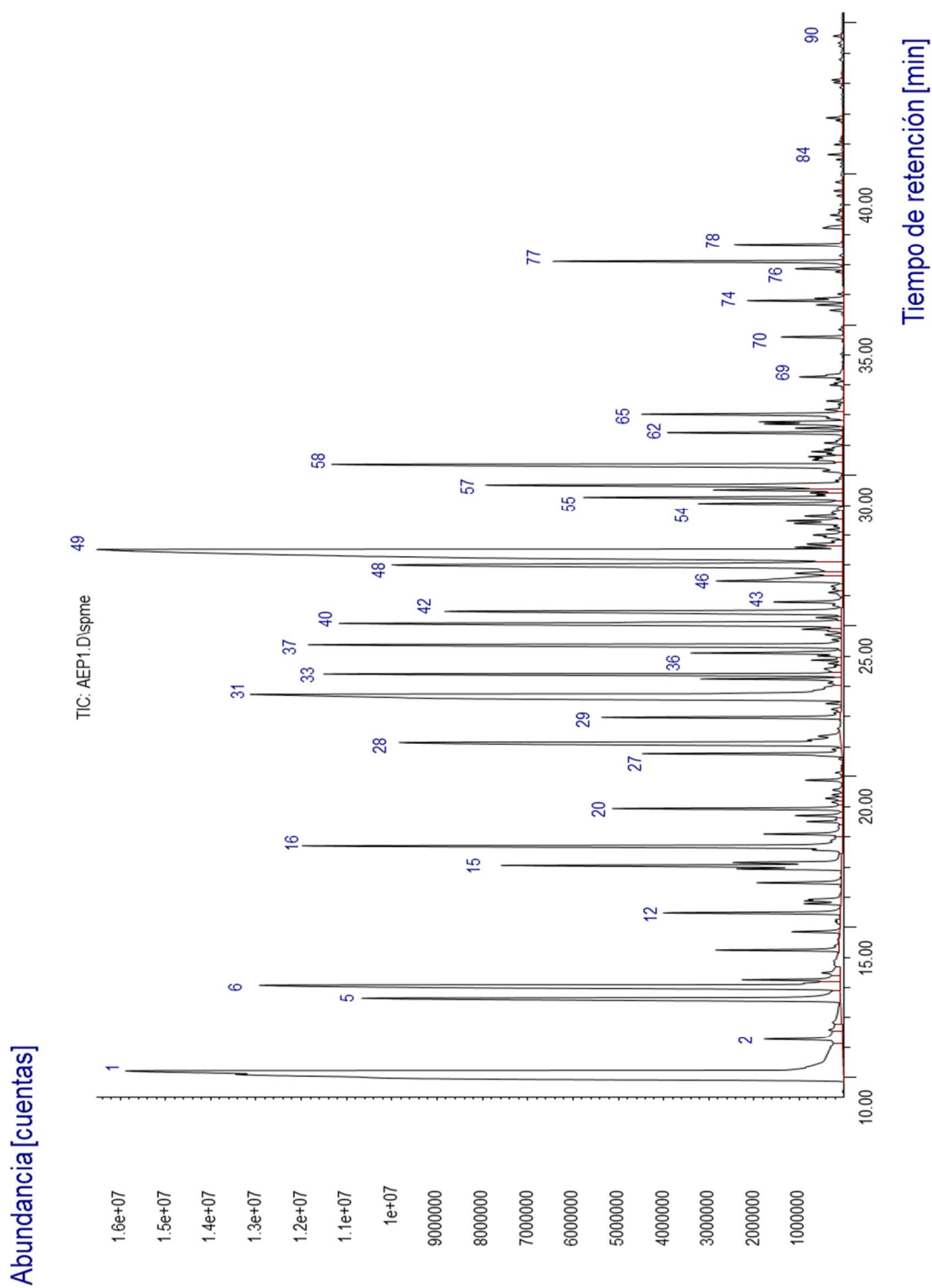


Tabla 10. Metabolitos identificados en el AE, realizando muestreo por *HS-SPME*.

| N° pico ^a | Nombre | IRL ^b | | tipo | Cantidad relativa (%) |
|----------------------|-------------------------------------|------------------|----------|------|-----------------------|
| | | Columna DB-WAX | | | |
| | | EXP | REF | | |
| 1 | α -Pinoeno | 1029 | 1025 [2] | M | 14.3 |
| 2 | Camfeno | 1068 | 1063 [3] | M | 0.6 |
| 3 | - | 1068 | | | 0.2 |
| 4 | - | 1112 | | | 0.2 |
| 5 | β -Pinoeno | 1112 | 1114 [3] | M | 3.4 |
| 6 | Sabineno | 1125 | 1122 [2] | M | 5.0 |
| 7 | Thuja-2,4(10)-dieno | 1131 | 1122 [2] | M | 0.4 |
| 8 | - | 1142 | | | 0.2 |
| 9 | Mirceno | 1162 | 1160 [2] | M | 0.5 |
| 10 | α -Terpineno | 1180 | 1178 [2] | M | 0.2 |
| 11 | - | | | | 0.1 |
| 12 | Limoneno | 1200 | 1198 [2] | M | 0.7 |
| 13 | β -Felandreno | 1210 | 1209 [2] | M | 0.4 |
| 14 | Z- β -Ocimeno | 1232 | 1234 [2] | M | 0.4 |
| 15 | <i>trans</i> - β -Ocimeno | 1251 | 1250 [2] | M | 2.6 |
| 16 | o-Cimeno | 1272 | 1268 [3] | M | 3.2 |
| 17 | Terpinoleno | 1284 | 1282 [2] | M | 0.4 |
| 18 | 1-Octen-3-ona | 1298 | 1301 [2] | M | 0.2 |
| 19 | -- | | | | 0.2 |
| 20 | <i>trans</i> -3-Acetato de hexenilo | 1312 | 1315 [2] | | 0.9 |
| 25 | n-Hexanol | 1345 | 1351 [2] | AA | 0.2 |
| 26 | -- | | | | 0.1 |
| 27 | <i>trans</i> -3-Hexen-1-ol | 1376 | 1380 [2] | AA | 0.9 |
| 28 | 3-Octanol | 1389 | 1391 [2] | AA | 3.5 |
| 29 | NI (m/z 152) | | | | 1.0 |
| 30 | -- | | | | 0.1 |
| 31 | 1-Octen-3-ol | 1448 | 1444 [2] | AA | 7.7 |
| 32 | <i>cis</i> -Hidrato de sabineno | 1467 | 1460 [2] | MO | 0.6 |
| 33 | α -Cubebeno | 1473 | 1472 [2] | S | 2.4 |
| 34 | -- | | | | 0.2 |
| 36 | Decanal | 1498 | 1496 [2] | HA | 0.8 |
| 37 | α -Copaeno | 1509 | 1491 [2] | S | 3.3 |
| 40 | β -Bourboneno | 1535 | 1523 [2] | S | 3.6 |
| 41 | -- | | | | 0.1 |
| 42 | β -Cubebeno | 1550 | 1541 [2] | S | 2.7 |
| 43 | <i>trans</i> -p-Menth-2-n-1-ol | 1562 | 1562 [3] | SO | 0.4 |
| 46 | Acetato de bornilo | 1588 | 1579 [2] | SO | 1.1 |
| 47 | -- | | | | 0.3 |

| | | | | | |
|----|---------------------------------------|------|----------|----|------|
| 48 | Terpinen-4-ol | 1608 | 1601 [2] | MO | 4.1 |
| 49 | <i>trans</i> -(β)-Cariofileno | 1626 | 1616 [3] | S | 14.6 |
| 52 | <i>trans</i> -Pinocarveol | 1659 | 1658 [3] | MO | 0.6 |
| 53 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 1665 | 1662 [2] | S | 0.3 |
| 54 | <i>trans</i> -Verbenol | 1680 | 1680 [2] | MO | 0.6 |
| 55 | α -Humuleno | 1687 | 1681 [2] | S | 1.5 |
| 56 | α -Terpineol | 1696 | 1694 [2] | MO | 0.6 |
| 57 | α -Terpinil acetato | 1702 | 1695 [2] | MO | 2.2 |
| 58 | Germacreno D | 1728 | 1716 [3] | S | 3.4 |
| 59 | NI (m/z 204) | | | | 0.4 |
| 60 | <i>cis</i> -Piperitol | 1744 | 1750 [2] | MO | 0.3 |
| 62 | δ -Cadineno | 1768 | 1755 [2] | S | 0.7 |
| 63 | γ -Cadineno | 1774 | 1763 [2] | S | 0.2 |
| 64 | <i>trans-cis</i> -sabinol | 1782 | 1800 [2] | MO | 0.7 |
| 68 | <i>trans</i> -Carveol | 1830 | 1836 [2] | S | 0.1 |
| 69 | p-Cime-8-ol | 1841 | 1848 [2] | | 0.3 |
| 72 | Z-Jasmona | 1933 | 1950 [2] | | 0.1 |
| 73 | - | | | | 0.1 |
| 74 | NI (m/z 222) | | | | 0.5 |
| 76 | NI (m/z 220) | | | | 0.2 |
| 77 | óxido de Cariofileno | 2004 | 1986 [2] | SO | 1.2 |
| 78 | <i>trans</i> -Nerolidol | 2031 | 2036 [2] | SO | 0.4 |
| 79 | Germacreno D-4-ol | 2057 | 2056 [2] | SO | 0.1 |
| 81 | 1-epi-Cubenol | | 2088 [2] | | 0.1 |
| 84 | Spathulenol | 2130 | 2186 [2] | SO | 0.1 |
| 85 | Timol | 2167 | 2164 [2] | MO | 0.1 |
| 86 | τ -Cadinol | 2171 | 2169 [2] | SO | 0.1 |
| 87 | - | | | | 0.1 |
| 88 | α -Cadinol | 2228 | 2227 [2] | SO | 0.1 |

^a: Número de pico en la **Figura 18**.

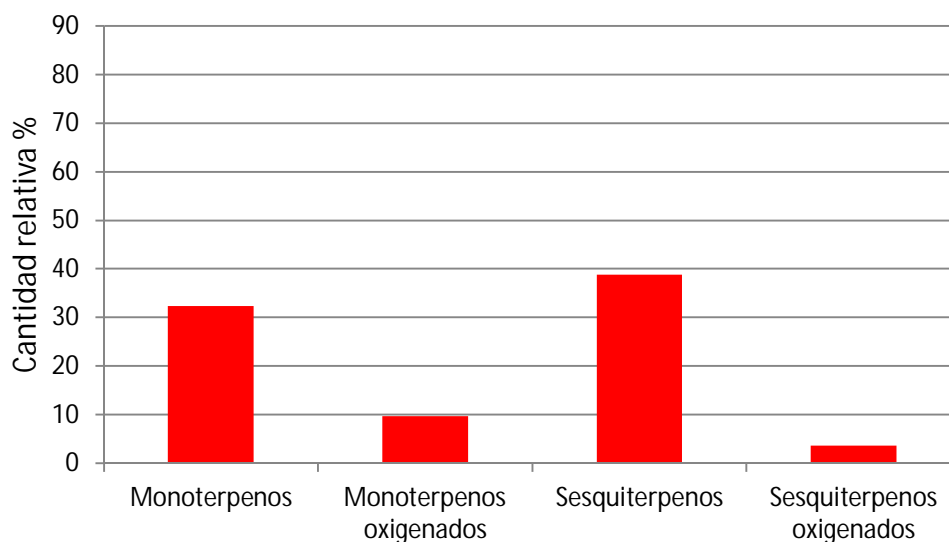
^b: Índices de retención lineales, experimental y referencia.

- 1) ADAMS, P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th edición, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 2004.
- 2) BABUSHOK, V. I., LINSTROM, P. J., ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. J. Phys. Chem. 2011. 40:4. pp. 1-47.
- 3) NIST Mass Spectrometry Data Center. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Los compuestos mayoritarios determinados fueron los siguientes: *trans*- β -cariofileno (14.6%), α -pineno (14.3%), 1-octeno-3-ol (7.7%), sabineno (5%), terpinen-4-ol (4.1%), β -bourboneno (3.6%), 3-octanol (3.5%) germacreno D (3.4%), β -pineno (3.4%), α -copaeno (3.15%), o-Cimeno (2.24%), β -Cubebeno

(2.16%), *trans*- β -Ocimeno (2.16%), α -Cubebeno (2%), correspondientes al 75% del área cromatográfica total.

Figura 20. Variación de las familias de compuestos químicos presentes en el AE destilado por *MWHD* de partes aéreas frescas de *plectranthus* sp., muestreo realizado por *HS-SPME*.



En la **Figura 19**, se reportan las cantidades relativas de las familias de metabolitos determinados en el análisis, encontrando como componentes principales la familia de los sesquiterpenos (38.8%), con contribuciones altas de *trans*- β -cariofileno (14.6%), seguida de la familia de los monoterpenos (32.3%), con contribuciones altas de α -pineno (14.3%) y sabineno (5%).

4.3. ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS POR SFE

El extracto *SFE*, obtenido de la especie vegetal se caracterizó utilizando dos métodos diferentes de muestreo, el primer método consistió en la preparación de muestra de manera tradicional, para ello se realizó la inyección directa de la muestra libre de interferencias disuelta en metanol, y un segundo método en el que se llevó a cabo el muestreo utilizando *HS-SPME*.

En el perfil cromatográfico obtenido por inyección directa del extracto *SFE*, no se logró identificar ningún metabolito, en cambio en el muestreo realizado por *HS-SPME*, se reportan en la **Figura 20**, 39 picos cromatográficos, de los cuales se lograron identificar 25 metabolitos secundarios, representando un 88% del área cromatográfica total. De ellos mayoritarios el *trans*-(β)-carifileno (34.68%),

1-octen-3-ol (18.17%), α -copaeno (6.36%), óxido de cariofileno (4.26%), β -bourboneno (3.94%), 3-octanol (3.5%) α -cubebeno (2.47%) y δ -cadineno (2%), correspondiente al 73% del área cromatográfica total.

Figura 21. Perfil cromatográfico del extracto SFE de *Plectranthus* sp., Columna DB-WAX, *Split* 1:30, MSD (70 Ev, IE).

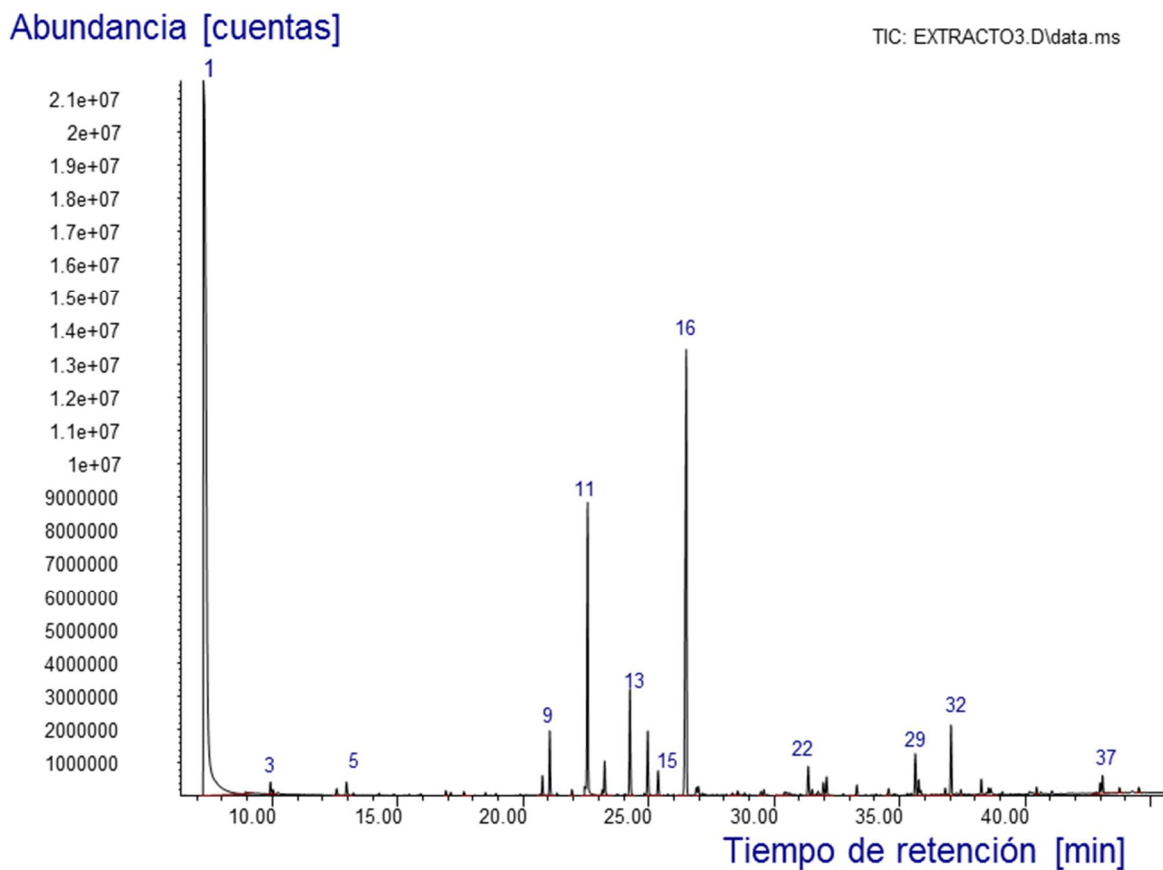


Tabla 11. Metabolitos identificados en el extracto SFE, utilizando HS-SPME, correspondientes al perfil cromatográfico de la **Figura 20**.

| N° Pico ^a | Nombre | IRL ^b | | | TIPO | Área relativa (%) |
|----------------------|---------------------------------------|------------------|----------|--|------|-------------------|
| | | Columna DB-WAX | | | | |
| | | EXP | REF | | | |
| 1 | Dicloro metano | | | | SOL | |
| 2 | -- | | | | | 0.3 |
| 3 | α -Pineno | 1024 | 1025 [2] | | M | 1.0 |
| 4 | β -Pineno | 1109 | 1114 [3] | | M | 0.5 |
| 5 | Sabineno | 1121 | 1122 [2] | | M | 0.9 |
| 6 | α -Terpineno | 1246 | 1178 [2] | | M | 0.3 |
| 7 | p-Cimeno | 1269 | 1270 [2] | | M | 0.2 |
| 8 | 3Z-Hexenol | 1376 | 1371 [3] | | AA | 1.2 |
| 9 | 3-Octanol | 1386 | 1391 [2] | | AA | 3.5 |
| 10 | N.I. (m/z 207) | | | | | 0.4 |
| 11 | 1-Octen-3-ol | 1441 | 1444 [2] | | AA | 18.2 |
| 12 | α -Cubebeno | 1467 | 1472 [2] | | S | 2.5 |
| 13 | α -Copaene | 1504 | 1491 [2] | | S | 6.4 |
| 14 | β -Bourboneno | 1531 | 1523 [2] | | S | 3.9 |
| 15 | β -Cubebeno | 1546 | 1541 [2] | | S | 1.6 |
| 16 | <i>trans</i> -(β)-Cariofileno | 1589 | 1588 [2] | | S | 34.7 |
| 17 | β -Copaeno | 1607 | 1580 [2] | | S | 1.1 |
| 18 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 1662 | 1662 [2] | | S | 0.6 |
| 19 | -- | | | | | 0.3 |
| 20 | α -Muuroleno | 1699 | 1723 [2] | | S | 0.4 |
| 21 | epi-Biciclosesquifelandreno | 1731 | 1748 [3] | | S | 0.9 |
| 22 | δ -Cadineno | 1766 | 1755 [2] | | S | 2.0 |
| 23 | γ -Cadineno | 1772 | 1763 [2] | | S | 0.4 |
| 24 | <i>trans-cis</i> -sabinol | 1781 | 1800 [2] | | MO | 0.5 |
| 25 | -- | | | | | 0.9 |
| 26 | <i>cis</i> -Cadina-1(2),4-dieno | 1794 | 1788 [2] | | S | 1.3 |
| 27 | <i>cis</i> -calameneno | 1843 | 1834 [2] | | S | 0.8 |
| 28 | epi-Cubebol | 1894 | 1900 [2] | | SO | 0.5 |
| 29 | - | | | | | 2.8 |
| 30 | C15H26O | 1946 | | | SO | 1.3 |
| 31 | - | | | | | 0.8 |
| 32 | óxido de Cariofileno | 2003 | 1986 [2] | | SO | 4.3 |
| 33 | - | | | | | 0.3 |
| 34 | N.I. (m/z 220) | | | | | 1.1 |
| 35 | N.I. (m/z 220) | | | | | 1.2 |
| 36 | - | | | | | 0.4 |
| 37 | N.I. (m/z 281) | | | | | 1.9 |
| 38 | N.I. (m/z 281) | | | | | 0.4 |

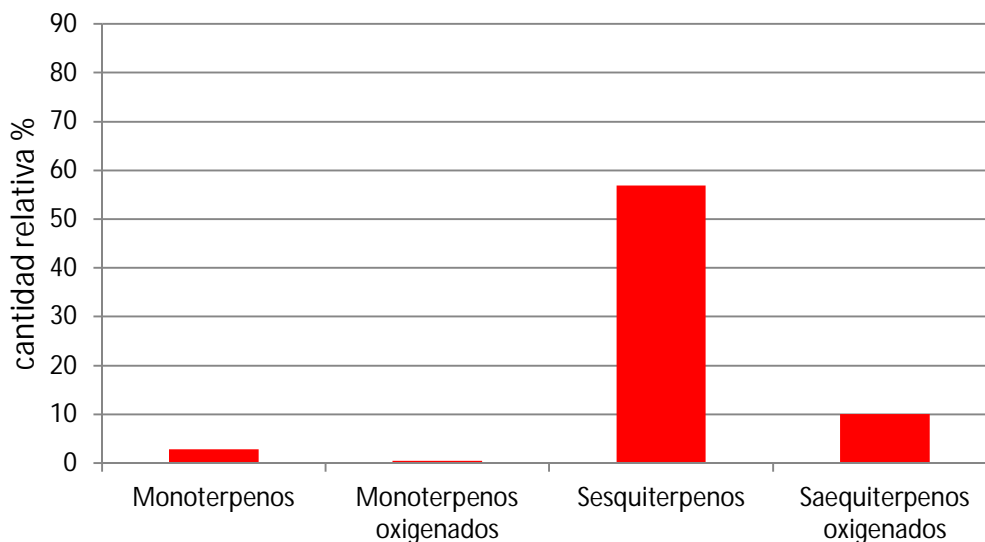
^a: Número de pico en la **Figura 20**.

^b: Índices de retención lineales, experimental y referencia.

- 0) ADAMS, P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th edición, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 2004.
- 1) BABUSHOK, V. I., LINSTROM, P. J., ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. J. Phys. Chem. 2011. 40:4. pp. 1-47.
- 2) NIST Mass Spectrometry Data Center. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

En la **Figura 21**, se reportan las cantidades relativas de las familias de metabolitos determinados en el análisis, encontrando como componentes principales la familia de los sesquiterpenos (56.8%), con contribuciones altas de *trans*- β -cariofileno (34.68%), α -copaeno (6.36%), y los sesquiterpenos oxigenados (10%), con contribuciones altas de óxido de cariofileno (4.26%).

Figura 22. Variación de las familias de compuestos químicos presentes en el AE destilado por SFE de partes aéreas frescas de *plectranthus* sp., muestreo realizado por HS-SPME.



4.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS DIRECTAMENTE DE LAS HOJAS FRESCAS POR HS-SPME

Se detectaron 41 picos cromatográficos, ver **Figura 22**, de los cuales se identificaron 37 metabolitos secundarios, que corresponden al 97% del área cromatográfica total, se encuentran con un área relativa > 2% los siguientes metabolitos:

trans- β -cariofileno (29.37%), germacreno D (12.7%), α -tujeno (10.13%), α -pineno (6%), 1-octeno-3-ol (5%), sabineno (4.74%), α -copaeno (4.71%), β -cubebeno (3.88%), β -bourboneno (2.74%), *trans*- β -ocimeno (2.46%), β -pineno (2.43%) y α -humuleno (2%), correspondientes al 86% del área cromatográfica total.

Figura 23. Perfil cromatográfico de hojas frescas de *plectranthus* sp, obtenido por HS-SPME, Columna DB-WAX, *Split* 1:30, MSD (70 Ev, IE).

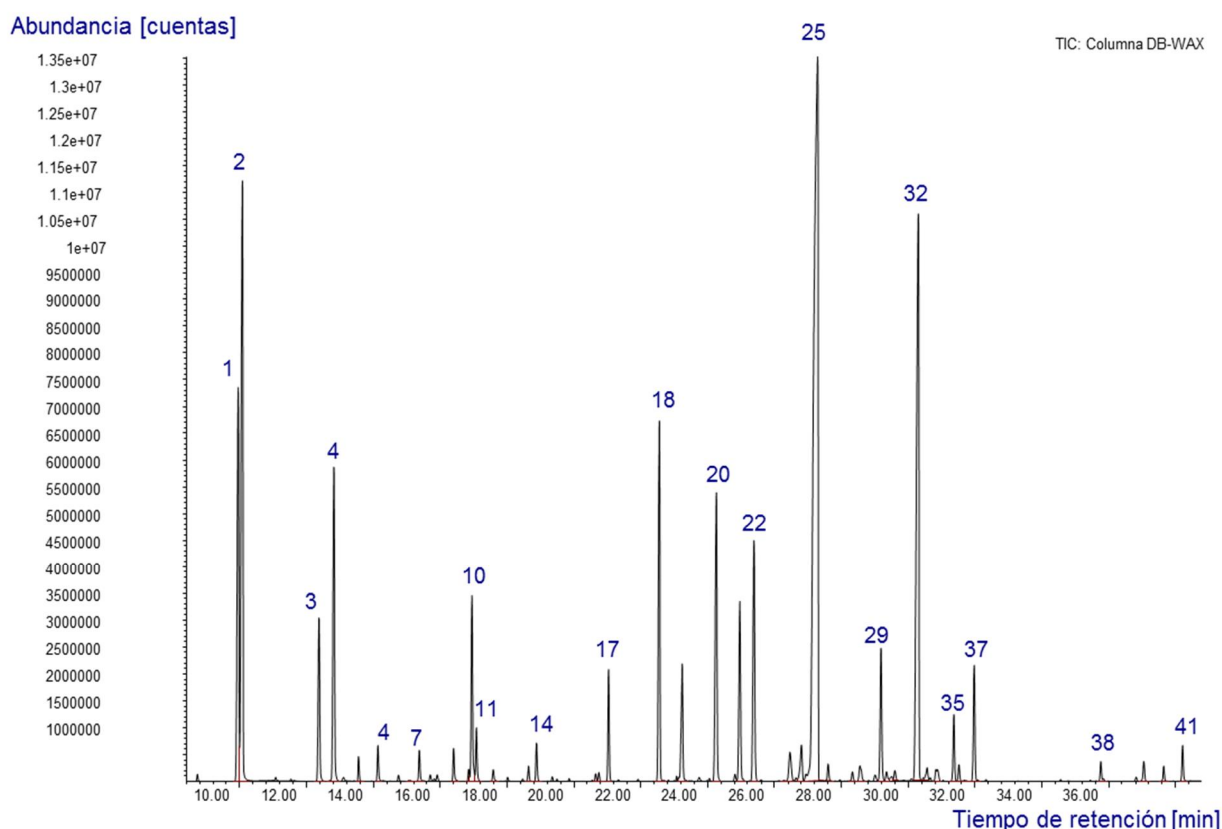


Tabla 12. Metabolitos identificados en hojas frescas de *plectranthus* sp.

| N° Pico ^a | Nombre | IRL ^b | | TIPO | Área relativa (%) |
|----------------------|---------------------------------------|------------------|----------|------|----------------------|
| | | DB-WAX | | | |
| | | EXP | REF | | |
| 1 | α -Pinoeno | 1024 | 1025 [2] | M | 6.04 |
| 2 | α -Tujeno | 1028 | 1026 [2] | M | 10.13 |
| 3 | β -Pinoeno | 1103 | 1114 [3] | M | 2.43 |
| 4 | Sabineno | 1117 | 1122 [2] | M | 4.74 |
| 5 | -- | 1140 | | | 0.25 |
| 6 | Mirceno | 1158 | 1160 [2] | M | 0.43 |
| 7 | Limoneno | 1197 | 1198 [2] | M | 0.41 |
| 8 | Z- β -Ocimeno | 1230 | 1234 [2] | M | 0.42 |
| 9 | γ -Terpineno | 1244 | 1245 [2] | M | 0.14 |
| 10 | <i>trans</i> - β -Ocimeno | 1248 | 1250 [2] | M | 2.46 |
| 11 | 3-Octanona | 1252 | 1254 [2] | | 0.68 |
| 12 | p-Cimeno | 1268 | 1270 [2] | M | 0.16 |
| 13 | -- | | | | 0.19 |
| 14 | <i>trans</i> -3-Hexenil acetato | 1311 | 1315 [2] | | 0.50 |
| 15 | 1-Octen-3-il acetato | 1373 | 1379 [2] | | 0.10 |
| 16 | 3Z-Hexenol | 1376 | 1371 [3] | | 0.12 |
| 17 | 3-Octanol | 1386 | 1391 [2] | | 1.35 |
| 18 | 1-Octen-3-ol | 1442 | 1444 [2] | | 5.04 |
| 19 | α -Cubebeno | 1467 | 1472 [2] | S | 1.85 |
| 20 | α -Copaene | 1505 | 1491 [2] | S | 4.71 |
| 21 | β -Bourboneno | 1531 | 1523 [2] | S | 2.74 |
| 22 | β -Cubebeno | 1547 | 1541 [2] | S | 3.88 |
| 23 | β -Copaeno | 1588 | 1580 [2] | S | 0.66 |
| 24 | β -Elemeno | 1601 | 1590 [2] | S | 0.69 |
| 25 | <i>trans</i> -(β)-Cariofileno | 1618 | 1616 [3] | S | 29.37 |
| 26 | β -Longipineno | 1629 | | | 0.24 |
| 27 | Germacreno D | 1655 | 1708 [2] | S | 0.14 |
| 28 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 1663 | 1649 [2] | S | 0.36 |
| 29 | α -Humuleno | 1685 | 1666 [2] | S | 2.03 |
| 30 | γ -Muuroleno | 1691 | 1690 [2] | S | 0.16 |
| 31 | γ -Amorfeno | 1700 | 1693 [2] | S | 0.18 |
| 32 | Germacreno D | 1726 | 1708 [2] | S | 12.70 |
| 33 | Premnaspirodieno | 1736 | | S | 0.24 |
| 34 | Biciclogermacreno | 1746 | 1734 [2] | S | 0.34 |
| 35 | N.I. (m/z 204) | 1767 | | | 0.91 |
| 36 | γ -Cadineno | 1773 | 1763 [2] | S | 0.23 |
| 37 | N.I. (m/z 204) | 1790 | | | 1.71 |
| 38 | 10-epi-Cubebol | 1946 | | SO | 0.29 |

| | | | | | |
|----|-------------------------|------|----------|----|------|
| 39 | Óxido de cariofileno | 2003 | 1986 [2] | SO | 0.28 |
| 40 | <i>trans</i> -Nerolidol | 2031 | 2036 [2] | SO | 0.19 |
| 41 | Germacreno D-4-ol | 2057 | 2057 [2] | SO | 0.48 |

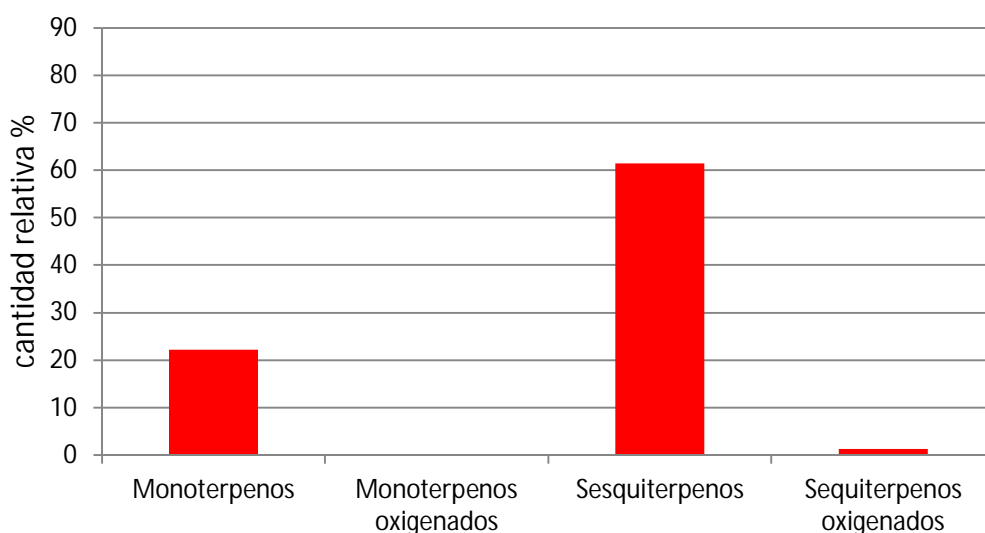
^a: Número de pico en la **Figura 20**.

^b: Índices de retención lineales, experimental y referencia.

- 0) ADAMS, P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th edición, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 2004.
- 1) BABUSHOK, V. I., LINSTROM, P. J., ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. J. Phys. Chem. 2011. 40:4. pp. 1-47.
- 2) NIST Mass Spectrometry Data Center. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

En la **Figura 23**, se reportan las cantidades relativas de las familias de metabolitos determinados en el análisis, encontrando como componentes principales la familia de los sesquiterpenos (61.43%), con contribuciones altas de *trans*- β -cariofileno (29.37%), germacreno D (12.7%), y monoterpenos (22.25%), con contribuciones altas de α -tujeno (10.13%), α -pineno (6%), sabineno (4.74%), α -copaeno (4.71%) como las familias de metabolitos presentes en mayor proporción en la determinación.

Figura 24. Variación de las familias de compuestos químicos presentes en el AE destilado por MWHF de partes aéreas frescas de *Plectranthus* sp., muestreo realizado por HS-SPME.



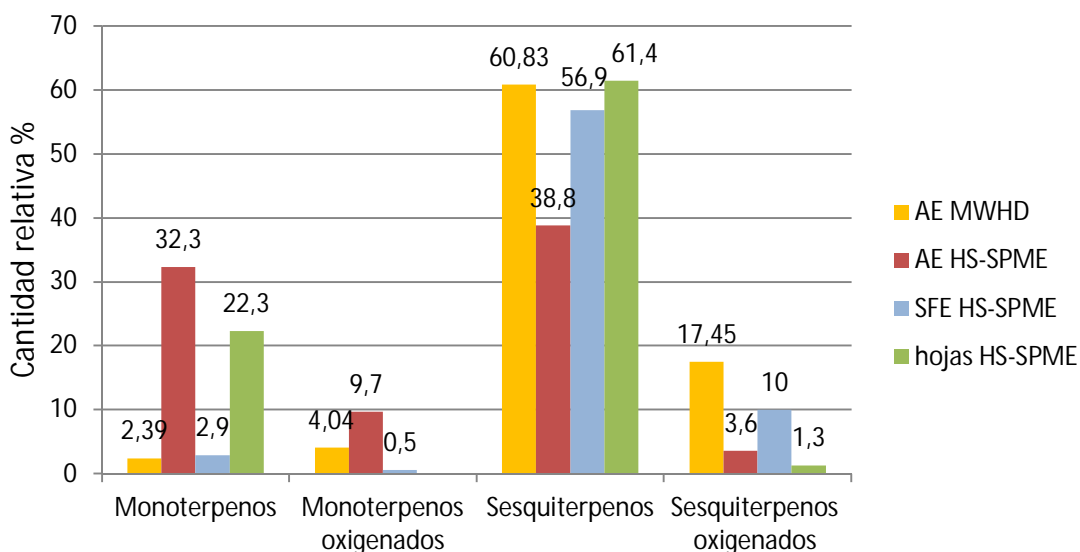
4.5. COMPARACIÓN DE LAS FAMILIAS DE METABOLITOS Y METABOLITOS MAYORITARIOS DETERMINADOS EN FUNCIÓN DE LA TÉCNICA DE AISLAMIENTO

Como se puede observar en la **Figura 24**, la familia de metabolitos que se encuentra en mayor proporción en función del método de aislamiento son los sesquiterpenos, con cantidades relativas de AE MWHD (60%), SFE HS-SPME (57%) y hojas HS-SPME (61%), para la muestra de AE HS-SPME (40%). Se presenta para la familia de los monoterpenos cantidades relativas alrededor del 30% para la muestra AE HS-SPME y del 20% para la muestra hojas HS-SPME, debido principalmente a su mayor volatilidad, son retenidos y concentrados en la fibra.

En la **Figura 25**, se presentan los metabolitos presentes en mayor cantidad relativa en función del método de aislamiento y muestreo, se encontró como componente mayoritario en todas las técnicas de destilación y extracción utilizadas el sesquiterpeno *trans*- β -cariofileno [E-BCF] en las siguientes cantidades relativas: **AE MWHD 27%, AE HS-SPME 14.6%, SFE HS-SPME 34.68% y hojas frescas HS-SPME 29.37%**.

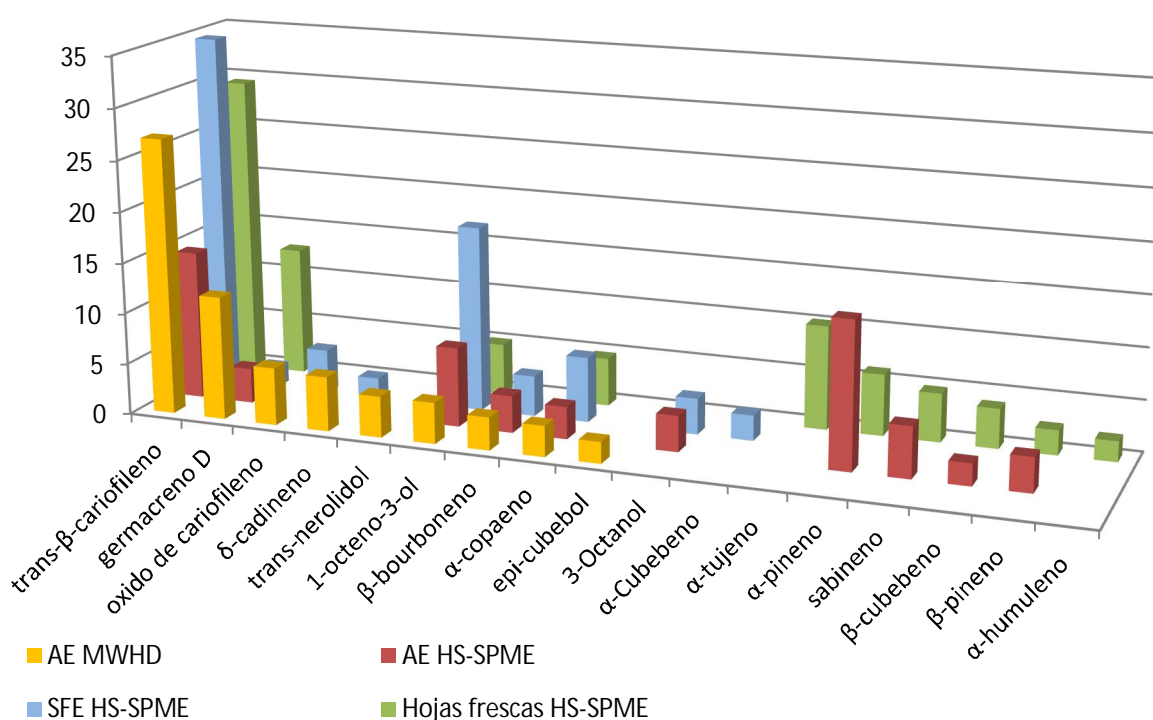
El [E-BCF], **Figura 26**, es un sesquiterpeno bicíclico natural, componente mayoritario de muchos AE, entre los más destacados el aceite de clavo de olor (*zygium aromaticum*) [59], del aceite esencial de cáñamo (*Cannabis sativa*) [60,61], de romero (*Rosmarinus officinalis*) [62], lúpulo (*humulus lupulus*) [63], orégano (*Origanum vulgare*) [63,65], canela (*Cinnamomum* spp.) y pimienta negra (*Pipiper nigrum*) [66,67].

Figura 25. Variación de las cantidades relativas de las familias de metabolitos secundarios determinados en función de su método de extracción.



En las plantas el [E-BCF] se encuentra generalmente con pequeñas cantidades de sus isómeros *cis*- β -cariofileno o isocariofileno y α -humuleno, un isómero de anillo abierto, también se encuentra con su producto de oxidación (óxido de cariofileno). El [E-BCF] se destaca por tener un anillo ciclobutano en su estructura, que es una rareza en la naturaleza ver **Figura 26**.

Figura 26. Composición porcentual de los compuestos mayoritarios detectados en el AE, extracto SFE y hojas frescas de *Plectranthus* sp.

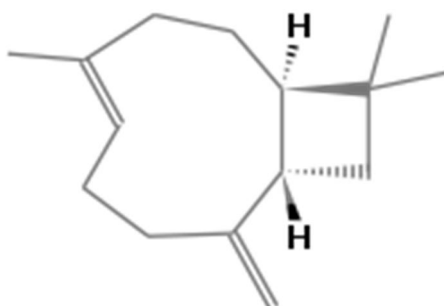


El [E-BCF] es uno de los metabolitos que contribuyen al sabor picante de la pimienta negra. En un estudio realizado por Jürg Gertsch y colaboradores, del Instituto Federal Suizo de Tecnología (ETH Zurich), el [E-BCF] demostró ser agonista selectivo del receptor cannabinoide de tipo 2 (CB₂) y ejercer efectos significativos antiinflamatorios en ratones [68]. Recientemente se han reportado actividad anticonceptiva [69], neuroprotectora [70], ansiolítica, antidepresiva [71] y antialcohólica [72].

Debido a su débil aroma y sabor es comercialmente utilizado como un aditivo de alimentos y cosméticos [73], aprobado por la FDA y se ingiere con la comida

diaria. Si este compuesto es capaz de modular los procesos inflamatorios en los seres humanos a través del sistema endocannabinoide es aún desconocido. El [E-BCF] no se une al receptor cannabinoide de tipo-1 expresado en el centro (CB₁) y por lo tanto no ejerce efectos psicomiméticos [68].

Figura 27. Estructura química del *trans*- β -Cariofileno.

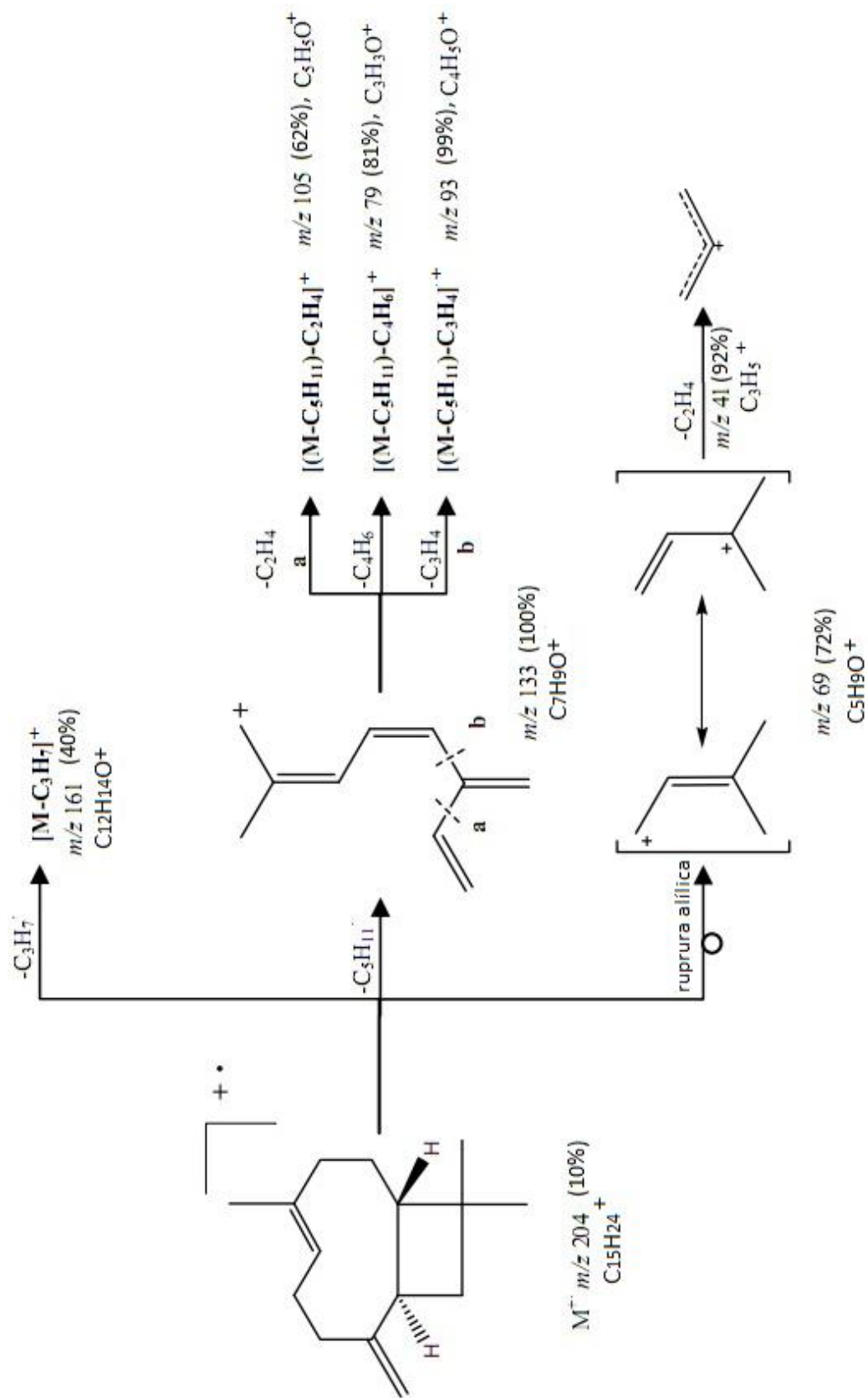


Fuente: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=87-44-5>

La primera síntesis total de cariofileno fue realizada en 1964 por EJ Corey y era considerada una de las manifestaciones clásicas de las posibilidades de la química orgánica sintética en el momento [74]. Las posibles rutas de ionización disociativa se presentan en la **Figura 27**.

El ion molecular del *trans*- β -Cariofileno en m/z 204 presenta una intensidad de (10%), presenta una fragmentación abundante, para llegar al ion pico de base en m/z 133 (100%), el ion molecular sufre reordenamientos del esqueleto y de hidrogeno. Con la sucesiva eliminación de moléculas neutras a partir de este fragmento, producen los iones en m/z 79 (81%), 93 (99%) y 105 (62%). La ruptura alílica del ión molecular produce iones en m/z 69 (72%) y 41 (92%).

Figura 28. Posibles rutas de fragmentación del *trans*- β -cariofileno.



5. CONCLUSIONES

Se determinó la composición química usando criterios cromatográficos (t_R , t_R patrón de hidrocarburos, I_k en columnas apolar y polar) y espectroscópicos (espectros masas, con EI de 70 eV) del AE, extracto SFE y fracción volátil de hojas frescas de *Plectranthus* sp.

Se obtuvo el AE, extracto SFE y fracción volátil por HS-SPME del AE, extracto SFE y hojas frescas de *Plectranthus* sp., los metabolitos volátiles fueron identificados en las diferentes muestras en los siguientes porcentajes del área cromatográfica total AE (92%), AE HS-SPME (93%), SFE HS-SPME (88%) y hojas HS-SPME (97%), resultados satisfactorios de acuerdo a los objetivos planteados en la investigación.

El AE, extracto SFE y fracción volátil se caracterizaron por estar constituidos principalmente por sesquiterpenos, representados en el AE (61%), AE HS-SPME (39%), SFE HS-SPME (57%) Y hojas HS-SPME (61%) del área cromatográfica total.

El sesquiterpeno *trans*- β -cariofileno fue el componente mayoritario determinado en el análisis de las muestras, encontrado en los siguientes porcentajes, AE (27%) y (14%) HS-SPME, extracto SFE (34%) y fracción volátil de hojas frescas (29%), representando el principal componente del AE, seguido por el germacreno D (12%).

Las familias de metabolitos secundarios determinados en función de la técnica de extracción, presentaron diferentes distribuciones, el AE analizado, realizando inyección directa presentó sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados como familias mayoritarias (61%) y (17%) respectivamente, y las contribuciones de las familias de monoterpenos y monoterpenos oxigenados llegan solo al 6%. Mientras que para el AE analizado por HS-SPME, presentó contribuciones mayores de los monoterpenos y monoterpenos oxigenados con porcentajes de (32%) y (10%) respectivamente, esto se debe a la mayor selectividad de la fibra por metabolitos más volátiles y de menor tamaño.

Del análisis de la fracción volátil por HS-SPME del AE y hojas frescas se observó una mayor contribución de los monoterpenos (32%) y (22%) respectivamente, representados por α -pineno, sabineno, β -cubebeno, α -humuleno y β -pineno, compuestos presentes a nivel de trazas en el AE.

BIBLIOGRAFÍA

1. KARP, G. *Biología Celular y Molecular*, 5ª Ed. McGraw Hill/Interamericana de Mexico. **2009**. p.p. 207-209.
2. STERN, K.; JANSKY, S.; BIDLACK J. *Introductory Plant Biology*, 9ª Ed. McGraw Hill. **2003**. p.p. 4-5.
3. Hoffman A
4. STASHENKO, E. *Aceites Esenciales*. 1ª Ed, UIS. Colombia, **2009**. p.p. 13-20.
5. BANDONI, A. (Ed.) *Los recursos vegetales aromáticos en latino-América. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. 1ª Ed, Editorial U. Nacional de la Plata, la Plata, Argentina.; **2000**. p.p. 13-42, 168-172.
6. SARAC, N. and UGUR, A. Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsia J. Bio. Sci.*, **2007**. 1:28-34.
7. GIULIANI, C. And MALECI BINI, L. Insight into the structure and chemistry of glandular trichomes of Labiatae, with emphasis on subfamily Lamioideae. *Plant systematic and Evolution*, **2008**. 276:199-208.
8. OZKAN, M., Glandular and glandular hairs of *salvia recognita* Fisch. And Mey. (Lamiaceae) in Turkey. *Bangladesh Journal of Botany*, **2008**. 37:93-95.
9. VENKATESHAPPA, S.M.; et al. Potential Medicinal Plants of Lamiaceae *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences*, 3(1), June-August, **2013**, pp. 82-87.
10. FERNÁNDEZ, J. L. Estudios en Labiatae de Colombia I. Novedades en los géneros *Salvia* e *Hyptis*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **1995b**. 19: 469-480 pp.
11. JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F & DONOGHUE, M.J. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. 3rd Edition. Sinauer, Sunderland, Mass. **2007**.
12. SIERRA R.C.; GONZÁLEZ, V. L.; MARRERO, D.; RODRÍGUEZ, E. A. *Lamiaceae: una revisión sobre sus efectos neuro-farmacológicos y su*

- presencia en Cuba Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 44, No.1, enero-abril, **2013**.
- 13.** PEREZ, G.; VEGA, N.; FERNANDEZ, J. L. Studies on Colombian Labiatae lectins. Lamiales news-letter 6: **1998**. 6-7pp.
 - 14.** LUKHOB, C.; SIMMONDS, M.; PATON, A. Plectranthus: A review of ethnobotanical uses. J Ethnopharmacol. **2006**. 103 (1): 1-24.
 - 15.** RICE, L.J.; BRITS, G.J.; POTGIETER, C.J.; VAN STADEN, J. Plectranthus: A plant for the future?. South African Journal of Botany 77, **2011**. 947–959.
 - 16.** DELLAR, J.; COLE, M.; WATERMAN, P. Antimicrobial abietane diterpenoids from Plectranthus elegans. Phytochemistry. **1996**. 41 (3): 735-738.
 - 17.** KREUTNER, W.; CHAPMAN, R.; GULBENKIAN, A.; TOZZI, S. Bronchodilator and antiallergy activity of forskolin. Eur J Pharmacol. **1985**. 111 (1): 1-8.
 - 18.** SIMOES, M.; RIJO P.; DUARTE, A.; BARBOSA, D.; MATIAS, D.; DELGADO, J.; CIRILO, N. y RODRÍGUEZ B. Two new diterpenoids from Plectranthus species. Phytochem Lett. **2010**. 3: 221–225.
 - 19.** GASPAR, C.; SIMOES, M.; DUARTE, A.; RODRÍGUEZ, B. Labdane and kaurane derivatives from Plectranthus fruticosus. J Nat Prod. **2003**. 66 (4): 491-496.
 - 20.** RIJO P, GASPAR-MARQUES C, SIMOES F, DUARTE A, APREDA-RIJAS M, CANO F, RODRIQUEZ B. Neoclerodane and labdane diterpenoids from Plectranthus ornatus. J Nat Prod. **2002**; 65 (10): 1387-1390.
 - 21.** VELASCO J, ROJAS L, DÍAZ T, USUBILLAGA A. Chemical Composition and Antibacterial Activity Against Enteric Pathogens of the Essential Oil of Coleus Amboinicus Lour. JEOP. **2009**; 12 (4): 453-461.
 - 22.** RABE T, VAN STADEN J. Screening of Plectranthus species for antibacterial activity. J S African Bot. **1998**; 64 (1): 62-65.
 - 23.** BORGES LC, CAMPOS C, SOTO-BLANCO B. Anticonvulsant Activity of Extracts of Plectranthus barbatus Leaves in Mice. Evid Based Complement Alternat Med. **2012**.

24. GRAYER, R.J., ECKERT, M.R., LEVER, A., VEITCH, N.C., KITE, G.C., PATON, A.J., Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2010**. 38, 335–341.
25. PRUDENT D, PERINEAU F, BESSIERE J, MICHEL G, BACCOU J. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.): evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *J Essent Oil Res.* **1995**; 7 (2): 165-173.
26. GRAYER, RJ, ECKERT M, LEVER A, VEITCH N, KITE G, PATON A. Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*. *Biochem Syst Ecol.* **2010**; 38: 335–34.
27. IGNACIMUTHU S, AYYANAR M, SANKARA-SIVARAMAN S. Ethnobotanical investigations among tribes in Madurai District of Tamil Nadu (India). *J Ethnobiol Ethnomed.* **2006**; 2 (25): 1-17.
28. GIL-OTAIZA R, CARMONA, J. *Herbolario tradicional venezolano*. Consejo de publicaciones, Universidad de Los Andes. Mérida – Venezuela; **2005**. p 160-161.
29. MENENDEZ, R.; PAVÓN, V. *Revista cubana de plantas medicinales.* **1999**; 3(3):110-115.
30. STASHENKO, E.; MARTÍNEZ, J. (editores) *Plantas aromáticas y aceites esenciales: estudio y aplicaciones*. 1ª Ed. Bucaramanga, C.; **2012**. p.p. 111-112.
31. Sacha Baginsky and Alisdair R. Fernie ED. *Plant Systems Biology*
32. TAIZ, L.; ZEIGER E. *Plant Physiology*, 3rd ed Sunderland; Sinauer Associates. **2002**. p.p.24-27.
33. BASER K. y BUCHBAUER G. *Handbook of essential oils. Science, technology and applications*. CRC press. Taylor and Francis group. Boca Raton, **2010**. pp. 39-81, 121-183
34. STASHENKO, E.; MARTÍNEZ, J. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis GC-MS. *Sciencia Chromatographica.* **2011**. 3. 1. p.p. 25-48.
35. LLINAS, M. Estudio de la composición química de los extractos y aceites esenciales de *Hiptys* sp., y *Lippia Alba* obtenidos por diferentes técnicas de

- extracción, Tesis pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial Santander, **2011**.
- 36.** GÓMEZ, G. Análisis de la composición química y de la actividad biológica de los aceites esenciales de 2 quimiotipos de *Lippia alba* (mill.), en función de las condiciones de extracción y secado, Tesis pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial Santander, **2007**.
 - 37.** PAWLISZYN, J. Handbook of Solid Phase Microextraction. 1ª Ed. Elsevier Inc. New York.; **2012**. p.p. 1-5.
 - 38.** WERCINSKI, S.; ANN, S. Solid Phase Microextraction: A Practical Guide. CRC Press, NY, USA. **1999**. p.p. 1-4.
 - 39.** JENNINGS, W.; MITTFELDELT, E.; STRIMPLE, P. Analytical gas chromatography. 2ª Ed. San Diego: Academic Press, **1997**. p.p. 2-6.
 - 40.** SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, J.; CROUCH, S. Fundamentos de Química Analítica. 8ª Ed. Thomson, México. **2005**. p.p. 959-961.
 - 41.** WATSON, J.; SPARKMAN, O. Introduction to Mass Spectrometry Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. 4ª Ed. Wiley, NY, USA. **2007**. p.p. 3-4.
 - 42.** HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry Principles and Applications. 2ª Ed. Wiley, USA. **2002**. p.p. 1-4.
 - 43.** WINK ME. Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology, vol. 3, CRC Press, Boca Raton. **1999**.
 - 44.** FIRN R, JONES C. Natural products a simple model to explain chemical diversity. NatProd Rep **2003**. 20: 382–391.
 - 45.** FIRN R, JONES C. The evolution of secondary metabolism a unifying model. Mol Microbiol **2000**. 37: 989–994
 - 46.** STEVENS, P.F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008 [and more or less continuously updated since]
 - 47.** LEON, J. Botánica de los cultivos tropicales. 3ª Ed. IICA, San José, C.R.; **2000**. p.p. 344-346.
 - 48.** MENENDEZ, R.; PAVÓN, V. Revista cubana de plantas medicinales. **1999**; 3(3):110-115.

49. Consultado el 10 noviembre de 2015
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aris.1440390110/pdf>
50. MICHAN, L; MUÑOZ I. Inv Ed Med. Cienciometría para ciencias médicas: defniciones, aplicaciones y perspectivas. **2013**;2(6):100-106.
51. Consultado el 10 noviembre de 2015 Informetría, bibliometría y cienciometría: aspectos teórico-prácticos. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/aci/vol10_4_02/aci040402.htm.
52. BANDEIRA, J.M.; BARBOSA, F.F.; BARBOSA, L.M.P.; RODRIGUES, I.C.S.; BACARIN, M.A.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus* en Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.13, n.2, **2011**. p.p.157-164.
53. GONG, H.Y.; LIUD, WH.; LVA, G.Y.; ZHOU, X. Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. Revista Brasileira Farmacognosia. Vol. 24. **2014**. p.p. 25-32.
54. Papel de la informetría y de la cienciometría y su perspectiva nacional e internacional. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol9_s_01/sci06100.htm. Consultado el 10 de noviembre de 2015.
55. GASPARD-MARQUES, C., RIJO, P., SIMÕES, M.F., DUARTE, M.A., RODRIGUEZ, B. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine* **2006**. 13, 267–271.
56. COOK, F.E.M., Economic Botany Data Collection Standard. International Working Group on Taxonomic Databases for Plant Sciences (TDWG), Royal Botanic Gardens Kew, UK. **1995**.
57. MANRIQUE, D. L. Estudio de la composición química de los metabolitos secundarios de *Satureja viminea* L., obtenidos por diferentes métodos de extracción y determinación de su capacidad antioxidante, Tesis pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial Santander, **2014**.
58. STASHENKO, E.E.; MARTÍNES, J.R.; CÁRDENAS, S.; SAAVEDRA, R.; DURÁN, D.C. GC-MS stdy of compounds isolated from *coffea arabica*

- flowers by different extraction techniques. *Journal of Separation Science*. **2013**. doi: 10.1002/201300458.
- 59.** ALMA, M. et. al. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove. *BioResources*,. 2 (2): 265–269.
- 60.** HENDRIKS H, MALINGRE T, BATTERMANN S, BOSS R. Mono and sesquiterpene hydrocarbons of the essential oil of *Cannabis sativa*. *Phytochemistry* **1975**. 14:814–815.
- 61.** MEDIAVILLA, V; STEINEMANN, S. Essential oil of *Cannabis sativa* L. strains. International Hemp Association. Retrieved 11 July **2008**.
- 62.** JAMSHIDI, R.; AFZALI, Z.; AFZALI, D. Chemical Composition of Hydrodistillation Essential Oil of Rosemary in Different Origins in Iran and Comparison with Other Countries (online). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* (Pakistan: IDOSI Publications), **2009**. 5 (1): 78–81. Disponible en: URL: <http://www.pnas.org/content/105/26/9099.full.pdf?with-ds=yes>
- 63.** BERNOTIENĖ, G.; NIVINSKIENĖ, O.; BUTKIENĖ, R.; MOCKUTĖ, D. ("Chemical composition of essential oils of hops (*Humulus lupulus* L.) growing wild in Aukštaitija") (online). *Chemija*. 2 (Vilnius, Lithuania: Lithuanian Academy of Sciences) **2004**. 4: 31–36.
- 64.** CALVO-IRABIEN, L. M.; YAM-PUC, J. A.; DZIB, G.; ESCALANTE-EROSA, F.; PEÑA-RODRIGUEZ, L. M. Effect of Postharvest Drying on the Composition of Mexican Oregano (*Lippia graveolens*) Essential Oil. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* (London, UK: Taylor & Francis) (July **2009**. 15 (3): 281–287.
- 65.** The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in vilnius district (Lithuania) *Phytochemistry*. **2001** May;57(1):65-9.
- 66.** JAYAPRAKASHA GK.; JAGAN MOHAN RAO L.; SAKARIAH KK. Volatile constituents from *Cinnamomum zeylanicum* fruit stalks and their antioxidant activities. *J Agric Food Chem* **2003**. 51:4344–4348.
- 67.** ORAV A, STULOVA I, KAILAS T, MU" U" RISEPP M. Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. *J Agric Food Chem* **2004**. 52:2582–2586.

68. GERTSCH J, LEONTI M, RADUNER S; et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**. 105 (26): 9099–104.
69. KATSUYAMA S., MIZOGUCHI H., KUWAHATA H.; et al. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. *European journal of pain* **2013**. 17 (5): 664–675.
70. GUIMARÃES-SANTOS, A. "Copaiba Oil-Resin Treatment Is Neuroprotective and Reduces Neutrophil Recruitment and Microglia Activation after Motor Cortex Excitotoxic Injury". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**: 1–9.
71. BAHI A.; et. al. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice." *Physiology & Behavior* **2014**. 135: 119–124.
72. AL MANSOURI, S.; OJHA, S.; AL MAAMARI, E.; AL AMERI, M. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. **2014**. 124C:260-268.
73. SKOLD, M.; KARLBERG, A.; MATURA M. The fragrance chemical betacaryophyllene-air oxidation and skin sensitization. *Food Chem Toxicol* **2006**. 44:538–545.
74. COREY, E.; MITRA, R.; UDA, H.; Total Synthesis of d,l-Caryophyllene and d,l-Isocaryophyllene. *Journal of the American Chemical Society* **1964**. 86 (3): 485–492.