

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

**Comparación de los metabolitos secundarios aislados de *Salvia aratocensis*
(Lamiaceae), obtenidos por diferentes métodos de extracción y en función del estado
fenológico de la planta**

Anderson Leonardo Paipa Perez

Trabajo de grado para optar por el título de químico

Directora

Elena Stashenko, Ph.D. en química

Codirectores

Jairo René Martínez, Ph.D. en química

Yuri Córdoba Campo, M. Sc. en química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2017

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Dedicatoria

A mis raíces y suelo, a quienes me han dado la vida entregándome sus mejores frutos, a mis padres: Edilberto y Eida.

Al cómplice, al soporte, al Sancho de este Quijote, al compañero de viaje incansable, a mi hermano: Sebastián.

Al recuerdo perenne de una sonrisa inocente, a mi hermano: Cristian.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Agradecimientos

A mi familia, por su apoyo constante, por su amor incondicional, por enseñarme a persistir.

A la profesora Elena, por sus enseñanzas, por su apoyo, por convertirse en ejemplo.

Al profesor Jairo, por su acompañamiento, colaboración y por sus enseñanzas.

A Karina Andrea, por estar junto a mi incondicionalmente, por mostrarme los colores con los que está pintado su mundo.

A mis compañeros y amigos del grupo CENIVAM, por su compañía y sus consejos; fueron vitales para el desarrollo del proyecto.

A mis amigos de universidad, por ser aire refrescante, por ser compañeros de viaje solidarios, por enseñarme el valor de la amistad.

A la Universidad Industrial de Santander, por permitirme desarrollar mis aptitudes profesionales y mi conciencia social.

Tabla de Contenido

Introducción	22
1. Marco Teórico.....	25
1.1 Salvia aratocensis.....	25
1.2. Metabolitos secundarios.....	26
1.2.1. Terpenos.....	26
1.2.2. Flavonoides.....	34
1.2.3. Compuestos nitrogenados o alcaloides	36
1.2.4. Glicósidos.	36
1.3. Aceites esenciales	37
1.4. Extractos vegetales.....	38
1.5. Métodos de extracción.....	38
1.5.1. Hidrodestilación asistida por microondas.....	38
1.5.2. Extracción con fluido supercrítico.....	39
1.5.3. Extracción con solvente	39
1.6. Análisis instrumental	39
1.6.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	39
1.6.2. Detector de ionización en llama.....	41
1.6.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	42
1.6.4. Espectrómetro de masas con detector Orbitrap	43

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

1.7. Actividad antioxidante	44
1.7.1. Especies reactivas de oxígeno.....	44
1.7.2. Antioxidantes	45
1.7.3. Capacidad de absorción del radical de oxígeno	46
1.7.4. Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	48
2. Cienciometría.....	50
3. Desarrollo experimental.....	55
3.1. Reactivos, solventes, materiales y equipos	56
3.2. Identificación botánica.....	57
3.3. Propagación del material vegetal.....	58
3.4. Recolección del material vegetal	58
3.5. Secado del material vegetal	58
3.6. Picado y tamizado del material vegetal	59
3.7. Extracción de los metabolitos secundarios	59
3.7.1. Obtención del aceite esencial.....	59
3.7.2. Obtención de extractos.....	60
3.8. Análisis cromatográfico	62
3.8.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	62
3.8.2. Cromatografía de gases con detector de ionización en llama.....	64

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

3.8.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas Orbitrap con interfaz de electronebulización.	65
3.9. Evaluación de la capacidad antioxidante	66
3.9.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS+·	67
3.9.2. Capacidad de absorción de los radicales de oxígeno	68
4. Resultados y discusión	69
4.1. Secado del material vegetal	69
4.2. Extracción de los aceites esenciales.....	70
4.3. Caracterización química de los aceites esenciales de <i>S. aratocensis</i>	71
4.3.1 Análisis del espectro de masas del compuesto mayoritario.....	79
4.4 Análisis comparativo de la composición de los aceites esenciales de <i>S. aratocensis</i>	82
4.5. Extracción de los metabolitos secundarios de <i>S. aratocensis</i> con mezclas hidroalcohólicas	86
4.6. Caracterización química de los extractos de <i>S. aratocensis</i> obtenidos con solventes hidroalcohólicos.....	91
4.7. Caracterización química de los extractos de <i>S. aratocensis</i> obtenidos con CO ₂ supercrítico	107
4.8. Determinación de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales y extractos aislados de <i>S. aratocensis</i>	111
5. Conclusiones	114
6. Divulgación de resultados.....	117
7. Recomendaciones	118

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Bibliografía 119

Lista de Figuras

Figura 1. A. Planta de <i>S. aratocensis</i> en su hábitat natural. B. Inflorescencias y C. Hoja individual.	25
Figura 2. Unión “cabeza-cola” de las unidades del isopreno.....	27
Figura 3. Biosíntesis de los bloques de construcción de los terpenos mediante la ruta del mevalonato. Dewick, P. (2009). Mevalonate pathway. [Figura]. Tomado de Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition.	29
Figura 4. Biosíntesis de los bloques de construcción de los terpenos mediante la ruta del fosfato de metileritrilo. Dewick, P. (2009). Methylerythritol Phosphate pathway. [Figura]. Tomado de Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition.	31
Figura 5. Formación del pirofosfato de geranilo. Dewick, P. (2009). Synthesis of geranyl pyrophosphate. [Figura]. Tomado de Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition.....	31
Figura 6. Formación de pirofosfato de nerolidilo y trans,cis-FPP a partir de trans,trans-FPP. Dewick, P. (2009). Nerolidyl PP and FPP synthesis. [Figura]. Tomado de Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition.	33
Figura 7. Formación de los iones gualilo, eudesmilo y cariofilo a partir del catión cis,cis-farnesilo. Dewick, P. (2009). Guaiyl, Eudesmil and Caryophyllyl cations. [Figura]. Tomado de Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition.	33
Figura 8. Formación de los iones precursores amorfilo, cariotilo y cadinilo. Dewick, P. (2009). Cadinyl, Carityl and Amorfyl cations. [Figura]. Tomado de Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition.	34

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Figura 9. Estructura general de los flavonoides. Van Acker et al. (1996). Flavonoids. [Figura]. Tomado de Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology & Medicine. 20.	35
Figura 10. Biosíntesis de los flavonoides. Petrusa et al. (2013). Biosynthesis of flavonoids. [Figura]. Tomado de Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses. International Journal of Molecular Sciences. 14.	36
Figura 11. Mecanismo propuesto para el ensayo ORAC. A. Formación del radical peroxilo. B. Oxidación de la fluoresceína. C. Estabilización del radical peroxilo por la acción del antioxidante.....	47
Figura 12. Proceso de oxidación-reducción del ABTS en el ensayo de decoloración del catión-radical $ABTS^+$	49
Figura 13. Relación de publicaciones por año. Fecha de búsqueda: 5 de septiembre de 2017. Fuente: Scopus (Elsevier). Período de observación: 1996-2017. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“Salvia”)......	50
Figura 14. Relación de publicaciones, según el área de estudio. Fecha de búsqueda: 5 de septiembre de 2017. Fuente: Scopus (Elsevier). Período de observación: 1996-2017. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“salvia”)......	52
Figura 15. Esquema de la metodología general de trabajo	55
Figura 16. Equipo de extracción con fluido supercrítico: Thar SFE-2000-2-FMC50. CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 31 de octubre de 2017.....	61
Figura 17. Cromatógrafo de gases AT 6890 Plus acoplado a un detector selectivo de masas AT MSD 5973 Network. Fuente: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, 9 de septiembre de 2015.	63

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Figura 18. Cromatógrafo líquido UHPLC Dionex Ultimate 3000, acoplado a espectrómetro de masas Orbitrap Exactive Plus, con interfaz de electronebulización. CENIVAM, Laboratorio Alexander Makarov. UIS. Bucaramanga, 12 de junio de 2017.	66
Figura 19. Lector de microplacas Turner Biosystems Inc. Modulus TM II Microplate Multimode Reader. CENIVAM, UIS. Laboratorio J. J. Thomson. Bucaramanga, 17 de enero de 2017.....	67
Figura 20. Curva de secado de material vegetal de <i>S. aratocensis</i>	69
Figura 21. Perfil cromatográfico del AE de <i>S. aratocensis</i> obtenido de plantas en estado de prefloración. Columna DB-5MS, 60 m. Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).	75
Figura 22. Perfil cromatográfico del AE de <i>S. aratocensis</i> obtenido de plantas en estado de floración. Columna DB-5MS, 60 m. Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).	75
Figura 23. Perfil cromatográfico del AE de <i>S. aratocensis</i> obtenido de plantas en estado de postfloración. Columna DB-5MS, 60 m. Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).	76
Figura 24. Variaciones en la composición de compuestos sesquiterpénicos en el AE de <i>S. aratocensis</i> , en función del estado fenológico de las plantas.	77
Figura 25. Espectro de masas experimental del τ -cadinol (EI, 70 eV).	78
Figura 26. Espectro de masas reportado del τ -cadinol (EI, 70 eV). Adams, R. (2005). τ -cadinol Mass Spectrum. [Figura]. Tomado de Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. 4th Edition.	78
Figura 27. Ruta de fragmentación propuesta para el τ -cadinol (EI, 70 eV).	80
Figura 28. Gráfica de contribuciones de los constituyentes del AE a los componentes principales. A. 10-epi-Cubebol, γ -selineno, τ -cadinol, β -cedreno, trans- β -farneseno, α -cubebeno, trans- β -guaieno. B. Germacreno D, β -burboneno, trans-muurola-3,5-dieno. C. trans- β -Cariofileno, valenceno, α -humuleno, trans-dauca-4,7-dieno. D. Himachala-2,4-dieno, α -bisabolol, isoledeno,	

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

veleranona, β -elemeno, γ -cadineno. E. Germacreno A, α -neocalitropseno, trans-muuro-la-4,5-dieno..... 83

Figura 29. Gráfica de correlación de los AE de *S. aratocensis* obtenidos de plantas en los estados de prefloración, floración y post-floración y sus componentes químicos. A. 10-epi-Cubebol, γ -selineno, τ -cadinol, β -cedreno, trans- β -farneseno, α -cubebeno, trans- β -guaieno, B. Germacreno D, β -burboneno, trans-muuro-la-3,5-dieno. C. trans- β -Cariofileno, valenceno, α -humuleno, trans-dauca-4,7-dieno. D. Himachala-2,4-dieno, α -bisabolol, isoledeno, veleranona, β -elemeno, γ -cadineno. E. Germacreno A, α -neocalitropseno, trans-muuro-la-4,5-dieno. 85

Figura 30. Diagrama de Pareto: efecto sobre el observable de los factores e interacciones evaluados en el diseño experimental. A. Concentración de etanol en el solvente; B. Temperatura; C. Relación entre el material y el solvente; D. Tiempo. 89

Figura 31. Diagrama de superficie de contorno del diseño experimental para las extracciones hidroalcohólicas de *S. aratocensis*. AB, Interacción entre las variables: Concentración de etanol en el solvente y temperatura. AD. Interacción entre las variables: Concentración de etanol en el solvente y tiempo de extracción..... 90

Figura 32. Corriente iónica obtenida por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, del extracto hidroalcohólico de *S. aratocensis* aislado de plantas en el estado de floración. 93

Figura 33. Espectro de masas experimental de la salvigenina obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS con voltajes de capilar de 4 kV y de fragmentación en HCD de 30 eV..... 96

Figura 34. Ruta de fragmentación de la salvigenina, en el espectro de masas obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-MS con potencial de fragmentación en HCD de 30 eV. 97

Figura 35. Espectro de masas experimental de la cirsimaritina obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS con voltaje de fragmentación en HCD de 30 eV..... 100

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Figura 36. Posible ruta de fragmentación de la cirsimaritina obtenida por LC-ESI ⁽⁺⁾ -Orbitrap-MS con potencial de fragmentación en HCD de 30 eV.....	101
Figura 37. Espectro de masas experimental de la genisteína obtenido por LC-ESI ⁽⁺⁾ -Orbitrap-MS con voltaje de fragmentación en HCD de 30 eV.	105
Figura 38. Posible ruta de fragmentación de la genisteína obtenida por LC-ESI ⁽⁺⁾ -Orbitrap-MS con potencial de fragmentación en HCD de 30 eV.....	106
Figura 39. Corriente iónica extraída obtenida por LC-ESI ⁽⁺⁾ -Orbitrap-MS del extracto supercrítico de <i>S. aratocensis</i> (fracción 1) obtenido de plantas en el estado de floración.....	111

Lista de Tablas

Tabla 1. Taxonomía de la <i>Salvia aratocensis</i>	26
Tabla 2. Reactivos, solventes, materiales y equipos auxiliares.	56
Tabla 3. Identificación botánica.....	57
Tabla 4. Variables y niveles evaluados en el diseño factorial 2^4 para las extracciones hidroalcohólicas de <i>S. aratocensis</i>	62
Tabla 5. Rendimientos de extracción de los AE de <i>S. aratocensis</i> , recolectada en diferentes estados fenológicos.	70
Tabla 6. Composición de los AE de <i>S. aratocensis</i> obtenidos por MWHD de plantas en los estados de prefloración, floración y post-floración.....	72
Tabla 7. Compuestos mayoritarios presentes en los AE de <i>S. aratocensis</i> y sus actividades biológicas reportadas en la literatura.	81
Tabla 8. Resultados del diseño experimental propuesto para las extracciones hidroalcohólicas de <i>S. aratocensis</i>	86
Tabla 9. Análisis de varianza para los valores ORAC del diseño experimental.....	87
Tabla 10. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólicos de <i>S. aratocensis</i>	92
Tabla 11. Patrón de fragmentación de las polimetoxiflavonas identificadas en los extractos hidroalcohólicos de <i>S. aratocensis</i>	92
Tabla 12. Patrón de fragmentación de las polimetoxiflavonas identificadas en los extractos hidroalcohólicos de <i>S. aratocensis</i>	102
Tabla 13. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de <i>S. aratocensis</i> obtenidos con SFE-CO ₂	110

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Tabla 14. Cuantificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de <i>S. aratocensis</i> obtenidos con SFE-CO ₂	110
Tabla 15. Valores de capacidad antioxidante de los aceites esenciales y los extractos de <i>S. aratocensis</i>	112

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Abreviaturas, Siglas y Acrónimos

A	Amperios
AAPH	<i>2,2'-Azobisisobutyramide dihydrochloride</i> [(Cloruro de 2,2-azobis(2-amidinopropano)]
ABTS ⁺	<i>2,2'-Azibo-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i> [Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]
AE	Aceite(s) esencial(es)
A.L.P.P.	Anderson Leonardo Paipa Pérez
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
CA	California
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
CHI	<i>Chalcone Isomerase</i> (Chalcona isomerasa)
CHS	<i>Chalcone Synthase</i> (Chalcona sintasa)
CTP	<i>Cytidine Triphosphate</i> (Trifosfato de citidina)
DB-5MS	5%-Fenil-poli(metilsiloxano)
D.I.	Diámetro interno
d _f	Espesor de la fase estacionaria
DMAPP	<i>Dimethylallyl Pyrophosphate</i> (Pirofosfato de dimetilalilo)
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidracilo
EI	<i>Electron Impact</i> (Impacto de electrones)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

eV	Electrón-Voltios
FPP	<i>Farnesyl Pyrophosphate</i> (Pirofosfato de farnesilo)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GPP	<i>Geranyl Pyrophosphate</i> (Pirofosfato de geranilo)
HCD	<i>Higher-Energy Collisional Dissociation</i> (Disociación por colisiones de alta energía)
HMG-CoA	<i>Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A</i> (Hidroximetilglutaril-coenzima A)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
IPP	<i>Isopentenyl Pyrophosphate</i> (Pirofosfato de isopentenilo)
IRL	Índice(s) de retención lineal(es)
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida)
MEP	<i>2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate</i> (2-C-Metil-D-eritritol-4-fosfato)
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas)
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> (Fosfato de adenina dinucleótido)
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de los radicales de oxígeno)
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PEG	Poli[etilen(glicol)]
ppb	Partes por billón

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

ppm	Partes por millón
RDA	Reacción retro Diels-Alder
SE	<i>Solvent Extraction</i> (Extracción con solvente)
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
ToF	<i>Time-of-Flight</i> (Tiempo de vuelo)
TPP	<i>Thiamine Pyrophosphate</i> (Pirofosfato de tiamina)
UV-VIS	Ultravioleta-visible

Resumen

Título: COMPARACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE *Salvia aratocensis* (Lamiaceae), OBTENIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y EN FUNCIÓN DEL ESTADO FENOLÓGICO DE LA PLANTA*

Autor: Anderson Leonardo Paipa Pérez**

Palabras clave: *Salvia aratocensis*, metabolitos secundarios, estado fenológico, aceites esenciales, extractos, actividad antioxidante.

Descripción:

Salvia aratocensis (familia Lamiaceae) es una planta endémica del cañón del Chicamocha, Santander (Colombia). Algunos estudios reportan la actividad antioxidante de *S. aratocensis*; esta puede variar según los cambios en la composición química de los aceites esenciales (AE), y extractos, que ocurren a medida que las plantas avanzan en su desarrollo fenológico. En el presente trabajo se estudió la relación entre los cambios de composición de los AE, extractos hidroalcohólicos (SE) y supercríticos (SFE) de *S. aratocensis* y su actividad antioxidante.

Los AE, SE y SFE se obtuvieron de plantas en los estados de prefloración, floración y post-floración mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHd), extracción con solventes SE y extracción con fluido supercrítico SFE, respectivamente. El análisis de la composición de los AE se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La composición de los SE y SFE se determinó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con detector *Orbitrap*, mediante una interface de electronebulización (ESI) en modo positivo (LC-ESI⁽⁺⁾-*Orbitrap*-MS). La capacidad antioxidante se evaluó mediante dos métodos: capacidad de absorción de los radicales de oxígeno (ORAC), y ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺. BHT y α -Tocoferol fueron las sustancias de referencia. La composición de los AE varió en función del estado fenológico de las plantas y se registró un incremento en la concentración del compuesto mayoritario en los AE colectados de plantas en postfloración. En los SE y SFE se identificaron tres flavonoides, cuya concentración se incrementó a medida que las plantas avanzaron hacia la postfloración. La actividad antioxidante de los AE, SE y SFE, evaluada por el método ORAC, fue superior a la de las sustancias de referencia. Para el ensayo ABTS⁺, se obtuvieron valores de actividad antioxidante de extractos y AE inferiores a los registrados por las sustancias de referencia.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko. Química, Ph.D.

Abstract

Title: COMPARISON OF SECONDARY METABOLITES ISOLATED FROM SALVIA ARATOCENSIS (LAMIACEAE), OBTAINED BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS AND IN FUNCTION OF THE PHENOLOGICAL PLANT STAGES.

Author: Anderson Leonardo Paipa Pérez

Key words: *Salvia aratocensis*, secondary metabolites, phenological stages, essential oils, extract, antioxidant activity.

Description:

Salvia aratocensis (Lamiaceae family) is a Chicamocha canyon endemic plant. Some studies have reported antioxidant activity in *Salvia aratocensis*; which could be variable depends on the chemical composition changes in essential oil and extracts. These alterations occur when the plants advance in their growth stages. This project studied the relation between the changes of essential oils composition, and the extracts obtained by hydroalcoholic solvents and CO₂ in supercritical conditions of *salvia aratocensis*, and their antioxidant activity.

EO, SE and SFE were obtained from plants in the preflowering, flowering and post-flowering stages by microwave hydrodistillation (MWHD), solvents extraction (SE) and supercritical fluid extraction, respectively. Chemical composition of the EO were performed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Liquid chromatography-electrospray ionization (positive mode)-mass spectrometry (Orbitrap) was used to determine compounds present in SE and SFE. Antioxidant capacity was assessed by two methods: 1. oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and 2. ABTS radical-cation discoloration test. BHT and α -Tocopherol were used as reference substances. EOs varies in composition according the phenological stage of plants were collected. An increase in the major component was recorded in EOs collected from post-flowering stage plants. Three flavonoids were identified in SE and SFE and their concentration increased when the plants advanced towards post-flowering. The antioxidant activity of EOs, SEs and SFEs, assessed by ORAC, was greater than registered by reference substances, however, α -Tocopherol and BHT exhibited higher values than obtained to EOs, SEs and SFEs by ABTS⁺ discoloration test.

*Bachelor Thesis

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko. Química, Ph.D.

Introducción

En el ámbito mundial, Colombia es el tercer país con mayor número de especies animales y vegetales en todo su territorio (Andrade y Ruiz, 1992). Este aspecto no ha sido aprovechado completamente para el desarrollo económico de la nación. La mayoría de los sectores productivos del país se han dedicado a la producción, explotación y exportación de materias primas como productos agrícolas tradicionales y minerales (Kalmanovitz, 2003). No se tiene en cuenta la transformación de éstos y la posibilidad de darles valor agregado. Por lo tanto, se hace necesario realizar proyectos que abran paso al desarrollo del sector agroindustrial; una alternativa es la incursión en industrias como la farmacéutica y la cosmética, las cuales, han recurrido a la búsqueda de compuestos activos presentes en plantas, que demuestren algún tipo de actividad biológica y den paso a la formulación de nuevos productos con alto valor comercial. La capacidad antioxidante es una de las actividades biológicas con mayor potencial para el desarrollo de productos de consumo elevado, debido a que atenúa los efectos del estrés oxidativo producido por radicales a nivel celular (Kohen y Nyska, 2002). Los radicales libres son especies químicas inestables producidas durante los procesos metabólicos celulares; degradan biomoléculas, lo que implica daño de tejidos y el desarrollo de enfermedades (Cefarelli, *et al.*, 2006). Con el fin de mitigar estos efectos, las industrias cosmética, farmacéutica y de alimentos han implementado el uso de antioxidantes sintéticos en la formulación de sus productos (Diplock, *et al.*, 1998). Estos compuestos interactúan con oxidantes, disminuyen su reactividad y evitan la oxidación de otras moléculas. A pesar de ser eficientes, también, pueden presentar efectos nocivos (Lanigan y Yamarik, 2002). Lo cual reduce su valor en la prevención de

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

problemas de salud. Las normas internacionales de calidad estipulan que los productos formulados con alguna actividad biológica específica, deben demostrar que no alteran el funcionamiento del organismo de quien los consume. Por lo tanto, los sectores industriales interesados en la comercialización de tales productos, han promovido la investigación enfocada en la búsqueda de nuevas fuentes naturales capaces de proveer principios activos sin efectos secundarios perjudiciales, dentro de los cuales se destacan las plantas que producen en su metabolismo secundario, compuestos que reducen la actividad radicalaria (Cefarelli *et al.*, 2006). Debido a ello, se buscan extractos y aceites esenciales (AE) capaces de sustituir a sus homólogos sintéticos (Lanigan y Yamarik, 2002).

Los AE y extractos de plantas pertenecientes a la familia de las labiadas, específicamente, al género *Salvia*, presentan diversas actividades biológicas, *e.g.*, antioxidante (Marineli *et al.*, 2014; Dincer *et al.*, 2012; Farhat *et al.*, 2013), antibacteriana (Kamatou, Van Vuuren, Van Heerden, Seaman, y Viljoen, 2007; Bisio *et al.*, 2015; Hanedaroglu, Karayab y Zaybek, 2001), antimicrobial (Cardile *et al.*, 2009), antiespasmódica (Romussi *et al.*, 2001), y antiséptica (Kamatou, Makunga, Ramogola, y Voljoen, 2008). Las plantas del género *Salvia* se encuentran extensamente distribuidas en Asia Central, América Central, Suramérica, la cuenca del Mediterráneo y en Asia Oriental (Ulubelen, Topcu y Kolak, 2005). Existen cerca de 300 especies de este género identificadas. El género *Salvia* está constituido principalmente por plantas arbustivas, herbáceas perennes y anuales; provistas en todas sus partes de glándulas secretoras de metabolitos secundarios, los cuales construyen una interfaz química entre las plantas y el entorno (Brizuela, García y Mansur, 1998). En Colombia, las *salvias* están representadas por 83 taxones, de los cuales 78 son nativos (Fernández y Rivera, 2005). Dentro de las *salvias* nativas colombianas se encuentra la *Salvia aratocensis*.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

La *S. aratocensis* es una especie endémica del Cañón del río Chicamocha, su nombre común es “Velero de monte”. Esta planta se encuentra en la Cordillera Oriental en el departamento de Santander entre los 1200 y 1500 m de altura (Fernández y Rivera, 2005); se ha reportado su actividad en patologías como la tuberculosis, el mal de Chagas y la Leishmaniasis (Bueno, Escobar, Martínez, Leal y Stashenko, 2011). Cala *et al.* (2007) reportaron la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, y propusieron su uso para la extracción de compuestos antioxidantes, lo que convierte a esta planta en una candidata potencial para su implementación en procesos de explotación agroindustrial. Para ello, en esta investigación, se estudiaron la composición química y la actividad antioxidante de los AE y extractos hidroalcohólicos y obtenidos con CO₂ de *S. aratocensis*, en función de su estado fenológico. Se examinaron tres estados fenológicos, a saber: 1. Prefloración; 2. Floración y 3. Post-floración. El estudio permitió obtener importante información sobre las etapas en que la planta tiene la cantidad de metabolitos secundarios más alta, que registren algún tipo de actividad biológica, siendo esto un factor determinante para el desarrollo de procesos de producción agroindustrial.

1. Marco Teórico

1.1 *Salvia aratocensis*

La *S. aratocensis* (**Figura 1**) pertenece a la familia Lamiaceae (**Tabla 1**); se reportó por primera vez en el año 2003 por el Dr. José Luis Fernández del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Bogotá, Colombia. Su nombre común es “Velero de monte”, crece en la Cordillera Oriental en los departamentos de Santander y Boyacá (Cañón del río Chicamocha, Municipios de Los Santos y Suratá, entre los 1200 y 1600 m.s.n.m.) (Fernández, 2003).

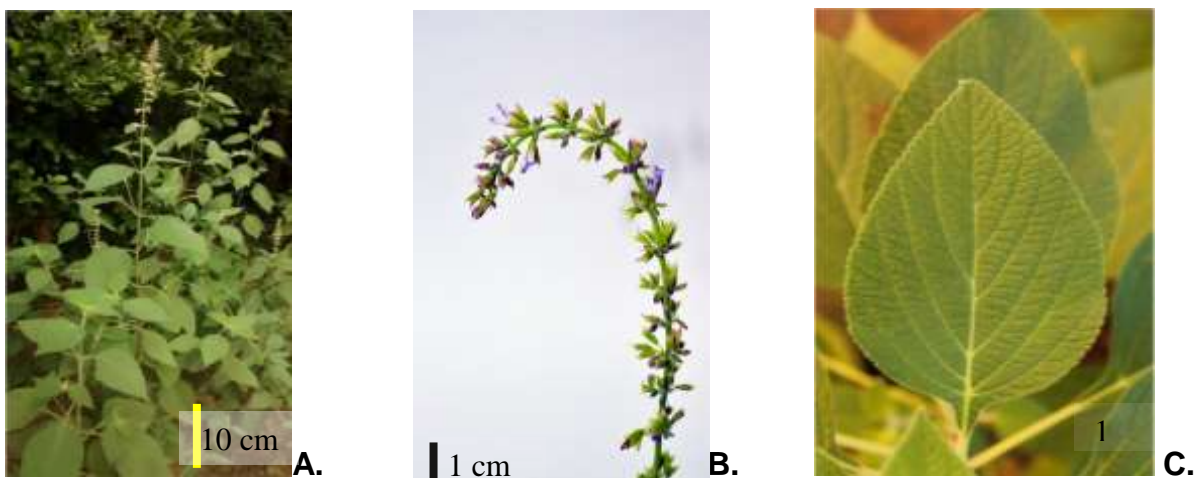


Figura 1. **A.** Planta de *S. aratocensis* en su hábitat natural. **B.** Inflorescencias y **C.** Hoja individual.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Tabla 1.

Taxonomía de la Salvia aratocensis.

Clase	Magnoliopsida
Superorden	Laminae
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Salvia</i>
Especie	<i>Aratocensis</i>
Subespecie	<i>Suratensis</i>

La *S. aratocensis* es un arbusto con una altura de hasta 1.5 m, se desarrolla en el piso térmico medio, en ambientes secos entre plantas espinosas o caducifolias. La *S. aratocensis* se propaga muy bien en senderos deteriorados por la ganadería y se adapta fácilmente a zonas con alta concentración de nitrógeno (Fernández, 2003).

1.2. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos producidos por las plantas; intervienen en los procesos de interacción entre la planta y su ambiente (Ávalos y Pérez-Urrutia, 2009). Algunos metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra predadores patógenos y otros, como atrayentes de polinizadores. Con base en sus orígenes biosintéticos, los metabolitos secundarios de las plantas se clasifican (Croteau, Kutchan y Lewis, 2000), en cuatro grupos, a saber:

1.2.1. Terpenos. Los terpenos son una familia de productos naturales, compuesta por sustancias generalmente formadas a partir de la unión “cabeza-cola” de unidades de isopreno C₅

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

(Figura 2), que se encuentra como difosfato de dimetilalilo (DMAPP, por sus siglas en inglés) y difosfato de isopentenilo (IPP, por sus siglas en inglés). Las estructuras típicas de los terpenos se representan como múltiplos de C_5 y se clasifican como monoterpenos, C_{10} , sesquiterpenos, C_{15} , diterpenos, C_{20} , sesterterpenos, C_{25} , triterpenos, C_{30} y tetraterpenos, C_{40} . Se conocen cerca de 30000 moléculas, que cumplen diversas funciones como mediadores en distintas interacciones ecológicas de las plantas (Gershenzon y Dudareva, 2007). Algunos compuestos volátiles como el *trans*- β -ocimeno son atrayentes de insectos específicos que cumplen la función de polinizadores (Dötterl y Schäffler, 2007)., o, por el contrario, pueden actuar como repelentes de especies enemigas, *e.g.*, geraniol (Müller *et al.*, 2009); otros, de mayor peso molecular y menos volátiles como los hidrocarburos sesquiterpénicos, presentan actividad antifúngica o antibacterial, son tóxicos para los insectos y se producen como un mecanismo de defensa ante el ataque de predadores. También, existen terpenos con funciones estructurales de los fitoesteroles (Malheiros, Schmitt, Yunes y Monache, 2005).

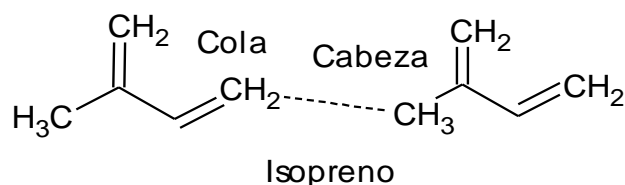


Figura 2. Unión “cabeza-cola” de las unidades del isopreno

1.2.1.1. *Biosíntesis de los terpenos.* La biosíntesis de terpenos parte de la formación de los bloques de construcción (IPP y DMAPP), que se producen por medio de dos rutas metabólicas: 1. Ruta del mevalonato y 2. Ruta del fosfato de metileritrilo. Los procesos posteriores que conducen a la formación del IPP y el DMAPP aún no se conocen detalladamente. Sin embargo,

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

metodologías genéticas (Tristch, Hemmerlin, Bach y Rohmer, 2010), muestran que hay dos enzimas involucradas, la primera, produce 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato y, la segunda, lo convierte a IPP y DMAPP; ambos pasos son de naturaleza reductora. Los mecanismos de este último proceso aún no han sido elucidados.

En la ruta del mevalonato (**Figura 3**), la acetil coenzima A (acetil-CoA) que es el precursor biogénico de los terpenos, se convierte a la “unidad activa de isopreno”, pirofosfato de isopentenilo (IPP); este proceso parte de la unión mediante una condensación de Claisen de dos moléculas de acetil-CoA para producir acetoacetil-CoA. Paso seguido, se da la incorporación de una tercera molécula de acetil-CoA a través de una adición aldólica estereoespecífica para producir el éster de cadena ramificada 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Posteriormente, sucede una reducción enzimática con dihidronicotinamida-adenina-dinucleótido (NADPH + H⁺) en presencia de agua; de este proceso se obtiene (R)-ácido mevalónico (McGaver y Croteau, 1995). La fosforilación del ácido mevalónico por el trifosfato de adenosina (ATP) produce el difosfato del ácido mevalónico, que se descarboxila y se deshidrata para producir el pirofosfato de isopentenilo (IPP). Mediante el mecanismo de protonación-deprotonación llevada a cabo por isomerasas, el IPP se transforma a pirofosfato de dimetilalilo. En la ruta del metileritritol fosfato (**Figura 4**), el ácido pirúvico y el gliceraldehído-3-fosfato, producen el MEP. Inicialmente, sucede la pérdida del carboxilo del piruvato con la mediación del difosfato de tiamina para producir un equivalente de acetaldehído enlazado a una enamina. Posteriormente, la enamina formada se une al gliceraldehído-3-fosfato mediante un ataque nucleofílico; el intermediario formado pierde pirofosfato de tiamina y, de este modo, se genera el 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato, que se transforma al MEP mediante un rearrreglo por una reacción aldol-aldol inversa, seguida de una reducción (Munos, Pu, Mansoorabadi, Kim y Liu, 2009). El

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

producto formado, contiene el sistema de cadena ramificada equivalente a la unidad de isopreno. La reacción del MEP con la citidina trifosfato (CTP) produce un derivado difosfórico de citidina, el cual es fosforilado por la vía del ATP. El 2-fosfato resultante pierde el fosfato de citidina y da paso a la formación de un fosfoanhídrido cíclico (Dewick, 2009). Los animales y los hongos parecen carecer de la vía del MEP, por lo que usan exclusivamente la del mevalonato. Generalmente, las plantas y algunas bacterias emplean ambas vías de manera simultánea y complementaria (Lichtenthaler, Romer y Schwender, 1997).

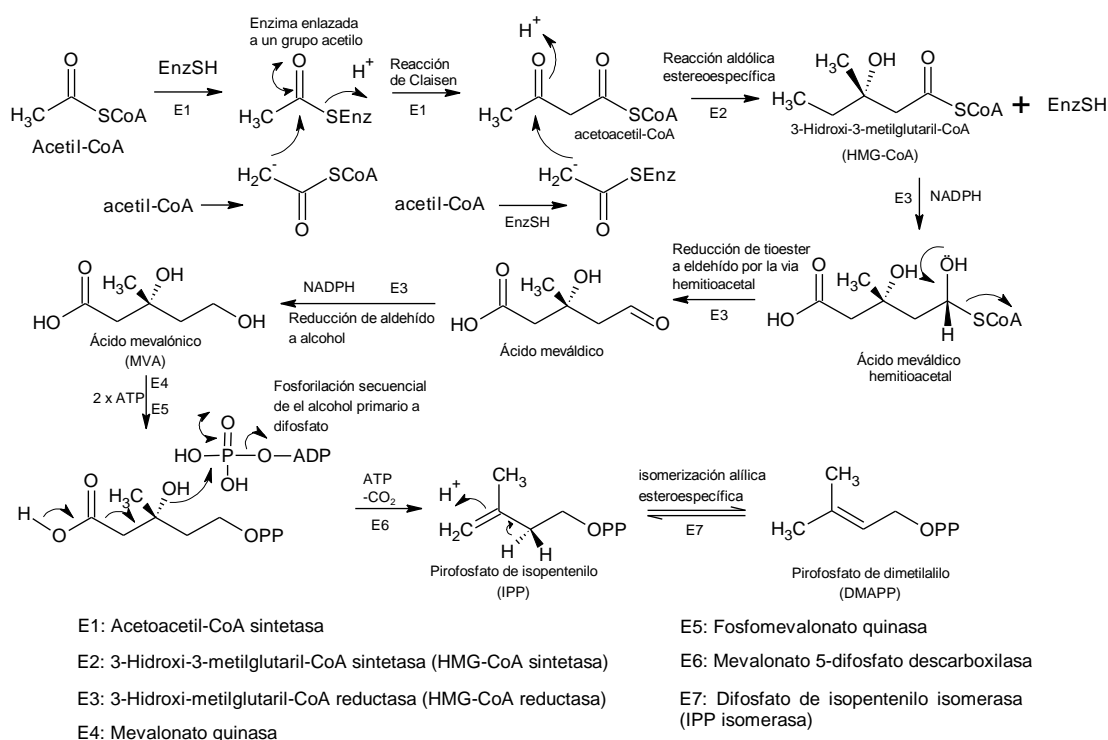
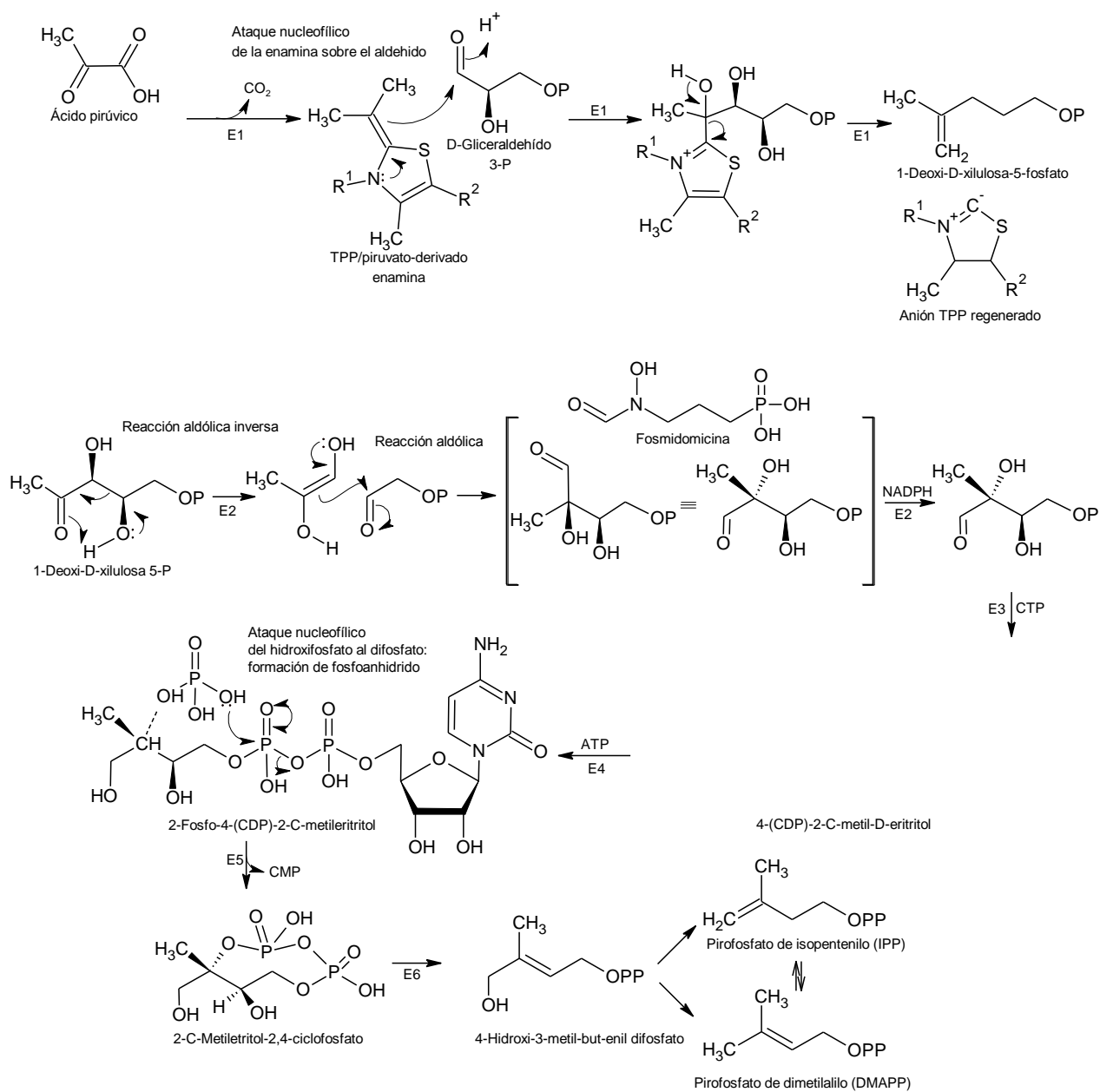


Figura 3. Biosíntesis de los bloques de construcción de los terpenos mediante la ruta del mevalonato. Dewick, P. (2009). *Mevalonate pathway*. [Figura]. Tomado de *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3rd Edition.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN



E1: 1-desoxi-D-xilulosa-5 -fosfato sintasa (DXP sintasa)

E2: 2-C-metil-eritritol 4-fosfatp sintasa; 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (IspC)

E3: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa (IspD)

E4: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa (IspE)

E5: 4-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa (IspE)

E6: 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difsfato sintasa (IspG)

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Figura 4. Biosíntesis de los bloques de construcción de los terpenos mediante la ruta del fosfato de metileritrilo. Dewick, P. (2009). *Methylerythritol Phosphate pathway*. [Figura]. Tomado de *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition*.

La unión de los bloques de construcción IPP y DMAPP da paso a las moléculas precursoras de monoterpenos (pirofosfato de geranilo, GPP, por sus siglas en inglés) y sesquiterpenos (pirofosfato de farnesilo, DMAPP, por sus siglas en inglés). La producción del pirofosfato de geranilo inicia con la pérdida del pirofosfato (OPP) por parte del DMAPP, genera un catión alílico y se une al carbono terciario del IPP por una adición electrofílica (Dewick, 2009). El producto de la adición es un catión terciario, que se transforma a GPP mediante la acción de la enzima geranil-difosfato sintasa (véase **Figura 5**).

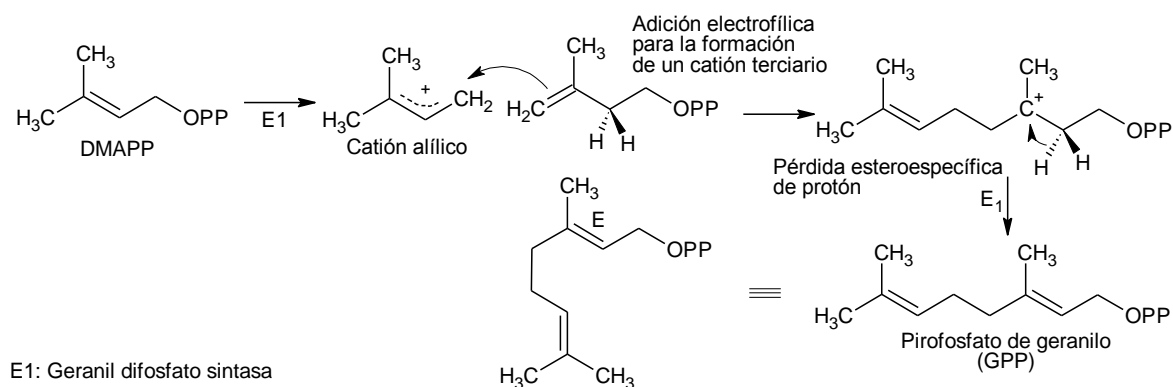
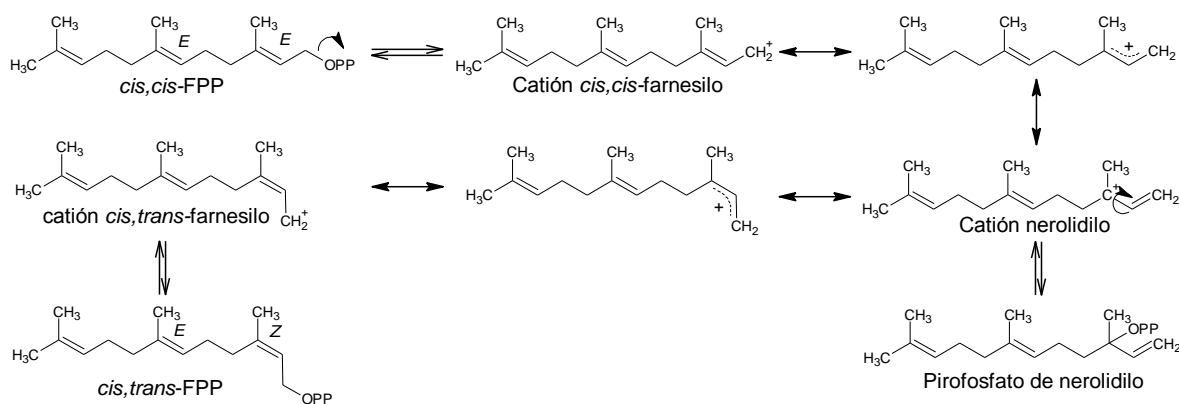


Figura 5. Formación del pirofosfato de geranilo. Dewick, P. (2009). *Synthesis of geranyl pyrophosphate*. [Figura]. Tomado de *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition*.

1.2.1.2. *Biosíntesis de sesquiterpenos*. Los sesquiterpenos se sintetizan generalmente por la vía del mevalonato; la adición de C₅ (IPP) al GPP mediada por la FPP sintasa, conduce a la

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

formación del precursor sesquiterpénico fundamental FPP; el mecanismo de la reacción es análogo al descrito para la formación del GPP (**Figura 5**). El aumento en la longitud de la cadena carbonada y la presencia de un doble enlace adicional en el FPP (respecto al GPP) aumenta las posibilidades de ciclación; lo que resulta en la formación de una gran variedad de compuestos mono-, di- y tricíclicos. En el proceso de formación de los sesquiterpenos, la estructura del FPP sufre rearrreglos que se dan a través de la transposición del grupo difosfato. La transposición inicia con la salida del difosfato que genera la formación de un catión alílico; posteriormente, la estructura experimenta la deslocalización de la carga y se estabiliza. De este paso, se desarrollan dos procesos diferentes: 1. La carga se estabiliza sobre el carbono terciario, el difosfato se une sobre éste dando paso a la formación del pirofosfato de nerolidilo (NPP); 2. La estructura rota en el punto en donde se encontraba el doble enlace que se deslocalizó; el restablecimiento del doble enlace genera la configuración *Z* que es más estable (respecto a la configuración *E*) (Dewick, 2009), esto conduce a la ubicación de la carga sobre el carbono primario y a la adición de grupo difosfato (**Figura 6**).



UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Figura 6. Formación de pirofosfato de nerolidilo y *trans,cis*-FPP a partir de *trans,trans*-FPP.

Dewick, P. (2009). *Nerolidyl PP and FPP synthesis*. [Figura]. Tomado de *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition*.

La salida del grupo difosfato del pirofosfato de nerolidilo y el *cis,trans*-FPP, produce el reordenamiento y la estabilización de estas estructuras, que resulta en la formación de los iones precursores de las distintas familias de sesquiterpenos, *e.g.* humulenos, cadinanos (**Figuras 7 y 8**, respectivamente), cariofilenos y germacrenos (Lichtenthaler, *et al.*, 1997).

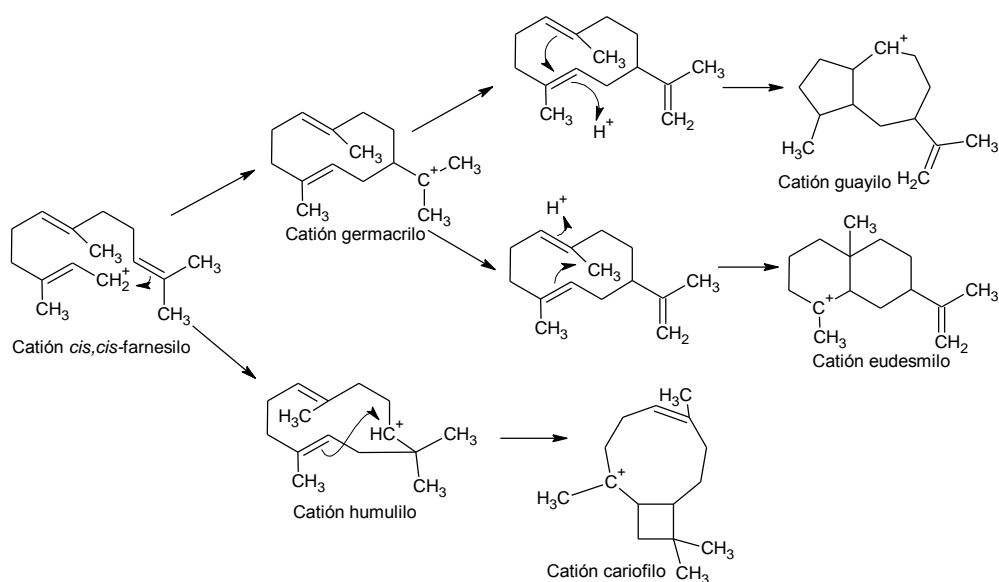


Figura 7. Formación de los iones guayilo, eudesmilo y cariofilo a partir del catión *cis,cis*-farnesilo. Dewick, P. (2009). *Guaiyl, Eudesmil and Caryophyllyl cations*. [Figura]. Tomado de *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition*.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

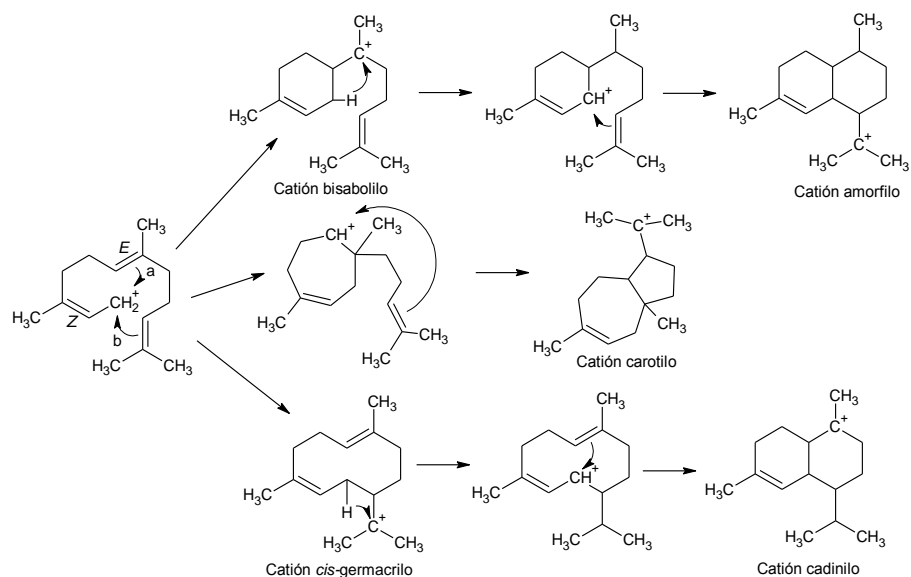


Figura 8. Formación de los iones precursores amorfilo, carotilo y cadinilo. Dewick, P. (2009). Cadinyl, Carityl and Amorfyl cations. [Figura]. Tomado de *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition*.

1.2.2. Flavonoides. Los flavonoides son un grupo de productos naturales distribuidos ampliamente en el reino vegetal, se encuentran como mezclas complejas en los tallos, las hojas y las flores de muchas plantas (Del Baño *et al.*, 2004). Son polifenoles formados por un sistema aromático que consta de tres anillos sustituidos (**Figura 9**). Según el tipo de sustituyente y la posición en la que se encuentran, los flavonoides se clasifican en cinco grupos, a saber: 1. Flavonoles: un doble enlace en la posición dos-tres, un hidroxilo en la posición tres y un grupo cetona en la posición cuatro; 2. Dihidroflavonoles: dos hidroxilos, uno en la posición tres y otro en la posición cuatro; 3. Flavonas: doble enlace entre las posiciones dos-tres y un grupo cetona en la posición cuatro; 4. Flavanonas: un grupo cetona en la posición cuatro; 5. Flavanoles: tres grupos hidroxilo. La actividad biológica de los flavonoides es variada, dentro de las más conocidas se encuentran la antitumoral (Kanadaswami, 2005), la antiinflamatoria (Guardia, Rotelli, Juarez y Pelzer, 2001), la antigenotóxica y la antioxidante (Bhouria *et al.*,

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

2011). En las plantas, los flavonoides actúan como reguladores del crecimiento y atenuadores del estrés oxidativo (Kumar y Pandey, 2013); la eficiencia de los flavonoides como neutralizadores de radicales libres depende de los sustituyentes presentes en los anillos y es mayor en los flavonoides que poseen un hidroxilo en la posición tres y un doble enlace entre las posiciones dos y tres (Van Acker, Van den Berg y Bast).

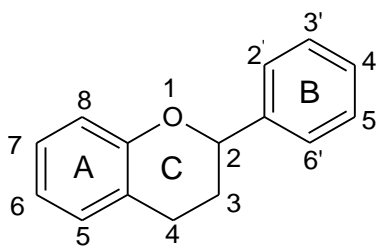


Figura 9. Estructura general de los flavonoides. Van Acker *et al.* (1996). *Flavonoids*. [Figura]. Tomado de *Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology & Medicine*. 20.

1.2.2.1. Biosíntesis de los flavonoides. Los flavonoides se sintetizan mediante la ruta de los fenilpropanoides (**Figura 10**), en la que la fenilalanina se transforma a 4-cumaroil-CoA, que se condensa con tres moléculas de malonil-CoA bajo la acción de las enzimas chalcona sintasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI); el producto de este proceso es la naringenina (flavona) (Falcone *et al.*, 2012). La acción de oxidasas, reductasas e isomerasas sobre la naringenina y sus derivados permite la formación de distintos flavonoides (Petrucci *et al.*, 2013).

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

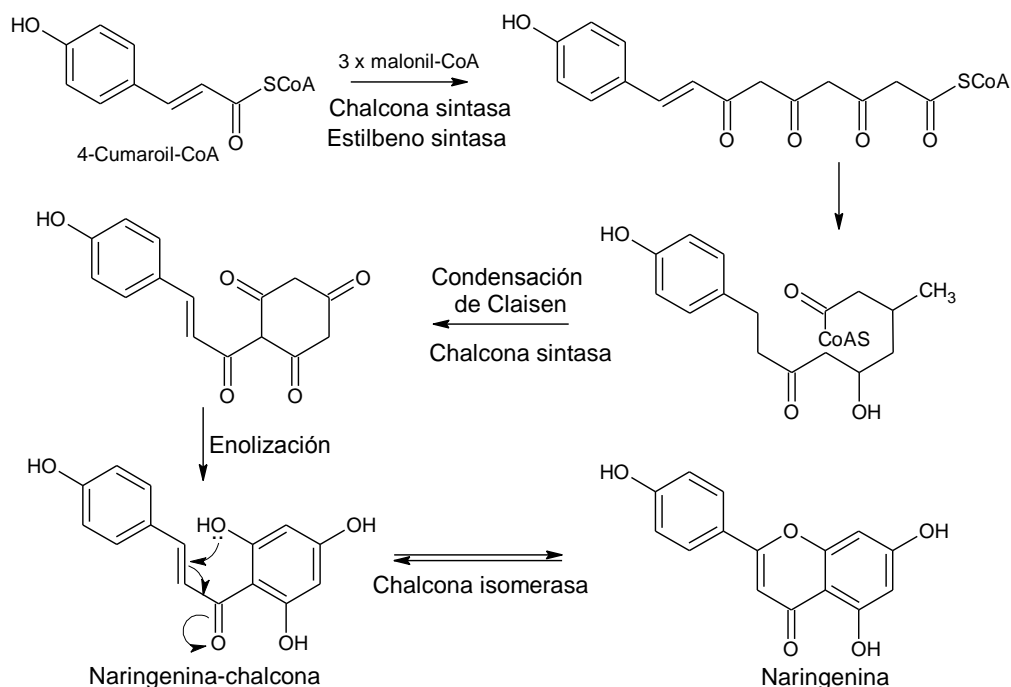


Figura 10. Biosíntesis de los flavonoides. Petrusa *et al.* (2013). *Biosynthesis of flavonoids*.

[Figura]. Tomado de *Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses*. *International Journal of Molecular Sciences*. 14.

1.2.3. Compuestos nitrogenados o alcaloides. Los alcaloides contienen uno o más átomos de nitrógeno, se sintetizan principalmente a partir de aminoácidos y se conocen aproximadamente 12000 alcaloides (Judd, Campbell, Kellog, Stevens y Donoghue, 2002), que poseen gran diversidad de estructuras químicas; son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que algunos se usan ampliamente en medicina (Roberts y Wink, 1998), por ejemplo, la morfina, la atropina, la quinina y la estricnina, entre otros.

1.2.4. Glicósidos. El término “glicósido” hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra (aglicona) a través de su grupo hidroxilo.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Existen cuatro grupos de glicósidos de interés particular: saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos (Yinrong y Yeap, 2000).

1.3. Aceites esenciales

Los AE son una mezcla de varios compuestos químicos sintetizados por las plantas (metabolitos secundarios), estos se encuentran en las células vegetales y poseen la fragancia característica de las plantas de las que han sido extraídos. Los compuestos presentes en un aceite esencial son volátiles, pero susceptibles a degradación química originada por luz o calor, bases o ácidos fuertes (Bandoni, 2000).

Las plantas producen metabolitos secundarios con el fin de crear mecanismos de defensa ante posibles predadores, adaptarse al ambiente, comunicarse con otros organismos vivos, protegerse contra cambios intempestivos, entre otros (Dudareva, Klempien, Muhlemann y Kaplan, 2013; Batish, Singh, Kohli y Kaur, 2008). La presencia de los metabolitos secundarios en los aceites esenciales les otorga propiedades biológicas que pueden aprovecharse en el tratamiento de dolencias, en cosmética o en la formulación de productos de aseo (Bakkali, Averbek y Idaomar, 2008).

Las siguientes son propiedades físicas de los aceites esenciales: son líquidos a temperatura ambiente, volátiles, incoloros o ligeramente coloreados; cuando están recién destilados, generalmente, poseen densidad inferior a la del agua, índice de refracción alto, son inflamables, pero no tóxicos (su límite de ingestión por toxicidad es muy alto), solubles en alcohol, en aceites fijos o grasas, pero poco solubles en agua (Stashenko, 2009).

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

1.4. Extractos vegetales

Los extractos vegetales son una mezcla de compuestos químicos que se pueden aislar de plantas con solventes. Estos compuestos pueden ser volátiles o no; la diferencia entre estas mezclas y los aceites esenciales es que en el caso de los extractos se aíslan básicamente, moléculas de peso molecular más alto, *e.g.*, alcaloides, flavonoides, grasas, entre otros (Gupta y Tuohy, 2015).

1.5. Métodos de extracción

1.5.1. Hidrodestilación asistida por microondas. Este es un método destilativo en el cual el material vegetal se encuentra contenido en un recipiente con agua dentro de un horno de microondas; el recipiente está conectado a un aparato *Clevenger* que, a su vez, se encuentra acoplado a un sistema de condensación. El recipiente (balón de fondo redondo) se somete a la radiación de las microondas producidas por un magnetrón ubicado dentro del horno. Esto provoca la ebullición del agua y la ruptura de los tricomas glandulares (en el caso de las Labiadas), que se encuentran en la planta. Los componentes liberados de la planta se arrastran por el agua y pasan a la fase gaseosa, la mezcla de vapor de agua y aceite esencial circula a través del aparato *Clevenger*. La separación del aceite esencial y el agua, se da por decantación, luego de que la mezcla se enfría y se condensa (Chemat y Cravotto, 2013).

El efecto de las microondas depende de la naturaleza del solvente y del material vegetal. El calentamiento ocasionado por la radiación de las microondas es proporcional a la constante dieléctrica del solvente. Por lo tanto, la mezcla se calienta de manera homogénea. Una ventaja de usar la radiación de microondas es que estas ondas interactúan selectivamente con moléculas

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

polares, por ejemplo, agua, y provocan un aumento de temperatura dentro de los tricomas glandulares, lo que causa su ruptura y la liberación de sustancias volátiles, componentes del aceite esencial (Destandau, 2013).

1.5.2. Extracción con fluido supercrítico. Este método de extracción usa como solvente CO₂ en condiciones supercríticas (temperatura superior a 304,21 K y presión mayor que 7.3×10^3 kPa). Los fluidos en condiciones supercríticas presentan valores de difusividad y de viscosidad, que les permiten solvatar y extraer con alta eficiencia moléculas de analitos que se encuentran en el material vegetal. El extracto obtenido es libre de solventes, fresco, con su aroma natural (Saraim, Somsubhra, Satyabrata y Banji, 2012).

1.5.3. Extracción con solvente. La extracción con solvente se basa en la transferencia de analitos de una matriz vegetal a un medio líquido constituido por un solvente o mezcla de solventes capaces de solvatar a las moléculas de interés. Los criterios de composición de la mezcla se determinan mediante el estudio de las características de los compuestos para extraer, *e.g.*, grupos funcionales, volatilidad, peso molecular y polaridad, de modo, que la fase líquida debe tener propiedades afines a la de los analitos, para facilitar su obtención (Pan, Xiao-Xiao y Liand, 2008).

1.6. Análisis instrumental

1.6.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La cromatografía es una técnica de separación de componentes de una mezcla; se usó a principios del siglo XX por Mijail Tswet para separar pigmentos vegetales (Williams, 2002). La separación en cromatografía

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

de gases (GC, por sus siglas en inglés) se basa en la interacción de los compuestos presentes en la mezcla con una fase estacionaria que recubre la pared interna de una columna cromatográfica, PDMS, poli(dimetilsiloxano) o PEG, poli(etilenglicol), más usadas para el análisis de los AE. Los compuestos se transportan a través de la columna por un gas inerte denominado gas de arrastre (N_2 , H_2 o He). Los componentes de la mezcla interactúan de manera distinta con la fase estacionaria, de modo que cada compuesto recorre la columna en tiempos diferentes; de esta forma, se separan. El tiempo de retención depende de las características químicas de las moléculas presentes en la muestra, tales como polaridad, peso molecular, punto de ebullición e interacciones intermoleculares, tipo de la fase estacionaria y la temperatura (Stashenko y Martínez, 2010).

En la técnica GC, la muestra se inyecta al equipo cromatográfico; el gas de arrastre lleva la muestra a la columna que se encuentra dentro de un horno, cuya temperatura es programable. El tiempo de retención de los componentes en la columna es función de su constante de distribución, K_D , *i.e.*, la relación de concentraciones del analito en las fases móvil y estacionaria, y depende de la temperatura, la naturaleza del gas y del polímero (fase estacionaria) (Grob y Barry, 2004).

Para realizar la identificación tentativa de los componentes, una mezcla de hidrocarburos (*n*-alcanos) se inyecta para calcular los índices de retención de los componentes del AE.

La espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que mide las masas de moléculas ionizadas y, en muchos casos, registra iones-fragmento obtenidos durante la ionización. En el interior del espectrómetro de masas, sucede la ionización de moléculas de la muestra, que puede ocurrir mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente para analizar AE es el impacto o bombardeo de las moléculas con electrones de una energía

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

estándar (70 eV), capaces de provocar la ionización y fragmentación de las moléculas. Las moléculas ionizadas y los iones-fragmento se aceleran hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos (depende del analizador). La cantidad de movimiento, mv, alcanzada por cada ion en el analizador magnético dependerá de su relación masa/carga (m/z). La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas ionizadas y sus fragmentos, produce el espectro de masas, que es diferente para cada compuesto (Hoffman y Stroobant, 1988).

Dentro de las ventajas de esta técnica, se destacan las siguientes: capacidad de identificación de estructuras moleculares y gran sensibilidad (detección de concentraciones del orden de ppm o ppb), información estructural e isotópica de la molécula analizada, además, se puede obtener un espectro en décimas de segundo, lo que permite conocer la composición de una mezcla en tiempo real. La espectrometría de masas con la ionización con electrones (EI, por sus siglas en inglés) se usa principalmente en el análisis cualitativo de sustancias químicas en áreas como la química forense, ambiental, control de calidad y en el estudio de productos naturales (Barker y Ando, 1998).

Al acoplar la cromatografía de gases a la espectrometría de masas (GC-MS), se logra por un lado, separar una mezcla y, por otro, determinar la estructura molecular de cada uno de sus componentes (Stashenko y Martínez, 2010).

1.6.2. Detector de ionización en llama. El detector de ionización en llama (FID, por sus siglas e inglés) funciona mediante un quemador de hidrógeno/oxígeno en donde se mezcla el efluente de la columna con hidrógeno y aire, que se enciende mediante una chispa eléctrica para producir una llama de alta temperatura. Al ser sometidos a altas temperaturas, compuestos orgánicos generan iones y electrones que pueden conducir electricidad a través de la llama. Se

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

establece una diferencia de potencial de unos centenares de voltios entre la parte inferior del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama. La corriente generada es baja (del orden de los 10^{-12} A), y debe ser amplificada mediante un amplificador de alta impedancia (Skoog, Vest y Holler, 2001).

Aún no ha sido establecido a cabalidad el mecanismo de ionización de los compuestos que contienen carbono. Sin embargo, se ha observado que el número de iones que se forman puede ser tomado como el mismo de carbonos transformados en la llama. El FID responde al número de átomos de carbono que ingresan al detector en unidad de tiempo; debido a esto, el FID es sensible a la masa, y no a la concentración del analito. En consecuencia, este detector tiene la ventaja de que los cambios en el caudal de la fase móvil tienen poco efecto sobre su respuesta (Scanlon y Willis, 1985).

1.6.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia. La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) es una técnica que separa los componentes de una mezcla, de moléculas poco volátiles, con baja termoestabilidad o de alto peso molecular (superior a 500 Da), con gran variedad de grupos funcionales. La HPLC usa como fase móvil solventes en estado líquido y a altas presiones, generalmente 20-40 MPa. El principio de separación es la interacción entre los compuestos presentes en la muestra, la fase móvil y el material, *i.e.*, la fase estacionaria, que rellena la columna cromatográfica (Johnson, 1987).

Los equipos de HPLC constan de un sistema de inyección, reservorios para los solventes, degasificador, un sistema de bombeo, que permite introducir la muestra a la columna cromatográfica junto con los solventes a altas presiones, columna cromatográfica, sistema de detección y sistema de registro. Para separar una mezcla de compuestos, la muestra se inyecta a

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

la columna y eluye con la fase móvil. La elución de la muestra se logra con solventes, cuya composición no cambia durante el proceso (modo isocrático), o con solventes de composición variable (modo gradiente). Los componentes, que eluyen de la columna, se detectan por la mediación de luz ultravioleta, fluorescencia, índice de refracción, por detección electroquímica o por espectrometría de masas (Smith, 1983).

1.6.4. Espectrómetro de masas con detector Orbitrap. El constante desarrollo en la proteómica y la metabolómica demandan espectrómetros de masas *tándem* con muy alta resolución y altísima exactitud en sus mediciones de masas. La aparición del detector *Orbitrap*, desarrollado por Alexander Makarov y sus colaboradores, permitió obtener equipos con rango dinámico lineal de 0.5 a 500 ppm, resolución de hasta un millón, medición de masa/carga (m/z) de hasta 6000 y precisión en la medición de masas de entre 1 y 5 ppm (Hu *et al.*, 2005).

La formación de los iones se da mediante el sistema de electronebulización, un método de ionización suave, *i.e.*, no destructivo, que produce iones moleculares, $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$, según el modo de uso de la interfaz, positivo o negativo. En el modo de operación *step scan*, la aplicación de una diferencia de potencial, permite el ingreso de los iones al espectrómetro, que posteriormente, se transportan guiados por una radiofrecuencia generada por una serie de cuadrupolos dentro de tres cámaras (cuya presión se reduce gradualmente de 10^{-3} a 10^{-7} bar) hacia el *C-trap* en donde los iones se acumulan y se “comprimen” (Hu *et al.*, 2005), para ser expulsados luego en paquetes, por pulsos, a una celda de disociación por colisiones de alta energía (HCD, por sus siglas en inglés), ahí un campo electrostático provoca la aceleración de los iones y el choque con moléculas de N_2 da paso a la formación de los fragmentos, que

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

posteriormente, se regresan al *C-trap* y, finalmente, se dirigen hacia el *Orbitrap*, en donde se miden sus corrientes en función de su relación m/z (Hardman y Makarov, 2003; Makarov, 2000).

1.6.4.1. Detector Orbitrap. El detector *Orbitrap* está compuesto por dos electrodos concéntricos, uno central en forma de huso o botella y otro, dispuesto de forma axial. Entre los electrodos existe un potencial electrostático que puede ser descrito mediante una ecuación cuadrática con nodo en el ecuador del huso, *i.e.*, punto en el que la diferencia de potencial es menor (Hu *et al.*, 2005). Los iones ingresan en uno de los vértices del *Orbitrap*, en paquetes acelerados (discriminados por su relación m/z), separados por nanosegundos y con trayectoria perpendicular al electrodo. La interacción con el campo electrostático ocasiona que los iones describan trayectorias traslacionales estables alrededor del huso y, al mismo tiempo, oscilaciones paralelas al eje de los electrodos. Los iones de distinta m/z muestran diferentes amplitud y frecuencia de oscilación sobre el eje de los electrodos (Makarov, 2000). La frecuencia se mide por las antenas de radiofrecuencia y a los valores obtenidos se les aplica la transformada de *Fourier* para obtener la relación m/z de cada grupo de iones.

1.7. Actividad antioxidante

1.7.1. Especies reactivas de oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son formas reducidas del oxígeno molecular (O_2 , atmosférico). Generalmente, se crean como subproductos del metabolismo aerobio de plantas y animales, mediante la excitación de O_2 para producir un oxígeno singlete O_2^1 o de la transferencia de electrones a O_2 para formar las siguientes especies: radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), entre otras (Asada, 2006; Turrens, 2003). Actúan como reguladores en los procesos de muerte celular programada y, en algunos casos, como antígenos ante el ataque de agentes patógenos (Rego y Oliveira, 2003), (Jabs, 1999). Si bien son necesarios para los organismos que los producen, su exceso puede degradar varios componentes celulares, provocar la destrucción oxidativa de la célula, dañar tejidos sanos y alterar el ADN (Valko *et al.*, 2007).

1.7.2. Antioxidantes. La constante exposición a los radicales libres, ha llevado a los organismos a desarrollar distintos mecanismos de su defensa, dentro de los que se encuentran mecanismos preventivos, de reparación, defensas físicas y antioxidantes. Las defensas antioxidantes pueden ser de tipo enzimático como el superóxido de dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa; o de tipo no enzimático como el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol, glutatión, carotenoides y flavonoides (Halliwell, 1999). Los mecanismos de acción para la estabilización de radicales libres son variados; los enzimáticos implican la acción de enzimas específicas sobre un radical, *e.g.*, la glutatión oxidasa en la oxidación de los radicales peróxido, $\text{ROO}\cdot$ (Law y Halliwell, 1983). Los mecanismos no enzimáticos más conocidos involucran la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre, *e.g.*, la curcumina en la reacción con radicales metilo (Jovanovic, Steenken, Boone y Simic, 1999), la captura del radical por parte del antioxidante, *e.g.*, la adición de radicales hidroxilo al *tert*-butanol (Mortensen, Skibsted, Sampson, Rice-Evans y Everett, 1997), y la entrega de electrones por parte del antioxidante hacia catión-radicales, *e.g.*, la estabilización de radicales hidroxilo por el kaempferol (Leopoldini, Marino, Russo y Toscano, 2004).

Con el fin de mantener las propiedades fisicoquímicas y la durabilidad de sus productos, las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, han desarrollado compuestos sintéticos capaces

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

de reducir los efectos de degradación promovidos por agentes oxidantes como las ROS, los radicales libres y la luz. Estos compuestos pueden ser: 1. Fenoles, *e.g.*, butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) y tocoferoles; 2. Sales, *e.g.*, sorbatos y benzoatos; y 3. Ésteres derivados de ácidos grasos como el palmitato de ascorbilo (McCarthy, Kerry, Lynch y Buckley, 2001). La captura de los radicales libres, es el mecanismo de acción más común de los antioxidantes sintéticos (Shahidi, 2000). El BHA, el BHT y otros antioxidantes sintéticos de tipo fenólico, presentan alta actividad citotóxica (Saito, Sakagami y Fujisawa, 2002), y se consideran carcinogénicos (Ito, Fukushima y Tsuda, 2008), por lo que su uso en artículos de consumo humano es controlado o restringido en algunos países de la Unión Europea, Japón y Canadá (Shahidi y Zhong, 2005).

1.7.3. Capacidad de absorción del radical de oxígeno. El método de capacidad de absorción del radical de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) se usa para medir la actividad antioxidante de compuestos químicos; evalúa su capacidad para proteger a una molécula fluorescente de la degradación oxidativa, causada por un ataque de radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) (Figura 11) (Bisby, Booke y Navaratnam, 2008).

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

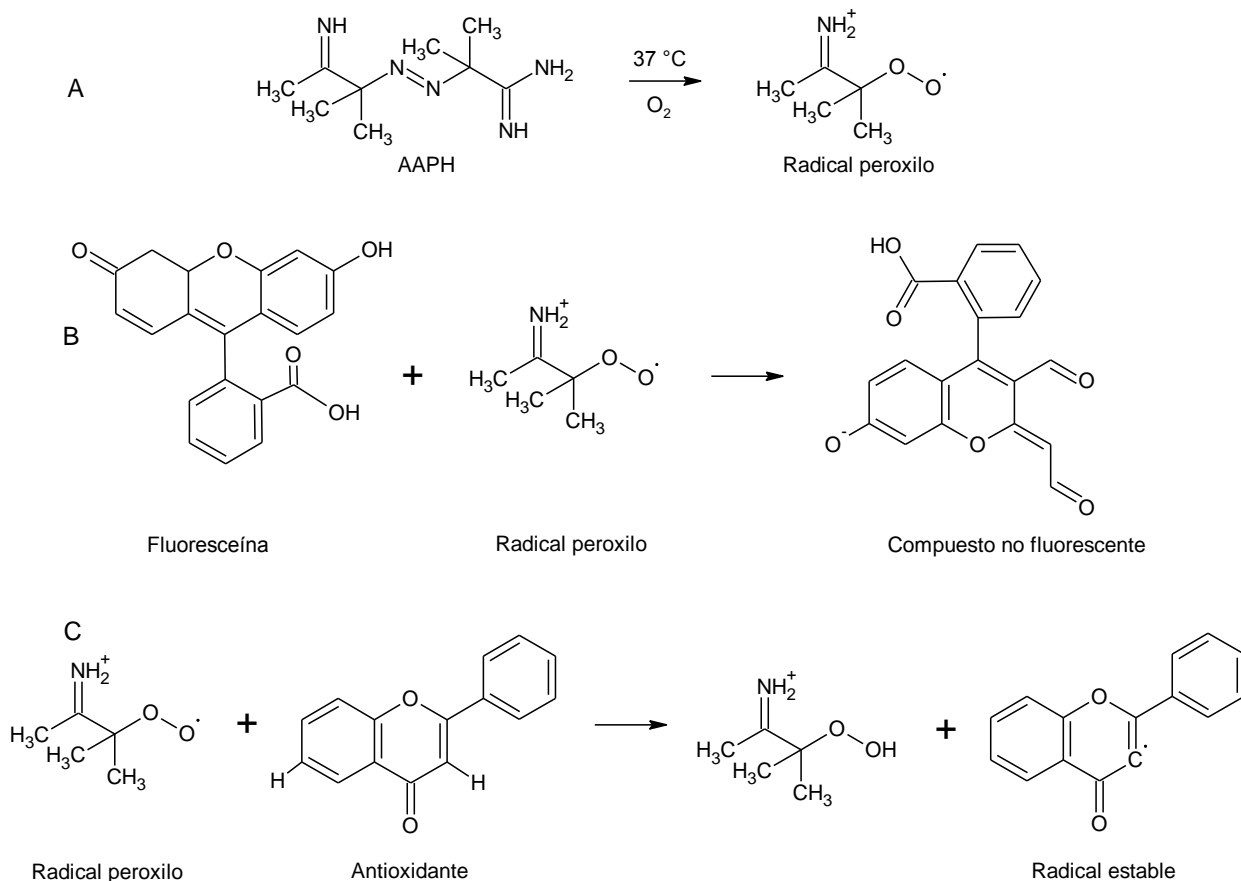


Figura 11. Mecanismo propuesto para el ensayo ORAC. **A.** Formación del radical peroxilo. **B.** Oxidación de la fluoresceína. **C.** Estabilización del radical peroxilo por la acción del antioxidante.

La reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno por parte del compuesto antioxidante al radical libre. Se utiliza un radical iniciador AAPH, para generar el radical peroxilo (ROO \cdot) (Huang, Ou, Hampsch, Flanagan y Prior, 2002), (**Figura 11-A**). En soluciones saturadas con aire, el radical AAPH reacciona con el oxígeno dando paso a un radical peroxilo más estable. La pérdida de fluorescencia por parte de la fluoresceína es un indicador de que está sufriendo un daño oxidativo (**Figura 11-B**). Por otra parte, la prolongación de la fluorescencia

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

indica que en la solución se encuentran moléculas que la protegen del daño causado por el ataque de los radicales, ya que en presencia de un antioxidante, ROO^\cdot capta un átomo de hidrógeno del antioxidante estable (**Figura 11-C**) (Huang *et al.*, 2002). El ensayo mide el área de la curva de decaimiento de la fluorescencia en el tiempo, causada por la oxidación de la fluoresceína, y los resultados se expresan en unidades de μmol de Trolox[®]/g de sustancia, medida que resulta de la comparación entre el área de las muestras analizadas y las áreas obtenidas de una curva de calibración de Trolox[®], análogo sintético de la vitamina E, usado como referencia en los ensayos de evaluación de la actividad antioxidante (Guohya, Helaine y Cutler, 1993).

1.7.4. Ensayo de decoloración del catión-radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$. El ensayo de decoloración del catión-radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ es un método de evaluación de la actividad antioxidante de un compuesto. Los primeros ensayos de $\text{ABTS}^{+\cdot}$ se basaban en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para generar un catión-radical, en presencia o ausencia de un antioxidante. Sin embargo, una versión mejorada del ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual, el radical se genera en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Figura 12) (Re *et al.*, 1999).

El $\text{ABTS}^{+\cdot}$ es un cromógeno artificial, *i.e.*, compuesto incoloro, que bajo oxidación da origen a compuestos coloreados, que presentan un espectro ultravioleta (UV) con tres máximos de absorbancia a $\lambda = 414, 752$ y 842 nm, en medio acuoso, y a $\lambda=414, 783, 873$ nm, en medio etanólico (Nenadis, Wang, Tsimidou y Zhang, 2004). La reducción del catión-radical varía, según la concentración del compuesto antioxidante y el tiempo de reacción. Mediante el grado de decoloración, se conoce el porcentaje de inhibición del catión-radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$, que, se calcula con respecto a la concentración de Trolox[®] utilizado como estándar y referencia (Arnao, 2000).

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

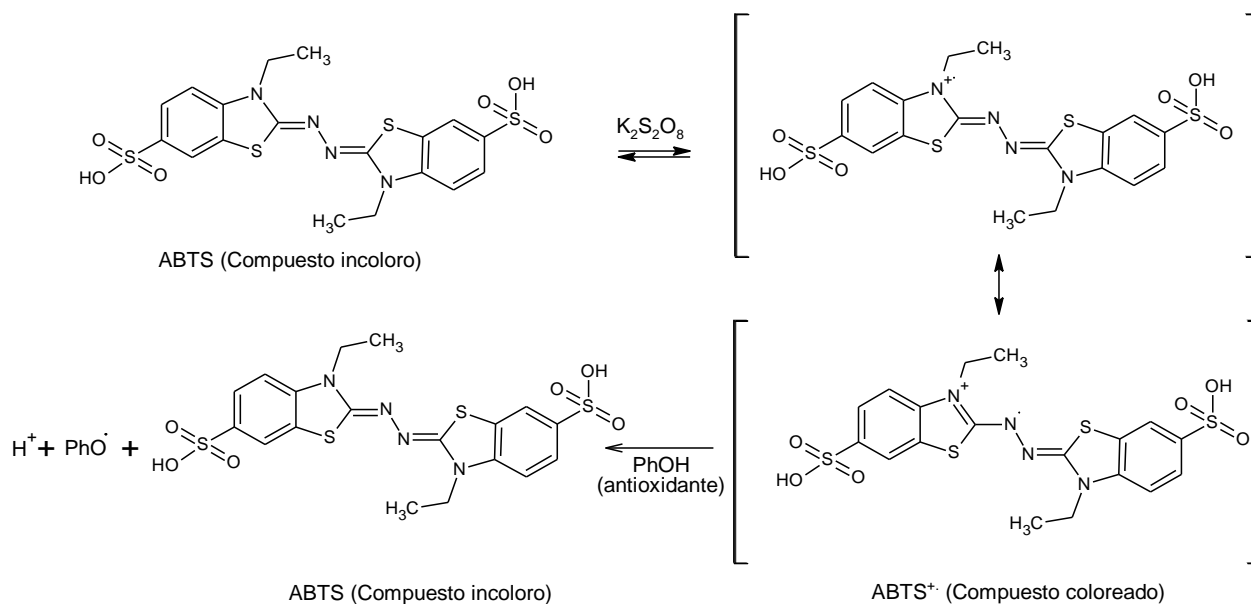


Figura 12. Proceso de oxidación-reducción del ABTS en el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}.

2. Cienciometría

La información presentada en las **Figuras 13 y 14**, se obtuvo usando la base de datos *Scopus (Elsevier)* y refleja el número de publicaciones y áreas de estudio, realizadas sobre plantas del género *Salvia* desde el año 1996.

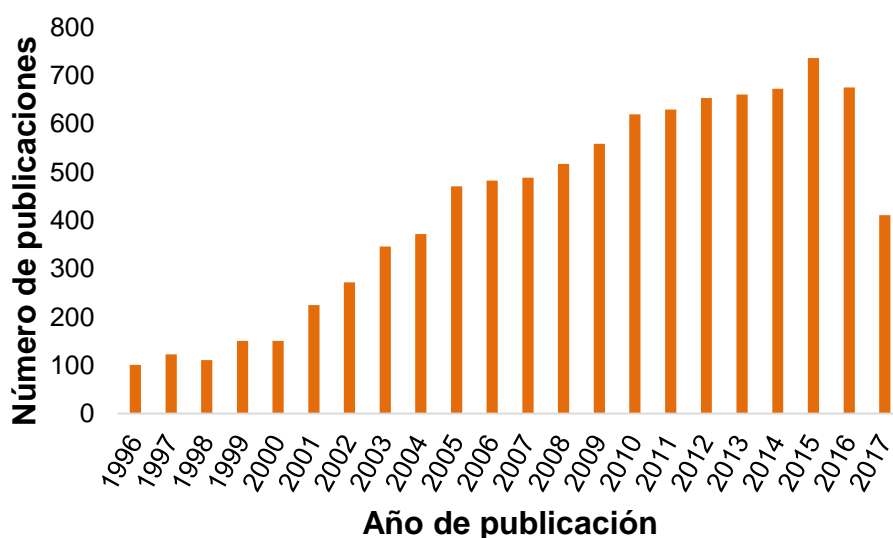


Figura 13. Relación de publicaciones por año. Fecha de búsqueda: 5 de septiembre de 2017.

Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Período de observación: 1996-2017. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY ("Salvia")*.

En la **Figura 13**, se muestra la relación de publicaciones científicas durante los últimos 21 años: se encontró un total de 9433 artículos. La cantidad de artículos publicados aumentó y logró su punto más alto en los años 2010-2016; la mayoría de reportes corresponden al estudio de la actividad biológica del género *Salvia* como antifúngica (Tan *et al.*, 2016), antibacteriana y

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

antioxidante (Adrar, Oukil y Bedjou, 2016)., genotóxica (Sevindik y Rencuzogullari, 2014). Las especies más estudiadas son *S. multiorrhiza* (4251 documentos) y *S. officinalis* (1634 documentos), plantas usadas como medicinales en las prácticas etnobotánicas tradicionales en China y en Europa, respectivamente. Los países con mayor número de reportes sobre *salvias* son China (3192), Estados Unidos (1373), Turquía (554) e Irán (486). México (208) y Brasil (173) son los países latinoamericanos que más estudios sobre plantas del género *Salvia* presentan; se ha estudiado la composición química y las actividades biológicas de sus plantas endémicas como *S. elegans* (Herrera *et al.*, 2006), *S. divinorum* (Simón-Arceo, 2017), *S. hispánica* (Rosas-Ramírez, 2017) y *S. lachnostachys* (Oliveira, Salvador, de Carvalho, Santos y Stefanello, 2016). Colombia tiene un total de 28 artículos de investigación sobre *salvias*, de los cuales nueve reportan la composición química o actividad biológica de los AE o extractos de plantas endémicas como *S. bogotensis* (Vega y Pérez, 2006), *S. palaefolia* (García-Rojas *et al.*, 2010), *S. scutellaroides* (Ramírez, Palacios y Gutiérrez, 2007). No obstante, Fernandez Alonso y Rivera (2005)., reportan la identificación de 83 taxones de *salvias* en Colombia, de los cuales, 78 son nativos; hecho que indica que el estudio de compuestos químicos presentes en *salvias* nativas de Colombia y la evaluación de sus actividades biológicas es un campo de investigación por desarrollar.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

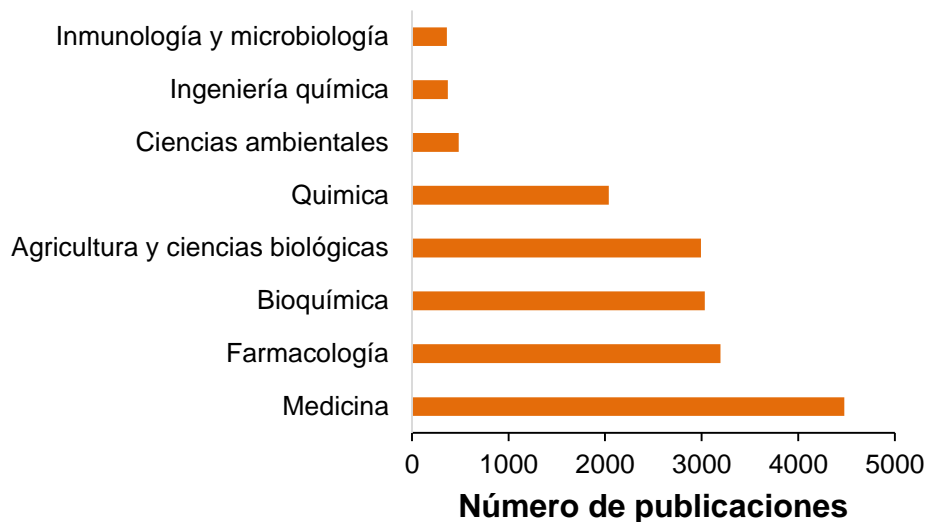


Figura 14. Relación de publicaciones, según el área de estudio. Fecha de búsqueda: 5 de septiembre de 2017. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Período de observación: 1996-2017. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY* (“*salvia*”).

En la Figura 14, se observa que los estudios sobre el género *Salvia* se han enfocado, principalmente, en la identificación y evaluación de las propiedades biológicas de sus componentes químicos aislados con miras a aplicaciones medicinales. Los resultados más comunes muestran que estas plantas presentan propiedades útiles en el tratamiento y la prevención de enfermedades como la gastritis (Li *et al.*, 2015), la diabetes (Hasanein, Falehgar y Emamjomeh, 2016) y afecciones cutáneas (Salimikia, Aryanpour, Bahramsoltani, Abdollahi y Abdolghaffari, 2016).

Uno de los campos de estudio más relevantes es la evaluación de la capacidad antioxidante de sus extractos obtenidos con CO₂ (SFE) e hidroalcohólicos, y la determinación de las condiciones de extracción en las que se registran mejores resultados. Generalmente, los métodos de evaluación usados se han basado en reacciones de transferencia de un electrón o átomo de

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

hidrógeno por parte de los metabolitos secundarios a un compuesto oxidante (Becker, Nissen y Skibsted, 2004). Šulniūtė *et. al.* (2016) estudiaron diez especies de *Salvia* y reportaron que la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos fue significativamente mayor que la de los extractos obtenidos con fluido supercrítico; los autores concluyeron que la mayoría de los metabolitos secundarios responsables de esta actividad eran polifenoles, y que el uso de solventes polares en la extracción favorecía la obtención selectiva de compuestos con actividad antioxidante.

La agricultura y las ciencias biológicas son áreas en las que se ha desarrollado un gran número de investigaciones (3000, aproximadamente). Se han estudiado los efectos de las condiciones de cultivo y los cambios de estado fenológico en el rendimiento y la calidad de los AE y los extractos de las plantas del género *Salvia*, *e.g.*, *S. lavandulifolia*, en el estado de floración, tiene la cantidad de terpenoides oxigenados más alta, y una actividad antioxidante mayor del aceite esencial (Porres, Gonzales, Carretero y Gómez, 2014).

Al usar como ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY* (“*salvia*”) *AND TITLE-ABS-KEY* (“*aratocensis*”), en la base de datos *Scopus* (Elsevier), solo se obtuvo un artículo (Adrar *et al.*, 2016) publicado en el año 2011; en el cual se reporta la actividad anti-micobacteriana del aceite esencial de la *S. aratocensis*. No obstante, existen otros estudios sobre esta planta. Cala *et al.* (Cala *et al.*, 2007) evaluaron la actividad antioxidante del extracto de *S. aratocensis*, usando el ensayo de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y la medición de contenido total de fenoles mediante el método de Folin-Ciocalteu. Obtuvieron valores de actividad antioxidante correspondientes a un décimo de los registrados para la vitamina E. Pese a los datos obtenidos, no descartaron el uso de esta planta como promisorio para el aislamiento de sustancias fenólicas con actividad antioxidante. Por otra parte, Gaitán (2011), realizó la

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto obtenido mediante extracción por fluido supercrítico (CO₂) y en el aceite esencial: los compuestos mayoritarios encontrados fueron *epi-α-cadinol* (34.5%), 1,10-di-*epi-cubenol* (22.4%) y *γ-cadineno* (11.9%).

De lo mostrado en la evaluación cuantitativa, se concluye que la investigación sobre *salvias* endémicas colombianas es deficiente pese a que estas plantas pueden ser una alternativa para la producción de moléculas con potencial en aplicaciones médicas, farmacéuticas y agroindustriales. Los compuestos químicos presentes en los AE y extractos de *S. aratocensis* poseen propiedades antioxidantes y antifúngicas, que requieren estudios más rigurosos en los que se analicen los efectos producidos por variables como el estado de desarrollo fenológico y el método de extracción. Es necesario identificar las moléculas presentes en los AE y extractos y establecer los efectos de los componentes mayoritarios sobre las actividades biológicas reportadas.

3. Desarrollo experimental

La **Figura 15** muestra el esquema general de la metodología y etapas del trabajo investigativo.

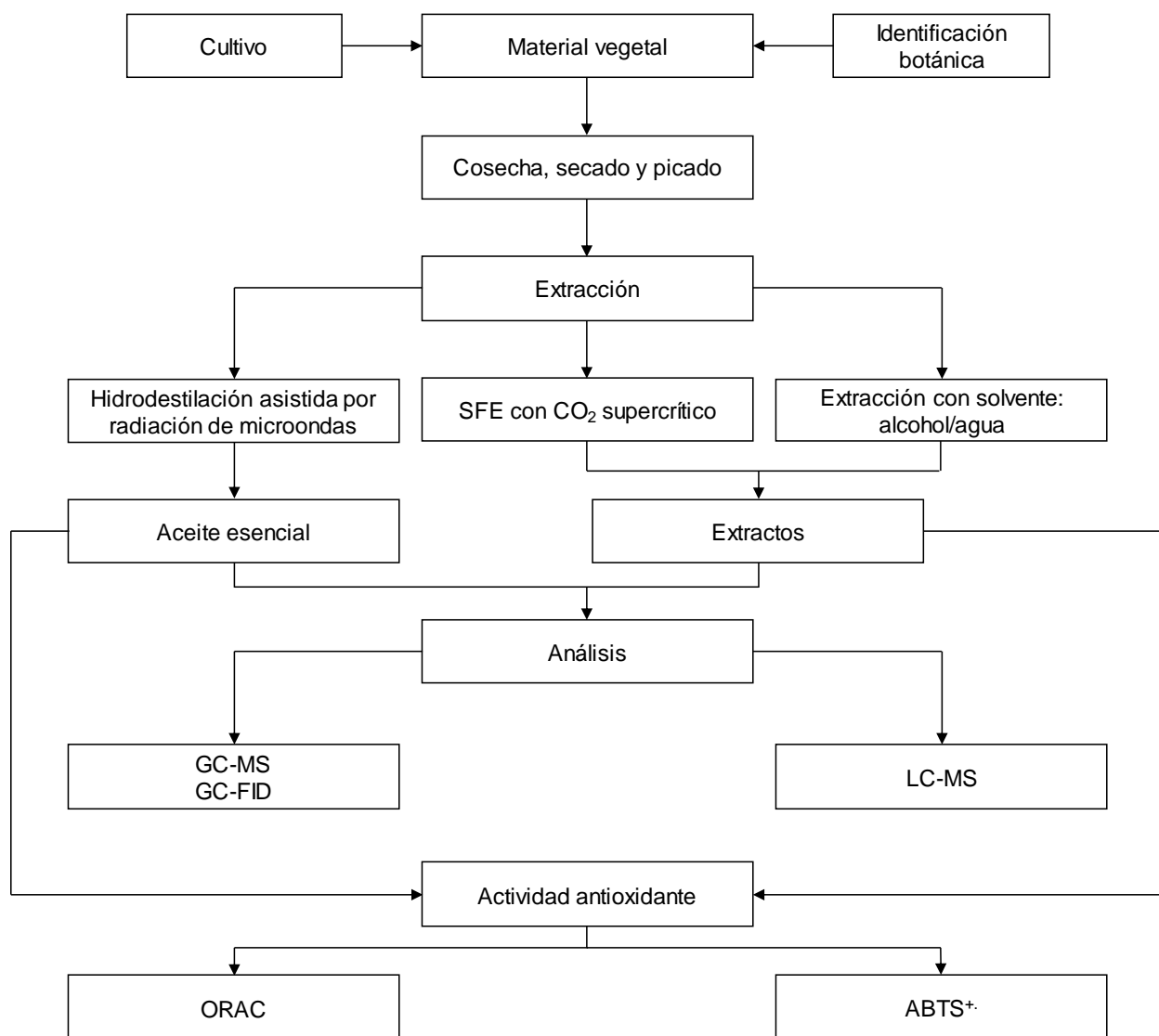


Figura 15. Esquema de la metodología general de trabajo

3.1. Reactivos, solventes, materiales y equipos

Los reactivos, solventes, materiales y equipos auxiliares de laboratorio utilizados durante el desarrollo de este trabajo de investigación, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

Reactivos, solventes, materiales y equipos auxiliares.

NOMBRE	ESPECIFICACIONES
Reactivos	
Sulfato de sodio	Anhidro; <i>J.T. Baker</i> (Phillisburgh, NJ, EE.UU.)
<i>n</i> -Tetradecano	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (Milwaukee, WI, EE.UU.)
Trolox [®]	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
α -Tocoferol	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
Butil hidroxitolueno	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
ABTS	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
AAPH	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
Persulfato de sodio	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
Fluoresceína	<i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
Fosfato dipotásico	Pureza: 99,1%; <i>J.T. Baker</i> (Phillisburg, NJ, EE.UU.)
Acetato de sodio	Pureza 99,95%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
Kaempferol	Pureza 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.)
Solventes	
Diclorometano	Grado analítico; <i>Merck</i> (Darmstadt; Alemania)
Etanol	Pureza 99.8%; <i>J.T. Baker</i> (Phillisburg, NJ, EE.UU.)
Metanol	Pureza 99.8%; <i>J.T. Baker</i> (Phillisburg, NJ, EE.UU.)
Materiales y equipos auxiliares de laboratorio	
Viales cromatográficos	2 mL; <i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, CA, EE. UU.)

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Micropipetas	2-20, “0-200, 100-1000 μ L; <i>Brand</i> (Wertheim, Alemania)
Frascos ámbar	2 y 4 mL

Tabla 2. Continuación

Consumibles	Cónicos, jeringas plásticas 10 mL, <i>septa</i> y microviales
Balones aforados	2, 5, 25, 100 mL; <i>Scott</i> (Lubbock, TX, EE.UU.)
Vasos de precipitados	59, 100, 250 mL; <i>Scott</i> (Lubbock, TX, EE.UU.)
<i>Transferpipette</i>	Multicanal, 10-200 μ L; <i>Brand</i> (Wertheim, Alemania)
Microplacas	96 pozos; <i>Thermo Fisher Scientific</i> (Sunnyvale, CA, EE.UU.)
Lector de microplacas	<i>Turner Biosystems Inc.</i> , <i>Modulus TM II Microplate Multimode Reader</i> (Sunnyvale, CA, EE.UU.)
Balanza analítica	<i>Mettler Toledo</i> PB 1502-S (Nänicon, Suiza)
Baño de ultrasonido	<i>Elmasonic</i> E30H (Elma, Alemania)
<i>Minishaker</i>	<i>IKA</i> (Hofheim, Alemania)
Equipo de hidrodestilación	Balón fondo redondo (2L), reductor 45/50 a 24/40, alargadera, trampa tipo <i>Dean-Stark</i> , condensadores de bolas y espiral.
Rotaevaporador	Balón fondo redondo (250 mL), Equipo <i>Heidolph</i> G1 (Schwabach, Alemania)

3.2. Identificación botánica

La identificación botánica de la especie bajo estudio se llevó a cabo en el Herbario Nacional del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por el doctor José Luis Fernández Alonso, bajo el número de colecta 517740. Los resultados de la identificación se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3.

Identificación botánica

Género	Especie	Subespecie	Familia
<i>Salvia</i>	<i>aratocensis</i>	<i>suratensis</i>	Lamiaceae

3.3. Propagación del material vegetal

La *S. aratocensis* se propagó por vía asexual, a partir de esquejes obtenidos de plantas cultivadas en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM, UIS, Bucaramanga). La propagación se realizó en bandejas plásticas y se usó *compost* como sustrato. Las plántulas propagadas se trasplantaron al suelo un mes después. Se plantaron 300 esquejes, de los cuales, 60 (20%) dieron paso a la formación de plantas nuevas. El cultivo se realizó por surcos, distanciados entre sí por 40 cm; distancia entre plantas, 30 cm, en un área de 7,5 m² (2,5 m x 3,0 m), a una altura aproximada de 959 m.s.n.m. con coordenadas, latitud, 7°08'25.9'' norte, longitud, 73°06'57,4'' oeste.

3.4. Recolección del material vegetal

La recolección del material vegetal se realizó en tres periodos de crecimiento de las plantas, a saber: 1. Prefloración; doce semanas de edad; 2. Floración; 24 semanas; y 3. Post-floración; 32 semanas. En los tres casos, se cortaron las partes aéreas y se separaron las hojas de los tallos y las inflorescencias.

3.5. Secado del material vegetal

El proceso de secado se realizó en un vivero de secado, a la sombra, ubicado en las instalaciones del CENIVAM (UIS, Campus principal, Bucaramanga). Las hojas intactas (*ca.* 3 kg por periodo

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

de crecimiento), se colocaron sobre bandejas forradas con papel periódico. Se monitoreó la pérdida de agua del material vegetal (ca. 1 kg) por un periodo de 30 días y con los resultados obtenidos se construyó una curva de secado, según la Ecuación 1.

$$\text{Material vegetal, \%} = 100 - \left[\left(\frac{w_x}{w_i} \right) \times 100 \right] \text{ Ecuación 1.}$$

w_x : Peso equivalente a la pérdida de agua diaria, g.

w_i : Peso inicial del material vegetal, g.

3.6. Picado y tamizado del material vegetal

El material vegetal se trituró en una licuadora *Oster® Heritage Blend™* 400, luego, se tamizó en una malla con tamaño de poro de 2 mm.

3.7. Extracción de los metabolitos secundarios

3.7.1. Obtención del aceite esencial. El AE de *S. aratocensis* se obtuvo mediante MWHD; se usó un horno microondas *Samsung* modelo AMW0113M con potencia de salida de 1200 W y frecuencia de radiación 2.5 GHz, acoplado a un aparato *Clevenger* con trampa *Dean-Stark*. En un balón de fondo redondo de dos litros, se adicionaron 230 g de material vegetal seco, picado y tamizado, junto con 300 mL de agua; la mezcla, se sometió a radiación de microondas con potencia de 720 W, en tres sesiones de 15 min, con intervalos de un minuto. La humedad se retiró del AE con Na_2SO_4 anhidro. El proceso se realizó por triplicado.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

3.7.2. Obtención de extractos. *3.7.2.1. Extracción con fluido supercrítico.* La extracción con CO₂ supercrítico se realizó en un equipo a escala piloto *Thar SFE-2000-2-FMC50* (*Thar Instruments*, Inc. Pittsburgh, PA, EE.UU.), equipado con dos cámaras extractoras de 0,42 m de alto, el diámetro interno de 0,076 m y el volumen de 0,002 m³. Las cámaras estaban conectadas a dos colectores en serie, cada uno con una capacidad de 5×10^{-4} m³, con controles de temperatura y de presión (Figura 16). Para la extracción, se cargaron 350 g de material vegetal seco y molido en un recipiente de malla metálica con poros de 0,2 mm; el volumen del recipiente fue de $1,78 \times 10^{-3}$ m³. La pureza del CO₂ fue del 95,5%, se encontraba enfriado a 4°C, y, por medio de una bomba de desplazamiento positivo, fue comprimido en las cámaras de extracción hasta alcanzar la presión de operación de 8 y 4 MPa en cada una de las cámaras. Se obtuvieron dos fracciones, una por cada cámara. La fracción obtenida con presión de 4 MPa se denominó fracción uno (F1), y la obtenida a 8 MPa, fracción 2 (F2).

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN



Figura 16. Equipo de extracción con fluido supercrítico: *Thar SFE-2000-2-FMC50*. CENIVAM. UIS. Bucaramanga, 31 de octubre de 2017.

3.7.2.2. *Extracción hidroalcohólica asistida por ultrasonido*. Las condiciones de extracción se establecieron usando un diseño experimental 2^4 ; como variables se tomaron las siguientes: volumen del solvente, la composición (agua/etanol) del solvente, temperatura de extracción y tiempo de extracción; la cantidad de material se mantuvo constante (*ca.* un gramo). El observable fue la actividad antioxidante de los extractos. La **Tabla 4** muestra las variables y los niveles evaluados en el diseño experimental utilizado para las extracciones hidroalcohólicas.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Tabla 4.

Variables y niveles evaluados en el diseño factorial 2⁴ para las extracciones hidroalcohólicas de S. aratocensis.

Variable	Niveles		
	-1	0	1
Concentración de etanol en solvente, % (v/v)	100	70	50
Volumen de solvente, mL	20	30	40
Temperatura, °C	30	40	50
Tiempo, min	20	40	60

3.8. Análisis cromatográfico

3.8.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La separación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial y la fracción volátil de los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico, se realizaron en un equipo GC *Agilent Technologies* (AT) 6890 Plus (Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas MSD AT 5973 *Network* (**Figura 17**). La separación de los compuestos de las mezclas se llevó a cabo en dos columnas capilares, una con fase estacionaria apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 µm d_f; y la otra polar, de poli(etilenglicol) (DB-WAX, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 µm d_f; en ellas, se empleó helio (99,995%, Linde, Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre, con presión de entrada de 11,3 MPa. La temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C, modo de inyección *split* (30:1). La temperatura del horno se programó de 45 a 150 °C, a 4 °C/min, luego se aumentó de 150 a 250 °C (5 min), finalmente, subió a 275 °C (15 min), a 10 °C/min. La velocidad lineal media del gas

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

fue de 26 cm/s. La temperatura de la línea de transferencia se mantuvo a 285 °C, la fuente de ionización a 230 °C, mientras que el cuadrupolo, a 150 °C. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI), con energía de 70 eV, con un barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*) de 3,58 *scans/s*, en un rango de masas de m/z 45-450. Los compuestos del AE se identificaron por comparación de sus espectros de masas experimentales y los índices de retención lineales (IRL), con los de las bases de datos (ADAMS, NIST y WILEY) y reportados en la literatura científica (Adams, 2005), (Babushok, Linstrom y Zenkevich, 2011). Para calcular los índices de retención lineal (IRL), se emplearon los tiempos de retención de de *n*-parafinas, C₁₀-C₂₅, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras. El cálculo se realizó mediante la **Ecuación 2** (Stashenko y Martínez, 2010).



Figura 17. Cromatógrafo de gases AT 6890 Plus acoplado a un detector selectivo de masas AT MSD 5973 Network. Fuente: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, 9 de septiembre de 2015.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

$$IRL = (100 \times N) + 100 \left(\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right) \text{ Ecuación 2}$$

N: Número de átomos de carbono de la *n*-parafina que eluye antes del compuesto de interés.

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

t_{Rn} : Tiempo de retención de la *n*-parafina que eluyen antes del compuesto de interés.

t_{RN} . Tiempo de retención de la *n*-parafina que eluye después del compuesto de interés.

3.8.2. Cromatografía de gases con detector de ionización en llama. La cuantificación de los componentes del AE, se llevó a cabo por estandarización interna con *n*-tetradecano como patrón interno, según la Ecuación 3 (Stashenko y Martínez, 2009)., en un cromatógrafo de gases AT 6890N (Palo Alto, California, EE. UU.), acoplado a un detector de ionización en llama. La separación de los analitos se llevó a cabo en una columna capilar con fase estacionaria apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 μ m, d_f , empleando helio como gas de arrastre (1 mL/min). Se inyectó 1 μ L de la muestra en modo *split* (1:30). La temperatura en el puerto de inyección fue de 250 °C. El método cromatográfico, *i.e.*, la programación de temperatura del horno, fue igual al descrito para el análisis por GC-MS (Sección 3.8.1). El análisis de cada muestra se realizó por triplicado.

$$C_x = C_{ISTD} \times \left(\frac{A_x}{A_{ISTD}} \right) \text{ Ecuación 3}$$

C_x : Concentración (g/L) del compuesto en el AE.

C_{ISTD} : Concentración (g/L) de *n*-tetradecano.

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

A_{ISTD} : Área (en cuentas) del pico cromatográfico correspondiente al *n*-tetradecano.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

3.8.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas Orbitrap con interfaz de electronebulización. El análisis de flavonoides extraídos con SFE y con solvente (SE), se realizó mediante cromatografía líquida, en un cromatógrafo líquido de ultra alta presión (UHPLC) *Dionex Ultimate 3000* (*Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE.UU.), equipado con una bomba binaria de gradiente (HPG3400RS), un inyector automático de muestras (WPS300TRS) y una unidad termostada para la columna (TCC3000). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna *Hypersil GOLD Aq* (*Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE.UU.) de 10 cm x 2.1 mm x 1.9 μm de tamaño de partícula), a 30 °C. Las siguientes fueron condiciones cromatográficas: 1. Fase móvil A: agua con ácido fórmico (0.2%) y 2. Fase móvil B: acetonitrilo con ácido fórmico (0.2%). El cromatógrafo líquido se conectó a un espectrómetro de masas *Orbitrap* (*Exactive Plus*, *Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE.UU.) (Figura 18), a través de una interfaz de electronebulización (ESI, por sus siglas en inglés), operada en modo positivo, con voltaje capilar de 4000 V. Se usó nitrógeno como gas nebulizador y secante. El voltaje de fragmentación en la celda de colisiones activadas fue de 30 eV. Los datos obtenidos se analizaron con el *software Xcalibur* de *Thermo Fisher Scientific* (Versión 2.1.0-2.3.0).



Figura 18. Cromatógrafo líquido UHPLC *Dionex UltiMate 3000*, acoplado a espectrómetro de masas *Orbitrap Exactive Plus*, con interfaz de electronebulización. CENIVAM, Laboratorio Alexander Makarov. UIS. Bucaramanga, 12 de junio de 2017.

3.9. Evaluación de la capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante de los AE y extractos, se realizó por medio de dos ensayos, a saber: 1. Decoloración de catión-radical $ABTS^{+}$; 2. Capacidad de absorción de los radicales de oxígeno para compuestos hidrofílicos (ORAC-H). La medición de la capacidad anti-radicalaria de los compuestos de referencia (α -tocoferol y Trolox[®]), el AE y los extractos de *S. aratocensis*, se llevó a cabo en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc. Modulus TM II Microplate Multimode Reader* (Turner BioSystems, Inc., Sunnyvale, CA, EE.UU.) (Figura 19) con microplacas en poli(estireno) de 96 pozos, provisto de un módulo de absorbancia UV-Vis y

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

un módulo de fluorescencia con filtros que manejan longitudes de onda de $\lambda=490$ nm de excitación y $\lambda=510-570$ nm de emisión (Cao, Alessio y Cutler, 1993).



Figura 19. Lector de microplacas Turner Biosystems Inc. Modulus TM II Microplate Multimode Reader. CENIVAM, UIS. Laboratorio J. J. Thomson. Bucaramanga, 17 de enero de 2017.

3.9.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺. Se preparó una solución de ABTS (7 mM) y se mezcló con una solución de persulfato de potasio (2.45 mM) para obtener una solución del catión-radical ABTS⁺. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 24 h, a 4 °C, en ausencia de luz. Luego, se prepararon las respectivas soluciones de trabajo, cuya absorbancia fue de 0.701 ± 0.003 , que se adicionaron a las diluciones de las muestras y sustancias de referencia hasta lograr una inhibición entre el 10 y el 80 % del blanco de absorbancia, según la Ecuación 4.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Las mediciones se realizaron ajustando el módulo de absorbancia UV-Vis a una longitud de onda $\lambda=750$ nm. Cada muestra se evaluó por triplicado.

$$\text{Inhibición (\%)} = 1 - \frac{A_f}{A_0} \quad \text{Ecuación 4}$$

A_0 : Absorbancia inicial del blanco.

A_f : Absorbancia medida 30 min después de adicionar la muestra.

Los valores de la capacidad antioxidante se determinaron por medio de una curva de calibración de Trolox[®], y se expresaron como $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra. Para determinar los valores ORAC, se utilizaron las curvas de calibración de Trolox[®]. Dicho valor se obtuvo del área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia, que resultó de la diferencia entre la respuesta en términos de la capacidad antioxidante de una muestra analizada y la de un blanco. Los resultados se expresaron en unidades de $\mu\text{mol de Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia.

3.9.2. Capacidad de absorción de los radicales de oxígeno. Para el ensayo con antioxidantes hidrofílicos, se adicionó fluoresceína a cinco diluciones de las muestras con concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 ppm. Las mezclas se agitaron e incubaron a 37 °C durante 15 min. Posteriormente, se adicionó una solución previamente preparada de AAPH [108]. Los datos se analizaron con un macro en *Microsoft Excel*[®] desarrollado en CENIVAM. El análisis de cada muestra se realizó por triplicado.

4. Resultados y discusión

4.1. Secado del material vegetal

Las hojas de *S. aratocensis* se sometieron a un proceso de secado a la sombra durante 30 días y se obtuvieron los datos experimentales del registro de pérdida en masa del material vegetal. La **Figura 20** muestra la disminución del porcentaje en masa del material vegetal por la pérdida diaria de agua (**Ecuación 1, Sección 3.5.**).

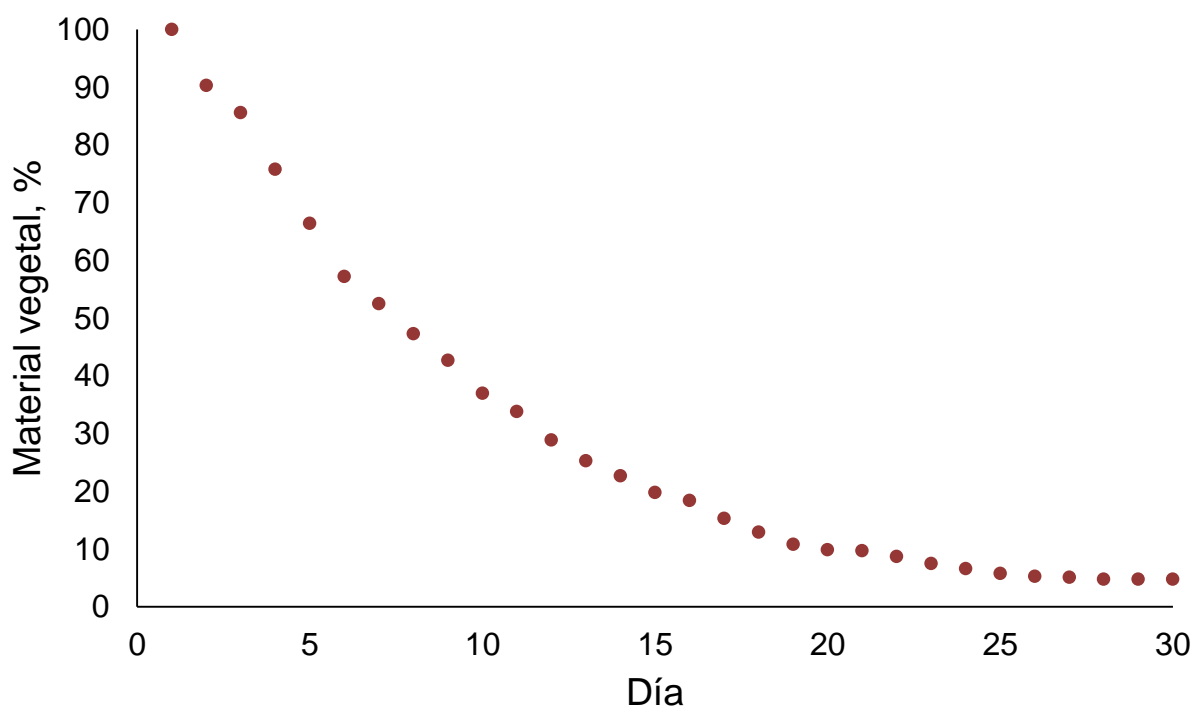


Figura 20. Curva de secado de material vegetal de *S. aratocensis*.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

En el día 30, al finalizar el proceso de secado, la masa del material vegetal se redujo hasta un 4.8% respecto al peso registrado el día 1, es decir, hubo una reducción de masa del 95.2%, se supone este valor como el correspondiente al porcentaje de agua contenido en el material vegetal en el momento de recolección.

4.2. Extracción de los aceites esenciales

Los AE obtenidos presentaron una coloración amarilla opaca, una textura viscosa y un olor amargo y fuerte. En la **Tabla 5**, se muestran los rendimientos (% p/p) de la extracción de AE de las hojas secas de *S. aratocensis*, obtenidos mediante MWHD, a partir de plantas en diferentes estados fenológicos, *i.e.*, prefloración, floración y post-floración.

Tabla 5.

Rendimientos de extracción de los AE de S. aratocensis, recolectada en diferentes estados fenológicos.

Estado de desarrollo	AE, g			Rendimiento, % ± s
	Extracción			
	1	2	3	
Prefloración	0.86	0.80	0.88	0.23 ± 0.01
Floración	0.83	0.87	0.89	0.23 ± 0.01
Post-floración	0.88	0.83	0.85	0.22 ± 0.01

El rendimiento de extracción del AE de *S. aratocensis* no cambió significativamente durante los periodos de desarrollo evaluados. Los rendimientos fueron relativamente bajos respecto a los

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

reportados en la literatura para plantas del mismo género, por ejemplo, *S. tomentosa* Miller (0.51%) (Tepe, Daferera, Sokmen, Sokmen y Polissiou, 2005), *S. libanolica* (0.93%) (Farhat, Affara, Gali-Muhtasib, 2001), y *S. officinalis* (1.9%) (Perry *et al.*, 1999).

4.3. Caracterización química de los aceites esenciales de *S. aratocensis*

La identificación por GC-MS de los compuestos presentes en el AE se realizó según los siguientes parámetros de integración: umbral de integración (*threshold*) de 18 y área de rechazo del pico sobre la línea base de 0.1.

La cantidad de compuestos identificados fue distinta para cada estado de desarrollo estudiado; en prefloración, se identificaron 28 compuestos (con cantidad relativa superior al 0,5%), equivalentes al 94.8% del área cromatográfica total, en floración, 31 (95.8%) y en post-floración, 25 (96.5%). Los componentes mayoritarios para los tres estados fenológicos fueron los mismos; las diferencias en composición se presentaron para sustancias cuya área cromatográfica fue menor del 2%. (Tabla 6). Los perfiles cromatográficos de los AE obtenidos, se muestran en las Figuras 21-23.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Tabla 6.

Composición de los AE de *S. aratocensis* obtenidos por MWHHD de plantas en los estados de prefloración, floración y post-floración.

Compuesto	Tipo	Indices de retención lineal (IRL)				Concentración en el AE (mg/g) (\pm s; n = 3)			
		DB-5MS		DB-WAX		Estado fenológico			
		Exp.	(Adams, 2005)	Exp.	(Babushok, 2011)	Prefloración	Floración	Post-floración	
1	Menta-1,5,8-trieno	M	1326	1328	1403	1411	-	6.1 \pm 0.7	6.5 \pm 0.9
2	Isoledeno	S	1362	1374	-	-	0.52 \pm 0.01	0.51 \pm 0.01	-
3	β -Burboneno	S	1395	1390	1516	1515	2.3 \pm 0.5	1.6 \pm 0.4	-
4	β -Elemeno	S	1397	1392	1578	1590	4.4 \pm 0.1	4.40 \pm 0.05	-
5	α -Cubebene	S	1401	1396	1453	1460	-	-	2.84 \pm 0.07
6	<i>trans</i> - β -Cariofileno	S	1434	1431	1595	1597	20.7 \pm 0.4	18.6 \pm 0.1	10.4 \pm 0.7
7	Himachala-2,4-dieno	S	1437	1434	1654	1663	5.67 \pm 0.08	5.20 \pm 0.05	-
8	β -Cedreno	S	1439	1428	1599	1606	-	-	3.7 \pm 0.3
9	Guaia-6,9-dieno	S	1452	1444	-	-	0.6 \pm 0.1	-	-
10	<i>trans</i> - β -Farneseno	S	1454	1450	1654	1663	-	-	2.3 \pm 0.3
11	<i>trans</i> -Muuro-la-3,5-dieno	S	1457	1453	1650	1664	13.7 \pm 0.2	10.0 \pm 0.1	-
12	α -Humuleno	S	1468	1462	1658	1666	10.6 \pm 0.1	9.8 \pm 0.1	5.6 \pm 0.6
13	<i>trans</i> -Muuro-la-4,5-dieno	S	1475	1485	1686	1692	35.4 \pm 0.5	36.1 \pm 0.4	26 \pm 3

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Tabla 6. *Continuación.*

14	β -Acoradieno	S	1478	1469	1694	1687	-	2.8 ± 0.2	-
15	α -Neocalitropseno	S	1487	1476	1715	1703	7.87 ± 0.08	8.10 ± 0.08	5.6 ± 0.9
16	Germacreno D	S	1494	1485	1722	1712	33.6 ± 0.4	29.6 ± 0.1	22 ± 3
17	<i>trans</i> - β -Guayeno	S	1499	1499	-	1532	-	-	3.7 ± 0.6
18	Valenceno	S	1500	1496	1739	1728	5.65 ± 0.05	4.92 ± 0.04	-
19	Premnaspirodieno	S	1502	1501	-	-	1.83 ± 0.03	0.74 ± 0.06	-
20	Epizonareno	S	1505	1505	1683	1672	-	0.56 ± 0.02	-
21	Biciclogermacreno	S	1508	1500	1742	1734	2.40 ± 0.04	0.82 ± 0.01	-
22	Germacreno A	S	1516	1506	1759	1747	7.0 ± 0.1	7.8 ± 0.8	-
23	γ -Cadineno	S	1526	1530	1771	1765	105 ± 1	104 ± 1	92 ± 6
24	<i>trans</i> -Calameneno	S	1532	1532	1843	1839	7.9 ± 1	9.6 ± 0.1	7.4 ± 0.1
25	10- <i>epi</i> -Cubebol	SO	1541	1535	-	1900	-	-	7.5 ± 0.6
26	α -Cadineno	S	1548	1538	1786	1779	7.9 ± 1	9.25 ± 0.08	6.7 ± 0.3
27	γ -Selineno	S	1550	1530	1732	1725	-	-	2.4 ± 0.2
28	<i>trans</i> -Dauca-4,7-dieno	S	1551	1556	1793	-	3.41 ± 0.09	3.03 ± 0.01	-
29	Elemol	SO	1559	1562	-	2078	2.60 ± 0.07	3.7 ± 0.9	1.9 ± 0.4

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Tabla 6. *Continuación*

30	Germacreno-B	S	1574	1569	1831	1823	0.20 ± 0.04	0.3 ± 0.04	-
31	Glenol	SO	1608	1599	2064	2051	2.99 ± 0.08	3.3 ± 0.2	1.9 ± 0.3
32	1-10-di- <i>epi</i> -Cubenol	SO	1633	1633	2070	2074	221 ± 6	224 ± 5	230 ± 15
33	τ -Cadinol	SO	1661	1653	2181	2169	420 ± 15	420 ± 10	480 ± 18
34	Cariofila-3,13-dien-5- β -ol	SO	1667	1656	2279	2301	-	8.6 ± 0.2	19 ± 4
35	α -Cadinol	SO	1671	1669	2242	2227	5.0 ± 0.2	4.9 ± 0.3	5.6 ± 0.3
36	Valeranona	SO	1694	1684	2129	2145	10.5 ± 0.4	10.3 ± 0.2	-
37	α -Bisabolol	SO	1697	1685	2222	2213	8.6 ± 0.4	8.2 ± 0.3	-

M: Monoterpeno, **S:** Sesquiterpeno, **SO:** Sesquiterpeno oxigenado

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

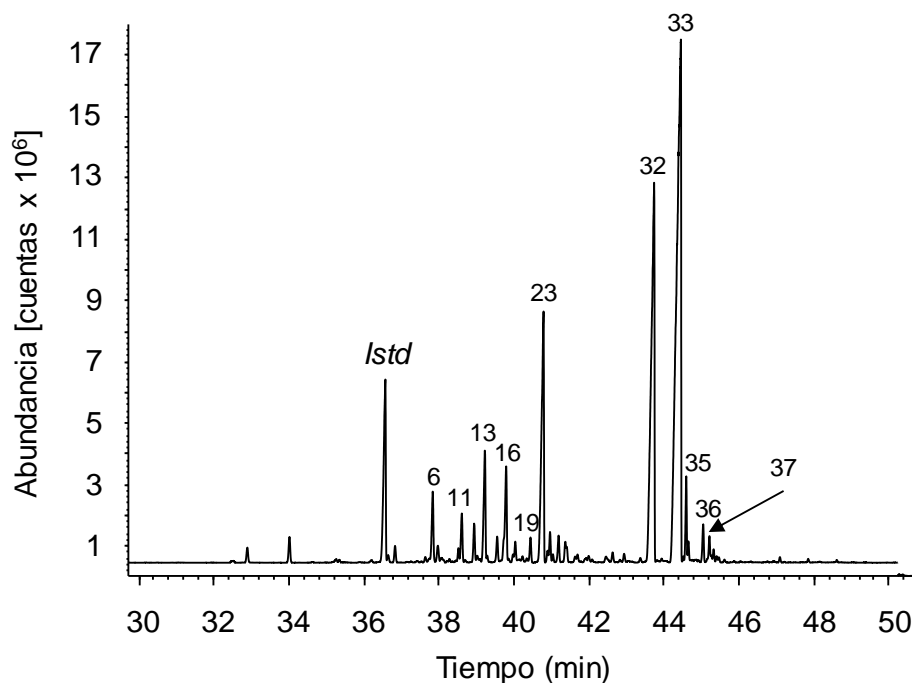


Figura 21. Perfil cromatográfico del AE de *S. aratocensis* obtenido de plantas en estado de prefloración. Columna DB-5MS, 60 m. Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).

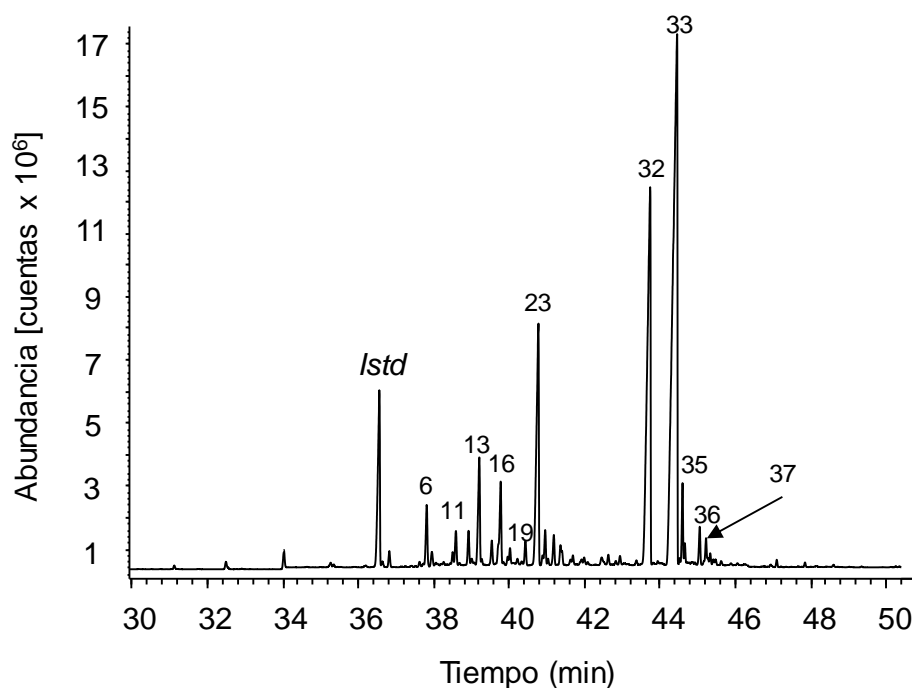


Figura 22. Perfil cromatográfico del AE de *S. aratocensis* obtenido de plantas en estado de floración. Columna DB-5MS, 60 m. Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

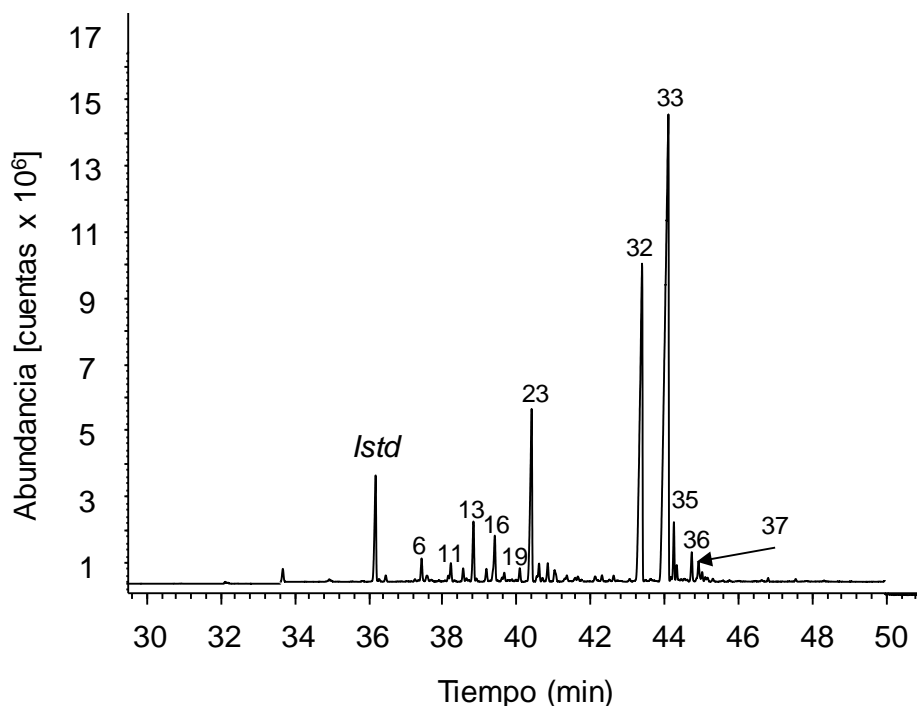


Figura 23. Perfil cromatográfico del AE de *S. aratocensis* obtenido de plantas en estado de postfloración. Columna DB-5MS, 60 m. *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

Los AE de *S. aratocensis* están compuestos por sesquiterpenos oxigenados (670.7 mg/g de AE en prefloración, 683.4 mg/g de AE en floración y 745.9 mg/g de AE en postfloración) y sesquiterpenos (274.4 mg/g de AE en prefloración, 276.8 mg/g de AE en floración y 193.5 mg/g de AE en postfloración) (**Figura 24**). La mayoría de los compuestos identificados (> 80%) son derivados del germacreno y pertenecen a la familia de los cadinanos. Hay pocas plantas del género *Salvia* cuyos AE poseen cadinanos como compuestos mayoritarios y se encuentran principalmente en Medio Oriente y Eurasia, *e.g.*, *S. lerifolia* (Rustaiyan, Shafeghat, Masoudi, Akhlaghy y Tabatabaei-Anakari, 2007), y *S. hians* (Melkani, Mohan, Pant, Negi y Dev, 2011). En contraste, los metabolitos secundarios más comunes en los AE de plantas del género *Salvia* son monoterpenos y monoterpenos oxigenados (Savelec, Okello, Perry, Wilkins y Perry, 2003;

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Longaray, Moschen-Pistorello, Artico, Atti-Serafini y Echeverrigaray, 2007), *e.g.*, tujona, α -pineno o 1,8-cineol.

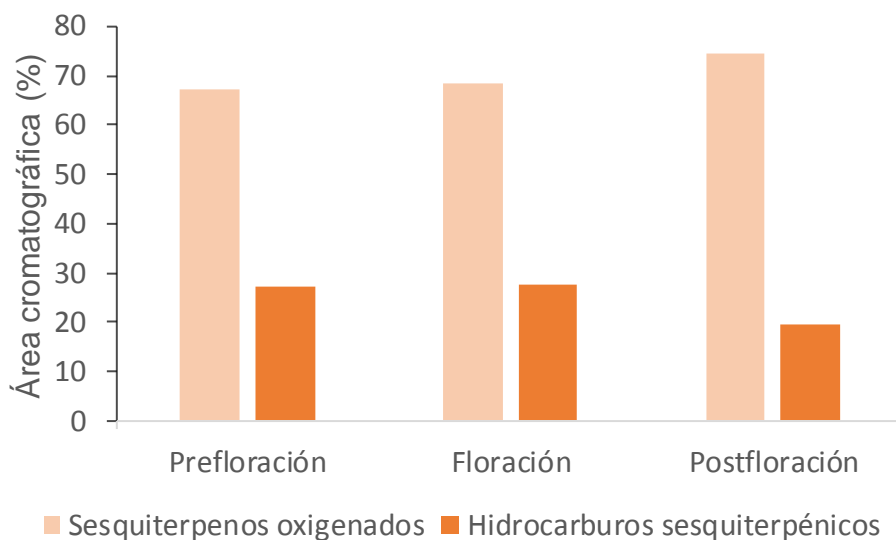


Figura 24. Variaciones en la composición de compuestos sesquiterpénicos en el AE de *S. aratocensis*, en función del estado fenológico de las plantas.

Se identificó como compuesto mayoritario al τ -cadinol (**Figura 27**) (420 mg/g en los AE, obtenidos de plantas en prefloración y floración, 480 mg/g en post-floración). Se reportan los espectros de masas experimental y de la base de datos en las **Figuras 25 y 26**; en la literatura (Mahdi y Bahernik, 2007), se reportó sólo una planta perteneciente al género *Salvia* (*S. compressa*) en Irán, con τ -cadinol como compuesto mayoritario; este compuesto posee propiedades antifúngicas, insecticidas y antibacteriales (Ho, Liao, Wang y Su, 2011; Chang, Cheng y Wang, 2001; Magina *et al.*, 2009).

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

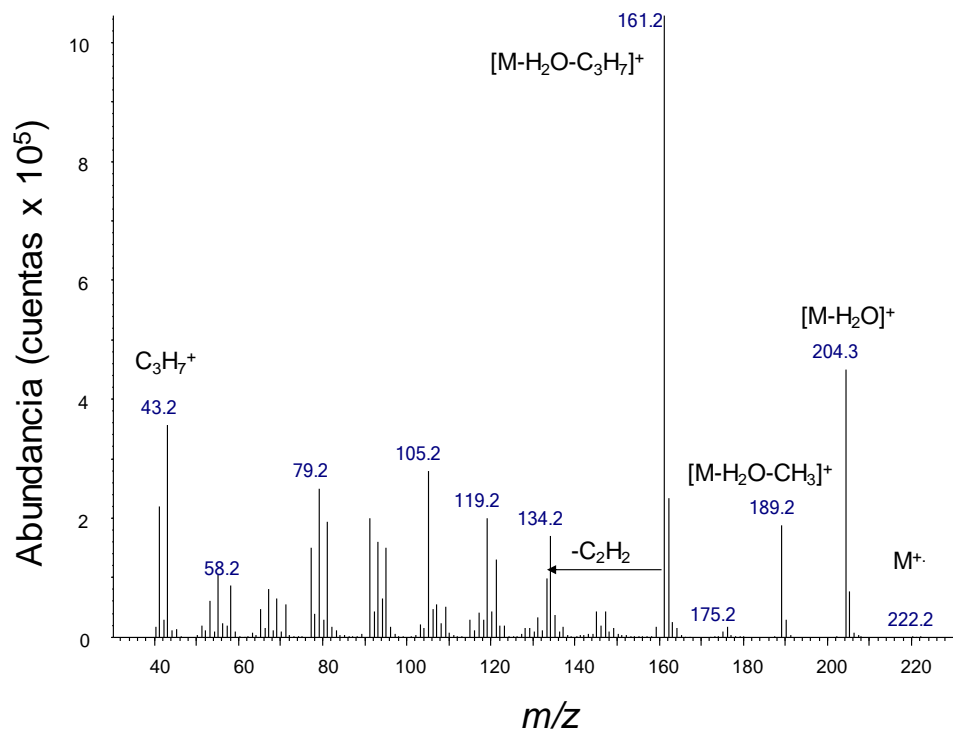


Figura 25. Espectro de masas experimental del τ -cadinol (EI, 70 eV).

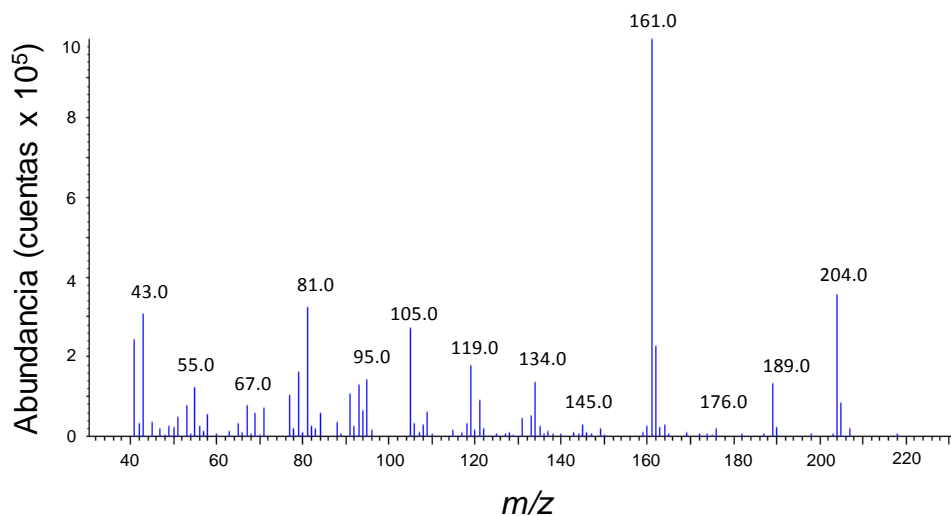


Figura 26. Espectro de masas reportado del τ -cadinol (EI, 70 eV). Adams, R. (2005). τ -cadinol *Mass Spectrum*. [Figura]. Tomado de *Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. 4th Edition*.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

4.3.1 Análisis del espectro de masas del compuesto mayoritario. El espectro de masas del compuesto mayoritario (Figura 24) muestra una señal de baja intensidad, en m/z 222, correspondiente al ion molecular de un sesquiterpeno oxigenado. Desplazada 18 unidades hacia la izquierda, se presenta la señal de un ion con una abundancia del 50% en m/z de 204. Hecho que indica la pérdida de una molécula de agua, que es típica para compuestos en cuya estructura está presente un grupo hidroxilo unido a un carbono secundario o terciario. La baja intensidad del ion molecular permite deducir que el compuesto es un alcohol poco estable, probablemente, terciario (Yang, Brereton, Wheeler y Ellis, 2005). La señal con abundancia del 20% en m/z 189 es inferior en 15 unidades a la presente en m/z 204 y muestra la presencia de por lo menos un grupo metilo (CH_3) dentro de la estructura. La señal del ion pico de base en m/z 161, *i.e.*, ion con la mayor estabilidad, respecto a los demás productos de la fragmentación, que en el espectro de masas se presenta con abundancia del 100%; se encuentra distanciado 43 unidades de la correspondiente al ion molecular deshidratado (m/z 204). La pérdida de 43 unidades corresponde a la salida de un radical isopropilo C_3H_7 que se encontraba en la estructura; la señal en m/z 43 y abundancia del 43% confirma que el radical formado es estable, y que en el proceso de fragmentación hubo un alto número de “fragmentos isopropilo” que adquirieron la carga, la cual, probablemente, se ha establecido sobre un carbono estable disustituído (véase la ruta de fragmentación propuesta en la Figura 26).

El ion m/z 134 con abundancia relativa del 18%, indica una pérdida de 70 unidades por parte del ion 204, que son equivalentes en unidades de masa atómica (u.m.a.) a la masa del radical C_5H_{10} . Todo permite concluir que en la estructura del compuesto existe un grupo isopropilo enlazado a un carbono secundario y que la salida de este grupo se dio por la presencia de un enlace doble ubicado a una distancia de dos carbonos desde el carbono en donde se produjo la

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

escisión, ruptura alílica en caso de que el sesquiterpeno oxigenado sea lineal, o retro-Diels-Alder (RDA) en caso de que el doble enlace se encontrara sobre un ciclo. Debido a que no se registran pérdidas consecutivas de radicales metilo, etilo o alilo, se descarta la posibilidad de que se trate de un sesquiterpeno oxigenado con cadena lineal, por lo que la formación del ion 134 debió provenir de un rearrreglo RDA. Finalmente, la señal en m/z 119 con abundancia relativa del 20% marca la pérdida de un radical metilo ubicado como sustituyente del ion m/z 134.

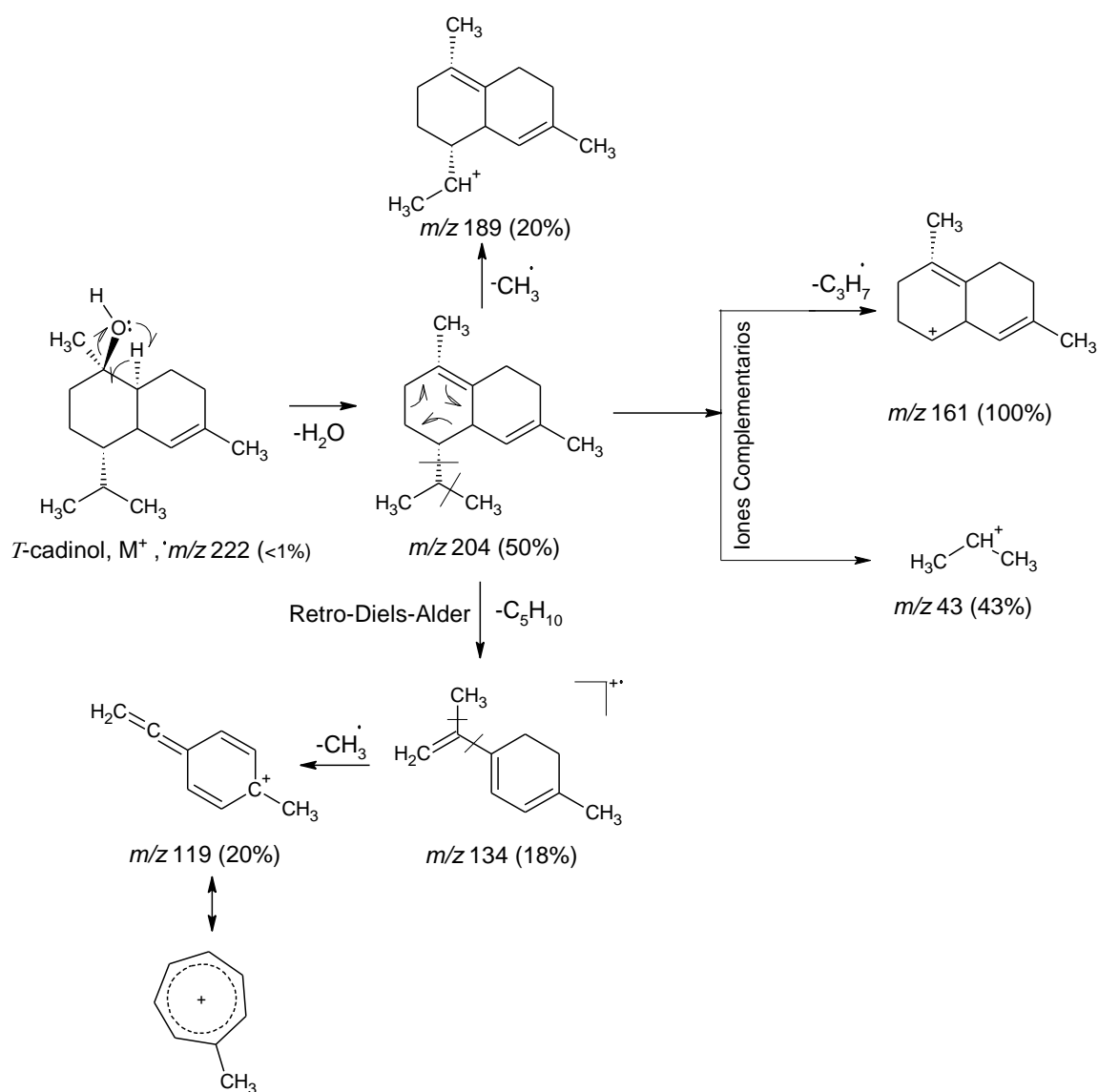


Figura 27. Ruta de fragmentación propuesta para el τ -cadinol (EI, 70 eV).

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

El 1-10-di-*epi*-cubenol se encontró en los AE de *S. aratocensis* en concentraciones superiores a 220 mg/g; los AE con este compuesto como mayoritario presentan actividad antimicrobiana (Del-Vechio, Sousa, Yamamoto y Kaplan, 2009), Otros compuestos presentes en los AE de *S. aratocensis* con porcentaje en masa superior del 1% muestran diversas actividades biológicas (Tabla 7).

Tabla 7.

Compuestos mayoritarios presentes en los AE de *S. aratocensis* y sus actividades biológicas reportadas en la literatura.

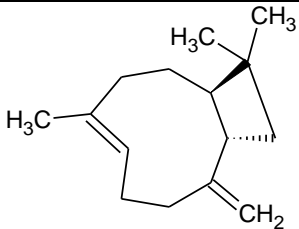
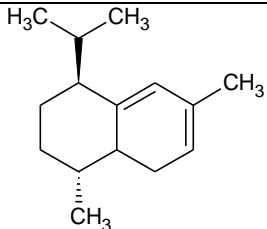
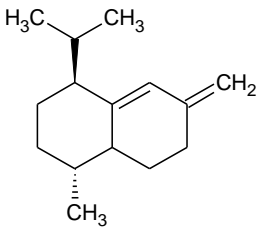
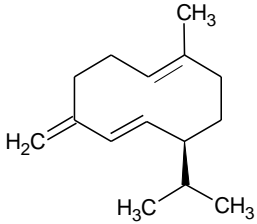
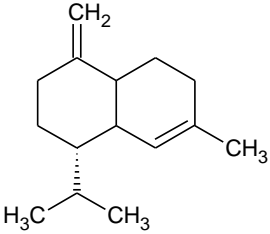
Compuesto	Estructura	Actividades biológicas
<i>trans</i> - β -Cariofileno		Antimicrobial (Oztürk, <i>et al</i> , 2009), antifúngica (Pessoa <i>et al.</i> , 2010), antioxidante y anti-inflamatoria (Graça-Miguel, 2010).
<i>trans</i> -Muurola-3,5-dieno		Repelente y larvicida (Giatropoulos <i>et al</i> , 2013).
<i>trans</i> -Muurola-4,5-dieno		Repelente, larvicida y citotóxica (Giatropoulos <i>et al</i> , 2013; Palazzo, Agius, Wright, Haber y Moriarty, 2009)

Tabla 7. *Continuación.*

Germacreno D		Antioxidante (Karioti, Hadjipavlou-Litina, Mensah, Fleischer y Skaltsa, 2004), y antimicrobial (Oztürk, <i>et al</i> , 2009).
γ -Cadineno		Antimicrobiano (Aghajani, Kazemi, Dakhili y Rustaiyan, 2009).

4.4 Análisis comparativo de la composición de los aceites esenciales de *S. aratocensis*.

Para comparar la composición de los AE de *S. aratocensis*, se desarrolló un gráfico de análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) en el que fue posible relacionar la composición de los AE con sus respectivas coordenadas espaciales (Wold, 1987). Para construir un gráfico PCA se debe establecer un sistema de coordenadas, cuyos ejes son los parámetros que mayor varianza aportan en la comparación de la composición de los AE. En el primer eje o componente principal uno, se establece el parámetro que permite describir las diferencias de composición con una mayor varianza, y en el eje Y o componente principal dos, se ubica el segundo parámetro con mayor aporte. La coordenada o “Score” de un compuesto o descriptor, se

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

obtiene a partir de la varianza que aporta dentro de los parámetros establecidos como ejes (Véase Figura 28).

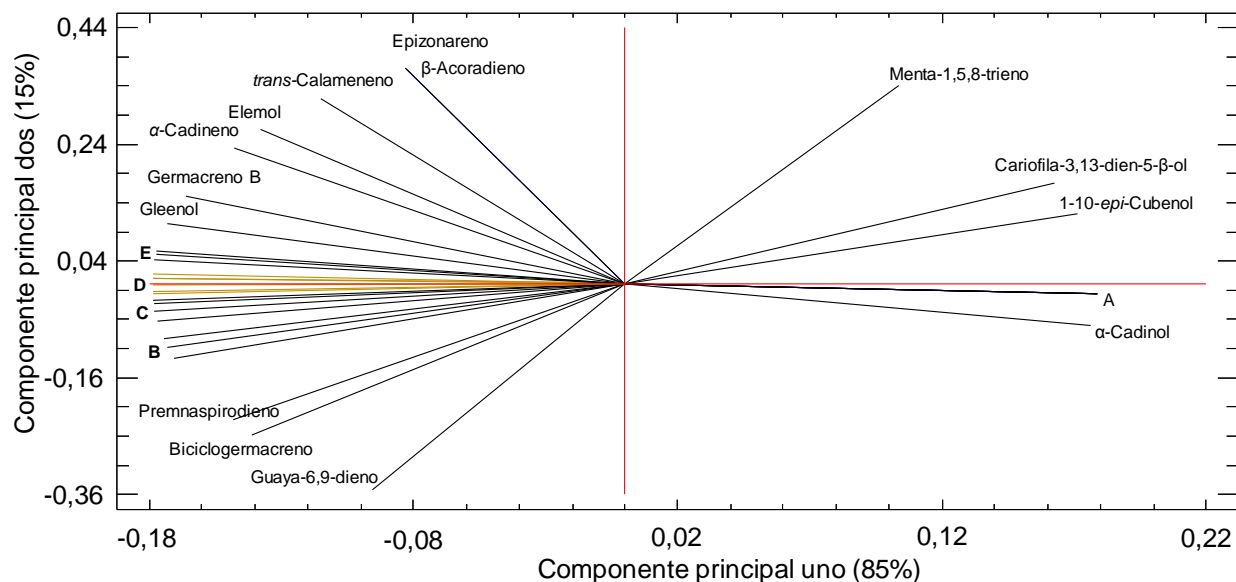


Figura 28. Gráfica de contribuciones de los constituyentes del AE a los componentes principales. **A.** 10-*epi*-Cubebol, γ -selineno, τ -cadinol, β -cedreno, *trans*- β -farneseno, α -cubebeno, *trans*- β -guaieno. **B.** Germacreno D, β -burboneno, *trans*-muurola-3,5-dieno. **C.** *trans*- β -Cariofileno, valenceno, α -humuleno, *trans*-dauca-4,7-dieno. **D.** Himachala-2,4-dieno, α -bisabolol, isodieno, veleranona, β -elemeno, γ -cadineno. **E.** Germacreno A, α -neocalitropseno, *trans*-muurola-4,5-dieno.

La **Figura 28** muestra a los compuestos identificados en los AE de *S. aratocensis*, dispuestos como vectores en un plano cuyos ejes son los componentes principales uno (varianza del 85%) y dos (varianza del 15%). La aparición de compuestos aglomerados en torno a una coordenada implica que la variación de sus concentraciones aporta valores muy similares a la varianza en la comparación de la composición de los AE. Luego de obtener las coordenadas de los compuestos,

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

se determinan las de los AE, a partir de las varianzas aportadas a cada parámetro por cada uno de sus componentes (**Figura 29**).

En la **Figura 29** se muestra la correlación de los AE de *S. aratocensis* y los componentes químicos identificados. La distancia entre las coordenadas de los AE indica diferencias de composición. De los AE estudiados, el obtenido de plantas en postfloración, es el que mayores diferencias presenta. Posee α -cadinol, cariofila-3,13-dien-5- β -ol, 1,10-*epi*-cubenol, menta-1,5,8-trieno y a los compuestos representados por el punto A en mayor proporción respecto a los AE obtenidos de plantas en estados de prefloración y floración. Por otra parte, el AE destilado de plantas en prefloración presenta guaya-6,9-dieno, biciclogermacreno y premnaspirodieno en cantidad más alta que la de los otros dos. Finalmente, el AE obtenido en el estado de floración contiene *trans*-calameneno, elemol, α -cadineno, epizonareno y germacreno B en una cantidad más alta que la de los AE aislados de plantas colectadas durante floración y post-floración.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

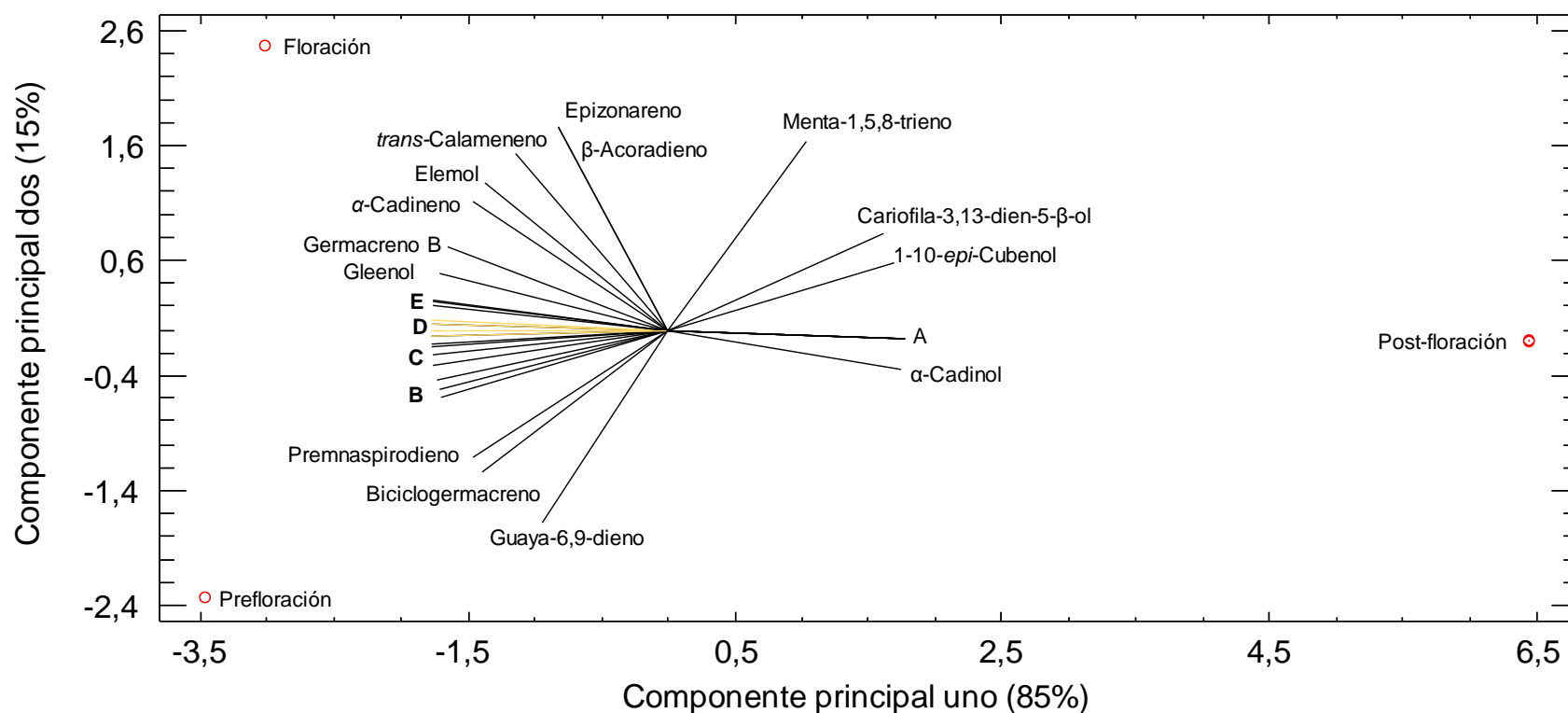


Figura 29. Gráfica de correlación de los AE de *S. aratocensis* obtenidos de plantas en los estados de prefloración, floración y post-floración y sus componentes químicos. **A.** 10-*epi*-Cubebol, γ -selineno, τ -cadinol, β -cedreno, *trans*- β -farneseno, α -cubebeno, *trans*- β -guaieno, **B.** Germacreno D, β -burboneno, *trans*-muuro-la-3,5-dieno. **C.** *trans*- β -Cariofileno, valenceno, α -humuleno, *trans*-dauca-4,7-dieno. **D.** Himachala-2,4-dieno, α -bisabolol, isodieno, veleranona, β -elemeno, γ -cadineno. **E.** Germacreno A, α -neocalitropseno, *trans*-muuro-la-4,5-dieno.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

4.5. Extracción de los metabolitos secundarios de *S. aratocensis* con mezclas hidroalcohólicas

Para establecer las condiciones de extracción hidroalcohólica de *S. aratocensis*, que maximizan el valor ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de extracto), se aplicó un diseño experimental 2⁴. Las siguientes fueron cuatro variables estudiadas: 1. Concentración de etanol en el solvente; 2. Temperatura de la extracción; 3. Relación entre el material vegetal y el solvente y 4. Tiempo de extracción (**Tabla 4**). El desarrollo del diseño permitió conocer las variables significativas y el rango de valores en que se obtuvieron extractos con actividad antioxidante alta, respecto a los demás puntos dentro del espacio muestral. Los resultados del diseño experimental se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8.

Resultados del diseño experimental propuesto para las extracciones hidroalcohólicas de S. aratocensis.

Experimento	Concentración, %, v/v	Temperatura, °C	Volumen, mL	Tiempo, min	Valor ORAC ($\mu\text{mol trolox}^{\text{®}}/\text{mg}$ extracto) \pm S
1	100	50	20	60	270 \pm 10
2	50	50	20	60	550 \pm 29
3	100	30	20	60	230 \pm 19
4	50	30	20	60	420 \pm 32
5	100	50	40	60	190 \pm 10
6	50	50	40	60	480 \pm 13
7	100	30	40	60	236 \pm 5

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

8	50	30	20	60	280±53
9	100	50	20	20	360±34

Tabla 8. *Continuación*

10	50	50	20	20	730±32
11	100	30	20	20	350±19
12	50	30	20	20	800±17
13	100	50	40	20	170±18
14	50	50	40	20	970±41
15	100	30	40	20	88±2
16	50	30	40	20	340±18

Para establecer los factores del diseño experimental con influencia significativa sobre el observable, se desarrolló un análisis de varianza (ANOVA) (**Tabla 9**), con los datos obtenidos se construyó un diagrama de Pareto (**Figura 30**).

Tabla 9.

Análisis de varianza para los valores ORAC del diseño experimental.

Factores	Suma producto	Efecto	S²_x	F_x
[A], EtOH, %	2672	334	446224	6374
[B], T, °C	980	122	60025	857
[C], mat/slvte	-960	-120	57600	822
[D], t, min	-1148	-143	82369	1176

Tabla 9. Continuación.

Interacciones secundarias				
AB	808	101	40804	582
AC	92	11	529	7
AD	-1064	-133	70756	1010
BC	760	95	36100	515
BD	-332	-41	6889	98
CD	392	49	9604	137
Interacciones ternarias y cuaternaria				
ABCD	-476	-59	14161	202
ABC	788	98	38809	554
ABD	-136	-17	1156	16
ACD	-364	-45	8281	118
BCD	-792	-99	39204	560

Puesto que ningún factor (F_x) presentó valores de significancia inferiores a 4 (**F umbral**), todos los factores tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el observable con un 95% de nivel de confianza.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

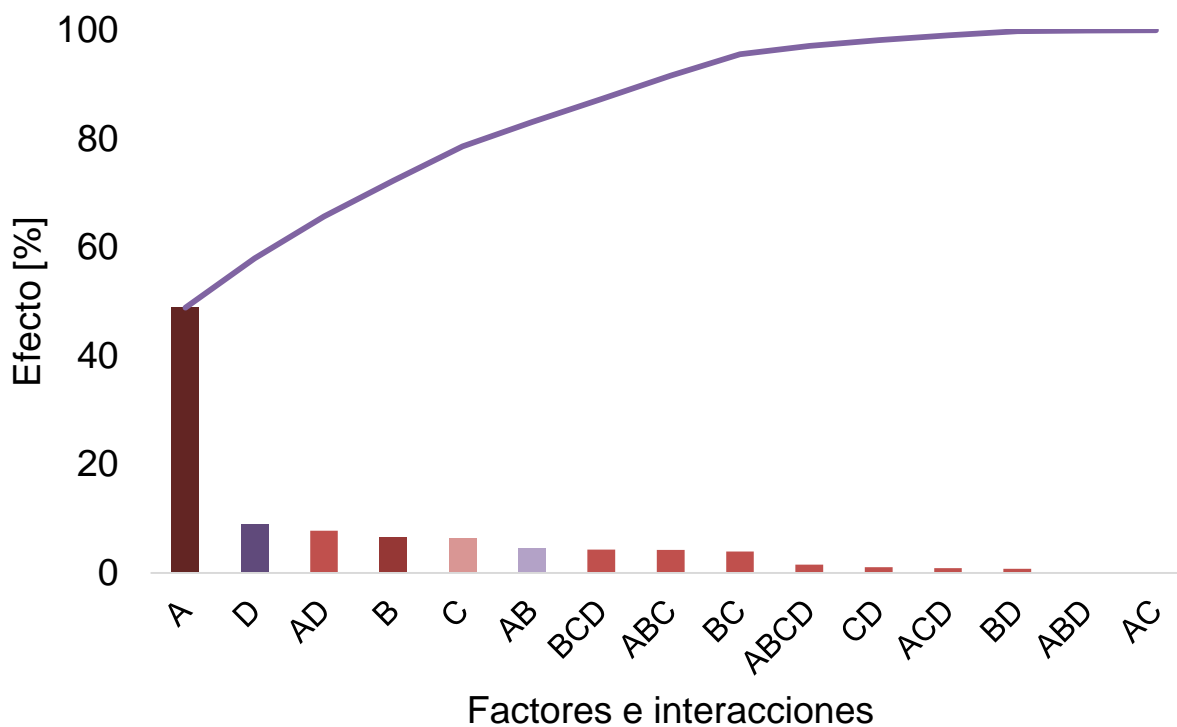


Figura 30. Diagrama de Pareto: efecto sobre el observable de los factores e interacciones evaluados en el diseño experimental. **A.** Concentración de etanol en el solvente; **B.** Temperatura; **C.** Relación entre el material y el solvente; **D.** Tiempo.

En la **Figura 30**, se observa que la variable con mayor efecto sobre las variaciones en el valor ORAC de los extractos fue la concentración de etanol, A (48.9%), seguida del tiempo de extracción, D (9.03%). La interacción entre el tiempo de extracción y la concentración de etanol (AD) aportó una varianza del 7,8%, valor semejante a los aportes de la temperatura, B (6.58%) y la relación entre el material y el solvente, C (6.31%). El sistema puede ser descrito en un 80% con la varianza aportada por los factores A, B, C, D, las interacciones de A con D, y A con B. La selección de las condiciones de extracción se realizó a partir del desarrollo de un diagrama de

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

contorno de superficie (**Figura 31**), que muestra los puntos del espacio muestral en donde el valor ORAC se maximizó.

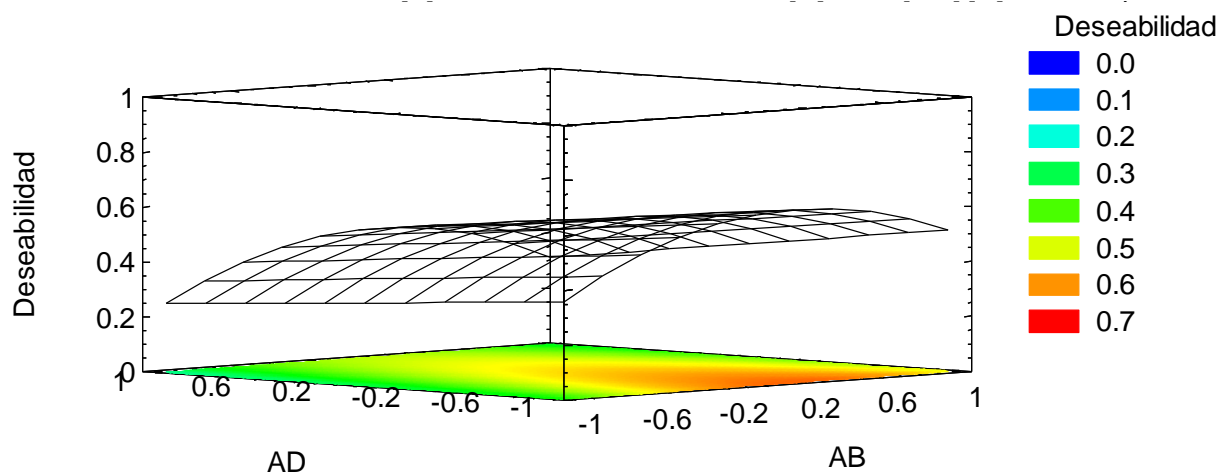


Figura 31. Diagrama de superficie de contorno del diseño experimental para las extracciones hidroalcohólicas de *S. aratocensis*. **AB**, Interacción entre las variables: Concentración de etanol en el solvente y temperatura. **AD**, Interacción entre las variables: Concentración de etanol en el solvente y tiempo de extracción.

En la **Figura 31**, se muestra el incremento del observable cuando la interacción entre concentración de etanol y temperatura se encuentra en el nivel superior del diseño experimental, 1, y la interacción entre la concentración de etanol y el tiempo de extracción se encuentra en el nivel inferior, -1. Por ello, se escogieron las condiciones de extracción del experimento 14 (**Tabla 8**): la concentración de etanol en el solvente del 50%, la temperatura de extracción de 50 °C, el volumen del solvente de 40 mL y el tiempo de extracción de 20 min.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

4.6. Caracterización química de los extractos de *S. aratocensis* obtenidos con solventes hidroalcohólicos

Los extractos hidroalcohólicos presentaron coloración verde oscura, consistencia pastosa y un olor dulce. El rendimiento de extracción (en peso) respecto al material seco en los tres estados de desarrollo fue del 3.8%, inferior a lo reportado para extracciones hidroalcohólicas en otras plantas del género *Salvia*. Hamdy *et al.* (2013), obtuvieron extractos de *S. officinalis* con etanol como solvente, a una temperatura de 30 °C, con el rendimiento de extracción del 18.2%. Süntar *et al.* (2011), realizaron extracciones de *S. cyanescens* y *S. cryptantha* a una temperatura de 30 °C, usando mezclas de etanol:agua (50:50) como solvente, con rendimientos de extracción de 19.5 y 21.3%, respectivamente.

La identificación de los compuestos se realizó mediante el análisis de sus espectros de masas, obtenidos mediante un espectrómetro de masas *Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.)*, con voltajes de capilar de 4 kV y de fragmentación en HCD de 30 eV. Se identificaron tres componentes: 1. Salvigenina; 2. Cirsimaritina y 3. Genisteína (**Tabla 10, Figura 32**). En esta investigación, se reporta por primera vez la presencia de flavonoides en los extractos hidroalcohólicos de *S. aratocensis*. La cuantificación (**Tabla 11**) se efectuó mediante el método de estándar interno, se usó kaempferol en una concentración de 2.5 ppb como sustancia de referencia, en un vial de 1 mL con concentración de muestra de 1000 ppm.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Tabla 10.

Identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólicos de S. aratocensis.

Compuesto ¹	Masa [M+H] ⁺ *		Δ ppm ^{**}	Estados fenológicos, $\mu\text{g/g}$ de extracto \pm s (n=3)		
	Calc.	Exp.		Prefloración	Floración	Postfloración
Genisteína	271.06009	271.06047	1.42	0.26 \pm 0.03	0.52 \pm 0.09	0.63 \pm 0.02
Cirsimaritina	315.08631	315.08641	0.30	0.37 \pm 0.01	0.41 \pm 0.01	0.57 \pm 0.06
Salvigenina	329.10196	329.10182	-0.43	2.28 \pm 0.04	2.9 \pm 0.1	4.5 \pm 0.2

¹ Identificación tentativa.

(*) Masa del ion molecular protonado.

(**) Error en la medición de las masas moleculares.

Tabla 11.

Patrón de fragmentación de las polimetoxiflavonas identificadas en los extractos hidroalcohólicos de S. aratocensis.

Nombre	Área cromatográfica, cuentas x 10 ⁵ \pm s; n=3			Concentración en el extracto, $\mu\text{g/g}$ de extracto \pm s; n=3		
	Prefloración	Floración	Postfloración	Prefloración	Floración	Postfloración
Salvigenina	10 \pm 1	13.2 \pm 0.6	19.7 \pm 0.6	2.28 \pm 0.04	2.9 \pm 0.1	4.5 \pm 0.2
Genisteína	1.15 \pm 0.02	2.3 \pm 0.1	2.75 \pm 0.08	0.26 \pm 0.03	0.52 \pm 0.09	0.63 \pm 0.02
Cirsimaritina	1.7 \pm 0.2	1.8 \pm 0.1	2.5 \pm 0.2	0.37 \pm 0.01	0.41 \pm 0.01	0.57 \pm 0.06
Kaempferol*	10 \pm 1	11.1 \pm 0.7	10.9 \pm 0.8	-----	-----	-----

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

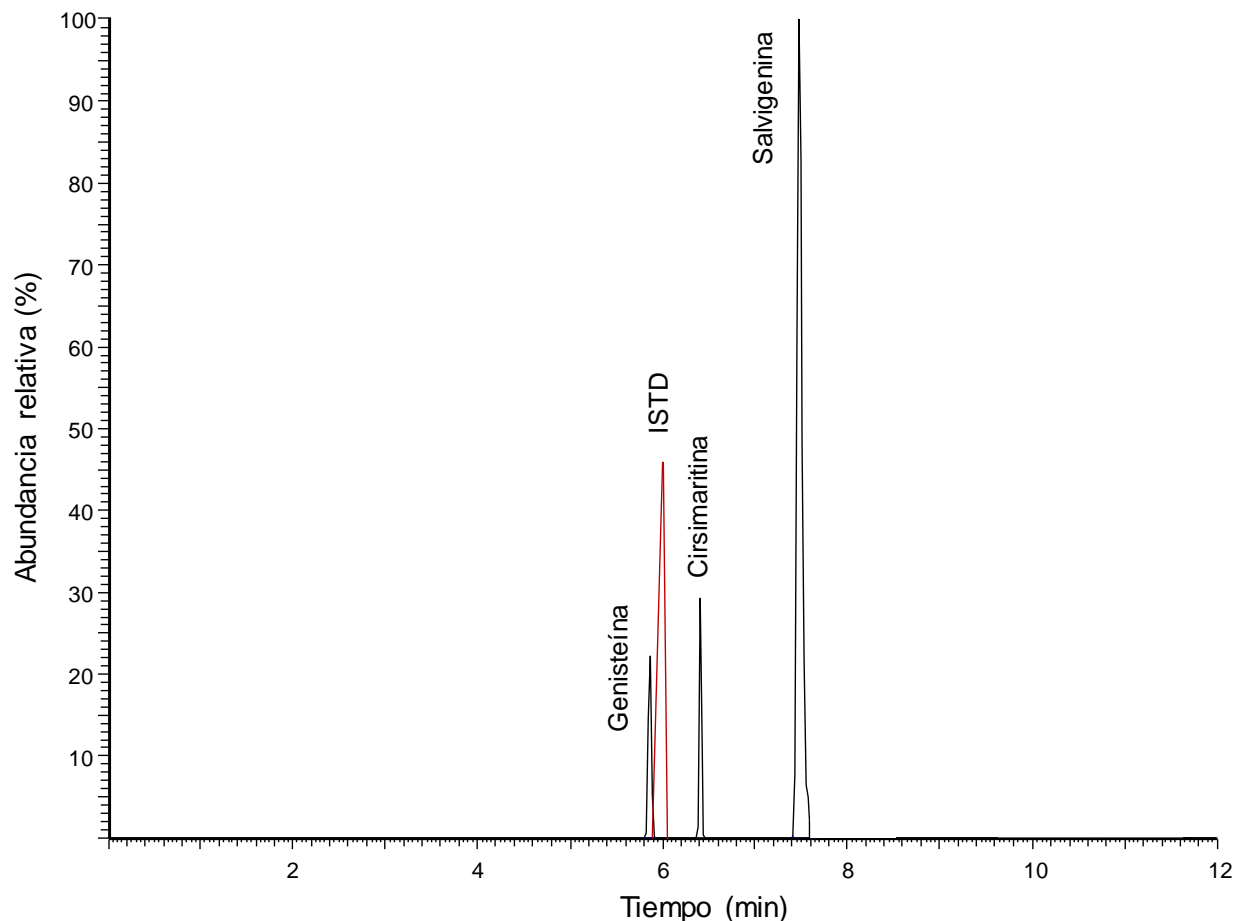


Figura 32. Corriente iónica obtenida por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, del extracto hidroalcohólico de *S. aratocensis* aislado de plantas en el estado de floración.

El espectro de masas obtenido mediante LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS con un potencial de fragmentación en HCD de 30 eV (**Figura 33**) brindó información estructural sobre el compuesto mayoritario. En la **Figura 33**, se muestra la masa exacta del ion molecular protonado, m/z 329.10182, y su composición elemental, C₁₈H₁₇O₆. También, se observan las masas exactas y las composiciones elementales de cuatro iones-fragmento: 1. En m/z 314.07838, C₁₇H₁₄O₆, con abundancia del 25%, formado mediante la pérdida de 15.02344 unidades, correspondientes a la salida de un grupo CH₃· presente en la estructura del ion molecular; el ion es de mediana

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

intensidad, por lo que, es probable que el grupo metilo estuviera unido a un átomo con mayor electronegatividad como el oxígeno conformando un grupo metoxi; 2. En m/z 296.06888, $C_{17}H_{12}O_5$, de alta intensidad (95%) que advierte la pérdida de agua por parte del ion-fragmento m/z 314.07838 y confirma que la molécula posee, al menos, un hidroxilo; 3. El ion fragmento, en m/z 268.07361, $C_{16}H_{12}O_4$, producto de la eliminación de CO del fragmento m/z 296.06888, presenta abundancia del 100% y es el más estable de los cuatro, posee un carbono adicional al de la estructura base de los flavonoides por lo que es probable que el CO se haya generado a partir de un enlace simple $R^1-(C=O)-R^2$ y no del grupo carbonilo característico de los flavonoides; 4. En m/z 240.07762, $C_{15}H_{12}O_3$, de baja intensidad (10%), indica la salida de CO del tercer ion fragmento, es un ion inestable, probablemente el CO saliente era el grupo carbonilo presente en la posición “4” del flavonoide. La ruta de fragmentación propuesta para la salvigenina se muestra en la **Figura 34**. Los análisis de los espectros de masas se realizaron teniendo en cuenta las rutas de fragmentación para polimetoxiflavonas reportadas en la literatura (Kuck, Huber, Ongania y Bonn, 2000; Grayer, Veitch, Kite, Price y Kokubun, 2001; Wiley, 2009).

La salvigenina fue el compuesto mayoritario en los tres extractos, presentó aumento a medida que las plantas avanzaron en su estado de desarrollo. La salvigenina es una flavona polimetoxilada, aislada por primera vez en 1968 por Ulubelen, Öztürk y Isildatici (1969)., de plantas de *S. triloba*. Este metabolito secundario se ha identificado en otras plantas del género *Salvia* como *S. leriaefolia* (Ayatollahi, Shojaii, Kobarfard, Mohammadzadeh y Choudhary, 2009), *S. aethiopsis* (Ulubelen y Uygur, 1976), *S. macrosiphon* (Gohari *et al.*, 2011) y *S. limbata* (Gohari, Saeidnia, Malmir, Hadjiakhoondi y Ajani, 2010). Mansourabadi *et al.* (2015)., aislaron salvigenina de plantas de *S. officinalis* y confirmaron el efecto analgésico y antiinflamatorio de esta molécula en ratas. Rafatian *et al.*, (2012)., estudiaron la actividad neuroprotectora y

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

antioxidante; determinaron que esta sustancia inhibe la apoptosis de células neuronales expuestas a estrés oxidativo y confirmaron el efecto neuroprotector. Noori *et al.* (2013)., aislaron salvigenina de *Tanacetum canescens* y estudiaron sus efectos antitumorales e inmunomoduladores en ratas, y mostraron que la salvigenina redujo la aparición de tejidos tumorales.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

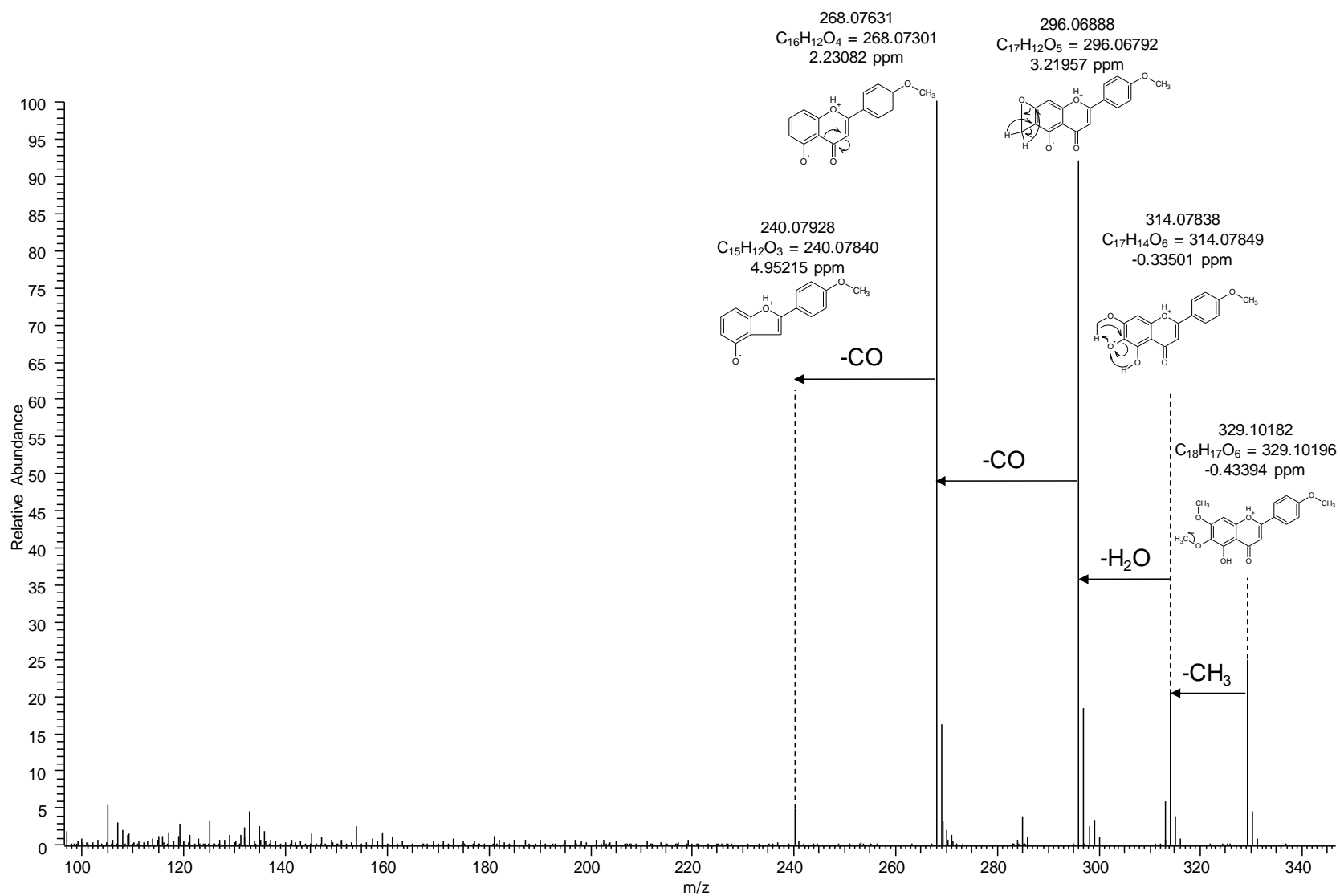


Figura 33. Espectro de masas experimental de la salvigenina obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS con voltajes de capilar de 4 kV y de fragmentación en HCD de 30 eV.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

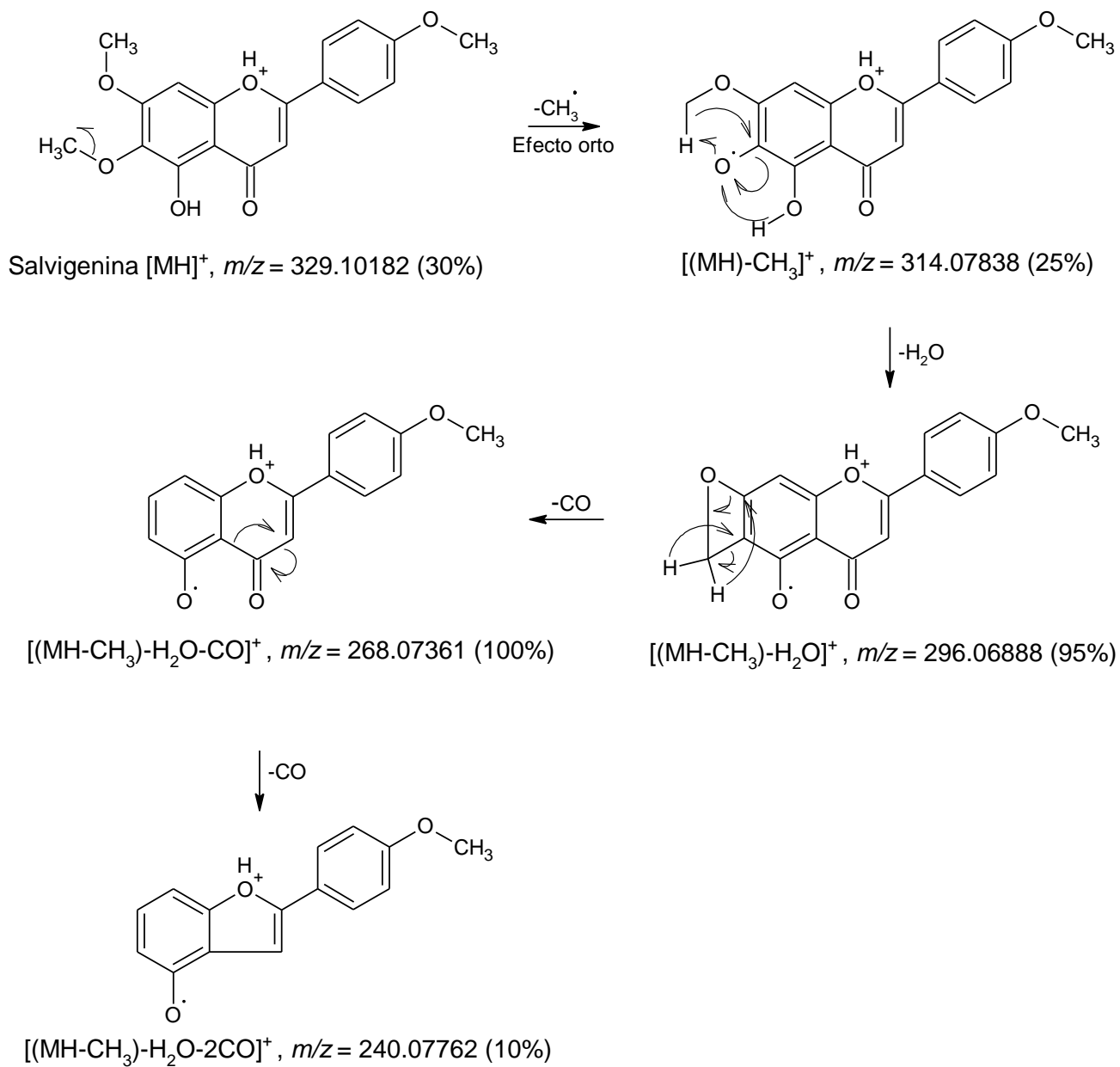


Figura 34. Ruta de fragmentación de la salvigenina, en el espectro de masas obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-MS con potencial de fragmentación en HCD de 30 eV.

En los extractos hidroalcohólicos de *S. aratocensis* se identificó cirsimaritina, con base en su espectro de masas (**Figura 35**) y el patrón de fragmentación estudiado. En la **Figura 35**, se

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

muestra el ion molecular protonado, con masa exacta, m/z 315.08641; la determinación de la masa exacta permitió establecer la composición elemental del ion molecular, $C_{17}H_{15}O_6$; el proceso de fragmentación en HCD con 30 eV de energía, dio paso a la aparición de tres iones, a saber: 1. En m/z 300.00197, con abundancia del 20% cuya composición elemental es $C_{16}H_{12}O_6$, muestra la pérdida de un grupo metilo por parte del ion molecular. La salida del grupo metilo se pudo haber dado por estar enlazado a un átomo de mayor electronegatividad mediante un enlace polarizado (H_3C-O-R), lo que confirmaría la presencia de grupos metoxi en la estructura del ion molecular. 2. En m/z 282.05185, con composición elemental, $C_{16}H_{10}O_5$, y abundancia del 100%, es el ion de mayor estabilidad y corresponde a la pérdida de agua del ion fragmento $[MH-CH_3]^+$. Indica la presencia de, al menos, un grupo hidroxilo ubicado en la posición vecinal al carbono (inestable) en donde ocurrió la pérdida del grupo metilo. 3. En m/z 254.05797, con composición elemental $C_{15}H_{10}O_4$, advierte la pérdida de CO por parte del segundo fragmento; la abundancia del ion (95%) y el número de carbonos (15), equivalente a los de la estructura base de los flavonoides, permite inferir que el grupo CO saliente proviene de un enlace $[R^1-(C=O)-R^2]$ perteneciente a un sustituyente del flavonoide, posiblemente, de un grupo metoxi, y no, del carbonilo característico de los flavonoides. La ruta de fragmentación propuesta para la cirsimaritina se muestra en la **Figura 36**.

Se observó un incremento en la concentración de cirsimaritina en los extractos obtenidos de plantas durante floración y postfloración, respecto a los colectados en la etapa de prefloración. La cirsimaritina es una flavona polimetoxilada común en plantas del género *Salvia*. Algunas plantas en cuyos extractos se ha detectado su presencia son *S. palestina* (Miski, Ulubelen, Johansson y Mabry, 1983), *S. officinalis* (Santos-Gomes, Saebrá, Andrade, Fernandez-Ferreira, 2002), *S. tomentosa* (Ulubelen, Miski, Neuman y Mavry, 1979) y *S. triloba* (Abdelhalim,

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Chebib, Aburjai, Johnston y Hanrahan, 2014). Hasrat *et. al.* (1997), aislaron cirsimarina de *Microtea debilis* y evaluaron la eficiencia de esta molécula en el tratamiento de fallos renales en ratas; los autores determinaron que la cirsimarina actúa como inhibidor de la interacción entre la adenosina y sus receptores y reduce los efectos de proteinuria, *i.e.* la excreción de proteína en la orina. Abdalla y Zarga (1987), extrajeron la cirsimarina de *Artemisia judaica* y estudiaron su efecto sobre el íleon de cobayas, y propusieron su uso para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Otras actividades reportadas para esta sustancia son antioxidante (Kelm, Nair, Strasburg y De Witt, 2000), antibacterial (Miski *et al.*, 1983) y antitumoral (Quan, Gu, Dong y Liu, 2010).

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

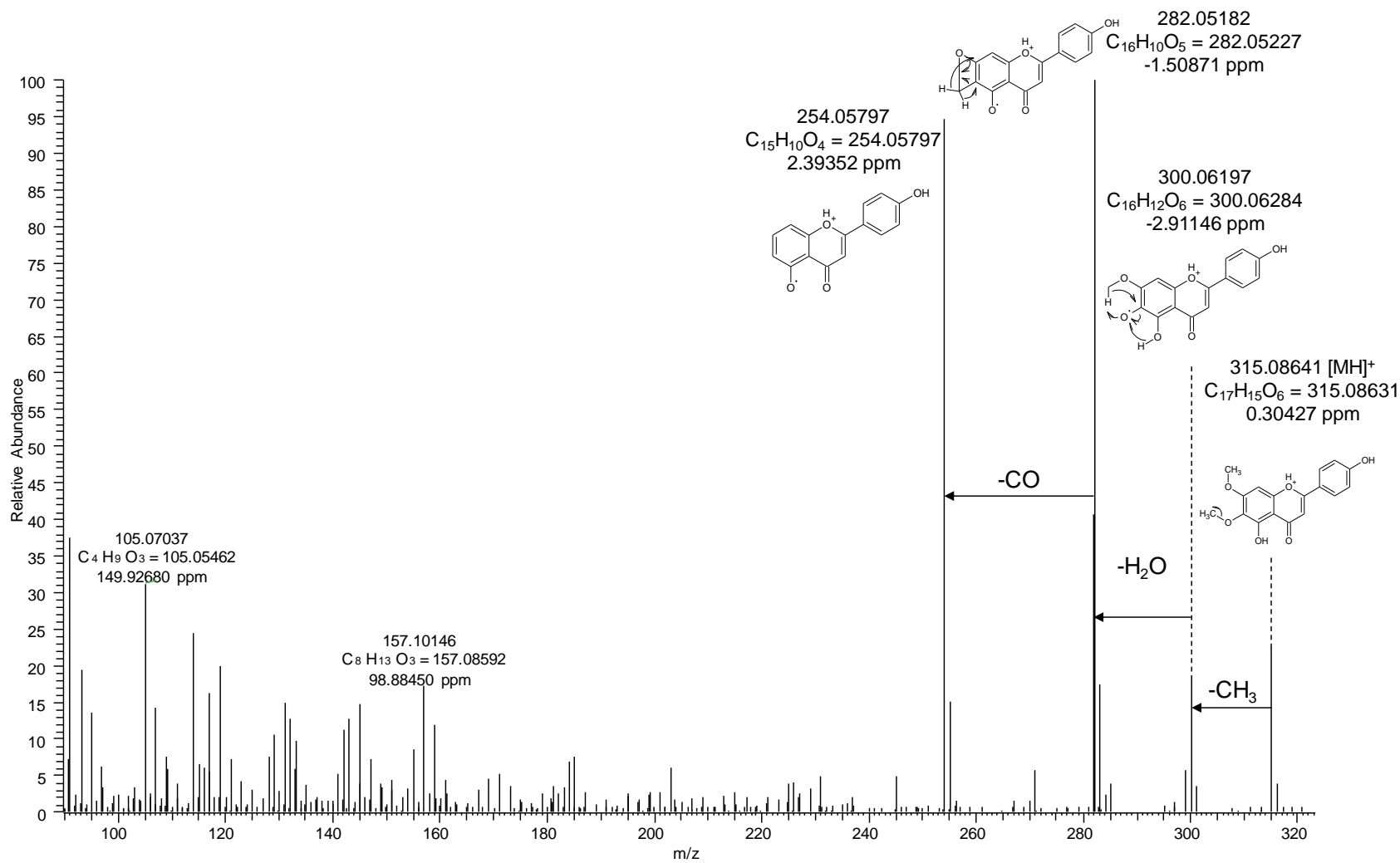


Figura 35. Espectro de masas experimental de la cirsimaritina obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS con voltaje de fragmentación en HCD de 30 eV.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

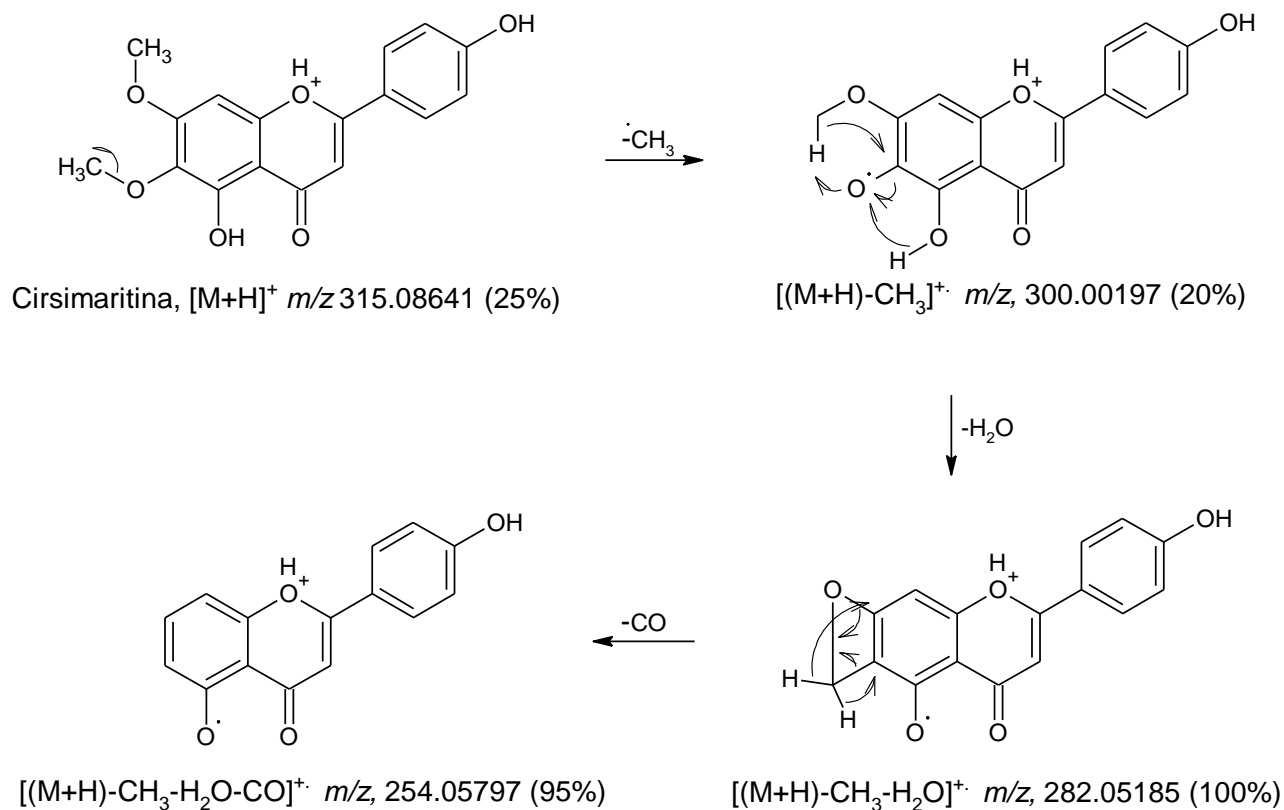


Figura 36. Posible ruta de fragmentación de la cirsimaritina obtenida por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS con potencial de fragmentación en HCD de 30 eV.

La información sobre la masa exacta de los iones moleculares protonados y los iones-fragmento de salvigenina y cirsimaritina, obtenida mediante el análisis por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS, muestra que al realizar la fragmentación en HCD con voltaje de 30 eV, se establece un patrón de pérdidas de fragmentos con masa exacta establecida (**Tabla 12**), que permiten elucidar la composición elemental y los grupos sustituyentes presentes en los anillos aromáticos de polimetoxiflavonas que posean grupos metoxi en las posiciones 6 y 7 en el anillo A.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Tabla 12.

Patrón de fragmentación de las polimetoxiflavonas identificadas en los extractos hidroalcohólicos de S. aratocensis.

Iones	Salvigenina, <i>m/z</i> , (%)	Cirsimaritina, <i>m/z</i> , (%)
$[M+H]^+$	329.10182 (30%)	315.08641 (25%)
$[(M+H)-CH_3]^+$	314.07838 (25%)	300.00197 (20%)
$[(M+H)-CH_3-H_2O]^+$	296.06888 (95%)	282.05185 (100%)
$[(M+H)-CH_3-H_2O-CO]^+$	268.07631 (100%)	254.05197 (95%)
$[(M+H)-CH_3-H_2O-2CO]^+$	240.07762 (10%)	No detectado

La genisteína (**Figura 38**) se identificó con base en su espectro de masas obtenido en el HCD a 30 eV y en el estudio de su patrón de fragmentación. En el espectro (**Figura 37**) se observan cuatro señales con información estructural del compuesto: 1. En *m/z* 271.06122, que corresponde al ion molecular protonado, con composición elemental C₁₅H₁₁O₅; posee el mismo número de carbonos que la estructura base de las flavonas e isoflavonas (15), por lo que se deduce que los sustituyentes sobre los anillos aromáticos deben ser grupos hidroxilo, específicamente, tres, ya que dos de los cinco presentes en la estructura deben formar parte del anillo central C. El ion

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

molecular protonado, es el más estable de los mostrados en el espectro (100% de abundancia) por lo que se supone que los sustituyentes hidroxilo no se encuentran en las posiciones de mayor reactividad, *e.g.*, sobre el anillo C. En la **Figura 37** no se registran pérdidas de agua y se descarta la posibilidad de que se trate de un flavonol (Tsimogiannis, Samiotaki, Panayotou y Oreopoulou, 2007). 2. Con masa exacta, en m/z 243.06607, y la composición elemental $C_{14}H_{11}O_4$, se deduce la pérdida de CO del ion molecular protonado; este ion-fragmento presenta una baja intensidad (5%), de modo, que su estructura no es estable, por lo que el CO saliente debe provenir del grupo carbonilo presente en el anillo central (C). 3. En m/z 153.01860, con la composición elemental $C_7H_5O_4$, que proviene de la reacción RDA del anillo central (C) y advierte la presencia de dos grupos hidroxilo sobre el anillo (A) de la isoflavona (véase **Figura 38**). 4. En m/z 119.01436 y la composición elemental, C_8H_7O , que corresponde al segundo fragmento formado en la ruptura RDA y confirma la presencia de un grupo hidroxilo sobre el anillo B. El espectro de masas de la genisteína se comparó con lo reportado (Klejduš, Vitamvásová y Kubán, 2001), obtenido por espectrometría de masas *tándem*.

La genisteína es una isoflavona, por primera vez fue aislada en 1899 de plantas de *Genista tinctoria* (Fabaceae) (Perkin y Newbuby, 1889). La mayoría de los estudios reportan su presencia en plantas de la familia Fabácea, *e.g.*, *Glycine max* (Zhang y Smith, 1996), *Medicago sativa* (Plaza, Ancos y Cano, 2003); y en Poáceas, *e.g.* *Zea mays* (Suzuki, Lijima, Okada y Okuyama, 2007), *Triticum aestivum* (Bajpai, Pande, Tewari y Dhan). Se encontró también en plantas de género *Salvia*, entre ellas, *S. hispanica* (Martínez-Cruz y Paredes-López, 2014), *S. plebeia* (Gu y Wrng, 2001), *S. officinalis* (Boroujeni, Boroujeni, Gholami y Shafiei, 2016), y *S. miltiorrhiza* (Ren, Du y Zhang, 2002). Peterson y Barnes (1996)., estudiaron la capacidad de la genisteína para inhibir el crecimiento de células epiteliales mamarias cancerígenas y obtuvieron resultados

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

positivos para la inhibición. Dolinoy *et al.* (2006), comprobaron en ratas que una dieta rica en genisteína en el periodo de gestación, reduce la probabilidad de que las crías sufran obesidad al llegar en la edad adulta. Wei *et.al.*, (1995), evaluaron el efecto antioxidante durante el consumo de genisteína en ratas y observaron que los individuos con una dieta rica en esta isoflavona mejoraban significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes en la piel.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

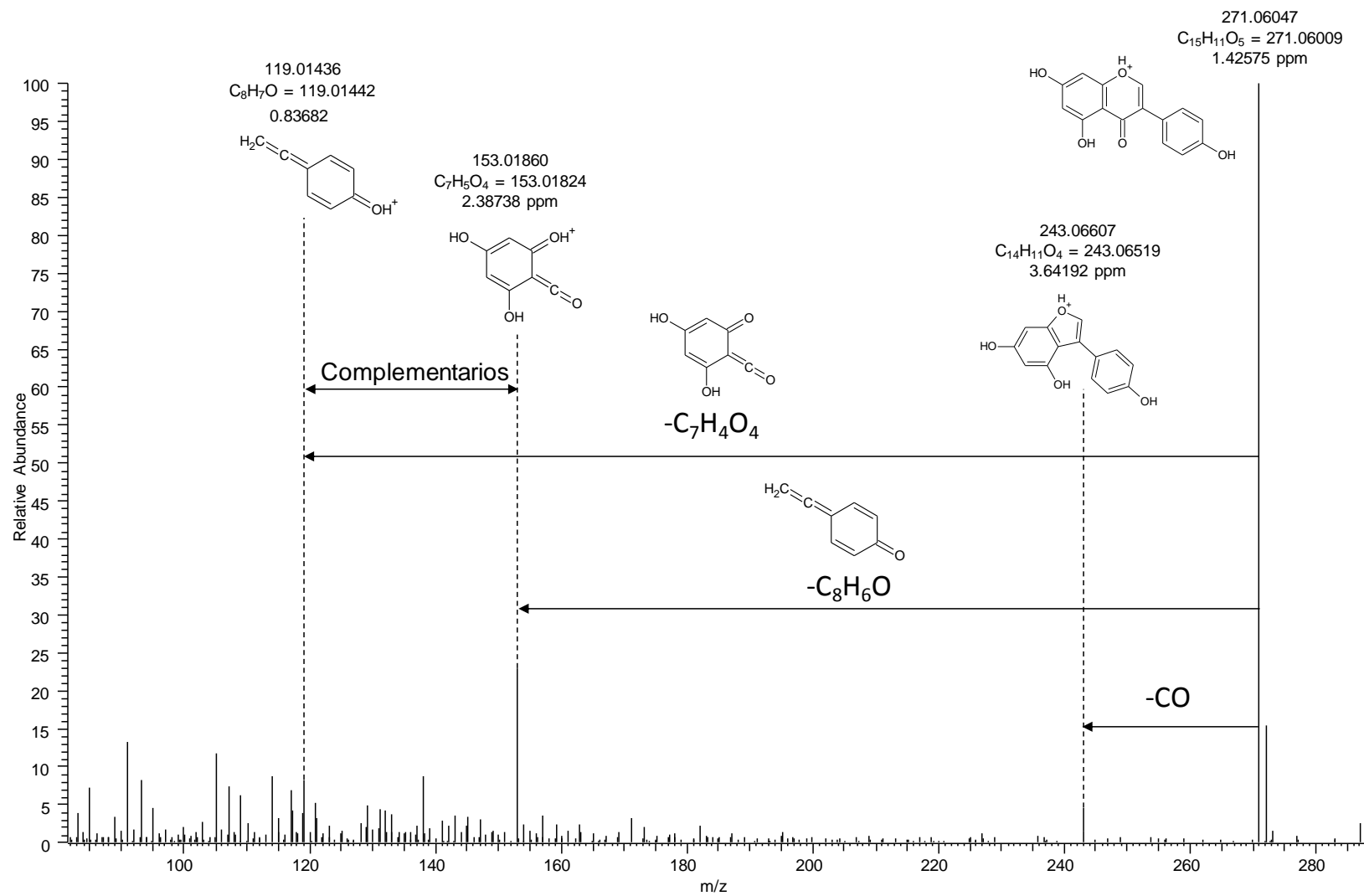


Figura 37. Espectro de masas experimental de la genisteína obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS con voltaje de fragmentación en HCD de 30 eV.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

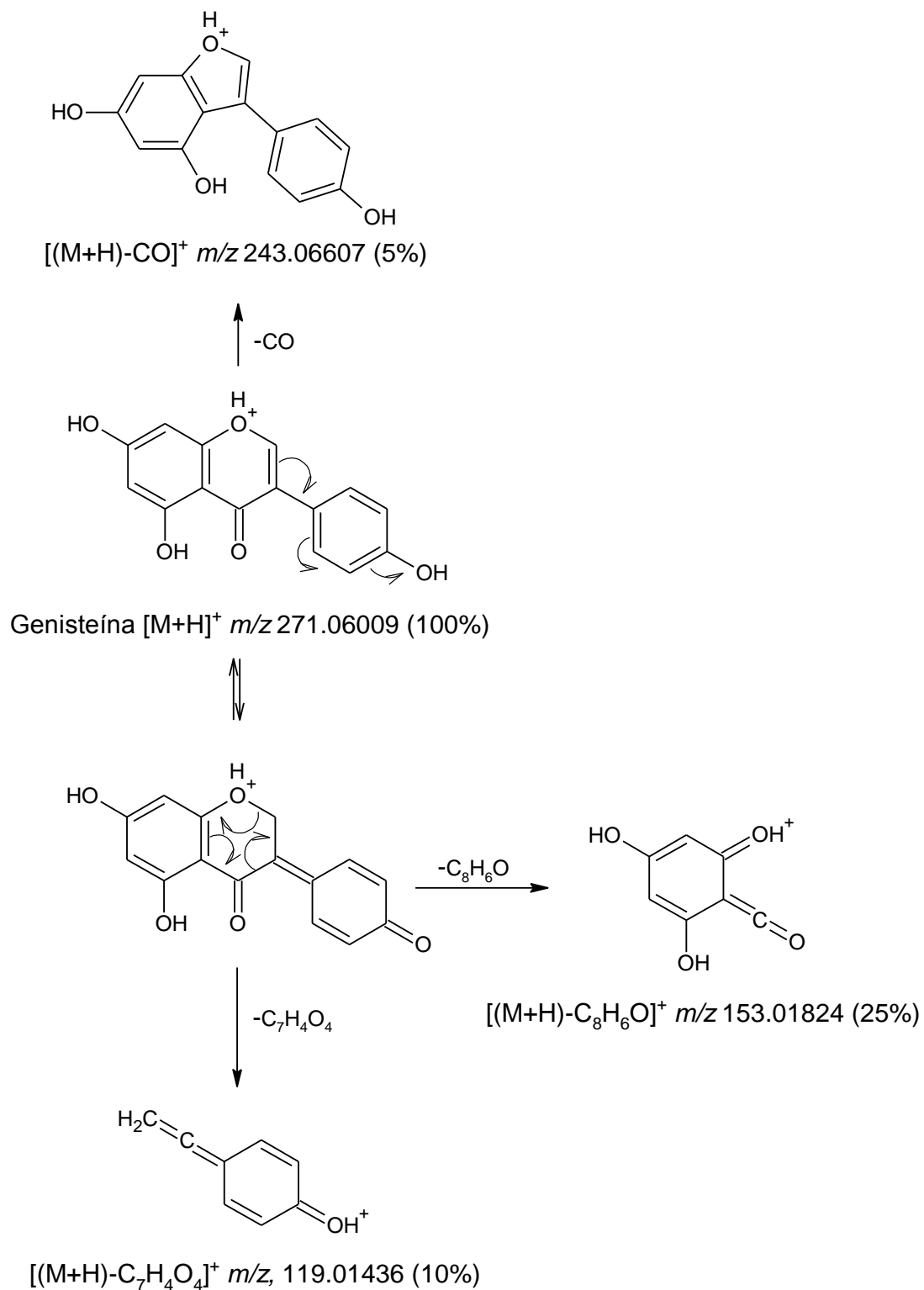


Figura 38. Posible ruta de fragmentación de la genisteína obtenida por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS con potencial de fragmentación en HCD de 30 eV.

4.7. Caracterización química de los extractos de *S. aratocensis* obtenidos con CO₂ supercrítico

En cada proceso de extracción por SFE-CO₂, se realizó un fraccionamiento mediante la variación de las presiones de colecta y la temperatura. Para la fracción uno, se usó una presión de 8 MPa y la temperatura de 35 °C. Para la fracción dos, se usó una presión de 4 MPa y temperatura de 25 °C.

Los extractos obtenidos presentaron coloración verde oscura, textura viscosa y olor dulce. El rendimiento de las extracciones fue del 4% (p/p para los tres estados). El rendimiento obtenido fue inferior a los reportados para otras *salvias*, *e.g.*, *S. miltiorrhiza* (10%) (Dean, Liu y Price, 1998), y *S. officinalis* (14.9%) (Durling *et al.*, 2007).

En los extractos se identificaron tres componentes (Tabla 13), a saber: genisteína, cirsimaritina y salvigenina (Figura 39). Su cuantificación (Tabla 14) se realizó mediante el método de estándar interno, usando el kaempferol (2.5 ppb) como sustancia de referencia. En las fracciones uno, la concentración de los compuestos identificados fue mayor que en las fracciones dos.

En los extractos, se registró un incremento de la concentración de los componentes a medida que el estado de desarrollo fenológico de las plantas avanzó hacia la post-floración. Este resultado fue contrastante con el obtenido en estudios similares realizados en plantas del mismo género. Farhat *et al.*, (2015), monitorearon la cantidad de fenoles totales obtenidos mediante extracción con solventes de plantas de *S. aegyptica* en los estados fenológicos de prefloración, floración y post-floración y determinaron que en el estado de floración el número de fenoles totales fue mayor respecto al de los otros dos estados. Farhat *et al.* (2015), también determinaron

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

el contenido total de fenoles en extractos aislados de plantas de *S. officinalis* en los estados de prefloración, floración y post-floración; se pudo concluir que las plantas de *S. officinalis* exhiben un mayor número compuestos fenólicos durante la floración.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Tabla 13.

Identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de S. aratocensis obtenidos con SFE-CO₂.

Compuesto ¹	Masa [M+H] ⁺ *			Concentración µg/g de extracto ± s (n=3) en diferentes estados					
	Experimental	Calculada	Δppm **	Prefloración		Floración		Post-floración	
				F1	F2	F1	F2	F1	F2
Genisteína	271.06047	271.06010	-1.36	0.54 ± 0.01	0.44 ± 0.03	0.67 ± 0.02	0.52 ± 0.05	0.70 ± 0.04	0.55 ± 0.04
Cirsimaritina	315.08652	315.08631	-0.67	0.59 ± 0.05	0.30 ± 0.01	0.8 ± 0.1	0.73 ± 0.02	0.90 ± 0.07	0.66 ± 0.04
Salvigenina	329.10182	329.10196	0.42	7.1 ± 0.2	5.7 ± 0.2	10.4 ± 0.3	9.1 ± 0.4	13.4 ± 0.8	12.1 ± 0.5

Nota: ¹ Identificación tentativa. (*), Masa del ion molecular protonado, (***) Error en la medición de las masas moleculares.

Tabla 14.

Cuantificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de S. aratocensis obtenidos con SFE-CO₂.

Compuesto	Área [cuentas] ± s; n=3, estado fenológico						Concentración µg/g de extracto ± s (n=3), estado fenológico					
	Prefloración		Floración		Postfloración		Prefloración		Floración		Post-floración	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
Genisteína	2.4 ± 0.1	1.9 ± 0.1	3.1 ± 0.4	2.1 ± 3	3.1 ± 0.6	2.4 ± 0.2	0.54 ± 0.01	0.44 ± 0.03	0.67 ± 0.02	0.52 ± 0.05	0.70 ± 0.04	0.55 ± 0.04
Cirsimaritina	2.6 ± 0.2	1.3 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.1 ± 0.2	3.9 ± 0.3	2.8 ± 0.3	0.59 ± 0.05	0.30 ± 0.01	0.8 ± 0.1	0.73 ± 0.02	0.90 ± 0.07	0.66 ± 0.04
Salvigenina	31 ± 1	24 ± 2	48 ± 2	38 ± 2	59 ± 5	51 ± 4	7.1 ± 0.2	5.7 ± 0.2	10.4 ± 0.3	9.1 ± 0.4	13.4 ± 0.8	12.1 ± 0.5

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

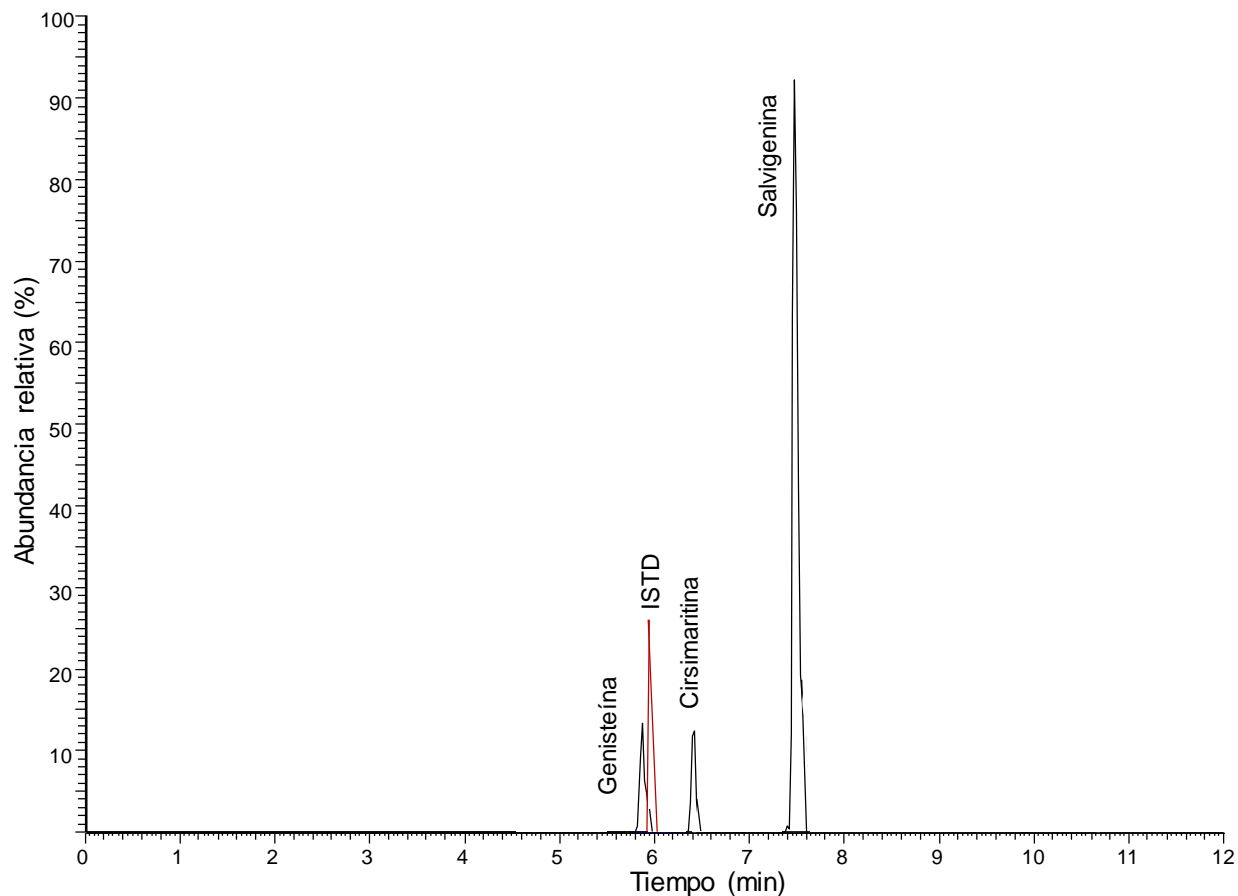


Figura 39. Corriente iónica extraída obtenida por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS del extracto supercrítico de *S. aratocensis* (fracción 1) obtenido de plantas en el estado de floración.

4.8. Determinación de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales y extractos aislados de *S. aratocensis*

La evaluación de la capacidad antioxidante de los metabolitos secundarios presentes en los AE y los extractos obtenidos de *S. aratocensis*, se realizó por los métodos de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y la decoloración del catión-radical ABTS⁺; en estos ensayos, se usaron butilhidroxitolueno (BHT) y α -tocoferol como sustancias antioxidantes de referencia.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Los resultados obtenidos se expresaron en equivalentes de μmol de Trolox[®]/g de muestra (Tabla 15).

Tabla 15.

Valores de capacidad antioxidante de los aceites esenciales y los extractos de *S. aratocensis*.

Muestra	Estado fenológico de la planta	Método de medición \pm s (n=3)		
		ORAC (μmol de trolox [®] /g de sustancia)	ABTS ⁺ (μmol de trolox [®] /g de sustancia)	
Aceite esencial	Prefloración	2800 \pm 145	206 \pm 3	
	Floración	2600 \pm 133	95 \pm 4	
	Postfloración	2830 \pm 26	193 \pm 8	
Extractos hidroalcohólicos	Prefloración	890 \pm 38	54 \pm 6	
	Floración	1050 \pm 38	69 \pm 4	
	Postfloración	1110 \pm 33	73 \pm 7	
Extractos obtenidos con CO ₂ supercrítico	Prefloración	F1	2500 \pm 120	200 \pm 12
		F2	2800 \pm 100	330 \pm 19
	Floración	F1	2100 \pm 130	95 \pm 4
		F2	2500 \pm 140	105 \pm 3
	Postfloración	F1	2100 \pm 103	85 \pm 5
		F2	1900 \pm 87	76 \pm 4
Sustancias de referencia	BHT	457 \pm 9	4760 \pm 23	
	α -Tocoferol	550 \pm 13	2429 \pm 7	

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

En la **Tabla 12** se observa que los valores de actividad antioxidante de los AE y extractos de *S. aratocensis* determinados por el método ORAC son superiores a los de las sustancias de referencia; en el caso de los AE, ello se debe, posiblemente, a la presencia de sesquiterpenos oxigenados, los cuales poseen grupos hidroxilo con hidrógenos lábiles que pueden ser donados a los radicales para su neutralización, de modo que se protege a la fluoresceína del daño oxidativo (Kumar, Varshney, Prasad, Rawat y Stashenko, 2013). En los extractos hidroalcohólicos y supercríticos, las flavonas e isoflavonas son las responsables de ceder hidrógenos de los grupos hidroxilo presentes en su estructura.

Los valores registrados para la actividad antioxidante de los extractos y AE de *S. aratocensis*, medida por el método ABTS⁺ fueron inferiores a los obtenidos para las sustancias de referencia, lo cual indica que los metabolitos aislados de *S. aratocensis* son poco eficientes en el mecanismo de donación de electrones a cationes-radicales para su neutralización.

De las muestras analizadas, los extractos hidroalcohólicos presentaron la actividad antioxidante más baja. Los AE y los extractos supercríticos de *S. aratocensis* poseen cualidades antioxidantes similares. Los valores de la actividad antioxidante de los metabolitos aislados de *S. aratocensis* varían ligeramente, según el desarrollo de las plantas. Los cambios observados en la concentración de sesquiterpenos oxigenados (AE) y flavonoides (en extractos supercríticos) en función del estado de desarrollo fenológico de la planta, no fueron significativos para la variación de los valores de actividad antioxidante obtenidos en los ensayos ORAC y ABTS⁺. En los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico, es muy probable que compuestos distintos a los identificados eran los responsables de la actividad antioxidante.

5. Conclusiones

Los rendimientos de extracción de los AE (0.2%), los extractos hidroalcohólicos (3.8%) y los obtenidos con CO₂ supercrítico (4%) de *S. aratocensis* no dependen del estado fenológico de las plantas.

Se identificaron por GC-MS 37 compuestos presentes en los AE de *S. aratocensis* en concentraciones superiores a 0.2 mg/g de AE. Más del 95% de los componentes identificados en el AE de *S. aratocensis* fueron sesquiterpenos oxigenados. La composición química de los AE varía en función del estado de desarrollo de la planta. En prefloración la concentración relativa de sesquiterpenos fue del 67% (p/p), en floración del 68% y en postfloración del 74%. La cantidad relativa de sesquiterpenos fue del 27% en prefloración y floración y del 19% en postfloración. En prefloración, se identificaron 28 componentes correspondientes al 94.8% del área cromatográfica total, en floración, 31 (95.8%) y en postfloración, 25 (96.5%).

Se identificaron por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS en los extractos obtenidos las polimetoxiflavonas, salvigenina y cirsimaritina, y la isoflavona, genisteína. La concentración de salvigenina en los extractos aumentó significativamente conforme las plantas avanzaron hacia la postfloración. En los extractos hidroalcohólicos, la concentración de salvigenina varió de 2.28 µg/g en el extracto obtenido de plantas en prefloración, a 2.9 µg/g en floración y 4.5 µg/g, en postfloración. En los extractos de plantas obtenidos con CO₂ en estado supercrítico a una presión de 8x10³ kPa, la concentración de salvigenina cambió de 7.1 µg/g en el extracto obtenido de plantas en

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

prefloración a 10.4 µg/g, en floración, y 13.4 µg/g, en postfloración; en las fracciones colectadas bajo presión de 4×10^3 kPa, pasó de 5.7 µg/g, en prefloración, a 9.1 µg/g, en floración, y 12.1 µg/g, en postfloración.

La concentración de etanol en el solvente, la cantidad solvente respecto al material vegetal, la temperatura y el tiempo de extracción son variables significativas para el proceso de obtención de extractos hidroalcohólicos. El valor ORAC de los extractos hidroalcohólicos de *S. aratocensis* se incrementó al realizar las extracciones bajo las siguientes condiciones: relación 50/50 (v/v) en la mezcla etanol/agua (solvente), temperatura de extracción de 50 °C, 40 mL de solvente por gramo de material vegetal y tiempo de extracción de 20 min.

Las variaciones observadas en la composición de los AE de *S. aratocensis* obtenidos de plantas en diferentes estados de desarrollo fenológico, no tuvieron efectos significativos sobre los resultados de la actividad antioxidante obtenidos mediante el ensayo ORAC.

Los compuestos presentes en los AE y extractos de *S. aratocensis* son más eficientes en la neutralización de radicales libres cediendo un átomo de hidrógeno, que las sustancias de referencia BHT y α -tocoferol. Los AE exhibieron en el ensayo ORAC valores de actividad antioxidante entre 2600 y 2800 µmol de Trolox[®]/g de sustancia. El rango de valores ORAC de los extractos hidroalcohólicos fue de 890 a 1110 µmol de Trolox[®]/g de sustancia y para los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico de 1900 a 2500 µmol de Trolox[®]/g de sustancia, valores superiores a los obtenidos para las sustancias de referencia, 457 µmol de Trolox[®]/g de sustancia (BHT) y 550 µmol de Trolox[®]/g de sustancia (α -tocoferol).

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Los AE y extractos de *S. aratocensis* son poco eficientes en la neutralización de radicales libres cediendo un electrón, comparados, con las sustancias de referencia BHT y α -tocoferol. Los AE presentaron en la evaluación de la actividad antioxidante mediante el método de decoloración del catión-radical ABTS⁺ valores de actividad antioxidante entre 95 y 206 μmol de Trolox[®]/g de sustancia, el rango de valores para los extractos fue de 54 a 330 μmol de Trolox[®]/g de sustancia. Estos valores son bajos, comparados con los exhibidos por las sustancias de referencia, BHT 4760 μmol de Trolox[®]/g de sustancia, y α -tocoferol 2429 μmol de Trolox[®]/g de sustancia, respectivamente.

6. Divulgación de resultados

Algunos de los resultados obtenidos en el desarrollo de este proyecto de investigación, fueron presentados en eventos de divulgación científica nacionales e internacionales, a saber: *Eighth Brazilian Symposium on Essential Oils – International Symposium on Essential Oils*, realizado del 10 al 13 de noviembre del año 2015, en la ciudad de Rio de Janeiro, Brasil; Primer Encuentro Científico – Facultad de Ciencias 2015, el cual se desarrolló el 25 y 25 de noviembre de 2015 en el campus central de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia; IV Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales (COLAPLAMED), llevado a cabo del 17 al 19 de agosto del 2016, en la ciudad de Barranquilla.

7. Recomendaciones

Realizar la identificación confirmatoria de la salvigenina, mediante la comparación del tiempo de retención y el espectro de masas obtenido por LC-ESI⁽⁺⁾-Orbitrap-MS en el desarrollo de este proyecto, con los registrados bajo las mismas condiciones analíticas, con un patrón certificado.

Evaluar la incorporación de los extractos supercríticos de *S. aratocensis* en productos cosmocéuticos como cremas antioxidantes.

Evaluar la actividad antifúngica de los AE de *S. aratocensis*.

Bibliografía

Abdalla, S. y Zarga, A. (1987). Effects of cirsimaritin, a flavone isolated from *Artemisia Judaica*, on isolated Guinea-pig ileum. *Planta Medica*. 53(4). 322-324.

Abdelhalim, A., Chebib, M., Aburjai, T., Johnston, G. y Hanrahan, J. (2014). GABA receptor modulation by compounds isolated from *Salvia triloba* L. *Advances in Biological Chemistry*. 4(1). 148-159.

Adams, R. (2005). Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. Carol Stream. USA. Allured publications.

Adrar, N., Oukil, N. y Bedjou, F. (2016). Antioxidant and antibacterial activities of thymus numidicus and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*. 88(1). 112-119.

Aghajani, Z., Kazemi, M., Dakhili, M. y Rustaiyan, A. (2009). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisi kulbadica* from Iran. *Natural Product Communications*. 4(9). 1261-1266.

Andrade, G., Gómez, R. y Ruiz, J. (1992). Biodiversidad, conservación y uso de recursos naturales: Colombia en el contexto internacional. Bogotá. Colombia. Fescol.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Arnao, M. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*. 11(11). 419-421.

Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*. 141(2). 391-396.

Ávalos, A. y Pérez-Urrutia, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. Madrid. España. Editorial REDUCA.

Ayatollahi, S., Shojaii, A., Kobarfard, F., Mohammadzadeh, M. y Choudhary, M. (2009). Two flavones from *Salvia leriaefolia*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 8(3). 179-184.

Babushok, V., Linstrom, P. y Zenkevich, I. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical Chemistry*. 40(4). 43101-43101.

Bajpai, M., Pande, A., Tewari, S. y Dhan, P. (2005). Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 56(4). 287-291.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*. 46(2). 446-475.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- Bandoni, A. (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. La Plata. Argentina. CYTED.
- Barker, J. y Ando, D. (1999) Mass Spectrometry: analytical chemistry by open learning. Greenwich. England. Wiley and Sons.
- Batish, D, Singh, H., Kohli, R. y Kaur, S. (2008). *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*. 256(12). 2166-2174.
- Becker, E., Nissen, L. y Skibsted, L. (2004) Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*. 219(6). 561-571.
- Bhouria, W., Sghaiera, M., Kilania, S., Bouhlela, I., Dijoux-Francac, M., Ghedirab, K. y Ghedira., L. (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- β -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- β -isorhamninoside. *Food and Chemical Toxicology*. 49(5). 1167–1173.
- Bisby, R., Booke, R. y Navaratnam, S. (2008). Effect of antioxidant oxidant potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry*. 108(3). 1002-1007.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- Bisio, A., Schito, A., Ebrahimi, S., Hamburguer, M., Mele, G., Piatti, G., Romussi, G., Dal Piaz, F. y De Tommasi, N. (2015). Antibacterial compounds from *Salvia adenophora* Fernald (Lamiaceae). *Phytochemistry*. 110(1). 121-127.
- Boroujeni, N., Boroujeni, M., Gholami, M. y Shafiei, A. (2016). Ethanolic extract of *Salvia officinalis* alter vascular endotelial growth factor gene expression and its receptors in the mouse endometrium at preimplantation. *Comparative Clinical Pathology*. 25(1). 125-129.
- Braca, A., Siciliano, T., D'Arrigo, M. y Germanò, M. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia*. 79(2). 123-125.
- Brizuela, A., García, L. y Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: Nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*. 15(1). 69-74.
- Bueno, J., Escobar, P., Martínez, J., Leal, S. y Stashenko, E. (2011). Composition of three essential oils, and their mammalian cell toxicity and antimycobacterial activity against drug resistant-tuberculosis and nontuberculous mycobacteria strains. *Natural Product Communications*. 6(11). 1743-1748.
- Cala, M., Vázquez, A., Miranda,., Tafur, G., Martínez, J. y Stashenko, E. (2007). Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia*

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. *Scientia et Technica*. 1(33). 205-207.
- Cao, G., Alessio, H. y Cutler, R. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 14(3). 303-311.
- Cardile, V., Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N. y Piozzi, F. (2009). Essential oils of *Salvia bacteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 126(2). 265-272.
- Cefarelli, G., D'abrosca, B., Fiorentino, A., Izzo, A., Mastellone, C., Pacifico, S. y Piscopo, V. (2002). Free-radical-scavenging and antioxidant activities of secondary metabolites from reddened cv. Annurca apple fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(3). 803-809.
- Chang, S., Cheng, S. y Wang, S. (2001). Antitermitic activity of essential oils and components from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides*). *Journal of Chemical Ecology*. 27(4). 717-724.
- Chemat, F. y Cravotto, G. (2013). Microwave-assisted extraction for bioactive compounds. New York. United States. Springer.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Croteau, T., Kutchan, N. y Lewis, G. (2000). Natural products (Secondary Metabolites).

American Society of Plant Physiologists. Rock Ville. Estados Unidos. American Society of Plant Physiologists.

Dean, J., Liu, B. y Price, R. (1998) Extraction of tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* bunge using supercritical fluid extraction and a new extraction technique, phytosol solvent extraction. *Journal of Chromatography A*. 799(2). 343-348.

Del Baño, M., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Marín, M. e Ibarra, I. (2004). Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis* postulation of a biosynthetic pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(16). 4987–4992.

Del-Vechio, G., Sousa, O., Yamamoto, C. y Kaplan, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). *Records of Natural Products*. 3(1). 52-57.

Destandau, E., Michel, T. y Elfakir, C. (2013). Natural Product Extraction: principles and applications. Cambridge. United Kingdom. RSC Publishing.

Dewick, P. (2009). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Nottingham. United Kingdom. Ed. Wiley & sons.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- Dincer, C., Topuz, A., Sahin-Nadeem, H., Ozdemir, K., Burak, I., Tontul, I., Suleyman, R., y Tugrul, S. (2012). A comparative study on phenologic composition, antioxidant activity and essential oil content of wild and cultivated sage (*Salvia fruticosa* Miller) as influenced by storage. *Industrial Crops and Products*. 39(1). 170-176.
- Diplock, A., Charleux, J., Crozier, G., Kok, F., Rice, C., Roberfroid, M., Stahl, W. y Viña, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*. 80(1). 77-112.
- Dolinoy, D., Weidman, J., Waterland, R. y Jirtle, R. (2006). Maternal genistein alters coat color and protects avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environmental Health Prospects*. 114(4). 567-572.
- Dötterl, S. y Schäffler, I. (2007). Flower scent of floral oil-producing *Lysimachia punctata* as attractant for the oil-bee *Macropis fulvipes*. *Journal of Chemical Ecology*. 33(2). 441-445.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. y Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*. 198(1). 16-32.
- Durling, N., Catchpole, O., Grey, J., Webby, R., Mitchell, K, Foo, L. y Perry, N. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry*. 101(4). 1417-1424.

- Falcone, M., Rius, S. y Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers In Plant Sciences*. 3(1). 1-10.
- Farhat, G., Affara, N. y Gali-Muhtasib, H. (2001). Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of East Mediterranean sage (*Salvia libanotica*) and its toxicity in mice. *Toxicon*. 39(10). 1601-1605.
- Farhat, M., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J., Landoulsi, A. y Jordán, M. (2014). Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. *Industrial Crops and Products*. 54(1). 78-85.
- Farhat, M., Jordán, M., Chaouch-Hamada, R., Landoulsi, A. y Sotomayor, J. (2015). Changes in phenolic profiling and antioxidant capacity of *Salvia aegyptica* L. by-products during three phenological stages. *Food Science and Technology*. 63(1). 791-797.
- Farhat, M., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. y Jordán, M. (2013). Phytochemical composition and *in vitro* antioxidant activity of by products of *Salvia verbenaca* L. growing wild in different habitats. *Industrial Crops and Products*. 49(1). 373-379.
- Fernández Alonso, J. (2003). Estudios en *Labiatae* de Colombia IV. Novedades en *Salvia* y sinopsis de las secciones *Angulatae* y *Purpureae*. Bogotá. Colombia. Caldasia.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Fernández, J. y Rivera, O. (2005). Las *Labiadas*. Bogotá. Colombia. Instituto de Ciencias Naturales (Universidad Nacional de Colombia).

Gaitán, J. (2011). Estudio de metabolitos secundarios volátiles de *Salvia aratocensis*, aislados mediante diferentes técnicas de extracción. Tesis de pregrado. Bucaramanga. Colombia. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

García-Rojas, A., Fontecha-García, J., Perálta-Bohórquez, A., Quijano-Celis, C., Morales, G. y Pino, J. (2010). Composition of the essential oil from leaves and fruits of *Salvia palaefolia* Kunth grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research*. 22(4). 369-370.

Gershenzon, J. y Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*. 3(7). 409-412.

Giatropoulos, A., Pitarokili, D., Papaioannou, F., Papachristos, D., Koliopoulos, G., Emmanouel, N., Tzakou, O. y Michaelakis, A. (2013). Essential oil composition, adult repellency and larvicidal activity of eight *Cupressaceae* species from Greece against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*. 112(3). 1113-1123.

Gohari, A., Ebrahimi, H., Saeidnia, S., Foruzani, M., Ebrahimi, P. y Ajanid, Y. (2011). Flavones and flavone glycosides from *Salvia macrosiphon* Boiss. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 10(2). 247-251.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Gohari, A., Saeidnia, S., Malmir, M., Hadjiakhoondi A. y Ajani, Y. (2010). Flavones and rosmarinic acid from *Salvia limbata*. *Natural Product Research*. 20(1). 1902-1906.

Graça-Miguel, M. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short Review. *Molecules*. 15(12). 9252-9287.

Grayer, R., Veitch, N., Kite, G., Price, A. y Kokubun, T. (2001). Distribution of 8-oxygenated leaf-surface flavones in the genus *Ocimum*. *Phytochemistry*. 56(6). 559-567.

Grob, R. y Barry, E. (2004). Modern practice of gas chromatography. Malvern. United States. Wiley & sons.

Gu, L. y Weng, X. (2001). Antioxidant activity and componets of *Salvia plebeia* R. Br. A Chinese herb. *Food Chemistry*. 73(3). 299-305.

Guardia, T., Rotelli, A., Juarez, A. y Pelzer, L. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *IL Farmaco*. 56(9). 683-687.

Guohya, C., Helaine, M. y Cutler, R. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*. 14(3). 303-311.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Gupta, V. y Tuohy, M. (2015). *Biotechnology of bioactive compounds sources and applications*. Londres. United Kingdom. Wiley Blackwell.

Halliwell, B. (1999). Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*. 33(1). 261-272.

Hamdy, M., Sarhan, M., Selim, K. y Khalel, K. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*. 43(1). 827-831.

Hardman, M. y Makarov, A. (2003). Interfacing the *orbitrap* mass analyzer to an electrospray ion source. *Analytical Chemistry*. 75(7). 1699-1705.

Hasanein, P., Falehgari, Z. y Emamjomeh, A. (2016). Preventive effects of *Salvia officinalis* L. against learning and memory deficit induced by diabetes in rats: Possible hypoglycemic and antioxidant mechanisms. *Neuroscience Letters*. 622(1). 72-77.

Hasrat, J., De Bruyne, T., Backer, J., Vauquelin, G. y Vlietink, A. (1997). Cirsimaritin, flavonoids of *Microtea debilis* (Phytolaccaceae) with adenosine antagonistic properties in rats: leads for new therapeutics in acute renal failure. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 49(1). 1150-1156.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Haznedaroglu, M., Karabay, N. y Zaybek, U. (2001). Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia*. 72(7). 830-831.

Herrera, M., García, Y., Mora, S., Díaz, G, Glauce, V., Tortoriello, J. y Ramírez, G. (2006). Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans*. *Journal of ethnopharmacology*. 107(1). 53-58.

Ho, C., Liao, P., Wang, E. y Su, Y. (2011). Composition and antifungal activities of the leaf essential oil of *Neolitsea parvigema* from Taiwan. *Natural Product Communications*. 6(9). 1356-1360.

Hoffman, E. y Stroobant, V. (1998). Mass spectrometry: principles and applications. Chichester. England. Wiley & Sons.

Hu, Q., Noll, R., Li, H., Makarov, A., Hardmanc, M. y Cooks, R. (2005). The *Orbitrap*: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*. 40(4). 430–443.

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. y Prior, R. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(16). 4437-4444.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Huck, C., Huber, C., Ongania, K. y Bonn, G. (2000). Isolation and characterization of methoxylated flavones in the flowers of *Primula veris* by liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 870(2). 453-462.

Ito, N., Fukushima, S. y Tsuda, H. (2008). Critical reviews in toxicology carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Critical Reviews in Toxicology*. 15(2). 109-150

Jabs, T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology*. 57(3). 231-245.

Johnson, J. (1987). Chromatographic theory and basic principles. New York. USA. Marcel Dekker, Inc.

Jovanovic, S., Steenken, S., Boone, C. y Simic, M. (1999). H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *Journal of American Chemical Society*. 121(41). 9677-9681.

Judd, W., Campbell, C., Kellog, E., Stevens, P. y Donoghue, M. (2002). Secondary plant compounds. *Plant Systemics and Evolution*. 239(3). 292-294.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Kalmanovitz, S. (2003). *Economía y nación: Una breve historia de Colombia*. Bogotá. Colombia.

Editorial Norma.

Kamatou, G., Makunga, N., Ramogola, W. y Voljoen, A. (2008). South African *Salvia species*: A review of biological activities and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*. 119(3). 664-672.

Kamatou, G., Van Vuuren, S., Van Heerden, F., Seaman, T. y Viljoen, A. (2007). Antibacterial and antimycobacterial activities of South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. chamelaeagna*. *South African Journal of Botany*. 73(4). 553-557.

Kanadaswami, C., Lee, L., Lee, P., Hwang, J., Ke, F., Huang, Y. y Lee., M. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In vivo*. 19(5). 895-910.

Karioti, A., Hadjipavlou-Litina, D., Mensah, M., Fleischer, T. y Skaltsa, H. (2004). Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopi aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(26). 8094-8098.

Kelm, M., Nair, M., Strasburg, G. y De Witt, D. (2000). Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine*. 7(1). 7-13.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Klejdus, B., Vitamvášová, D. y Kubán, V. (2001). Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography–mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Analitica Chimica Acta*. 450(2). 81-97.

Kohen, R. y Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30(6). 620-650.

Kumar, A., Varshney, V., Prasad, R., Rawat, M. y Stashenko, E. (2013). *In vitro* antioxidant, antifungal and antibacterial activities of essential oil of *Morina longifolia* Wall. Leaves. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 3(3). 183-19.

Kumar, S. y Pandey, K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 16(2). 1-16.

Lanigan, R. y Yamarik, T. (2002). Final report on the safety assessment of BHT. *International Journal of Toxicology*. 21(2). 19-94.

Law, M. y Halliwell, B. (1983). Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochemical Journal*. 210(3). 899-903.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N. y Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom *versus* electron transfer mechanism. *Journal of Physical Chemistry A*. 108(22). 4916-4922.

Li, R., Yang, F., Liu, J., Yang, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, p. y Wang, Z. (2015). Compound *Salvia* pellet in combination with rebeprazole for treatment of elderly patients with chronic atrophic gastritis: Curative efficacy and effect on serum gastrin and endothelin. *World Chinese Journal of Digestology*. 23(1). 1298-1302.

Lichtenthaler, H., Rohmer, M. y Schwender, J. (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenil diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*. 101(3). 643-652.

Longaray, A. Moschen-Pistorello, I., Artico, L., Atti-Serafini., L. y Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *S. officinalis* L. and *S. trilobal* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*. 100(3). 603-608.

Magina, M., Dalmarco, E., Wisniewski, A., Simionatto, E., Dalmarco, J., Pizzolatti, M. y Brighente, I. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. *Journal of Natural Medicines*. 63(3). 345-350.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- Mahdi, M. y Bahernik, Z. (2007). Extraction and identification of chemical components of the essential oil of *Salvia compressa* Vent. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 22(4). 431-436.
- Makarov, A. (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*. 72(6). 1156-1162.
- Malheiros, A., Schmitt, C., Yunes, R. y Monache, F. (2005). Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassay-guided fractionation. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 8(2). 335-339.
- Mansourabadi, A., Sadeghi, H., Razavi, N. y Rezvani, E. (2015). Anti-inflammatory and analgesic properties of Salvigenin, *Salvia officinalis* flavonoid extracted. *Advanced Herbal Medicine*. 1(3). 31-41.
- Marineli, R., Aguiar, É., Alves, S., Teixeira, A., Nogueira, M. y Maróstica, M. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT – Food Science and Technology*. 53(2). 71-77.
- Martínez-Cruz, O. y Paredes-López, O. (2014). Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1346(1). 43-48.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- McCarthy, T., Kerry, J., Lynch, B. y Buckley, D. (2001). Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science*. 57(1). 45-52.
- McGarvey, D. y Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*. 7(7). 1015-1026.
- Melkani, A., Mohan, A., Pant, C., Negi, A. y Dev, V. (2011). Terpenoid composition and antibacterial activity of essential oil from *Salvia hians* Royle ex. Benth. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 14(4). 662-667.
- Miski, M., Ulubelen, A., Johansson, C. y Mabry, J. (1983). Antibacterial activity studies of flavonoids from *S. palestina*. *Journal of Natural Products*. 46(6). 874-875.
- Mortensena, A., Skibsted, L., Sampson, J., Rice-Evans, C. y Everett, S. (1997). Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *Fellow of the European Board of Surgery Letters*. 418(2). 91-97.
- Müller, G., Junnila, A., Butler, J., Kravchenko, V., Revay, E., Weiss, R. y Schlein, Y. (2009). Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*. 34(1). 2-8.
- Munos, J., Pu, X., Mansoorabadi, S., Kim, H. y Liu, H. (2009). A secondary kinetic isotope effect study of the 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase-catalyzed reaction:

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- evidence for a retroaldol-aldol rearrangement. *Journal of the American Chemical Society*. 131(6). 2048–2049.
- Nenadis, N., Wang, L., Tsimidou, M. y Zhang, H. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS⁺ assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(15). 4669-4674.
- Noori, S., Hassan, Z., Yaghmaei, B. y Dolatkah, M. (2013). Antitumor and immunomodulatory effects of salvigenin on tumor bearing mice. *Cellular Immunology*. 286(2). 16-21.
- Oliveira, C., Salvador, M., de Carvalho, J., Santos, É., Barison, A. y Stefanello, M. (2016). Cytotoxic abietane-derivative diterpenoids of *Salvia lachnostachys*. *Phytochemistry Letters*. 17(1). 140-143.
- Oztürk, M., Duru, M., Aydoğmuş-Oztürk, F., Harmandar, M., Mahliçli, M., Kolak, U. y Ulubelen, A. (2009). GC-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys cretica* subsp. *Smyrnaea*. *Natural Product Communications*. 4(1). 109-114.
- Palazzo, M., Agius, B., Wright, B., Haber, W. y Moriarity, D. (2009). Chemical compositions and cytotoxic activities of leaf essential oils of four Lauraceae tree species from Monteverde, Costa Rica. *Records of Natural Products*. 3(1). 32-37.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- Pan, J., Xiao-Xiao, X. y Liang, J. (2008). Analysis of pesticide multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic solvent extraction and liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15(1). 25-32.
- Perkin, A. y Newbuby, F. (1899). The colouring matters contained in dyer's broom (*Genista tinctoria*) and Heather (*Colluna vulgaris*). *Journal of the Chemical Society*. 75(1). 830-839.
- Perry, B., Anderson, R., Brennan, N., Douglas, M., Heaney, A., McGimpsey, J. y Smallfield, B. (1999). Essential oils from dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(5). 2048–2054.
- Pessoa, A., de Oliveira, E., Alves, P., Santos, E., Carmo, E. y Leite, E. (2010). Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41(3). 28-33.
- Peterson, G. y Barnes, S. (1996). Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Cell Growth Differentiation*. 7(10). 1345-1351.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S. y Vianello, A. (2013).

Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(7). 14950-14973.

Plaza, L., Ancos, B. y Cano, M. (2003). Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*. L) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method. *European Food Research and Technology*. 216(2). 138-144.

Porres, M., Gonzales, E., Carretero, M. y Gómez, P. (2014). Influence of phenological stage on chemical composition and antioxidant activity of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oils. *Industrial Crops and Products*. 53(1). 71-77.

Quan, Z., Gu, J., Dong, P. y Liu, Y. (2010). Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction contribute to cirsimaritin-induced apoptosis in human gallbladder carcinoma GBC-SD cells. *Cancer Letters*. 295(2). 252-259.

Rafatian, G., Khodaghali, F., Farimani, M., Abraki, S. y Gardaneh, M. (2012). Increase of autophagy and attenuation of apoptosis by Salvigenin promote survival of SH-SY5Y cells following treatment with H₂O₂. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 371(2). 9-22.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Ramírez, J., Palacios, M. y Gutiérrez, O. (2007). Implementation of the technique in isolated organ vascular as tool for the validation of medicinal plants: Study of the vasodilator effect of the *S. scutellarioides*. *Colombia Medica*. 38(1). 34-49.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9). 1231-1239.

Rego, C. y Oliveira, C. (2003). Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity y apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochemical Research*. 28(10). 1563-1574.

Ren, D., Du, G. y Zhang, J. (2002). Inhibitory effect of the water-soluble extract of *Salvia miltiorrhiza* on neutrophil-endothelial adhesion. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 90(3). 276-280.

Roberts, M. y Wink, M. (1998). Alkaloids Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. New York. United States. Springer Science.

Romussi, G., Ciarallo, G., Bisio, A., Fontana, N., De Simone, F., De Tommasi, N., Mascolo, N. y Pinto, N. (2001). A new diterpenoid with antispasmodic activity from *Salvia cinnabarina*. *Planta Medica*. 67(2). 153-155.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- Rosas-Ramírez, D., Fragoso-Serrano, M. Escandón-Rivera, S. Vargas-Ramírez, A. Reyes-Grajeda, J. y Soriano-García, M. (2017). Resistance-modifying activity in vinblastine-resistant human breast cancer cells by oligosaccharides obtained from mucilage of chia seeds (*Salvia hispánica*). *Phytotherapy Research*. 31(6). 906-914.
- Rustaiyan, A., Shafeghat, A., Masoudi, S., Akhlaghy, H. y Tabatabaei-Anaraki, M. (2007). Chemical Composition of the essential oils from stems, leaves and flowers of *Salvia leriifolia* Benth. from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 10(2). 121-126.
- Sairam, p., Somsubhra, G., Satyabrata, J. y Banji, D. (2012) Supercritical fluid extraction (SFE) – An overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2(3). 112-120.
- Saito, M., Sakagami, H. y Fujisawa, S. (2002). Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Anticancer Research*. 23(6). 4693-4701.
- Salimikia, I., Aryanpour, M., Bahramsoltani, R., Abdollahi, M. y Abdolghaffari, A. (2016). Phytochemical and wound healing effects of methanolic extract of *Salvia multicaulis* Vahl. in rat. *Journal of Medicinal Plants*. 1(57). 38-46.
- Santos-Gomes, P., Saeber, R., Andrade, P. y Fernandes-Ferreira, M. (2002). Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*. 162(6). 981-987.

- Savelev, S., Okello, E., Perry, N., Wilkins, R. y Perry, E. (2003). Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 75(3). 661-668.
- Scanlon, J. y Willis, D. (1985). Calculation of flame ionization detector relative response factors using the effective carbon number concept. *Journal of Chromatographic Science*. 23(8). 333-340.
- Sevindik, N. y Rencuzogullari, E. (2014). The genotóxica and antigenotoxic effects of *Salvia fruticosa* leaf axtract in human blood lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*. 37(3). 295-302.
- Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Molecular Nutrition & Food Research*. 44(3). 158-163.
- Shahidi, F. y Zhong, Y. (2005). Antioxidants: Regulatory Status. New Jersey. Estados Unidos. Wiley & sons.
- Simón-Arceo, K. González-Trujano, M., Coffen, U., Fernández-Mas, R., Mercado, F., Almanza, A., Contreras, B., Jaimes, O. y Pellicer, F. (2017). Neuropathic and inflammatory antinociceptive effects and electrocortical changes produced by *Salvia divinorum* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 206(1). 115-124.

Skoog, D., Vest, D. y Holler, J. (2010). Fundamentos de química analítica. Barcelona. España. Reverté.

Smith, R. (1983). HPLC in food analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1(3). 242.

Stashenko, E. (2009). Aceites esenciales. Bucaramanga. Colombia. División de publicaciones UIS.

Stashenko, E. y Martínez, J. (2009). Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*. 1(3). 29-45.

Stashenko, E. y Martínez, J. (2010). Algunos aspectos prácticos de la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*. 2(1). 29-47.

Stashenko, E. y Martínez, J. (2010). GC y GC-MS: Configuración del equipo *versus* aplicaciones. *Scientia Chromatographica*. 2(3). 23-46.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- Šulniūtė, V., Ragažinskienė y Venskutonis, R. (2016). Comprehensive evaluation of antioxidant potential of ten *Salvia* species using high pressure methods for the isolation of lipophilic and hydrophilic plant fractions. *Plant Foods Human Nutrition*. 72(6). 1-8.
- Süntar, I. Akkol, E., Sezer, F., Keles, H. y Orhana, I. (2011). Investigating wound healing, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of the ethanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia cyanescens* using *in vivo* and *in vitro* experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*. 135(1). 51-57.
- Suzuki, R., Lijima, M., Okada, Y. y Okuyama, T. (2007). Chemical constituents of the style of *Zea mays* L. with glycation inhibitory activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 55(1). 153-155.
- Tan. N., Satana, D., Sen, B., Tan, E., Altan, H., Demirci, B., Uzun, M. (2016). Antimycobacterial and antifungal activities of selected four *Salvia* species. *Records of Natural Products*. 10(5). 593-603.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M. y Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*. 90(3). 333–340.
- Tritsch, D., Hemmerlin, A., Bach, T. y Rohmer, M. (2010). Plant isoprenoid biosynthesis via the MEP pathway: *in vivo* IPP/DMAPP ratio produced by (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- diphosphate reductase in tobacco BY-2 cell cultures. *Fellow of the European Board of Surgery Letters*. 584(1). 129–134.
- Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G. y Oreopoulou, V. (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*. 12(3). 593-606.
- Turrens, J. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 552(2). 335-344.
- Ulubelen, A. y Uygur, I. (1976). Flavonoids and other compounds of *Salvia aethiopis*. *Planta Medica*. 29(4). 318-320.
- Ulubelen, A., Miski, M., Neuman, P. y Mabry, T. (1979). Flavonoids of *Salvia tomentosa* (Labiatae). *Journal of Natural Products*. 42(3). 261-263.
- Ulubelen, A., Öztürk, S. y İsíldatici, S. (1968). A new flavone from *Salvia triloba* L.f (Labiatae). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 57(6). 1037-1038.
- Ulubelen, A., Topcu, G. y Kolak, U. Labiatae flavonoids and their bioactivity. (2005). *Studies in Natural Products Chemistry*. 30(1). 233-293.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

- Valkoa, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Croninc, M., Mazura, M. y Telserd, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(1). 44-84.
- Van Acker, S., Van den Berg, D. y Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*. 20(3). 331-342.
- Vega, N. y Pérez, G. (2006). Isolation and characterisation of *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry*. 67(4). 347-355.
- Wang, K. y Zhang, H. (2009). Positive electrospray ionization tandem mass spectrometry of polymethoxylated flavones. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 23(1). 2107-2111.
- Wei, H., Bowen, R. y Cai, Q. (1995). Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Experimental Biology and Medicine*. 208(1). 124-129.
- Williams, K. (2002). Colored bands: history of chromatography. *Journal of Chemical Education*. 79(8). 922-923.
- Wold, S. (1987). Principal components analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2(3). 37-52.

UN APORTE A LA BIOPROSPECCIÓN

Yang, S., Brereton, S., Wheeler, M. y Ellis, A. (2005). ¿Soft or hard ionization of molecules in helium nanodroplets? An electron impact investigation of alcohols and ethers. *Physical Chemistry and Chemical Physics*. 32(24). 4085-4087.

Yinrong, L. y Yeap, F. (2000). Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*. 55(3). 263-267.

Zhang, F. y Smith, D. (1996). Genistein accumulation in soybean (*Glicine max* [L.] Merr.) root systems under suboptimal root zone temperaturas. *Journal of Experimental Botany*. 47(6). 785-792.