

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE *Satureja viminea* L., OBTENIDOS POR DIFERENTES  
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE SU CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE.**

**DIANA LISSETH MANRIQUE LÓPEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE *Satureja viminea* L., OBTENIDOS POR DIFERENTES  
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE SU CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE.**

**DIANA LISSETH MANRIQUE LÓPEZ**

**Tesis de grado para optar al título de  
Química**

**Directores**

**ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.**

**JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.**

**Co-directora:**

**DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA, Licenciada en Química, Ph.D.**

**Universidad Autónoma de Querétaro, México.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

## DEDICATORIA

*A Dios, sin él, nada de esto sería posible.*

*A quienes debo todo lo que soy y a quienes amo por encima de todo, José Miguel y Rosalba, mis padres, por ser mí ejemplo a seguir, por apoyarme y estar a mi lado incondicionalmente. Gracias por su amor, comprensión y confianza.*

*A mis hermanos Karen y Miguel, a quienes adoro con todo mi corazón, gracias por su compañía y amistad, por acompañarme en los momentos más importantes de mi vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres José Miguel y Rosalba, por brindarme todo su amor y su apoyo, por ser mí ejemplo a seguir, por su comprensión y confianza.

A los Doctores Elena Stashenko y Jairo René Martínez, por compartir con sus estudiantes sus conocimientos, por fomentar la disciplina y la constancia como elementos primordiales en el desarrollo de la investigación científica, y por permitirme formar parte del Centro de Investigación y Excelencia, CENIVAM.

Especialmente quiero agradecer a la Doctora Dora Marina Gutiérrez Avella, gracias infinitas de todo corazón por tus sabios consejos, por tu compañía, por tu amistad, por todos los gratos momentos y por haber compartido este gran logro contigo.

A mis amigos de siempre Nathalie Gómez, Eliana Benincore, Verónica Chaparro, Eduardo Ravelo, Carlos Martínez, Sergio Guerrero, por los gratos momentos compartidos en estos años.

A Adriana Maldonado, por su amistad incondicional, por acompañarme en los buenos y malos momentos.

A mi Tía Blanca, por su compañía y por sus sabios consejos.

A todos los integrantes del Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, y compañeros del grupo de investigación, especialmente a Yuri Córdoba, Andrés González, Jesica Mejía, Corina Bernal y Julián Arias, por su apoyo e incondicionalidad.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>1. ESTADO DEL ARTE .....</b>	<b>24</b>
1.1. Género <i>Satureja</i> .....	24
1.1.1. <i>Satureja viminea</i> .....	25
1.2. ACEITES ESENCIALES .....	28
1.2.1. Definición .....	28
1.2.2. Composición química .....	29
1.2.3. Control de calidad de los aceites esenciales.....	30
1.3. EXTRACTOS .....	33
1.4. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.....	34
1.4.1. Obtención de aceites esenciales.....	34
1.4.2. Obtención de extractos .....	35
1.4.3. Obtención de fracciones volátiles.....	36
1.5. ANTIOXIDANTES .....	38
1.5.1. Compuestos antioxidantes .....	40
1.5.2. Estrés oxidativo .....	42
1.5.3. Los radicales libres.....	42
1.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	43
1.6.1. Capacidad de absorción de radicales oxígeno.....	44
1.6.2. Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS <sup>+</sup> .....	45
1.6.3. Peroxidación lipídica .....	46
1.6.4. Monitoreo de la peroxidación lipídica .....	50
1.7. SEPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.....	53
1.7.1. Cromatografía de gases.....	53

1.7.2.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....	54
1.7.3.	Cromatografía líquida de alta eficiencia .....	54
<b>2.</b>	<b>CIENCIOMETRÍA.....</b>	<b>56</b>
<b>3.</b>	<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>59</b>
3.1.	REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO .....	59
3.2.	CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA .....	62
3.3.	OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	63
3.3.1.	Hidrodestilación asistida por microondas .....	63
3.4.	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS .....	65
3.4.1.	Destilación-extracción con solvente simultánea .....	65
3.4.2.	Extracción con fluido supercrítico.....	66
3.4.3.	Extracto con solvente .....	66
3.5.	OBTENCIÓN DE FRACCIONES VOLÁTILES .....	67
3.5.1.	<i>Headspace</i> estático.....	67
3.5.2.	Microextracción en fase sólida .....	68
3.6.	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	69
3.6.1.	Cuantificación.....	71
3.6.2.	Identificación .....	71
3.6.3.	Análisis por HPLC-DAD .....	72
3.7.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS .....	74
3.7.1.	Capacidad de absorción del oxígeno radical.....	75
3.7.2.	Ensayo de decoloración del radical ABTS <sup>+</sup> .....	75
3.7.3.	Peroxidación lipídica .....	76
3.8.	DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S. viminea</i> .....	81

<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>82</b>
4.1.	IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE .....	82
4.2.	SECADO DEL MATERIAL VEGETAL.....	82
4.3.	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS AE Y EXTRACTOS DE <i>S. viminea</i> . ....	83
4.3.1.	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>S. viminea</i> , aislados por MWHD. ....	84
4.3.2.	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>S. viminea</i> , aislados por SDE. ....	93
4.3.3.	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>S. viminea</i> , aislados por SFE.....	97
4.3.4.	Identificación de la fracción volátil por <i>headspacey</i> SPME. ....	100
4.3.5.	Identificación de flavonoides aislados por extracción con solvente....	109
4.4.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS DE <i>S. viminea</i> .....	113
4.5.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DE LOS AE Y EXTRACTOS EN UN SISTEMA LIPÍDICO.....	115
4.6.	DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S. viminea</i> .....	118
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>119</b>
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>122</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>123</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>135</b>

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los parámetros analíticos aplicados para el control de calidad de los aceites esenciales.	31
<b>Tabla 2.</b> Sustancias químicas empleadas en esta investigación.	59
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de extracción por MWHD de los aceites esenciales de <i>Satureja viminea</i> (Lamiaceae).	64
<b>Tabla 4.</b> Identificación taxonómica de la especie <i>Satureja viminea</i> L.	82
<b>Tabla 5.</b> Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por MWHD, de <i>S. viminea</i> fresca.	86
<b>Tabla 6.</b> Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por MWHD, de <i>S. vimineaseca</i> .	89
<b>Tabla 7.</b> Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por SDE, de la planta <i>S. vimineaseca</i> .	95
<b>Tabla 8.</b> Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por SFE, de <i>S. vimineaseca</i> .	98
<b>Tabla 9.</b> Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por HS-SPME, de hojas y tallos frescos de <i>S. viminea</i> .	102
<b>Tabla 10.</b> Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por HS-SPME,de hojas y tallos secos de <i>S. viminea</i> .	105

<b>Tabla 11.</b> Compuestos principales de la planta <i>S. viminea</i> , obtenidos por diferentes técnicas de extracción.	108
<b>Tabla 12.</b> Familias de compuestos de la planta <i>S. viminea</i> , obtenidos por diferentes técnicas de extracción.	109
<b>Tabla 13.</b> Valores de TAC ( $\mu\text{mol Trolox } \text{\textcircled{R}} / \text{g sustancia}$ ), obtenidos por el método ORACy ABTS <sup>+</sup> , para el AE obtenido de plantas frescas y extractos metanólico e isopropanólico de <i>S. viminea</i> .	114
<b>Tabla 14.</b> Porcentaje de protección de los AE, extractos, BHT y $\alpha$ -tocoferol en el aceite de girasol.	116
<b>Tabla 15.</b> Ficha técnica del aceite esencial de <i>Saturejaviminea</i> .	118

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Planta de <i>Satureja viminea</i> (Fam. Lamiaceae). Foto tomada por la autora en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM, el 3 de abril de 2013.	26
<b>Figura 2.</b> Estructuras de los componentes mayoritarios presentes en el AE de <i>Satureja viminea</i> . A. <i>p</i> -Menta-3-en-8-ol y B. Pulegona.	27
<b>Figura 3.</b> Unidad estructural característica de los terpenoides.	29
<b>Figura 4.</b> Dispositivo para SPME (Arthur and Pawliszyn, 1990).	38
<b>Figura 5.</b> Estructuras químicas de algunos antioxidantes sintéticos usados en alimentos y cosméticos. BHA: Butil-hidroxianisol; BHT: Butil-hidroxitolueno; TBHQ: <i>ter</i> -butilhidroquinona; PG: Galato de propilo; $\alpha$ -tocoferol.	40
<b>Figura 6.</b> Estructura básica y ejemplos de flavonoides.	41
<b>Figura 7.</b> Estructura química de la fluoresceína.	44
<b>Figura 8.</b> Generación del catión-radical ABTS <sup>+</sup> •.	45
<b>Figura 9.</b> Formación de radicales de ácidos grasos (R <sup>•</sup> ) por abstracción de un hidrógeno H <sup>•</sup> , iniciadas por ERO o cualquier RL.	47
<b>Figura 10.</b> Estabilización de los radicales de ácidos grasos (R <sup>•</sup> ) por medio de rearrreglos intramoleculares y formación de peróxidos por reacción de éstos radicales con oxígeno.	47

- Figura 11.** Ataque de un radical peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ) a una molécula vecina, abstrayendo  $\text{H}\cdot$  y propagando la reacción en cadena. 48
- Figura 12.** Formación de radicales alcoxilo ( $\text{RO}\cdot$ ) en presencia de metales divalentes, en el proceso de finalización de la peroxidación lipídica. 48
- Figura 13.** Productos finales generados durante el proceso de peroxidación lipídica. 49
- Figura 14.** Generación del hexanal durante la oxidación del ácido linoléico. 50
- Figura 15.** Reacción de derivación de los aldehídos con pentaflúorfenilhidracina (PFPH). 52
- Figura 16.** Número de publicaciones por año, sobre el género *Satureja*. Periodo de observación: 1994 – 2013. Base de datos: *Science Direct, Scopus (Elsevier)*. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABSTR-KEY (essential oil and Satureja)* y *TITLE-ABSTR-KEY (extract and Satureja)*. Total artículos: 631. Fecha de consulta: agosto 22 de 2013. 57
- Figura 17.** Número de publicaciones, por año, sobre el género *Satureja*. Periodo de observación: 1993 – 2013. Base de datos: *Science Direct, Scopus (Elsevier)*. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABSTR-KEY (Antioxidants and Satureja)*; Total artículos: 104. Fecha de consulta: agosto 22 de 2013. 58
- Figura 18.** Montaje MWHD. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Antoine Lavoisier, CENIVAM, UIS. Fecha: Febrero de 2013. 63
- Figura 19.** Equipo a micro-escala de destilación-extracción con solvente simultánea (SDE), Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Marie Curie, CENIVAM, UIS. Fecha: Marzo de 2013. 65
- Figura 20.** Extractor *Soxhlet* de alta presión para SFE. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Marie Curie, CENIVAM, UIS. Fecha: Abril de 2013. 66

**Figura 21.** Equipo empleado en la técnica *headspace* estático. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio J.J. Thomson, CENIVAM, UIS. Fecha: Mayo de 2013. 68

**Figura 22.** Montaje empleado para la extracción por HS-SPME de los volátiles de la planta. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Antoine Lavoisier, CENIVAM, UIS. Fecha: Mayo de 2013. 69

**Figura 23.** Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Series GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863 Series*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CROM-MASS. Fecha: Agosto de 2013. 70

**Figura 24.** Cromatógrafo *Agilent Technologies 1200*, con bomba cuaternaria *Agilent Technologies G1354A*, equipado con inyector automático y acoplado a un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) G1315B. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CROM-MASS. Fecha: Agosto de 2013. 73

**Figura 25.** Lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*, con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos y equipado con módulos de absorbancia UV-Vis y fluorescencia (*Sunnyvale, CA, EE.UU.*). Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio J.J. Thomson, CENIVAM, UIS. Fecha: Junio de 2013. 74

**Figura 26.** Cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, EE.UU.)*, HP 6890 *Plus*, acoplado a un detector de captura de electrones (ECD,  $^{63}\text{Ni}$ ), equipado con puerto de inyección *split/splitless*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS, Fecha: Julio de 2013. 77

**Figura 27.** Reactor UV, equipado con una refrigerante y 6 lámparas fluorescentes F6T5BLB de 16 x 225.1 mm y 6 Watt. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Antoine Lavoisier. Fecha: Agosto de 2013. 79

**Figura 28.** Curva de secado a temperatura ambiente de *Satureja viminea* L. 83

**Figura 29.** Perfiles cromatográficos del aceite esencial de plantas frescas (A) y secas (B), obtenido de los tallos y hojas de *S. viminea*, aislados por MWHD. Columna DB-5MS (60m), Split 1:30, MSD (EI,70 eV). En las Tablas 5 y 6, se reporta la identificación de los picos cromatográficos. 85

**Figura 30.** Variación de las familias de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales obtenidos por MWHD de plantas de *S. viminea* frescas y secas. 93

**Figura 31.** Perfil cromatográfico del extracto de *S. viminea*, obtenido por SDE. Columna DB-5MS (60m), Split 1:30, MSD (EI, 70 eV). En la Tabla 7, se reporta la identificación de los picos cromatográficos. 94

**Figura 32.** Perfil cromatográfico del extracto de *S. viminea*, obtenido por SFE. Columna DB-5MS (60m); *split* 1:30, MSD (EI,70 eV). En la Tabla 9, se reporta la identificación de los picos cromatográficos. 97

**Figura 33.** Composición porcentual de los principales compuestos detectados en los aceites esenciales y los extractos obtenidos de *S. viminea* por tres técnicas de extracción, MWHD, SDE y SFE. 99

**Figura 34.** Perfiles cromatográficos típicos de los componentes aislados por HS-SPME, de la planta fresca (A) y seca (B), obtenido de los tallos y hojas de *S. viminea*. Columna DB-5MS (60m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). En las Tablas 9 y 10, se reporta la identificación de los picos cromatográficos. 101

**Figura 35.** Estructura de tres flavonoides identificados en los extractos de *Satureja viminea* obtenidos con solvente. A. Ácido rosmarínico; B. Naringenina; C. Kaempferol. 110

**Figura 36.** Perfil cromatográfico de extractos obtenidos con solventes de la especie *Satureja viminea*: A. Extracto metanólico, B. Extracto isopropanólico, C. Extracto isopropanólico-metanólico; obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar Kinetex C18 (4.6 mm x 100 mm, 2.5 µm); 1. Ácido rosmarínico, 2. Naringenina, 3. Kaempferol. 111

**Figura 37.** Perfil cromatográfico de sustancias patrón; obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar Kinetex C18 (4.6 mm x 100 mm, 2.5  $\mu$ m).112

**Figura 38.** Curva de calibración del Trolox <sup>®</sup> obtenida por el método ORAC.113

**Figura 39.** Curva de calibración del Trolox <sup>®</sup> obtenida por el método ABTS<sup>+</sup>.  
114

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo A.</b> Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-ECD del hexanal analizado en forma de su derivado hidrazónico, generados en el aceite de girasol sometido a la radiación UVA.	123
<b>Anexo B.</b> Curva de calibración del hexanal por GC-ECD.	125
<b>Anexo C.</b> Proyección rendimiento del aceite esencial.	126

## ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRONIMOS

<b>ABC</b>	Área bajo la curva
<b>AAPH</b>	2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
<b>AE</b>	Aceite esencial
<b>AO</b>	Antioxidante
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>CENIVAM</b>	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
<b>DAD</b>	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos)
<b>e.g.</b>	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
<b>EI</b>	<i>Electron Impact</i> (Impacto de electrón)
<b>ECD</b>	<i>Electron Capture Detector</i> (Detector de captura de electrones)
<b>FID</b>	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
<b>FL</b>	Fluoresceína
<b>SF</b>	<i>Supercritical Fluid</i> (Fluido supercrítico)
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
<b>HAT</b>	<i>Hydrogen Atom Transfer Assay</i> (Transferencia de átomo de hidrógeno)
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
<b>Istd</b>	<i>Internal standard</i> (Estándar interno)
<b>LRI</b>	<i>Linear Retention Index</i> [Índice(s) de retención lineal(es)]

<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
<b>MSD</b>	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas)
<b>MWHD</b>	<i>Microwave-Assisted Hidrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas)
<b>ORAC</b>	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno)
<b>PDMS/DVB</b>	<i>Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene</i> (Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno)
<b>PDS</b>	Persulfato de potasio
<b>PL</b>	Peroxidación lipídica
<b>PFPH</b>	<i>Pentafluorophenylhydrazine</i> (pentaflúorfenilhidracina)
<b>R<sub>f</sub></b>	<i>Retention Factor</i> (Factor de retención)
<b>SDE</b>	<i>Simultaneous Distillation-Solvent Extraction</i> (Destilación-extracción con solvente simultánea)
<b>SET</b>	<i>Single Electron Transfer</i> (Transferencia de un solo electrón)
<b>SFE</b>	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
<b>SPME</b>	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
<b>TAC</b>	<i>Total Antioxidant Capacity</i> (Capacidad antioxidante total)
<b>TEAC</b>	Trolox <sup>®</sup> <i>Equivalent Antioxidant Capacity</i> (Capacidad antioxidante equivalente en Trolox <sup>®</sup> )
<b>TIC</b>	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)
<b>TROLOX<sup>®</sup></b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención

## RESUMEN

**TÍTULO: ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Satureja viminea* L., OBTENIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE\***

**Autor:** Diana Lisseth Manrique López\*\*

**Palabras clave:** *Satureja viminea*, aceite esencial, extracción con solvente, capacidad antioxidante, ORAC, ABTS, Peroxidación lipídica.

*Satureja viminea* L., es una planta nativa de las Antillas, conocida en Colombia como “Muña”, de agradable olor a menta y con propiedades medicinales. Es originaria de Costa Rica y se extiende a lo largo de Centroamérica. En Colombia no es claro su origen, sin embargo se encuentra en la zona oriente del país. En la presente investigación se determinó la capacidad antioxidante de los aceites esenciales y extractos obtenidos con solvente de la planta *Satureja viminea* L., cultivada y recolectada en parcelas experimentales en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM, mediante los métodos ORAC y TEAC en un lector de microplacas.

Se obtuvieron el aceite esencial y extractos de la planta, por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, destilación-extracción simultánea con solvente, extracción con fluido supercrítico, y extractos con solvente, así mismo se obtuvo la fracción volátil por medio de microextracción en fase sólida. Los compuestos mayoritarios caracterizados para los aceites esenciales fueron *p*-menta-3-en-8-ol y pulegona, otros componentes importantes encontrados fueron *cis*-pulegol,  $\alpha$ -copaeno, D-germacreno,  $\beta$ -cariofileno, 9-*epi*- $\beta$ -cariofileno, bicilogermanceno. Para los extractos obtenidos por destilación-extracción simultánea con solvente se encontró que *p*-menta-3-en-8-ol y pulegona se presentan en mayor proporción, y para el extracto obtenido por extracción con fluido supercrítico los componentes mayoritarios son el *p*-menta-3-en-8-ol y el *cis*-pulegol.

El método de identificación utilizado fue cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) con una columna DB-5MS. Los componentes fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los reportados en las bases de datos NBS/Wiley, NIST.

El aceite esencial y los extractos obtenidos con solvente también presentaron actividad antirradicalaria, superior a los antioxidantes sintéticos de referencia evaluados (BHT y  $\alpha$ -Tocoferol), medida por el ensayo ORAC, ABTS+, y peroxidación lipídica.

---

\* Trabajo de grado

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Elena Stashenko, Química, Ph.D. y Jairo René Martínez, Químico, Ph.D., Co-directora: Dora Marina Gutiérrez, Licenciada en Química, Ph.D. (Universidad Autónoma de Querétaro)

## ABSTRACT

**TITLLE: STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF SECONDARY METABOLITES OF *Satureja viminea* L., OBTAINED BY DIFFERENT METHODS OF EXTRACTION AND DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY \***

**Author:** Diana Lisseth Manrique López\*\*

**Key words:** *Satureja viminea*, essential oil, solvent extraction, antioxidant capacity, ORAC, ABTS, lipid peroxidation.

*Satureja viminea* L. is an endemic plant of the Antilles. In Colombia, it is known as "Muña" because of its pleasant mint odor and medicinal properties. It is native to Costa Rica and extends along Central America. In Colombia, its origin is not clear, however it is found in the east zone of the country. In the present study the antioxidant capacity of essential oils and solvent extracts from the plant *Satureja viminea* L., cultivated and harvested in experimental plots in the Agroindustrial Complex Pilot CENIVAM were obtained by the ABTS<sup>+</sup> and ORAC methods in a microplate reader.

Essential oil and plant extracts were obtained by assisted hydrodistillation microwave radiation, distillation-extraction simultaneous with solvent, supercritical fluid extraction, and extract with solvent; also the volatile fraction was obtained by solid phase microextraction. The main compounds found in the essential oil were *p*-mentha-3-en-8-ol and pulegone; other important components found were *cis*-pulegol,  $\alpha$ -copaene, D-germacrene,  $\beta$ -caryophyllene, 9-*epi*- $\beta$ -caryophyllene, bicyclogermacrene. For the extracts obtained by distillation-extraction simultaneous with solvent was found that *p*-mentha-3-en-8-ol and pulegone are presented in higher proportion, and in the extract obtained by supercritical fluid extraction the main components were the *p*-mentha-3-en-8-ol and *cis*-pulegol.

The method of identification used was a gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) with a DB-5MS column. The components were identified by comparison of their mass spectra with that reported in the data bases of NBS / Wiley, NIST.

The essential oil and the extracts obtained with solvent showed antiradical activity, higher than reference synthetic antioxidants evaluated (BHT and  $\alpha$ -tocopherol), as measured by ORAC, ABTS\*\*assays, and lipid peroxidation.

---

\* College thesis

\*\*Science Faculty, School of Chemistry. Directed by Elena Stashenko, Química, Ph.D. and Jairo René Martínez, Químico, Ph.D., Co-director: Dora Marina Gutiérrez, Degree in Chemistry, Ph.D. (Universidad Autónoma de Querétaro).

## INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales constituyen el recurso vegetal más antiguo, usado por la humanidad, para tratar enfermedades. Aquellas sustancias responsables de su fragancia, conocidas como aceites esenciales, tienen un gran número de actividades biológicas y aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y de alimentos.

Los metabolitos secundarios, aislados de las plantas, se destacan por sus características especiales, y son de amplio uso en varias ramas de la industria y medicina. Estas sustancias reciben el nombre de aceites esenciales, aceites volátiles, aceites etéreos o esencias; son mezclas complejas de compuestos de naturaleza química diversa, de olor generalmente agradable, intenso y constituyen del 0,01 al 6% del peso total de la planta; se han desarrollado diferentes métodos de obtención, para optimizar su rendimiento, mediante el uso de diversas técnicas de extracción. Entre las técnicas de extracción se encuentran la hidrodestilación y la destilación por arrastre con vapor. También, se pueden extraer las fracciones volátiles o extractos mediante la extracción con solventes y la extracción con fluido supercrítico (Stashenko y Martínez, 2012).

Se han encontrado sustancias promisorias como antioxidantes, que pueden ser tanto de origen natural, como obtenidas por medio de la síntesis orgánica (Bozin *et al.*, 2007). Sin embargo, la sociedad actual exige antioxidantes menos tóxicos y más efectivos. Por ello, las plantas aromáticas son una alternativa, ya que en ellas se encuentran sustancias que presentan propiedades biológicas, que pueden sustituir componentes artificiales utilizados como antioxidantes en alimentos, conservantes en cosméticos, entre otros (Informe final, Instituto de Investigaciones Alexander von Humboldt, 2003). Por tanto, el presente proyecto se enfocó en el estudio de la composición química del aceite esencial y extractos de la especie *Satureja viminea* (Fam. Lamiaceae), así como la

determinación de su capacidad antioxidante, ya que es de gran importancia para la industria de alimentos, aumentar los beneficios de sus productos, innovando con productos naturales.

## 1. ESTADO DEL ARTE

### 1.1. Género *Satureja*

Las plantas del género *Satureja* (Fam. Lamiaceae) son subarbustos perennes de muy diverso hábito, en un extremo, son hierbas postradas y delicadas, en el otro, son subarbustos de hasta 2 m de altura; está conformado por 30 especies ampliamente distribuidas en Europa, Asia, África y las Américas, principalmente, aromáticas. El primer estudio en América del Sur se realizó en 1927, en aquella época solo una pequeña variedad de especies fueron descritas, después, en 1964, Epling y Játiva(1964), llevaron a cabo una revisión más extensa del género en América del Sur, es cuando reportaron la presencia de plantas en Perú, Ecuador, Venezuela, Chile, Bolivia y Argentina; en Colombia, describieron la presencia de *Satureja connata* Epl., *Satureja andrei* Epl., *Satureja caerulescens* (Benth.), *Satureja brownei* (Sw.), Briq., *Satureja nubigena*(Kunth), Briq., *Satureja tenella* Epl., *Satureja grisea* Epl. En esta publicación, no se reportó la presencia de *Satureja viminea* en ningún país de América del Sur.

Gran parte de las plantas del género *Satureja* son hierbas aromáticas utilizadas como condimento y, además, tienen un amplio uso medicinal, por lo que existe una buena cantidad de información acerca de la composición química de sus aceites esenciales, más de 50 especies han sido reportadas, y con base en la naturaleza química de sus componentes mayoritarios, se pueden dividir en tres quimiotipos, a saber: el quimiotipo I lo conforman los aceites ricos en monoterpenos aromáticos de *p*-mentano, como son el carvacrol, el timol y el *p*-cimeno; aquellos, ricos en monoterpenos alifáticos de *p*-mentano como son la mentona, la isomentona, la pulegona y la piperitenona, constituyen el quimiotipo II y el quimiotipo III, lo forman los aceites ricos en monoterpenos y

sesquiterpenos, e.g., el espatulenol, el germacreno, el limoneno y el linalool (Oke *et al.*, 2009).

Sin embargo, existen excepciones, pues plantas como *S. atropatana*, *S. mutica*, *S. obovata*, *S. cuneifolia*, entre otras, pueden ser asignadas a más de un quimiotipo, por ejemplo, los componentes mayoritarios del aceite esencial de *S. cuneifolia*, originaria de Turquía, son carvacrol (44.99%) y *p*-cimeno (21,61%) (Oke *et al.*, 2009); en contraste, linalool (19,9%) y  $\alpha$ -pineno (12.3%) son componentes mayoritarios del aceite esencial de la misma planta originaria de Montenegro (Savikin, *et al.*, 2010).

Aunque la composición de un aceite está afectada por el estado ontogénico de la planta, el lugar de origen, el periodo de colecta, la parte de la planta utilizada, etc., en general, se ha observado en muchos estudios, que plantas del género *Satureja* procedentes de la región mediterránea pertenecen al quimiotipo I y especies procedentes del Sur y Centro América, son del quimiotipo II (Niemeyer, 2010).

#### **1.1.1. *Satureja viminea***

La *S. viminea* es una especie vegetal, perteneciente al género *Satureja*, de la familia de las lamiáceas, también llamadas labiadas, es muy popular debido a su agradable olor a menta y su amplio uso medicinal, aunque no se encuentran reportes acerca de su origen en Colombia, se sabe, que es abundante y muy conocida en Jamaica, Cuba, la Hispaniola y Costa Rica, que se usa en el té de menta, que es de mayor consumo.

En Centroamérica, la especie *S. viminea* L. se identificó en Costa Rica, aunque su origen es dudoso. Morton (1981), hace referencia al uso tradicional de *S. viminea* L. en Jamaica y menciona su crecimiento en Cuba y la Hispaniola (República Dominicana y Haití), hasta una altura de 1200 m.s.n.m., en los bosques de la Cordillera de Talamanca (extensión de la Cordillera de los Andes en América del Sur) (Bandoni, 2002; Morton, 1981).

*S. viminea*, es un arbusto perenne, aromático, de hasta 4 m de altura, de tallo cilíndrico en su base y ramificado, presenta tallos jóvenes con 4 aristas y es leñoso en la parte inferior, sus hojas son opuestas, simples, cortamente pecioladas, aovado-oblongas, de bordes lisos, lámina rugosa con la nervadura central pronunciada. Sus flores son pequeñas de 3 a 10 mm de largo, axiales en grupos de 3, de cáliz tubular de 2-3 mm de largo, contiene 5 sépalos iguales y son de color blanco (Bandoni, 2002) (Véase **Figura 1**).

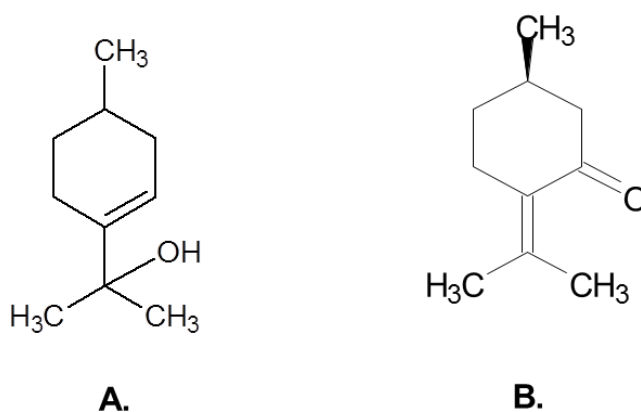
**Figura 1.** Planta de *Satureja viminea* (Fam. Lamiaceae). Foto tomada por la autora en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM, el 3 de abril de 2013.



Vila *et al.* (2000) mencionan en su artículo, un estudio preliminar realizado en 1983 por Wainberg, cuando la planta era conocida como "*Mentha* sp.", en ella se identificó la pulegona como uno de los componentes principales, acompañada de un terpeno que tiene en su esqueleto un doble enlace y un alcohol terciario. Esta estructura podría ser el *p*-menta-3-en-8-ol.

En el año 2000, se publicaron dos estudios sobre la composición química del aceite esencial de esta especie. Vila *et al.* (2000), identificaron 40 componentes, representando el 94% del aceite esencial, siendo los constituyentes principales el *p*-menta-3-en-8-ol (40%) y la pulegona (35.3%). Los monoterpenos oxigenados representan el grupo mayoritario (77.6%). Tucker *et al.* (2000), identificaron 31 componentes, de los cuales el *p*-menta-3-en-8-ol y la pulegona fueron los compuestos principales (48.3 y 14.36%, respectivamente).

**Figura 2.** Estructuras de los componentes mayoritarios presentes en el AE de *Satureja viminea*. **A.** *p*-Menta-3-en-8-ol y **B.** Pulegona.



A pesar de todos los beneficios, atribuidos a esta planta, solo existe un estudio sobre la actividad farmacológica del aceite esencial; en este estudio, se observó un efecto analgésico con la administración oral del aceite esencial de

*S. viminea*, comparado con el observado con indometacina (analgésico de referencia); igualmente, el aceite esencial inhibió el tránsito intestinal y el vaciamiento gástrico. La  $DL_{50}$  del aceite esencial de *S. viminea* fue de 556.8 mg/kg (Suárez *et al.*, 2003).

## **1.2. ACEITES ESENCIALES**

### **1.2.1. Definición**

Los términos aceite esencial (AE) o esencia se utilizan para referirse a las sustancias líquidas, aromáticas y volátiles, de características lipofílicas, que se obtienen a partir de diferentes partes de la planta, a través de métodos físicos, *e.g.*, arrastre con vapor, hidrodestilación, destilación con agua/vapor y que llevan en sí mismas la huella, olor y sabor, del material vegetal del cual proceden (Stashenko y Martínez, 2012). Los AE poseen una química compleja, aunque generalmente, consisten en una mezcla heterogénea de sustancias orgánicas como hidrocarburos terpénicos y compuestos oxigenados de bajo peso molecular (alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), que son los que les dan a los AE el olor que los caracteriza, además, son sustancias de peso molecular menor de 300 Da, con una presión de vapor suficientemente alta para volatizarse a temperatura ambiente; estos componentes, son derivados del metabolismo secundario de las plantas (Bandoni, 2002; Sell, 2009).

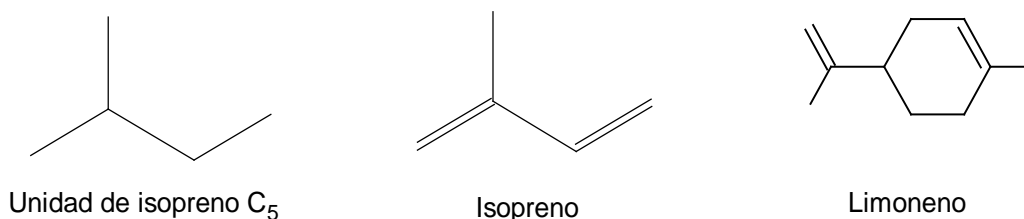
Los metabolitos secundarios volátiles tienen una distribución restringida en la naturaleza, la cual se limita a ciertas plantas llamadas “aromáticas”, en algunos casos, a solo unas especies o subespecies, por lo que se consideran como una manifestación individual del organismo que las contiene y se les atribuye una gran variedad de funciones biológicas específicas, ya que son biosintetizados y

biodegradados (Informe Final, Instituto de Investigaciones Alexander von Humboldt, 2003).

### 1.2.2. Composición química

La mayoría de los componentes, que hacen parte de los AE, pertenecen a una familia de sustancias químicas llamadas “terpenos” o “terpenoides”, e.g., limoneno, carvona,  $\alpha$ -humuleno, etc., cuya característica estructural que los distingue, es la unidad de isopreno  $C_5$  en el esqueleto hidrocarbonado (**Figura 3**). Esta observación fue hecha por el químico alemán Otto Wallach en 1887 y se conoce como regla de isopreno (Carey, 1999), (Sell, 2003).

**Figura 3.** Unidad estructural característica de los terpenoides.



Con base en el número de unidades de isopreno  $(C_5)_n$  presentes en el esqueleto hidrocarbonado, los terpenos y sus análogos sustituidos se clasifican como monoterpenoides  $(C_5)_2$ , sesquiterpenoides  $(C_5)_3$ , diterpenoides  $(C_5)_4$ , sesterpenoides  $(C_5)_5$ , triperpenoides  $(C_5)_6$ , y tetraterpenoides  $(C_5)_8$ ; con base en la forma de sus estructuras moleculares, también, pueden ser clasificados como terpenoides de cadena abierta o cíclicos de uno, dos o más anillos.

### 1.2.3. Control de calidad de los aceites esenciales

Para el empleo de los aceites esenciales en el ámbito industrial se requiere desarrollar estudios de factibilidad de su producción y sus aplicaciones industriales, pero, antes que todo, conocer su composición química. La composición química y las características fisicoquímicas y organolépticas, son requisito imprescindible para establecer los parámetros que determinan la calidad de un AE.

Según la calidad, los AE se pueden clasificar en dos grandes grupos (Bandoni, 2002):

- **Aceites esenciales crudos:** A los cuales no se les ha adicionado mayor valor agregado, se utilizan en la elaboración de velas, pebeteros, artículos de aseo y limpieza.
- **Aceites esenciales refinados:** Poseen mayor valor, debido a que han sido sometidos a procesos industriales, por ejemplo, rectificación, fraccionamiento, destilado o decerado, entre otros. Estos productos se emplean en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y de perfumes.

Cuando los aceites son sometidos a procesos industriales, su estabilidad y perdurabilidad de las propiedades organolépticas también, se aumenta y por ende, su costo (Bandoni, 2002). Los principales valores analíticos para evaluar la calidad de un aceite esencial se reportan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Clasificación de los parámetros analíticos aplicados para el control de calidad de los aceites esenciales.

Características organolépticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Olor</li> <li>• Color</li> <li>• Apariencia</li> </ul>
Determinaciones físicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Densidad</li> <li>• Poder rotatorio</li> <li>• Índice de refracción</li> <li>• Solubilidad en etanol</li> <li>• Punto de inflamación</li> </ul>
Índices químicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Índice de acidez</li> <li>• Índice de éster</li> <li>• Índice de saponificación</li> <li>• Índice de acetilo</li> <li>• Índice de fenoles</li> </ul>
Características cromatográficas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perfil cromatográfico por GC</li> <li>• Cuantificación de los principales componentes</li> </ul>
Características espectroscópicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ultravioleta-visible</li> <li>• Infrarrojo</li> </ul>
Otras determinaciones	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trazas de pesticidas</li> <li>• Trazas de metales pesados</li> </ul>

Las características organolépticas de los aceites esenciales son fundamentales para determinar sus aplicaciones, principalmente, en las industrias de sabores y fragancias, y cosmética.

Las propiedades físicas permiten hacer elucidaciones iniciales acerca de los componentes presentes en los AE. Densidades menores de 0.9 g/mL e índices de refracción menores de 1.47 sugieren un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos. Si la densidad es mayor de 0.9 g/mL y el índice de refracción es mayor de 1.47 es posible que hayan compuestos oxigenados alifáticos. Los hidrocarburos aromáticos tienen densidades menores de 0.9 g/mL, pero sus índices de refracción son mayores de 1.47. Los compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos tienen densidades e índices de refracción superiores a los límites señalados (Domínguez, 1988).

Aún cuando las constantes físicas permitan determinar la homogeneidad de los AE en diferentes lotes de producción, no dan razón sobre la composición química de estos productos. Este tipo de ensayos ha sido parcialmente sustituido por determinaciones espectroscópicas, que permiten identificar tentativamente las sustancias presentes, así como la presencia de adulterantes o diluyentes, entre otros.

Otras propiedades de los AE, para tener en cuenta, son la volatilidad, la estabilidad ante la luz y el oxígeno, la presencia de agentes oxidantes y reductores, el pH y la tensión superficial. La solubilidad en etanol alta les permite ser utilizados en la elaboración de perfumes y fragancias. Los AE refractan la luz polarizada, propiedad que se usa para su control de pureza, pues tienen, por ello, un rango de índice de refracción característico. También, presentan un poder rotatorio específico, en razón de que poseen en su composición numerosos productos ópticamente activos. La determinación de estas propiedades físicas puede ser de gran utilidad para la detección de adulteraciones o falsificaciones en este tipo de productos (Bandoni, 2002, Schreier, 1984).

### 1.3. EXTRACTOS

Los extractos de las plantas son mezclas de compuestos químicos, producto del metabolismo secundario vegetal. Se diferencian de los AE, en muchas de sus propiedades químicas y físicas, ya que, normalmente, son mezclas viscosas, y están formadas por compuestos de mayor peso molecular, *e.g.*, diterpenoides, fitoesteroles y, en la mayoría de los casos, son compuestos de menor volatilidad.

Normalmente, estos compuestos corresponden a la fracción semi-volátil o no volátil de la planta, es decir, aquellos analitos que, por no ser volatilizables o ser inestables térmicamente, no se pueden aislar mediante otros métodos destilativos. En vez de ello, para su obtención se emplean distintos procesos, que forman el grupo de las técnicas extractivas, y cuyo principio de operación radica en la extracción mediante un disolvente, es cuando se aprovechan las propiedades de solubilidad y polaridad de los analitos de la matriz y su afinidad con un disolvente dado o sus mezclas (Stashenko *et al.*, 2011).

Los extractos, al igual que los AE, se encuentran en una amplia aplicación en diversos campos, dentro de los cuales se destacan: industria cosmética, *e.g.*, compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos) aplicados en bases cosméticas; alimentos, *e.g.*, pigmentos y condimentos; química farmacéutica, *e.g.*, compuestos con bioactividad (vitaminas, esteroides, polisacáridos), entre otros.

## 1.4. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

### 1.4.1. Obtención de aceites esenciales

#### Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

Las técnicas de extracción de los AE más importantes son los métodos de arrastre con vapor, destilación con agua/vapor e hidrodestilación. Estas técnicas tienen la ventaja de separar fácilmente los compuestos volátiles de los no volátiles. En la presente investigación, se empleó la técnica de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD, *Microwave-Assisted Hydrodistillation*, por sus siglas en inglés); en esta técnica, se emplea la radiación de microondas como fuente de energía.

Esta técnica fue descrita inicialmente por Paré y colaboradores (Paré *et al.*, 1992, 1993), y consistía en la extracción de la esencia a través del calentamiento con microondas, empleando un solvente “transparente”, que no absorbe la radiación de las microondas. En el Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM se han optimizado las condiciones operativas de este proceso, para obtener mejores rendimiento, así como lo describen Stashenko *et al.* (2004) y Tsarkova (1997).

En el proceso de extracción, la muestra se sumerge al disolvente, en este caso, agua, en un equipo de destilación tipo *Clevenger*. La radiación de microondas calienta el líquido en contacto con el material vegetal, rompiendo los receptáculos oleíferos de la planta y liberando el AE, el cual, por efecto de la presión de vapor, asciende junto con el vapor de agua, y luego se condensa formando dos capas, que se pueden separar por medio de decantación en una trampa *Dean-Stark* (Golmakani *et al.*, 2008).

## 1.4.2. Obtención de extractos

### Destilación – Extracción con solvente simultánea

Este sistema combinado de destilación – extracción con solvente simultánea (SDE, por sus siglas en inglés), fue descrito por primera vez en 1964 por Likends y Nickerson (*Likends et al.*, 1964), y permite operar con solventes de densidades mayores o menores que el agua; siendo el de mayor densidad, e.g., el diclorometano, y el más empleado para la obtención de estos extractos (Mora, 1997).

Goderfoot *et al.* (1981), plantearon una reducción de dimensiones del aparato para la utilización de una menor cantidad de material (microescala). La técnica posee una gran ventaja, y es la poca cantidad de material vegetal que se emplea, así como se usan cantidades de solvente muy bajas.

### Extracción con fluido supercrítico

Un fluido supercrítico (SF) es una sustancia cuyas condiciones de presión y temperatura se encuentran por encima de su punto crítico; región en la cual coexisten dos fases: líquida y gaseosa (Rosa *et al.*, 2009). Esta capacidad le confiere propiedades características de ambos estados, ya que tiene densidad similar a la de los líquidos, y la difusividad propia de los gases, junto con valores de viscosidad y tensión superficial bajos, lo cual permite una extracción más rápida y eficiente (Luque y col., 1993).

El proceso SFE (*Supercritical Fluid Extraction*, por sus siglas en inglés), consiste en una extracción sólido-líquido, llevada a cabo dentro de una cámara, a través de la cual se hace circular el fluido, que, al entrar en contacto con la matriz, solubiliza y arrastra los compuestos presentes en ésta. Sin embargo, una de las principales desventajas del SF, es la extracción de sustancias no

deseadas, e.g., ácidos grasos, carotenoides y ceras, entre otras (Stashenko *et al.*, 1996, 2000).

### **Extracción con solvente**

La extracción con disolvente (SE, por sus siglas en inglés), es la técnica de extracción que emplea una fase líquida para aislar los analitos de la matriz. En la SE, los compuestos de interés se recuperan de la muestra, mientras el disolvente puede removerse del extracto, sin afectar su composición de la muestra. La eficiencia de la extracción depende de tres factores fundamentales, a saber: solubilidad, transferencia de masa y efecto de matriz (Mitra, 2003). Sin embargo, la principal desventaja de esta técnica es el consumo alto de solventes, el tiempo de extracción prolongado, formación de emulsiones y la disposición posterior de solventes tóxicos.

#### **1.4.3. Obtención de fracciones volátiles**

##### ***Headspace* estático**

Las técnicas de extracción en forma gaseosa son muy similares a las extracciones líquido – líquido, ya que pueden ser llevadas a cabo en una sola etapa de extracción. Para ello, la muestra se coloca en un vial herméticamente cerrado. Allí, los compuestos volátiles se evaporan parcialmente a partir de la muestra, luego, el sistema llega a un equilibrio, donde la concentración de analitos volátiles en la fase gaseosa se mantiene constante. Tomando una alícuota de la fase de gas, se pueden analizar los compuestos volátiles, sin interferencias por la matriz no volátil. En este procedimiento, las dos fases en el vial están bajo condiciones estáticas y la transferencia de la muestra se lleva a cabo después de que se haya alcanzado el equilibrio. Es por esta razón, que a este tipo de extracción, se le conoce como análisis de espacio de cabeza estático o análisis *headspace* (Kolb *et al.*, 2006).

El sistema de *headspace* va acoplado a un cromatógrafo de gases, ya que este es un método ideal para el análisis de sustancias volátiles. Este sistema consta de dos pasos, en primer lugar, la muestra (líquido o sólido) se coloca en un vial cerrado, en donde queda un volumen de gas por encima de la muestra. Este vial se somete a una termorregulación, a una temperatura constante, hasta alcanzar el equilibrio entre las dos fases. A continuación, una parte (alícuota) de la fase de gas del vial se introduce en la corriente de gas portador que lo lleva al interior de la columna.

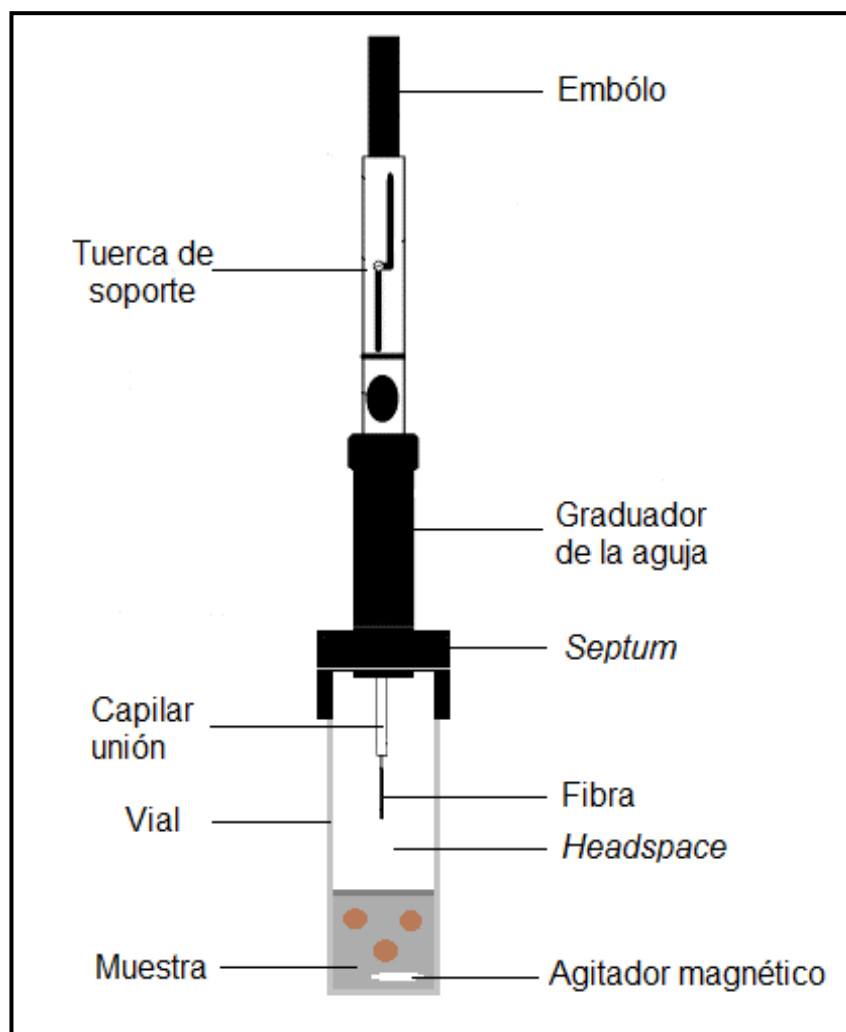
La transferencia de la muestra puede ser manual, *e.g.*, mediante el uso de una jeringa hermética, o por medio de un inyector automático (Kolb *et al.*, 2006).

### **Microextracción en fase sólida de la fase vapor**

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) fue desarrollada por Arthur y Pawliszyn (1990). Es una técnica rápida, sencilla y eficiente para el análisis de plantas secas o frescas, principalmente, por extraer y concentrar volátiles de pocas cantidades de muestra, en un solo paso (Stashenko *et al.*, 1996, 2007). La extracción se basa en un proceso de adsorción – desorción, que ocurre sobre una película de fase estacionaria que reviste una fibra de sílice fundida.

La cantidad de volátiles extraídos por SPME depende del espesor de la fibra y de la constante de distribución de los analitos (Stashenko *et al.*, 2007). El valor de esta constante incrementa con el peso molecular y el punto de ebullición del compuesto. Los compuestos más volátiles se extraen mejor por una fibra con recubrimiento de mayor espesor que el empleado para los semivolátiles. A mayor espesor del recubrimiento, más lenta será la desorción de los analitos, lo que incrementa el riesgo de efectos de “memoria” en la fibra; para ello, antes de cada análisis, se debe realizar un tratamiento de limpieza de la fibra, exponiéndola por algunos minutos en el puerto de inyección de un GC, a temperaturas altas 250 - 270° C.

**Figura 4.** Dispositivo para SPME (Arthur and Pawliszyn, 1990).



## 1.5. ANTIOXIDANTES

Un antioxidante está definido por Halliwell & Gutteridge (2004), como “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparadas con la del sustrato oxidable, previene o retarda la oxidación del sustrato”. Son moléculas de origen natural o sintético que en bajas concentraciones, previenen o inhiben la oxidación de grasas, proteínas, vitaminas u otras biomoléculas fácilmente oxidables. En alimentos, estas oxidaciones generan olores, colores y sabores desagradables, además de producir efectos nocivos para la salud (Halliwell & Gutteridge, 2004).

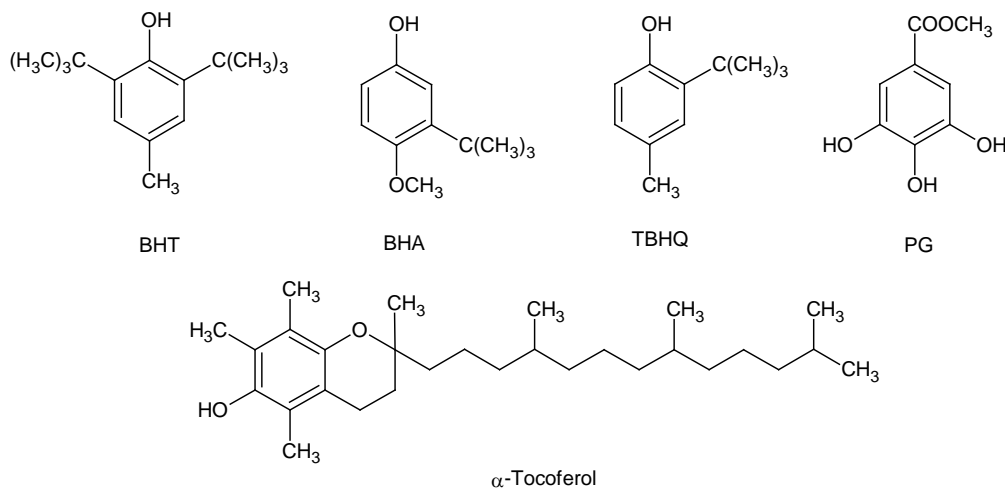
Según el mecanismo de acción, los antioxidantes se clasifican de la siguiente manera:

**Antioxidantes preventivos:** son compuestos que inhiben la reacción de peroxidación, “secuestran” las especies radicalarias y desactivan el oxígeno singulete (Ugartondo, 2009).

**Antioxidantes de ruptura de cadena:** actúan sobre las especies reactivas de oxígeno ( $R\cdot$ ,  $RO\cdot$ ,  $RO_2\cdot$ ). Son compuestos donadores de hidrógeno o electrón e interrumpen una reacción en cadena. La vitamina E, los galatos y los flavonoides son compuestos estables, que tienen la capacidad de formar dímeros o reordenar su estructura, para permitir la reacción con un radical alcoxilo o peroxilo, deteniendo así la reacción de oxidación del sustrato (Ugartondo, 2009).

Los antioxidantes también pueden clasificarse según su origen, como naturales o sintéticos. La mayoría de los antioxidantes naturales, que son extraídos de plantas o tejidos animales, son compuestos fenólicos, *e.g.*, tocoferoles, flavonoides, ácidos fenólicos y gálicos y, en algunos casos, carotenoides y terpenoides, que también han demostrado actividad antioxidante (Tafurt, 2008), (Shahidi, 1997). Los antioxidantes de origen sintético, son, en su mayoría, compuestos fenólicos, que poseen grupo(s) alquilo que aumentan su solubilidad en grasas y aceites; entre algunos antioxidantes comerciales, de uso más frecuente, figuran el butil-hidroxianisol (BHA), el butil-hidroxitolueno (BHT), la *ter*-butilhidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo (GC)(Jadhav *et al.*, 1996).

**Figura 5.** Estructuras químicas de algunos antioxidantes sintéticos usados en alimentos y cosméticos. BHA: Butil-hidroxianisol; BHT: Butil-hidroxitolueno; TBHQ: *ter*-butilhidroquinona; PG: Galato de propilo;  $\alpha$ -tocoferol.



## 1.5.1. Compuestos antioxidantes

### 1.5.1.1. Compuestos fenólicos

Al hablar de compuestos fenólicos, se hace referencia a todas aquellas sustancias que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a uno o más anillos aromáticos. Estos compuestos abarcan un grupo amplio y diverso de compuestos, que presentan diferentes funciones, por ejemplo, contribuir al crecimiento y desarrollo de la planta, hasta crear su propio mecanismo de defensa contra agentes externos, la radiación UV y al entorno (Vermerris *et al.*, 2008).

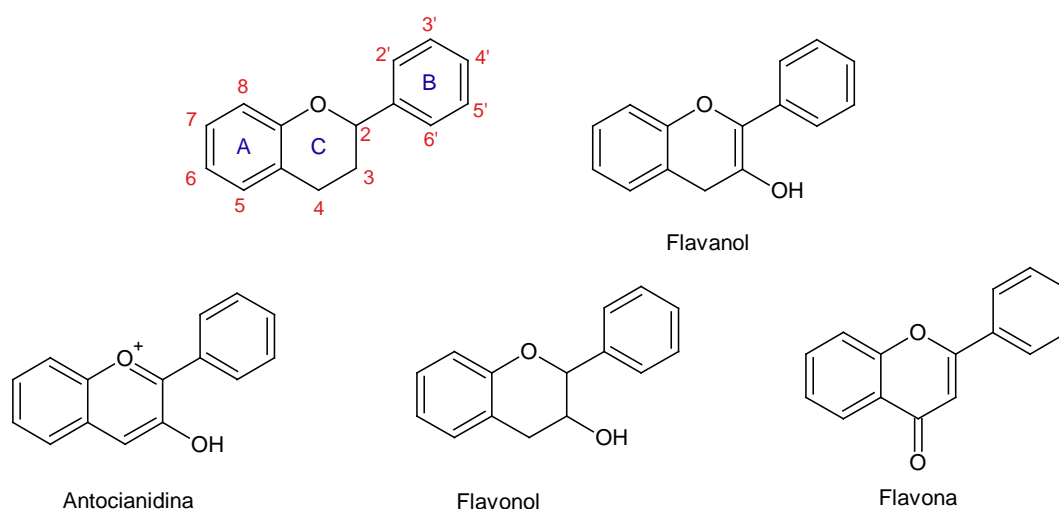
De acuerdo con la diversidad química, los compuestos fenólicos tienen diversas funciones en las plantas; su cantidad y tipo dependen de la especie vegetal, así como también, de la parte de la planta (frutos, hojas, tallos, semillas, etc.) y las condiciones de cultivo. Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados de diferentes formas, una de ellas, es según el número y la disposición de sus átomos de carbono, *e.g.*, ácidos fenólicos, cumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos y flavonoides (Vermerris *et al.*, 2008).

### 1.5.1.2. Flavonoides

Los flavonoides son polifenoles que se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos, enlazados por un heterociclo oxigenado que tiene tres átomos de carbono, es decir, presentan un esqueleto carbonado  $C_6-C_3-C_6$  (Véase **Figura 6**). Son sustancias sólidas de color blanco o amarillento. Se clasifican a partir de sus variaciones estructurales, los más destacados, por su interés farmacológico, son las flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianidinas, catequinas y sus correspondientes glucósidos (Vermerris *et al.*, 2008).

Los flavonoides se encuentran hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4', y 5'. La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3, determina el tipo de flavonoide.

**Figura 6.** Estructura básica y ejemplos de flavonoides.



La acción antioxidante de los compuestos fenólicos es una de sus principales características. Por un lado, son susceptibles a ser oxidados y, por otro, impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación. Así, los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico, presentan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interactúe con los electrones del anillo, lo que les confiere unas características especiales respecto al resto de los

alcoholes. Por otra parte, pueden además actuar como quelantes (sobre todo, fenoles no flavonoides) y formar complejos con metales di- o trivalentes, especialmente, con el hierro y el aluminio, lo que puede tener también implicaciones nutricionales (Gimeno, 2004).

### **1.5.2. Estrés oxidativo**

El oxígeno está asociado a la vida aerobia y participa en el mantenimiento del metabolismo, la respiración y otros sistemas enzimáticos que lo utilizan. La circulación del oxígeno en la naturaleza está asociada con la fotosíntesis y con su reducción durante los procesos de síntesis del adenosín trifosfato (ATP) en células aeróbicas. Esta reducción puede llegar a ser descontrolada, y acelerar la formación de radicales libres (RL) (Gvozdjaková, 2008).

Para hacer frente a esta oxidación, actúan los sistemas de defensa antioxidante del organismo. Sin embargo, la producción de especies reactivas de oxígeno es un proceso natural, constante y continuo. Cuando hay un desequilibrio entre la producción de estas especies, se genera un estrés oxidativo, el cual ha sido relacionado con el desarrollo de numerosas patologías, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, envejecimiento prematuro, entre otras (Sies, 2005).

### **1.5.3. Los radicales libres**

En 1990, el término “radical libre” fue introducido por el trabajo de Moses Gomberg, quién demostró la existencia del radical trifenilmetilo ( $\text{Ph}_3\text{C}^\cdot$ ) (1900). Luego, se definió a un “radical libre” como una especie química que posee uno o más electrones desapareados. Es una especie altamente reactiva, inestable y con un tiempo de vida muy corto, con una gran capacidad de combinación con moléculas como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que puede causar su oxidación o el daño en la célula (Aruoma, 1998).

Los RL se producen por el metabolismo normal de cada célula y se inactivan por una conjunto de mecanismos (enzimáticos y de atrapamiento) (Rodríguez *et al.*, 2001); por esto, los RL juegan un papel importante en el origen de la vida y la evolución biológica. Por ejemplo, los radicales de oxígeno tienen, entre otras funciones fisiológicas en el organismo, la participación en la fagocitosis, la síntesis de colágeno, la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis (Venereo, 2002; Fang *et al.*, 2002).

## **1.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Los métodos para evaluar la capacidad antioxidante de una gran variedad de sustancias, se pueden clasificar en dos grandes grupos; aquellos, que determinan la capacidad de inhibir la oxidación lipídica, y los que miden la habilidad para secuestrar radicales (Jacobsen, 1999).

En el primer grupo, se usa el sistema modelo *in vitro* para el proceso de peroxidación lipídica, en el cual, el posible antioxidante se somete a una rápida oxidación, que puede ser inducida por radiación UV, entre otros métodos (calentamiento, iones metálicos, etc.).

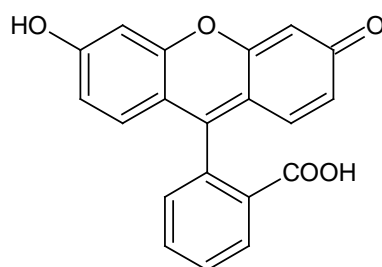
Por el contrario, los métodos que determinan la capacidad para atrapar radicales, imitan los mecanismos que ocurren en la oxidación lipídica y miden la reducción de radicales inestables por transferencia de un electrón o de un protón. Entre estos métodos se encuentra la prueba de capacidad de absorción de los radicales libres de oxígeno (ORAC); y metodologías basadas en principios colorimétricos por reducción de radicales coloreados, tales como el ABTS<sup>•+</sup> [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencensulfónico-6)] y el DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Wanasundara *et al.*, 2005).

### 1.6.1. Capacidad de absorción de radicales oxígeno

Es uno de los métodos de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés). El mecanismo de acción se basa en la transferencia al radical libre de un átomo de hidrógeno del antioxidante; para esto, se emplea un indicador para generar el radical peroxilo ( $\text{ROO}^\cdot$ ). En presencia de un compuesto antioxidante (AH), el radical forma un enlace con un átomo de hidrógeno del AH y se originan un hidroperóxido ( $\text{ROOH}$ ) y un radical antioxidante ( $\text{A}^\cdot$ ) (Ou *et al.*, 2001).

La fluoresceína (FL) (Véase **Figura 7**), es un compuesto sintético, fotoestable y con alto poder fluorescente a pH mayor de 7.0. La FL absorbe y emite luz en el rango de 492 y 515 nm, actúa como indicador y, a su vez, se oxida para neutralizar los radicales peroxi ( $\text{ROO}^\cdot$ ) por transferencia de un átomo de hidrógeno. De esta manera, el método ORAC mide la pérdida de la fluorescencia de la fluoresceína, que indica la magnitud de los daños causados por la reacción de la fluoresceína con los radicales peroxi ( $\text{ROO}^\cdot$ ). Sin embargo, la velocidad en la disminución de la fluorescencia puede reducirse en presencia de un antioxidante, ya que éste compite con la FL para estabilizar el radical. El mecanismo de acción del antioxidante se monitorea mediante la evaluación del área bajo la curva del blanco en el que no hay antioxidante y se evalúa la relación con el patrón de referencia Trolox<sup>®</sup> (Ou *et al.*, 2001).

**Figura 7.** Estructura química de la fluoresceína.

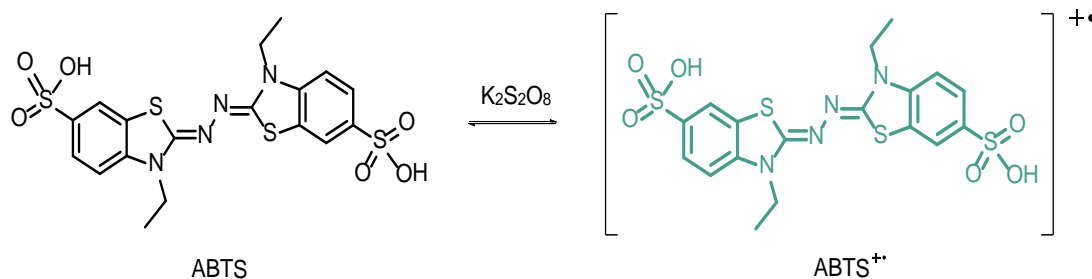


### 1.6.2. Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>

El ensayo de la capacidad antioxidante equivalente de **Trolox**<sup>®</sup>, TEAC (*Trolox*<sup>®</sup> *Equivalent Antioxidant Capacity*), fue descrito por primera vez por Re y colaboradores (1999). Dentro de las ventajas que presenta, se encuentra la capacidad de ‘secuestrar’ radicales y su funcionalidad para ser aplicado tanto en compuestos hidrosolubles, como liposolubles.

El ensayo se basa en la capacidad de los compuestos AO de estabilizar el catión-radical ABTS<sup>•+</sup> (catión-radical del ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), por medio del mecanismo de transferencia de un electrón, SET (*Single Electron Transfer*, por sus siglas en inglés). El catión-radical, se genera por la reacción del ABTS con una especie química oxidante, el persulfato de potasio, PDS (Véase **Figura 8**), el cual es de color azul-verdoso en solución y presenta una absorbancia máxima en 734nm (Erel, 2004).

**Figura 8.** Generación del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>.



Cuando se agrega el AO a la mezcla reactante, el radical experimenta una reducción, la cual es proporcional a la concentración y capacidad antirradicalaria del compuesto, que resulta en la decoloración del catión-radical, lo que se mide espectroscópicamente, en función de su absorbancia. Esta

variación se calcula con respecto al compuesto de referencia Trolox<sup>®</sup> y se expresa como equivalentes de Trolox<sup>®</sup>.

### 1.6.3. Peroxidación lipídica

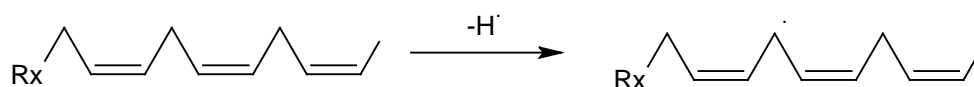
La peroxidación de lípidos es un proceso de degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados expuestos a diferentes agentes oxidantes *e.g.*, iones metálicos, calor, la radiación y a especies reactivas de oxígeno, tales como ion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Esta oxidación se puede dividir en tres tipos, a saber: auto-oxidación, foto-oxidación y oxidación enzimática. La auto-oxidación de los lípidos se lleva a cabo cuando los ácidos grasos insaturados están expuestos al oxígeno, y procede a través de una reacción en cadena. Los radicales libres se forman cuando los átomos de hidrógeno se extraen a partir de los ácidos grasos. Los radicales reaccionan con el oxígeno y forman radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicales hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Los peróxidos se descomponen fácilmente a los radicales alcoxilo, lo que conduce a una amplia variedad de productos de reacción. Estos incluyen especies no radicales tales como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes. Los productos de oxidación secundarios incluyen compuestos de bajo peso molecular, compuestos volátiles y no volátiles de peso molecular relativamente alto (Pérez y Permanyer, 1986), (Lin *et al.*, 1998).

Este proceso de oxidación se puede dividir en tres pasos, a saber:

- I. **Iniciación:** en esta etapa, se produce el ataque de una especie radicalaria, formándose así radicales  $-CH-(R^{\cdot})$  de los correspondientes ácidos grasos, como se observa en la **Figura 9**.

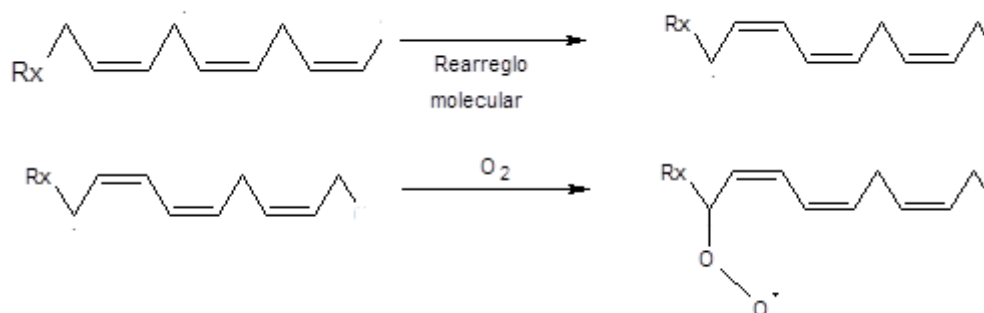
**Figura 9.** Formación de radicales de ácidos grasos ( $R^\cdot$ ) por abstracción de un hidrógeno  $H^\cdot$ , iniciadas por ERO o cualquier RL.



$Rx = CH_3(CH_2)_n$ ;  $n = 1, 2, 3 \dots$

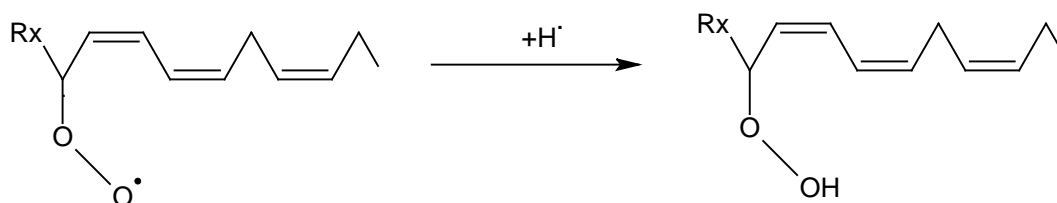
Los radicales de los ácidos grasos así formados ( $R^\cdot$ ), tienden a ser estabilizados mediante rearrreglos intramoleculares conducentes a formar dienos conjugados (**Figura 10**). Estos radicales dieno-conjugados pueden reaccionar con  $O_2$  originando radicales peróxido  $ROO^\cdot$ .

**Figura 10.** Estabilización de los radicales de ácidos grasos ( $R^\cdot$ ) por medio de rearrreglos intramoleculares y formación de peróxidos por reacción de éstos radicales con oxígeno.



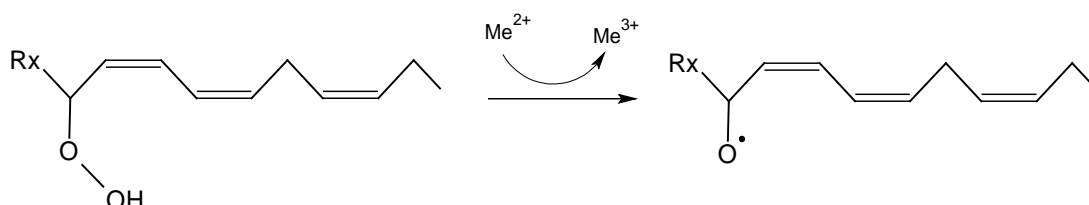
**II. Propagación:** Los radicales peróxidos ( $ROO^\cdot$ ), anteriormente formados (**Figura 10**), pueden abstraer los H de otras moléculas de lípidos vecinos para formar hidroperóxidos ( $LOOH$ ) y un nuevo radical de ácido ( $R^\cdot$ ), que también reaccionará con  $O_2$ , dará origen a un nuevo radical peróxido ( $ROO^\cdot$ ), para continuar así la reacción en cadena (**Figura 11**).

**Figura 11.** Ataque de un radical peróxido ( $\text{ROO}^\cdot$ ) a una molécula vecina, abstrayendo  $\text{H}^\cdot$  y propagando la reacción en cadena.



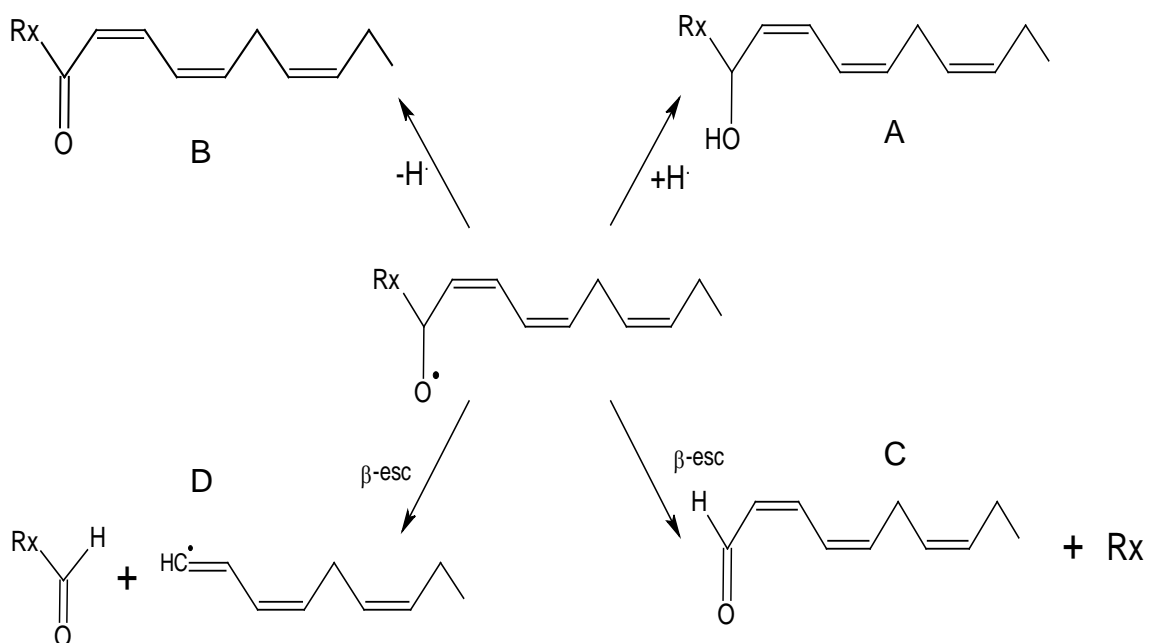
**III. Finalización:** Los hidroperóxidos ( $\text{LOOH}$ ), en presencia de iones o complejos de metales de transición como  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , originan los radicales alcoxilo ( $\text{RO}^\cdot$ ) (**Figura 12**).

**Figura 12.** Formación de radicales alcoxilo ( $\text{RO}^\cdot$ ) en presencia de metales divalentes, en el proceso de finalización de la peroxidación lipídica.



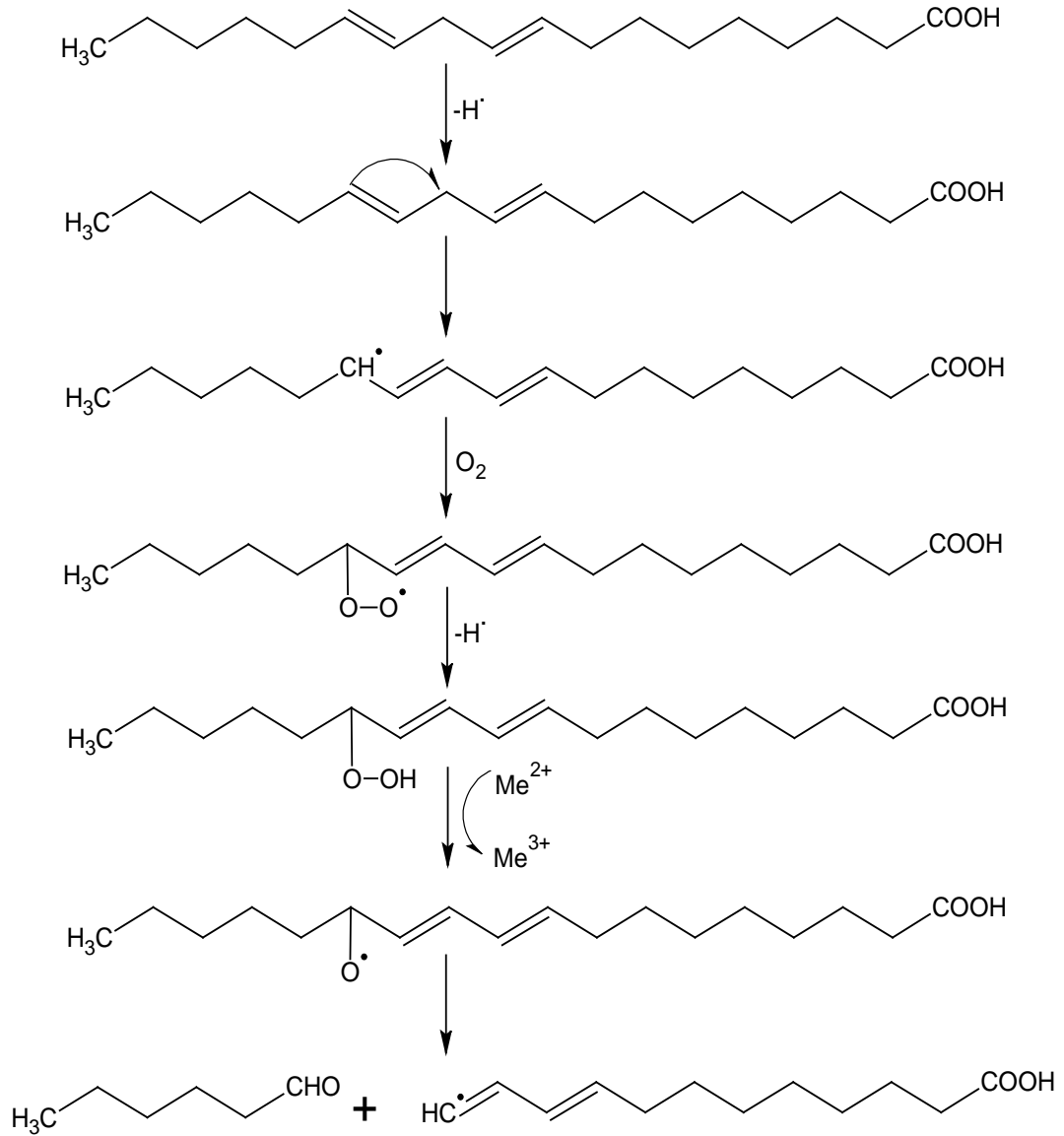
Los radicales ( $\text{RO}^\cdot$ ) pueden abstraer  $\text{H}^\cdot$  de otras moléculas, para formar (A) derivados hidroxilados, también pueden perder  $\text{H}^\cdot$  y formar las respectivas (B) cetonas, o pueden sufrir una escisión  $\beta$  ( $\beta$ -esc) y así formar (C) un aldehído y un (D) radical alquílico, que puede dar origen a un hidrocarburo por abstracción de un  $\text{H}^\cdot$  de otra molécula (**Figura 13**) (Frankel, 1991; Sherwin, 1978).

**Figura 13.** Productos finales generados durante el proceso de peroxidación lipídica.



De acuerdo con este proceso, por ejemplo, uno de los productos finales mayoritarios de degradación del ácido linoleico es el hexanal, cuya formación se observa en la **Figura 14**. Se forman, además, otros productos de degradación, a saber: 3-nonanal, 2,4-decadienal, acetaldehído, acroleína, propanal, butanal, pentanal, heptanal, nonanal, 2-hexenal, 2-heptenal, 2-10-oxo-decanoato de metilo, 10-oxo-8-decenoato de metilo, 4,5-epoxi-2-decenal, pentano, hexano, 1-pentanol, 1-octen-3-ol, 2-pentil-furano, heptanoato y octanoato de metilo (Lin *et al.*, 1998; Contreras, 2002).

**Figura 14.** Generación del hexanal durante la oxidación del ácido linoléico.



#### 1.6.4. Monitoreo de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica (PL), implica la “pérdida” (modificación o degradación) de los ácidos grasos. Por lo tanto, determinar su disminución está relacionado con el grado de PL en el sistema. El análisis de los ácidos grasos se puede

hacer por HPLC, pero éstos también se pueden derivatizar a compuestos más volátiles y estables (ésteres), para analizarlos por GC (Elmore *et al.*, 1999), (Park *et al.*, 1994).

El monitoreo de los compuestos volátiles generados en la peroxidación lipídica, se realiza por medio de la microextracción en fase sólida (SPME), esta técnica se basa en la extracción de los analitos de la matriz de una muestra mediante una fibra de sílice fundida recubierta con un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos ab(d)sorbidos mediante temperatura o un disolvente orgánico (Pawliszyn, 1997). El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta manera, se facilita su manipulación y al mismo tiempo, se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa (Véase **Figura 4**).

El procedimiento de extracción, consiste en la exposición de la fibra a un pequeño volumen del espacio de cabeza (*headspace*), por un cierto periodo de tiempo. Las condiciones de extracción se ven afectadas por variables como: agitación de la muestra, que permite la difusión de los analitos hacia la fibra, logrando el equilibrio más rápidamente. Los compuestos con coeficientes de difusión muy bajos tienen tiempo de equilibrio más largo. En este caso, se debe establecer el tiempo de extracción, con el fin de obtener la mayor cantidad de analitos en un tiempo de extracción dado (Cervantes, 2006).

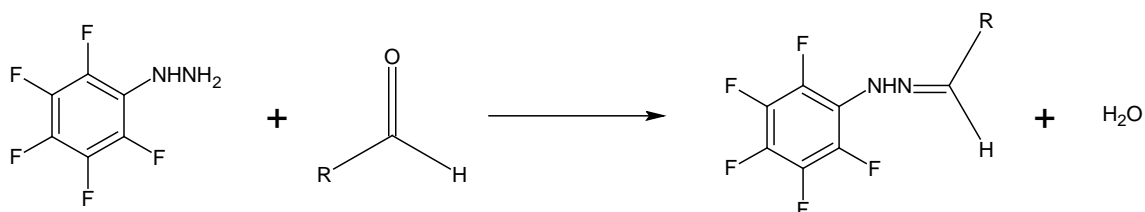
Otro parámetro, a tener en cuenta, es la temperatura de extracción, ya que puede tener efectos opuestos sobre la SPME. Un aumento en la temperatura favorece la difusión de los analitos hacia la fibra, además, en el modo *headspace*, la temperatura permite la transferencia de analitos a la fase vapor de la muestra. Por otro lado, ya que la adsorción es un proceso exotérmico, un incremento de la temperatura reduce la constante de distribución del analito.

Para medir los aldehídos volátiles, generados en la PL, se hace necesario el uso de una técnica de derivatización. En este caso, la combinación de la SPME con la derivatización es la extracción y derivatización simultánea de los analitos de interés directamente sobre la fibra, que aumenta la eficacia de la extracción y la selectividad.

En este caso, la fibra es introducida en el vial que contiene el reactivo derivatizante a una concentración elevada, de manera que la fibra queda enriquecida con el reactivo derivatizante. Luego, la fibra se introduce al espacio de cabeza del vial que contiene los analitos y la extracción de los mismos se produce simultáneamente con su derivatización (Pawliszyn, 1997).

Stashenko y colaboradores (2000), emplearon como agente derivatizante pentafluorfenilhidracina (PFPH), para la derivatización de compuestos carbonílicos sobre la fibra de SPME, expuesta al *headspace* (HS) de la muestra, obteniendo de esta manera, las respectivas hidrazonas (**Figura 15**), las cuales se analizan por GC/ECD. Esta metodología fue aplicada a la determinación de compuestos carbonílicos que se forman durante la peroxidación lipídica inducida térmicamente; luego, fue extendida a la evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales usando hexanal como marcador en un sistema lipídico modelo para medir el efecto protector contra la oxidación. (Cervantes, 2006).

**Figura 15.** Reacción de derivación de los aldehídos con pentafluorfenilhidracina (PFPH).



## **1.7. SEPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS**

El estudio de la composición y el control de calidad de los aceites esenciales y extractos se realizan a través de diferentes métodos de separación, identificación y cuantificación.

El presente estudio está sustentado en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, que es la técnica más usada en el análisis de los AE. A continuación, se describen brevemente sus puntos más relevantes.

### **1.7.1. Cromatografía de gases**

Es una técnica analítica, utilizada para separar los componentes de una muestra y, al mismo tiempo, permite determinar sus concentraciones. La muestra se volatiliza antes de ingresar a la columna cromatográfica, donde experimenta partición entre una fase móvil (gas inerte) y una fase estacionaria, constituida por un sólido o líquido soportado sobre las paredes de la columna. Las columnas de GC son capilares, y constan de dos partes principales: tubo y fase estacionaria. El recubrimiento interno de la columna, está compuesto por una película fina (de 0.1 a 5 $\mu$ m) de un polímero, térmicamente estable, con un elevado peso molecular (Karasek, 1998, Satinder, 2003).

La columna se encuentra dentro del horno, donde la temperatura se ajusta según los requerimientos del análisis. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de los analitos de la muestra y del grado de separación requerido. Los analitos, que eluyen de la columna, pasan a un detector, que registra las diferentes sustancias y genera una señal proporcional a su cantidad (Jennings *et al.*, 1987, Poople *et al.*, 1991).

### 1.7.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La combinación de la cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) es una de las herramientas analíticas más poderosas. En los últimos años, se ha demostrado que es uno de los métodos más eficientes y utilizados para el estudio de la composición de los AE de diversas plantas (Pino *et al.*, 1997), (Fajardo, 2007).

Los componentes del AE se separan en la columna y se identifican con base en sus tiempos de retención, índices de retención lineales (LRI) y los patrones de fragmentación, únicos para cada sustancia (Merken *et al.*, 2000).

Los tiempos de retención de la sustancia y de los hidrocarburos lineales se utilizan para determinar los llamados índices de retención lineales (Véase **Sección 3.6.2**), que sirven para identificar tentativamente los compuestos, pues todas las sustancias, que no co-eluyen en la columna GC, tienen LRI diferentes. La identificación por espectrometría de masas (MS) se hace por comparación del espectro de masas de la sustancia con los espectros de distintas bases de datos, *e.g.*, *Adams*, *NIST*, *Wiley*, y con base en el estudio de patrones de fragmentación. La identificación confirmatoria se hace con patrones certificados.

### 1.7.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia

Es la técnica más usada para el análisis de compuestos fenólicos en diferentes matrices. En general, para el análisis de flavonoides se ha empleado principalmente la cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), es decir, cuando la fase estacionaria posee menor polaridad que la fase móvil (Merken *et al.*, 2000).

Los gradientes de elución se realizan con sistemas binarios de disolventes, tales como soluciones acuosas acidificadas con ácidos acético, trifluoroacético, perclórico, *o*-fosfórico o fórmico, o con *buffer*, acetato o formiato en agua (solvente A) y con metanol o acetonitrilo como modificadores orgánicos (solvente B), (Merken *et al.*, 2000, Perl *et al.*, 2005).

En cuanto a los sistemas de detección, tres de los más empleados son UV-Vis, detector con arreglo de diodos (DAD) y MS. Todos los compuestos fenólicos contienen, por lo menos un anillo aromático, en consecuencia, absorben luz ultravioleta. Para el caso de los flavonoides, el primer máximo se encuentra entre 240-285 nm, debido al anillo A y, el segundo máximo, se presenta en el rango de 300-550 nm, debido al anillo C (Merken *et al.*, 2000).

## 2. CIENCIOMETRÍA

La cienciometría permite cuantificar la actividad científica en función del tiempo, analizar y difundir información, identificar y anticipar oportunidades o riesgos en la toma de decisiones oportunas. Este proceso sistemático utiliza, como herramientas, bases de datos de patentes y buscadores de Internet que ayudan en el proceso de organización de la información (Rossi y Delfino, 2005).

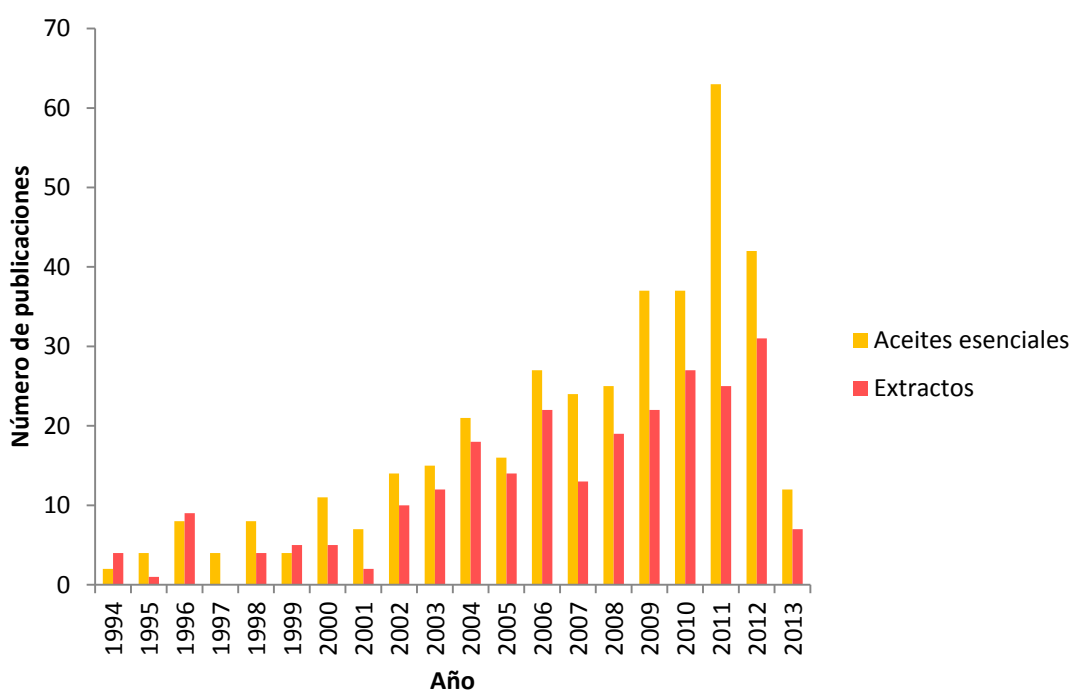
Por medio de la cienciometría se pueden estudiar diferentes aspectos cuantitativos de la actividad científica de una disciplina. Se puede obtener información tan específica como el país, la institución pública, el área, el año de publicación, las revistas, entre otras.

Con el fin de analizar el estado actual de las investigaciones sobre los aceites esenciales y extractos de la especie *Satureja viminea* L., se realizó un estudio cienciométrico de la producción científica existente, utilizando la base de datos *Scopus* (Elsevier).

El desarrollo científico y los estudios realizados sobre la especie *S. viminea* (Fam. Lamiaceae), se analizaron mediante las herramientas de producción científica sobre el género *Satureja*. Según el análisis cienciométrico, las investigaciones sobre la utilización de la planta *S. viminea*, han sido muy limitadas, es decir, aún no se ha realizado un estudio exhaustivo sobre esta planta. Las ecuaciones de búsqueda utilizadas en la base de datos *Scopus* (Elsevier), fueron “essential oil and *Satureja viminea*”, aparecieron 3 publicaciones desde el año 2000 hasta la fecha; “extract and *Satureja viminea*”, correspondieron a 3 publicaciones en la última década, y “antioxidant and *Satureja viminea*”, no reportaron ningún registro. En la revisión bibliográfica realizada, no se encontraron artículos en donde se evidencie el estudio sobre la planta *S. viminea* y su actividad antioxidante.

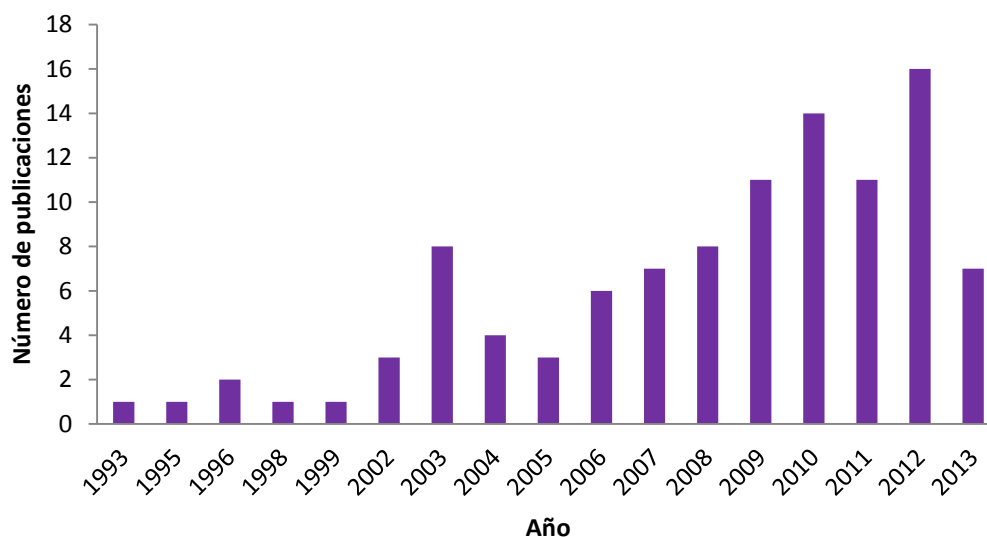
Sin embargo, al realizar una búsqueda del género *Satureja*, sí, se encuentra un gran número de artículos, tanto para el aceite esencial, como para los extractos. Estos resultados se muestran en la **Figura 16**, en donde se evidencia un aumento en el número de publicaciones sobre el género *Satureja* (631 artículos), que comprende alrededor de 30 especies, distribuidas abundantemente en la región mediterránea, Asia, Centroamérica y América del Sur.

**Figura 16.** Número de publicaciones por año, sobre el género *Satureja*. Periodo de observación: 1994 – 2013. Base de datos: *Science Direct, Scopus (Elsevier)*. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*essential oil and Satureja*) y TITLE-ABSTR-KEY (*extract and Satureja*). Total artículos: 631. Fecha de consulta: agosto 22 de 2013.



En la **Figura 17**, se muestra la relación de número de artículos respecto al año de publicación, para la ecuación de búsqueda “*Antioxidants and Satureja*”, se reportan 104 artículos.

**Figura 17.** Número de publicaciones, por año, sobre el género *Satureja*. Periodo de observación: 1993 – 2013. Base de datos: *Science Direct, Scopus (Elsevier)*. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Antioxidants and Satureja*); Total artículos: 104. Fecha de consulta: agosto 22 de 2013.



De la búsqueda realizada, se destacan dos artículos publicados en el año 2000 en la revista *Journal of Essential Oil Research*, ya que contiene información importante para la identificación de los componentes del aceite esencial de la planta, objeto de estudio, así como de las técnicas de extracción empleadas.

En estas publicaciones, Vila *et al.*, (2000), identificaron 40 componentes, que representan el 94% del aceite esencial; los principales son el *p*-menta-3-en-8-ol, (40%), y la pulegona, (35.3%). De la misma manera, Tucker *et al.*, (2000), identificaron 31 componentes, de los cuales el *p*-menta-3-en-8-ol y la pulegona fueron los componentes principales, con 48.3 y 14.4%, respectivamente. En ambas publicaciones, se reporta que el método de obtención del aceite esencial de la planta *Satureja viminea*, fue la hidrodestilación utilizando un aparato tipo Clevenger modificado.

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.1. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

##### Reactivos y solventes

Los reactivos y solventes utilizados en la parte experimental de esta investigación, fueron grado *HPLC* o grado analítico, y se adquirieron a través de los representantes de *Aldrich*, *Merck* y *Sigma*. En la **Tabla 2**, se reporta la lista de reactivos y solventes usados para la realización de este proyecto.

**Tabla 2.** Sustancias químicas empleadas en esta investigación.

Reactivos	Pureza y casa productora
Butilhidroxitolueno, (BHT)	99%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 63178, EE.UU.
Pentaflúorfenilhidracina, (PFPH)	97%, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI 53233, EE.UU.
Sulfato de sodio anhidro	Analítico, Merck-Schuchardt, 85662 Hohenbrum, Alemania
$\alpha$ -Tocoferol (Vitamina E)	97%, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI 53233, EE.UU.
Hexanal	98%, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI 53233, EE.UU.
<b>Disolventes</b>	
Metanol	HPLC, <i>J.T Baker</i> , México, D.F., México

Etanol	HPLC, <i>J.T Baker</i> , México, D.F., México
Hexano	HPLC, <i>J.T Baker</i> , México, D.F., México
Diclorometano	Analítico, Emscience, <i>Merck KgaA</i> , 41149122, Alemania
Agua	HPLC, Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, 08865, EE.UU.

---

## **Materiales**

- Balones aforados de 2, 5 10 y 25 mL.
- Micropipeteadores de 2-20 y 25-250  $\mu$ L (BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania).
- Puntas plásticas para las micropipetas (BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania).
- Pipetas Pasteur de vidrio de 230 mm de longitud (BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania).
- Tubos de ensayo 16 x 150 mm.
- Tubos cónicos de poli(propileno) de 1,5 mL (BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania).
- Frascos ámbar de 2 y 5 mL.
- Barras magnéticas (2 x 10 mm, 1 x 5 mm).
- Vaso refrigerante (10 cm x 80 mm y 10 cm x 70 mm, ancho 1,8 mm).
- Balón fondo redondo de 2 L, reductor de 45/50 a 24/40, alargadera 24/40, trampa *Dean-Stark*, condensador de bolas y condensador de espiras.
- Consumibles cromatográficos (*férulas, septa, liner, jeringas* Hamilton de 10  $\mu$ L).
- Viales de automuestreo de 2 mL (Agilent Technology, EE.UU.)
- Viales estándar para *headspace* de 12 mL.

- Fibra para SPME de PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$  57310-U. Sigma Chemical Co., Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.
- *Holder* manual para SPME. Sigma Chemical Co., Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.
- Gases especiales (He, H<sub>2</sub>, aire, mezcla Ar/CH<sub>4</sub>, Linde Colombia S.A., Bogotá, Colombia)

### Equipos de laboratorio

- *Minishaker* (IKA, JKMS, Hofheim, Alemania).
- Balanzas de precisión (Mettler Toledo AG258  $\pm$  0,00001 g., Zurich, Suiza).
- Balanza de precisión BA310S Sartorius Basis  $\pm$  0,005 g, Göttingen, Alemania).
- Plancha de calentamiento con agitación magnética, (SCHOTT MR 065, *Schott Geräte GmbH*, D-65719 Hofheim, Alemania).
- Baño circulatorio de refrigeración (Fisher Scientific, Model 901, Pittsburg, EE.UU.).
- Lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*, equipado con módulos de absorbancia (UV-Vis) y fluorescencia (*Sunnyvale*, CA, EE.UU.)
- Equipo de ultrasonido (Ultrasonic LC 20H).
- Extractor *Soxhlet* de alta presión *J&W Scientific*. Inc. 1500 psi.
- Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863*.
- Cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard-5890 Series II*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless*, columna HP-5 [30 m, 0.25 mm d<sub>i</sub>, 0.25 d<sub>f</sub>, fase estacionaria: 5%-fenil poli(metilsiloxano)] y detector de captura de electrones (EDC, <sup>63</sup>Ni), un inyector automático HP 7683, y un sistema de datos HP *ChemStation* HP Rev. A.06.03.

### 3.2. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA

El material vegetal se recolectó durante los meses de febrero, marzo y abril del 2013, en parcelas experimentales ubicadas en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM, en el Campus principal de la Universidad Industrial de Santander.

La identificación botánica de la planta *S. viminea*, se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Herbario Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá). El pliego testigo de la planta quedó depositado como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá), así: *Satureja viminea* (Lamiaceae), número COL 566449. La planta fue clasificada por el doctor José Luis Fernández Alonso, en el año 2013.

El material se trató en estado fresco (recién cortado) y parte del material vegetal fue sometido a un proceso de secado a temperatura ambiente a la sombra. Para ello, las plantas se colocaron sobre bandejas, dando paso a la circulación de aire en todas las direcciones. Se registró el cambio en el peso de la planta en función del tiempo, cada 12h hasta alcanzar el equilibrio. Finalmente, se calculó la pérdida de peso porcentual y, con base en esto, se construyó la curva de secado para la especie.

La disminución de la humedad de la planta durante el secado, se calculó mediante la **Ecuación 1**, bajo la presunción de que la pérdida de peso corresponde exclusivamente al contenido de agua del material vegetal.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W_{\text{Húmeda}}}{[W_{\text{Húmeda}} + W_{\text{Seco}}]} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde,

$W_{\text{húmeda}}$  = Peso planta fresca.

$W_{seca}$  = Peso planta seca.

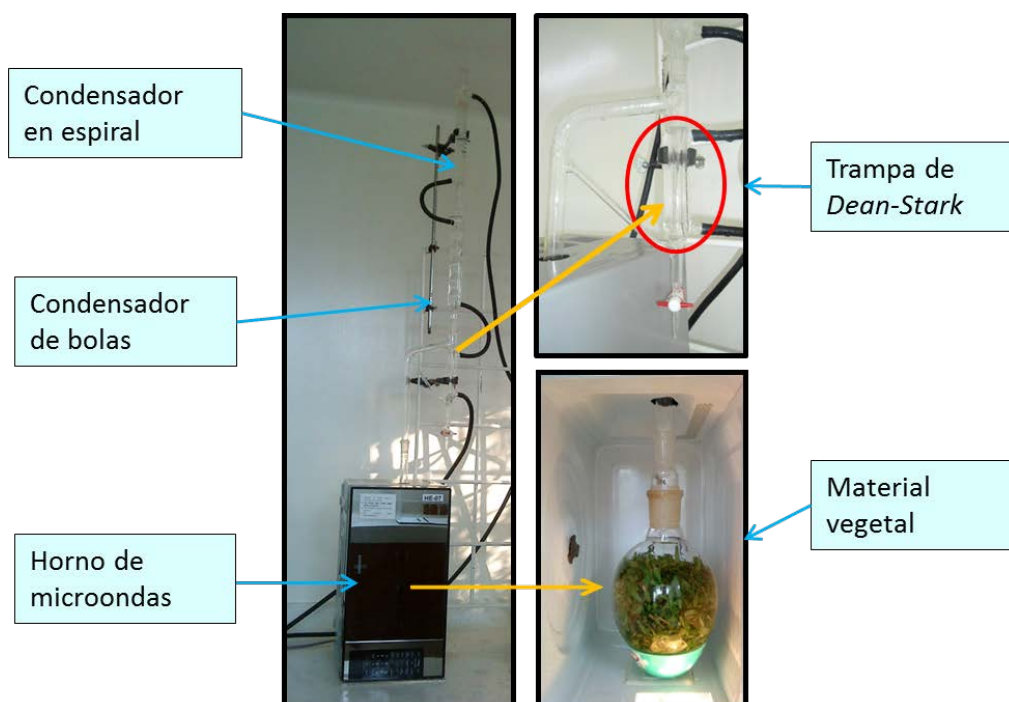
El picado de la planta se realizó de forma manual, con unas tijeras de jardinería, hasta obtener un tamaño de partícula de aproximadamente 0.5 mm.

### 3.3. OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

#### 3.3.1. Hidrodestilación asistida por microondas

Los aceites esenciales se obtuvieron de las partes aéreas (hojas y tallos) de *S. viminea* (Lamiaceae), por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, MWHD. La extracción se llevó a cabo en un equipo de destilación tipo *Clevenger*, con reservorio de destilación *Dean-Stark*, adaptado a un sistema de calentamiento, en un horno de microondas doméstico Samsung MS-1242zk, con potencia de salida de 1600 W y frecuencia de radiación de 2,4 GHz. En la **Figura 18**, se puede observar el montaje utilizado para MWHD.

**Figura 18.** Montaje MWHD. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Antoine Lavoisier, CENIVAM, UIS. Fecha: Febrero de 2013.



Las condiciones de operación del procedimiento se desarrollaron según lo descrito por Stashenko y colaboradores (2004). En la **Tabla 3**, se especifican las condiciones de extracción del aceite de la planta fresca y de la planta seca. Los AE obtenidos se secaron con sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para eliminar humedad, se pesaron para calcular, con base en el peso inicial de material vegetal, su rendimiento. Posteriormente, se almacenaron en frascos ámbar, en una nevera a 4° C, en donde se conservaron para los futuros ensayos.

**Tabla 3.** Condiciones de extracción por MWHD de los aceites esenciales de *Satureja viminea* (Lamiaceae).

Planta	Estado	Parte de la planta empleada	Tiempo de extracción	Vol. Agua, mL
<i>S. viminea</i> L.	Fresco	Hojas y tallos	3 x 15 min	300 mL
	Seco	Hojas y tallos	3 x 15 min	420 mL

La obtención del AE se realizó por triplicado para obtener la reproducibilidad del proceso. El rendimiento de la extracción se determinó con base en el peso inicial del material vegetal empleado, según la **Ecuación 2**.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{W_{AE}}{W_{MV}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde:

$W_{AE}$  = Peso del aceite esencial obtenido;

$W_{MV}$  = Peso inicial del material vegetal.

Los valores determinados para cada extracción se promediaron; la variación en el contenido del aceite corresponde a la desviación estándar de los datos. Finalmente, se tomaron 50 µL del aceite esencial y se depositaron en un vial de reacción, al cual se le adicionó 1 µL de *Istd* (patrón interno, *n*-tetradecano). La

mezcla se aforó a 1 mL con diclorometano y se inyectó al GC-MS, para su posterior análisis.

### 3.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

#### 3.4.1. Destilación-extracción con solvente simultánea

El proceso SDE (*Simultaneous Distillation-Solvent Extraction*, por sus siglas en inglés), se llevó a cabo en un equipo, a micro-escala, para solventes de alta densidad, diseñado por Goderfroot *et al.* (1981). Se emplearon 2,5 g de material vegetal, finamente picado, y se le adicionaron 15 mL de agua destilada; la duración de la extracción fue de 2 h, así como lo describen Stashenko *et al.*(1996). El solvente de extracción fue diclorometano (grado HPLC). El extracto obtenido se concentró con corriente de nitrógeno y se le adicionó 1  $\mu$ L de *Istd*(*n*-tetradecano) y se aforó a 1 mL con diclorometano y se inyectó al GC-MS, para su posterior análisis. En la **Figura 19**, se muestra el montaje empleado.

**Figura 19.** Equipo a micro-escala de destilación-extracción con solvente simultánea (SDE), Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Marie Curie, CENIVAM, UIS. Fecha: Marzo de 2013.



### 3.4.2. Extracción con fluido supercrítico

La obtención del extracto supercrítico de la planta se realizó en un extractor Soxhlet de alta presión (*J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*). Se usó la metodología empleada por Stashenko *et al.* (1994, 2000). Se emplearon 2 g del material vegetal seco, 500 g de hielo seco (CO<sub>2</sub>) comercial, como fuente de fluido supercrítico; la extracción se llevó a cabo durante dos horas, contadas a partir que el manómetro indicaba una presión interna de 1050-1100 psi, introducido en un baño a una temperatura de 40-50 °C. El extracto obtenido se secó y se disolvió en diclorometano. Se inyectó 1 µL de la solución en el GC-MS para su posterior análisis. En la **Figura 20**, se muestra el montaje empleado.

**Figura 20.** Extractor Soxhlet de alta presión para SFE. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Marie Curie, CENIVAM, UIS. Fecha: Abril de 2013.



### 3.4.3. Extracto con solvente

Para los extractos con solvente (SE), se realizaron dos extracciones usando solventes distintos. El primer extracto se realizó empleando una solución 70:30

metanol-agua, para la cual se emplearon 10 g de material vegetal seco y picado. La extracción se realizó en tres tandas usando en cada una 300 mL de solución, se agitó por un tiempo de 30 min y se sometió a ultrasonido durante 30 min más. Se reservó el extracto y luego se rotoevaporó, se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno.

En la segunda extracción, se empleó isopropanol, que se adicionó en tres tandas de 100 mL cada una, a 5 g de material vegetal seco y picado. El extracto obtenido se filtró, se rotoevaporó y se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno.

### **3.5. OBTENCIÓN DE FRACCIONES VOLÁTILES**

#### **3.5.1. *Headspace* estático**

La extracción de la fracción volátil se llevó a cabo en un equipo *headspace sampler* HP 7694 (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, EE.UU.), el cual se muestra en la **Figura 21**. Se emplearon los siguientes parámetros operacionales: temperatura del vial, 70 °C; tiempo de equilibrio, 10 min; temperaturas del *loop* y de la línea de transferencia, se mantuvieron a 110 y 180 °C, respectivamente. Se emplearon 2 g de material vegetal fresco y 1.5 g de material vegetal seco, previamente picado, que se colocaron en un vial de *headspace* de 20 mL; 1 mL de la fase vapor se inyectó a la columna cromatográfica.

**Figura 21.** Equipo empleado en la técnica *headspace* estático. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio J.J. Thomson, CENIVAM, UIS. Fecha: Mayo de 2013.



### 3.5.2. Microextracción en fase sólida

La SPME se realizó usando una fibra de poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno, (PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$  de espesor). Se llevó a cabo la extracción de volátiles a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  de la fase vapor de la planta picada (1.30 g de planta fresca y 1.15 g de planta seca), colocada en un vial ámbar para SPME de 10 mL. El tiempo de exposición de la fibra fue de 30 min (la selección de este parámetro se basó en experimentos preliminares). Las sustancias extraídas fueron térmicamente desorbidas a  $250^\circ\text{C}$ , durante 10 min, en el puerto de inyección de un GC-MS; el montaje usado para HS-SPME se puede observar en la **Figura 22**.

**Figura 22.** Montaje empleado para la extracción por HS-SPME de los volátiles de la planta. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Antoine Lavoisier, CENIVAM, UIS. Fecha: Mayo de 2013.



### 3.6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Con el fin de realizar la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en el AE y en los extractos de *S. viminea*, las muestras se sometieron a un proceso de separación cromatográfico, empleando dos columnas de diferente polaridad. Se usó un detector de masas, MDS (*Mass Selective Detector*, por sus siglas en inglés).

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un equipo *Agilent Technologies 6890N Series Network System* (Palo Alto, California, EE.UU), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Inert XL*. (Véase **Figura 23**)

La separación de los analitos de la mezcla se realizó en una columna capilar apolar, DB-5MS, de 60 m x 0.25 mm, (d.i.) x 0.25  $\mu$ m, (d<sub>f</sub>), con fase

estacionaria apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) y una columna capilar polar, DB-WAX, de 60 m x 0.25 mm, (d.i.) x 0.25  $\mu\text{m}$ , (d<sub>f</sub>), con fase estacionaria entrecruzada e inmobilizada de poli(etilenglicol).

El gas de arrastre empleado en el análisis fue helio (99.995 % gas AP, Linde, Colombia), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y un flujo volumétrico de 1mL/min. La programación de temperatura del horno fue de 45 °C (5 min) hasta 150 °C (3 min), @ 3 °C/min, luego hasta 220 °C (5 min) @ 4 °C/min.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con la energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia permanecieron a 230 y 285 °C, respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron obtenidos en un cuádrupolo, por medio de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*), en el rango de masas de  $m/z$  40-350.

**Figura 23.** Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Series GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863 Series*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CROM-MASS. Fecha: Agosto de 2013.



### 3.6.1. Cuantificación

La cuantificación de los compuestos presentes en el AE y extractos de la planta, se realizó por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama, FID (*Flame Ionization Detector*, por sus siglas en inglés)(Stashenko *et al.*, 2009, 2010).

La cuantificación de los metabolitos identificados se realizó mediante estandarización interna empleando *n*-tetradecano, como patrón interno, según la **Ecuación 3**.

$$C_x = \left[ \frac{C_{Istd} \times A_x}{A_{Istd}} \right] \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

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

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

$A_x$ : Área del pico cromatográfico del analito, cuentas;

$A_{Istd}$ : Área del pico cromatográfico del patrón interno, cuentas.

### 3.6.2. Identificación

La identificación cualitativa de los compuestos en el AE y en los extractos, se realizó por comparación de los índices de retención lineales, LRI, y los espectros de masa experimentales, con los reportados en las librerías de espectros de Adams (2004), NIST (2008), Wiley (2008), Davis (1990), y the Pherobase (disponible en: <http://www.pherobase.com/>).

Los LRI se calcularon con base en los tiempos de retención de una serie homologa de patrones de hidrocarburos lineales desde C<sub>6</sub> hasta C<sub>25</sub>, que se

analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas que se usaron para los AE y los extractos de la planta. Su determinación se realizó empleando la **Ecuación 4**.

$$LRI = 100n + 100 \left[ \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

LRI: Índice de retención lineal del compuesto de interés;

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

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

$t_{Rx}$ : Tiempo de retención del compuesto de interés.

$t_{Rn}$  y  $t_{RN}$ : Tiempos de retención de *n*- alcanos que eluyen antes y después del compuesto de interés, respectivamente.

### 3.6.3. Análisis por HPLC-DAD

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200, con bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1315B, un inyector automático y un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) G1315B (Véase **Figura 24**).

La separación de los compuestos fenólicos se realizó en una columna apolar Kinetex C18 (4.6 mm x 100 mm, 2.5  $\mu$ m). El procesamiento de los datos se hizo a través del software *Agilent Technologies ChemStation*, Versión B.04.02 (SP1).

La fase móvil consistió en ácido acético, al 0.3%, y acetonitrilo. La temperatura de la columna fue de 35 °C, con un flujo volumétrico de 1 mL/min, y un volumen de inyección de 20 µL. Los cromatogramas se registraron a 245 nm.

La identificación de los compuestos antioxidantes se realizó por comparación de los tiempos de retención ( $t_R$ ) y los espectros UV-Vis con los de una mezcla de sustancias de referencia certificadas, entre ellas: ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, epigalocatequina, catequina, ácido vanílico, ácido cafeico, epicatequina, epigalocatequina galato, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, epicatequina galato, ácido rosmarínico, ácido *trans*-cinámico, quercetina, luteolina, apigenina, naringenina, kaempferol, pinocembrina, ácido carnósico y ácido ursólico.

**Figura 24.** Cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200, con bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, equipado con inyector automático y acoplado a un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) G1315B. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CROM-MASS. Fecha: Agosto de 2013.



### 3.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS

La determinación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos, AE y extractos (SE) se realizó siguiendo dos metodologías diferentes, en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*, con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos y equipado con módulos de absorbancia UV-Vis y fluorescencia (*Sunnyvale, CA, EE.UU.*) (Véase **Figura 25**). Las mediciones se realizaron con cada una de las metodologías (capacidad de absorción del oxígeno radical, y capacidad antioxidante equivalente al Trolox®), por triplicado, y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar.

**Figura 25.** Lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*, con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos y equipado con módulos de absorbancia UV-Vis y fluorescencia (*Sunnyvale, CA, EE.UU.*). Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio J.J. Thomson, CENIVAM, UIS. Fecha: Junio de 2013.



### 3.7.1. Capacidad de absorción del oxígeno radical

La capacidad antioxidante de los AE, extractos, sustancias control, se midió evaluando la inhibición en la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína, que se utilizó como indicador molecular y blanco de ataque de los radicales peroxilo generados por el compuesto AAPH (Arias, 2012).

Se realizaron diluciones de las muestras para garantizar que la reacción llegará a su fin, es decir, que se alcanzará un valor de fluorescencia final menor del 5% del valor inicial.

La respuesta de la capacidad antioxidante de las muestras fue el área bajo la curva (ABC) de éstas, con respecto a la curva del blanco, que representa la disminución de la fluorescencia de la FL, la cual es directamente proporcional al valor ORAC expresado en  $\mu\text{mol}$  de Trolox<sup>®</sup>/ g de muestra. Las mediciones se realizaron en el lector de microplacas, empleando el módulo de fluorescencia con filtros, que manejan longitudes de onda de 490 nm de excitación y 510-570 nm de emisión.

### 3.7.2. Ensayo de decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>

El ensayo se realizó empleando un lector de microplacas, empleando el módulo de absorbancia, a una longitud de onda de 750 nm, con base en el procedimiento descrito por Re y colaboradores (1999). Se preparó una solución *stock* del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>, mezclando una solución de ABTS (7mM) con persulfato de potasio, PDS (2,45mM). La mezcla se dejó reaccionar por 24 h, a 4°C, en ausencia de luz. Para el ensayo, la absorbancia del equipo se ajustó a  $0,700 \pm 0.003$ .

La respuesta de las muestras se determinó como el porcentaje de absorbancia del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>, según la **Ecuación 5**.

$$\text{Inhibición de absorbancia}_{\lambda 750 \text{ nm}}(\%) = \left(1 - \frac{A_f}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

En donde:

$A_0$ = Absorbancia del catión-radical ABTS<sup>•+</sup> sin inhibir;

$A_f$ =Absorbancia del catión-radical ABTS<sup>•+</sup> determinada después de la adición del posible antioxidante.

Se prepararon soluciones del AE, extracto y sustancias de referencia, de tal manera, que la inhibición de la solución del catión-radical ABTS<sup>•+</sup> resultara entre el 10-80% del blanco de la absorbancia. Posteriormente, se determinó la capacidad antioxidante equivalente al Trolox<sup>®</sup> (TAC –  $\mu\text{mol}$  de Trolox<sup>®</sup> / g de sustancia) (n=3).

### 3.7.3. Peroxidación lipídica

Se midió el efecto protector a los AE y extractos de la especie *S. viminea* y sustancias control, BHT y  $\alpha$ -tocoferol contra el deterioro oxidativo de una matriz lipídica, (aceite de girasol), sometido a radiación UVA. El estudio se realizó mediante el seguimiento del hexanal, producto secundario final más abundante de la degradación oxidativa del ácido linoleico (ácido mayoritario) presente en el aceite de girasol.

#### 3.7.3.1. Análisis por GC-ECD del derivado PFPH-hexanal

El análisis del derivado PFPH se realizó en un cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 6890 *Plus* (Véase **Figura 26**), acoplado a un detector de captura de electrones (ECD, <sup>63</sup>Ni, 280 °C), equipado con puerto de inyección *split/splitless* (inyección en modo *split* 1:10). Se empleó una columna HP-5 de 30 m x 0.25 mm D.I. x 0.33  $\mu\text{m}$ ,  $d_f$ , 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano). Se utilizó helio como gas de arrastre (99.995%, Grupo

Linde Colombia S.A.), con flujo volumétrico de 1mL/min y como gas auxiliar argón/metano (9:1). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 260 y 280 °C, respectivamente. La temperatura fue programada de la siguiente manera: 100 °C (5 min) hasta 250 °C (2 min) @ 10 °C/min.

**Figura 26.** Cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 6890 *Plus*, acoplado a un detector de captura de electrones (ECD,  $^{63}\text{Ni}$ ), equipado con puerto de inyección *split/splitless*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS, Fecha: Julio de 2013.



### 3.7.3.2. Calibración externa del derivado PFPH del hexanal

La cuantificación del hexanal, generado durante la degradación oxidativa, por la acción de la radiación UV en el sistema lipídico de aceite de girasol, se realizó por el método de calibración externa.

Se preparó una solución “stock” del hexanal en metanol (500 ppm). La fibra de PDMS/DVB de 65  $\mu\text{m}$ , se expuso a una solución acuosa de PFPH (2 mL, 500 ppm, 1000 rpm, 10 min). Después de su saturación con PFPH, la fibra se expuso al *headspace* de las diferentes disoluciones de la solución patrón del hexanal (0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 ppm). Los derivados formados sobre la fibra, se

desorbieron, durante 10 min a 250 °C, en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases.

Los valores de concentración, tiempo de retención ( $t_R$ ) y las áreas cromatográficas de cada derivado, se utilizaron para calcular la reproductibilidad y repetitividad de las áreas cromatográficas de sus respectivas concentraciones de la solución patrón del hexanal. Para esto, se determinaron el valor promedio ( $\bar{X}$ ), la desviación estándar (S) y el porcentaje del coeficiente de variación (CV) de las áreas cromatográficas de la señal del hexanal, usando las **Ecuaciones 5 - 7**:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

**Ecuación 5.**

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{(n-1)}}$$

**Ecuación 6.**

$$\% CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

**Ecuación 7.**

Donde:

$\bar{X}$ : Valor promedio de la variable X (área);

$x_i$ = Valor “iésimo” obtenido para la variable X en una medición.

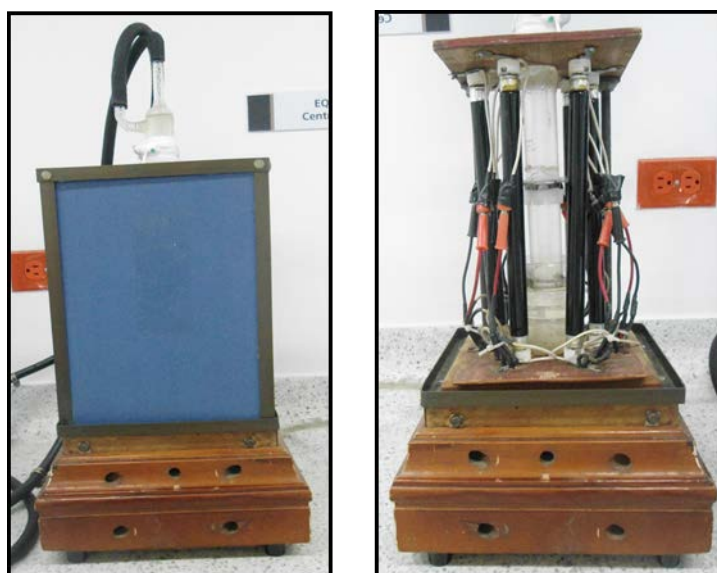
n= Número de datos

### **3.7.3.3. Peroxidación lipídica en el aceite de girasol sometido a radiación UV**

La degradación oxidativa del aceite de girasol, producida por la exposición a la radiación UVA, se evaluó con 400 mg del aceite de girasol en tubos cónicos de poli(propileno), sellados herméticamente con un séptum, papel parafina y teflón, para evitar, que algunos de los compuestos volátiles generados durante la irradiación, se escaparan. La radiación fue emitida por un reactor UV, desarrollado por Contreras (2002) (Véase **Figura 27**). Las muestras se

colocaron en el portamuestras del reactor y se irradiaron durante 12 h, manteniendo una temperatura de 55 °C, para garantizar la presencia de los componentes antioxidantes de interés. Luego, las muestras se retiraron del reactor y se llevaron a enfriamiento a 4°C, en una nevera industrial INDUFRIAL. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las muestras.

**Figura 27.** Reactor UV, equipado con una refrigerante y 6 lámparas fluorescentes F6T5BLB de 16 x 225.1 mm y 6 Watt. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Antoine Lavoisier. Fecha: Agosto de 2013.



El procedimiento, que se realizó, se describe a continuación:

**Paso 1: Pre-equilibrio de la PFPH.** En un vial ámbar de 4.5 mL, sellado con teflón, se adicionaron 2 mL de la solución de PFPH (500 ppm), a temperatura ambiente y agitación magnética (1000 rpm), durante 10 min.

**Paso 2: Saturación de la fibra.** La fibra de PDMS/DVB, se expuso al espacio de cabeza de la solución de PFPH durante 10 min.

**Paso 3: Pre-equilibrio de la muestra.** Simultáneamente a la saturación de la fibra con PFPH, se colocó la muestra, previamente refrigerada, en un baño de agua a 40 °C durante 10 min, con agitación magnética.

**Paso 4: Derivatización del hexanal en la muestra.** Después de alcanzar el pre-equilibrio de la muestra, se expuso la fibra saturada con la PFPH al espacio de cabeza de la muestra durante 40 min.

**Paso 5: Desorción de los compuestos volátiles.** La desorción de los derivados hidrazónicos se realizó en el puerto de inyección del GC-μ-ECD, a 260 °C, durante 10 minutos.

#### **3.7.3.4. Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de los AE y extractos de *S. viminea*, en el aceite de girasol sometido a radiación UV**

Se pesaron 2 mg de cada muestra junto con 398 mg de aceite de girasol en tubos cónicos de poli(polipropileno), para alcanzar una concentración de 0.5% p/p. Las muestras fueron irradiadas en el reactor UV, siguiendo la metodología descrita en la **Sección 3.7.3.3**. El grado de protección (%GP) de las muestras en el sistema lipídico (aceite de girasol), contra su degradación oxidativa, se calculó utilizando la **Ecuación 8**.

$$\% GP = \left[ \left( \frac{A_0 - A_X}{A_0} \right) \times 100 \right] \quad \text{Ecuación 8.}$$

Donde:

A<sub>0</sub>: Área cromatográfica del pico del hexanal medida en el sistema lipídico sometido a radiación UV, sin antioxidante.

A<sub>x</sub>: Área cromatográfica del pico del hexanal medida en el sistema lipídico sometido a radiación UV, con antioxidante.

El grado de protección se determinó con base en la cantidad del hexanal generado, que es uno de los aldehídos que se producen en mayor proporción durante la peroxidación lipídica del ácido linoleico.

#### **3.7.3.5. Validación del sistema lipídico modelo**

La validación consistió en evaluar, también, los efectos protectores de dos antioxidantes sintéticos, el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y el BHT, a los cuales se les realizó el procedimiento descrito en las **Secciones 3.7.3.2y3.7.3.3.**

### **3.8. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. viminea*.**

Un aceite esencial se caracteriza también por sus constantes físicas: estos parámetros analíticos se utilizan para valorar su genuinidad, es decir, sirven como patrones en el control de calidad para detectar adulteraciones, discriminar la calidad del aceite o determinar que el producto sea realmente natural. Entre las constantes físicas se destacan la densidad, el índice de refracción y el poder rotatorio, entre otras (Cañigueral, 2000).

En el presente trabajo, se determinaron las siguientes propiedades físicas, siguiendo la metodología descrita en las normas ISO: punto de congelación (Norma ISO 1041, 1973), índice de refracción (Norma ISO 280, 1998), densidad relativa (Norma ISO 279, 1998), humedad (Norma ISO 11021, 1999), rotación óptica (Norma ISO 592, 1998), índice de acidez(Norma ISO 1242, 1999), solubilidad en etanol(Norma ISO 875, 1999), y punto de chispa (Norma ISO 11018, 1997).

## 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El desarrollo experimental de esta investigación se realizó en tres etapas: la primera, fue la extracción y caracterización de los aceites esenciales, los extractos y la fracción volátil de la planta; en la segunda etapa, se realizó la extracción con solvente para identificar compuestos fenólicos; en la tercera etapa, se evaluó la actividad antirradicalaria de los AE y extractos de *Satureja viminea*. A continuación, se presenta la discusión de resultados obtenidos de esta investigación.

### 4.1. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE

Al realizar estudios sobre especies vegetales, es importante tener la certeza sobre la identidad botánica de la especie, objeto de estudio. Para la presente investigación, la especie *Satureja viminea* L., cultivada en parcelas experimentales en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, se identificó en el Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, por el doctor José Luis Fernández Alonso, en el año 2013. Los resultados de la caracterización botánica se registran en la **Tabla 4**.

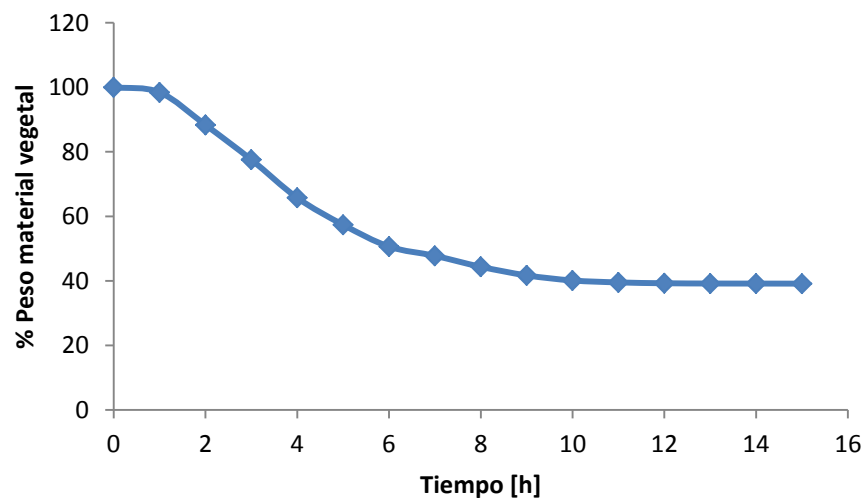
**Tabla 4.** Identificación taxonómica de la especie *Satureja viminea* L.

<b>Especie</b>	<b>Autor</b>	<b>Familia</b>	<b>No. COL</b>
<i>Satureja viminea</i> L.	Linné, Carl von	<i>Lamiaceae</i>	566449

### 4.2. SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

En la **Figura 28**, se presenta la curva de equilibrio construida con los datos experimentales durante el secado de la planta *Satureja viminea* L. a temperatura ambiente.

**Figura 28.** Curva de secado a temperatura ambiente de *Satureja viminea* L.



La gráfica representa el peso durante el proceso de secado de la planta, en función del tiempo. Como se puede observar, transcurridas 14 horas, se alcanzó la humedad de equilibrio, definida como la humedad más baja que puede conservar un material, en función de la humedad relativa del aire. Se tendría entonces que el 61% en peso, que perdió la planta, correspondía exclusivamente al agua contenida en esta. El 39% restante se compone de la masa del material vegetal y agua remanente en equilibrio con la humedad relativa. Cabe resaltar, que al tratarse de un espacio abierto, el contenido de humedad está sujeto a las variaciones de humedad relativa del ambiente.

#### **4.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS AE Y EXTRACTOS DE *S. viminea*.**

Para obtener una información completa acerca de la composición química de metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de la planta bajo estudio, se emplearon las técnicas MWHD, SDE, SFE. Además, para evaluar mejor la composición química de la fragancia natural de la planta, se usaron métodos de aislamiento menos “invasivos”, como lo son las técnicas de *headspace* (S-HS) y SPME.

#### 4.3.1. Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *S. viminea*, aislados por MWHD.

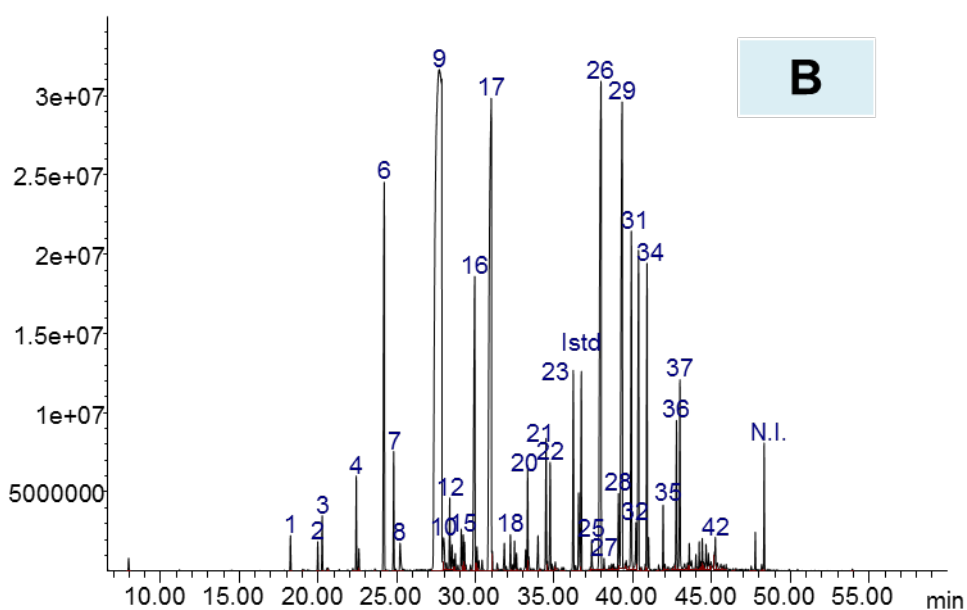
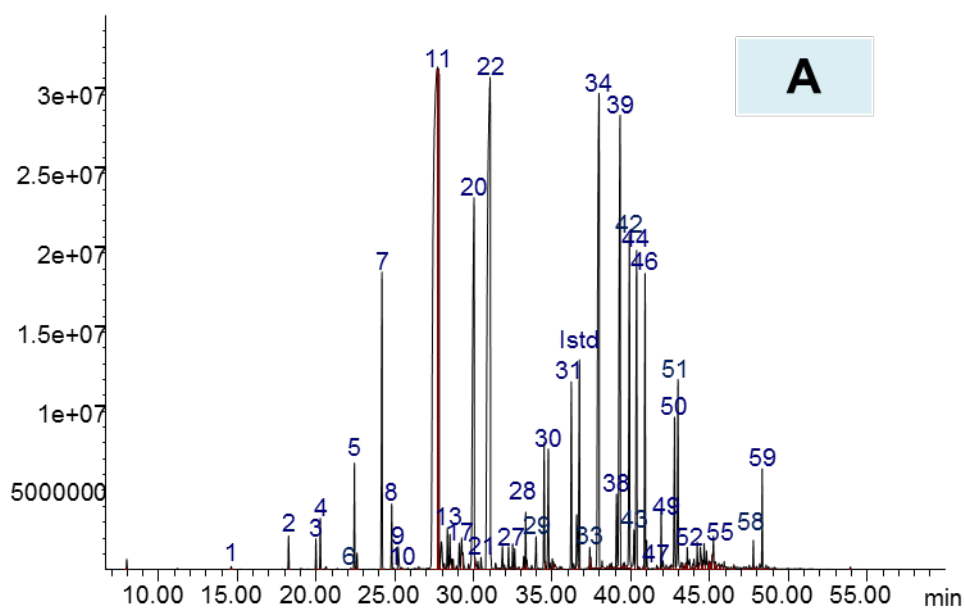
Los aceites esenciales de *Satureja viminea* L., obtenidos por MWHD, presentan un olor intenso a menta y son de color ligeramente amarillo. El rendimiento del proceso de la MWHD, fue de  $0.87 \pm 0.098\%$  (n=3), para la planta fresca y  $2.16 \pm 0.061\%$  (n=3), para la planta seca.

Los metabolitos presentes en ambas matrices (AE y extracto), se identificaron por GC-MS. El análisis de los espectros de masas (EI, 70 eV), se realizó empleando los siguientes parámetros de integración de los picos cromatográficos: área de rechazo del pico en la base igual a 0.1 y un umbral de integración, *thshd*= 18.0. Con base en estas condiciones, en los AE y extractos de la planta se detectaron 59 compuestos, para el AE obtenido de la planta fresca, y 42 compuestos, para el AE aislado de planta seca, con cantidades relativas mayores de 0.1%, de los cuales se identificaron el 97 y el 95% de compuestos, respectivamente.

En la **Figura 29**, se presentan los perfiles cromatográficos de los metabolitos secundarios de los AE de *Satureja viminea*, aislados por MWHD, de plantas frescas o secas.

En las **Tablas 5 y 6**, se relacionan los componentes mayoritarios de los aceites esenciales aislados e identificados, según su orden de elución en la columna apolar, con sus respectivos índices de retención lineales, cantidades relativas, obtenidos de plantas frescas o secas.

**Figura 29.** Perfiles cromatográficos del aceite esencial de plantas frescas (A) y secas (B), obtenido de los tallos y hojas de *S. viminea*, aislados por MWHD. Columna DB-5MS (60m), Split 1:30, MSD (EI,70 eV). En las **Tablas 5** y **6**, se reporta la identificación de los picos cromatográficos.



**Tabla 5.** Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por MWHD, de *S. viminea* fresca.

Nº Pico <sup>a</sup>	Compuesto	LRI <sup>b</sup>				Tipo	Cantidad relativa <sup>c</sup> , % ( $\pm$ s, n=3)
		Columna DB5-MS		Columna DB-WAX			
		Experimental.	Lit. [d]	Experimental.	Lit. [e, f, g]		
1	<i>cis</i> -3-Hexenol	855	857	1387	-	OC	0.061 $\pm$ 0.0058
2	$\alpha$ -Pineno	937	939	1023	1036	M	0.15 $\pm$ 0.017
3	Sabineno	976	975	1123	1130	M	0.13 $\pm$ 0.010
4	$\beta$ -Pineno	982	979	1110	1124	M	0.25 $\pm$ 0.022
5	Limoneno	1033	1029	1201	1206	M	0.45 $\pm$ 0.056
6	$\beta$ -Felandreno	1036	1029	1211	1216	M	0.069 $\pm$ 0.0016
7	<i>p</i> -Menta-3,8-dieno	1076	1072	1270	-	M	1.8 $\pm$ 0.23
8	<i>p</i> -Menta-2,4(8)-dieno	1090	1088	1293	-	M	0.32 $\pm$ 0.041
9	Linalol	1100	1096	1548	1555	MO	0.150 $\pm$ 0.0025
10	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	1106	1098	1471	1463	MO	0.018 $\pm$ 0.0055
11	<i>p</i> -Menta-3-en-8-ol	1164	1150	1622	-	MO	51 $\pm$ 1.6
12	<i>iso</i> -Mentona	1176	1162	-	-	MO	0.05 $\pm$ 0.013
13	<i>neo-iso</i> -Isopulegol	1181	1171	1640	1619	MO	0.18 $\pm$ 0.010
14	<i>trans</i> -Isopulegona	1185	1175	1586	-	MO	0.046 $\pm$ 0.0038
15	<i>trans</i> -Pinocanfona	1188	1162	1561	1507	MO	0.23 $\pm$ 0.011
16	Terpinen-4-ol	1190	1177	-	-	MO	0.103 $\pm$ 0.0058
17	Isomentol	1200	1182	1674	-	MO	0.160 $\pm$ 0.0050
18	$\alpha$ -Terpineol	1204	1207	1704	1688	MO	0.13 $\pm$ 0.017
19	Mirtenol	1206	1195	-	-	MO	0.028 $\pm$ 0.0032
20	<i>cis</i> -Pulegol	1225	1229	1734	-	MO	5.5 $\pm$ 0.74
21	<i>trans</i> -Pulegol	1237	1214	-	-	MO	0.03 $\pm$ 0.011

**Tabla 5,** Continuación.

22	Pulegona	1252	1237	1666	1662	MO	16 ± 1.1
23	<i>p</i> -Anisaldehído	1262	1250	-	-	MO	0.049 ± 0.0033
24	Acetato de isopulegilo	1273	1277	-	-	MO	0.027 ± 0.0162
25	Acetato de <i>neo</i> -isopulegilo	1277	1276	1601	-	MO	0.026 ± 0.0015
26	Acetato de <i>iso</i> -isopulegilo	1284	1285	1648	-	MO	0.0815 ± 0.00093
27	Acetato de <i>trans</i> -sabinilo	1288	1290	-	-	MO	0.0193 ± 0.00084
28	Acetato de mircenilo	1307	1261	-	-	MO	0.060 ± 0.0042
29	Acetato de mirtenilo	1330	1326	1698	1720	MO	0.107 ± 0.0045
30	Piperitenona	1350	1343	1935	1918	MO	0.45 ± 0.042
31	α-Copaeno	1388	1376	1505	1493	S	0.66 ± 0.069
32	<i>iso</i> -Cariofileno	1419	1408	-	-	S	0.13 ± 0.029
33	α-Gurjuneno	1421	1409	1545	1529	S	0.023 ± 0.0011
34	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1439	1419	1618	-	S	6.5 ± 0.66
35	β-Copaeno	1445	1432	-	-	S	0.037 ± 0.0042
36	Sesquiterpeno, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> (N.I.)	1459	-	-	-	S	0.018 ± 0.0041
37	α-Guaieno	1463	1439	-	-	S	0.020 ± 0.0027
38	α-Humuleno	1472	1454	1684	1663	S	0.31 ± 0.028
39	β-9- <i>epi</i> -Cariofileno	1479	1466	1667	-	S	4.4 ± 0.42
40	<i>allo</i> -Aromadendreno	1485	1495	-	-	S	0.027 ± 0.0037
41	γ-Muuroleno	1487	1479	-	-	S	0.030 ± 0.0038
42	Germacreno D	1497	1485	1721	1712	S	1.9 ± 0.15
43	α-Farnenseno	1506	1505	-	-	S	0.03 ± 0.019
44	Biciclogermacreno	1512	1500	1745	1744	S	1.8 ± 0.13
45	γ-Cadineno	1526	1513	-	-	S	0.015 ± 0.0025
46	δ-Cadineno	1530	1523	1765	1761	S	1.2 ± 0.11

**Tabla 5,** Continuación.

47	$\alpha$ -Calacoreno	1555	1545	-	-	S	0.008 $\pm$ 0.0055
48	<i>trans</i> -Nerolidol	1565	1563	2043	2044	SO	0.12 $\pm$ 0.013
49	$\beta$ -Calacoreno	1576	1565	-	-	S	0.0251 $\pm$ 0.00070
50	Espatulenol	1594	1578	2133	2153	SO	0.29 $\pm$ 0.018
51	Óxido de cariofileno	1602	1583	1996	2000	SO	0.53 $\pm$ 0.039
52	Muurola-4,10(14)-dien-1- $\beta$ -ol	1640	1631	-	-	SO	0.026 $\pm$ 0.0065
53	$\tau$ -Muurolol	1656	1642	2195	-	SO	0.030 $\pm$ 0.0064
54	$\beta$ -Bourboneno	1397	1388	1533	1526	S	0.020 $\pm$ 0.0010
55	Copaen-15-ol	1665	1661	2313	-	SO	0.023 $\pm$ 0.0072
56	$\alpha$ -Cadinol	1671	1654	2243	2224	SO	0.05 $\pm$ 0.013
57	<i>trans</i> -Calamemen-10-ol	1679	1669	-	-	SO	0.05 $\pm$ 0.010
58	<i>cis</i> -14-Hidroxi-cariofileno	1688	1667	2350	-	SO	0.10 $\pm$ 0.033
59	<i>trans</i> -Isovalencenol	1811	1793	-	-	SO	0.046 $\pm$ 0.0059
M:	Monoterpeno						3.1 $\pm$ 0.4
MO:	Monoterpeno oxigenado						74 $\pm$ 3.7
S:	Sesquiterpeno						17 $\pm$ 1.7
SO:	Sesquiterpeno oxigenado						1.3 $\pm$ 0.4
OC:	Otros compuestos oxigenados						0.061 $\pm$ 0.006

<sup>a</sup>: Número de pico en la **Figura 29 (A)**.

<sup>b</sup>: Índices de retención lineales experimentales obtenidos en las columnas DB-5MS y DB-WAX, y reportados en la literatura.

<sup>c</sup>: Promedio de tres extracciones independientes, %  $\pm$   $\sigma$ , n=3,  $\sigma$ =desviación estándar.

<sup>d.e.f.g</sup>Lit: Índices de retención lineales reportados en la literatura y bases de datos (Adams, NIST, Davis, Pherobase)

N.I. No identificado

**Tabla 6.** Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por MWHD, de *S. viminea* seca.

Nº Pico <sup>a</sup>	Compuesto	LRI <sup>b</sup>				Tipo	Cantidad relativa <sup>c</sup> , % ( $\pm$ s, n=3)
		Columna DB5-MS		Columna DB-WAX			
		Experimental.	Lit. [d]	Experimental.	Lit. [e, f, g]		
1	$\alpha$ -Pinenol	937	939	1023	1036	M	0.15 $\pm$ 0.024
2	Sabinol	976	975	1123	1130	M	0.12 $\pm$ 0.015
3	$\beta$ -Pinenol	982	979	1110	1124	M	0.26 $\pm$ 0.038
4	Limonol	1033	1029	1201	1206	M	0.36 $\pm$ 0.032
5	$\beta$ -Felandrol	1036	1029	1211	1216	M	0.086 $\pm$ 0.0044
6	<i>p</i> -Menta-3,8-dieno	1076	1072	1270	-	M	3.1 $\pm$ 0.25
7	<i>p</i> -Menta-2,4(8)-dieno	1091	1088	1293	-	M	0.47 $\pm$ 0.040
8	Linalol	1100	1096	1548	1555	MO	0.16 $\pm$ 0.018
9	<i>p</i> -Menta-3-en-8-ol	1164	1150	1622	-	MO	58 $\pm$ 1.1
10	<i>iso</i> -Isopulegol	1172	1159	1575	1574	MO	0.42 $\pm$ 0.014
11	<i>iso</i> -Mentona	1176	1162	-	-	MO	0.106 $\pm$ 0.0039
12	<i>neoiso</i> -Isopulegol	1181	1171	1640	-	MO	0.31 $\pm$ 0.018
13	<i>trans</i> -Isopulegona	1185	1175	1595	-	MO	0.267 $\pm$ 0.0027
14	<i>trans</i> -Pinocamfona	1188	1162	1561	1507	MO	0.12 $\pm$ 0.016
15	Terpinen-4-ol	1190	1177	-	-	MO	0.18 $\pm$ 0.016
16	$\alpha$ -Terpineol	1204	1188	1704	1688	MO	0.14 $\pm$ 0.022
17	Pulegona	1251	1237	1666	1662	MO	11.1 $\pm$ 0.66
18	Acetato de isopulegilo	1284	1277	-	-	MO	0.080 $\pm$ 0.0043
19	Acetato de <i>trans</i> -sabinilo	1291	1290	-	-	MO	0.096 $\pm$ 0.0034
20	Monoterpeno, C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O (N.I.)	1294	-	-	-	MO	0.109 $\pm$ 0.0070

**Tabla 6,** Continuación.

21	Acetato de mirtenilo	1330	1326	1698	1720	MO	0.107 ± 0.0026
22	Piperitenona	1350	1343	-	-	MO	0.320 ± 0.0027
23	α-Copaeno	1388	13.76	1505	1493	S	0.68 ± 0.037
24	β-Longipineno	1419	1400	-	-	S	0.15 ± 0.013
25	α-Gurjuneno	1421	1409	1545	1529	S	0.061 ± 0.0045
26	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1439	1419	1618	-	S	6.5 ± 0.36
27	β-Copaeno	1445	1432	-	-	S	0.045 ± 0.0016
28	α-Humuleno	1472	1454	1684	1672	S	0.30 ± 0.010
29	β-9- <i>epi</i> -Cariofileno	1479	1466	-	-	S	4.8 ± 0.20
30	γ-Amorfeno	1491	1495	-	-	S	0.04 ± 0.015
31	Germacreno D	1497	1485	1721	1712	S	1.67 ± 0.067
32	α-Farnenseno	1506	1505	1747	1735	S	0.12 ± 0.038
33	Biciclogermacreno	1512	1500	1745	1744	S	1.62 ± 0.077
34	δ-Cadineno	1530	1523	1764	1761	S	1.15 ± 0.051
35	β-Calacoreno	1576	1565	-	-	S	0.08 ± 0.016
36	Espatuleno	1594	1578	-	-	SO	0.047 ± 0.0058
37	Óxido de cariofileno	1601	1583	-	-	SO	0.38 ± 0.047
38	Muurolo-4,10(14)-dien-1-β-ol	1640	1631	-	-	SO	0.06 ± 0.013
39	Cubenol	1643	1646	-	-	SO	0.033 ± 0.0066
40	τ-Muurolol	1658	1642	-	-	SO	0.14 ± 0.030
41	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol	1677	1686	-	-	SO	0.03 ± 0.017
42	<i>cis</i> -14-Hidroxi-cariofileno	1687	1667	-	-	SO	0.08 ± 0.014

M:	Monoterpeno	4.5 ± 0.4
MO:	Monoterpeno oxigenado	72 ± 1.9
S:	Sesquiterpeno	17 ± 1.0
SO:	Sesquiterpeno oxigenado	0.8 ± 0.13

<sup>a</sup>: Número de pico en la **Figura 29 (B)**.

<sup>b</sup>: Índices de retención lineales experimentales obtenidos en las columnas DB-5MS y DB-WAX, y reportados en la literatura.

<sup>c</sup>: Promedio de tres extracciones independientes, % ±  $\sigma$ , n=3,  $\sigma$ =desviación estándar.

<sup>d.e.f.g</sup>Lit: Índices de retención lineales reportados en la literatura y bases de datos (Adams, NIST, Davis, Pherobase)

N.I. No identificado

Tucker *et al.* (2000), reportaron 32 compuestos identificados en el aceite esencial de *Satureja viminea*, en base fresca, en donde muestran además, que el *p*-menta-3-en-8-ol, fue el componente principal con un 48% de abundancia relativa, seguido de la pulegona (14%),  $\beta$ -cariofileno (5%) y la *p*-menta-3,8-dieno (8%).

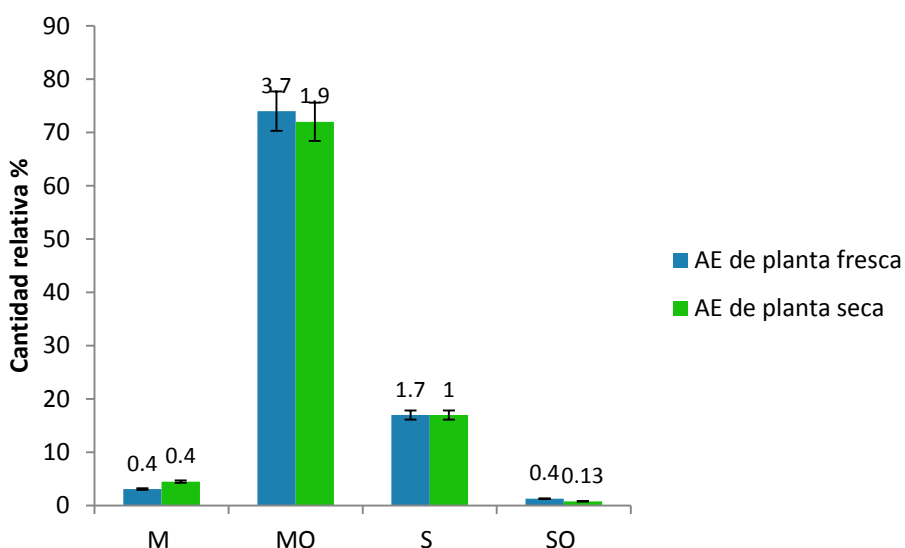
En la investigación realizada por Vila *et al.* (2000), se reportan 42 compuestos, de los cuales el componente mayoritario fue el *p*-menta-3-en-8-ol (40%), seguido de la pulegona (35%), y el *p*-menta-3, 8-dieno(5%).

Como se puede observar en la **Tabla 5**, los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *S. viminea* fresca, fueron los monoterpenos oxigenados *p*-menta-3-en-8-ol (51%) y pulegona (16%), representando el 67% del total del aceite, seguidos por los compuestos *trans*- $\beta$ -cariofileno (6.5%), *cis*-pulegol (5.5%), 9-*epi*- $\beta$ -cariofileno (4.4%), germacreno D (1.9%), *p*-menta-3,8-dieno (1.8%), biciclogermacreno (1.8%),  $\delta$ -cadineno (1.2%). En la **Tabla 6**, se muestra la composición del aceite esencial obtenido cuando la planta se secó a la sombra, en donde, los compuestos mayoritarios son los mismos monoterpenos oxigenados, a saber:*p*-menta-3-en-8-ol (58%) y pulegona(11.1%), representando el 69% del total del aceite, seguido de los compuestos *trans*- $\beta$ -cariofileno (6.5%),9-*epi*- $\beta$ -cariofileno (4.8%),*p*-menta-3,8-dieno (3.1%),germacreno D (1.67%),biciclogermacreno (1.62%) y  $\delta$ -cadineno (1.15%).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vila y col., (2000) quienes reportan cantidades de 40% y 35% para *p*-menta-3-en-8-ol y pulegona, respectivamente, en *S. viminea* cultivada en Costa Rica. Por otra parte, Tucker y col., (2000), obtuvieron, de la misma manera, como componente principal el *p*-menta-3-en-8-ol (48%), seguido de la pulegona (14%); los autores estudiaron la planta de origen costarricense, adquirida en un mercado de hierbas en Estados Unidos y luego cultivada en materas.

Como se puede observar en la **Figura 30**, el grupo de compuestos más importante en los aceites esenciales obtenidos de plantas frescas y secas fueron hidrocarburos monoterpénicos oxigenados, con contribuciones altas de *p*-menta-3-en-8-ol (51 y 58%), pulegona (16 y 11.1%), *cis*-pulegol (5.5%), respectivamente. Otro grupo importante fueron los hidrocarburos sesquiterpénicos, representados, en su mayoría, por *trans*- $\beta$ -cariofileno (6.5% para ambos aceites),  $\beta$ -9-*epi*-cariofileno (4.4 y 4.8%) y germacreno D (1.9 y 1.8%).

**Figura 30.** Variación de las familias de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales obtenidos por MWHD de plantas de *S. viminea* frescas y secas.



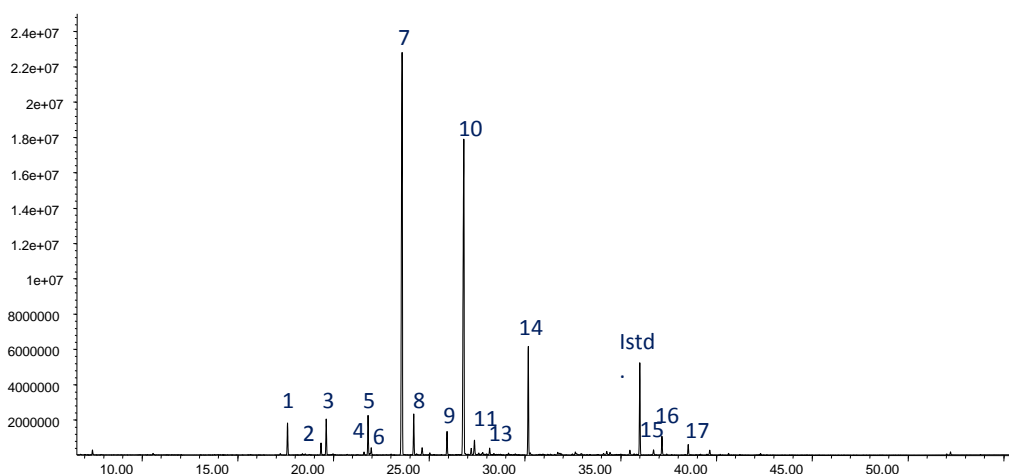
#### 4.3.2. Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *S. viminea*, aislados por SDE.

En la **Figura 31**, se presenta el perfil cromatográfico típico del extracto de *S. viminea*, obtenido por el método de SDE de las partes aéreas de la planta. La identificación de los compuestos presentes en el extracto se llevó a cabo utilizando los índices de retención lineales calculados en dos columnas, apolar (DB-5MD) y polar (DB-WAX). En la **Tabla 7**, se presenta la composición química del extracto de *S. viminea*, obtenido por SDE.

Dentro de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por SDE, el *p*-menta-3-en-8-ol y la pulegona aparecen en este extracto, pero no son los componentes mayoritarios; mediante esta técnica, el monoterpeno *p*-menta-3,8-dieno fue el compuesto mayoritario ( $44 \pm 1.2\%$ ); de 17 compuestos detectados ( $>0.1\%$ ), que representan el 90% de todos los compuestos en el extracto SDE.

En la **Tabla 7**, se pueden apreciar la cantidad relativa (%) de los compuestos que se encuentran en cantidades mayores de 0.1%. Se identificaron 17 compuestos, correspondientes al 90% del área cromatográfica total. Dentro de la totalidad de metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 6 principales, a saber: *p*-menta-3,8-dieno (44%), seguido del *p*-menta-3-en-8-ol (25%), la pulegona (8.2%), *p*-menta2,4(8)-dieno (4.4%), limoneno (2.9%) y  $\beta$ -pineno (2.4%), que corresponden al 86.9% del área cromatográfica total.

**Figura 31.** Perfil cromatográfico del extracto de *S. viminea*, obtenido por SDE. Columna DB-5MS (60m), Split 1:30, MSD (EI, 70 eV). En la **Tabla 7**, se reporta la identificación de los picos cromatográficos.



**Tabla 7.** Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por SDE, de la planta *S. viminea* seca.

Nº Pico <sup>a</sup>	Compuesto	LRI <sup>b</sup>				Tipo	Cantidad relativa <sup>c</sup> , % (± s, n=3)
		Columna DB5-MS		Columna DB-WAX			
		Experimental	Lit. [d]	Experimental	Lit. [e, f, g]		
1	α-Pineno	937	939	1023	1036	M	0.17 ± 0.045
2	Sabineno	976	975	1124	1130	M	0.62 ± 0.083
3	β-Pineno	982	979	1111	1124	M	2.4 ± 0.75
4	<i>p</i> -Cimeno	1028	1026	-	-	M	0.10 ± 0.041
5	Limoneno	1033	1029	1202	1206	M	2.9 ± 0.88
6	1,8-Cineol	1037	1031	1214	1228	MO	0.42 ± 0.056
7	<i>p</i> -Menta-3,8-dieno	1076	1072	-	-	MO	44 ± 1.2
8	<i>p</i> -Menta-2,4(8)-dieno	1090	1088	-	-	MO	4.4 ± 0.92
9	Terpinoleno	1101	1088	-	-	M	0.36 ± 0.056
10	<i>p</i> -Menta-3-en-8-ol	1157	1150	-	-	MO	25 ± 1.1
11	<i>iso</i> -Isopulegol	1166	1159	1577	-	MO	0.37 ± 0.072
12	<i>trans</i> -Isopulegona	1171	1175	-	-	MO	0.06 ± 0.031
13	<i>p</i> -Mentona	1182	-	-	-	MO	0.3 ± 0.21
14	Pulegona	1246	1237	1666	1662	MO	8.2 ± 0.34
15	α-Copaeno	1387	1376	1503	1493	S	0.18 ± 0.031
16	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1435	1419	-	-	S	0.57 ± 0.060
17	<i>allo</i> -Aromadendreno	1475	1460	-	-	S	0.009 ± 0.0084

**Tabla 7.** Continuación.

M:	Monoterpeno	$7 \pm 1.9$
MO:	Monoterpeno oxigenado	$83 \pm 3.9$
S:	Sesquiterpeno	$0.8 \pm 0.1$

<sup>a</sup>: Número de pico en la **Figura 31**

<sup>b</sup>: Índices de retención lineales experimentales obtenidos en las columnas DB-5MS y DB-WAX, y reportados en la literatura.

<sup>c</sup>: Promedio de tres extracciones independientes,  $\% \pm \sigma$ ,  $n=3$ ,  $\sigma$ =desviación estándar.

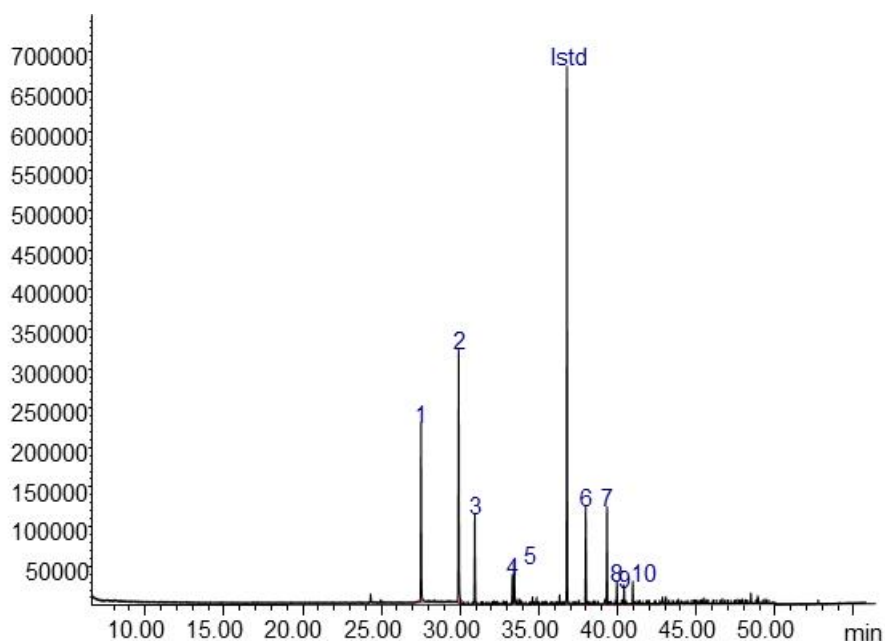
<sup>d.e.f.g</sup>Lit: Índices de retención lineales reportados en la literatura y bases de datos (Adams, NIST, Davis, Pherobase)

#### 4.3.3. Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *S. viminea*, aislados por SFE.

En la **Figura 32**, se presenta el perfil cromatográfico típico del extracto de *S. viminea*, obtenido por SFE. La identificación de los compuestos presentes en el extracto se llevó a cabo utilizando los índices de retención calculados en dos columnas, apolar (DB-5MD) y polar (DB-WAX). En la **Tabla 8**, se presenta la composición química del extracto de *S. viminea*, obtenido por SFE.

Para el extracto obtenido con fluido supercrítico se utilizó material vegetal seco, ya que el agua presente en la planta actúa como solvente, aumentando la polaridad del sistema, lo cual interfiere en este proceso extractivo. El rendimiento de esta extracción fue de  $0.08 \pm 0.012\%$  ( $n=3$ ), bajo las condiciones operativas empleadas (1100 psi, 40 °C); sin embargo, esta técnica fue poco reproducible, ya que es difícil controlar variables tales como la cantidad de CO<sub>2</sub> empleada, y la velocidad de despresurización, que afectan la cantidad de extracto obtenido.

**Figura 32.** Perfil cromatográfico del extracto de *S. viminea*, obtenido por SFE. Columna DB-5MS (60m); *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). En la [referencia.](#), se reporta la identificación de los picos cromatográficos.



**Tabla 8.** Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por SFE, de *S. viminea* seca.

Nº Pico <sup>a</sup>	Compuesto	LRI <sup>b</sup>				Tipo	Cantidad relativa <sup>c</sup> , % (± s, n=3)
		Columna DB5-MS		Columna DB-WAX			
		Experimental	Lit. <sup>[d]</sup>	Experimental	Lit. <sup>[e, f, g]</sup>		
1	<i>p</i> -Menta-3-en-8-ol	1151	1150	-	-	MO	21.3 ± 0.12
2	<i>cis</i> -Pulegol	1212	1229	-	-	MO	29.7 ± 0.18
3	Pulegona	1240	1237	1659	1662	MO	10.63 ± 0.042
4	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1429	1419	1610	1617	S	11.7 ± 0.17
5	<i>allo</i> -Aromadendreno	1470	1460	-	-	S	11.39 ± 0.091
6	Germacreno D	1489	1485	1720	1718	S	2.64 ± 0.015
7	Biciclogermacreno	1503	1500	1743	1744	S	2.18 ± 0.021
8	δ-Cadineno	1522	1523	1763	1761	S	2.36 ± 0.023
MO:	Monoterpeno oxigenado						61.6 ± 0.3
S:	Sesquiterpeno						30.3 ± 0.3

<sup>a</sup>: Número de pico en la **Figura 32**

<sup>b</sup>: Índices de retención lineales experimentales obtenidos en las columnas DB-5MS y DB-WAX, y reportados en la literatura.

<sup>c</sup>: Promedio de tres extracciones independientes, % ± σ, n=3, σ=desviación estándar.

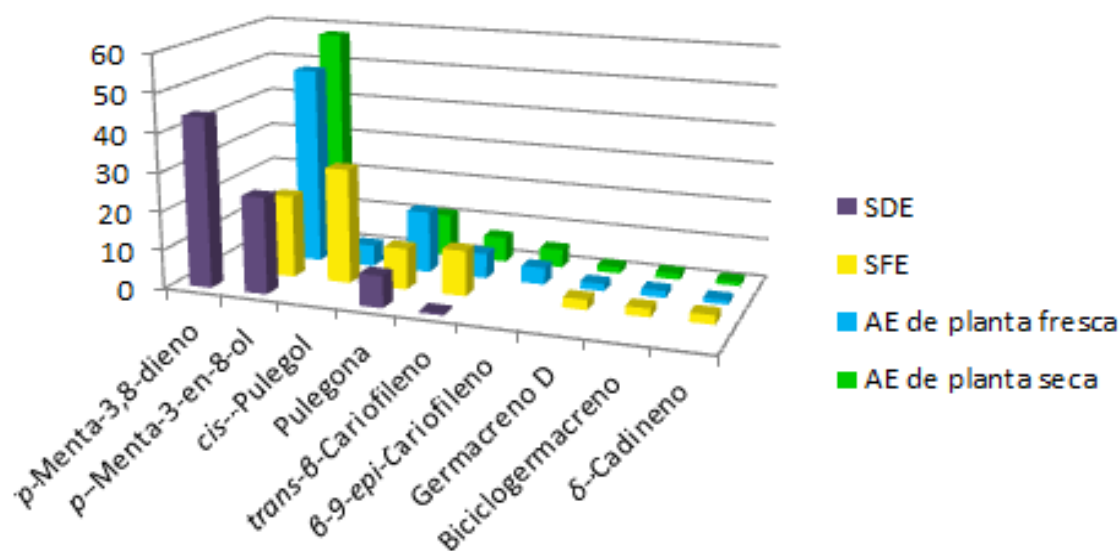
<sup>d,e,f,g</sup>Lit: Índices de retención lineales reportados en la literatura y en bases de datos (Adams, NIST, Davis, Pherobase)

Para la *S. viminea* cultivada en Bucaramanga (Santander, Colombia), la *p*-menta-3-en-8-ol, fue el componente mayoritario en el aceite y en el extracto, obtenido por las técnicas de MWHD y SFE, respectivamente, seguido de la pulegona, que también se encontró en alta proporción tanto en el AE, como en los extractos obtenidos por SDE y SFE.

Se encontró la *p*-menta3-en-8-ol en muy alta proporción (29–51%). Este metabolito es común en los AE y extractos aislados de *S. viminea* cultivada en Colombia, y coincide con los reportes en Costa Rica (Vila *et al.*, 2000), (Tucker *et al.*, 2000).

Otros compuestos principales detectados en el aceite y extractos obtenidos por tres técnicas de extracción fueron el *p*-menta-3,8-dieno, el *p*-menta-3-en-8-ol, el *cis*-pulegol, la pulegona, el *trans*- $\beta$ -cariofileno, el  $\beta$ -9-*epi*-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno y  $\delta$ -cadideno. A continuación, en la **Figura 33**, se pueden observar los componentes comunes aislados por las tres técnicas de extracción empleadas.

**Figura 33.** Composición porcentual de los principales compuestos detectados en los aceites esenciales y los extractos obtenidos de *S. viminea* por tres técnicas de extracción, MWHD, SDE y SFE.



#### 4.3.4. Identificación de la fracción volátil por *headspace* y SPME.

Los tallos y hojas de *Satureja viminea*, presentan un intenso olor a menta, muy agradable al olfato humano; debido a esta característica, se implementó el análisis *HS-SPME* con el fin de identificar los componentes más volátiles causantes del olor característico a menta de esta especie. La determinación se realizó para plantas frescas y secas.

La determinación de los compuestos volátiles de la planta se realizó usando una fibra de SPME, con recubrimiento polimérico de PDMS/DVB [poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno].

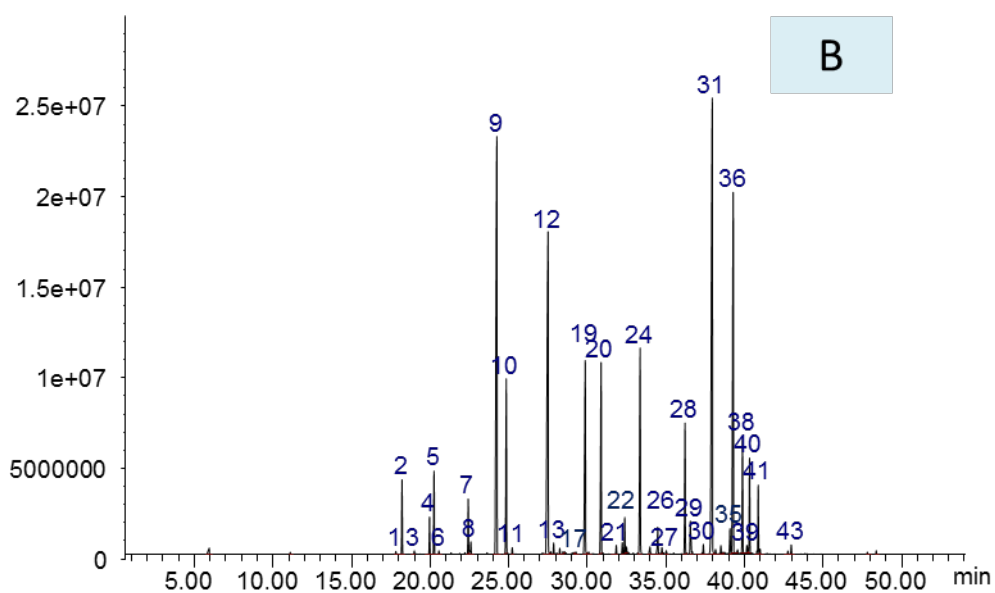
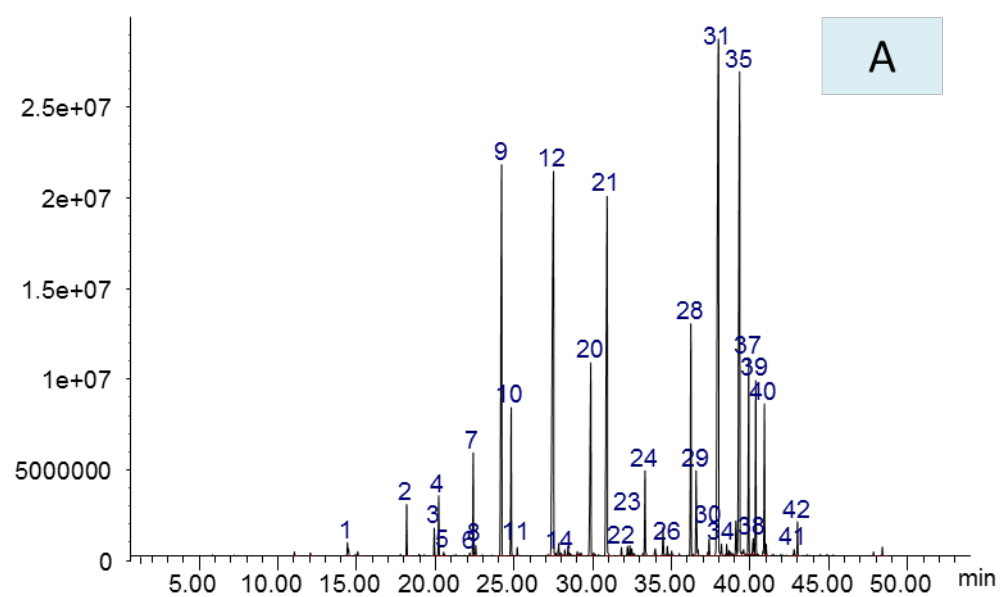
En la **Figura 34**, se presentan los perfiles cromatográficos, obtenidos en la columna apolar DB-5MS, de los componentes volátiles de hojas y tallos de *S. viminea*, aislados por HS-SPME, empleando la planta fresca y seca.

En las **Tablas 9** y **10**, se reportan los componentes mayoritarios aislados e identificados, según su orden de elución en esta columna, con sus respectivos índices de retención lineales y cantidades relativas. Como se puede observar en la **Figura 34**, se pudieron identificar positivamente 42 compuestos para la planta fresca, y 43 compuestos para la planta seca.

Como se puede observar en las **Tablas 9** y **10**, se detectaron e identificaron 42 y 43 compuestos, respectivamente; en ambos casos, la fracción correspondiente a sesquiterpenos fue la mayoritaria (48.84 y 41.6%) con el *trans*- $\beta$ -cariofileno como compuesto común (18%). Los compuestos en concentraciones >1% fueron comunes tanto para la planta fresca como seca, excepto el  $\alpha$ -pineno (1.6%) y el  $\delta$ -cadineno (1.5%) que estuvieron presentes solo en la fracción volátil proveniente de la planta seca. Después del compuesto mayoritario los siguientes en abundancia fueron: *p*-menta-3-en-8-ol (14.6%), 9-*epi*- $\beta$ -cariofileno (13.5%), pulegona (10.6%), *p*-menta-3-eno (9.8 %), *cis*-pulegol (4.9%),  $\alpha$ -copaeno (4.3%), germacrene D (3.4%), biciclogermacreno

(2.9%), *p*-menta-2,4(8)-dieno (2.5%),  $\delta$ -cadineno (2.5%),  $\beta$  bourboneno (1.8%), limoneno (1.6%), y dihidrocarveol (1.5%).

**Figura 34.** Perfiles cromatográficos típicos de los componentes aislados por HS-SPME, de la planta fresca (**A**) y seca (**B**), obtenido de los tallos y hojas de *S. viminea*. Columna DB-5MS (60m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). En las **Tablas 9** y **10**, se reporta la identificación de los picos cromatográficos.



**Tabla 9.** Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por HS-SPME, de hojas y tallos frescos de *S. viminea*.

Nº Pico <sup>a</sup>	Compuesto	LRI <sup>b</sup>				Tipo	Cantidad relativa <sup>c</sup> , % (± s, n=3)
		Columna DB5-MS		Columna DB-WAX			
		Experimental	Lit. [d]	Experimental	Lit. [e, f, g]		
1	<i>cis</i> -3-Hexenol	851	857	-	-	OC	0.08 ± 0.042
2	α-Pineno	935	939	1022	1034	M	0.79 ± 0.039
3	Sabineno	975	975	1120	1130	M	0.4 ± 0.36
4	β-Pineno	981	979	1107	1113	M	0.93 ± 0.065
5	β-Mirceno	988	990	1160	1166	M	0.11 ± 0.023
6	<i>o</i> -Cimeno	1027	1026	-	-	M	0.05 ± 0.035
7	Limoneno	1032	1029	1197	1210	M	1.6 ± 0.14
8	1,8-Cineol	1036	1031	1212	1224	M	0.21 ± 0.040
9	<i>p</i> -Menta-3-eno	1075	-	-	-	M	9.8 ± 0.72
10	<i>p</i> -Menta-2,4(8)-dieno	1090	1088	1291	-	M	2.5 ± 0.17
11	Linalol	1099	1096	1542	1555	MO	0.2 ± 0.09
12	<i>p</i> -Menta-3-en-8-ol	1158	1150	1619	-	MO	14.6 ± 0.25
13	<i>iso</i> -Isopulegol	1167	1159	1580	-	MO	0.28 ± 0.040
14	Mentofurano	1170	1164	-	-	MO	0.10 ± 0.040
15	Isopulegol	1177	1149	1573	1574	MO	0.11 ± 0.051
16	<i>p</i> -Mentona	1182	1154	-	-	MO	0.2 ± 0.12
17	<i>trans</i> -Pinocanfona	1185	1162	1560	-	MO	0.06 ± 0.032

**Tabla 9,** Continuación.

18	$\alpha$ -Terpineol	1201	1188	-	-	MO	$0.05 \pm 0.033$
19	Mirtenal	1203	1195	1645	-	MO	$0.08 \pm 0.023$
20	<i>cis</i> -Pulegol	1219	1229	1738	-	MO	$4.9 \pm 0.26$
21	Pulegona	1247	1237	1667	1662	MO	$10.6 \pm 0.20$
22	Acetato de <i>neo</i> -isopulegilo	1272	1276	1599	-	MO	$0.15 \pm 0.056$
23	Acetato de isopulegilo	1282	1277	1585	1585	MO	$0.17 \pm 0.055$
24	Dihidrocarveol	1311	1307	-	-	MO	$1.54 \pm 0.040$
25	Acetato de mirtenilo	1328	1326	1698	1720	MO	$0.22 \pm 0.055$
26	Piperitenona	1349	1343	1945	1918	S	$0.18 \pm 0.014$
27	$\alpha$ -Cubebeno	1356	1351	-	-	S	$0.10 \pm 0.033$
28	$\alpha$ -Copaeno	1388	1376	1505	1551	S	$4.3 \pm 0.27$
29	$\beta$ -Bourboneno	1396	1388	1533	1586	S	$1.8 \pm 0.26$
30	$\alpha$ -Gurjuneno	1421	1409	1544	-	S	$0.39 \pm 0.011$
31	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1438	1419	1618	-	S	$18 \pm 0.8$
32	$\beta$ -Copaeno	1444	1432	1591	1626	S	$0.25 \pm 0.057$
33	Aromadendreno	1454	1441	1631	1650	S	$0.19 \pm 0.023$
34	$\beta$ -9- <i>epi</i> -Cariofileno	1462	1466	-	-	S	$13.5 \pm 0.34$
35	$\alpha$ -Humuleno	1471	1454	1688	1719	S	$0.71 \pm 0.031$
36	$\gamma$ -Muuroleno	1486	1479	-	-	S	$0.20 \pm 0.013$
37	Germacrene D	1495	1485	1729	-	S	$3.4 \pm 0.23$
38	$\alpha$ -Farneseno + Viridiflorene	1505	1496	1712	1697	S	$0.41 \pm 0.052$
39	Biciclogermacrene	1510	1500	1754	-	S	$2.91 \pm 0.020$
40	$\delta$ -Cadineno	1529	1523	1771	1784	S	$2.5 \pm 0.48$
41	Espatuleno	1592	1578	2141	-	SO	$0.14 \pm 0.023$
42	Óxido de cariofileno	1600	1583	2010	-	SO	$0.55 \pm 0.031$

**Tabla 9**, Continuación.

M:	Monoterpeno	16 ± 1.6
MO:	Monoterpeno oxigenado	33 ± 1.7
S:	Sesquiterpeno	49 ± 2.6
SO:	Sesquiterpeno oxigenado	0.69 ± 0.05
OC:	Otros compuestos oxigenados	0.08 ± 0.04

<sup>a</sup>: Número de pico en la **Figura 34 (A)**.

<sup>b</sup>: Índices de retención lineales experimentales obtenidos en las columnas DB-5MS y DB-WAX, y reportados en la literatura.

<sup>c</sup>: Promedio de tres extracciones independientes, % ± $\sigma$ , n=3,  $\sigma$ =desviación estándar.

<sup>d.e.f.g</sup>Lit: Índices de retención lineales reportados en la literatura y bases de datos (Adams, NIST, Davis, Pherobase)

N.I. No identificado.

**Tabla 10.** Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por HS-SPME, de hojas y tallos secos de *S. viminea*.

Nº Pico <sup>a</sup>	Compuesto	LRI <sup>b</sup>				Tipo	Cantidad relativa <sup>c</sup> , % (± s, n=3)
		Columna DB5-MS		Columna DB-WAX			
		Experimental	Lit. [d]	Experimental	Lit. [e, f, g]		
1	α-Tujeno	927	930	-	-	M	0.06 ± 0.021
2	α-Pineno	936	939	1022	1034	M	1.6 ± 0.03
3	Camfeno	954	954	-	-	M	0.08 ± 0.021
4	Sabineno	975	975	1127	1130	M	0.79 ± 0.042
5	β-Pineno	982	979	1115	1113	M	1.81 ± 0.054
6	β-Mirceno	989	990	1164	1168	M	0.09 ± 0.011
7	Limoneno	1032	1029	1200	1210	M	1.2 ± 0.32
8	1,8-Cineol	1036	1031	1214	1224	M	0.34 ± 0.022
9	<i>p</i> -Menta-3-eno	1076	-	-	-	M	15.8 ± 1.42
10	<i>p</i> -Menta-2,4(8)-dieno	1090	1088	1291	-	M	4.1 ± 0.64
11	Linalol	1099	1096	1542	1555	MO	0.15 ± 0.026
12	<i>p</i> -Menta-3-en-8-ol	1157	1150	1613	-	MO	13.7 ± 1.23
13	<i>iso</i> -Isopulegol	1167	1159	1572	-	MO	0.3 ± 0.02
14	Isopulegol	1177	1149	-	-	MO	0.13 ± 0.043
15	<i>p</i> -Mentona	1182	1154	-	-	MO	0.06 ± 0.013
16	<i>trans</i> -Pinocanfona	1185	1162	1560	-	MO	0.057 ± 0.011
17	α-Terpineol	1201	1188	-	-	MO	0.05 ± 0.010
18	Mirtenal	1203	1195	1644	1619	MO	0.08 ± 0.019

**Tabla 10,** Continuación.

19	<i>cis</i> -Pulegol	1219	1229	1734	-	MO	6 ± 1.1
20	Pulegona	1246	1237	1664	1662	MO	5.1 ± 0.94
21	Acetato de <i>neo</i> -isopulegilo	1272	1276	-	-	MO	0.22 ± 0.031
22	Acetato de isopulegilo	1282	1277	1582	1585	MO	0.3 ± 0.11
23	Acetato de sabinilo	1289	1290	-	-	MO	0.2 ± 0.03
24	Dihidrocarveol	1312	1307	-	-	MO	5.7 ± 0.09
25	Acetato de mirtenilo	1328	1326	1697	1720	MO	0.28 ± 0.021
26	Piperitenona	1348	1343	1944	1918	S	0.17 ± 0.012
27	α-Cubebeno	1355	1348	1464	-	S	0.11 ± 0.023
28	α-Copaeno	1387	1376	1502	1493	S	3.1 ± 0.56
29	β-Bourboneno	1396	1388	1530	1586	S	1.13 ± 0.045
30	α-Gurjuneno	1420	1409	-	-	S	0.27 ± 0.034
31	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1437	1419	-	-	S	18 ± 1.7
32	β-Copaeno	1443	1432	1546	-	S	0.18 ± 0.027
33	Aromadendreno	1453	1441	1623	1650	S	0.2 ± 0.03
34	α-Humuleno	1458	1454	1686	1684	S	0.05 ± 0.021
35	γ-Muuroleno	1471	1479	1701	-	S	0.63 ± 0.043
36	β-9- <i>epi</i> -Cariofileno	1477	1466	-	-	S	10.9 ± 1.15
37	γ-Cadineno	1485	1513	-	-	S	0.16 ± 0.010
38	Germacreno D	1494	1485	1725	-	S	2.7 ± 0.24
39	γ-Gurjuneno	1503	1477	-	-	S	0.3 ± 0.02
40	Biciclogermacreno	1509	1500	1750	-	S	2.2 ± 0.15
41	δ-Cadineno	1528	1523	1769	1784	S	1.5 ± 0.02
42	Espatuleno	1592	1578	-	-	SO	0.09 ± 0.010
43	Óxido de cariofileno	1599	1583	2010	-	SO	0.2 ± 0.03

**Tabla 10**, Continuación.

M:	Monoterpeno	26 ± 2.0
MO:	Monoterpeno oxigenado	32 ± 3.7
S:	Sesquiterpeno	42 ± 4.1
SO:	Sesquiterpeno oxigenado	0.29 ± 0.04

<sup>a</sup>: Número de pico en la **Figura 34 (B)**.

<sup>b</sup>: Índices de retención lineales experimentales obtenidos en las columnas DB-5MS y DB-WAX, y reportados en la literatura.

<sup>c</sup>: Promedio de tres extracciones independientes, % ± $\sigma$ , n=3,  $\sigma$ =desviación estándar.

<sup>d.e.f.g</sup>Lit: Índices de retención lineales reportados en la literatura y en bases de datos (Adams, NIST, Davis, Pherobase)

N.I. No identificado.

A partir de los datos obtenidos, se puede concluir, que los compuestos principales de la planta *S. viminea*, se encuentran, en cada uno de los tipos de extracción utilizados. A continuación, en la **Tabla 11**, se muestran los compuestos principales obtenidos en cada técnica.

**Tabla 11.** Compuestos principales de la planta *S. viminea*, obtenidos por diferentes técnicas de extracción.

Compuestos principales	Cantidad relativa %					
	MWHD		SDE	SFE	HS-SPME	
	Planta fresca	Planta seca			Planta fresca	Planta seca
<i>p</i> -Menta-3,8-dieno	1.8±0.23	3.1±0.25	44±1.2	-	-	-
<i>p</i> -Menta-3-en-8-ol	51±1.6	58±1.1	25±1.1	21.3±0.12	14.6±0.25	13.7±1.23
<i>cis</i> -Pulegol	5.5±0.74	-	-	29.7± 0.18	4.9±0.26	6±1.1
Pulegona	16±1.1	11.1± 0.66	8.2±0.34	10.63±0.042	10.6±0.20	5.1±0.94
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	6.5±0.66	6.5±0.36	0.57±0.060	11.7±0.17	18±0.8	18±1.7
$\beta$ -9- <i>epi</i> -Cariofileno	4.4±0.42	4.8±0.20	-	-	13.5±0.34	10.9±1.15
Germacreno D	1.9±0.15	1.67±0.067	-	2.64±0.015	3.4±0.23	2.7±0.24
Biciclogermacreno	1.8±0.13	1.62±0.077	-	2.18±0.021	2.91±0.020	2.2±0.15
$\delta$ -Cadineno	1.2±0.11	1.15±0.051	-	2.36±0.023	2.5±0.48	1.5±0.02

Así mismo, se realizó la comparación entre familias de compuestos aislados según la técnica de extracción empleada; cómo se puede observar en la **Tabla 12**. La técnica de *headspace* (HS-SPME) extrae, preferencialmente, los compuestos volátiles (hidrocarburos monoterpénicos), mientras la SFE extrae compuestos menos volátiles (hidrocarburos sesquiterpénicos).

**Tabla 12.** Familias de compuestos de la planta *S. viminea*, obtenidos por diferentes técnicas de extracción.

Familias de compuestos	Cantidad relativa %					
	MWHD		SDE	SFE	HS-SPME	
	Planta fresca	Planta seca			Planta fresca	Planta seca
Hidrocarburos monoterpénicos	3.1± 0.4	4.5± 0.4	7± 1.9		16± 1.6	26± 2.0
Monoterpenos oxigenados	74± 3.7	72± 1.9	83± 3.9	61.6±0.3	33± 1.7	32± 3.7
Hidrocarburos sesquiterpénicos	17± 1.7	17± 1.0	0.8±0.1	30.3± .3	49± 2.6	42± 4.1
Sesquiterpenos oxigenados	1.3± 0.4	0.8±0.13			0.69±0.05	0.29±0.04

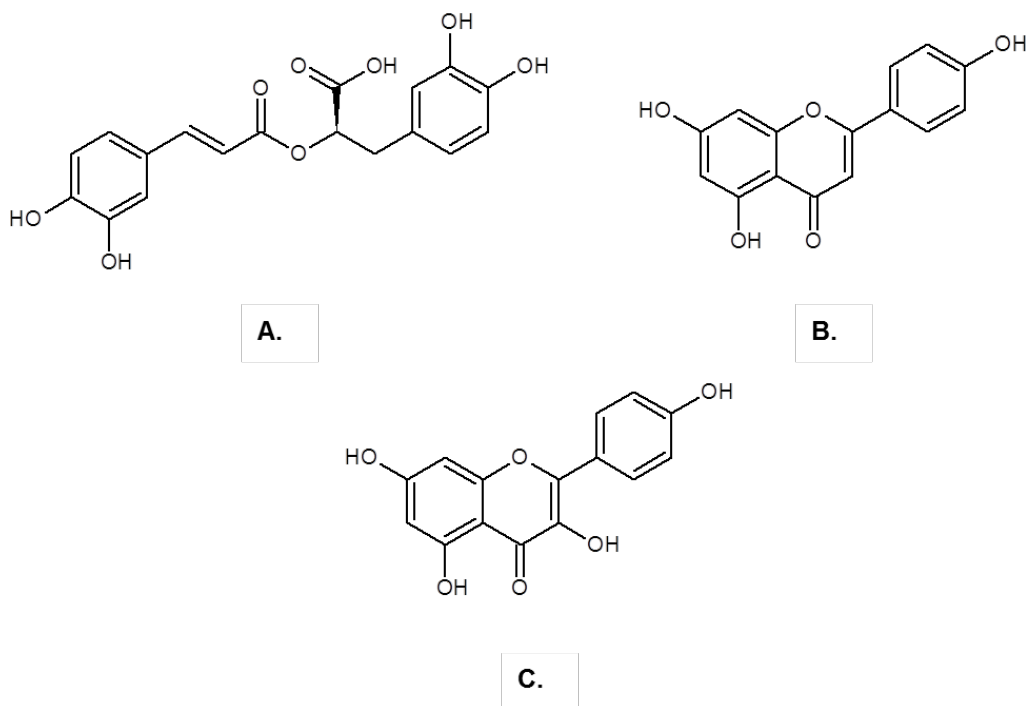
#### 4.3.5. Identificación de flavonoides aislados por extracción con solvente.

Aplicando las metodologías desarrolladas para la obtención y análisis de los extractos mediante HPLC (Cala, 2011) (**Sección3.4.3**), se identificaron los compuestos fenólicos presentes en la planta de *Satureja viminea*.

Se utilizó una mezcla de sustancias de referencia certificadas de 24 analitos, en el extracto metanólico se identificó un solo compuesto, el ácido rosmarínico, para el extracto isopropanólico se detectaron el ácido rosmarínico, naringenina y el kaempferol. Además se preparó un extracto adicional a partir del extracto isopropanólico, el cual se aciduló y se disolvió en metanol, en este extracto, se detectaron dos flavonoides, la naringenina y el kaempferol.

En la **Figura 35**, se muestran las estructuras de los tres flavonoides determinados por HPLC-DAD, en los extractos obtenidos con solvente.

**Figura 35.** Estructura de tres flavonoides identificados en los extractos de *Satureja viminea* obtenidos con solvente. **A.** Ácido rosmarínico; **B.** Naringenina; **C.** Kaempferol.

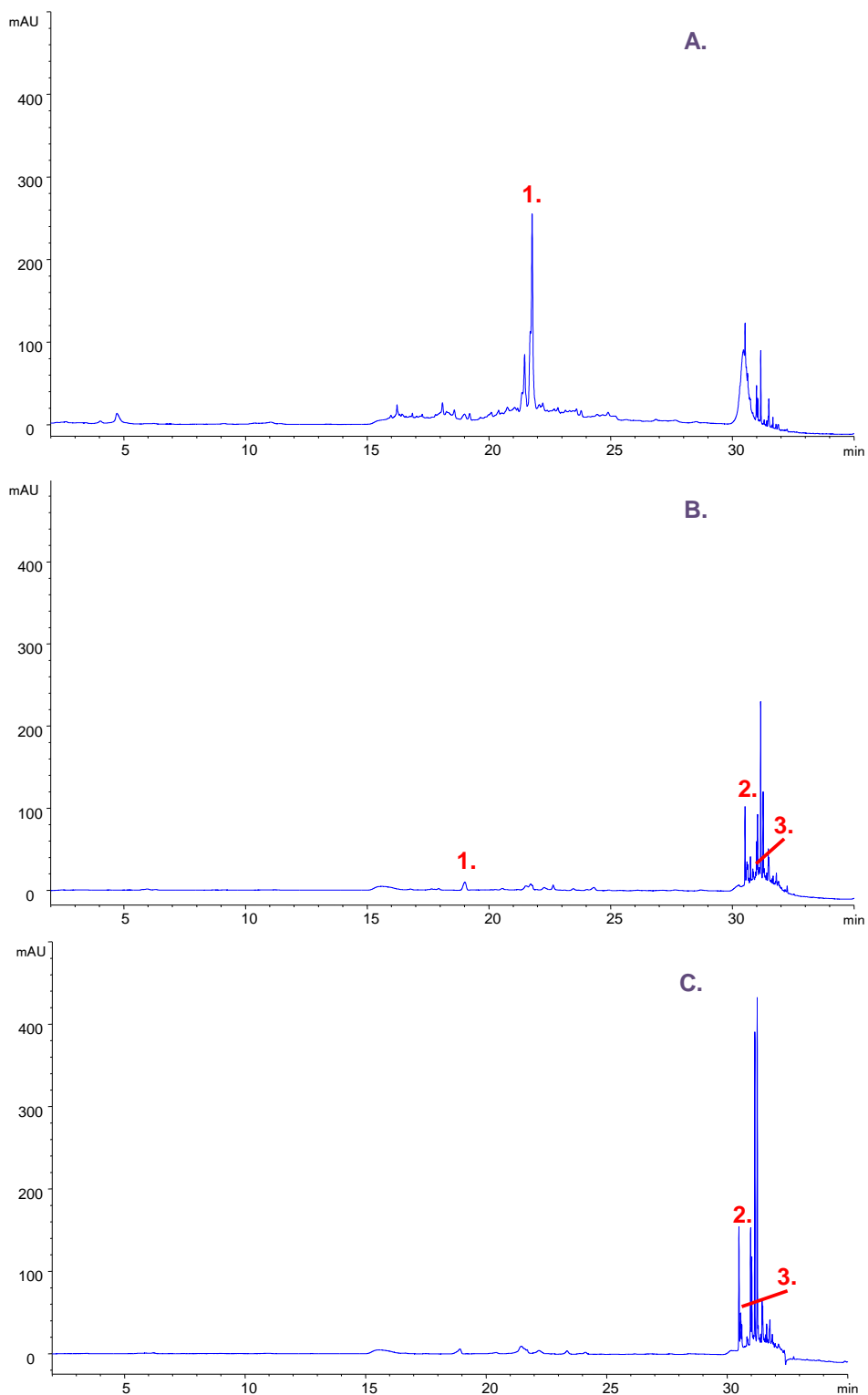


Lizarraga y Abdala (2004), identificaron en los extractos con solvente, de la especie *Satureja boliviana*, kaempferol y quercetina en forma de glucósidos. Otras especies de *Satureja*, como la *S. hortensis*, contienen ácido rosmarínico y carnosol, en su extracto metanólico (Yanishlieva *et al.*, 2006).

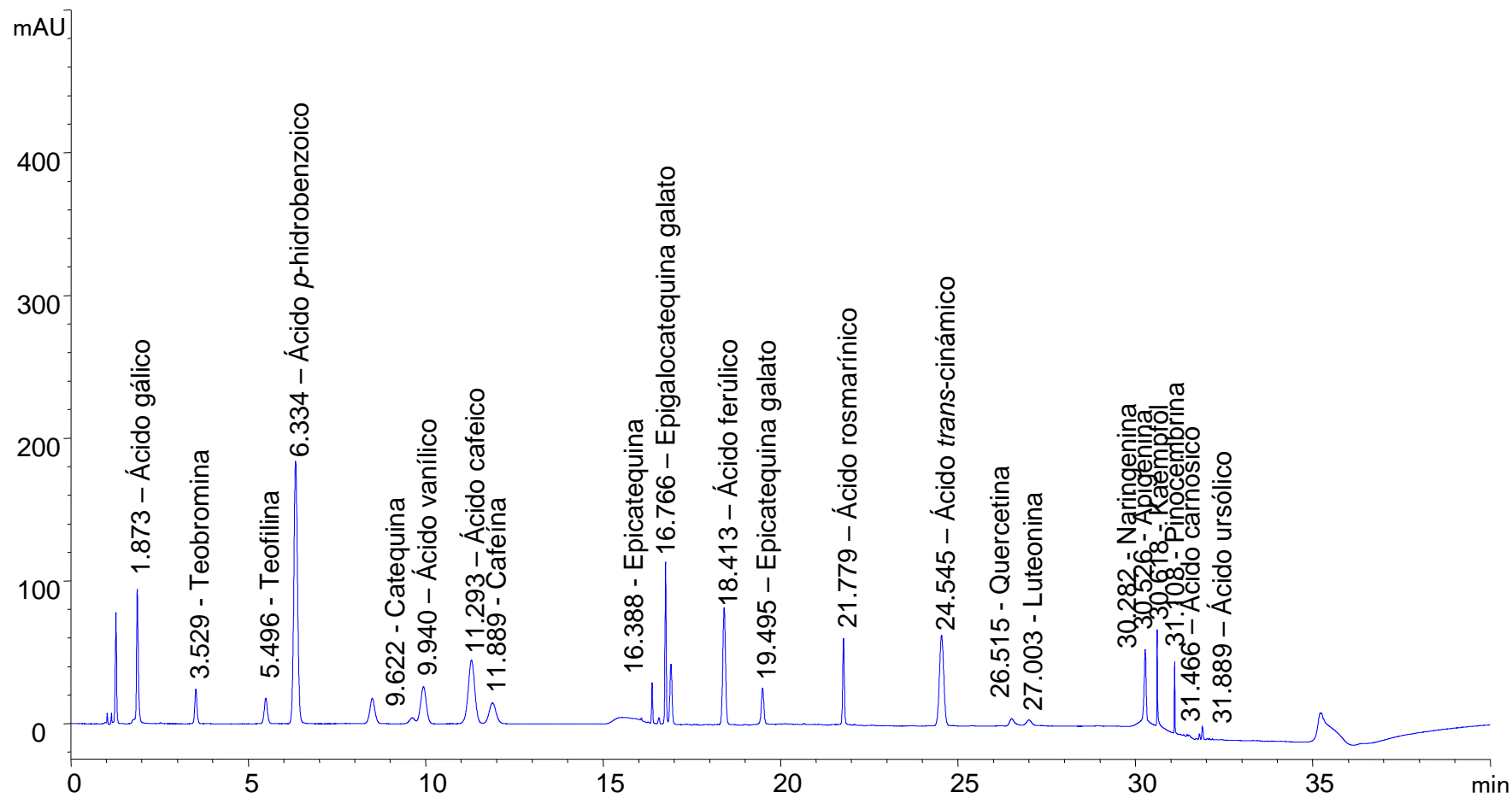
Sin embargo, para la especie, objeto de este estudio, no existen reportes de compuestos fenólicos. En la **Figura 36**, se observan los perfiles cromatográficos de cada uno de los extractos bajo estudio.

Además en la **Figura 37**, se muestra el cromatograma de sustancias patrón para la identificación de flavonoides en los extractos obtenidos con solvente para la planta *S. viminea*.

**Figura 36.** Perfil cromatográfico de extractos obtenidos con solventes de la especie *Satureja viminea*: **A.** Extracto metanólico, **B.** Extracto isopropanólico, **C.** Extracto isopropanólico-metanólico; obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar Kinetex C18 (4.6 mm x 100 mm, 2.5  $\mu$ m); **1.** Ácido rosmarínico, **2.** Naringenina, **3.** Kaempferol.



**Figura 37.** Perfil cromatográfico de sustancias patrón; obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar Kinetex C18 (4.6 mm x 100 mm, 2.5 µm).



#### 4.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS DE *S. viminea*.

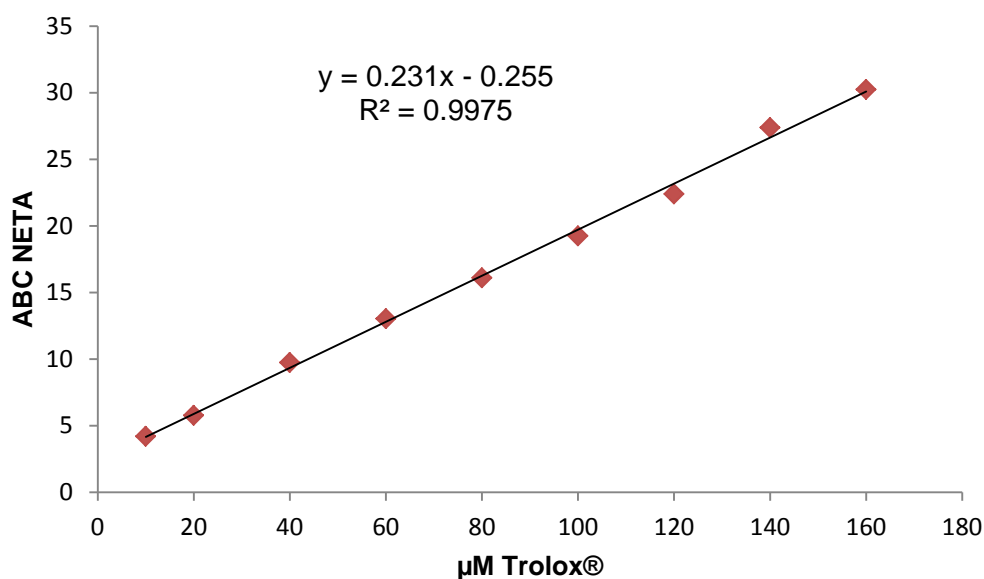
La capacidad antioxidante, expresada en  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g de sustancia, determinada por los métodos ORAC y ABTS, se midió para los AE y extractos obtenidos con solvente de la especie *S. viminea*, caracterizados previamente. Así mismo, se emplearon como compuestos antioxidantes de referencia el  $\alpha$ -tocoferol y BHT, ya que son usados ampliamente en plásticos, gomas, polímeros y alimentos como antioxidantes.

Esto se realiza para establecer, si los AE y extractos analizados tuvieron capacidades antirradicalarias mayores, menores o comparables con las de algunas sustancias de referencia.

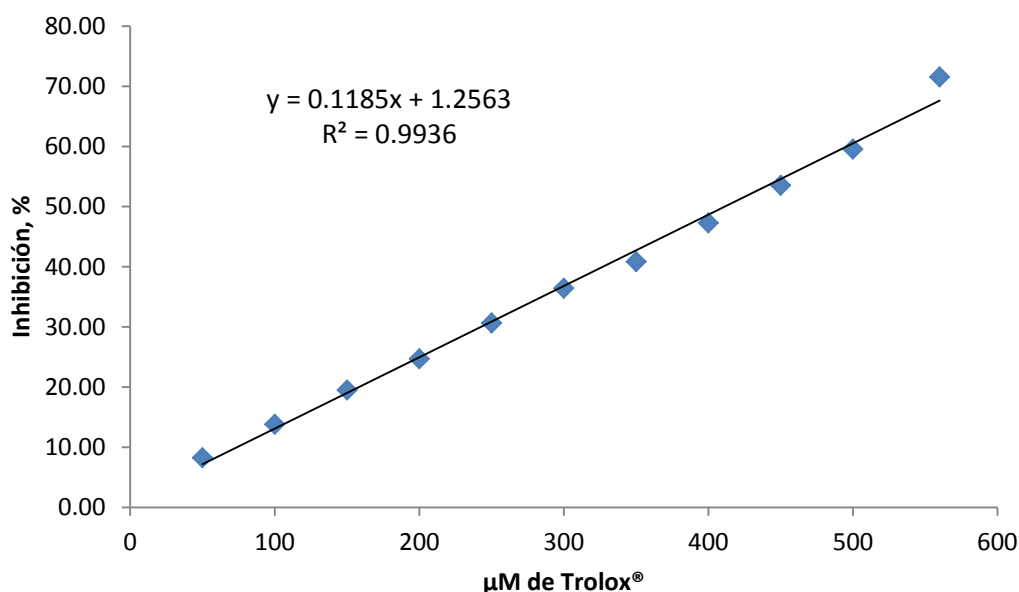
El ensayo ORAC, permite medir la degradación oxidativa de la fluoresceína, en presencia de un compuesto oxidante, luego de ser mezclado con el generador de radicales AAPH.

En las **Figuras 38** y **39**, se muestran las curvas de calibración del Trolox<sup>®</sup>, con base en las cuales se realizó la cuantificación.

**Figura 38.** Curva de calibración del Trolox <sup>®</sup> obtenida por el método ORAC.



**Figura 39.** Curva de calibración del Trolox® obtenida por el método ABTS<sup>+</sup>.



En la **Tabla 13** se presentan los resultados de TAC (*Total Antioxidant Capacity*), medida por el ensayo ORAC y el ensayo ABTS<sup>+</sup>, del AE, extractos metanólico e isopropanólico de la planta, junto con los antioxidantes de referencia BHT y  $\alpha$ -tocoferol, expresados en  $\mu\text{mol}$  de Trolox<sup>®</sup>/ g de antioxidante.

**Tabla 13.** Valores de TAC ( $\mu\text{mol}$  Trolox<sup>®</sup> /g sustancia), obtenidos por el método ORAC y ABTS<sup>+</sup>, para el AE obtenido de plantas frescas y extractos metanólico e isopropanólico de *S. viminea*.

Sustancia	Método de medición ( $\pm$ s, n=3)	
	ORAC	ABTS <sup>+</sup> ,
	( $\mu\text{mol}$ Trolox <sup>®</sup> /g sustancia)	( $\mu\text{mol}$ Trolox <sup>®</sup> /g sustancia)
AE de plantas frescas	1060 $\pm$ 16	52 $\pm$ 1
Extracto metanólico	6400 $\pm$ 241	1603 $\pm$ 5
Extracto isopropanólico	1300 $\pm$ 88	250 $\pm$ 33
BHT	470 $\pm$ 13	420 $\pm$ 13
$\alpha$ -Tocoferol	500 $\pm$ 51	289 $\pm$ 4

Se observó, que el extracto metanólico de la planta, presenta mayor capacidad antirradicalaria, medida por el ensayo ORAC (mecanismo de transferencia de

átomo de hidrógeno, HAT), superior al del aceite esencial y el extracto isopropanólico. En comparación con las sustancias sintéticas de referencia evaluadas, BHT y  $\alpha$ -tocoferol, el aceite esencial y los extractos metanólico e isopropanólico presentaron la capacidad antioxidante más alta.

Sin embargo, es importante resaltar que la actividad antioxidante de algunas moléculas que no poseen enlaces X-H lo suficientemente débiles, no puede ser descrita a través de la donación de dicho átomo de H; algunos compuestos antioxidantes no fenólicos, tienen capacidad de formar radicales centrados en átomos de carbono (de preferencia terciarios), que se pueden estabilizar por resonancia, lo que aumenta de manera considerable su tiempo de vida media. (Gómez, 2012) Un ejemplo de esto, fue descrito por Foti e Ingold, (2003), y es la actividad antioxidante del  $\gamma$ -terpineno.

Según el modelo, el  $\gamma$ -terpineno se oxida a *p*-cimeno, a través de una reacción en cadena, en donde, el  $\text{HOO}^\bullet$  actúa como propagador. Cabe destacar la favorabilidad de la reacción de terminación cruzada entre  $\text{HOO}^\bullet$  y  $\text{ROO}^\bullet$ , en comparación a la reacción de terminación propia  $\text{ROO}^\bullet + \text{ROO}^\bullet$ .

Pocos compuestos fenólicos, presentes en los extractos, constituyen la principal causa de la capacidad baja de captura de radicales libres estimada por el ensayo de decoloración del radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$ , lo cual se confirma con los estudios realizados por Stashenko *et al.* (2008), en donde se compara la actividad frente al  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  de un aceite pobre en compuestos fenólicos y otro, rico en timol y carvacrol.

#### **4.5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE LOS AE Y EXTRACTOS EN UN SISTEMA LIPÍDICO**

En esta etapa, se evaluó la capacidad antirradicalaria de antioxidantes sintéticos y naturales en un sistema lipídico sometido a la radiación UVA, tal como se describe en el **Numeral 3.7.3**.

En el **Anexo A**, se muestran los perfiles cromatográficos de los derivados hidrazónicos de los compuestos carbonílicos, producto de la descomposición de los ácidos durante la peroxidación lipídica, inducida durante 12 h en el aceite de girasol. Los aldehídos reaccionaron con el agente derivatizante (PFPH), sobre la fibra SPME con posterior análisis por GC-EDC.

La presencia del ácido linoleico en el aceite de girasol se relaciona directamente con la concentración del hexanal generado durante la degradación oxidativa de este ácido graso. Al someter el aceite de girasol, en presencia del aceite esencial y los extractos, a la radiación UVA, utilizando la metodología descrita en la **Sección 3.7.3.3**, se observó que todas las muestras presentaron, en menor o mayor grado, un efecto protector, actuando como secuestradores de radicales libres y generando especies estables que protegieron la degradación de la matriz lipídica, o retardan la oxidación del ácido linoleico.

En la **Tabla 14**, se muestra el grado de protección de los AE, extractos y sustancias de referencia, además, la concentración del hexanal generado durante el proceso de oxidación de la muestra de aceite de girasol. La curva de calibración del hexanal se realizó en un intervalo de concentraciones de 1 hasta 200 ppm (Véase **Anexo B**). Con base en los resultados, se determinó la concentración del hexanal formado en cada una de las muestras.

**Tabla 14.** Porcentaje de protección de los AE, extractos, BHT y  $\alpha$ -tocoferol en el aceite de girasol.

<b>Sustancia</b>	<b>Grado de protección, %, (<math>\pm</math> s, n =3)</b>
AE , plantas frescas	19 $\pm$ 3
Extracto metanólico	3 $\pm$ 1
Extracto isopropanólico	49 $\pm$ 6
BHT	51 $\pm$ 3
$\alpha$ -Tocoferol	33 $\pm$ 4

En el presente trabajo, se utilizó como sistema lipídico modelo el aceite vegetal de girasol, por ser uno de los de mayor consumo doméstico, cuyo ácido graso principal es el ácido linoleico y, a su vez, el principal producto de degradación oxidativa es el hexanal (Stashenko *et al.*, 2002), lo cual hace que este sistema lipídico sea apto para el estudio de la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos.

La degradación oxidativa de este sistema se llevó a cabo irradiando el aceite de girasol con luz UV en un reactor diseñado y construido para tal fin. Lo que se observa en la **Tabla 14**, es que el aceite esencial de *S. viminea* a la concentración de 5g/kg inhibe en menor grado la oxidación de lípidos en comparación con las sustancias de referencia, el BHT y el  $\alpha$ -tocoferol; estos resultados concuerdan con los obtenidos para el aceite esencial de cilantro (*n*-decanol, decanal, (E)-2-decenal, undecanal y nonano, componentes mayoritarios) y el aceite esencial de romero (alcanfor, eucaliptol,  $\alpha$ -pineno, canfeno y  $\beta$ -pineno, componentes principales), que a la misma concentración presentaron valores inferiores a los de la vitamina E tomada como referencia, en contraste con el aceite esencial de orégano rico en timol y carvacrol, reconocidos por su actividad antioxidante (Tafurt *et al.*, 2005). En general, es conocido que la actividad antioxidante se relaciona con la composición química de los aceites esenciales.

Los resultados obtenidos muestran, que el uso del extracto isopropanólico de la especie *S. viminea*, presentó el mayor grado de protección (49%), similar al de la sustancia control BHT (51%).

El porcentaje de protección del aceite esencial y el extracto metanólico, no superó al de los dos antioxidantes sintéticos. En el caso del extracto metanólico, hay que tener en cuenta que su baja capacidad se puede deber a la diferencia de polaridad entre el extracto y la matriz lipídica, lo cual interfería en el proceso, debido a que los dos no eran miscibles. (Véase **Tabla 14**).

Al comparar el efecto protector del  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y el BHT, se observa que el BHT tiene mayor efecto protector en el aceite de girasol. En términos generales, el extracto metanólico presenta menor efecto protector en el sistema lipídico estudiado. El aceite esencial y el extracto isopropanólico, presentan un efecto protector similar (49%), al de los antioxidantes de referencia  $\alpha$ -tocoferol (33%) y BHT (51%).

#### 4.6. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. viminea*

La descripción de las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de *S. viminea* se llevó a cabo mediante los procedimientos descritos por las normas internacionales ISO; los resultados se presentan en la **Tabla 15**.

**Tabla 15.** Ficha técnica del aceite esencial de *Satureja viminea*.

Prueba	Valor ( $\sigma$ , n=3)
Aspecto	Líquido traslúcido ligeramente amarillo, olor a menta
Punto de congelación	Inferior a -20°C
Índice de refracción a 20°C	*1.481 $\pm$ 0.0006
Densidad a 20°C	0.9225
Rotación óptica	*+56.8 $\pm$ 0.91
Humedad	*1.217% $\pm$ 0.1060
Índice de acidez	6.0
Punto de inflamación	78°C
Solubilidad en etanol	Soluble en todos los volúmenes ensayados

\* Promedio de tres mediciones.

## 5. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo, se obtuvieron los aceites esenciales y extractos de *Satureja viminea*, por medio de diferentes técnicas de extracción, a saber: hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), destilación-extracción con solvente simultánea (SDE), extracción con fluido supercrítico (SFE), microextracción en fase sólida (HS-SPME) en fase gaseosa (*headspace*) y extracción con solventes (metanol e isopropanol).
2. Se encontró, que tanto los aceites esenciales como los extractos obtenidos por SDE y SFE de *S. viminea*, tuvieron como componentes mayoritarios, el *p*-menta-3-en-8-ol y la pulegona; mientras que en los extractos obtenidos con solventes, se encontraron compuestos de tipo flavonoide.
3. La composición de los metabolitos secundarios volátiles, obtenidos por las diferentes técnicas de extracción, de acuerdo con las principales familias de compuestos, presentó visibles diferencias. En la MWHD y SDE, predominaron compuestos volátiles más polares, como monoterpenos oxigenados (>70 y 80%, respectivamente); la SDE, por su parte, mostró una cantidad baja de hidrocarburos sesquiterpénicos y sus análogos oxigenados. En la SFE, se obtuvieron compuestos menos volátiles como monoterpenos oxigenados (>60%) y sesquiterpenos apolares (>30%), y por la técnica de *headspace* se encontró una mayor cantidad de compuestos volátiles, como lo son los hidrocarburos monoterpénicos, sus análogos oxigenados y algunos sesquiterpenos.
4. La composición química de los aceites obtenidos de la planta *S. viminea* fresca y seca fue similar, pero, el rendimiento del aceite, fue mayor para la planta seca ( $0.87 \pm 0.098\%$  y  $2.16 \pm 0.061\%$ , respectivamente), ya que,

se eliminó la interferencia causada por el contenido de agua en la planta (61%).

5. Se evaluó la composición química de los extractos obtenidos de *S. viminea* por SDE y SFE, y se encontró que ellos presentan composición similar al aceite esencial de la planta en estudio. Así mismo, se evaluó la composición volátil de la planta por medio de HS-SPME, donde se evidenció que la composición varía dependiendo del estado de la planta; los hidrocarburos monoterpénicos varían significativamente para la planta fresca y seca (16 y 26%, respectivamente), además, se encontró que los hidrocarburos sesquiterpénicos son los principales compuestos de la fracción volátil de la planta, tanto fresca como seca (49 y 42%, respectivamente). También se encontró que la cantidad de monoterpenos oxigenados no presentan una diferencia significativa para la planta fresca y seca ( $33 \pm 1.7$  y  $32 \pm 3.7\%$ , respectivamente).
6. Por medio de HPLC-DAD, se determinaron los compuestos flavonoides en los extractos obtenidos con solvente (metanol, isopropanol), a saber: ácido rosmarínico, naringenina y kaempferol, a los cuales, se les puede atribuir la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos.
7. Las diferencias entre los métodos de determinación de la actividad antioxidante utilizados, se deben a los mecanismos de reacción de cada ensayo, a la naturaleza del radical, al medio de reacción utilizado y a la cantidad de muestra empleada.
8. Los valores de capacidad antioxidante, obtenidos por el ensayo ORAC para el aceite esencial (1060  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia) y los extractos obtenidos con solvente, tanto el isopropanólico (1300  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia) y metanólico (6400  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia), fueron

mayores que los de los antioxidantes de referencia BHT (470  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia) y  $\alpha$ -tocoferol (500  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia).

9. Los valores de capacidad antioxidante, obtenidos por el ensayo ABTS<sup>+</sup>, para el extracto metanólico (1603  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia), fueron mayores que los de los antioxidantes de referencia, BHT (420  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia) y  $\alpha$ -tocoferol (289  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia), en este ensayo, el aceite esencial (52  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia) y el extracto isopropanólico (250  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia) mostraron la capacidad antioxidante más baja.
  
10. Se determinó el efecto protector del AE y extractos de la especie *S. viminea* y dos antioxidantes de referencia (BHT y  $\alpha$ -tocoferol), mediante el monitoreo del hexanal, producto secundario final, en el proceso de peroxidación lipídica del aceite de girasol, acelerada mediante la exposición a radiación UVA. El efecto protector del extracto isopropanólico ( $49 \pm 6$ ), sobre el aceite de girasol, fue similar a las de las sustancias de control, BHT ( $51 \pm 3$ ) y  $\alpha$ -tocoferol ( $33 \pm 4$ ).
  
11. Con base en el rendimiento del aceite esencial, se logró determinar la productividad del aceite por hectárea, que asciende a más de 300 kg para el tercer corte. (Ver **ANEXO C.**)

## 6. RECOMENDACIONES

1. Mediante la medición del hexanal, como producto secundario principal de descomposición del ácido linoléico, presente en el aceite de girasol, se recomienda evaluar el proceso oxidativo únicamente del ácido linoléico, para evaluar la capacidad antioxidante de las diferentes muestras estudiadas y determinar cuánto puede afectar la matriz protectora.
2. Se recomienda determinar el contenido total de fenoles, mediante el método Folin-Ciocalteu. Lo anterior, permitiría comparar los resultados obtenidos por HPLC-DAD en el presente trabajo.
3. Se recomienda hacer un estudio de producción de la planta *Satureja viminea*, y los costos de la producción agroindustrial del AE, así como desarrollar cultivos pilotos para establecer las cosechas en las cuales se obtendría mayor rendimiento del AE.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ADAMS P. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. 4<sup>th</sup> Ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 2004, 456 p.
2. ARIAS, G. Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citrodora*, cultivadas en el municipio Sucre (Santander). Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, **2012**, p.p. 59-75.
3. ARTHUR, C. and PAWLISZYN, J., Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused-silica fibers. *Anal. Chem.*, **1990**, 62, p.p. 2145-2148.
4. ARUOMA, O. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *JAOCS.*, **1998**, *75*, p.p. 199-212.
5. BANDONI, A. L. (Ed.) Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. CYTED. Subprograma IV. Proyecto IV. 6. 2<sup>a</sup> Edición. Universidad Nacional de la Plata; La Plata, Argentina, **2000**; p.p. 12-14, 17-19, 39-40, 87-89.
6. BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SAMOJLIK, I., and JOVIN, E., Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils., *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, p.p. 7879-7880.
7. CALA, M. Determinación de antioxidantes fenólicos en plantas aromáticas del genero *Lippia* sp. (Familia Verbenaceae) empleando cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. **2011**, p.p. 152-180.

8. CAÑIGUERAL S. Análisis y control de calidad de aceites esenciales, **2000**, pp. 2017-210. En: Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. CYTED. Subprograma IV. Proyecto IV.6. Ed. 2 Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina.
9. CAREY, F.A. Química orgánica. **1999**, Tercera edición, Ed. McGraw-Hill, Inc., Madrid, p.p. 945-953.
10. CERVANTES, M., Determinación por HS-SPME/GC-ECD, de los componentes carbonílicos y carboxílicos volátiles presentes en el sudor humano, Tesis de Maestría, Facultad de ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2006**.
11. CONTRERAS, N., Evaluación de la actividad antioxidante *in-vitro* de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta. Tesis de Maestría, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **2002**.
12. DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases, *J. Chromatogr.*, **1990**, 503, p.p. 1-24.
13. DOMÍNGUEZ, X. A., Métodos de investigación fitoquímica, Ed. Limusa, México, **1988**, p.p. 232.
14. ELMORE, J. S., MOTTRAN, D. S., ENSER, M., and WOOD, J. D., Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volátiles, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, p.p. 1619-1625.
15. EPLING, C., and JÁTIVA, C., Revisión del género *Satureja* en América del Sur., *Brittonia*, **1964**, 16, 393-416.

16. EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.*, **2004**, 37, p.p. 277-285.
17. FAJARDO, O. Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la capacidad antioxidante del aceites esencial de *Aloysia tripillia* (L'Her) Britton, cultivada en tres regiones de Colombia. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, **2007**, p.p. 65-86.
18. FANG, Y., YANG, S. Y WU. G., Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutr.*, **2002**, 18, p.p. 873-874.
19. FOTI, M.C., and INGOLD, K.U. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by  $\gamma$ -terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51. P.p. 2758 – 2765.
20. FRANKEL, E. N. Review. Recent Advances in lipid Oxidation. *J. Sol. Food Agric.*, **1991**, 54, pp. 495-511.
21. GIMENO CREUS, E., Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Rev. Offarm*, **2004**, p.p. 80-82.
22. GODEFROOT, M; SANDRA, P. y VERSALE, M., New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr. A.*, **1981**, 203, p.p. 325-335.
23. GOLMAKANI, M.; REZAEI, K., Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L., *J. Food Chem.*, **2008**, 109(1), p.p. 925-930.
24. GOMBERG, M., An Incidence of Trivalent Carbon Trimethylphenyl, *J. Am Chem. Soc.*, **1900**, 22, p.p. 757-771.

25. GÓMEZ, F. N., Aislamiento, identificación y cuantificación de hernandulcina en el extracto de *Lippia dulcis* Trevir, obtenido por extracción con fluido supercrítico. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **2012**, p.p. 110-113.
26. GVOZDJÁKOVÁ, A. Mitochondrial medicines. Mitochondrial metabolism, diseases, diagnosis and therapy. Eslovaquia, Bratislava. Springer. **2008**, Chapter 2, p.p. 20-23.
27. HALLIWELL, B. y WHITEMAN, M., Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Brit. J. Pharmacol.*, **2004**, 142, p.p. 231-255.
28. Informe final: Estudio de mercado nacional de aceites esenciales; Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y FUNDACOFAN, **2003**. Bogotá, p.p. 18-21
29. International standard. Reference No. ISO 1041- 1973 (E). Essential oils. Determination of freezing point First edition.
30. International standard. Reference No. ISO 11021: 1999. Essential oils. Determination of water content. Karl Fischer method. Second edition.
31. International standard. Reference No. ISO 1242: 1999 (E). Essential oils. Determination of acid value. Second edition.
32. International standard. Reference No. ISO 279: 1998 (E). Essential oils. Determination of relative density at 20°C. Second edition.
33. International standard. Reference No. ISO 875: 1999. Essential oils- Evaluation of miscibility in ethanol. Second edition.
34. International standard. Norma ISO 280: 1998 (E). Essential oils. Determination of refractive index. Second edition.

35. International standard. Norma ISO 592: 1998 (E). Essential oils. Determination of optical rotation. Second edition.
36. International standard. Norma ISO/TR 11018: 1997 (E). Essential oils. General guidance on the determination of flash point. First edition.
37. JACOBSEN, C., et al. Partitioning of selected antioxidants in mayonnaise. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 41, p.p. 3601-3610.
38. JADHAV, S. J., NIMBALKAR, S. S., KULKARNI, A. D. y MADHAVI, D. L. Lipid oxidation in biological and food systems, *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives*, **1996**, pp. 5-63.
39. JENNINGS, W.; MITTFELDLT, E.; STREMPLE, P. Analytical gas chromatography. 2<sup>nd</sup>, Academic Press, London, UK, **1987**, p.p. 1-287.
40. KARASEK, F. Basic gas chromatography-mass spectrometry. 1<sup>a</sup> Ed. Amsterdam: *Elsevier*. **1998**, p.p. 201.
41. KOLB B. and ETTRE L. S., Static Headspace – Gas Chromatography: Theory and Practice. New Jersey, Hoboken, **2006**, Editorial John Wiley & Sons, Inc. Segunda edición, p.p. 1-5.
42. LIKENDS, S. T. and NICKERSON, G. B. (1964) Detection of certain hop constituents in brewing products. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, St. Paul, MN, p.p. 5.
43. LIN, J. N. and KAO, C. H., Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. *Bot. Bull. Acad. Sin*, **1998**, 38, p.p. 161-161.
44. LIZARRAGA, E. y ABDALA, L. R. Compuestos fenólicos mayoritarios en *Satureja boliviana* (Benth.) Briq. (Lamiaceae). *Rev. Acta Farmacéutica Bonaerense*. **2004**, Vol. 23, N° 2. p.p. 198–200.

45. LUQUE, M., VALCARCEL, M., and TENA, M. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. Barcelona, **1993**, Editorial REVERTÉ, S.A., p. 480.
46. MERKEN, H.M and BEECHER, G.R; Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, p.p. 577-579.
47. MITRA, S., Sample preparation techniques in analytical chemistry. New Jersey, EE.UU. **2003**, p.p. 140-141.
48. MORA, A. L., Composición química del aceite de *Cymbopogon citratus* en función del método de extracción, época de cosecha y tiempo de secado de la planta, Tesis de Maestría, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **1997**, p.p. 4-93.
49. MORTON, J. F., Atlas of medicinal plants of Middle America-Bahamas to Yucatan. **1981**. Charles Thomas Publisher. Springfield, USA. p.p.880.
50. NIEMEYER, H. M., Composition of essential oils from *Satureja darwinii* (Benth.) Briq. And *S. multiflora* (R. et P.) Briq.(Lamiaceae). Relationship between chemotype and oil yield in *Satureja* spp., *J. Essent. Oil Res.*, **2010**, 22:6, p.p. 477- 482.
51. NIST Standard Reference Database. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program. Gaithersburg, MD, USA. Data Version 05, 2008.
52. OKE, F., ASLIMB, B., OZTURKA, S., ALTUNDAG, S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten., *Food Chemistry*, **2009**, 112, 874–879.
53. OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M. y PRIOR, R. L., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay

- using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.***2001**, 49, p.p. 4619-4626.
- 54.** PARÉ, J.R.J., and BELANGER, J.M.R., Microwave-assisted process (MAPTM): A new tool for the analytical laboratory. *TrAC.*,**1993**, 13, p.p.176-184.
- 55.** PARÉ, J.R.J., Microwave extraction of volatile oil and apparatus therefore, U.S. Patent Ep 0485668 A1, **1992**.
- 56.** PARK, P. W., and GOINS, R. E., *In situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods, *J. Food Sci.*,**1994**, 59, p.p. 1262-1266.
- 57.** PAWLISZYN, J., Solid phase microextraction, theory and practice, Wiley-VCH, New York, **1997**, p.p. 247.
- 58.** PÉREZ, F. y PERMANYER, J. Estudio de las alteraciones termooxidativas de los aceites vegetales: aceites de oliva virgen y aceites de girasol refinado. *Grasas y Aceites*, **1986**, 37, p.p. 29-32.
- 59.** PERL, I.M. and FUZFAI, Z.; Chromatography, capillary electrophoretic and capillary electrochromatography techniques in the analysis of flavonoids, *J. Chromatogr .A*, **2005**, 1073, p.p. 201-207.
- 60.** PINO, J. A.; ORTEGA, A. G.; PÉREZ, A; RODRÍGUEZ. M.; BALUJA, R. Composición y propiedades del aceite esencial de *Lippia alba* (MII) N.E. Brown, *Rev. Cub. Farm.*, **1997**, 30, p.p. 30.
- 61.** POOPLE, C.F. and POOPLE S, K.; Chromatography Today, *Elsevier*, Amsterdam, **1991**, 1026 p.
- 62.** RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 26, p.p. 1231-1237.

63. RODRÍGUEZ, J. M., MELÉNDEZ, J. R., TRUJILLO, Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cub Med Mil.*, **2001**, 30, p.p. 15-20.
64. ROSA, P.T.V., PARAJÓ, J.C., DOMÍNGUEZ, H., MOURE, A., DÍAZ, B., SMITH, R.L. Jr., TOYOMIZU, M., FLORUSSE, L.J., PETERS, C.J., GOTO, M., and MEIRELES, M. Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. En: MEIRELES, M. Extracting bioactive compounds for food products: Theory and applications. FL. CRC PRESS LLC. Boca Raton, **2009**.p.p. 269-288.
65. ROSSI, J. P., DELFINO, J. M., "Cienciometría, instrumentos de evaluación crítica". *Revista Ciencia Hoy en línea.*, **2005**, 15 (89) [Disponible en: <http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy89/cienciometria.htm>], Fecha de consulta: 5 de diciembre de 2013.
66. SATINDER, A: Chromatography and separation science, Academic Press, New York, EE.UU, **2003**, 4, p.p. 1-9, 133-142.
67. SAVIKIN, K.P., MENKOVIC, N. R., ZDUNIC, G. M., TASIC, S.R., RISTIC, M. S., STEVIC, T. R., DAJIC-STEVANOVIC, Z. P., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch. *M. dalmatica* Benth. and *Satureja cuneifolia* Ten. and its secretory elements., *J. Essent. Oil Res.*, **2010**, 22, 91-96.
68. SCHREIER, P., Chromatographic studies of biogénesis of plant volátiles, Chomatographic Methods, Sr. Alfred Hüthing Verlag, New York, **1984**.
69. SELL, C., Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Ed. by K. Hüsnü, Can Baser and Gerhard Buchbauer., CRC Press **2009**, p.p. 121-122.
70. SELL, C.S.A fragrant introduction to terpenoid Chemistry. Primera edición, Royal Society of Chemistry, **2003**, p.p. 396. Disponible en la

Internet: <http://www.rsc.org/pdf/books/terpenoidsc.pdf>. Consultado: 18 de agosto de 2013.

71. SHAHIDI, F. Natural antioxidants chemistry, health effects and applications. Boca Ratón, FL, EE.UU., AOCS Press. **1997**, p.p. 414.
72. SHERWIN, E.R. Oxidation and Antioxidants in Fat and Oil Processing. *JAACS*, **1978**, 55, pp. 809-814.
73. SIES, H. Oxidative stress and inflammatory mechanism in obesity, diabetes and the metabolic syndrome. **2005**, Ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU., p.p. 235-243.
74. STASHENKO E. E., RUIZ C, MUÑOZ A, CASTAÑEDA M, MARTÍNEZ JR. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. *Nat Prod Commun.* **2008**. 3(4), p.p. 563-566.
75. STASHENKO, E. E., ACOSTA, R. and MARTÍNEZ, J. R., "High resolution gas chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.)". *J. Biochem. Biophys. Methods.*, **2000**, 43, p.p. 379-390.
76. STASHENKO, E. E., y MARTÍNEZ J. R. (Editores). Plantas aromáticas y aceites esenciales: estudio y aplicaciones. **2012**, División de Publicaciones UIS, Bucaramanga, Colombia. p.p. 15-31.
77. STASHENKO, E. E., PUERTAS, M. A., and COMBARIZA, M. Y., Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 752, p.p. 223-232.
78. STASHENKO, E. E., PUERTAS, M. A., SALGAR, W., DELGADO, W., and MARTÍNEZ, J. R., Solid-Phase Microextraction with On-Fibre Derivatisation Applied to the Analysis of Volatile Carbonyl Compounds. *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 886, 175-181.

79. STASHENKO, E. E., y MARTÍNEZ, J. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*, **2009**, 1(2), p.p. 29-45.
80. STASHENKO, E. E., y MARTÍNEZ, J. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica.*, **2010**, 2, p.p. 29-47.
81. STASHENKO, E. E., y MARTÍNEZ, J. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*, **2011**, 3, p.p. 25-44.
82. STASHENKO, E. E., JARAMILLO, B., and MARTÍNEZ, J. Comparison of Different Extraction Methods for the analysis of Volatile Secondary Metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, Grown in Colombia and Evaluation of its *in vitro* Antioxidant Activity. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1025, p.p. 93-103.
83. STASHENKO, E.E., and MARTÍNEZ, J.R., Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, 70, p.p. 235-242.
84. STASHENKO, E.E., QUIROZ, N., and MARTÍNEZ, J.R., HRGC-FID/NPD and HRGC-MSD study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques, *J. High Resol. Chromatogr.* **1996**, 19, p.p. 353-358.
85. SUÁREZ, A., ECHANDI, M. M., ULATE, G., CICCIO, J.F. Pharmacological activity of the essential oil of *Satureja viminea* (Lamiaceae). *Rev. Biol. Trop* (Revista de Biología Tropical), **2003**, 51, p.p. 247-252.

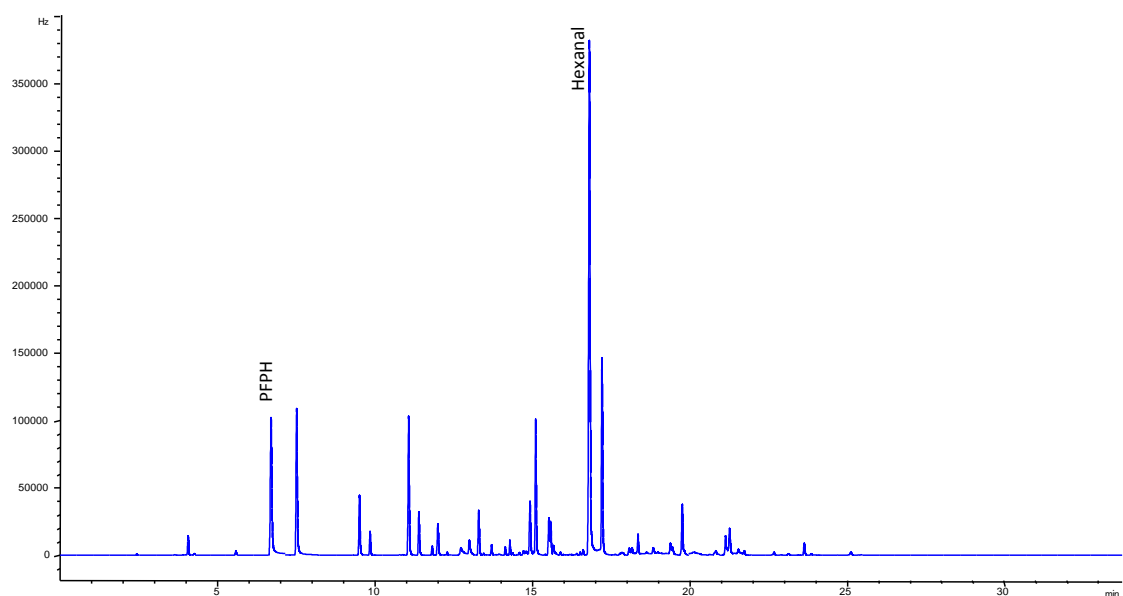
86. TAFURT G, MARTÍNEZ JR, STASHENKO EE. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Revista Colombiana de Química*, **2005**, 34(1), p.p. 43-55.
87. TAFURT, G. G. Estudio teórico y experimental para evaluar la relación actividad antioxidante-estructura de anilinas sintéticas y la alquilación intramolecular de Friedel-Craft de *orto*-alil-N-benzilanilinas. Tesis de Doctorado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, **2008**, p.p. 10-13.
88. The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals, Kovats index, o, disponible en: <http://www.pherobase.com>>; fecha de consulta: Junio a julio de 2013.
89. TSARKOVA, T. Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas. Tesis de Maestría. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander, **1997**, p.p. 27-31.
90. TUCKER, A.O., MACIARELLO, M.J., LIBBEY, L.M. Essential oil of *Satureja viminea* (Lamiaceae), *J. Essent. Oil Res.*, **2000**, 12, p.p. 283-284.
91. UGARTONDO, V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis de Doctorado, Universidad de Barcelona, Barcelona, España. **2009**, p.p. 120-142.
92. VENEREO GUTIÉRREZ, J. R., Daño oxidativo, radicales libres y antioxidants. *Rev Cub Med Mil.*, **2002**, 31, p.p. 126-133.
93. VERMERRIS, W. y NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry; Springer, New York, EE.UU., **2008**, p.p. 1-24.

- 94.** VILA, R., IGLESIAS, J., CAÑIGUERAL, S., CICCIO, J.F. Essential oil of *Satureja viminea* L. from Costa Rica., *J. Essent. Oil Res.*, **2000**, 12, p.p. 279-282.
- 95.** WANASUNDARA, D. and SHAHIDI, F., Bailey's industrial oil & fat products, Volumen 1. *Antioxidants: Science, Technology, and Applications*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, Hoboken. **2005**, Chapter 11.p.p. 436-443.
- 96.** YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.; POKORNÝ, J.; Natural antioxidants from herbs and spices, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2006**, 108, p.p. 776-793.

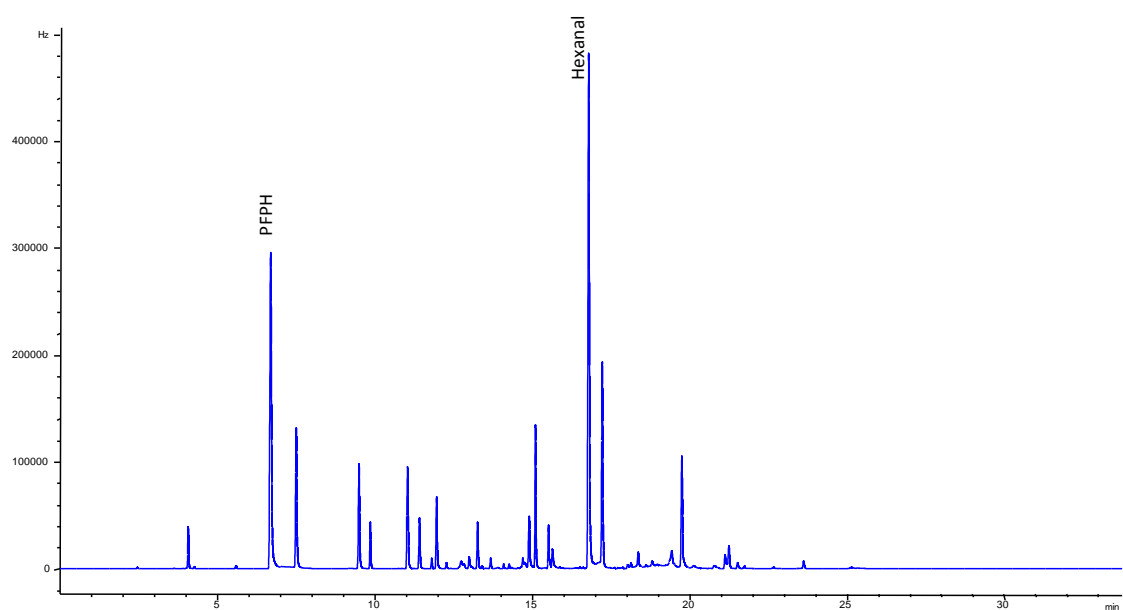
## **ANEXOS**

**ANEXO A.** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-ECD del hexanal analizado en forma de su derivado hidrazónico, generados en el aceite de girasol sometido a la radiación UVA.

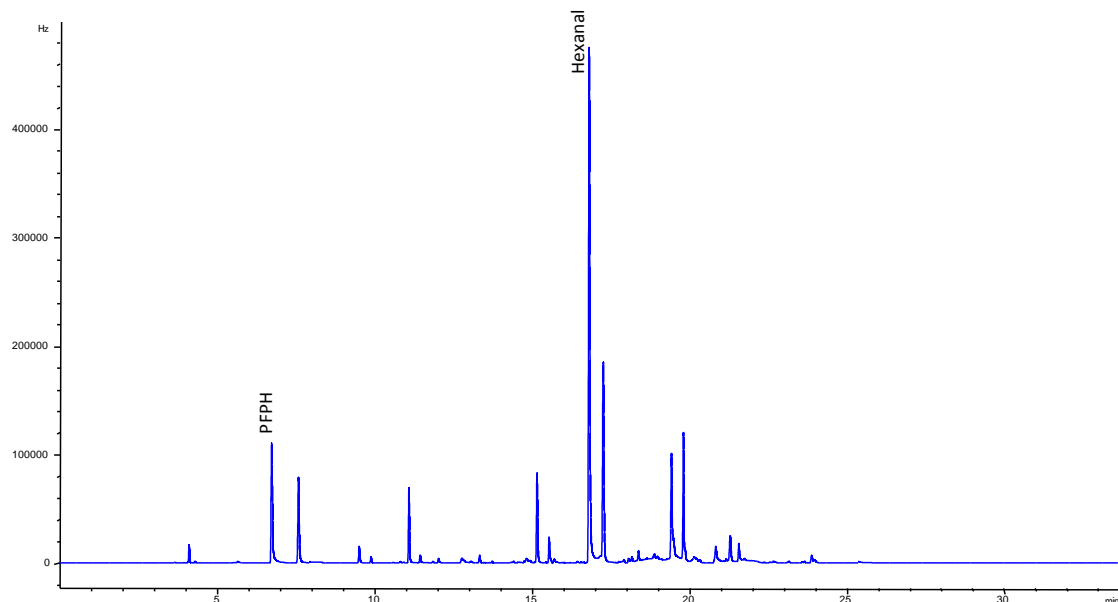
**Figura 1.1.** Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de girasol con AE de *Satureja viminea*.



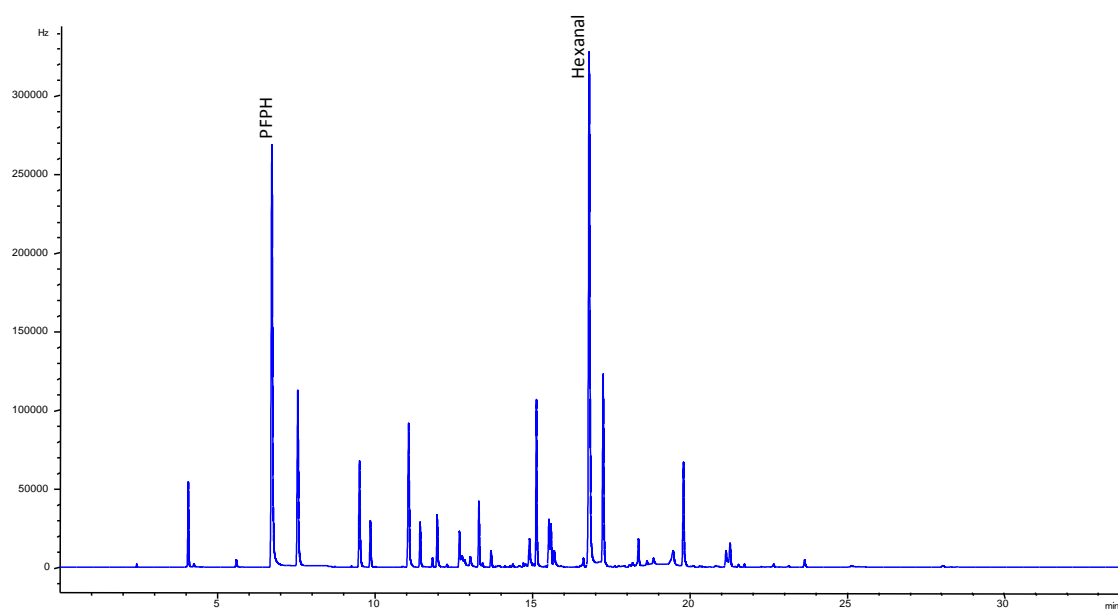
**Figura 1.2.** Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de girasol con extracto metanólico de *Satureja viminea*.



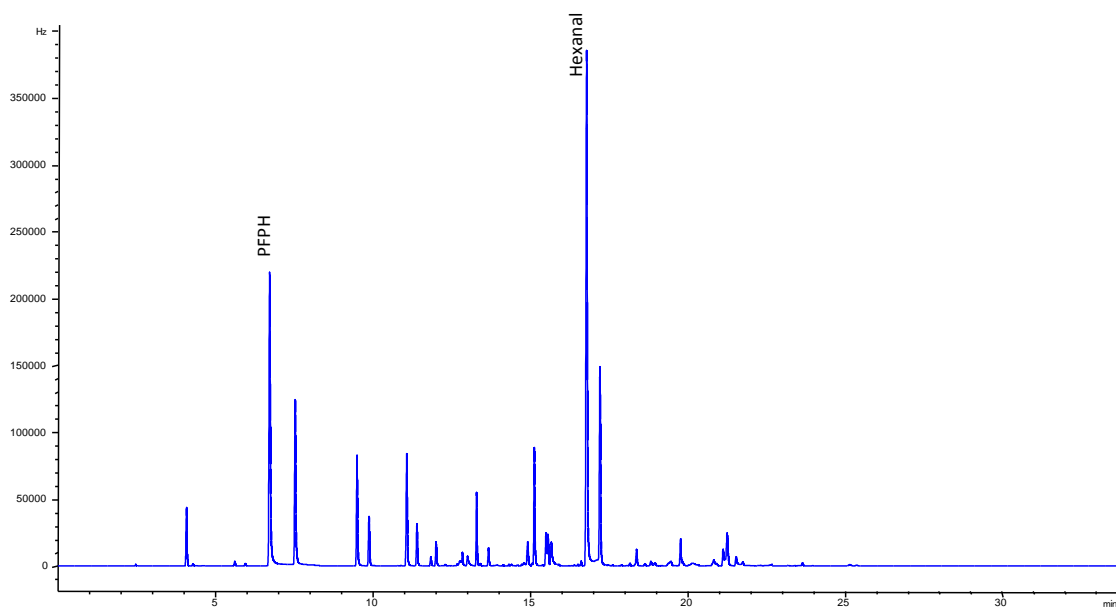
**Figura 1.3.** Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de girasol con extracto isopropanólico AE de *Satureja viminea*.



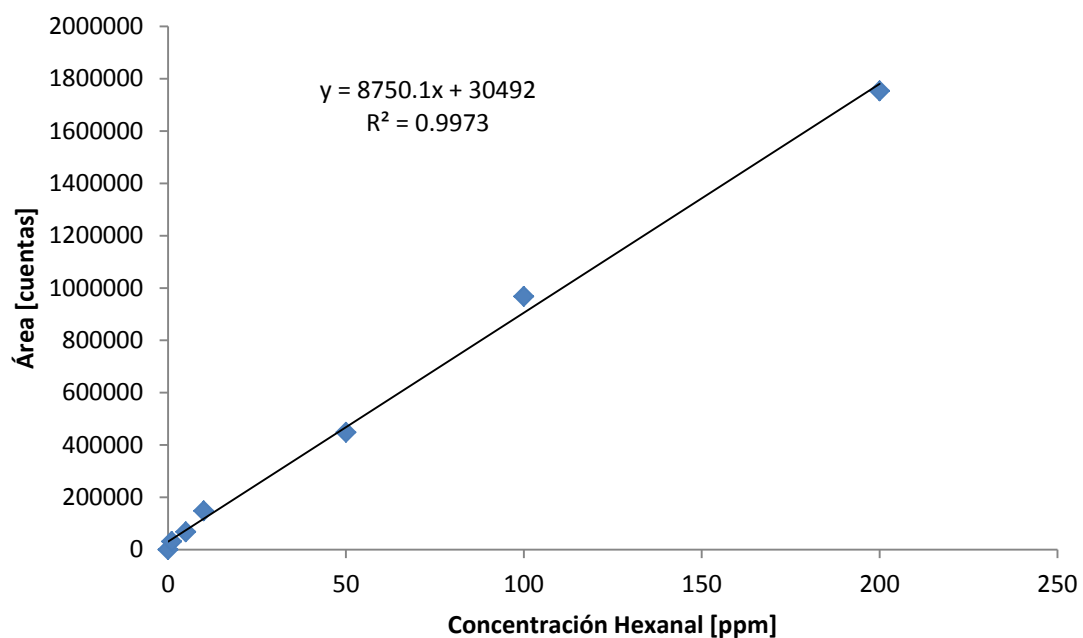
**Figura 1.4.** Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de girasol con BHT.



**Figura 1.5.** Perfil cromatográfico de los productos secundarios generados en el aceite de girasol con  $\alpha$ -tocoferol.



**ANEXO B.** Curva de calibración del hexanal por GC-ECD.



## **ANEXO C.** Proyección rendimiento del aceite esencial.

Para desarrollar un cultivo experimental de plantas aromáticas de *Satureja viminea*, se debe establecer un sistema de intercalado en surcos debido a su facilidad de cosecha, además de ser el más adecuado para instaurar cultivos comerciales.

La distancia de siembra entre cada planta es de 1 m, ya que la planta, en su edad adulta, alcanza más de 1.5 m de altura y, además, es frondosa.

La recolección del material vegetal se debe realizar cada cuatro meses. El rendimiento del AE se define como la cantidad del AE obtenido de la biomasa cosechada de una especie, en unidad de área (por planta o cantidad de biomasa).

Para los tres cortes (1 año) de la planta, el rendimiento de aceite generado para 1 ha, (10.000 plantas) se muestra a continuación:

<b>Corte de la planta</b>	<b>Peso de aceite esencial</b>	<b>Cantidad de material vegetal por hectárea</b>	<b>AE del cultivo de 10000 plantas (kg)</b>
Corte 1	0.00435 kg	5000 kg	43.5
Corte 2	0.0087 g	10000 kg	87
Corte 3	0.0348 g	40000 kg	348

\*Base de cálculo, 10.000 plantas por hectárea (ha).

\*\*Rendimiento de AE=0.87 % p/p.