

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE ACEITES
ESENCIALES DE PLANTAS TROPICALES Y COMPUESTOS SINTÉTICOS
NITROGENADOS**

BEATRIZ EUGENIA JARAMILLO COLORADO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2004**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE ACEITES
ESENCIALES DE PLANTAS TROPICALES Y COMPUESTOS SINTÉTICOS
NITROGENADOS**

BEATRIZ EUGENIA JARAMILLO COLORADO

Código: 994201

**Tesis presentada como requisito parcial para optar el título de
Doctora en Química**

Directora:

Dra. Elena E. Stashenko, Profesora Titular, Escuela de Química

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2004**

Tú eres lo que es el profundo deseo que te impulsa.

Tal como es tu deseo es tu voluntad.

Tal como es tu voluntad son tus actos.

Tal como son tus actos es tu destino.

Brihadaranyaka Upanishad IV. 4.5.

DEDICATORIA

A las personas que amo con todo mi corazón y quienes me apoyan siempre:

A mis padres, Gladys y Jairo, a quienes todo les debo.

A mi hija, Laura, mi fuente de vida.

A mi esposo, Edison por la alegría de su amor.

A mi hermana y sobrino, Patty y Sebastián.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos, muy especialmente, a la doctora Elena Stashenko, quien, sin conocerme, aceptó ser mi directora, por sus valiosas enseñanzas, orientación, por sus consejos y constante apoyo.

Al doctor Jairo René Martínez, por sus aportes, orientación y colaboración, brindados durante el desarrollo de esta investigación.

A mi Familia, por todos sus esfuerzos, solidaridad y el amor que me dan día a día. Porque me enseñaron que querer es poder.

A Estella Restrepo Rincón

A mis profesores.

A la Universidad Industrial de Santander, especialmente, al Laboratorio de Cromatografía, por el apoyo financiero y logístico para llevar a cabo este trabajo.

A COLCIENCIAS, por financiar mi pasantía doctoral internacional.

Al Instituto de Química de Alimentos de la Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania, donde se llevó a cabo mi pasantía, y a su director e integrantes: Prof. Peter Winterhalter, Dr. Peter Fleischman, María, Gerold, Marita, Nadine y Eliana.

Al doctor Jesús Olivero, profesor de la Universidad de Cartagena, por realizar las pruebas de toxicidad de los aceites esenciales estudiados.

A los doctores Vladimir Kouznetsov y Alirio Palma, por proporcionar las sustancias sintéticas, preparadas bajo su dirección en el Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina.

A los jurados Dres. Luis Enrique Cuca, Fernando Echeverri y Vladimir Kouznetsov, por toda la colaboración que me brindaron durante la evaluación de este trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Cromatografía, los que están y los que ya se fueron, especialmente, a Mónica, Geovanna, Ciro, José Luis M, las Marthicas, Amanda, Amner y Alberto Serrano.

A mis amigos Maritza Villalobos, Geovanna Tafurt y Alberto Sánchez.

A Doña Claudina y su hija Natalia, Luz Elena Martínez y familia.

Y, gracias a *Dios*.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------|--|
| ABTS: | <i>2,2'-Azinobis-(Ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)</i> [Ácido 2,2'-azino-bis- (3-etiltiazolina - bencenosulfónico-6)]. |
| AE: | Aceite esencial. |
| BHA: | <i>Butylated hydroxyanisol</i> [2-(<i>ter</i> -Butil)-4-metoxifenol]. |
| BHT: | <i>Butylated hydroxytoluene</i> [2,6-di(<i>ter</i> Butil)- <i>p</i> -cresol]. |
| BTEX: | Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos. |
| CCC: | <i>Counter Current Chromatography</i> (Cromatografía en contracorriente). |
| DVB | <i>Divinylbenzene</i> (Divinilbenceno). |
| DPPH : | <i>α,α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl radical</i> (Radical α,α -Difenil- β -picrilhidracilo). |
| ECD: | <i>Electron Capture Detector</i> (Detector de captura de electrones). |
| EDE: | Energía de disociación de enlace. |
| EI: | <i>Electron Impact</i> (Impacto de electrones). |
| ERO's: | Especies reactivas de oxígeno. |
| ESR: | <i>Electron Spin Resonance</i> (Espectroscopía de resonancia electrónica de espín). |
| eV: | Electrón-Voltio. |
| d_f: | Espesor de la fase estacionaria, μm . |
| D.I: | Diámetro interno, mm. |
| FAME: | <i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (Metil-ésteres de los ácidos grasos). |
| FID: | <i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama). |
| GC: | <i>Gas Chromatograph</i> (Cromatógrafo de gases). |
| GC/MS: | <i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas). |
| HA's: | Hidrocarburos antioxidantes. |
| HD: | <i>Hydro-Distillation</i> (Hidrodestilación). |

- HOMO:** *Highest Occupied Molecular Orbital* (Orbital molecular ocupado más alto).
- HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
- HRGC:** *High Resolution Gas Chromatography* (Cromatografía de gases de alta resolución).
- HRGC-MS:** *High Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas).
- HS:** *Headspace* (Espacio de cabeza).
- HS-SPME:** *Headspace Solid-Phase Microextraction* (Headspace-microextracción en fase sólida).
- IR:** Infrarrojo.
- LC₅₀:** *Median Lethal Concentration* (Concentración letal media).
- LD₅₀:** *Median Lethal Dose* (Dosis letal media).
- LLE:** *Liquid-Liquid Extraction* (Extracción líquido-líquido).
- LUMO:** *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (Orbital molecular desocupado más bajo).
- MLCCC:** *Multil-Layer Counter-Current Chromatography* (Cromatografía en contracorriente de multicapa).
- MLR:** *Multiple Linear Regression* (Regresión lineal múltiple).
- MSD:** *Mass Selective Detector* (Detector selectivo de masas).
- MWHD:** *Microwave-Assisted Hydro-Distillation* (Extracción asistida por la radiación de microondas).
- NPD:** *Nitrogen-Phosphorus Detector* (Detector selectivo de nitrógeno-fósforo).
- ORAC:** *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (Capacidad de absorbancia del radical oxígeno).
- PC:** *Principal Component* (Componente principal).

- PCA:** *Principal Components Analysis* (Análisis de componentes principales).
- PDMS:** *Poly(Dimethylsiloxane)* [Poli(dimetilsiloxano)].
- PDMS/DVB:** *Poly(Dimethylsiloxane)/Divinylbenzene* [Poli(dimetilsiloxano)]/divinilbenceno.
- PFPH:** *Pentafluorophenylhydrazine* (Pentaflúorfenilhidracina).
- PI:** Potencial(es) de ionización.
- P&T:** *Simultaneous Purge & Trap* (Purga y trampa simultánea).
- PTFE:** *Poly(Tetrafluoroethylene)* [Poli(tetraflúoretileno)].
- PUFA:** *Polyunsaturated Fatty Acids* (Ácidos grasos polinsaturados).
- QSAR:** *Quantitative Structure Activity Relationship* (Relación cuantitativa estructura-actividad).
- SDE:** *Simultaneous Distillation-Solvent Extraction* (Destilación-extracción con solvente simultánea).
- SFE:** *Supercritical Fluid Extraction* (Extracción con fluido supercrítico).
- S-HS:** *Static Headspace* (*Headspace* estático)
- TAA:** *Total Antioxidant Activity* (Actividad antioxidante total).
- TBA:** *Thiobarbituric Acid* (Ácido tiobarbitúrico).
- TCD:** *Thermal Conductivity Detector* (Detector de conductividad térmica).
- TEAC:** *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox).
- TLC:** *Thin Layer Chromatography* (Cromatografía de capa fina)
- α -TOH:** α -Tocoferol.
- TRIS:** *Tris[2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol]* [2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol].
- UV-VIS:** *Ultraviolet –Visible* (Ultravioleta-Visible).

CONTENIDO

| | | Pág. |
|----------|---|------|
| | INTRODUCCIÓN | 27 |
| 1 | PARTE EXPERIMENTAL | 43 |
| 1.1 | MATERIALES Y REACTIVOS | 43 |
| 1.2 | PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN | 45 |
| 1.2.1 | Obtención de aceites esenciales | 45 |
| 1.2.2 | Obtención de extractos | 48 |
| 1.2.3 | Obtención de fracciones volátiles | 48 |
| 1.3 | DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DE ACEITES ESENCIALES | 54 |
| 1.3.1 | Descripción general del sistema modelo lipídico | 54 |
| 1.3.2 | Medición del hexanal | 54 |
| 1.3.3 | Medición del ácido linoleico | 55 |
| 1.3.4 | Estudio de la capacidad de los aceites esenciales para atrapar radicales | 56 |
| 1.3.4.1 | Ensayo de descoloramiento del catión-radical ABTS ⁺ | 56 |
| 1.3.4.2 | Ensayo de descoloramiento del radical DPPH | 58 |
| 1.4 | ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO | 59 |
| 1.4.1 | Fraccionamiento de aceites esenciales por cromatografía en contracorriente | 62 |
| 1.5 | DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC ₅₀) DE LOS ACEITES ESENCIALES FRENTE A <i>ARTEMIA SALINA</i> | 64 |
| 1.6 | DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MOLÉCULAS SINTÉTICAS NITROGENADAS Y CÁLCULO MECÁNICO-CUÁNTICO DE SUS PROPIEDADES ELECTRÓNICAS PARA CONSTRUIR UN MODELO QSAR | 65 |
| 1.7 | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 80 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2. | ANÁLISIS DE RESULTADOS | 85 |
| 2.1 | OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE EXTRACTOS Y FRACCIONES VOLÁTILES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS BAJO ESTUDIO | 85 |
| 2.1.1 | <i>Lippia alba</i> Mill., N.E. Brown | 86 |
| 2.1.1.1 | Metabolitos secundarios volátiles de <i>L. alba</i> | 87 |
| 2.1.2 | <i>Aloysia triphylla</i> (L'Hérit.) Britton | 99 |
| 2.1.2.1 | Metabolitos secundarios volátiles de <i>A. triphylla</i> | 100 |
| 2.1.3 | <i>Lantana armata</i> Schauer | 109 |
| 2.1.3.1 | Metabolitos secundarios volátiles de <i>L. armata</i> | 111 |
| 2.1.4 | <i>Xylopiya aromatica</i> Lamarck | 120 |
| 2.1.4.1 | Metabolitos secundarios volátiles de <i>Xylopiya aromatica</i> Lam. | 121 |
| 2.1.5 | <i>Satureja brownei</i> Briq. | 130 |
| 2.1.5.1 | Metabolitos secundarios volátiles de <i>S. brownei</i> | 131 |
| 2.1.6 | Fraccionamiento de aceites esenciales por cromatografía en contracorriente | 138 |
| 2.2 | DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC ₅₀) DE LOS ACEITES ESENCIALES FRENTE A <i>ARTEMIA SALINA</i> | 143 |
| 2.3 | ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES Y ALGUNAS DE SUS FRACCIONES | 148 |
| 2.3.1 | Determinación de la inhibición de la peroxidación lipídica | 152 |
| 2.3.2 | Determinación <i>in vitro</i> de la capacidad de atrapamiento de radicales de los aceites esenciales, usando el catión-radical ABTS ⁺ y el radical DPPH | 161 |
| 2.3.2.1 | Ensayo de descoloramiento del catión-radical ABTS ⁺ | 161 |
| 2.3.2.2 | Método de descoloramiento del radical DPPH | 165 |
| 2.4 | ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE SUSTANCIAS SINTÉTICAS NITROGENADAS | 171 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 2.4.1 | Efecto protector de las sustancias nitrogenadas sintéticas contra la oxidación del ácido linoleico inducida por iones Fe^{2+} en la presencia de O_2 | 171 |
| 2.4.2 | Evaluación de la capacidad de secuestrar radicales de los derivados sintéticos nitrogenados | 189 |
| 2.4.3 | Relación cuantitativa de la actividad antioxidante con la estructura química de los compuestos nitrogenados sintéticos | 194 |
| 2.4.3.1 | Correlación del efecto protector con la estructura usando el Modelo 1 | 200 |
| 2.4.3.2 | Correlación del efecto protector con la estructura usando el Modelo 2 | 203 |
| 2.4.3.3 | Correlación del efecto protector con la estructura usando el Modelo 3 | 206 |
| 2.4.3.4 | Correlación del efecto protector con la estructura usando el Modelo 4 | 209 |
| 2.4.3.5 | Correlación del efecto protector con la estructura usando el Modelo 5 | 211 |
| 2.4.3.6 | Correlación de la capacidad de atrapar radicales de los compuestos sintéticos nitrogenados con la estructura | 213 |
| 3. | CONCLUSIONES | 219 |
| | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 226 |
| | ANEXOS | 242 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Tabla 1. Derivados de bencilaminas, tetrahydroquinolinas, 2-benzazepinas y nitronas estudiados en la presente investigación. | 66 |
| Tabla 2. Composición química de los extractos de <i>Lippia alba</i> , obtenidos por diferentes técnicas de extracción. | 89 |
| Tabla 3. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en las fracciones volátiles de <i>L. alba</i> , obtenidos por P&T, S-HS y HS-SPME. | 93 |
| Tabla 4. Composición del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> de diferentes orígenes geográficos. | 97 |
| Tabla 5. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de <i>A. triphylla</i> , aislados por métodos extractivos. | 102 |
| Tabla 6. Cantidad relativa (%) de los metabolitos secundarios volátiles en las fracciones de <i>A. triphylla</i> obtenidas por diferentes técnicas <i>headspace</i> . | 104 |
| Tabla 7. Principales compuestos encontrados en los aceites esenciales y fragancias de <i>A. triphylla</i> de diferentes orígenes geográficos. | 107 |
| Tabla 8. Composición química de los metabolitos secundarios de <i>Lantana armata</i> Schauer, aislados por diferentes métodos extractivos. | 112 |
| Tabla 9. Composición química de las fracciones volátiles de <i>L. armata</i> , aisladas por métodos <i>headspace</i> . | 115 |
| Tabla 10. Compuestos mayoritarios encontrados en aceites esenciales de <i>L. camara</i> , cultivada en diferentes países. | 117 |
| Tabla 11. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la <i>Xylopiá aromática</i> (Lamarck), obtenidos por diferentes técnicas de extracción. | 122 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| Tabla 12. | Composición química de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos de frutos secos de <i>X. aromatica</i> L., por métodos <i>headspace</i> . | 125 |
| Tabla 13. | Principales compuestos encontrados en los aceites esenciales de <i>X. aromatica</i> de diferentes orígenes geográficos. | 128 |
| Tabla 14. | Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la <i>Satureja brownei</i> Briq., obtenidos por diferentes técnicas de extracción. | 133 |
| Tabla 15. | Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la <i>Satureja brownei</i> Briq., obtenidos por técnicas <i>headspace</i> . | 135 |
| Tabla 16. | Principales compuestos, presentes en las fracciones de los aceites esenciales de <i>L. alba</i> , <i>L. armata</i> , <i>A. triphylla</i> y <i>X. aromatica</i> , obtenidas por CCC e identificados por GC-MS. | 142 |
| Tabla 17. | Valores de LC ₅₀ e intervalos de confianza (95%) de los aceites esenciales a 24 y 48 horas de exposición a la <i>A. salina</i> . | 145 |
| Tabla 18. | Métodos usados para la evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales. | 151 |
| Tabla 19. | Efecto protector de los aceites esenciales de <i>L. alba</i> , <i>A. triphylla</i> , <i>L. armata</i> , <i>X. aromatica</i> y <i>S. brownei</i> , la vitamina E y el BHA, contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe ²⁺ en la presencia de O ₂ . | 155 |
| Tabla 20. | Capacidad de atrapar radicales del ácido ascórbico, BHA, BHT, vitamina E, sustancias patrón de terpenos y de los aceites esenciales, medida por los métodos de descoloramiento del catión-radical ABTS ⁺ y del radical DPPH. | 162 |
| Tabla 21. | Capacidad de atrapar radicales de algunas fracciones de los aceites esenciales obtenidas por CCC, medida por los métodos de descoloramiento de los radicales ABTS ⁺ y DPPH. | 169 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Tabla 22. | Efecto protector <i>in vitro</i> de los derivados <u>1-27</u> de las bencilaminas, contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe ²⁺ en presencia de O ₂ . | 172 |
| Tabla 23. | Efecto protector <i>in vitro</i> de la vitamina E y el BHA contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe ²⁺ en presencia de O ₂ . | 177 |
| Tabla 24. | Efecto protector <i>in vitro</i> de los derivados <u>28-34</u> de las 2-benzazepinas, contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe ²⁺ en presencia de O ₂ . | 179 |
| Tabla 25. | Efecto protector <i>in vitro</i> de los derivados <u>35-46</u> de las tetrahydroquinolinas, contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe ²⁺ en presencia de O ₂ . | 181 |
| Tabla 26. | Efecto protector <i>in vitro</i> de los compuestos nitrogenados <u>47-56</u> , contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe ²⁺ en presencia de O ₂ . | 184 |
| Tabla 27. | Efecto protector <i>in vitro</i> de las nitronas <u>57-70</u> , contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe ²⁺ en presencia de O ₂ . | 187 |
| Tabla 28. | Capacidad atrapadora de radicales de los compuestos nitrogenados <u>4-16</u> , <u>18-20</u> , <u>23-25</u> , <u>27</u> , <u>31-34</u> , <u>41</u> , <u>47-62</u> , <u>65-67</u> . | 190 |
| Tabla 29. | Coeficientes de regresión, obtenidos para el Modelo 1 (34 moléculas). | 201 |
| Tabla 30. | Coeficientes de regresión, obtenidos para el Modelo 2 (20 moléculas). | 204 |
| Tabla 31. | Coeficientes de regresión, obtenidos para el Modelo 3 (8 moléculas). | 208 |
| Tabla 32. | Coeficientes de regresión, obtenidos para el Modelo 4 (10 moléculas). | 210 |
| Tabla 33. | Coeficientes de regresión, obtenidos para el Modelo 5 (11 moléculas). | 212 |
| Tabla 34. | Coeficientes de regresión, obtenidos para la correlación de la estructura y la capacidad atrapadora de radicales de los compuestos sintéticos nitrogenados, medida por el método del catión-radical ABTS ⁺ . | 214 |
| Tabla 35. | Coeficientes de regresión obtenidos para los valores de EC ₅₀ y los descriptores moleculares seleccionados. | 215 |

- Tabla 36. Principales compuestos encontrados en los extractos de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei*. 220
- Tabla 37. Compuestos con mayor correlación para cada uno de los modelos obtenidos. 224

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Figura 1. Equipo usado para la obtención de aceites esenciales por hidrodestilación convencional. | 46 |
| Figura 2. Montaje empleado para obtener los aceites esenciales por el método de hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD). | 47 |
| Figura 3. Equipo a micro-escala de destilación-extracción con solvente simultánea (SDE) para solventes de alta densidad, empleado para la obtención de extractos de plantas. | 49 |
| Figura 4. Extractor Soxhlet de alta presión para la obtención de extractos vegetales con fluido supercrítico (SFE). | 50 |
| Figura 5. Equipo de extracción <i>headspace</i> dinámico (purga de espacio de cabeza con N ₂ y trampa en solvente simultánea, P & T). | 51 |
| Figura 6. Equipo empleado en la técnica <i>headspace</i> estático. | 52 |
| Figura 7. Montaje empleado para la extracción por HS-SPME de los volátiles de la planta. | 53 |
| Figura 8. Estructuras químicas de la vitamina E y de su análogo hidrosoluble, Trolox. | 57 |
| Figura 9. Cromatógrafo de gases, acoplado a espectrómetro de masas (<i>Agilent Technologies</i>), usado para el análisis de los aceites esenciales, extractos y fracciones volátiles de las plantas bajo estudio. | 61 |
| Figura 10. Cromatógrafo en contracorriente, utilizado para el fraccionamiento de los aceites esenciales de <i>L. alba</i> , <i>L. armata</i> , <i>A. triphylla</i> y <i>X. aromatica</i> . | 63 |
| Figura 11. Planta cultivada de <i>Lippia alba</i> Mill., N.E. Brown, utilizada en el presente estudio. | 87 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figura 12. | Cromatogramas típicos de extractos de <i>Lippia alba</i> , aislados por A. HD; B. MWHD; C. SDE y D. SFE. Columna HP-5 (30 m), <i>split</i> 1:30, FID. Ver la Tabla 2 para la identificación de los picos. | 88 |
| Figura 13. | Composición química de la fragancia de <i>Lippia alba</i> , obtenida por diferentes métodos <i>headspace</i> A. HS-SPME; B. P&T y C. S-HS. Columna HP-5 (30 m), <i>split</i> 1:30, FID. Ver la Tabla 3 para la identificación de los picos. | 92 |
| Figura 14. | Cantidad relativa (%) de los componentes principales, aislados por SPME de la fase vapor, de la planta fresca de <i>Lippia alba</i> en función del tiempo de exposición de la fibra (PDMS, 100 μ m). | 95 |
| Figura 15. | Distribución de las principales familias de los compuestos en los aceites esenciales, extractos y fracciones volátiles de <i>L. alba</i> , obtenidos por los diferentes métodos. M: Monoterpenos, MT: Monoterpenonas, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Sesquiterpenos, SO: Sesquiterpenos oxigenados. | 96 |
| Figura 16. | Representación gráfica de las composiciones relativas de fracciones volátiles, aisladas de la planta fresca de <i>L. alba</i> por diferentes métodos de extracción, en el espacio formado por los primeros tres componentes principales: A. <i>Factor 1 Vs Factor 2</i> . B. <i>Factor 2 Vs Factor 3</i> . Véase el Anexo 2 (Tabla 1) para las contribuciones de los componentes en cada uno de los <i>Factores</i> . | 98 |
| Figura 17. | Planta de <i>Aloysia triphylla</i> (L'Hérit.) Britton. | 100 |
| Figura 18. | Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de <i>A. triphylla</i> , obtenido por hidrodestilación; <i>istd</i> = <i>n</i> -tetradecano. Columna HP-5 (30 m), <i>split</i> 1:30, FID. La identificación de los picos se reporta en la Tabla 5 . | 101 |
| Figura 19. | Variación en la composición de metabolitos secundarios volátiles en los extractos de <i>A. triphylla</i> , obtenidos por diferentes técnicas. HO: Hidrocarburos oxigenados, M: Monoterpenos, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Sesquiterpenos, SO: Sesquiterpenos oxigenados. | 106 |

- Figura 20. **Figura 20.** Representación gráfica de las composiciones relativas de fracciones volátiles, aisladas de la planta fresca de *A. triphylla*, por diferentes métodos de extracción, en el espacio formado por los primeros dos componentes principales. Véase el **Anexo 2 (Tabla 2)** para las contribuciones de los componentes en los *Factores* 1 y 2. 109
- Figura 21. Planta cultivada de *Lantana armata* Schauer, utilizada en el presente estudio. 110
- Figura 22. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *L. armata*, obtenido por hidrodestilación. Columna HP-5 (30 m), *split* 1:30, FID. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 8**. 111
- Figura 23. Distribución de las principales familias de los compuestos en los aceites y extractos de *L. armata*, obtenidos por los diferentes métodos. HO: Hidrocarburos oxigenados, M: Monoterpenos, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Sesquiterpenos, SO: Sesquiterpenos oxigenados. 116
- Figura 24. Representación gráfica de las composiciones relativas de fracciones volátiles, aisladas de la planta fresca de *L. armata*, por diferentes métodos, en el espacio formado por los primeros dos componentes principales. En el **Anexo 2 (Tabla 3)** aparecen las contribuciones de los compuestos en los *Factores* 1 y 2. 118
- Figura 25. Frutos del árbol de *Xylopiya aromatica* Lamarck. 120
- Figura 26. Cromatograma del aceite esencial de frutos secos de *Xylopiya aromatica* Lam., obtenido por HD, *istd* = *n* tetradecano. Columna HP-5, *split* 1:30, FID. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 11**. 121
- Figura 27. Distribución de las principales familias de los compuestos en los aceites y extractos de *X. aromatica*, obtenidos por los diferentes métodos. M: Monoterpenos, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Sesquiterpenos, SO: Sesquiterpenos oxigenados, BC: Bencenoides. 127

- Figura 28. Representación gráfica de las composiciones relativas de fracciones volátiles, aisladas los frutos secos de *X. aromatica* por diferentes métodos de extracción, en el espacio formado por los primeros dos componentes principales: *Factor 1 Vs Factor 2*. En el **Anexo 2 (Tabla 4)** aparecen las contribuciones de los compuestos a los *Factores 1 y 2*. 129
- Figura 29. Planta de *Satureja brownei* Briq., usada en el presente estudio. 131
- Figura 30. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *S. brownei*, obtenido por HD. Columna HP-5 (30 m), *istd* = *n*-tetradecano, *split* 1:30, FID. En la **Tabla 14** aparece la respectiva identificación de los picos cromatográficos. 132
- Figura 31. Distribución de las principales familias de los compuestos en los aceites y extractos de *S. brownei*, obtenidos por los diferentes métodos. HO: Hidrocarburos oxigenados, M: Monoterpenos, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Sesquiterpenos, SO: Sesquiterpenos oxigenados. 136
- Figura 32. Representación gráfica de las composiciones relativas de las fracciones volátiles, aisladas de la planta fresca de *S. brownei*, por diferentes métodos de extracción, en el espacio formado por los dos primeros componentes principales. Las contribuciones de los componentes a los *Factores 1 y 2* aparecen en el **Anexo 2 (Tabla 5)**. 137
- Figura 33. Cromatogramas típicos de los aceites esenciales de: **A.** *Lippia alba*, **B.** *Lantana armata*, **C.** *Aloysia triphylla* y **D.** *Xylopia aromatica*, obtenidos por CCC. Sistema de solventes (acetonitrilo/*ter*-butilmetiléter/hexano). Columna PTFE (160 m x 1.6 mm D.I.). Detector UV (254 nm). 140
- Figura 34. TLC de fracciones de los aceites esenciales de *L. alba*, *A. triphylla*, *L. armata* y *X. aromatica*, aisladas por CCC. 141

| | | |
|------------|--|-----|
| Figura 35. | Valor <i>Probit</i> Vs el logaritmo de las concentraciones de los aceites esenciales de a. <i>L. armata</i> ; b. <i>A. triphylla</i> ; c. <i>X. aromatica</i> ; d. <i>L. alba</i> ; e. <i>S. brownei</i> y f. <i>Callistemon viminalis</i> . A. Después de 24 horas de exposición a la <i>A. salina</i> . B. Después de 48 horas de exposición a la <i>A. salina</i> . | 146 |
| Figura 36. | Derivación de aldehídos con pentaflúorfenilhidracina (PFPH). | 153 |
| Figura 37. | Esterificación de lípidos catalizada por un ácido de Lewis | 154 |
| Figura 38. | Efecto protector de los aceites esenciales de <i>L. alba</i> , <i>A. triphylla</i> , <i>L. armata</i> , <i>X. aromatica</i> , <i>S. brownei</i> , vitamina E y BHA (10 g/kg), contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe ²⁺ en presencia de O ₂ . | 156 |
| Figura 39. | Perfiles cromatográficos del hexanal [*] (medido como su derivado C ₆ -PFPH) en diferentes sistemas sometidos a oxidación: I. Ácido linoleico (Blanco); II. Ácido linoleico + BHA (10 g/L); III. Ácido linoleico + Aceite esencial de <i>L. armata</i> (10 g/L); IV. Ácido linoleico + Vitamina E (10 g/L). Columna HP-5 (30 m). ECD. | 157 |
| Figura 40. | Reacciones del α-tocoferol (TOH) con radicales alquílicos. | 159 |
| Figura 41. | Porcentaje de inhibición del catión-radical ABTS ⁺ , en función de la cantidad de Trolox (λ = 734 nm). | 164 |
| Figura 42. | Capacidad de los aceites esenciales evaluados para atrapar el catión-radical ABTS ⁺ , en función de su concentración en la solución, medida como % de inhibición del catión-radical. | 164 |
| Figura 43. | Concentración efectiva media, EC ₅₀ , del ácido ascórbico, medida en función de la disminución de la cantidad del radical DPPH. | 166 |
| Figura 44. | Posible mecanismo de acción del ácido ascórbico frente al radical DPPH. | 166 |
| Figura 45. | Determinación del estado estacionario de la reacción de los aceites esenciales con el radical DPPH, medido en función de la disminución de su absorbancia. | 167 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Figura 46. | Posible reacción entre una nitrona y un radical HO. | 186 |
| Figura 47. | Posible reacción de aminas secundarias con el radical DPPH·. | 192 |
| Figura 48 | Posibles reacciones secundarias entre radicales amino y radicales DPPH·. | 192 |
| Figura 49. | Relación entre los valores de la actividad antioxidante observados y calculados mediante la ecuación de MLR para los 70 compuestos nitrogenados sintéticos evaluados. | 198 |
| Figura 50. | Análisis de componentes principales de los 70 compuestos sintéticos nitrogenados empleados. | 199 |
| Figura 51. | Estructuras del grupo de moléculas usadas para el Modelo 1. | 202 |
| Figura 52. | Relación entre el efecto protector observado y calculado del grupo de moléculas correspondiente al Modelo 1. | 203 |
| Figura 53. | Estructuras del grupo de moléculas usadas para el Modelo 2. | 205 |
| Figura 54. | Actividad antioxidante experimental Vs actividad antioxidante calculada correspondiente al Modelo 2. | 206 |
| Figura 55. | Estructuras del grupo de moléculas usadas para el Modelo 3. | 207 |
| Figura 56 | Actividad antioxidante experimental Vs actividad antioxidante calculada para el Modelo 3. | 208 |
| Figura 57. | Estructuras del grupo de moléculas usadas para el Modelo 4. | 209 |
| Figura 58. | Correlación de la actividad antioxidante experimental Vs la calculada para el grupo de moléculas correspondientes al Modelo 4. | 210 |
| Figura 59. | Estructuras del grupo de moléculas usadas para el Modelo 5. | 210 |
| Figura 60. | Correlación de la actividad antioxidante experimental Vs la calculada para el grupo de moléculas correspondientes al Modelo 5. | 212 |
| Figura 61. | Correlación entre los valores de TEAC, obtenidos por el método ABTS ⁺ y los calculados de los compuestos sintéticos nitrogenados. | 216 |
| Figura 62. | Correlación entre los valores de EC ₅₀ obtenidos por el método DPPH· y los calculados de los compuestos sintéticos nitrogenados. | 217 |
| Figura 63. | Estructuras de los compuestos sintéticos nitrogenados que presentaron mayor actividad antioxidante. | 223 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Anexo 1. Publicaciones y participaciones en Congresos científicos. | 242 |
| Anexo 2. Contribuciones de cada compuesto de <i>L. alba</i> , <i>L. armata</i> , <i>A. triphylla</i> , <i>X. aromatica</i> y <i>S. brownei</i> a los componentes principales, usados para clasificar las fracciones volátiles obtenidas por las diferentes técnicas de extracción. | 247 |
| Anexo 3. Estados estacionarios de 37 compuestos nitrogenados sintéticos durante la reacción con el radical DPPH, $\lambda = 534$ nm. | 259 |
| Anexo 4. Tablas de correlación entre el efecto protector medido experimentalmente y el calculado de los compuestos sintéticos nitrogenados. | 272 |

RESUMEN

TÍTULO

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS TROPICALES Y COMPUESTOS SINTÉTICOS NITROGENADOS*

AUTOR

BEATRIZ EUGENIA JARAMILLO COLORADO**

PALABRAS CLAVES

Antioxidantes, aceites esenciales, volátiles, productos naturales, compuestos carbonílicos, HRGC, compuestos nitrogenados, bencilaminas, tetrahydroquinolinas, nitronas, 2-benzazepinas, ABTS⁺, DPPH, UV-VIS.

DESCRIPCIÓN

Se estudió la actividad antioxidante *in vitro* de 5 aceites esenciales de plantas autóctonas colombianas, a saber: *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills, *Aloysia triphylla* (L'Héritier) Britton, *Lantana armata* Schauer, *Xylopiya aromatica* Lamarck y *Satureja brownei* Briq., y la de 70 compuestos sintéticos nitrogenados, derivados de bencilaminas, tetrahydroquinolinas, 2benzazepinas y Nóxidos, que en otros ensayos han presentado algún tipo de actividad biológica.

La composición química de los aceites esenciales y las fracciones volátiles de las plantas fueron exhaustivamente analizadas usando diferentes métodos destilativos, extractivos y de *headspace*, para caracterizar los aceites y extractos completamente, debido a que no todas las sustancias presentes en ellos, son las responsables de su actividad antioxidante, mientras que compuestos presentes en baja concentración, sí pueden contribuir a dicha actividad.

Se usaron dos métodos para determinar la actividad antioxidante de las sustancias estudiadas, el primero midió el grado de protección, que proporcionan las sustancias evaluadas contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, acelerada por Fe²⁺ en presencia de O₂, empleando HRGC-ECD y HRGC-FID. El segundo método empleado, evaluó la capacidad de moléculas o mezclas (aceites esenciales) para atrapar radicales utilizando los ensayos de decoloración del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH, y la espectroscopía UV-VIS.

Los aceites esenciales estudiados por el método de la inhibición de la oxidación lipídica mostraron a las mismas concentraciones, una actividad antioxidante *in vitro* similar o mayor de las de la vitamina E y del BHA. De las sustancias nitrogenadas evaluadas por este método, las nitronas mostraron mayor efecto antioxidante. Los aceites esenciales y las sustancias sintéticas nitrogenadas presentaron una capacidad de atrapar radicales baja, inferior a los compuestos de referencia (ácido ascórbico, vitamina E, BHA y BHT), pero se destaca la capacidad de atrapamiento de la 6-fluoro-4-metil-2-propil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina.

Se estableció la relación cuantitativa entre la estructura (QSAR) de 70 compuestos sintéticos nitrogenados y su actividad antioxidante.

*Tesis doctoral

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Elena E. Stashenko.

SUMMARY

TITLE

STUDY OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY *IN VITRO* OF ESSENTIAL OILS OF TROPICAL PLANTS AND SYNTHETIC NITROGENATED COMPOUNDS *

AUTHOR

BEATRIZ EUGENIA JARAMILLO COLORADO * *

KEYWORDS

Antioxidant, essential oils, volatiles, natural products, carbonyl compounds, HRGC, nitrogenated compounds, benzylamine, tetrahydroquinoline, nitron, 2benzazepine, ABTS⁺, DPPH, UV-VIS.

DESCRIPTION

The *in vitro* antioxidant activity of five essential oils of Colombian native plants, that is: *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills, *Aloysia triphylla* (L'Héritier) Britton, *Lantana amata* Schauer, *Xylopiá aromática* Lamarck y *Satureja brownei* Briq., was studied. Furthermore, 70 synthetic nitrogenated compounds derived of benzylamines, tetrahydroquinolines, 2-benzazepines and N-oxides were studied too. They have presented some type of biological activity in other researches.

The chemical composition of the essential oils and the volatile fractions of the plants were analyzed using destilative, extractive and headspace methods, to characterize the oils and extracts completely, because not all the present substances in them are those responsible for their antioxidant activity, while present compounds in low concentration, yes they can contribute to this activity.

Two methods were used to determine the antioxidant activity of the substances studied, the first one measured the protecting effect against lipid peroxidation of the linoleic acid in emulsion, induced by Fe²⁺ in presence of O₂, using HRGC-ECD and HRGC-FID. The second method used, it evaluated the capacity of molecules or mixtures (oil essentials) of radical scavenger using the ABTS⁺ and DPPH assays, and UV-VIS spectroscopy.

The essential oils studied by the method of the protecting effect against lipid peroxidation showed to the same concentrations, an *in vitro* antioxidant activity similar or bigger than those of the vitamin E and BHA. Nitrogenated substances evaluated by this method, the nitrones showed the biggest antioxidant effect. The essential oils and the synthetic nitrogenated substances presented a low capacity radical scavenger compared with reference compounds (ascorbic acid, vitamin E, BHA and BHT), but, the 6-fluor-4-methyl-2-propyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline exhibited the biggest antioxidant activity

The Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) was determined between the structure of 70 synthetic nitrogenated compounds and its antioxidant activity.

* Doctoral thesis

* * Faculty of Science, School of Chemistry, Elena E. Stashenko.

INTRODUCCIÓN

En esta investigación se estudió la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales y compuestos sintéticos nitrogenados. Para ello, se emplearon cinco plantas autóctonas colombianas, a saber: *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills, *Aloysia triphylla* (L'Héritier) Britton, *Lantana armata* Schauer, *Xylopiya aromatica* Lamarck y *Satureja brownei* Briq., cuya actividad antioxidante no ha sido reportada hasta el momento. La composición química de los aceites esenciales y las fracciones volátiles de estas plantas fueron exhaustivamente analizadas usando diferentes métodos destilativos, extractivos y de *headspace*, ya que es muy importante caracterizar los aceites y extractos completamente, debido a que no todas las sustancias presentes en ellos, son las responsables de su actividad antioxidante, mientras que compuestos presentes en concentración baja, sí pueden contribuir a dicha actividad. También se estudió la actividad antioxidante *in vitro* de 70 sustancias sintéticas nitrogenadas, derivadas de bencilaminas, tetrahydroquinolinas, 2-benzazepinas y N-óxidos, que en otros ensayos han presentado algún tipo de actividad biológica.

El desarrollo industrial creciente, para satisfacer las necesidades de la sociedad y lograr el bienestar de la población, ha impulsado la búsqueda de sustancias de origen natural y/o sintético que puedan presentar algún tipo de actividad, ya sea de tipo fungicida, bactericida, farmacológica y antioxidante, entre otros. Entre las sustancias naturales con aplicación amplia, figuran los aceites esenciales, constituidos por una mezcla compleja de metabolitos secundarios volátiles de plantas, de naturaleza química variable [1]. Los aceites esenciales son de gran utilidad en diversas ramas de la industria, a saber: fragancias, aromas y sabores, como biorreguladores en agroquímica, sustancias de partida en química orgánica fina, pinturas, textiles, empaques plásticos y en la farmacología, entre otras [2-4].

Colombia es un país con una flora rica, muy diversa, aún poco estudiada; por lo que ha sido centro de atención de expedicionarios e investigadores extranjeros en busca de plantas con componentes activos de utilidad principalmente en farmacología y medicina. A nivel nacional, sólo una pequeña parte de esta gran riqueza vegetal ha sido explorada. Por ello, es necesario llevar a cabo la permanente búsqueda de especies vegetales promisorias, que pueden contribuir al desarrollo tecno-científico del país y al bienestar de su gente.

Las plantas de la familia *Verbenaceae* llaman la atención de los investigadores no sólo por su alta diversidad botánica, su abundante y amplia distribución en todo el mundo, sino también por su variable uso. La familia *Annonaceae*, por su parte, comprende numerosas especies, muchas de ellas cultivadas por sus frutos comestibles, ricos y agradables al paladar, además, porque varias de sus especies tienen células oleíferas. Las especies pertenecientes a la familia *Labiatae* también han sido ampliamente investigadas, porque todas, particularmente, en sus hojas, contienen aceites esenciales [5,6]. Teniendo en cuenta estas características, se escogieron para este estudio tres plantas de la familia *Verbenaceae*, a saber: *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills, *Aloysia triphylla* (L'Héritier) Britton y *Lantana armata* Schauer; una, de la familia *Annonaceae*, *Xylopiya aromatica* Lamarck, y una de la familia *Lamiaceae*, i.e. *Satureja brownei* Briq.; todas originarias del continente americano, con extensos usos, a nivel etnobotánico, generalmente, como plantas medicinales [5-20].

La *L. alba*, es conocida también como *Lippia geniculata* HBK o *Lantana alba* Mill y, en Colombia, por sus nombres populares "Pronto alivio", "Curatodo" y "Orégano de cerro". Esta especie es un subarbusto muy aromático, está ampliamente distribuida y crece espontáneamente en Centro y Sur América [5, 8]. La planta se caracteriza por su olor intenso, penetrante y contiene de 0.1 a 1.2% del aceite

volátil [5]. Los extractos y aceites esenciales de esta especie han presentado propiedades anti-inflamatorias, bactericidas y antifúngicas [7,9].

La *A. triphylla*, denominada también como *Aloysia citriodora* Ortega ex Pers., *Verbena triphylla* L'Héritier y *Lippia citriodora* Kunth. En Colombia, se le llama popularmente "Cidrón" y "Limón verbena". Es una planta espontánea de América del Sur. Las partes aéreas contienen 0.2-1% de aceite esencial [5]. En varios trabajos se reportan propiedades biológicas del aceite esencial de *A. triphylla* y/o algunos de sus componentes, a saber: antidiarréica [10], antimicótica [11], psicotrópica [12], analgésica y anti-inflamatoria [13], entre otras.

La *L. armata*, se conoce también como *Lantana camara* L., *Camara vulgaris* Benth, *Lantana aculeata* L. y, en Colombia, popularmente, como "Venturosa", "Gurupacha" y "Carraquillo"; se extiende a lo largo de América Central y del Sur [5, 14]. Su aceite esencial ha presentado propiedades insecticidas, nematocidas, bactericidas y fungicidas [8, 15-18].

La *Xylopia aromatica* Lamarck pertenece a la familia *Annonaceae*, muy común en América tropical; se encuentra distribuida desde América Central y las Antillas hasta el sur de Brasil; el nombre popular, que se le da en Colombia, es "Achón", "Fruta de burro", "Malaguita" o "Sembe" [5, 6]. El aceite esencial obtenido de los frutos de la *X. aromatica* ha sido usado en la preparación de cosméticos y productos alimenticios [19]. La planta también ha presentado propiedades antisépticas, analgésicas y actividad insecticida [6, 19, 20].

La *S. brownei*, identificada también como *Thymus brownei* Swartz, *Clinopodium brownei* Kuntze, *Micromeria brownei* Bentham, es una planta autóctona que pertenece a la familia *Labiatae*; se distribuye desde el sur de los Estados Unidos hasta Brasil y Paraguay. Se conoce popularmente como "Poleo" y "Ajedrea" [5, 6]. Todas las especies de esta familia contienen aceite esencial, concentrado,

particularmente, en sus hojas. Se usa como condimento, especialmente, de carnes; en la medicina popular se utiliza la decocción o infusión de toda la planta como antigripal, estomáquico y carminativo [5, 6].

Por ser de origen natural, la composición química de las esencias varía mucho y depende, entre otros, de los siguientes factores: el método y la duración de la extracción, la temperatura de este proceso, el estado y la procedencia de la planta, y las condiciones geobotánicas y agrícolas de su cultivo, entre otros [21]. El valor económico y la aplicación industrial de las esencias están directamente relacionados con su composición química; la que, a su vez, determina todas las propiedades macroscópicas e.g. físico-químicas (olor, color, etc.) y la actividad biológica [21, 22]. Es por ello, que el establecimiento de la composición química de aceites esenciales es una tarea analítica importante, que requiere usar la combinación de diferentes métodos de extracción y de su análisis instrumental exhaustivo, utilizando técnicas de separación, detección e identificación, sensibles y específicas, tales como la cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Es por ello, que en esta investigación se emplearon y compararon varias técnicas destilativas y extractivas, tales como la hidrodestilación (HD), hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), destilación con vapor-extracción simultánea con solvente (SDE) y extracción con fluido supercrítico (SFE); además, para analizar la composición *per se* de la fragancia de las plantas se emplearon técnicas de *headspace*, dinámico (P&T), estático (S-HS) y la microextracción en fase sólida (SPME) en modo *headspace*.

Para estudiar la incidencia del método de extracción sobre la composición química final del extracto, obtenido por diferentes técnicas destilativas y extractivas (HD, MWHD, SDE y SFE) y de *headspace* (S-HS, P&T y HS-SPME), se llevó a cabo la comparación de la composición química de los extractos, por medio del análisis estadístico de componentes principales (PCA).

Muchos aceites esenciales se utilizan en medicina folclórica, aromaterapia, industrias farmacéutica y cosmética no sólo por sus fragancias agradables y/o como enmascaradores, sino debido a sus diversas actividades biológicas (bactericidas, fungicidas, antiparasitarias, etc), entre las cuales se destaca la actividad antioxidante. La última fue el objeto de nuestro estudio, donde se emplearon diferentes métodos para su medición. El primero, usó un sistema lipídico modelo, para medir el grado de protección, que proporcionan los componentes de los aceites (*L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei*) contra la oxidación del ácido linoleico, acelerada por Fe^{2+} en presencia de O_2 . El segundo, permitió evaluar la capacidad atrapadora de radicales (ABTS⁺ y DPPH) de los aceites bajo estudio.

Las sustancias promisorias como fuentes de antioxidantes, pueden ser tanto de origen natural, como obtenidas por medio de la síntesis orgánica fina [23, 24]. La síntesis y búsqueda de nuevas y aún más efectivas sustancias antioxidantes es una labor dispendiosa y costosa; sin embargo, la sociedad impone y exige antioxidantes más efectivos, menos tóxicos, su búsqueda adquiere cada día mayor importancia y compromete a muchos laboratorios y compañías farmacéuticas del mundo con el descubrimiento y la síntesis de tales moléculas. Es por ello, que en este estudio también han sido estudiados compuestos sintéticos nitrogenados, e.g. las tetrahydroquinolinas, nitronas, bencilaminas, 2-benzazepinas, para muchos de los cuales ya han sido establecidas actividades biológicas, tales como antifúngica, antiparasitaria, pesticida, psicomotora, antiinflamatoria, entre otras [25-29]. En este estudio, en particular, se evaluó la actividad antioxidante de 37 derivados de bencilaminas, 12 tetrahydroquinolinas, 7 benzazepinas y 14 nitronas, sintetizadas en el Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina de la Universidad Industrial de Santander, dirigido por los profesores Drs. Vladimir Kouznetsov y Alirio Palma.

Frecuentemente, los antioxidantes se adicionan a los productos alimenticios, ya que la oxidación de moléculas con insaturaciones (e.g. ácidos grasos poliinsaturados) es responsable por la formación del *off-flavour*, aroma y sabor desagradables o rancidez. A los alimentos, ricos en grasas, es necesario agregarles antioxidantes; por lo general, se añaden compuestos sintéticos (BHA, BHT, galato de propilo) y/o también naturales, e.g. las vitaminas A, E y carotenos, que actúan como secuestradores de radicales o previenen la descomposición de los peróxidos, formados en el sistema, a compuestos oxigenados de bajo peso molecular [30-32].

En los sistemas vivos existen múltiples reacciones de óxido-reducción, que son imprescindibles para la vida. Sin embargo, la oxidación puede ser también una fuente de enfermedades, cuando se pierde el equilibrio entre oxidantes (generalmente, especies reactivas de oxígeno) y antioxidantes, a favor de los primeros, lo cual se conoce como estrés oxidativo [33-35]. Muchos de los oxidantes son radicales, especies químicas muy inestables, reactivos y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse, inespecíficamente con la diversidad de moléculas, integrantes de estructuras celulares, a saber: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos [35]. La aterosclerosis, el envejecimiento prematuro y el cáncer, por citar sólo algunos ejemplos, son una pequeña parte de una enorme lista de problemas y padecimientos, que de alguna manera, son asociados a los oxidantes, estrés oxidativo y los radicales [35-37]. Es por eso, que en algunas ocasiones es necesario suministrar antioxidantes adicionales en la dieta humana.

La actividad antioxidante de una sustancia depende, entre otros factores, del sustrato atacado por los radicales y del mecanismo de esta interacción. En general, los antioxidantes se dividen en tres grupos principales, a saber: antioxidantes preventivos, secuestradores de radicales y de reparación o *de novo* [35].

La técnica analítica para medir la actividad antioxidante, se escoge de acuerdo con el objetivo del ensayo. Es decir, cuando se evalúa el mecanismo de acción antioxidante, se pueden emplear técnicas de estudio de atrapamiento de radicales, pero si se evalúa la capacidad de protección de un sustrato contra el deterioro oxidativo, se realiza el seguimiento de compuestos, tanto degradados como generados durante la oxidación. Las espectroscopías, ESR (espectroscopía de resonancia electrónica de espín) y UV-VIS (ultravioleta-visible), se usan en los ensayos de atrapamiento de radicales, dentro de los cuales los más utilizados son el del catión-radical ácido 2,2'-azino-*bis*-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) (ABTS⁺) y el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH); mientras que las técnicas IR, HPLC y los métodos calorimétricos, conductimétricos y titrimétricos, generalmente, se usan para determinar los compuestos generados o algunos productos de degradación durante la oxidación de un sustrato [38, 39]. En general las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) son ampliamente utilizadas para el análisis de aldehídos, cetonas, alcoholes, hidroperóxidos y ácidos grasos [38, 39].

Frecuentemente, las sustancias carbonílicas volátiles y semivolátiles se usan como indicadores de la rancidez provocada por la descomposición de peróxidos e hidroperóxidos [32]. Desde el punto de vista analítico, la detección y cuantificación de los compuestos carbonílicos en diferentes matrices tienen marcadas dificultades, ya que son altamente reactivos, térmicamente inestables, muy volátiles y se encuentran en bajas concentraciones (ppt, ppb), además, su análisis cromatográfico con detectores convencionales tales como el FID (detector de ionización en llama) o TCD (detector de conductividad térmica), genera una respuesta baja. La solución a este problema ha sido la derivación de los compuestos carbonílicos a productos más estables, no volátiles, preferiblemente, insolubles en agua, y con grupos funcionales que permitan obtener respuesta selectiva y sensible con detectores, e.g. NPD (detector de nitrógeno-fósforo), ECD

(detector de captura de electrones) y MS/SIM (detector selectivo de masas operado en el modo de monitoreo del ión seleccionado) [40-45].

La actividad antioxidante de los aceites esenciales y las sustancias sintéticas nitrogenadas se determinó usando dos métodos, a saber: el primero midió la capacidad inhibitoria de la oxidación lipídica del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe^{2+} en presencia de O_2 , y el segundo la capacidad para atrapar radicales (en este caso el radical DPPH y el catión-radical ABTS⁺).

La capacidad inhibitoria de la oxidación lipídica se midió monitoreando el hexanal, principal compuesto carbonílico, formado en la oxidación de la emulsión de ácido linoleico, que se empleó como sistema lipídico modelo y fue sometida a un proceso de oxidación “acelerada” por iones metálicos (Fe^{2+}) en presencia de O_2 . Para evaluar el efecto protector de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei*, se determinó la cantidad del hexanal, generado durante la lipoxidación, en la forma de su derivado hidrazónico, tanto en la fase condensada, como en la fase vapor, empleando los métodos de extracción líquido-líquido y HS-SPME, respectivamente; usando la técnica analítica instrumental GC-ECD. También se midió por GC-FID el ácido linoleico remanente en el sistema, en forma de su metiléster. Por el método de la inhibición de la oxidación lipídica, los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla* y *X. aromatica*, mostraron a las mismas concentraciones, una actividad antioxidante *in vitro* similar o mayor de las de la vitamina E y del BHA, antioxidantes natural y sintético ampliamente usados en la industria, mientras que el aceite esencial de *S. brownei*, presentó una actividad antioxidante relativamente baja. De las sustancias nitrogenadas evaluadas en este trabajo, las nitronas mostraron mayor efecto antioxidante, medido en la emulsión del ácido linoleico.

El segundo método empleado evaluó la capacidad de moléculas o mezclas (aceites esenciales) para atrapar radicales utilizando los ensayos de

descoloramiento del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH y la espectroscopía UV-Vis.

Todos los aceites esenciales evaluados en este trabajo presentaron una capacidad de atrapar radicales baja, inferior a los compuestos de referencia (ácido ascórbico, vitamina E, BHA y BHT).

Es de destacar, que una de las tetrahydroquinolinas, *i.e.* 6-fluoro-4-metil-2-propil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina, presentó una capacidad de atrapar radicales igual o superior a la de antioxidantes de referencia como la vitamina E, BHA, BHT y el ácido ascórbico; mientras que los demás compuestos nitrogenados mostraron una capacidad de atrapar radicales más baja que estos compuestos antioxidantes.

Para entender mejor cómo está relacionada la estructura de compuestos sintéticos estudiados con su actividad antioxidante, *i.e.* atrapadora de radicales, se realizó un estudio teórico tipo QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), hallando las propiedades constitucionales, geométricas, topológicas, electrostáticas y de energía de las moléculas, por medio de sus descriptores moleculares, los cuales se obtuvieron empleando diferentes programas computacionales. La actividad antioxidante “teórica” se relacionó con los datos experimentales obtenidos mediante los métodos estadísticos de regresión lineal múltiple (MLR) y análisis de componentes principales (PCA).

Los resultados de la presente investigación, de alguna manera, pueden hacer su modesta contribución al desarrollo tecnológico y científico del país, siendo de interés para las industrias farmacéutica, de alimentos, cosmética, perfumería y para aquellas empresas, que produzcan y/o utilicen aceites esenciales y antioxidantes naturales y/o sintéticos.

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatografía, adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, de la Universidad Industrial de Santander, el cual aportó la infraestructura, equipos, bases de datos actualizadas y elementos necesarios para la realización de este trabajo.

Los resultados parciales fueron publicados en revistas internacionales y nacionales, *i.e.* *Journal of Chromatography A*, la Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y la Revista Arte y Ciencia Cosmética (Véase **Anexo 1**). Además, se divulgaron en eventos científicos de carácter internacional y nacional, que se enumeran a continuación:

- *24th International Symposium on Capillary Chromatography and Electrophoresis*, Las Vegas, EE.UU., mayo 20-24, 2001;
- XII Congreso Colombiano de Química, Asociación Química Colombiana, Bogotá, septiembre 5-7, 2001;
- IX Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines COLACRO, Cartagena de Indias, Colombia, febrero 20-22, 2002;
- *25th International Symposium on Capillary Chromatography*, Riva del Garda, Italia, mayo 13-17, 2002;
- *3rd Int. Symposium on Separations in Bioscience SBS 2003, Russian Academy of Sciences*, "100 years of Chromatography". Moscú, Rusia, mayo 13-18, 2003;
- XVI Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos COLAMIQC, Cartagena de Indias, Colombia, septiembre 15-18, 2003;

- *GDCh-Jahrestagung Chemie 2003, 32 Deutscher Lebensmittelchemkertag*, München, Alemania, octubre 6-11, 2003;
- *25th International Symposium on Chromatography*, Paris, Francia, octubre 4-8, 2004.
- *Tenth Latin American Congress on Chromatography and Related Techniques*, Campos do Jordão, Brasil, octubre 18-22, 2004.

El trabajo, titulado: “Análisis de compuestos volátiles y semivolátiles de tres plantas de la familia *Verbenaceae* y evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de sus aceites esenciales”, presentado en el **XVI Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos**, realizado en Cartagena del 15 al 18 de septiembre de 2003, obtuvo **el Premio de la Cámara de Productos de Aseo y Cosméticos de la ANDI**.

La disertación consta de 3 capítulos, contiene 37 tablas, 63 figuras y 4 anexos; además de su respectiva lista bibliográfica después de cada capítulo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAERHEIM SVENDSEN, A. and SCHEFFER, J.J.C. (Editors), **1985**. Essential oils and aromatic plants, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, p.p. 107, 108, 115.
2. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y FUNDACOFAN, **2002**. "Informe Final: Estudio del mercado nacional de aceites esenciales", Bogotá, p.p. 18-21.
3. TIZIANA BARATA, M.; DAMIEN D, H.J.; DEANS, S.G.; FIQUEREIDO, A.C.; BARROSO, J.G., and RUBERTO, G., **1998**. "Antimicrobial and antioxidant properties of some comercial essential oils". *Flavour Fragr. J.*, **13**, p.p. 235-244.
4. ABURJARAI, T. and NATSHEH, F.M., **2003**. "Plants used in cosmetics". *Phytotherapy Res.*, **17** (9), p.p. 987-1000.
5. GARCÍA B, H., **1992**. Flora Medicinal de Colombia, Tercer Mundo Editores, Bogotá, Tomo I (*Annonaceae*) p.p. 341, Tomo II (*Verbenaceae*) p.p. 495-507, Tomo III (*Labiatae*) p.p. 37.
6. CORREA Q, J.E. y BERNAL M, H.Y., **1989**. Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello, Editorial Guadalupe, Bogotá, Tomo I (*Annonaceae*), p.p. 269-271. Tomo X (*Labiatae*), p.p. 179-183.
7. PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M.E.; VILLAR, A., **2001**. "*Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review". *J. Ethnopharm.*, **76**, p.p. 201-214.
8. GUPTA, M.P., (Editor), **1995**. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas, CYTED-SECAB, Editorial Presencia, Bogotá, 617 p.
9. PINO, J.A.; ORTEGA, A.G.; ROSADO, A.; RODRÍGUEZ, M., and BALUJAR, R., **1997**. "Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* Mill. N.E Brown". *Rev. Cubana Farm.*, **30** (1), p.p. 1-8.
10. PÉREZ, S.G.; ZAVALA, M.A.; VARGAS, R.; PÉREZ, C., and PÉREZ, R.M., **1998**. "Antidiarrheal activity of C-9 aldehyde isolated from *Aloysia triphylla*". *Phytotherapy Res.*, **12**, p.p. S45-S46.

11. GUERRERA, P.M.; LEPORATTI, M.L.; FODDAI, S.; MORETTO, D., and MERCANTINI, R., **1995**. "Antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia citriodora* Kunth. (*Aloysia triphylla* Britton)". *Rev. Italiana EPPOS.*, 15, p.p. 23-25.
12. WANMACHER, L.; FUCHS, F.D.; PAOLI, C.L.; FILMAN, C.H.; GIANLUPI, A., and LUBIANCA, N., **1990**. "Plants employed in the treatment of anxiety and insomnia: II. Effect of infusions *Aloysia triphylla* on experimental anxiety in normal volunteers". *Fitoterapia*, 61, p.p. 449-453.
13. NAKAMURA, I.; OKUYAMA, E.; TSUKADA, A.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M.; NISHIBE, S., and DEYAMA, T., **1997**. "Acteoside as the analgesic principle of cedron (*Lippia triphylla*), a peruvian medicinal plant". *Chem. Pharm. Bull.*, 45, p.p. 499-504.
14. GENTRY, A.H., **1993**. A Field guide to the families and genera of woody plants of northwest, South America (Colombia, Ecuador and Peru), Conservation International, Washington, D.C., 895 p.
15. BOUDA, H.; TAPONDJOU, L.A.; FONTEM, D.A.; GUMEDZOE, M.Y.D., **2001**. "Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae)". *J. Stor. Res.*, 37, p.p. 103-109.
16. ADEBAYO, T. A.; GBOLADE, A. A.; OLAIFA, J. I., **1999**. "Comparative study of toxicity of some essential oils to larvae of three mosquito species". *Niger. J. Nat. Prod. Med.*, 3, p.p. 74-76.
17. BEGUM, S.; WAHAB, A.; SIDDIQUI, B.S.; QAMAR, F., **2000**. "Nematicidal constituents of the parts of *Lantana camara*". *J. Nat. Prod.*, 63, p.p. 765-767.
18. DEENA, M.J. and THOPPIL, J.E., **2000**. "Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*". *Fitoterapia*, 71, p.p. 453-455.
19. EKUNDAYO. O., **1989**. "A Review of the volatiles of the *Annonaceae*". *J. Essent. Oil Res.*, 1, p.p. 223-245.

20. FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; CHARLES, B.; FOURNIAT, J.; LEBOEUF, M., and CAVÉ, A., **1994**. "Chemical and biological studies of *Xylopiá aromática* stem bark and leaf oils". *Planta Med.*, 60, p.p. 283-284.
21. BANDONI, A. (Editor), **2000**. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. CYTED. Editorial de la Universidad de La Plata, La Plata, 410 p.
22. STASHENKO, E.E., JARAMILLO, B.E. and MARTÍNEZ, J.R., **2003**. "Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia *Verbenaceae*". *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 27 (105), p.p. 579-597.
23. PRYOR, W.A.; STRICKLAND, T. and CHURCH, D.F., **1988**. "Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions". *J. Am. Chem. Soc.*, 110, p.p. 2224-2229.
24. VALENZUELA, A. and NIETO, K., **1996**. "Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors". *Grasas y Aceites*, 47, (3), p.p. 186-19.
25. KOUZNETSOV, V.; URBINA, J.; PALMA, A.; LÓPEZ, S., *et al.*, **2000**. "Synthesis and *in vitro* antifungal properties of 4-aryl-4-N-arylamino-1-butenes and related compounds". *Molecules*, 5, p.p. 428-430.
26. KOUZNETSOV, V.; PALMA, A.; SALAS, S., *et al.*, **1997**. "Chemistry of functionalized benzazepines. 5 [1]. Synthesis and chemical transformation of the 1,2,4,5-tetrahydrospiro-[3H-2-benzazepine-3,1'-cycloalkanes]". *J. Heterocyc. Chem.*, 34, p.p. 1591-1595.
27. KOUZNETSOV, V.; VARGAS, L.Y.; TIBADUIZA, O.C., *et al.*, **2004**. "4-Aryl(benzyl)amino-4-heteroarylbut-1-enes as building blocks in heterocyclic synthesis. 4. Synthesis of 4,6-dimethyl-5-nitro(amino)-2-pyridylquinolines and their antiparasitic activities". *Archiv. der Pharmazie*, 337 (3), p.p. 137-132.
28. MACDONALD, G. J.; BRANCH, C. L.; HADLEY, M. S., *et al.*, **2003**. "Design and synthesis of *trans*-3-(2-(4-((3-(3-(5-Methyl-1,2,4-oxadiazolyl)) phenyl) carboxamido) cyclohexyl) ethyl)-7-methylsulfonyl-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-3-benzazepine (SB-414796): a potent and selective dopamine D₃ receptor antagonist". *J. Med. Chem.*, 46 (23), p.p. 4952-4964.

29. FEVIG, T.; BOWEN, S.M.; JANOWICK, D.A.; JONES, B.K., and MUNSON, R., **1996**. "Design, synthesis and *in vitro* evaluation of cyclic nitrones as free radical traps for the treatment of stroke". *J. Med. Chem.*, 39, p.p. 4988-4996.
30. POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N. and GORDON, M. (Editors), **2001**. Antioxidants in Food. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 380 p.
31. MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S. and SALUNKHE, D.K. (Editors), **1996**. "Food Antioxidants: technological, and health perspectives". Marcel Dekker Inc., New York, p.p. 74, 75, 195.
32. BADUI, S., **1996**. Química de los Alimentos. Alhambra Mexicana, México, 251 p.
33. HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C., **1989**. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford, 543 p.
34. PERKINS, M. J., **1994**. Radical Chemistry. Ellis Horwood, New York, 182 p.
35. GUTTERIDGE, J. and HALLIWELL, B., **1994**. Antioxidants in nutrition; health and disease, Oxford University Press, New York, 143 p.
36. ELEJALDE GUERRA, J.I., **2001**. "Oxidación, entre la vida y la enfermedad". *Anal. Med. Interna (Madrid)*, 8 (1), p.p. 1-4.
37. AHMAD, S., **1995**. Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Chapman & Hall, New York, 511 p.
38. MOYA, M.; MENDOZA, D. and AMEZQUITA, F., **1999**. "Analytical evaluations of polyunsaturated fatty acids degradation during thermal oxidation of edible oils by fourier transform infrared spectroscopy". *Talanta*, 50, p.p. 269-275.
39. HENDERSON, D.E. and SLIKMAN, M., **1999**. "Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: a comparative study against BHT and melatonin". *J. Agric. Food Chem.*, 47 (7), p.p. 2563-2570.

40. ESTERBAUER, H. and ZOLLMER, H., **1989**. "Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products". *Free Rad. Biol. Med.*, 7, p.p. 197-203.
41. ESTERBAUER, H.; SCHAUER, R.D. and ZOLLMER, H., **1991**. "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes". *Free Rad. Biol. Med.*, 11, p.p. 81-128.
42. MOORE, K., and ROBERTS, L.J., **1998**. "Measurement of lipid peroxidation". *Free Rad. Res.*, 28 (6), p.p. 659-671.
43. STASHENKO E.E., PUERTAS, M.A.; SALGAR, W.; DELGADO, W., and MARTINEZ J. R., **2000**. "Solid phase microextraction with on fibre derivatization applied to the analysis of volatile carbonyl compounds". *J. Chromatogr. A.*, 886, p.p. 175-181.
44. STASHENKO, E.E; FERREIRA, MC; SEQUEDA, L.G; MARTINEZ, J.R., and WONG, J.W., **1997**. Comparison of extraction methods and detection system in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds". *J. Chromatogr. A.*, 779:, p.p. 360-369.
45. STASHENKO E.E.; WONG J.W.; MARTINEZ J. R.; MATEUS A., and SHIBAMOTO T., **1996**. "High resolution gas chromatography with nitrogen-phosphorous detection of saturated volatile aldehydes with 2-hydrazinobenzothiazole. *J. Chromatogr., A.*, 752, p.p. 209-216.

1. PARTE EXPERIMENTAL

1.1. MATERIALES Y REACTIVOS

Solventes: Agua, diclorometano, hexano, trifluoruro de boro en metanol (solución al 20 %), *ter*-butilmetiléter se compraron a *Merck* (Darmstadt, Alemania) y fueron grado HPLC, el metanol y el etanol se adquirieron en *Riedel-de Haën* de *Sigma-Aldrich* (Buchs, Suiza) y el acetonitrilo a *J.T. Baker* de *Mallinckrodt Baker, Inc.*, (Phillipsburg, NJ, EE.UU.)

Compuestos patrón: *n*-Tetradecano, (S)-(-)- α - pineno, ácido ascórbico, persulfato de potasio, (*ter*-butil)-4-metoxifenol (BHA), sulfato de hierro, sulfato de sodio, dodecil sulfato de sodio, *Tris* [2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol] y cloruro de potasio se compraron a *Merck* (Darmstadt, Alemania).

Limoneno, óxidos de limoneno (97%, mezcla de *cis*- y *trans*-), (S)-(+)-carvona (96%), (R)- (-)-carvona (98%), dihidrocarvona (98%), α -terpineol (90%), eugenol (99%), citral (*cis*-isómero, 64% y *trans*-isómero, 32%), α -terpineno (85%), γ -terpineno (97%), dihidrocarveol (95%), 1,8-cineol (99%), (-) *trans*- β -cariofileno (98%), geraniol (98%), farnesol (mezcla de isómeros, 90%), (-) mirtenol (97%), hexanal (98%), vitamina E (99%), 2,6-di(*ter*-butil-*p*-cresol) (BHT), pentaflúorfenilhidracina (PFPH) (97%), ácido linoleico (99%), ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) (ABTS), radical α,α -difeníl- β -picrilhidracilo (DPPH) y Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano -2-carboxílico), se compraron a *Aldrich Chemical Co. Inc.*, (Milwaukee, WI. EE.UU.).

Columnas cromatográficas: Columnas HP-5 (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, EE.UU.), de 30 m x 0.32 mm, D.I. x 0.24 μ m, d_f , y de 60 m x 0.25 mm, D.I.,

0.25 μm , d_f , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), y una columna capilar de sílice fundida polar INNOWAX (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, EE.UU.) de 50 m x 0.2 mm D.I. x 0.2 μm , d_f .

Materiales: *Septa*, férrulas, *liners* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.); dispositivo para SPME (*Supelco Inc.*, Bellefonte, EE.UU.), fibras para SPME con recubrimientos de PDMS (100 μm) y PDMS/DVB (65 μm) (*Supelco Inc.*, Bellefonte, EE.UU.), placas para TLC, (*Merck*, Darmstadt, Alemania), plancha de calentamiento con agitación magnética (*Thermolyne, Nouva II stirring hot plate*, Dubuque, IA, EE.UU.), plancha de calentamiento con agitación magnética, *Schott Geräte GMBH* modelo MR106S (Hofheim, Alemania), *minishaker IKA, JKMS*, (Hofheim, Alemania), balanza analítica digital *Mettler Toledo* AG285 \pm 0.00001 g (Greifensee, Suiza), balanza de precisión BA310S *Sartorius Basic* \pm 0.005 g (Göttingen, Alemania), balanza de precisión *Ainsworth* (Denver, EE.UU.), baño circulatorio de refrigeración *FISHER* (Pittsburgh, PA, EE.UU.), centrífuga *Compact II Clay Adams, BRAND GMBH Co.*, (Wertheim, Alemania), jeringas de 10 μL *Hamilton Co.* (Reno, EE.UU.) y de 5 μL (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, EE.UU.). Los tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL, micropipeteadores de 2-20 y 25-250 μL , puntas plásticas para las micropipetas, cubetas plásticas de 3 mL para espectrofotómetro, dispensadores para solventes y las pipetas Pasteur desechables se compraron a *BRAND GMBH Co.* (Wertheim, Alemania).

Material de vidrio: Frascos de 2, 5, 50 y 100 mL (*Schott*, Hofheim, Alemania), pipetas volumétricas y aforadas de 0.5, 1, 2, 5 y 10 mL, balones aforados de 1, 2, 5, 10 y 25, 250 mL, vasos de precipitados de 50, 100, 250 y 600 mL, Soxhlet, balones de fondo redondo y plano de 50, 100, 250 y 500 mL se compraron a *Vilab* (Bogotá, Colombia).

Gases especiales: He, N₂, H₂, aire (99,995%, *Aga-Fano S.A.*, Bucaramanga, Colombia).

1.2 PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN

1.2.1 Obtención de aceites esenciales

Hidrodestilación (HD): se llevó a cabo usando un equipo de destilación tipo Clevenger, según los procedimientos descritos por Stashenko *et al.* (1993) y Combariza *et al.* (1994) [1, 2]. En la **Figura 1**, se puede ver el hidrodestilador empleado. Se utilizaron 100 g del material vegetal picado de trozos de 2-3 cm, sumergido en agua; la duración de la hidrodestilación fue de 2 horas. El aceite esencial se separó del agua, previamente saturada con NaCl, por decantación, y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Una alícuota del aceite (30 µL) se diluyó en 1 mL de diclorometano, para el análisis cromatográfico. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWH): se realizó empleando el mismo montaje descrito para HD, pero, en vez de la manta de calentamiento, se usó un horno microondas *Kendo MO 124* (Osaka, Japón, frecuencia de microondas 2450 MHz, 120 V, potencia de salida 800 W), dentro del cual se colocó un balón (1 L) con agua y material vegetal (100 g). En la **Figura 2**, se aprecia el montaje usado en esta técnica. El tiempo de extracción, a máxima potencia del horno, fue 30 minutos. Los demás parámetros del método y el modo de preparación de la muestra para el análisis cromatográfico, fueron los mismos, como están descritos para HD y en los trabajos de Stashenko *et al.* 1999 [3, 4].

Figura 1. Equipo usado para la obtención de aceites esenciales por hidrodestilación convencional.

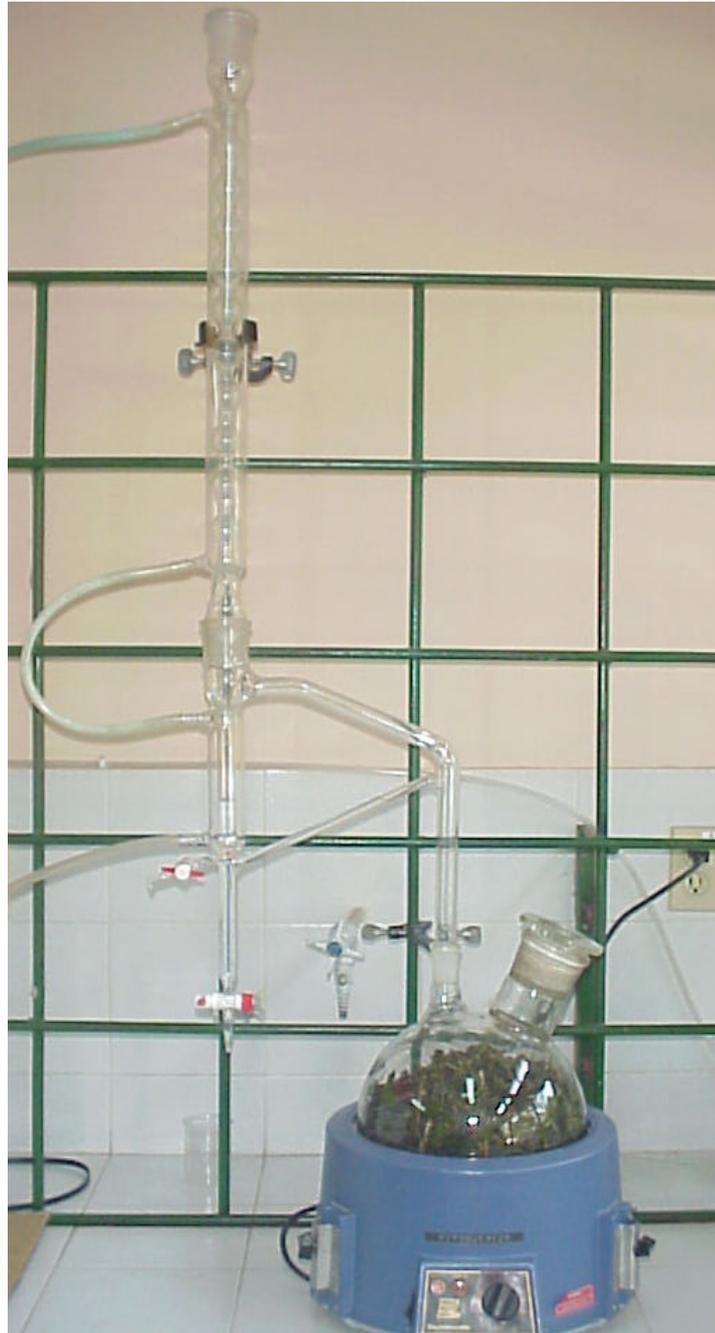


Figura 2. Montaje empleado para obtener los aceites esenciales por el método de hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD).



1.2.2 Obtención de extractos

Destilación con vapor- extracción simultánea con solvente (SDE): se llevó a cabo en un equipo a micro-escala para solventes de alta densidad, diseñado por Godefroot *et al.* [5]. Se usaron 10 g del material vegetal, finamente picado; la duración de la extracción fue de 2 horas, así como lo describen Stashenko *et al.* [3-6]. El solvente de extracción fue diclorometano (grado HPLC). El extracto obtenido (1 μ L) se inyectó directamente al GC. En la **Figura 3** se muestra el montaje empleado.

Extracción con fluido supercrítico (SFE): se empleó un extractor Soxhlet de alta presión (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.). Se usó la metodología descrita por Stashenko *et al.* [6,7]. Se utilizaron 10 g del material vegetal, 320 g de hielo seco (CO_2) comercial, como fuente de fluido supercrítico; la extracción durante 2 horas, se llevó a cabo a la temperatura de 40-45 $^{\circ}\text{C}$ y a la presión de 1050-1100 psi. El extracto obtenido fue secado con Na_2SO_4 anhidro y disuelto en diclorometano (30 μ L en 1 mL del solvente). 1 μ L de la solución se inyectó en el GC. En la **Figura 4** se aprecia el equipo usado en esta técnica.

1.2.3. Obtención de fracciones volátiles

Purga de espacio de cabeza con N_2 y trampa en solvente simultánea (P&T): se realizó en un equipo de extracción *headspace* dinámico, construido en el Laboratorio de Cromatografía y similar al diseñado por Umano y Shibamoto [8], como se aprecia en la **Figura 5**. El procedimiento de extracción fue realizado de acuerdo con la metodología descrita por Stashenko *et al.* (1992) [9]. Se usó el material vegetal (100 g), nitrógeno (99,995%) como gas de purga, y diclorometano como solvente para atrapar volátiles. La duración de la P&T fue de 2 horas. El extracto obtenido se concentró hasta 10 mL en un equipo *Kuderna-Danish*, y luego

se llevó hasta 2 mL, usando una corriente de nitrógeno seco; 1 μ L del extracto final se inyectó al GC.

Figura 3. Equipo a micro-escala de destilación-extracción con solvente simultánea (SDE) para solventes de alta densidad, empleado para la obtención de extractos de plantas.

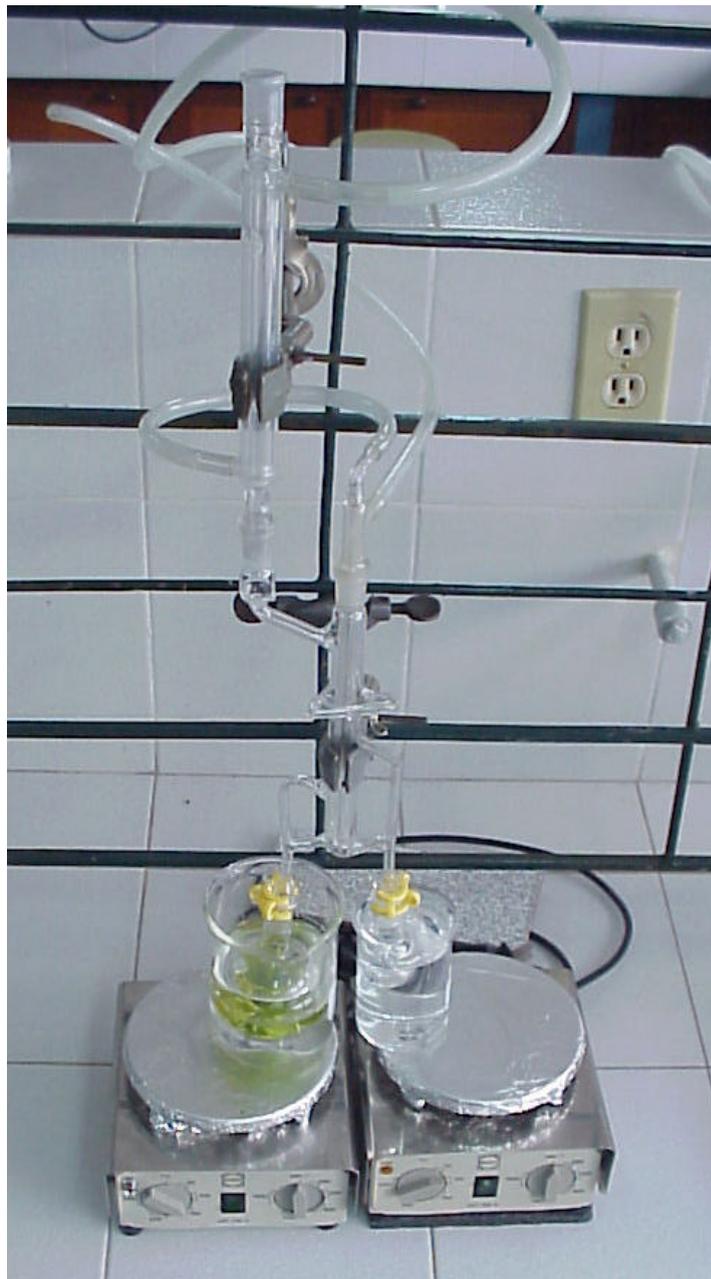


Figura 4. Extractor Soxhlet de alta presión para la obtención de extractos vegetales con fluido supercrítico (SFE).



Figura 5. Equipo de extracción *headspace* dinámico (purga de espacio de cabeza con N_2 y trampa en solvente simultánea, P & T).



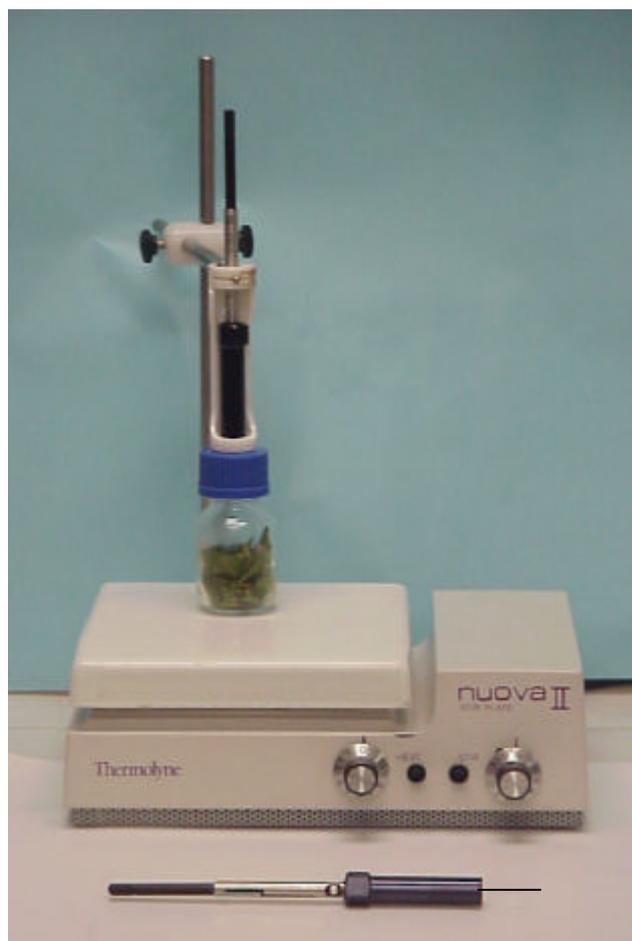
Headspace estático (S-HS): se llevó a cabo en un equipo *headspace sampler* HP 7694 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EE.UU.), el cual se muestra en la **Figura 6**. Se emplearon los siguientes parámetros operacionales: temperatura del termostato 40 °C, tiempo de equilibrio de 15 minutos, temperaturas del *loop* y de la línea de transferencia se mantuvieron a 100 y 110 °C, respectivamente. Se usaron 5 g de planta picada, colocada en un frasco de 20 mL; 1 mL de la fase vapor se inyectó a la columna cromatográfica.

Figura 6. Equipo empleado en la técnica *headspace* estático.



Microextracción en fase sólida de la fase vapor (*headspace*) (HS-SPME): se realizó usando una fibra de poli(dimetilsiloxano) (PDMS, 100 μm de espesor). Se llevó a cabo la extracción de volátiles a 22 ± 1 °C de la fase vapor de la planta picada (10 g), colocada en un frasco de 50 mL. El tiempo de exposición de la fibra fue de 60 min (la selección de este parámetro se basó en experimentos preliminares). Las sustancias extraídas fueron térmicamente desorbidas a 250 °C, durante 5 minutos, en un puerto de inyección del GC, usando un *liner* especial para SPME, de volumen reducido. El montaje usado para HS-SPME se puede observar en la **Figura 7**.

Figura 7. Montaje empleado para la extracción por HS-SPME de los volátiles de la planta.



1.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE ACEITES ESENCIALES

1.3.1. Descripción general del sistema modelo lipídico. La oxidación de la emulsión del ácido linoleico fue inducida por iones Fe^{2+} en presencia de oxígeno, según la metodología descrita por Tamura *et al.* [10,11]. La emulsión fue preparada mezclando 2 mL de la solución acuosa del ácido linoleico (2.5 g/L) con 3 mL del buffer de *Tris* (pH 7.4), que contenía 0.75 mM de KCl, 0.2% de dodecilsulfato de sodio y 2.01 mM de sulfato de hierro. Se añadieron a la emulsión del ácido linoleico aceites esenciales de *L. alba*, *A. triphylla*, *L. armata*, *X. aromatica* o *S. brownei*, obtenidos por HD, la vitamina E y/o BHA, en concentraciones de 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 g/L (la última concentración no se usó para el BHA). La solución resultante se incubó a 37 °C durante 12 horas. Al final de la incubación, la mezcla fue enfriada por 10 minutos en un baño de agua/hielo; a la emulsión simultáneamente fueron agregados 100 μL de la solución de BHT (antioxidante) en metanol (2%, p/v), para interrumpir la reacción de oxidación en cadena, porque, una vez iniciada, ésta continúa.

1.3.2 Medición del hexanal. El hexanal, producto final principal de la degradación oxidativa del ácido linoleico y marcador del avance del proceso de peroxidación [12, 13], fue medido por dos métodos independientes, así: **1. En solución**, después de su derivación con PFPH (pentaflúorfenilhidracina) y extracción líquido-líquido de la hidrazona, C_6 -PFPH, con hexano, según la metodología descrita por Stashenko *et al.* [4, 14]; y **2. En fase vapor**, usando la fibra SPME (PDMS/DVB, 65 μm), previamente saturada con PFPH a temperatura ambiente durante 40 minutos; y la extracción-derivación directa del hexanal sobre la fibra, así como se describe en los trabajos de Stashenko *et al.* [15, 16]. El efecto protector de aceites esenciales se calculó, según la siguiente fórmula:

$$\text{Grado de protección, \%} = \frac{[A_B - A_M]}{A_B} \times 100\%$$

Donde:

A_B: Área del pico cromatográfico de hexanal en el sistema lipídico sin antioxidante;

A_M: Área del pico de hexanal en el sistema lipídico con antioxidante.

1.3.3 Medición del ácido linoleico. El progreso de la peroxidación se determinó también cuantificando el ácido linoleico, en forma de su metil-éster, obtenido por derivación con BF₃/MeOH, según Stashenko *et al.* [4]. El ácido linoleico se cuantificó antes y después de su oxidación inducida. La siguiente fórmula se empleó para determinar el grado de protección del ácido linoleico:

$$\text{Grado de protección, \%} = \frac{[A_B - A_M]}{[A_{BB} - A_B]} \times 100\%$$

Donde:

A_B: Área del pico cromatográfico del ácido linoleico, sometido a oxidación sin antioxidante;

A_{BB}: Área del pico cromatográfico del ácido linoleico sin oxidar y sin antioxidante;

A_M: Área del pico cromatográfico del ácido linoleico, sometido a la oxidación, en presencia de antioxidante.

La cuantificación del hexanal y del ácido linoleico se realizó en ausencia (blanco) y en la presencia de antioxidante, *e.g.* aceite esencial, vitamina E o BHA, adicionándolos en diferentes concentraciones a la emulsión. El efecto protector se determinó como la disminución de la concentración del hexanal en solución y en fase vapor, cuantificando también la cantidad de ácido linoleico remanente (sin oxidar) en el sistema.

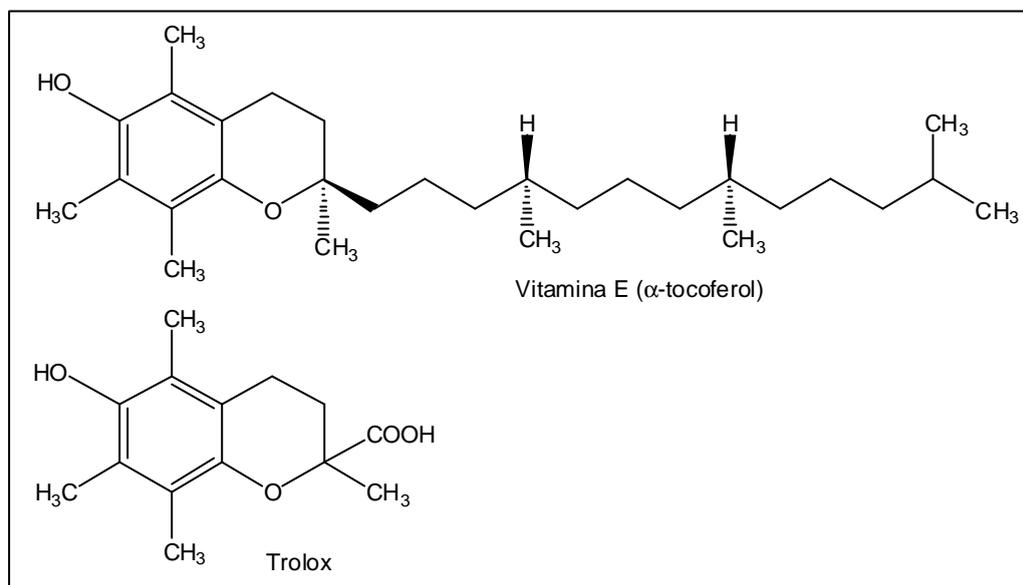
Todas las mediciones se hicieron por triplicado; se determinaron parámetros estadísticos, tales como el promedio (\bar{X}) y la desviación estándar (s) de los valores obtenidos.

1.3.4 Estudio de la capacidad de los aceites esenciales para atrapar radicales. Los compuestos que tienen la habilidad para “secuestrar” los radicales generados durante la oxidación, inhiben la propagación de éstos, transfiriéndoles protones o electrones. Hay una gran variedad de ensayos que permiten evaluar la capacidad antioxidante, sin embargo, la mayoría de ellos se limita al análisis de compuestos hidrofílicos. El ensayo de la capacidad equivalente al Trolox (TEAC) o método de descoloración del catión-radical ABTS⁺, puede ser usado también en sistemas hidrofóbicos. Otro análisis, que evalúa la capacidad para atrapar radicales tanto de sustancias hidrofóbicas, como hidrofílicas, es el ensayo del radical DPPH [17, 18].

1.3.4.1 Ensayo de descoloramiento del catión-radical ABTS⁺. El efecto protector de los aceites esenciales y de las sustancias de referencia se determinó con base en el procedimiento descrito por Re R. *et al.* [17]. Este método se basa en la medición de la habilidad de ciertos compuestos, con capacidad antioxidante para atrapar radicales, en este caso ABTS⁺, el cual absorbe a una longitud de onda de 734 nm.

La solución del ABTS⁺ es de color azul, la adición de un compuesto antioxidante hace que se descolore, con la consiguiente disminución de su absorbancia. La actividad antioxidante de las sustancias de prueba se comparó con la actividad del Trolox, un compuesto análogo a la vitamina E, pero soluble en agua. En la **Figura 8**, se muestran estructuras de estos dos compuestos. Todos los datos espectroscópicos fueron obtenidos en un espectrofotómetro *Jenway 6300* (*Jenway Ltd.* Felsted, Dunmow, U.K), en todos los casos se usaron cubetas plásticas desechables (1 cm x 1 cm x 4,5 cm).

Figura 8. Estructuras químicas de la vitamina E y de su análogo hidrosoluble, Trolox.



El catión-radical $ABTS^+$ fue preparado así: 38.5 mg de $ABTS^+$ se disolvieron en agua bidestilada (10 mL), luego, se adicionó de persulfato de potasio (6.90 mg). La solución final se dejó reaccionar durante 20 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente, una alícuota de la solución del $ABTS^+$ se diluyó en etanol hasta conseguir una absorbancia de 0.70 (\pm 0.20) a 734 nm. Los aceites esenciales se prepararon en tres concentraciones diferentes, dependiendo del grado de actividad, usando etanol como solvente.

La absorbancia se midió exactamente seis minutos después de la adición de una alícuota de Trolox (10 μ L, 3,3 - 13,3 μ M) o de cada uno de los posibles agentes "secuestradores" de radicales, a la solución diluida del catión-radical $ABTS^+$ (1,5 mL).

El efecto protector se estimó con respecto a la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC). Éste se define como la concentración de Trolox (mM) que tiene

la capacidad antioxidante equivalente a la sustancia bajo estudio en concentración de 1.0 mM. En el caso de los aceites esenciales, su capacidad de atrapar radicales se determinó como la actividad antioxidante total (*Total Antioxidant Activity*, TAA), expresada como mmol de Trolox por kilogramo de aceite esencial. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, al igual que los blancos de solvente.

1.3.4.2 Ensayo de descoloramiento del radical DPPH[·]. El efecto antioxidante de los aceites esenciales y de las sustancias de referencia se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Brand-Williams *et al.* [18]. La solución de DPPH[·] es de color violeta y la adición de una sustancia antioxidante hace que ésta se descolore. Para este ensayo se siguió la siguiente metodología: a una solución de DPPH[·] (80 µM, 2.5 mL) en metanol, se le adicionaron 0,5 mL de cada uno de los compuestos con posible capacidad “secuestradora” de radicales. Inmediatamente después, se midió la absorbancia a 514 nm a 0, 5, 10, 15 min y luego cada 15 min, hasta la obtención del estado estacionario en la reacción, es decir, cuando la absorbancia de la solución sea constante. La concentración inicial exacta del DPPH[·] en el medio de reacción, se determinó mediante una curva de calibración de soluciones de DPPH[·] medidas a 514 nm, en concentraciones de 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50 y 100 µM. La capacidad de atrapar radicales se expresó como el número de moles de sustancia antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial del radical DPPH[·] en un 50% y se calculó como la concentración efectiva EC₅₀, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EC_{50} = \frac{\text{Concentración de antioxidante en el estado estacionario}}{\text{Concentración de DPPH}_{t=0}}$$

La concentración del antioxidante en el estado estacionario es aquella a la cual la absorbancia medida a través del tiempo no cambia o es menor de 10 %, y la

concentración del radical DPPH_{t=0}, es la concentración inicial medida antes de agregar la sustancia antioxidante. La capacidad de atrapar el radical DPPH se determinó con base en una gráfica de porcentaje remanente de DPPH Vs tiempo de reacción, en función de la relación molar antioxidante/DPPH (mmol de antioxidante/mmol DPPH).

1.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

El análisis cromatográfico de las muestras se realizó en un GC *Hewlett-Packard* (HP) 5890A *Series II*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 1:30) y un detector de ionización en llama (FID) (250 °C). Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con un programa HP *ChemStation* HP Rev. A.06.03 [509]. Para la separación de mezclas se usaron dos columnas capilares, apolar HP-5 (*Hewlett-Packard*), de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, d_f , con fase estacionaria de 5%-fenilpoli(metilsiloxano); y polar, INNOWAX (HP), con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol), de 50 m x 0.20 mm, D.I. x 0.20 µm, d_f . La temperatura del horno fue programada de 40 °C (15 min) hasta 250 °C @ 5 °C min⁻¹, para la columna apolar, HP-5; y de 50 °C (5 min) hasta 200 °C @ 4 °C min⁻¹, para la columna polar, INNOWAX. El gas de arrastre empleado fue helio (99.995 %, *Aga-Fano* S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 200 kPa y una velocidad lineal de 26 cm s⁻¹. El gas auxiliar fue nitrógeno (99.995%, *Aga-Fano* S.A.), con una velocidad de flujo de 30 mL min⁻¹. Las velocidades de flujos para gases de combustión del FID, el aire y el hidrógeno, fueron de 300 y 30 mL min⁻¹, respectivamente. El volumen de los extractos inyectado fue de 1.0 µL.

Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con energía de 70 eV, en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890 *Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5973,

equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación *split* de 1:30), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos (*HP ChemStation 1.05*), incluyendo las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K y NIST 98. Se usó una columna capilar de sílice fundida, HP-5MS de 50 m x 0.25 mm D.I., con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 0.25 µm de grosor. El gas de arrastre fue helio (99.995%, *Aga Fano, S.A.*), con una velocidad lineal de 35 cm.s⁻¹. La temperatura del horno fue programada de 40 °C (15 min) hasta 250 °C (15 min) @ 5 °C min⁻¹. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285 °C, respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*) @ 4.75 *scan s*⁻¹, en el rango de masas de *m/z* 40-350. La homogeneidad de cada pico cromatográfico fue revisada, obteniendo fragmentogramas de masas, basados en iones característicos de cada compuesto. La **Figura 9** muestra el equipo GC/MS utilizado. Para la identificación de los compuestos se usaron algunos terpenos estándar, analizados bajo las mismas condiciones instrumentales que las muestras, espectros de masas e índices de retención de Kováts de componentes, que se compararon con los reportados en la literatura [19-23].

Los índices de retención de Kováts se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C₇ hasta C₂₈ (*Bio-Rad, Sadtlerd, EE.UU.*), corridos en el GC bajo las mismas condiciones operacionales que los aceites esenciales, empleando las columnas HP-5 e INNOWAX. Para su determinación se usó la siguiente fórmula:

$$I_k = 100 n + 100 \left[\frac{t_{R_x} - t_{R_n}}{t_{R_{n+1}} - t_{R_n}} \right]$$

Donde:

I_k : índice de retención del compuesto de interés;
 n : número de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés;
 N : número de átomos de carbono del n -alcano que eluye después del compuesto de interés, $N > n$;
 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 x.

Figura 9. Cromatógrafo de gases (6890N), acoplado a espectrómetro de masas (5973) (Agilent Technologies), usado para el análisis de los aceites esenciales, extractos y fracciones volátiles de las plantas bajo estudio.



La determinación del hexanal, en forma de su derivado hidrazónico, C₆-PFPH, se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases HP 5890 A Series II, equipado con

un detector de captura de electrones (ECD), operado a 280 °C, con una mezcla metano:argón (10%) como gas auxiliar, a la velocidad lineal de 60 mL min⁻¹; con una columna capilar HP-5 de 30 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, ϕ , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) y un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación *split* 1:10). Se usó helio (99.995 %, *Aga-Fano* S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 200 kPa y una velocidad lineal de 26 cm.s⁻¹.

1.4.1 Fraccionamiento de aceites esenciales por cromatografía en contracorriente. Para el fraccionamiento de los aceites esenciales se usó un cromatógrafo en contracorriente MLCCC (*Multi-Layer Counter-Current Chromatography*) (*Multilayer, PC. Inc., Potomac, USA*), con una columna analítica de poli(tetraflúoretileno) (PTFE) (160 m x 1.6 mm, D.I.), con capacidad para 350 mL. El aspecto general del equipo se presenta en la **Figura 10**.

El sistema de solventes usado fue acetonitrilo/*ter*-butilmetiléter/hexano 1.5:0.2:1.0 (v/v) para los aceites esenciales de *A. triphylla*, *L. alba* y *X. aromatica*. Para el aceite esencial de *L. armata* la relación de solventes fue acetonitrilo/*ter*-butilmetiléter/hexano 1.0:0.2:1.5 (v/v). Los solventes fueron mezclados y agitados fuertemente en un embudo de separación, luego, se separaron las dos fases formadas. A la fase superior se le llamó fase liviana y a la inferior fase pesada. Las separaciones se llevaron a cabo a una velocidad de 800 rpm. El modo de elución fue “cabeza-cola”, empleando la fase liviana como la fase estacionaria. La velocidad de flujo de la fase móvil (fase pesada) fue de 1.5 mL/min, a excepción de la que se usó para el fraccionamiento del aceite esencial de *L. armata*, *i.e.* 2.0 ml/min, para ésto se utilizó una bomba HPLC *Biotronik BT 3020*. La cantidad de aceite esencial usado para cada corrida cromatográfica fue de 500 mg; los aceites se disolvieron en una mezcla 1:1 de fases liviana y pesada, que se inyectó al sistema cromatográfico por un *loop*. Se recolectaron fracciones cada 5 mL empleando un fraccionador *LKB Bromma*

2312 Redirac II Current status; el detector fue un UV-Vis, LKB Bromma 2238 UVICORD S II, con una celda analítica de 254 nm. Los cromatogramas se obtuvieron utilizando un registrador BBC GOERZ Metrawatt SE 120.

Figura 10. Cromatógrafo en contracorriente, utilizado para el fraccionamiento de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla* y *X. aromatica*.



Las fracciones se recolectaron de acuerdo con la secuencia de salida de los picos cromatográficos y como método complementario se usó cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*). Ésta se realizó empleando placas de TLC de gel de sílice 60 F254 (*Merck*, Darmstadt, Alemania), de 20 cm x 20 cm. Las muestras se aplicaron con capilares, en bandas de 5 mm de separación, a una distancia de 5 mm del borde de las placas. Éstas se desarrollaron con diclorometano en una cámara de vidrio cerrada. Luego, las placas se secaron y se revelaron con la mezcla de *p*-anisaldehído al 0,5% en

metanol: ácido sulfúrico: ácido acético (85:5:10) (*RdH Laborchemikalien. GmbH & Co, Seelze Alemania*), luego se calentaron en una estufa a 110 °C por 1 min.

1.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC₅₀) DE LOS ACEITES ESENCIALES FRENTE A LA ARTEMIA SALINA

Este ensayo fue realizado por el doctor Jesús Olivero y su grupo de investigación de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena (Cartagena, Colombia). Las soluciones de los aceites esenciales fueron preparadas en agua de mar, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO, *Merck, Hohenbrunn, Alemania*) como disolvente, teniendo en cuenta que la concentración final de éste no fuera mayor del 2% (v/v).

Para este ensayo, se colocaron 10 larvas de *Artemia salina* en 10 mL de las soluciones de aceites. El control negativo fue realizado empleando DMSO. El conteo de organismos muertos se llevó a cabo 24 y 48 horas después de inoculadas las soluciones. Para cada aceite esencial fueron ejecutados cuatro bioensayos.

El grado de toxicidad de una sustancia contra una población de organismos se expresa como concentración letal media (LC₅₀) o dosis letal media (LD₅₀); ésto es, la cantidad de sustancia requerida para causar la muerte del 50% de un grupo representativo de la población evaluada. La determinación de las LC₅₀ de los aceites esenciales de *L. armata*, *L. alba*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei* frente a *Artemia salina* fue realizada por el método de análisis *Probit*, según [24]. En este método, para calcular la dosis letal media de un producto debe determinarse primero la curva de toxicidad o curva de regresión “dosis-mortalidad”, es decir, aquella línea que relaciona las dosis que se ensayan con las mortalidades que se obtienen [24].

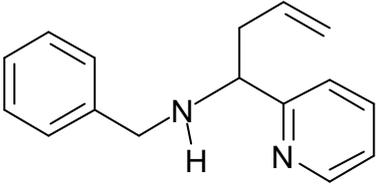
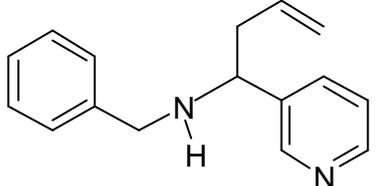
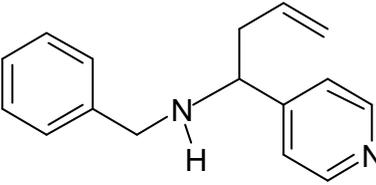
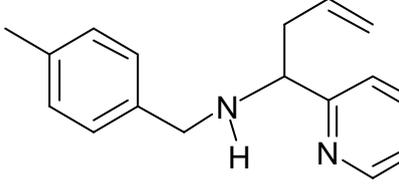
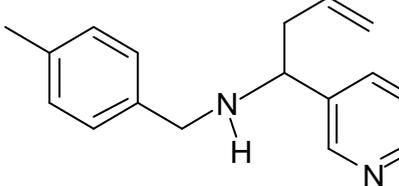
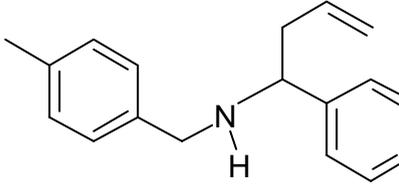
1.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MOLÉCULAS SINTÉTICAS NITROGENADAS Y CÁLCULO MECÁNICO-CUÁNTICO DE SUS PROPIEDADES ELECTRÓNICAS PARA CONSTRUIR UN MODELO QSAR

En el Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina (LSOF, CIBIMOL), dirigido por los Dres. Vladimir Kouznetsov y Alirio Palma, de la Universidad Industrial de Santander, se sintetizaron los compuestos nitrogenados estudiados en este trabajo, a saber: tetrahydroquinolinas, bencilaminas, 2-benzazepinas y nitronas; según los procedimientos descritos por Rozo, W., 1995 [25], Urbina, J.M., 2001 [26]; Vargas, L., 1998 y 2000 [27,28], Rivero, J., 2000, 2002 y 2003 [29-31]; Salas, S., 1999 [32]; Muñoz, J., 1999 [33]; Sanabria, C.M., 2003 [34], Gómez, S., 2003 [35] y Jaimes, J, 2004 [36]. En La **Tabla 1** aparecen las estructuras de los compuestos nitrogenados, sus nombres y referencias de síntesis.

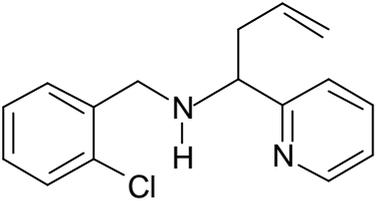
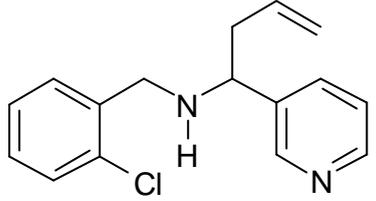
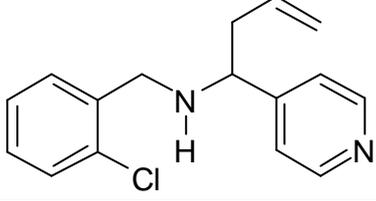
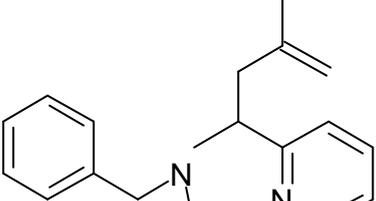
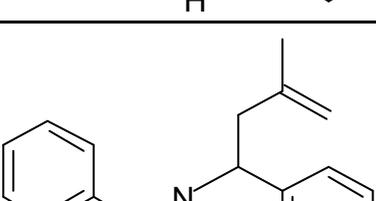
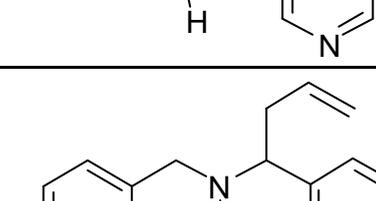
La actividad antioxidante *in vitro* de estos compuestos sintéticos nitrogenados se evaluó, usando los siguientes ensayos:

- Inhibición del deterioro oxidativo de la emulsión de ácido linoleico, midiendo por HS-SPME el hexanal en la fase vapor, como marcador del avance del proceso de peroxidación, de acuerdo con la metodología descrita en el Numeral **1.3.2**.
- Capacidad de atrapamiento de radicales: este ensayo sólo se pudo realizar para 37 moléculas, puesto que en varios casos no hubo suficiente cantidad de la muestra requerida para esta prueba. Se emplearon los métodos de decoloración del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH, así como está descrito en los Numerales **1.3.4.1** y **1.3.4.2**.

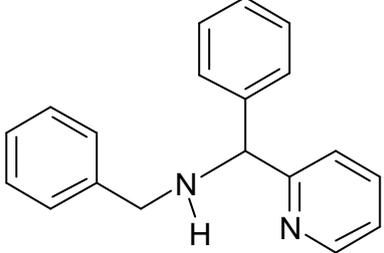
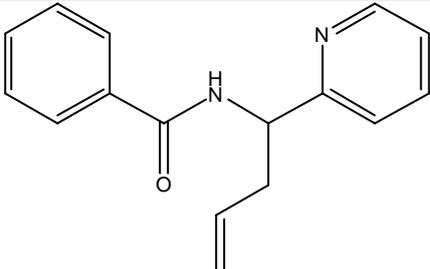
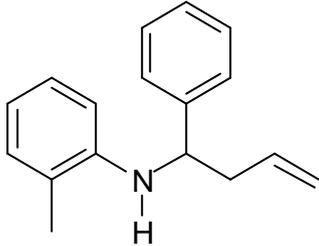
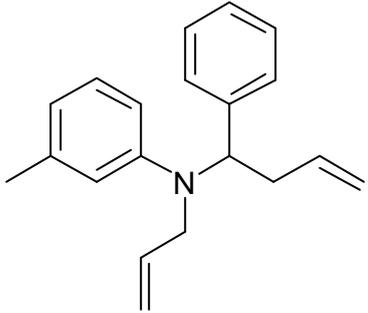
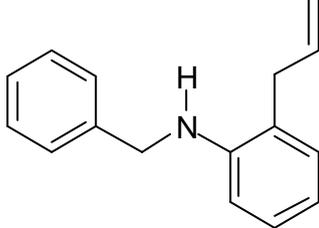
Tabla 1. Derivados de bencilaminas, tetrahydroquinolinas, 2-benzazepinas y nitronas estudiados en la presente investigación.

| N° | Estructura | Nombre | Referencia |
|-----------|---|---|------------------------|
| <u>1</u> |  | 4-N-Bencilamino -4-(α -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2000 [30]. |
| <u>2</u> |  | 4-N-Bencilamino -4-(β -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2000 [30]. |
| <u>3</u> |  | 4-N-Bencilamino -4-(γ -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2000 [30]. |
| <u>4*</u> |  | 4-N-(4-Metilbencilamino)-4-(α -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [30]. |
| <u>5*</u> |  | 4-N-(4-Metilbencilamino)-4-(β -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2000 [30]. |
| <u>6*</u> |  | 4-N-(4-Metilbencilamino)-4-(γ -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2000 [30]. |

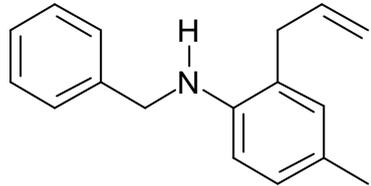
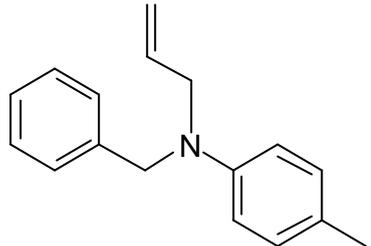
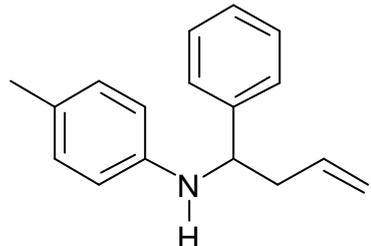
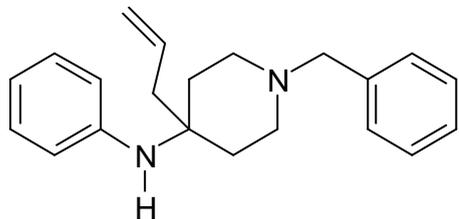
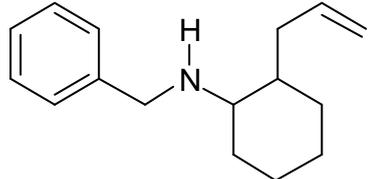
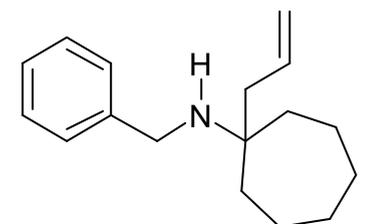
Continuación de la **Tabla 1**.

| | | | |
|------------|---|--|---------------------------|
| 7 |  | 4-N-(2-Clorobencilamina)- 4-(α -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [30]. |
| 8 |  | 4-N-(2-Clorobencilamina)- 4-(β -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2000 [30]. |
| 9 |  | 4-N-(2-Clorobencilamina)- 4-(γ -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2000 [30] |
| 10* |  | 4-N-(Bencilamina)-2-metil- 4-(α -piridil)-1-buteno. | Rivero, J. 2003 [30]. |
| 11* |  | 4-N-(Bencilamina)-2-metil- 4-(β -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 12* |  | 4-N-(4-Clorobencilamina)- 4-(β -piridil)-1-buteno. | Rivero, J. 2003 [30]. |

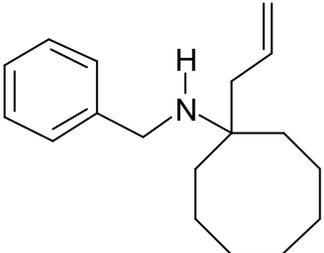
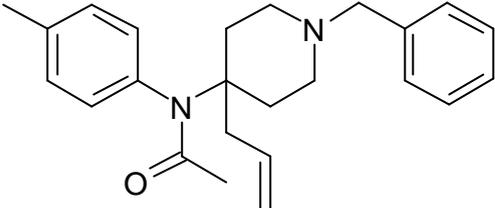
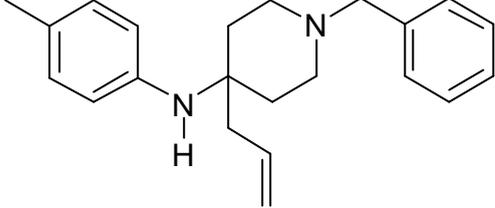
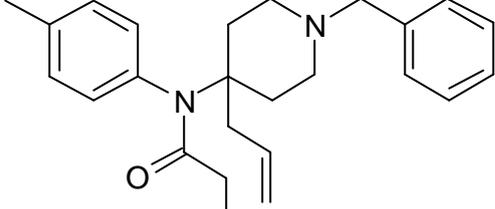
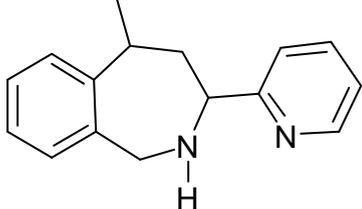
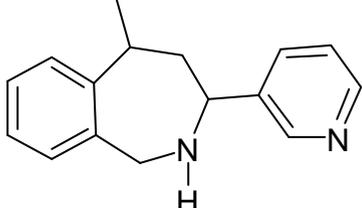
Continuación de la **Tabla 1**.

| | | | |
|------------|---|--|------------------------|
| 13* |  | N-Bencil-N-[α -(α -piridil)bencil]amina. | Rivero, J., 2003 [30]. |
| 14* |  | N-[1-(β -Piridil)-3-butenil]bencenamida. | Rivero, J., 2003 [30]. |
| 15* |  | Fenil-3-butenil-2-metilanilina | Jaimes, J., 2004 [36]. |
| 16* |  | N-Alil-(1-fenil-3-butenil)-3-metilanilina | Jaimes, J., 2004 [36]. |
| 17* |  | 2-Alil-N-bencilanilina. | Jaimes, J., 2004 [36]. |

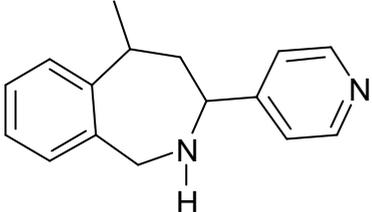
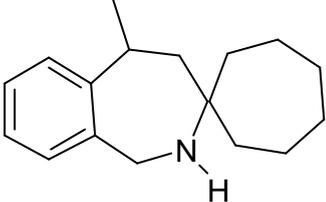
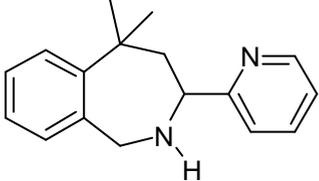
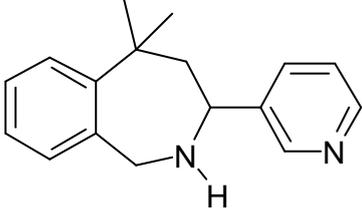
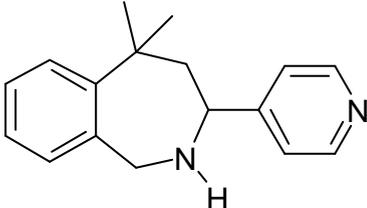
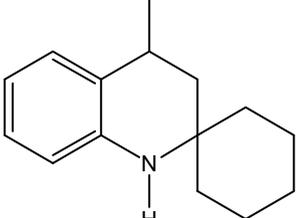
Continuación de la **Tabla 1**.

| | | | |
|------------|---|---|----------------------------|
| 18* |  | 2-Alil-N-bencil-4-metilanilina | Jaimes, J., 2004 [36]. |
| 19* |  | N-Alil-N-bencil-4-metilanilina | Jaimes, J., 2004 [36]. |
| 20* |  | (1-Fenil-3-butenil)-4-metilanilina | Rivero, J., 2003 [29]. |
| 21 |  | 4-Alil-1-bencil-4N-fenilaminopiperidina | Sanabria, C.M., 2003 [34]. |
| 22 |  | N-Bencilamino-2-alilociclohexano. | Sanabria, C.M., 2003 [34]. |
| 23* |  | N-(1-Alilcicloheptil)-bencilamina. | Vargas, L., 1998 [27, 28]. |

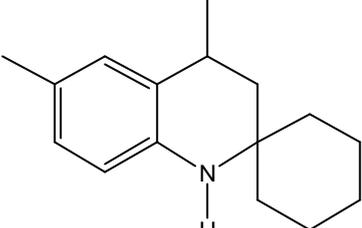
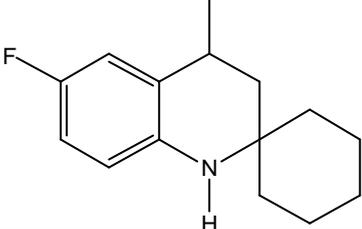
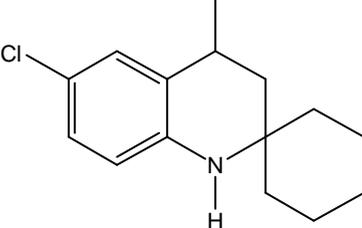
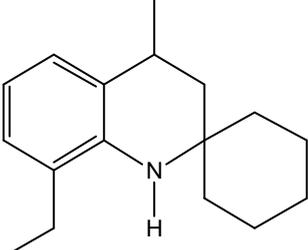
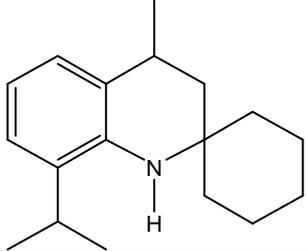
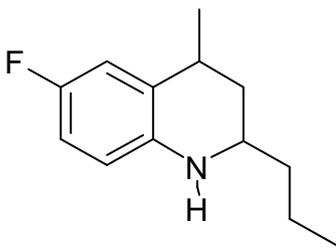
Continuación de la **Tabla 1**.

| | | | |
|------------|---|---|----------------------------|
| 24* |  | N-(1-Alilciclooctil)-bencilamina. | Vargas, L., 1998 [27, 28]. |
| 25* |  | N-(4-Metilfenil)-(4-alil-1-bencilpiperidinil)-4-acetamida. | Sanabria, C.M., 2003 [33]. |
| 26 |  | 4-Alil-1-bencil-4N-(4-metilfenilamino) piperidina. | Sanabria, C.M., 2003 [34]. |
| 27* |  | N-(4-Metilfenil)-N-(4-alil-1-bencilpiperidinil)-4-propanamida. | Sanabria, C.M., 2003 [34]. |
| 28 |  | 3-(α -Piridil)-5-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo-2-azepina. | Rivero, J., 2003 [29, 31]. |
| 29 |  | 3-(β -Piridil)-5-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo-2-azepina. | Rivero, J., 2003 [29, 31]. |

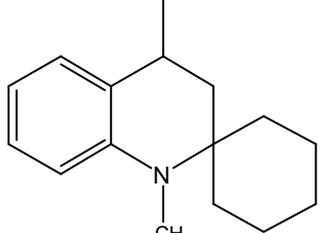
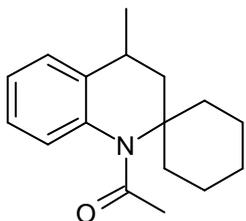
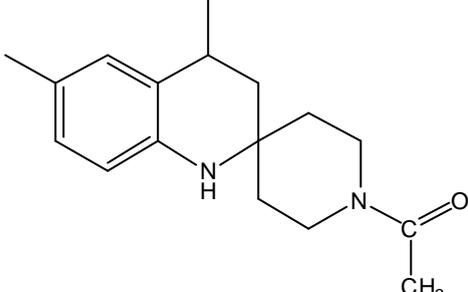
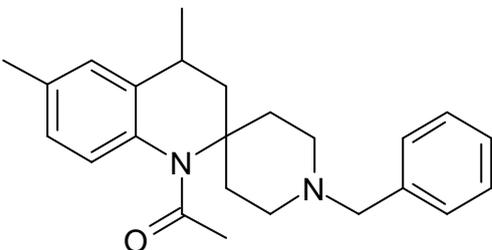
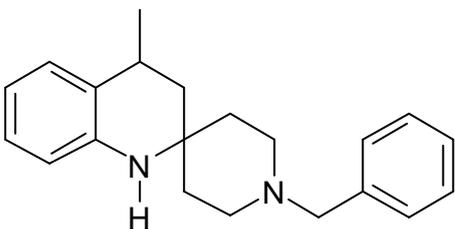
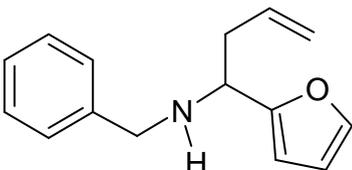
Continuación de la **Tabla 1**.

| | | | |
|------------|---|--|----------------------------|
| 30 |  | 3-(γ-Piridil)-5-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo-2-azepina. | Rivero, J., 2003 [29, 31]. |
| 31* |  | 5-Metil-1,2,4,5-tetrahidroespiro (3H-2-benzazepina-3,1'-cicloheptano). | Salas, S., 1999 [33]. |
| 32* |  | 5,5-Dimetil-3-(α-piridil)-1,2,4,5-tetrahidro-3H-2-benzazepina. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 33 |  | 5,5-Dimetil-3-(β-piridil)-1,2,4,5-tetrahidro-3H-2-benzazepina. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 34* |  | 5,5-Dimetil-3-(γ-piridil)-1,2,4,5-tetrahidro-3H-2-benzazepina. | Rivero, J., 2003 [29-31]. |
| 35 |  | 1,2,3,4-Tetrahidroquinolina-4-metilespiro [quinolina-2-ciclohexano]. | Rozo, W., 1995 [25]. |

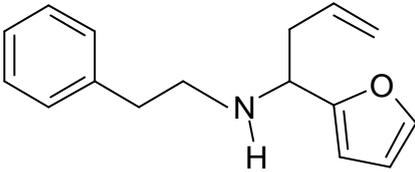
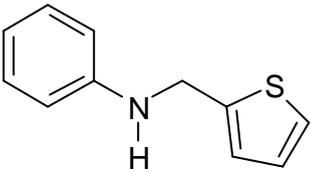
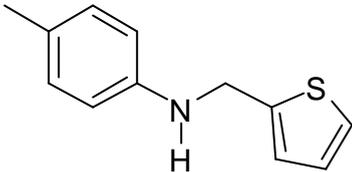
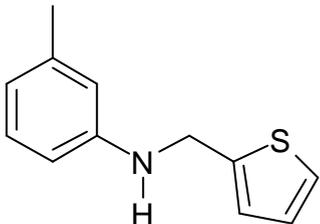
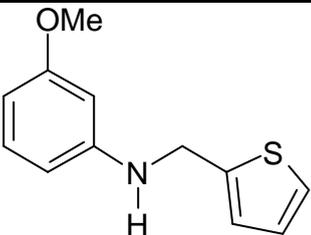
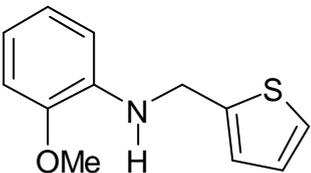
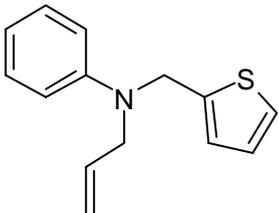
Continuación de la **Tabla 1**.

| | | | |
|------------|---|---|---------------------------------|
| 36 |  | <p>1,2,3,4-Tetrahydroquinolina-4,6-dimetilespiro [quinolina-2-ciclohexano].</p> | <p>Rozo, W., 1995 [25].</p> |
| 37 |  | <p>1,2,3,4-Tetrahidro-6-fluoro-4-metil espiro [quinolina-2-ciclohexano].</p> | <p>Rozo, W., 1995 [25].</p> |
| 38 |  | <p>1,2,3,4-Tetrahidro-6-cloro-4-metil espiro [quinolina-2-ciclohexano].</p> | <p>Rozo, W., 1995 [25].</p> |
| 39 |  | <p>1,2,3,4-Tetrahidro-8-etil-4-metil espiro [quinolina-2-ciclohexano].</p> | <p>Rozo, W., 1995 [25].</p> |
| 40 |  | <p>1,2,3,4-Tetrahidro-8-isopropil-4-metil espiro [quinolina-2-ciclohexano].</p> | <p>Rozo, W., 1995 [25].</p> |
| 41* |  | <p>6-Fluoro-4-metil-2-propil-1,2,3,4-tetrahidroquinolina.</p> | <p>Urbina, J.M., 2001 [26].</p> |

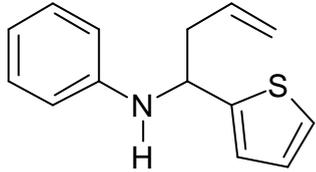
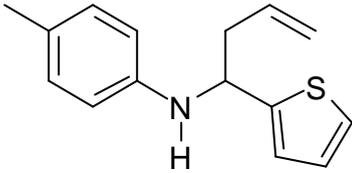
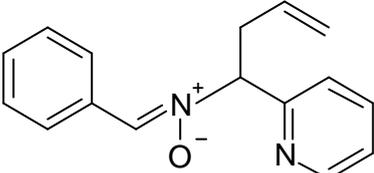
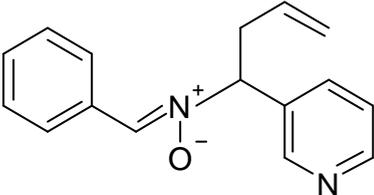
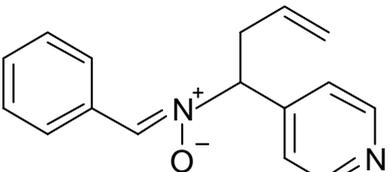
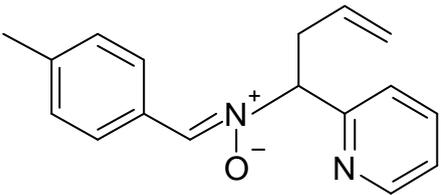
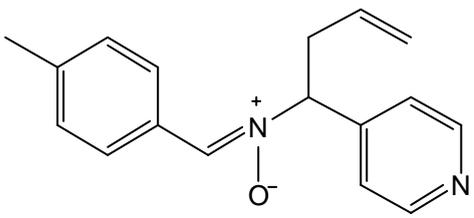
Continuación de la **Tabla 1**.

| | | | |
|------------|---|---|----------------------------|
| 42 |  | N-Metil-3,4-dihidro-4-metil espiro [quinolina-2-ciclohexano]. | Rozo, W., 1995 [25]. |
| 43 |  | N-Acetil-3,4-dihidro-4-metil espiro [quinolina-2-ciclohexano]. | Rozo, W., 1995 [25]. |
| 44 |  | 1,2,3,4-Tetrahidro-4,6-dimetil espiro-[N-acetil piperidina-4'-2-(1H)-quinolina]. | Sanabria, C.M., 2003 [34]. |
| 45 |  | N-Acetil-1'-bencil-4,6-dimetil-3,4-dihidro-espiro [piperidina-4'-2-(1H)-quinolina]. | Sanabria, C.M., 2003 [34]. |
| 46 |  | 1'-Bencil-4-metil-3,4-dihidro-espiro [piperidina-4'-2-(1H)-quinolina]. | Sanabria, C.M., 2003 [34]. |
| 47* |  | 4-N-Bencilamino-4-(α -furil)-1-buteno. | Muñoz, J.M., 1999 [33]. |

Continuación de la **Tabla 1**.

| | | | |
|------------|---|--|-------------------------|
| 48* |  | 4-N-β-Fenetilamino-4-(α-furil)-1-buteno. | Muñoz, J.M., 1999 [33]. |
| 49* |  | N-(2-Tienilmetil) anilina. | Gómez, S., 2003 [35]. |
| 50* |  | N-(2-Tienilmetil)-4-metilanilina . | Gómez, S., 2003 [35]. |
| 51* |  | N-(2-Tienilmetil)-3-metilanilina . | Gómez, S., 2003 [35]. |
| 52* |  | N-(2-Tienilmetil)-3-anisidina. | Gómez, S., 2003 [35]. |
| 53* |  | N-(2-Tienilmetil)-2-anisidina. | Gómez, S., 2003 [35]. |
| 54* |  | N-Alil-N-(2-tienilmetil) anilina. | Gómez, S., 2003 [35]. |

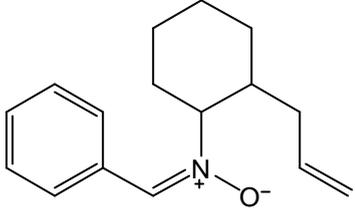
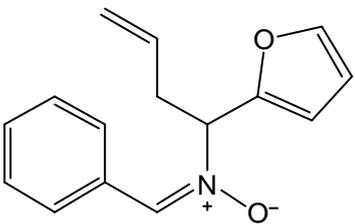
Continuación de la **Tabla 1**.

| | | | |
|------------|---|---|------------------------|
| 55* |  | 4-(N-Fenilamino)-4- α -tienil-1-buteno. | Gómez, S., 2003 [35]. |
| 56* |  | 4-(N-4-metilanilina)-4-tienil-1-buteno. | Gómez, S., 2003 [35]. |
| 57 |  | N-Óxido del 4-N-bencilamino-4-(α -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 58 |  | N-Óxido del 4-N-bencilamino-4-(β -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 59 |  | N-Óxido del 4-N-bencilamino-4-(γ -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 60* |  | N-Óxido del 4-N-(4-metilbencilamino)-4-(α -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 61* |  | N-Óxido del 4-N-(4-metilbencilamino)-4-(γ -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [31]. |

Continuación de la **Tabla 1**.

| | | | |
|------------|--|---|------------------------|
| 62* | | N-Óxido del 4-N-(4-clorobencilamino)-4-(γ -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 63 | | N-Óxido del 4-N-(2-clorobencilamino)-4-(β -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 64 | | N-Óxido del 4-N-(2-clorobencilamino)-4-(γ -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 65* | | N-Óxido del 4-N-(4-metilbencilamino)-4-(β -piridil)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 66* | | N-Óxido del 1-ali1-1-N-bencilaminociclohexano. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 67* | | N-Óxido del 4,5-dihidro-3H-espiro[2-benzazepina-3,1'-cicloheptano]. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 68 | | N-Óxido de la 10-etil-5-metil-5a,6,7,8,10-hexahidroacridina. | Rivero, J., 2003 [31]. |

Continuación de la **Tabla 1**.

| | | | |
|-----------|---|--|------------------------|
| 69 |  | N-Óxido del 2-alil-1-N-bencilaminociclohexano. | Rivero, J., 2003 [31]. |
| 70 |  | N-Óxido del 4-N-bencilamino-4-(α -furyl)-1-buteno. | Rivero, J., 2003 [31]. |

*Compuestos nitrogenados, cuya capacidad como atrapadores de radicales fue evaluada por los métodos del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH.

Para el estudio QSAR, que permite relacionar la estructura de las moléculas sintéticas con su actividad antioxidante, se realizó el cálculo de 89 descriptores moleculares. Los descriptores de tipo estructural, topológico y geométrico se obtuvieron empleando el programa computacional *Moldes* (Tartu State University, Tartu, Estonia) y los electrostáticos y de energía usando el programa *Gaussian/98W*, Versión 5.0 (*Gaussian Inc.* Pittsburgh, PA, EE.UU). La actividad antioxidante “teórica” se correlacionó con los datos experimentales obtenidos, mediante los métodos estadísticos de regresión lineal múltiple (MLR) y análisis de componentes principales (PCA), usando el programa *STATISTICA*, Versión 6.0 (*StatSoft Inc.*, Tulsa, Oklahoma, EE.UU).

La metodología utilizada para la obtención de los descriptores moleculares fue la siguiente:

- Las estructuras de las moléculas fueron “dibujadas” empleando el *ChemDraw Ultra (Chemical Structure Drawing Standar)* 1985-2001 del Programa *ChemOffice 2002 CambridgeSoft Corporation* (Cambridge, MA, EE.UU.).
- Las estructuras se colocaron en archivo nuevo, usando el paquete *SC Chem 3D Ultra (Molecular Modelling and Analysis)* 2001 del programa *CambridgeSoft Corporation* (Cambridge, MA, EE.UU.). Luego, se guardaron bajo dos extensiones (.mol y .gjf).
- Los archivos .mol de cada molécula se importaron al programa *Moldes (Tartu State University, Tartu, Estonia)*. Con éste, se obtuvieron 84 descriptores moleculares de tipo topográfico, topológico, constitucional y geométrico.
- Los descriptores de tipo electrostático y cuántico (momento dipolar, carga sobre el nitrógeno, energía total, HOMO y LUMO) se obtuvieron mediante el programa *Gaussian 98W* (Versión 5.0, *Gaussian Inc.* Pittsburgh, PA, EE.UU.). Para ésto, los archivos .gjf de cada molécula se importaron a un archivo del programa *TexPad (Helios Software Solutions, Chorley, England)*, donde se copiaron las coordenadas de las moléculas. Luego, este archivo fue empleado por el programa *Gaussian/98W* mediante el formalismo Hartree-Fock (HF) usando el conjunto base 6-31G (d).
- Una vez obtenidos los descriptores moleculares, se realizó una combinación lineal de la actividad antioxidante de los compuestos sintéticos y cada una de sus propiedades, por regresión lineal múltiple (MLR), utilizando el programa *STATISTICA* Versión 6.0, (*StatSoft Inc.*, Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). Los mejores parámetros, escogidos mediante MLR, se correlacionaron con la actividad antioxidante mediante la **Ecuación 1**, que es una expresión matemática generalizada que establece la correlación entre la actividad antioxidante y los descriptores moleculares.

$$\text{Actividad antioxidante} = b_0 + \sum \beta_i \times D_i$$

Ecuación 1 .

La contribución de cada descriptor en la predicción de la actividad antioxidante estuvo dado por un factor de peso β_i .

Debido a las diferencias estructurales entre las 70 moléculas estudiadas, se escogieron subgrupos de moléculas con características estructurales similares, estableciéndose de este modo un modelo matemático tipo actividad antioxidante Vs descriptores, para cada subgrupo. Para esto, se siguieron los siguientes pasos:

- Las moléculas se clasificaron en subconjuntos similares, según su distancia en el espacio formado por los primeros dos componentes principales obtenidos del conjunto de 89 descriptores moleculares, empleando PCA.
- Se hallaron los coeficientes de regresión para la **Ecuación 1**, con cada uno de los conjuntos de descriptores moleculares obtenidos y para cada conjunto de moléculas similares, según el análisis de PCA. La capacidad de predicción de cada modelo se representó por medio del coeficiente de correlación múltiple R^2 .

1.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J. R.; MACKU, C., and SHIBAMOTO, T., **1993**. "HRGC and GC-MS analysis of essential oil from Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. Et Thomson, forma genuine)". *J. High Resol. Chromatogr.*, 16, p.p. 441-444.
2. COMBARIZA, M.Y.; BLANCO, C.; STASHENKO, E.E., and SHIBAMOTO, T., **1994**. "Limonene concentration in lemon (*Citrus volcameriana*) peel oil as a function of ripeness". *J. High Resol. Chromatogr.*, 17, p.p. 643-646.
3. STASHENKO, E.E.; QUIROZ, N. and MARTÍNEZ, J. R., **1996**. "HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques". *J. High Resol. Chromatogr.*, 19, p.p. 359-362.
4. STASHENKO, E.E.; CERVANTES, M.; COMBARIZA, Y.; FUENTES, H., and MARTÍNEZ, J.R., **1999**. "HRGC/FID and HRGC/MSD Analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity". *J. High Resol. Chromatogr.*, 22, p.p. 343-349.
5. GODEFROOT, M; SANDRA, P. and VERSALE, M., **1981**. "New method for quantitative essential oil analysis". *J. Chromatogr. A*, 203, p.p. 325-335.
6. STASHENKO, E.E.; PUERTAS, M.A. and COMBARIZA, M.Y., **1996**. "Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction". *J. Chromatogr. A*, 752, p.p. 223-232.
7. STASHENKO, E.; ACOSTA, R. and MARTÍNEZ, J. R., **2000**. "High resolution gas chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.)". *J. Biochem. Biophys. Methods*. 43, p.p. 379-390.
8. UMANO, K. and SHIBAMOTO, T., **1987**. "Analysis of headspace volatiles from overheated beef fat". *J. Agric. Food Chem.*, 35, p.p. 14-18.

9. STASHENKO, E.; MACKU, C. and SHIBAMOTO, T., **1992**. "Monitoring volatile chemicals formed from must during yeast fermentation". *J. Agric. Food Chem.*, 40, p.p. 2257-2259.
10. TAMURA, H. and SHIBAMOTO, T., **1991**. "Antioxidant activity measurement in lipid peroxidation system with malondialdehyde and 4-hydroxynonenal". *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 78, p.p. 941-943.
11. TAMURA, H. and YAMAGAMI, A., **1994**. "Antioxidant activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey a grape". *J. Agric. Food Chem.*, 42, p.p. 1612-1615.
12. FRANKEL, E.N., **1982**. "Volatile lipid oxidation products". *Prog. Lipid Res.*, 22, p.p. 1-33.
13. FRANKEL, E.N., **1987**. "Secondary products of lipid oxidation". *Chem. Phys. Lipids*, 44, p.p. 73-81.
14. STASHENKO, E.E.; FERREIRA, M.C.; SEQUEDA, L.G.; MATEUS, A.; CERVANTES, M; MARTÍNEZ, J.R., **1997**. "Desarrollo de un método para monitoreo de la degradación oxidativa en lípidos y evaluación de la actividad antioxidante de productos naturales". *Revista Arte y Ciencia Cosmética*, 8, p.p. 21 -27.
15. STASHENKO, E.E.; PUERTAS, M.A.; SALGAR, W.; DELGADO, W., and MARTÍNEZ, J. R., **2000**. "Solid-phase microextraction with on fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds". *J. Chromatogr. A*, 886, p.p. 175-181.
16. STASHENKO, E.E.; PUERTAS, M.A. and MARTÍNEZ, J.R., **2002**. "SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of *in vitro* antioxidant activity". *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, p.p. 70-74.
17. RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M., and RICE-EVANS, C., **1999**. "Antioxidant activity applying and improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay". *Free Rad. Biol. Med.*, 26, p.p. 1231-1237.
18. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E. and BERSET, C., **1995**. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". *Lebens. Wiss. U.Technol.*, 28, p.p. 25-30.

19. KOVÁTS, E., **1965**. "Gas chromatographic characterization of organic substances in the reaction index system". *Adv. Chromatogr.* **1**, p.p. 229-247.
20. JENNINGS, W. & SHIBAMOTO, T., **1980**. "Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography". New York: Academic Press, Inc., 472 p.
21. DAVIES, N.W., **1990**. "Gas chromatography retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases". *J. Chromatogr. A*, **503**, p.p. 1-24.
22. ADAMS, R.P., **1995**. "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry". Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 469 p.
23. JOULAIN, D. and KÖNIG, W., **1998**. "The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons". Hamburg: E.B.-Verlag, 658 p.
24. AGUILERA, L.; NAVARRO, A.; TACORONTE, J.E.; LEYVA, M. y MARQUETTI., **2003**. "Efecto letal de Myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae)". *Rev. Cubana Med. Trop.*, **55**, p.p. 100-104
25. ROZO N, W., **1997**. Tesis de Pregrado: "Síntesis y estudio químico de derivados del 4metil-1,2,3,4-tetrahidroespiroquinolina-2-ciclooctanos". Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
26. URBINA, J.M., **2001**. Tesis de Pregrado: "Preparación de 4-N-arilamino-1-butenos (heptenos) como precursores en la síntesis de (tetrahidro)lepidonas-2,6-disustituidas, potenciales agentes antifúngicos y leishmanicidas". Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
27. VARGAS, M., **1998**. Tesis de Pregrado: "Homoalilaminas con el fragmento del ciclooctano en la preparacion de espirocompuestos heterocíclicos nitrogenados". Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

28. VARGAS, L.; ROZO, W. and KOUZNETSOV, W., **2000**. "Synthesis of new spiro-N-heterocycles with cyclooctane fragment from N(1-alkenylcyclooctyl)-N-aryl (benzyl) amines". *Heterocycles*, **53**, p.p. 785-796.
29. RIVERO, J.; OCHOA, C.; STASHENKO, E.; MARTÍNEZ, J.; MONTORO, D.; NOGAL, J.; FERNÁNDEZ, S.; GÓMEZ, A.; BAHASAS, A., and AMARO, L., **2002**. "4-N-Aryl (benzyl)amino-4-heteroaryl-1-butenes as building blocks in heterocyclic synthesis. 2. Synthesis of a new tetrahydro-2-benzazepina derivatives and related compounds containing a pyridine ring,". *Heterocycl. Comm*, **8** (84): p.p. 365-368.
30. RIVERO, J., **2000**. Tesis de Pregrado: "Síntesis y evaluación del comportamiento químico de nuevas homoolilaminas con el fragmento β - y γ -piridínico". Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
31. RIVERO, J. **2003**. Tesis de Maestría: "Síntesis de α -fenilnitronas N-sustituidas como posibles atrapadores de radicales libres y su uso sintético en la obtención de nuevos compuestos heterocíclicos nitrogenados". Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina, CIBIMOL, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
32. SALAS, M., **1999**. Tesis de Maestría: "Síntesis de nuevos derivados del tetrahidroespiro[benz-2-azepina-3,1'-cicloheptano] y tetrahidroespiro[benz-2-azepina-3,4'-piperidinas]". Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
33. MUÑOZ A., J.M., **1999**. Tesis de Pregrado: "Síntesis de α -aminometilfuranos como posibles precursores útiles en la química orgánica y medicinal". Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
34. SANABRIA, C.M., **2003**. Tesis de Pregrado: "Preparación de 4-alil-4-N-aryl-aminopiperidinas y sus transformaciones químicas, sistemas de espiroquinolinopiperidinas". Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
35. GÓMEZ, S., **2003**. Tesis de Pregrado: "Estudio exploratorio de la viabilidad de una ruta alterna basada en la transposición amino-Claisen de N-alil-N-aryl-N-tenilaminas para acceder a las 2,5-

dihidro-1H-tieno(2,3-e) benzo-1-azepinas". Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

36. JAIMES, J., **2004**. Tesis de Maestría: "Extensión de la transposición amino-Claisen a la preparación de derivados de la 6,11-dihidrodibenzo[b,e]azepina". Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

2. ANÁLISIS DE RESULTADOS

2.1 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE EXTRACTOS Y FRACCIONES VOLÁTILES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS BAJO ESTUDIO

Las plantas de *Lippia alba*, *Aloysia triphylla*, *Lantana armata*, *Xylopia aromatica* y *Satureja brownei*, utilizadas en esta investigación, se recolectaron en diferentes jardines de la ciudad de Bucaramanga (Santander). Solamente se usaron hojas y tallos frescos en las extracciones. La identificación taxonómica de las plantas se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). Los pliegos testigo de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá), así:

- *Lippia alba* Mill. N.E. Brown., Fam. *Verbenaceae*, N° COL 480747. Clasificada por el doctor J. L. Fernández.
- *Lantana armata* Schauer, Fam. *Verbenaceae*, N° COL 480749. Clasificada por el doctor J. L. Fernández.
- *Aloysia triphylla* (H'er.) Britton, Fam. *Verbenaceae*, N° COL 480750. Clasificada por el doctor J. L. Fernández.
- *Satureja brownei* (Sw.) Briq., Fam. *Labiatae*, N° COL 48751. Clasificada por el doctor J. L. Fernández.
- *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart., Fam. *Annonaceae*, N° COL 480748. Clasificada por el doctor J. Murillo.

Para obtener una información completa acerca de la composición química de metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de las cinco plantas bajo estudio, se emplearon las técnicas HD, MWHD, SDE y SFE. Además, para evaluar mejor la composición química de la fragancia natural de la planta, se usaron métodos de aislamiento menos “invasivos”, *i.e.* las técnicas *headspace* (S-HS, P&T, HS-SPME), donde el calor y el agua, que pueden eventualmente inducir la formación de artefactos durante la extracción, fueron eliminados.

A continuación, se exponen las principales características de las plantas tratadas y los resultados obtenidos sobre la naturaleza química de sus metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles.

2.1.1 *Lippia alba* Mill. N.E. Brown. La *L. alba* es una Verbenácea ampliamente distribuida en Centro y Sur América, conocida también como *Lippia geniculata* HBK o *Lantana alba* Mill, sus nombres populares en Colombia son “Pronto alivio” (Antioquia, Valle, Viejo Caldas), “Curatodo” y “Orégano de cerro” (Magdalena) [1, 2]. En la **Figura 11** se muestra una planta de *L. alba*.

Esta especie se ha empleado como estomacal y antiespasmódica en infusión teiforme; también se ha usado como sedante, desinfectante, diaforética y emenagoga, antiinflamatoria, antihipertensiva, bactericida e insecticida [1-7]. La planta se caracteriza por su intenso y penetrante olor y contiene de 0.1 a 1.2% del aceite volátil. La composición química del aceite esencial de *L. alba* depende sensiblemente del origen geográfico de la planta, las condiciones de su cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción, y de algunos otros factores geobotánicos; lo que evidencian los trabajos sobre la composición química de *L. alba* realizados en Cuba [8], Guatemala [9], India [10,11], Uruguay [12] y Brasil [13-15].

Figura 11. Planta cultivada de *Lippia alba* Mill., N.E. Brown, utilizada en el presente estudio.



2.1.1.1 Metabolitos secundarios volátiles de *L. alba*. En la **Figura 12** aparecen perfiles cromatográficos típicos de metabolitos secundarios volátiles, aislados por HD, MWHD, SDE y SFE, de hojas y tallos frescos de *L. alba*. En las **Tablas 2 y 3**, se registran los compuestos identificados y sus cantidades relativas (%) en diferentes fracciones volátiles, obtenidas por métodos destilativos (HD, MWHD), extractivos (SDE y SFE) y de *headspace* (S-HS, P & T y HS-SPME). Más de 30 sustancias en concentraciones relativas >0.05% se encontraron en el aceite esencial, los extractos y en la fase vapor de la planta.

Figura 12. Cromatogramas típicos de extractos de *Lippia alba*, aislados por **A.** HD; **B.** MWHD; **C.** SDE y **D.** SFE. Columna HP-5 (30 m), *split* 1:30, FID. Ver la **Tabla 2** para la identificación de los picos.

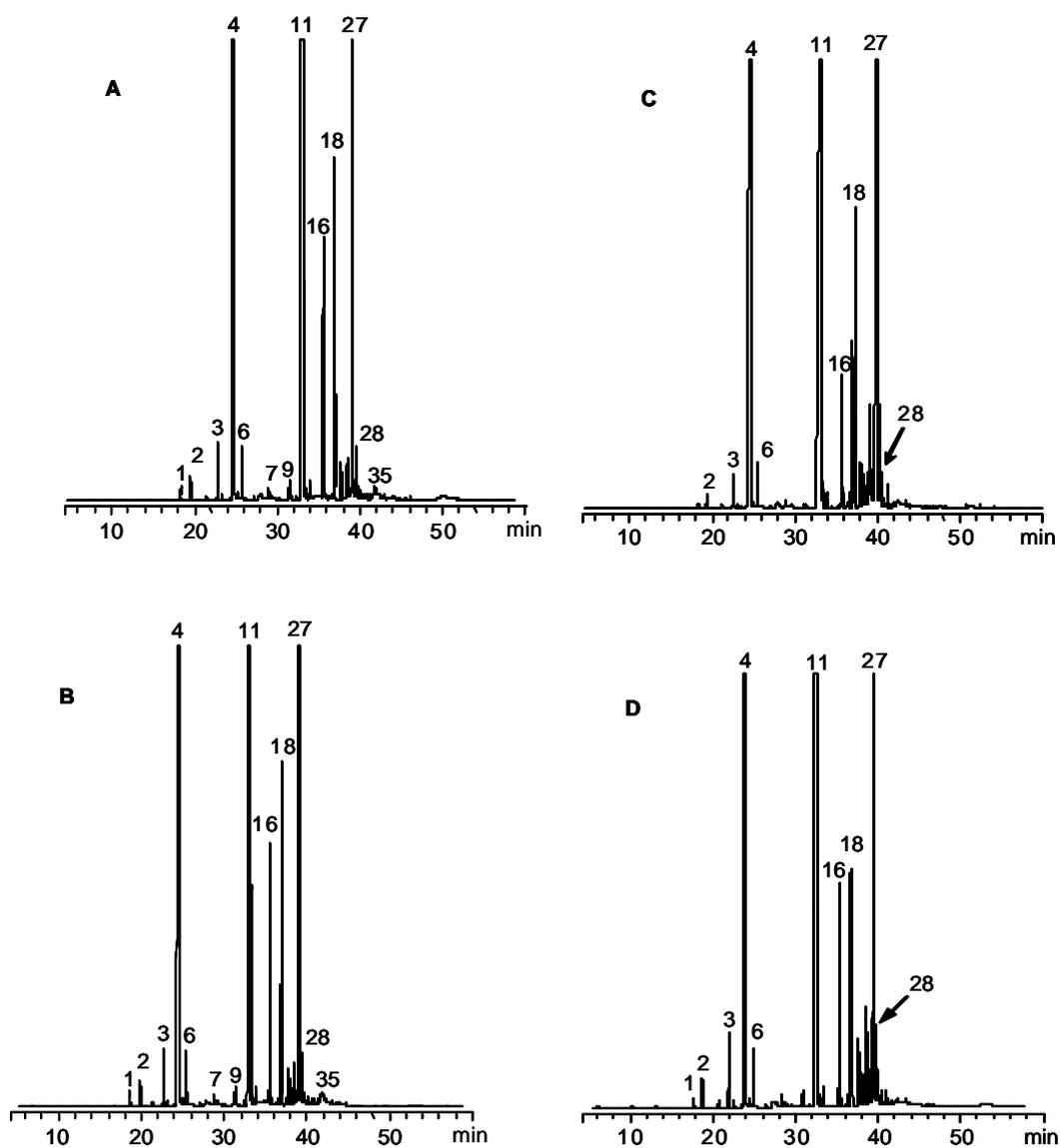


Tabla 2. Composición química de los extractos de *Lippia alba*, obtenidos por diferentes técnicas de extracción.

| Pico ^a Nº | Compuesto | Tipo | I _k ^b | | Cantidad relativa ^c , % | | | |
|-------------------------|---------------------------|------|-----------------------------|---------|------------------------------------|-------------|------------|-------------|
| | | | HP-5 | Innowax | HD | MWHD | SDE | SFE |
| 1 | α-Pineno* | M | 935 | 1039 | 0.05±0.03 | 0.050±0.001 | 0.10±0.16 | 0.070±0.001 |
| 2 | Canfeno | M | 949 | 1066 | 0.14±0.03 | 0.10±0.05 | 0.26±0.07 | 0.2±0.1 |
| 3 | β-Mirceno* | M | 993 | 1157 | 0.405±0.003 | 0.35±0.01 | 0.53±0.04 | 0.3±0.1 |
| 4 | Limoneno* | M | 1033 | 1204 | 32.6±0.8 | 29.60±0.04 | 36.90±0.07 | 23.9±0.1 |
| 5 | (Z)-β-Ocimeno | M | 1043 | 1250 | 0.11±0.03 | 0.16±0.03 | 0.11±0.06 | 0.12±0.01 |
| 6 | Óxido de pineno | MO | 1052 | 1256 | 0.37±0.03 | 0.37±0.01 | 0.41±0.11 | 0.3±0.1 |
| 7 | cis-Tuyona | MO | 1106 | 1562 | 0.18±0.04 | 0.21±0.05 | 0.13±0.04 | 0.2±0.1 |
| 8 | Óxido de limoneno* | MO | 1133 | 1211 | 0.16±0.03 | 0.19±0.02 | 0.1±0.1 | 0.19±0.01 |
| 9 | trans-Dihidrocarvona | MO | 1197 | 1602 | 0.12±0.05 | 0.08±0.07 | 0.1±0.1 | 0.18±0.03 |
| 10 | Pulegona* | MO | 1205 | 1662 | 0.15±0.01 | 0.11±0.03 | 0.2±0.1 | 0.2±0.1 |
| 11 | Carvona* | MO | 1259 | 1715 | 51.0±0.1 | 57.20±0.02 | 45.1±0.1 | 40.5±0.1 |
| 12 | Piperitona | MO | 1347 | 1782 | 0.83±0.01 | 1.23±0.02 | 0.8±0.3 | 1.0±0.1 |
| 13 | Geranial* | MO | 1270 | 1730 | 0.09±0.01 | 0.12±0.02 | 0.24±0.04 | 0.41±0.01 |
| 14 | trans-Óxido de carvona | MO | 1282 | 1800 | 0.13±0.11 | 0.19±0.02 | 0.12±0.03 | 0.1±0.1 |
| 15 | trans-Acetato de carveilo | MO | 1341 | 1777 | 0.09±0.02 | 0.10±0.03 | 0.4±0.1 | 0.1±0.1 |
| 16 | Piperitenona | MO | 1347 | 1782 | 1.5±0.1 | 1.81±0.02 | 1.1±0.4 | 1.6±0.7 |
| 17 | β-Bourboneno | S | 1391 | 1526 | 0.7±0.2 | 0.60±0.02 | 1.0±0.3 | 1.5±0.1 |
| 18 | α-Copaeno | S | 1393 | 1520 | 0.40±0.05 | 0.22±0.03 | 0.5±0.2 | 0.6±0.1 |
| 19 | β-Cubebeno | S | 1396 | 1544 | 0.6±0.1 | 0.35±0.02 | 0.6±0.5 | 0.5±0.1 |
| 20 | γ-Elemeno | S | 1426 | 1470 | 0.4±0.3 | 0.22±0.02 | 0.35±0.03 | 0.3±0.1 |
| 21 | β-Cedreno | S | 1436 | 1470 | 0.3±0.1 | 0.22±0.02 | 0.26±0.03 | 0.4±0.1 |
| 22 | trans-β-Cariofileno* | S | 1452 | 1618 | 0.20±0.02 | 0.13±0.09 | 0.17±0.02 | 0.3±0.1 |
| 23 | α-Humuleno | S | 1460 | 1670 | 0.4±0.2 | 0.19±0.01 | 0.5±0.3 | 1.0±0.1 |
| 24 | β-Farneseno* | S | 1469 | 1695 | 0.3±0.2 | 0.24±0.01 | 0.4±0.3 | 0.8±0.1 |
| 25 | allo-Aromadendreno | S | 1475 | 1662 | 0.1±0.1 | 0.12±0.02 | 0.2±0.2 | 0.3±0.1 |
| 26 | Germacreno D | S | 1486 | 1720 | 0.1±0.1 | 0.12±0.02 | 0.1±0.1 | 0.3±0.1 |
| 27 | Biciclosesquifelandreno | S | 1489 | 1760 | 7.3±0.3 | 4.79±0.09 | 8.9±0.4 | 21.8±0.1 |
| 28 | Germacreno A | S | 1505 | 1769 | 0.4±0.1 | 0.28±0.02 | 0.5±0.3 | 0.9±0.1 |
| 29 | β-Bisaboleno | S | 1508 | 1745 | tr | tr | tr | 0.11±0.03 |
| 30 | Cubebol | SO | 1514 | 2010 | 0.15±0.02 | 0.11±0.04 | 0.14±0.06 | 0.3±0.1 |
| 31 | δ-Cadineno | S | 1520 | 1785 | tr | tr | tr | 0.12±0.02 |
| 32 | (E)-α-Bisaboleno | S | 1528 | 1790 | tr | tr | tr | 0.1±0.1 |
| 33 | Óxido de cariofileno | SO | 1580 | 1965 | tr | tr | tr | 0.22±0.04 |
| 34 | Germacreno B | S | 1596 | 1776 | 0.3±0.1 | 0.2±0.1 | 0.1±0.1 | 0.20±0.03 |
| 35 | Óxido de humuleno | SO | 1605 | 1970 | 0.3±0.2 | 0.19±0.04 | 0.20±0.04 | 0.2±0.1 |
| 36 | Cedranona | SO | 1620 | 2030 | 0.1±0.1 | 0.2±0.1 | 0.1±0.1 | 0.2±0.1 |

| | | | | | | | | |
|----|---------------------------------|----|------|------|---|---|---|---------------|
| 37 | <i>epi</i> - α -Muurolol | SO | 1641 | 2136 | - | - | - | 0.1 \pm 0.1 |
|----|---------------------------------|----|------|------|---|---|---|---------------|

Continuación de la **Tabla 2.**

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|---|----------------|------------------|-----------------|----------------|---|-----------------|
| 38 | Hidrocarburo, C ₂₅ | - | - | - | - | - | - | 0.10 \pm 0.03 |
| 39 | Hidrocarburo, C ₂₆ | - | - | - | - | - | - | 0.12 \pm 0.01 |
| M: Monoterpenos | | | 33.3 \pm 0.4 | 30.2 \pm 0.1 | 37.9 \pm 0.2 | 24.6 \pm 0.1 | | |
| MT: Monoterpenonas | | | 54.0 \pm 0.2 | 60.7 \pm 0.1 | 47 \pm 1 | 43.7 \pm 0.9 | | |
| MO: Monoterpenos oxigenados ^d | | | 0.8 \pm 0.1 | 0.97 \pm 0.04 | 0.8 \pm 0.5 | 1 \pm 1 | | |
| S: Sesquiterpenos | | | 11.3 \pm 0.5 | 19.03 \pm 0.04 | 14 \pm 1 | 29.4 \pm 0.1 | | |
| SO: Sesquiterpenos oxigenados ^e | | | 0.9 \pm 0.2 | 0.5 \pm 0.1 | 0.42 \pm 0.07 | 1.1 \pm 0.1 | | |

- a. Número del pico en la **Figura 12.**
- b. Índices de Kovàts determinados experimentalmente en las columnas HP-5 e Innowax.
- c. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en columna HP-5, promedio de tres extracciones para cada técnica.
- d. Óxidos, aldehídos, alcoholes y acetatos.
- e. Óxidos, alcoholes y cetonas.
- tr* Trazas.
- * Identificado por espectrometría de masas, usando sustancia patrón.

La composición de aceites esenciales de *L. alba* y del extracto, obtenidos por HD, MWHD y SDE, respectivamente, es muy similar. En cambio, en el extracto aislado por SFE, se encontraron en mayor proporción sesquiterpenos. La fracción altamente volátil, *i.e.* monoterpenos, se recuperó mejor por el método SDE (ca. 38% Vs 33 y 30% para HD y MWHD), mientras que la técnica SFE permitió aislar más eficientemente los compuestos menos volátiles, *i.e.* sesquiterpenoides (ca. 30% Vs 11 y 19% para HD y MWHD). El método MWHD fue el más ventajoso en cuanto al tiempo de extracción mucho más corto (30 min; rendimiento del aceite 0.70%), en comparación con el HD convencional (2 horas; rendimiento del aceite 0.69%), la composición de ambos aceites obtenidos fue prácticamente la misma, como se aprecia en la **Tabla 2.**

La carvona (40-57%) fue el componente mayoritario en todos los aceites (HD, MWHD) y extractos (SDE, SFE) de *L. alba*, seguido del limoneno (24-37%), el biciclosesquifelandreno (2-22%), la piperitenona (1-2%), la piperitona (0.8-1.2%) y el β -bourboneno (0.6-1.5). La *L. alba* colombiana es un quimiotipo nuevo, no descrito previamente en la literatura, que se destaca por el alto contenido de la carvona; mientras que los otros quimiotipos de esta planta, cultivados en India [10,11], Uruguay [12] y Brasil (São Paulo) [15], poseen el linalool como compuesto mayoritario (55-85%). En el aceite esencial de *L. alba* de Guatemala prevalecen el limoneno (44%) y la piperitona (31%) [9].

Para evaluar la composición química de la fragancia natural de la planta, se usaron también métodos *headspace* (S-HS, P&T y HS-SPME). La composición de las fracciones volátiles de *L. alba* depende del método de *headspace* empleado. La técnica *headspace* estático, tal vez, refleja mejor el olor propio de la planta, tal como lo percibe la nariz; los métodos de *headspace* dinámico y HS-SPME incluyen la etapa de concentración y, por ende, la composición de las fracciones volátiles obtenidas dependerá notoriamente de los tiempos de purga (P&T) y de la exposición de la fibra (HS-SPME), respectivamente [16].

En la **Figura 13** se muestran perfiles cromatográficos típicos de las fracciones volátiles aisladas por las técnicas *headspace* (S-HS, P&T, HS-SPME). Como se puede observar en la **Tabla 3**, el número de componentes aislados por los métodos HS es menor que el obtenido por las técnicas extractivas (**Tabla 2**). El compuesto principal en las fracciones volátiles fue el limoneno (27-77%), seguido de carvona (14-30%), el biciclosesquifelandreno (1-33%) y el β -bourboneno (0.5-6.5%). El método S-HS extrajo predominantemente los compuestos más volátiles, *i.e.* monoterpenos, y sus análogos oxigenados.

Figura 13. Composición química de la fragancia de *Lippia alba*, obtenida por diferentes métodos *headspace* **A.** HS-SPME; **B.** P&T y **C.** S-HS. Columna HP-5 (30 m), *split* 1:30, FID. Ver la **Tabla 3** para la identificación de los picos.

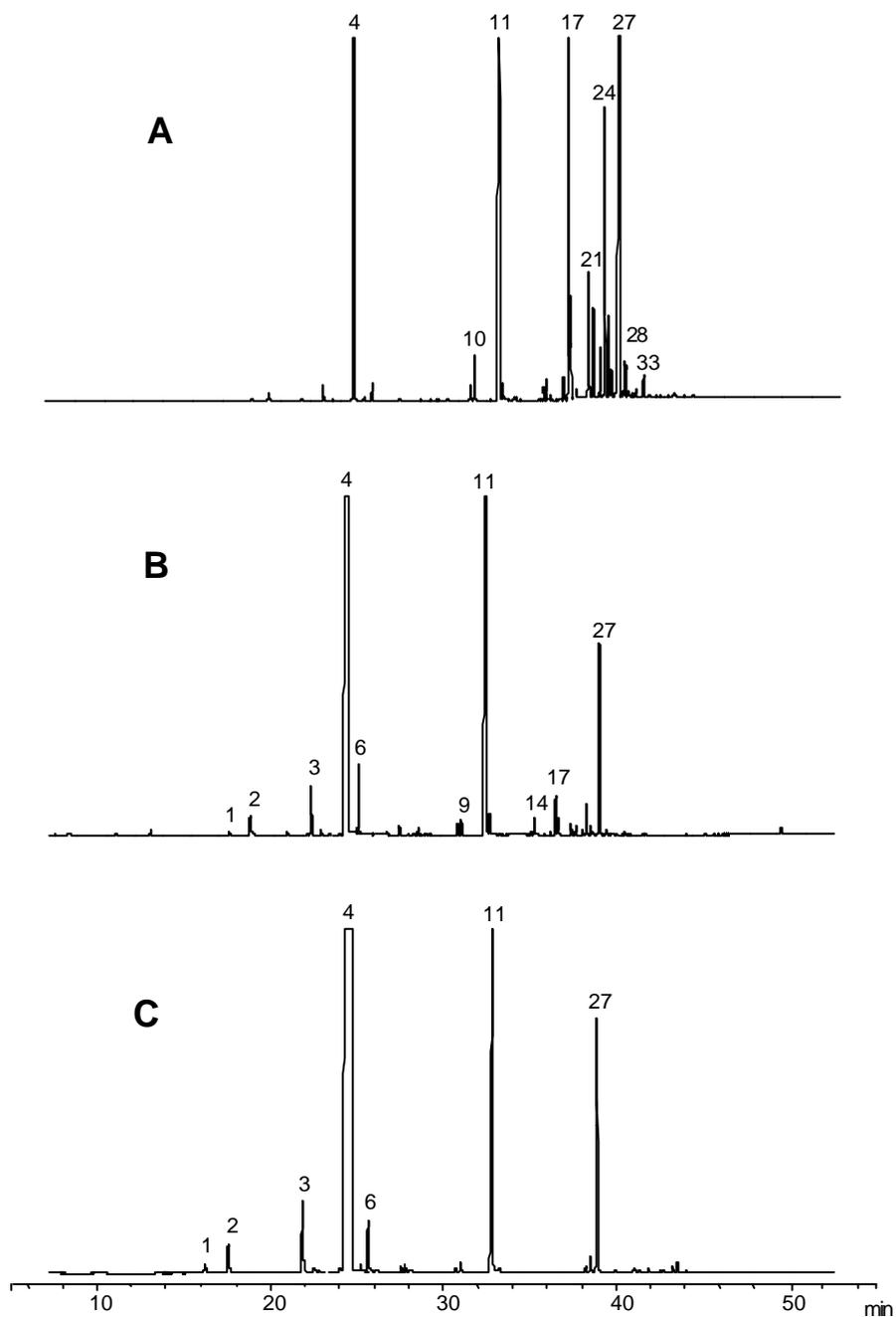


Tabla 3 Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en las fracciones volátiles de *L. alba*, obtenidos por P&T, S-HS y HS-SPME.

| Pico No ^a | Compuesto | Tipo | Headspace | | |
|--|--------------------------------------|------|-----------------|-----------------|------------------|
| | | | P & T | S-HS | SPME |
| 1 | α -Pinoeno* | M | 0,16 \pm 0,01 | 0,62 \pm 0,01 | <i>tr</i> |
| 2 | Canfeno | M | 0,4 \pm 0,1 | 0,88 \pm 0,04 | 0,20 \pm 0,02 |
| 3 | β -Mirceno* | M | 0,8 \pm 0,1 | 1,1 \pm 0,1 | 0,3 \pm 0,2 |
| 4 | Limoneno* | M | 62,7 \pm 0,6 | 77 \pm 2 | 26,7 \pm 0,1 |
| 5 | (Z)- β -Ocimeno | M | 0,18 \pm 0,02 | 0,63 \pm 0,05 | 0,28 \pm 0,01 |
| 6 | Óxido de pinoeno | MO | 0,6 \pm 0,1 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| 7 | Tujona | MO | 0,38 \pm 0,01 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| 8 | Óxido de limoneno* | MO | 0,2 \pm 0,1 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| 9 | <i>trans</i> -Dihidrocarvona | MO | 0,2 \pm 0,1 | <i>tr</i> | 0,2 \pm 0,1 |
| 10 | Pulegona* | MO | 0,21 \pm 0,02 | <i>tr</i> | 0,8 \pm 0,4 |
| 11 | Carvona* | MO | 29,8 \pm 0,9 | 13,9 \pm 0,5 | 15,45 \pm 0,05 |
| 12 | Piperitona | MO | 0,5 \pm 0,1 | 0,39 \pm 0,01 | 0,3 \pm 0,1 |
| 13 | Geranial* | MO | 0,10 \pm 0,03 | 0,35 \pm 0,01 | <i>tr</i> |
| 14 | <i>trans</i> -Óxido de Carvona | MO | 0,11 \pm 0,02 | 0,30 \pm 0,01 | <i>tr</i> |
| 15 | <i>trans</i> -Acetato de carveilo | MO | 0,08 \pm 0,01 | 0,59 \pm 0,01 | 0,21 \pm 0,05 |
| 16 | Piperitenona | MO | 0,43 \pm 0,04 | 0,31 \pm 0,01 | 0,4 \pm 0,1 |
| 17 | β -Bourboneno | S | 0,5 \pm 0,1 | 0,49 \pm 0,02 | 6,5 \pm 0,3 |
| 18 | α -Copaeno | S | 0,1 \pm 0,1 | <i>tr</i> | 0,66 \pm 0,04 |
| 19 | β -Cubebeno | S | 0,20 \pm 0,01 | <i>tr</i> | 2 \pm 1 |
| 20 | Elemeno | S | 0,18 \pm 0,05 | <i>tr</i> | 0,2 \pm 0,1 |
| 21 | Cedreno | S | 0,18 \pm 0,01 | <i>tr</i> | 2,0 \pm 0,1 |
| 22 | <i>trans</i> - β -Cariofileno* | S | 0,11 \pm 0,01 | <i>tr</i> | 1,8 \pm 0,4 |
| 23 | α -Humuleno | S | 0,14 \pm 0,05 | <i>tr</i> | 0,72 \pm 0,03 |
| 24 | β -Farneseno* | S | 0,1 \pm 0,1 | <i>tr</i> | 4,9 \pm 0,2 |
| 25 | <i>allo</i> Aromadendreno | S | 0,07 \pm 0,01 | <i>tr</i> | 1,38 \pm 0,02 |
| 26 | Germacreno D | S | 0,11 \pm 0,05 | <i>tr</i> | 0,4 \pm 0,3 |
| 27 | Biciclosesquifelandreno | S | 1,14 \pm 0,01 | 2,2 \pm 0,5 | 32,7 \pm 0,4 |
| 28 | Germacreno B | S | 0,12 \pm 0,05 | <i>tr</i> | 0,6 \pm 0,1 |
| 29 | β -Bisaboleno | S | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,38 \pm 0,04 |
| 30 | Cubebol | SO | 0,05 \pm 0,01 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| 33 | Óxido de cariofileno | SO | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,3 \pm 0,2 |
| M: Monoterpenos | | | 64,3 \pm 0,8 | 80,5 \pm 0,1 | 27,5 \pm 0,3 |
| MT: Monoterpenonas | | | 31 \pm 1 | 14,6 \pm 0,6 | 17,2 \pm 0,5 |
| MO: Monoterpenos oxigenados ^b | | | 1,1 \pm 0,1 | 1,20 \pm 0,01 | 0,2 \pm 0,1 |

Continuación de la **Tabla 3**.

| | | | |
|--|-------------|-----------|------------|
| S: Sesquiterpenos | 2.9 ± 0.1 | 2.6 ± 0.1 | 54.6 ± 0.6 |
| SO: Sesquiterpenos oxigenados ^c | 0,10 ± 0,01 | – | 0,3 ± 0,2 |

a. Número del pico en la **Figura 13**.

b. Óxidos, aldehídos, alcoholes y acetatos.

c. Óxidos, alcoholes y cetonas.

tr Trazas.

* Identificado por espectrometría de masas usando compuesto estándar.

La composición de la fracción volátil de *L. alba*, aislada por HS-SPME, dependió en gran medida del tiempo de la exposición de la fibra, tal como se puede observar en la **Figura 14**, donde se aprecia que a mayor tiempo de exposición, se extrajo mayor cantidad de componentes y, además, la fracción aislada se saturaba progresivamente con sustancias menos volátiles, *i.e.* sesquiterpenos, que poseen coeficientes de distribución, K_D , más altos que los monoterpenos, pero sus volatilidades y velocidades de difusión son más bajas.

La diferencia en la composición química de los aceites esenciales y los extractos se ilustra en la **Figura 15**, en la cual los resultados de las **Tablas 2 y 3**, fueron agrupados por familias de compuestos. Los monoterpenos y monoterpenonas predominaron en las fracciones volátiles de *L. alba* obtenidos por métodos *headspace*. La mejor recuperación de monoterpenos y sus análogos oxigenados se logró con las técnicas HD y MWHD, mientras que los sesquiterpenoides se aislaron en mayor proporción, usando la técnica SFE.

En la **Tabla 4** se comparan los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de *L. alba* colombiana [16] con los obtenidos en los aceites de *L. alba* cultivada en otros países, a saber: Cuba [8] y 3 municipios diferentes de Brasil (Belterra, Santamaria y Chaves) [14]. El aceite esencial de *L. alba* cubana se extrajo de las partes aéreas de la planta (hojas, tallos y flores), secas y molidas, usando el método de hidrodestilación durante 3 horas; para obtener el aceite

esencial de *L. alba* de las tres provincias del Brasil, se emplearon también las partes aéreas de la planta seca y la extracción se llevó a cabo por el método de destilación por arrastre con vapor (4 horas); en el presente trabajo se utilizaron las hojas y tallos finamente picados de la planta fresca, y para la extracción del aceite esencial se usó la técnica de hidrodestilación (HD y MWHD, durante 2 horas y 30 min., respectivamente). Los datos obtenidos ilustran las diferencias en la composición química de los aceites, que depende del origen geográfico de la planta, las condiciones de su cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción y de algunos otros factores geobotánicos [3,16-18].

Figura 14. Cantidad relativa (%) de los componentes principales, aislados por SPME de la fase vapor, de la planta fresca de *Lippia alba*, en función del tiempo de exposición de la fibra (PDMS, 100 µm).

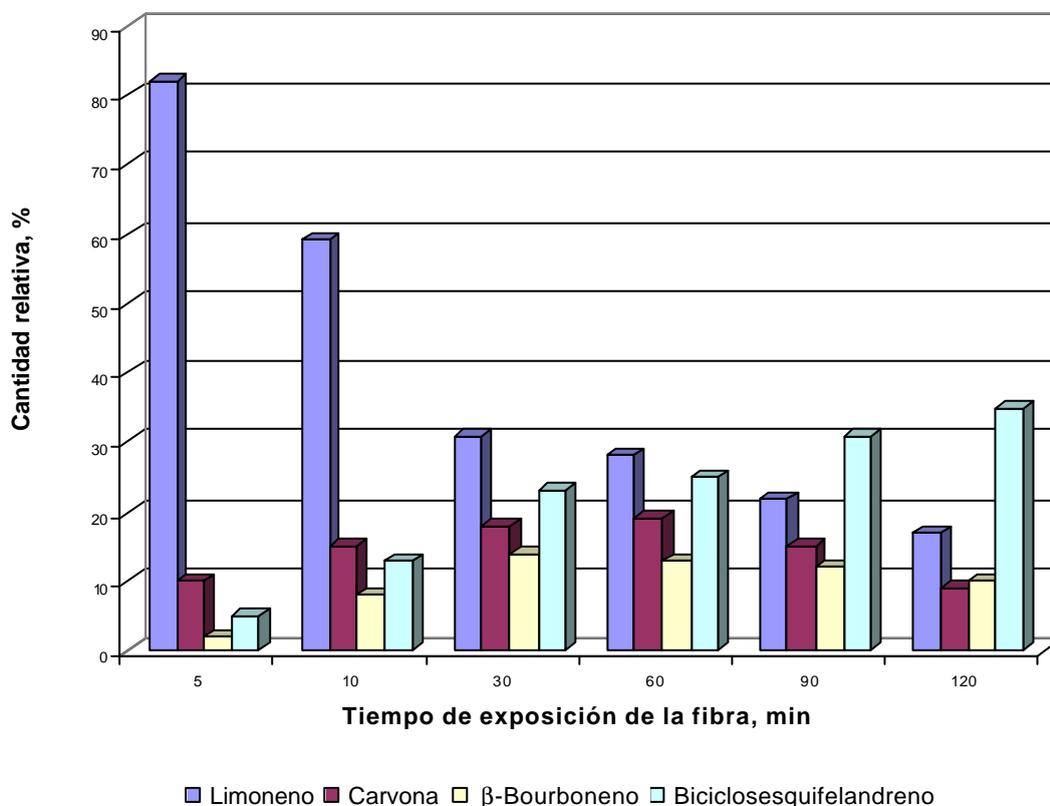


Figura 15. Distribución de las principales familias de los compuestos en los aceites esenciales, extractos y fracciones volátiles de *L. alba*, obtenidos por los diferentes métodos. M: Monoterpenos, MT: Monoterpenonas, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Sesquiterpenos, SO: Sesquiterpenos oxigenados.

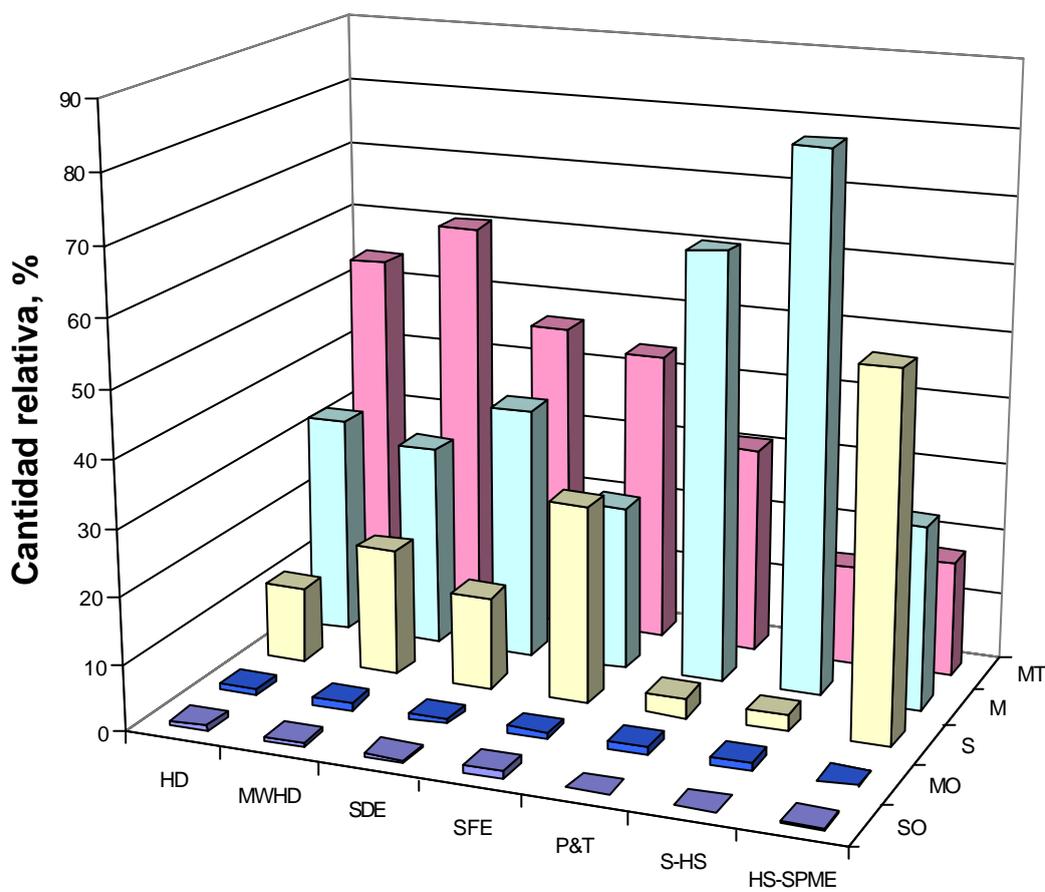
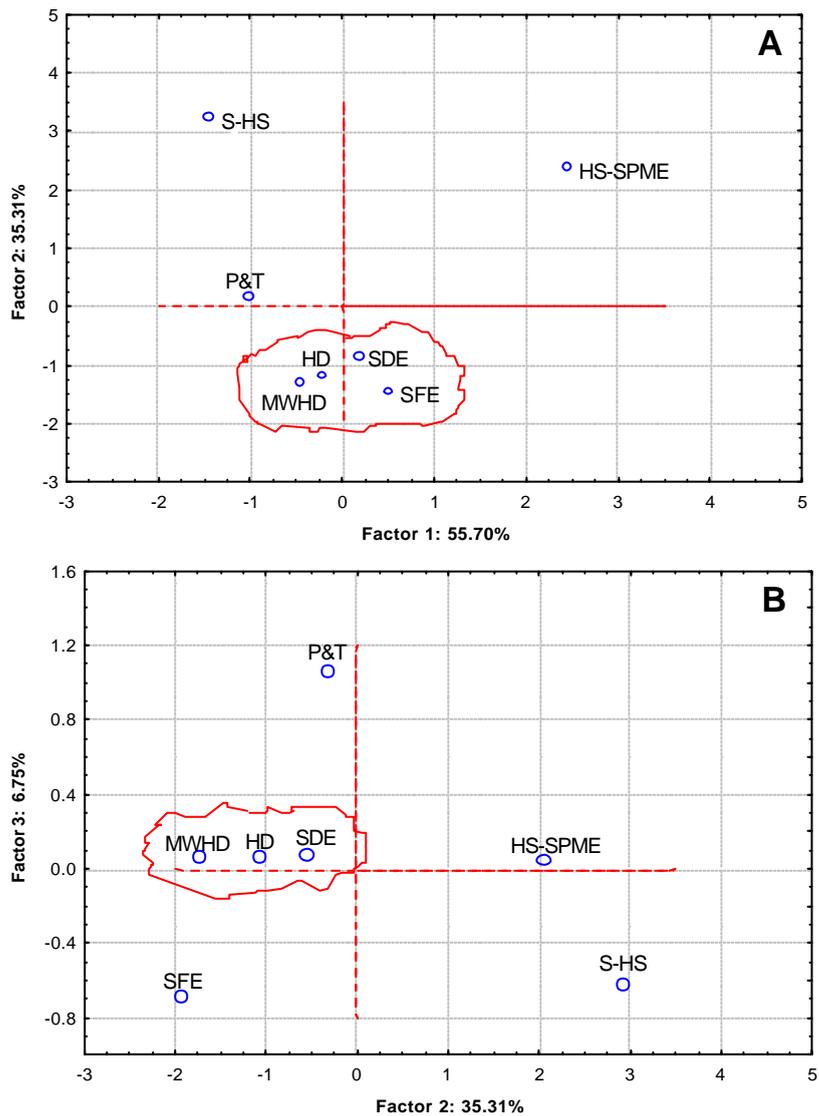


Tabla 4. Composición del aceite esencial de *Lippia alba* de diferentes orígenes geográficos.

| Compuesto | Cantidad relativa, % | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|----------|--------|------|-----------------------|
| | Brasil | | | Cuba | Bucaramanga, Colombia |
| | Santamaria | Belterra | Chaves | | |
| 1,8-Cineol | 35 | – | 3 | – | – |
| Limoneno | 18 | 32 | 1 | 6 | 29-32 |
| Carvona | 9 | 32 | – | 4 | 51-57 |
| Sabineno | 8 | 0.7 | 1 | 0.01 | – |
| β -Mirceno | 37 | 11 | – | 0.3 | ca. 0.4 |
| Linalool | 0.7 | 0.7 | 4 | 1 | – |
| Neral | – | – | 14 | – | – |
| Geranial | – | – | 23 | – | ca. 0.1 |
| Germacreno D | – | 21 | 25 | – | ca. 0.1 |
| <i>trans</i> - β -Cariofileno | 0.5 | – | 10 | 1 | 0.1-0.2 |
| β -Guaieno | – | – | – | 10 | – |
| Piperitona | 0.4 | – | – | 4 | 0.8-1.2 |
| Piperitenona | – | – | – | 8 | 1-2 |
| Biciclosesquifelandreno | – | – | – | – | 4-7 |
| β -Bourboneno | 0.5 | – | – | 3 | 0.6-0.7 |

Para apreciar mejor la influencia del método de aislamiento sobre la composición final de las fracciones volátiles, obtenidas por las diferentes técnicas extractivas (HD, MWHD, SDE y SFE) y de *headspace* (S-HS, P & T y HS-SPME), se aplicó el análisis estadístico de componentes principales, PCA. El análisis comparativo de los diferentes extractos de *L. alba* indica que más del 90% de la información de las **Tablas 2 y 3**, puede ser representada por un subespacio de tres coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones relativas de los componentes presentes en los diferentes extractos, tal como se aprecia en la **Figura 16**.

Figura 16. Representación gráfica de las composiciones relativas de fracciones volátiles, aisladas de la planta fresca de *L. alba* por diferentes métodos de extracción, en el espacio formado por los primeros tres componentes principales: **A.** *Factor 1 Vs Factor 2.* **B. *Factor 2 Vs Factor 3.* Véase el **Anexo 2 (Tabla 1)** para las contribuciones de los componentes en cada uno de los *Factores*.**



La **Figura 16** muestra que el *Factor 1* involucra el 56% de la información y está representado por el óxido de limoneno, *p*-ocimeno, tuyona, pulegona piperitona y *trans*-acetato de carveilo, y sesquiterpenos (β -bourboneno, β -cubebeno, cedreno, *trans*-cariofileno, *allo*-aromadendreno, etc). El *Factor 2* corresponde al 35% de la información y está conformado por pineno, canfeno, mirceno, limoneno; cetonas (carvona, piperitona, piperitenona), otros compuestos oxigenados (óxidos de carvona y limoneno) y sesquiterpenos (α -copaeno, elemeno, α -humuleno, germacreno A, biciclosesquifelandreno). La principal contribución al *Factor 3*, que constituye el 7% de la información, la hacen el geranial, cadineno, germacreno D, cubebol γ -bisaboleno y *epi*- α -muurolol. En el **Anexo 2 (Tabla 1)** aparecen las contribuciones de las diferentes sustancias químicas correspondientes a cada uno de los factores. Como se puede observar en la **Figura 16**, la proximidad de los puntos correspondientes a los métodos HD, MWHD y SDE, confirma la similitud de las composiciones obtenidas por estas técnicas (**Tabla 2**), así como las diferencias composicionales notorias con los métodos *headspace* (e.g. HS estático Vs HS dinámico).

2.1.2 *Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton. Esta planta se conoce también como *Aloysia citriodora* Ortega ex Pers., *Verbena triphylla* L'Héritier y *Lippia citriodora* Kunth; popularmente se llama "Limón verbena", "Cidrón" o "Cedrón", "Verbena", "Yerba Luisa" o "Hierba de la princesa", según el país o la región [1, 2]. Es una planta espontánea de América del Sur, originaria, posiblemente, del Perú, cultivada, por ser medicinal y ornamental, en solares y jardines de los climas fríos y templados con bastante luz solar; se caracteriza por emanar una intensa y agradable fragancia de limón. La infusión o decocción de las hojas de esta especie se usa en medicina popular como antiespasmódica, tranquilizante, calmante nervioso, expectorante, estomacal y antipirética [1, 2, 7].

En varios trabajos se reportan propiedades biológicas del aceite esencial de *A. triphylla* y/o algunos de sus componentes, a saber: antidiarreica [19], antimicótica

[20], psicotrópica [21], analgésica y anti-inflamatoria [7, 22]. En la **Figura 17** se muestra la planta de *A. triphylla*.

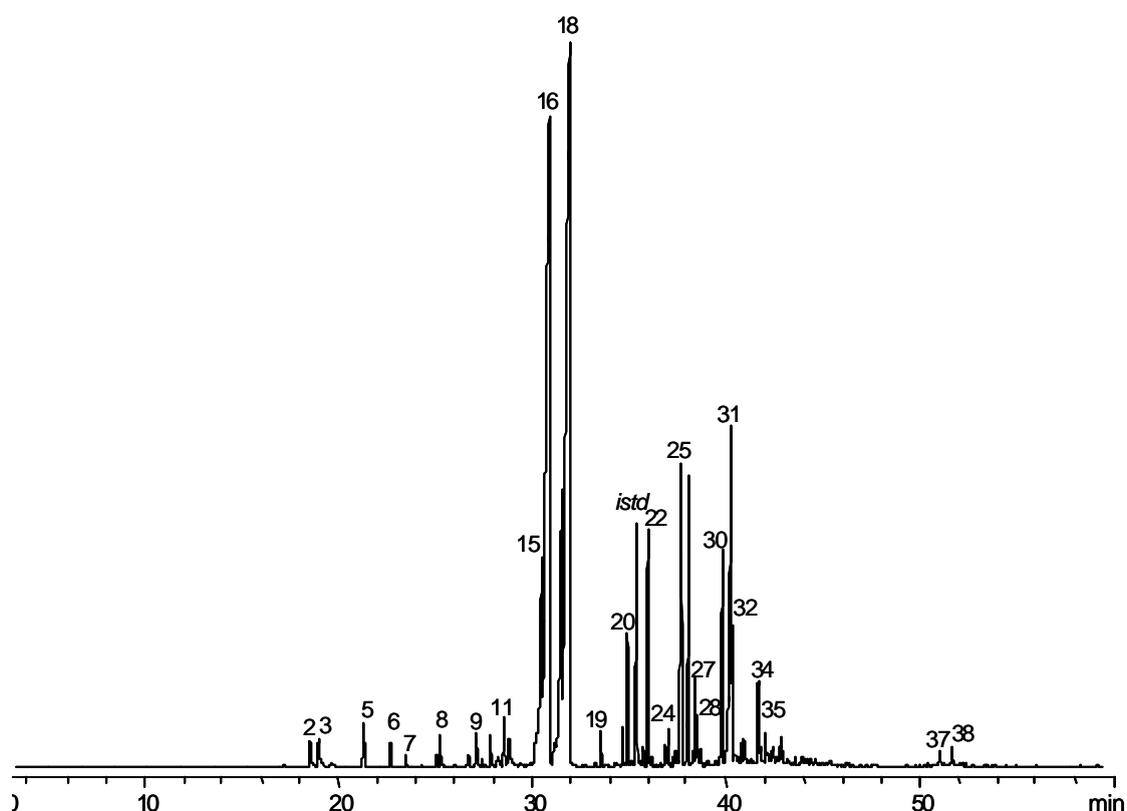
Figura 17. Planta de *Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton.



2.1.2.1 Metabolitos secundarios volátiles de *A. triphylla*. En la **Figura 18**, se observa un perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *A. triphylla* colombiana, obtenido por hidrodestilación. En el cromatograma se destacan dos picos principales, correspondientes al neral y geranial, isómeros geométricos del citral, y un poblado grupo de señales características de sesquiterpenos ($t_R > 34$ min). En los extractos de *A. triphylla* colombiana, obtenidos por HD, MWHD, SDE, y SFE se identificaron 37, 35, 38 y 37 metabolitos secundarios, respectivamente, en concentraciones superiores a 0.1%, así como se aprecia en la **Tabla 5**, donde se

reportan las cantidades relativas (%) y la identificación con base en índices de Kovàts y espectros de masas de los componentes aislados.

Figura 18. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *A. triphylla*, obtenido por hidrodestilación; *istd* = *n*-tetradecano. Columna HP-5 (30 m), *split* 1:30, FID. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 5**.



El principal compuesto encontrado en todos los extractos fue el geranial (33-38%), identificado por comparación de su espectro de masas con el de compuesto patrón. Otros compuestos encontrados en alta proporción, fueron el neral (19-22%), nerol (1-5%), geraniol (2-6%), los sesquiterpenoides *ar*-curcumeno (3-5%), biciclosesquifelandreno (1-2%), espatulenol (3-4%), nerolidol (1-2%), *trans*- β -cariofileno (3-5%) y su óxido (ca. 1%) (Véase **Tabla 5**).

Tabla 5. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de *A. triphylla*, aislados por métodos extractivos.

| No Pico ^a | Compuesto | Tipo | I _K ^b | | Cantidad relativa, % ^c | | | |
|----------------------|----------------------------------|------|-----------------------------|---------|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | HP-5 | Innowax | HD | MWHD | SDE | SFE |
| 1 | α-Fencheno | M | 951 | 1070 | 0,12 ± 0,02 | <i>tr</i> | 0,21 ± 0,04 | 0,10 ± 0,01 |
| 2 | 1-Octen-3-d | HO | 979 | 1415 | 0,55 ± 0,01 | 0,50 ± 0,01 | 1,6 ± 0,1 | 2,4 ± 0,1 |
| 3 | 6-Metil-5-hepten-2-ona | HO | 984 | — | 0,37 ± 0,01 | <i>tr</i> | 2,1 ± 0,2 | <i>tr</i> |
| 4 | 3-Octanol | HO | 996 | 1519 | 0,14 ± 0,02 | <i>tr</i> | 0,3 ± 0,2 | <i>tr</i> |
| 5 | Limoneno* | M | 1032 | 1204 | 0,6 ± 0,1 | 0,60 ± 0,01 | 6 ± 1 | 3,3 ± 0,2 |
| 6 | 1,8-Cineol* | MO | 1036 | 1228 | 0,40 ± 0,01 | 0,19 ± 0,01 | 1,7 ± 0,6 | 1,30 ± 0,03 |
| 7 | <i>cis</i> -β-Ocimeno* | M | 1046 | 1250 | 0,22 ± 0,02 | 0,30 ± 0,01 | 0,21 ± 0,05 | 0,16 ± 0,01 |
| 8 | Linalool* | MO | 1099 | 1508 | 0,39 ± 0,05 | 0,40 ± 0,01 | 0,44 ± 0,01 | 0,21 ± 0,01 |
| 9 | <i>cis</i> -Fotocitral | MO | 1140 | 1613 | 0,21 ± 0,05 | 0,50 ± 0,03 | 0,32 ± 0,01 | 0,16 ± 0,03 |
| 10 | <i>trans</i> -Fotocitral | MO | 1149 | 1572 | 0,9 ± 0,3 | 0,60 ± 0,02 | 1,0 ± 0,1 | 0,60 ± 0,02 |
| 11 | Mentol | MO | 1174 | 1614 | 0,5 ± 0,1 | 0,70 ± 0,03 | 0,4 ± 0,1 | 0,18 ± 0,03 |
| 12 | Terpinen-4-ol* | MO | 1180 | 1630 | 0,6 ± 0,2 | 0,55 ± 0,04 | 1,5 ± 0,5 | 0,48 ± 0,02 |
| 13 | α-Terpineol* | MO | 1192 | 1730 | 0,69 ± 0,01 | 0,6 ± 0,1 | 0,68 ± 0,04 | 0,3 ± 0,1 |
| 14 | Dihidrocitronelol | MO | 1198 | 1750 | 1,20 ± 0,02 | 1,7 ± 0,1 | 1,4 ± 0,1 | 0,80 ± 0,01 |
| 15 | Nerol* | MO | 1226 | 1755 | 4,7 ± 0,1 | 4,1 ± 0,3 | 5,1 ± 0,4 | 1,75 ± 0,03 |
| 16 | Neral* | MO | 1242 | 1682 | 19 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 2 | 21,9 ± 0,3 |
| 17 | Geraniol* | MO | 1251 | 1795 | 5,4 ± 0,2 | 5,6 ± 0,5 | 5,9 ± 0,5 | 1,94 ± 0,03 |
| 18 | Geranial* | MO | 1271 | 1728 | 38 ± 2 | 38 ± 2 | 33 ± 2 | 34,0 ± 0,4 |
| 19 | <i>cis</i> -Acetato de verbenilo | MO | 1283 | 1690 | 0,72 ± 0,02 | 0,70 ± 0,05 | 0,7 ± 0,1 | 0,90 ± 0,05 |
| 20 | α-Copaeno | S | 1385 | 1526 | 0,29 ± 0,01 | 0,20 ± 0,05 | 0,30 ± 0,01 | 0,27 ± 0,04 |
| 21 | β-Bourboneno | S | 1394 | 1520 | 1,20 ± 0,01 | 1,4 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 | 1,4 ± 0,3 |
| 22 | <i>trans</i> -β-Cariofileno* | S | 1431 | 1618 | 2,8 ± 0,1 | 3,1 ± 0,1 | 2,6 ± 0,6 | 5,40 ± 0,01 |
| 23 | β-Copaeno | S | 1437 | 1628 | 0,5 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 | 0,20 ± 0,03 | 0,20 ± 0,04 |
| 24 | α-Aromadendreno | S | 1439 | 1662 | 0,75 ± 0,01 | 0,80 ± 0,02 | 0,5 ± 0,2 | 0,60 ± 0,01 |
| 25 | <i>ar</i> -Curcumeno | S | 1481 | 1775 | 3,09 ± 0,05 | 4,0 ± 0,5 | 3 ± 2 | 4,8 ± 0,2 |
| 26 | Biciclosesquifelandreno | S | 1487 | 1760 | 1,31 ± 0,03 | 1,5 ± 0,1 | 2 ± 1 | 2,4 ± 0,5 |
| 27 | Biciclogermacreno | S | 1508 | 1768 | 3,4 ± 0,1 | 3,4 ± 0,6 | 1,5 ± 0,5 | 0,7 ± 0,1 |
| 28 | γ-Cadineno | S | 1514 | 1770 | 0,71 ± 0,01 | 0,6 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 | 0,50 ± 0,01 |
| 29 | β-Sesquifelandreno | S | 1527 | 1787 | 0,58 ± 0,01 | 0,47 ± 0,01 | 0,34 ± 0,01 | 3,70 ± 0,05 |
| 30 | Nerolidol* | SO | 1564 | 2040 | 2,26 ± 0,01 | 2,4 ± 0,3 | 1,35 ± 0,03 | 2,30 ± 0,03 |
| 31 | Espatuleno | SO | 1592 | 2150 | 3,6 ± 0,5 | 3 ± 1 | 2,7 ± 0,5 | 2,6 ± 0,1 |
| 32 | Óxido de cariofileno | SO | 1599 | 1965 | 1,10 ± 0,04 | 0,7 ± 0,1 | 1,2 ± 0,1 | 0,50 ± 0,01 |
| 33 | Cedranona | SO | 1617 | 2030 | 0,50 ± 0,01 | 0,30 ± 0,05 | 0,4 ± 0,1 | 0,1 ± 0,1 |
| 34 | γ-Eudesmol | SO | 1626 | 2240 | 1,5 ± 0,1 | 1,2 ± 0,1 | 0,6 ± 0,3 | 0,5 ± 0,1 |
| 35 | α-Muurolo | SO | 1646 | 2147 | 0,3 ± 0,1 | 0,25 ± 0,01 | 0,4 ± 0,3 | 0,22 ± 0,05 |
| 36 | α-Cadinol | SO | 1654 | 2224 | 0,50 ± 0,01 | 0,40 ± 0,07 | 0,4 ± 0,1 | 0,3 ± 0,1 |
| 37 | Cariofileno | SO | 1664 | 2036 | 0,20 ± 0,01 | 0,20 ± 0,03 | 0,20 ± 0,03 | 0,50 ± 0,07 |

Continuación de la **Tabla 5.**

| | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|---|---|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 38 | N.I., C ₁₅ H ₂₄ | - | - | - | 0.40 ± 0.01 | 0.30 ± 0.04 | 0.20 ± 0.03 | 0.10 ± 0.04 |
| 39 | N.I., C ₁₅ H ₂₄ | - | - | - | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0.60 ± 0.01 |
| 40 | N.I., C ₁₅ H ₂₄ | - | - | - | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 1.8 ± 0.1 |
| HO: Hidrocarburos oxigenados | | | | | 1.0 ± 0.1 | 0.50 ± 0.01 | 4.0 ± 0.5 | 2.4 ± 0.6 |
| M: Monoterpenos | | | | | 0.9 ± 0.1 | 0.9 ± 0.1 | 6.2 ± 0.6 | 3.6 ± 0.4 |
| MO: Monoterpenos oxigenados | | | | | 73 ± 2 | 77 ± 3 | 72 ± 1 | 66.0 ± 0.9 |
| S: Sesquiterpenos | | | | | 15 ± 1 | 16.0 ± 0.8 | 10.9 ± 0.8 | 20.0 ± 0.5 |
| SO: Sesquiterpenos oxigenados | | | | | 10.4 ± 0.9 | 9.0 ± 0.5 | 7.5 ± 0.5 | 9.5 ± 0.5 |

- Número de pico en la **Figura 18.**
- Índices de Kovàts determinados experimentalmente en las columnas HP -5 e Innowax.
- Promedio de tres extracciones independientes.

tr Trazas.

* Identificado por espectrometría de masas usando compuesto patrón.

N.I. No identificado.

Las composiciones relativas de las fracciones volátiles, obtenidas por las técnicas extractivas HD, MWHD, SDE y SFE, son bastante similares entre si, pero diferentes a las aisladas por los métodos *headspace*. El método S-HS, que se basa en el estudio de un equilibrio establecido entre los volátiles presentes en la planta y en su fase vapor, *i.e.*, su perfume emanado, permite reflejar más fielmente la composición del olor propio de la planta. La técnica S-HS de *A. triphylla* mostró el predominio en la fase vapor de los monoterpenoides, a saber: limoneno (ca. 30%), 1,8-cineol (13%), geranial (9%) y neral (6%), junto con otros compuestos oxigenados volátiles, *e.g.* 3-octanol (4%), linalool (2.8%) y mentol (0.5%). El estudio de *headspace* de plantas aromáticas tropicales puede servir de base para la creación de aromas y perfumes exóticos en un mercado de nuevas fragancias, tan sofisticado y altamente competitivo.

Tabla 6. Cantidad relativa (%) de los metabolitos secundarios volátiles en las fracciones de *A. triphylla* obtenidas por diferentes técnicas *headspace*.

| Pico Nº a | Compuesto | P & T | S-HS | HS-SPME |
|--------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | α -Fencheno | 0.2 \pm 0.1 | 2,6 \pm 0.3 | <i>tr</i> |
| 2 | 1-Octen-3-ol | 1,69 \pm 0.02 | <i>tr</i> | 0,9 \pm 0.4 |
| 3 | 6-Metil-5-hepten-2-ona | 3.22 \pm 0.04 | <i>tr</i> | 0,5 \pm 0.4 |
| 4 | 3-Octanol | 0,23 \pm 0.01 | 4,1 \pm 0.8 | 0,9 \pm 0.2 |
| 5 | Limoneno | 9.73 \pm 0.07 | 29 \pm 5 | 9 \pm 1 |
| 6 | 1,8-Cineol | 2,30 \pm 0.01 | 13 \pm 1 | 6 \pm 1 |
| 7 | <i>cis</i> - β -Ocimeno | <i>tr</i> | 1,7 \pm 0.6 | <i>tr</i> |
| 8 | Linalool | 0,72 \pm 0.02 | 2.8 \pm 0.4 | 0,7 \pm 0.2 |
| 9 | <i>cis</i> -Fotocitral | 0,60 \pm 0.05 | 2 \pm 1 | <i>tr</i> |
| 10 | <i>trans</i> -Fotocitral | 0,32 \pm 0.02 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| 11 | Mentol | 0,31 \pm 0.01 | 0.5 \pm 0.1 | 0,8 \pm 0.1 |
| 12 | Terpinen-4-d | 0,80 \pm 0.01 | <i>tr</i> | 4,4 \pm 0.7 |
| 13 | α -Terpineol | 0,3 \pm 0.1 | <i>tr</i> | 7,1 \pm 0.2 |
| 14 | Dihidrocitronelol | 2,50 \pm 0.01 | 5 \pm 1 | 0,6 \pm 0.4 |
| 15 | Nerol | 1,0 \pm 0.1 | 1,1 \pm 0.2 | 0,8 \pm 0.1 |
| 16 | Neral | 22 \pm 1 | 6 \pm 1 | 14 \pm 5 |
| 17 | Geraniol | 3,20 \pm 0.02 | 3,2 \pm 0.1 | 1,3 \pm 0.2 |
| 18 | Geranial | 27 \pm 2 | 9,2 \pm 0.2 | 18 \pm 2 |
| 19 | <i>cis</i> -Acetato de verbenilo | 0,32 \pm 0.01 | 1,00 \pm 0.04 | 5 \pm 3 |
| 20 | α -Copaeno | 0,91 \pm 0.01 | 0,8 \pm 0.8 | 3 \pm 1 |
| 21 | β -Bourboneno | 0,71 \pm 0.01 | <i>tr</i> | 4 \pm 1 |
| 22 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 3,8 \pm 0.3 | 3,80 \pm 0.05 | 5 \pm 2 |
| 23 | β -Copaeno | 1,2 \pm 0.1 | <i>tr</i> | 0,22 \pm 0.05 |
| 24 | α -Aromadendreno | 0,20 \pm 0.01 | <i>tr</i> | 0,3 \pm 0.1 |
| 25 | <i>ar</i> -Curcumeno | 4,51 \pm 0.04 | 2,3 \pm 0.2 | 6 \pm 2 |
| 26 | Biciclosesquifelandreno | 2,3 \pm 0.1 | 1,9 \pm 0.1 | 5 \pm 1 |
| 27 | Biciclogermacreno | 0,30 \pm 0.04 | \pm | 3,5 \pm 0.5 |
| 28 | γ -Cadineno | 1,10 \pm 0.02 | <i>tr</i> | 2,4 \pm 0.7 |
| 29 | β -Sesquifelandreno | 1,21 \pm 0.01 | <i>tr</i> | 0,5 \pm 0.2 |
| 30 | Nerolidol | 3 \pm 1 | <i>tr</i> | 0,60 \pm 0.01 |
| 31 | Espatulenol | 4,0 \pm 0.4 | <i>tr</i> | 0,7 \pm 0.1 |
| 32 | Óxido de cariofileno | 0,33 \pm 0.01 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| 33 | Cedranona | 0,3 \pm 0.1 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| 34 | γ -Eudesmol | 0,47 \pm 0.01 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |

Continuación de la **Tabla 6**.

| | | | |
|--|-----------|--------|-----------|
| HO: Hidrocarburos oxigenados | 1.9 ± 0.5 | 4 ± 1 | 1.4 ± 0.4 |
| M: Monoterpenos | 10 ± 1 | 34 ± 4 | 9 ± 1 |
| MO: Monoterpenos oxigenados ^b | 64 ± 3 | 53 ± 1 | 61 ± 5 |
| S: Sesquiterpenos | 16 ± 1 | 9 ± 1 | 29 ± 2 |
| SO: Sesquiterpenos oxigenados ^c | 8 ± 1 | - | 1 ± 1 |

- a. Número del pico en la **Figura 18**.
 b. Óxidos, aldehídos, alcoholes y acetatos.
 c. Óxidos, alcoholes y cetonas.
tr Trazas.

Los métodos P&T y HS-SPME, que involucran una etapa de concentración, permitieron obtener fracciones volátiles, cuya composición se acerca más a la del aceite esencial de la planta (**Tabla 6**). Así, el neral (14-20%) y el geranial (18-27%) fueron los compuestos mayoritarios en las mezclas de volátiles, obtenidos por P&T y HS-SPME.

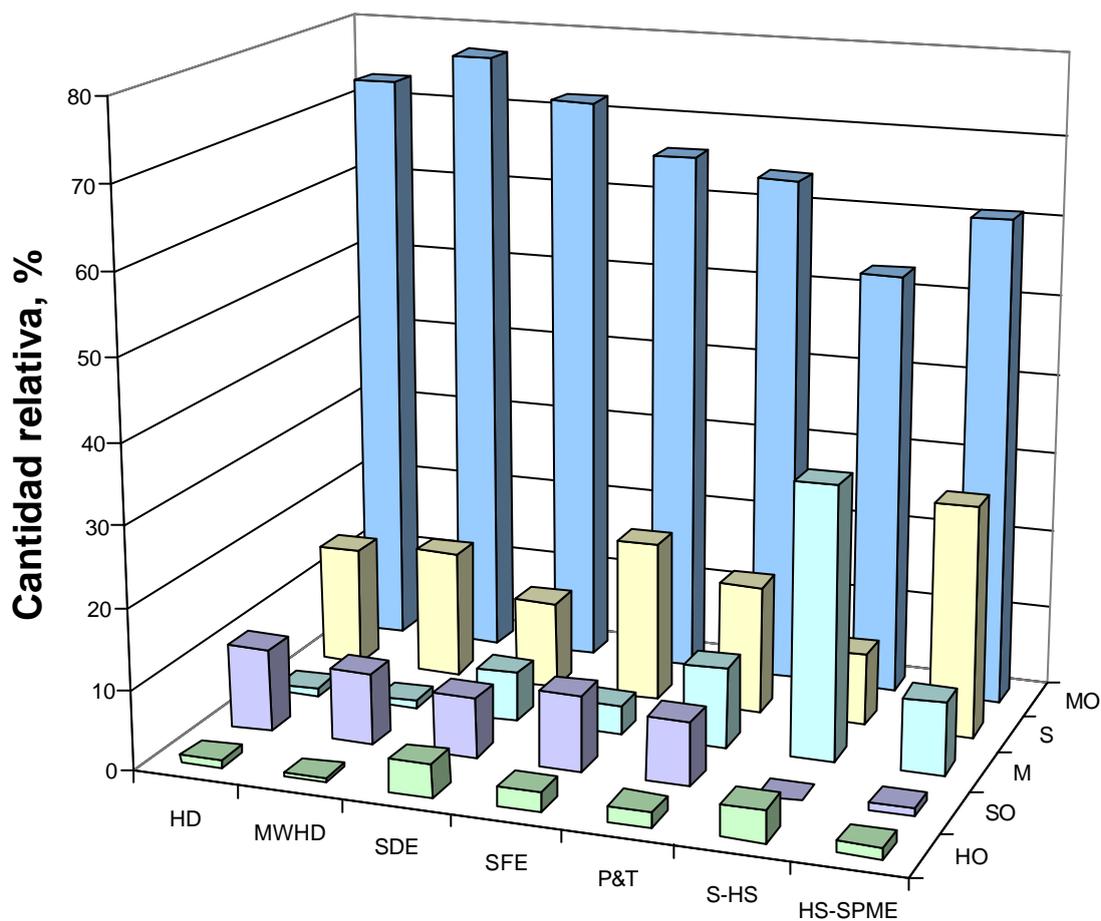
La técnica HS-SPME (se usaron 60 min para la exposición de la fibra a los volátiles de la planta) permitió concentrar los sesquiterpenos en una alta proporción, lo que facilitó luego su mejor separación en la columna cromatográfica y la identificación más confiable con base en los índices de retención y espectros de masas.

El alto contenido de citral (ca. 60%) en la *A. triphylla* colombiana convierte esta planta en una especie aromática promisoría para su cultivo industrial, la obtención del aceite esencial y/o la extracción del citral a partir de éste.

Los aceites esenciales obtenidos por HD, MWHD y los extractos aislados por SDE y SFE, contenían hidrocarburos oxigenados (1.1, 0.5, 4.0 y 2.1%); monoterpenos, C₁₀H₁₆ (1, 0.9, 8 y 5%), monoterpenos oxigenados (71, 72, 71 y 65%), sesquiterpenos, C₁₅H₂₄ (16, 16, 11 y 21%) y sesquiterpenos oxigenados (9, 10, 7 y 7%). La diferencia en la composición química de los extractos y de las fracciones volátiles se ilustra en la **Figura 19**, en la cual los resultados de las **Tablas 5 y 6**,

fueron agrupados por familias de compuestos. Los monoterpenos y sus análogos oxigenados predominaron en las fracciones volátiles de *A. triphylla*, obtenidos por métodos *headspace*. La recuperación más eficiente de monoterpenoides se logró con las técnicas HD, MWHD, SDE y la de los sesquiterpenoides, con la técnica SFE.

Figura 19. Variación en la composición de metabolitos secundarios volátiles en los extractos de *A. triphylla*, obtenidos por diferentes técnicas. HO: Hidrocarburos oxigenados, M: Monoterpenos, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Sesquiterpenos, SO: Sesquiterpenos oxigenados.



Al comparar la composición química de los aceites esenciales de *A. triphylla* colombiana [16] con los aceites de otros orígenes, e.g. de Chile [23, 24], Argentina [25-27], Brasil [28], Marruecos [29], Turquía [30] y Corea [31], se observaron grandes variaciones. En la **Tabla 7** se comparan los principales compuestos volátiles del aceite esencial de *A. triphylla* colombiana con los encontrados en los aceites obtenidos de plantas, cultivadas en otros países.

Tabla 7. Principales compuestos encontrados en los aceites esenciales y fragancias de *A. triphylla* de diferentes orígenes geográficos.

| Compuesto | Cantidad relativa, % | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|--------------|----------------|------------|---------------|-------------|----------------|
| | Marruecos * | Turquía * | Argentina * | Chile * | Colombia * | Corea ** | Colombia ** |
| Sabineno | 0.2 | ca. 3 | ca. 1 | — | - | 1-9 | - |
| 1,8-Cineol | 12 | - | - | 6 | 0.4 | - | 6 |
| Limoneno | 4 | 15-19 | 7-9 | 13 | 0.6 | 4-30 | 9 |
| Neral | 10 | 6-8 | - | 18 | 19 | 13-78 | 14 |
| Geranial | 10 | 12-19 | - | 24 | 38 | 15-34 | 18 |
| Geraniol | 0.5 | ca. 0.1 | - | - | 5 | 0.1-0.5 | 1 |
| Nerol | - | 0.1-0.3 | - | - | ca. 5 | 1-5 | 0.8 |
| Citronelol | - | - | - | 5 | - | - | - |
| <i>ar</i> -Curcumeno | 5 | 5-6 | - | - | 3 | 0.2-5 | 6 |
| <i>trans</i> - β -Cariofileno | - | ca. 4 | <1 | - | ca. 3 | - | 5 |
| Óxido de cariofileno | 6 | 3-5 | - | 6 | ca. 1 | - | - |
| Espatuleno | - | ca. 4 | 3-5 | - | ca. 4 | - | 0.7 |
| 6-Metil-5-hepten-2-ona | 7 | ca. 2 | — | - | ca. 0.4 | - | 0.5 |
| α -Tuyona | - | - | 13-17 | - | - | - | - |
| Mircenona | - | - | 31-37 | - | - | - | - |
| Germacreno D | - | - | 0.1-4 | - | - | - | - |
| Biciclosesquifelandreno | - | - | - | - | 1 | - | 5 |
| Biciclogermacreno | - | - | 4 | - | ca. 3 | - | 3 |
| Lipifoli-1(6)-en-5-ona | - | - | ca. 9 | - | - | - | - |

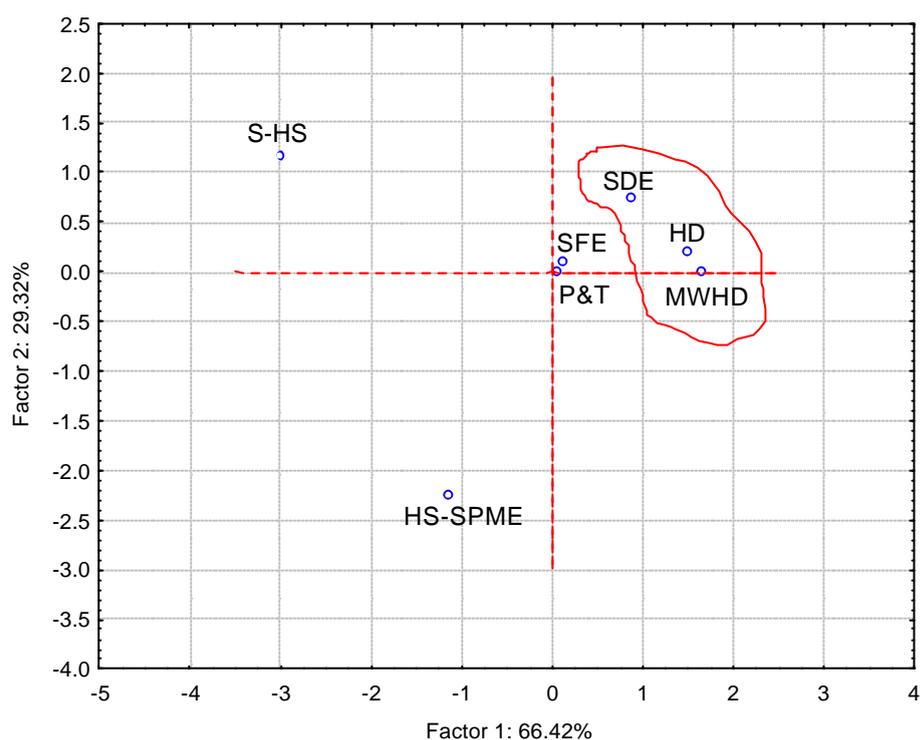
* Aceites obtenidos por HD.

** Fracción volátil aislada por HS-SPME.

Las composiciones relativas de fracciones volátiles, obtenidas por las diferentes técnicas destilativas (HD, MWHD), extractivas (SDE, SFE) y de *headspace* (S-HS, P & T y HS-SPME), se compararon por medio del análisis estadístico de componentes principales. La mayoría de la información contenida en las **Tablas 5 y 6** (ca. 96%) puede ser representada por dos componentes principales. La **Figura 20** muestra que el *Factor 1* corresponde al 66% de la variación y está representado por el 3-octanol, *cis*-ocimeno, mentol, terpinen-4-ol, nerol, neral, geraniol, geranial y los *sesquiterpenoides* α -copaeno, *trans*-cariofileno, γ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, 5-cedranona y γ -eudesmol. El *Factor 2* corresponde al 29% de la información y está conformado principalmente por 1,8-cineol, limoneno, isopulegol, dihidrocitronelol y los sesquiterpenos β -bourboneno y *ar*-curcumeno. En la **Figura 20** aparece la representación de estas fracciones volátiles en el subespacio formado por las dos primeras componentes principales.

En el **Anexo 2 (Tabla 2)** aparecen las contribuciones de los diferentes compuestos a los *Factores 1 y 2*. La proximidad de los puntos, correspondientes a las fracciones volátiles, obtenidas por HD, MWHD y SDE se debe a la similitud de sus composiciones químicas, ya que como se observó en las **Tablas 5 y 6**, los extractos y fracciones volátiles de *A. triphylla* están compuestos básicamente por monoterpenos oxigenados. De otro lado, en la gráfica se observa que las técnicas S-HS y HS-SPME permiten aislar fracciones volátiles, que poseen diferencias en su composición a lo largo de ambas coordenadas de componentes principales. Estas diferencias corresponden principalmente a las variaciones en el contenido de limoneno, neral, geranial en S-HS, y α -copaeno, β -bourboneno y biciclosesquifelandreno en HS-SPME (Véase **Tabla 6**).

Figura 20. Representación gráfica de las composiciones relativas de fracciones volátiles, aisladas de la planta fresca de *A. triphylla*, por diferentes métodos de extracción, en el espacio formado por los primeros dos componentes principales. Véase el **Anexo 2 (Tabla 2)** para las contribuciones de los componentes en los Factores 1 y 2.



2.1.3 *Lantana armata* Schauer. Se conoce además como *Lantana camara* L, *Camara vulgaris* Benth y *Lantana aculeata* L. Los nombres populares que se le dan en Colombia son "Venturosa", "Gurupacha" y "Carraquillo" [1, 2]. Esta Verbenácea se extiende a lo largo de América Central y del Sur, es una hierba de unos 60 cm de altura, erecta, bien ramificada, hojas opuestas, flores de color amarillo-anaranjado al principio, que luego se vuelven rojas; frutos drupáceos, carnosos y de color morado. En la **Figura 21** se aprecia una planta de la *L. armata*.

La decocción de las hojas de esta planta es empleada para las afecciones del estómago y en los resfriados. La decocción de la raíz se usa para purificar la sangre y en enfermedades hepáticas [2]. Las flores y la raíz se emplean como expectorante en la bronquitis, la tos y el asma. Toda la planta en infusión se usa como emenagogo y antiséptico e inhibitorio de la trombina [1, 2, 32]. Su aceite esencial ha demostrado propiedades insecticidas, nematocidas, bactericidas y antifúngicas [33-36].

Figura 21. Planta cultivada de *Lantana armata* Schauer, utilizada en el presente estudio.



2.1.3.1 Metabolitos secundarios volátiles de *L. armata*. En la **Figura 22** aparece un perfil cromatográfico de metabolitos secundarios, aislados por hidrodestilación de las hojas y tallos frescos de *L. armata*, que es ampliamente difundida en el Departamento de Santander y en el Magdalena Medio. La identificación de los componentes y sus cantidades relativas (%) se reportan en la **Tabla 8**. El aceite esencial es de tipo *sesquiterpenoide*; más del 60% de la mezcla lo representan sesquiterpenos, $C_{15}H_{24}$, y ca. 30% sus análogos oxigenados.

Figura 22. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *L. armata*, obtenido por hidrodestilación. Columna HP-5 (30 m), *split* 1:30, FID. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 8**.

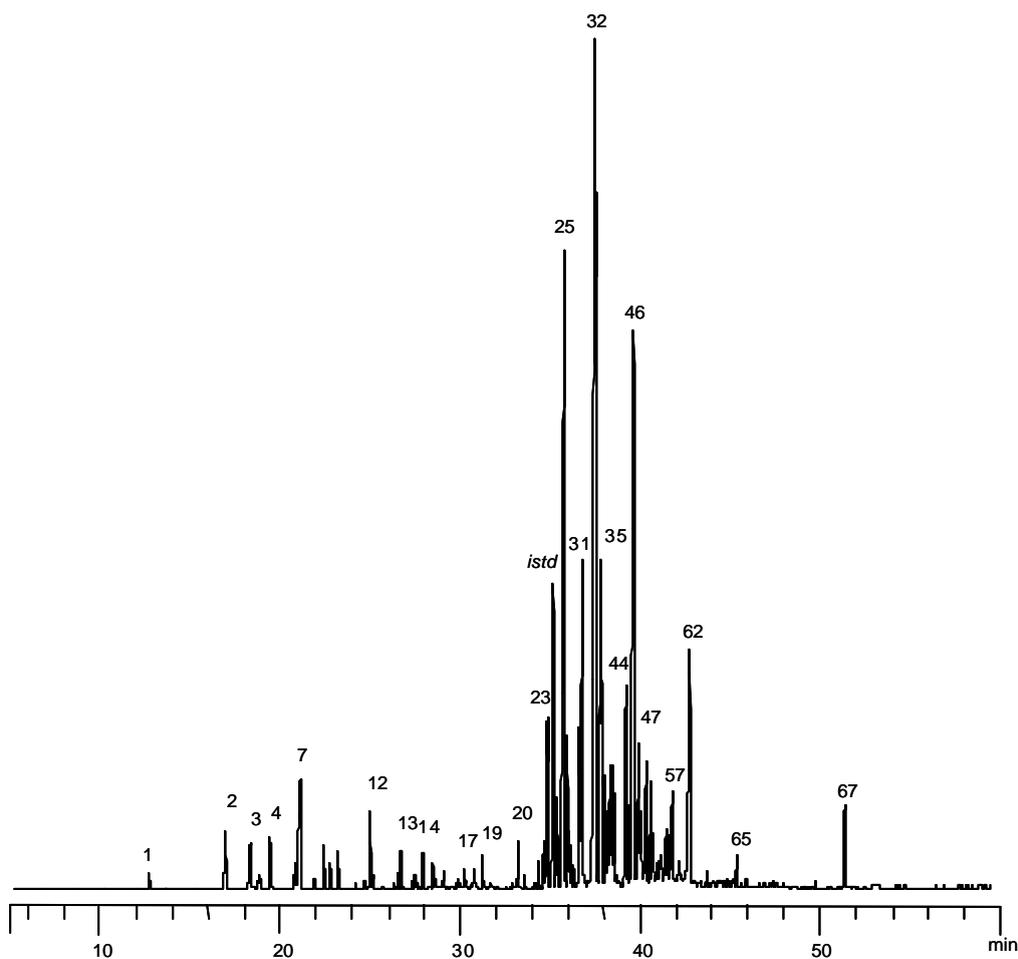


Tabla 8. Composición química de los metabolitos secundarios de *Lantana armata* Schauer, aislados por diferentes métodos extractivos.

| Pico N ^o ^a | Compuesto | Tipo | I _k ^b | | Cantidad relativa, % ^c | | | | |
|-------------------------------------|------------------------------|------|-----------------------------|---------|-----------------------------------|---------------------|-------------|-------------|--|
| | | | HP-5 | Innowax | HD | MWHD | SDE | SFE | |
| 1 | 3-Hexenol | HO | 853 | 1320 | 0,26 ± 0,03 | 1,14 ± 0,03 | 1,50 ± 0,03 | 0,20 ± 0,05 | |
| 2 | α-Tuyeno | M | 928 | 1035 | 0,9 ± 0,1 | 1,9 ± 0,5 | 4,1 ± 0,1 | 0,4 ± 0,2 | |
| 3 | α-Pineno* | M | 937 | 1037 | 0,9 ± 0,6 | 0,78 ± 0,06 | 0,7 ± 0,3 | 0,90 ± 0,03 | |
| 4 | Sabineno | M | 976 | 1129 | 0,30 ± 0,02 | 0,60 ± 0,04 | 0,7 ± 0,1 | <i>tr</i> | |
| 5 | 3-Octenol | HO | 979 | 1418 | 2,2 ± 0,5 | 2,6 ± 0,6 | 2,5 ± 0,8 | 0,69 ± 0,05 | |
| 6 | β-Pineno* | M | 982 | 1124 | 2,9 ± 0,3 | 2,5 ± 0,3 | 2,6 ± 0,1 | 0,20 ± 0,02 | |
| 7 | β-Mirceno* | M | 993 | 1157 | 3,0 ± 0,8 | 3,1 ± 0,4 | 3,9 ± 0,7 | 1,7 ± 0,2 | |
| 8 | 3-Octanol | HO | 996 | 1515 | 0,30 ± 0,03 | 0,10 ± 0,01 | 0,10 ± 0,03 | <i>tr</i> | |
| 9 | α-Felandreno | M | 1009 | 1180 | 0,93 ± 0,07 | 0,26 ± 0,05 | 1,0 ± 0,1 | 0,20 ± 0,03 | |
| 10 | p-Cimeno | M | 1027 | 1278 | 0,20 ± 0,01 | 0,60 ± 0,08 | 0,50 ± 0,01 | 0,10 ± 0,02 | |
| 11 | Limoneno* | M | 1032 | 1205 | 0,09 ± 0,03 | 0,10 ± 0,04 | 0,50 ± 0,01 | <i>tr</i> | |
| 12 | 1,8-Cineol* | MO | 1036 | 1230 | 1,4 ± 0,6 | 1,6 ± 0,8 | 2,0 ± 0,5 | 0,70 ± 0,02 | |
| 13 | <i>trans</i> -β-Ocimeno | M | 1047 | 1249 | 0,7 ± 0,4 | 0,50 ± 0,06 | 1,4 ± 0,3 | 0,10 ± 0,04 | |
| 14 | γ-Terpineno* | M | 1061 | 1253 | 0,28 ± 0,01 | 0,50 ± 0,04 | 0,7 ± 0,4 | 0,20 ± 0,05 | |
| 15 | Terpinoleno | M | 1088 | 1290 | 0,70 ± 0,04 | 0,7 ± 0,1 | 1,2 ± 0,2 | 0,60 ± 0,05 | |
| 16 | Linalool* | MO | 1098 | 1509 | 0,50 ± 0,01 | 0,8 ± 0,1 | 1,0 ± 0,1 | 0,9 ± 0,1 | |
| 17 | Nerol* | MO | 1224 | 1755 | 0,60 ± 0,06 | 0,30 ± 0,01 | 0,40 ± 0,03 | 0,10 ± 0,05 | |
| 18 | Neral* | MO | 1239 | 1679 | 1,0 ± 0,1 | 0,3 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 | 0,6 ± 0,1 | |
| 19 | Geraniol* | MO | 1249 | 1795 | 0,5 ± 0,2 | 0,30 <i>tr</i> 0,03 | 0,60 ± 0,05 | 0,5 ± 0,1 | |
| 20 | Geraniol* | MO | 1270 | 1728 | 0,60 ± 0,01 | 0,40 ± 0,03 | 0,90 ± 0,04 | 0,8 ± 0,1 | |
| 21 | δ-Elemeno | S | 1341 | 1480 | 0,70 ± 0,05 | 0,5 ± 0,1 | 0,40 ± 0,05 | 0,30 ± 0,03 | |
| 22 | β-Bourboneno | S | 1382 | 1526 | 0,65 ± 0,01 | 0,70 ± 0,03 | 0,70 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 | |
| 23 | β-Cubebeno | S | 1385 | 1544 | 1,6 ± 0,1 | 1,70 ± 0,02 | 1,26 ± 0,01 | 1,90 ± 0,03 | |
| 24 | α-Cedreno | S | 1412 | 1599 | 0,7 ± 0,03 | 0,90 ± 0,01 | 0,56 ± 0,02 | 0,4 ± 0,1 | |
| 25 | <i>trans</i> -β-Cariofileno* | S | 1432 | 1615 | 14 ± 1 | 14 ± 2 | 14 ± 1 | 15 ± 3 | |
| 26 | Aromadendreno | S | 1435 | 1648 | 1,3 ± 0,1 | 1,4 ± 0,4 | 1,32 ± 0,03 | 0,90 ± 0,02 | |
| 27 | α-Humuleno | S | 1452 | 1670 | 0,5 ± 0,1 | 1,00 ± 0,01 | 0,60 ± 0,03 | 0,60 ± 0,01 | |
| 28 | <i>allo</i> Aromadendreno | S | 1465 | 1663 | 1,60 ± 0,02 | 1,50 ± 0,01 | 0,40 ± 0,01 | 0,3 ± 0,2 | |
| 29 | γ-Himachaleno | S | 1475 | 1700 | 0,50 ± 0,03 | 0,80 ± 0,01 | 0,60 ± 0,02 | 0,70 ± 0,02 | |
| 30 | Germacreno D | S | 1480 | 1720 | 1,6 ± 0,2 | 2,3 ± 0,03 | 0,40 ± 0,04 | 0,60 ± 0,02 | |
| 31 | <i>ar</i> -Curcumeno | S | 1482 | 1775 | 1,4 ± 0,2 | 1,32 ± 0,01 | 1,5 ± 0,1 | 3,20 ± 0,01 | |
| 32 | Biciclosesquifelandreno | S | 1490 | 1760 | 16 ± 2 | 16 ± 2 | 17 ± 3 | 18 ± 1 | |
| 33 | α-Zingibereno | S | 1494 | 1726 | 6 ± 1 | 6 ± 1 | 5,7 ± 0,4 | 5 ± 1 | |
| 34 | E,E-α-Farneseno | S | 1509 | 1740 | 3,70 ± 0,01 | 4 ± 1 | 3,4 ± 0,3 | 3,2 ± 0,4 | |
| 35 | γ-Bisaboleno | S | 1515 | 1758 | 3,20 ± 0,01 | 3,3 ± 0,2 | 3,0 ± 0,5 | 3,9 ± 0,2 | |
| 36 | <i>cis</i> -Calameneno | S | 1518 | 1842 | 2 ± 1 | 1,9 ± 0,1 | 1,6 ± 0,3 | 1,7 ± 0,1 | |

Continuación de la **Tabla 8.**

| | | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------|----|------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 37 | δ-Cadineno | S | 1524 | 1785 | 1,9 ± 0,2 | 1,4 ± 0,1 | 1,20 ± 0,05 | 1,3 ± 0,4 |
| 38 | Nerolidol* | SO | 1537 | 2035 | 1,2 ± 0,1 | 0,70 ± 0,03 | 0,6 ± 0,1 | 1,6 ± 0,2 |
| 39 | α-Calacoreno | S | 1543 | 1915 | 0,9 ± 0,1 | 1,0 ± 0,2 | 1,0 ± 0,2 | 1,4 ± 0,5 |
| 40 | Elemol | SO | 1547 | 2075 | 0,70 ± 0,01 | 0,50 ± 0,01 | 0,30 ± 0,04 | 1,2 ± 0,1 |
| 41 | δ-Calacoreno | S | 1558 | 1920 | 1,4 ± 0,7 | 1,2 ± 0,5 | 1 ± 1 | 1,4 ± 0,8 |
| 42 | Ledol | SO | 1567 | 2100 | 1,2 ± 0,7 | 1,3 ± 0,2 | 1,1 ± 0,4 | 1,20 ± 0,03 |
| 43 | α- Óxido de himachaleno | SO | 1571 | 2130 | 0,7 ± 0,1 | 0,80 ± 0,03 | 0,5 ± 0,3 | 0,80 ± 0,02 |
| 44 | Germacrenol | SO | 1575 | 2150 | 1,0 ± 0,1 | 0,90 ± 0,01 | 0,5 ± 0,1 | 1,2 ± 0,1 |
| 45 | Óxido de cariofileno | SO | 1581 | 1966 | 5,9 ± 0,4 | 4 ± 1 | 4,7 ± 0,1 | 8,8 ± 0,5 |
| 46 | trans-β-Elementona | SO | 1596 | 2008 | 2,0 ± 0,1 | 1,9 ± 0,4 | 1,8 ± 0,1 | 1,8 ± 0,6 |
| 47 | Óxido de humuleno | SO | 1604 | 1970 | 0,44 ± 0,03 | 0,6 ± 0,1 | 1,1 ± 0,6 | 1,0 ± 0,1 |
| 48 | Sesquilandulol | SO | 1607 | – | 0,6 ± 0,1 | 0,6 ± 0,1 | 0,2 ± 0,2 | 1,0 ± 0,0 |
| 49 | β-Óxido de himachaleno | SO | 1610 | – | 0,9 ± 0,1 | 0,6 ± 0,5 | 0,30 ± 0,05 | 1,0 ± 0,2 |
| 50 | Cedranona | SO | 1617 | 2030 | 1,20 ± 0,05 | 1,3 ± 0,1 | 0,4 ± 0,1 | 1,4 ± 0,5 |
| 51 | epi-γ-Eudesmol | SO | 1622 | 2183 | 0,28 ± 0,01 | 0,30 ± 0,02 | 0,2 ± 0,1 | 0,6 ± 0,1 |
| 52 | Cubenol | SO | 1627 | 2034 | 0,10 ± 0,01 | 0,20 ± 0,02 | 0,10 ± 0,04 | 0,3 ± 0,1 |
| 53 | γ-Eudesmol | SO | 1630 | 2240 | 0,28 ± 0,01 | 0,40 ± 0,01 | 0,4 ± 0,2 | 0,30 ± 0,02 |
| 54 | β-Acorenol | SO | 1635 | – | 0,20 ± 0,01 | 0,50 ± 0,02 | 0,5 ± 0,3 | 0,60 ± 0,03 |
| 55 | epi-α-Cadinol | SO | 1639 | 2224 | 0,59 ± 0,01 | 0,60 ± 0,05 | 0,4 ± 0,3 | 0,60 ± 0,02 |
| 56 | Himachalol | SO | 1646 | – | 0,80 ± 0,05 | 0,60 ± 0,03 | 0,5 ± 0,3 | 0,60 ± 0,04 |
| 57 | α-Cadinol* | SO | 1654 | – | 0,59 ± 0,01 | 0,3 ± 0,1 | 0,20 ± 0,04 | 0,70 ± 0,05 |
| 58 | Dihidroeudesmol | SO | 1659 | – | 0,33 ± 0,01 | 0,4 ± 0,1 | 0,1 ± 0,1 | 0,60 ± 0,03 |
| 59 | Isocedranol | SO | 1669 | – | 0,2 ± 0,1 | 0,40 ± 0,05 | 0,10 ± 0,04 | 0,50 ± 0,01 |
| 60 | α-Óxido de bisaboleno | SO | 1679 | – | 0,2 ± 0,1 | 0,3 ± 0,1 | 0,1 ± 0,1 | 0,50 ± 0,05 |
| 61 | Acarenona | SO | 1685 | – | tr | tr | tr | 0,20 ± 0,02 |
| 62 | Germacrona | SO | 1688 | – | 2,3 ± 0,1 | 2 ± 1 | 0,7 ± 0,3 | 2,2 ± 0,4 |
| 63 | β-Sinensal | SO | 1695 | 2040 | tr | tr | tr | 0,80 ± 0,02 |
| 64 | Farnesol* | SO | 1740 | – | tr | tr | tr | 0,7 ± 0,1 |
| 65 | Acetato de cariofileno | SO | 1700 | 2038 | 0,3 ± 0,1 | 0,6 ± 0,6 | tr | 0,9 ± 0,1 |
| 66 | N.I. | – | – | – | tr | tr | tr | 0,50 ± 0,04 |
| 67 | N.I. | – | – | – | 0,50 ± 0,01 | 0,50 ± 0,03 | 0,10 ± 0,05 | 0,7 ± 0,1 |
| HO: Hidrocarburos oxigenados | | | | | 2,80 ± 0,03 | 3,9 ± 0,1 | 4,1 ± 0,1 | 0,9 ± 0,1 |
| M: Monoterpenos | | | | | 11,1 ± 0,5 | 11,6 ± 0,8 | 17,3 ± 0,8 | 4,4 ± 0,1 |
| MO: Monoterpenos oxigenados | | | | | 4,6 ± 0,3 | 3,7 ± 0,9 | 5,4 ± 0,2 | 2,8 ± 0,6 |
| S: Sesquiterpenos | | | | | 60 ± 2 | 59 ± 2 | 56 ± 2 | 61 ± 3 |
| SO: Sesquiterpenos oxigenados | | | | | 22 ± 1 | 22 ± 1 | 17 ± 1 | 30,6 ± 0,5 |

a. Número de pico en la **Figura 22.**

b. Índices de Kováts determinados experimentalmente en las columnas HP-5 e Innowax

- c. Promedio de tres extracciones independientes.
- tr* Trazas.
- * Identificado por espectrometría de masas usando compuesto patrón.
- N.I. No identificado.

Los siguientes fueron sesquiterpenos mayoritarios, aislados de la *L. armata* por diferentes técnicas extractivas, a saber: el *trans*- β -cariofileno (14-15%) y su óxido (4-9%), *ar*-curcumeno (1-3%), el biciclosesquifelandreno (16-18%), el α -zingibereno (5-6%), el *E,E*- α -farneseno (3-4%) y el γ -bisaboleno (3-4%). La fracción de monoterpenos, C₁₀H₁₆, fue inferior al 10%; entre éstos, el β -pineno (0.2-3%) y el β -mirceno (2-4%) fueron los monoterpenos mayoritarios.

Las composiciones relativas de las fracciones volátiles de *L. armata*, obtenidas por las técnicas *headspace*, fueron notoriamente diferentes a las de aceites esenciales (HD, MWHD) y de los extractos (SDE y SFE). La composición química relativa (%) de las fracciones volátiles de *L. armata*, obtenidas por las técnicas *headspace*, se muestra en la **Tabla 9**.

La fragancia de la planta, analizada por *headspace* estático (S-HS), estuvo constituida principalmente por el hexen-3-ol (ca. 20%), α -tuyeno (ca. 20%) y sabineno (ca. 16%). La composición de la fracción volátil, obtenida por la técnica HS-SPME, en las condiciones experimentales empleadas (exposición de la fibra durante 60 min), fue más cercana a la del aceite esencial, puesto que a mayor tiempo de exposición de la fibra se logra una mayor recuperación de hidrocarburos sesquiterpénicos (ca. 81%).

La composición de los volátiles aislados por P&T fue más cercana a la obtenida por S-HS, ésto se ve reflejado en la **Figura 23**, donde se observa la distribución de las principales familias de los compuestos en los aceites y extractos de la *L. armata*, obtenidos por los diferentes métodos. Afín con otras Verbenáceas (*L. alba* y *A. triphylla*), la *L. armata* presenta una gran variedad de quimiotipos y diferencias en la composición química de sus aceites volátiles.

Tabla 9. Composición química de las fracciones volátiles de *L. armata*, aisladas por métodos *headspace*.

| Pico Nº ^a | Compuesto | Tipo | Cantidad relativa, % ^b | | |
|------------------------------|------------------------------|------|-----------------------------------|-----------|-------------|
| | | | P & T | S-HS | HS-SPME |
| 1 | 3-Hexenol | HO | 13,7 ± 0,1 | 19 ± 2 | 1,7 ± 0,2 |
| 2 | α-Tuyeno | M | 14 ± 3 | 19 ± 3 | 1,9 ± 0,3 |
| 3 | α-Pineno* | M | 7 ± 1 | 7,3 ± 0,6 | 0,4 ± 0,1 |
| 4 | Sabineno | M | 9,2 ± 0,3 | 16 ± 1 | 0,80 ± 0,05 |
| 5 | 1-Octen-3-ol | HO | 7,1 ± 0,4 | 6,1 ± 0,6 | 1,0 ± 0,1 |
| 6 | β-Pineno* | M | 8 ± 1 | 6 ± 1 | 0,7 ± 0,1 |
| 7 | β-Mirceno* | M | 0,60 ± 0,05 | 1,9 ± 0,6 | 1,1 ± 0,2 |
| 8 | Octan-3-ol | HO | 0,6 ± 0,2 | 0,3 ± 0,5 | 0,30 ± 0,05 |
| 17 | Nerol* | MO | 0,1 ± 0,1 | <i>tr</i> | 0,20 ± 0,03 |
| 18 | Neral* | MO | 0,10 ± 0,05 | <i>tr</i> | 0,2 ± 0,1 |
| 19 | Geraniol* | MO | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,9 ± 0,1 |
| 20 | Geranial* | MO | 0,6 ± 0,1 | <i>tr</i> | 0,5 ± 0,1 |
| 21 | δ-Elemeno | S | 0,9 ± 0,3 | <i>tr</i> | 0,6 ± 0,1 |
| 22 | β-Bourboneno | S | 0,30 ± 0,05 | <i>tr</i> | 0,6 ± 0,1 |
| 23 | β-Cubebena | S | 1,1 ± 0,4 | 1,1 ± 0,2 | 3,7 ± 0,1 |
| 24 | α-Cedreno | S | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,4 ± 0,1 |
| 25 | <i>trans</i> -β-Cariofileno* | S | 11 ± 2 | 12 ± 1 | 28 ± 2 |
| 26 | Aromadendreno | S | 0,9 ± 0,1 | <i>tr</i> | 5,2 ± 0,4 |
| 27 | α-Humuleno | S | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 2,0 ± 0,6 |
| 28 | <i>allo</i> -Aromadendreno | S | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,60 ± 0,02 |
| 29 | γ-Himachaleno | S | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 1,3 ± 0,2 |
| 30 | Germacreno D* | S | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 3,9 ± 0,3 |
| 31 | <i>ar</i> -Curcumeno | S | 3 ± 1 | <i>tr</i> | 3,2 ± 0,5 |
| 32 | Biciclosesquifelandreno | S | 11 ± 2 | 7 ± 2 | 12,3 ± 0,5 |
| 33 | α-Zingibereno | S | 0,5 ± 0,1 | 1,6 ± 0,8 | 7 ± 1 |
| 34 | E,E-α-Farneseno | S | 0,6 ± 0,1 | <i>tr</i> | 4,8 ± 0,8 |
| 35 | γ-Bisaboleno | S | 0,40 ± 0,05 | <i>tr</i> | 2,7 ± 0,3 |
| 36 | <i>cis</i> -Calameneno | S | 0,50 ± 0,03 | <i>tr</i> | 1,4 ± 0,2 |
| 37 | δ-Cadineno | S | 0,9 ± 0,1 | <i>tr</i> | 1,1 ± 0,3 |
| 38 | Nerolidol* | SO | 0,8 ± 0,1 | <i>tr</i> | 3 ± 1 |
| 39 | α-Calacoreno | S | 0,5 ± 0,1 | <i>tr</i> | 0,9 ± 0,4 |
| 45 | Óxido de cariofileno | SO | 2,0 ± 0,8 | <i>tr</i> | 2,5 ± 0,5 |
| HO: Hidrocarburos oxigenados | | | 22,2 ± 0,3 | 26 ± 4 | 3,0 ± 0,4 |
| M: Monoterpenos | | | 39,1 ± 0,1 | 50 ± 3 | 4,1 ± 0,5 |

Continuación de la **Tabla 9**.

| | | | |
|-------------------------------|-----------|--------|-----------|
| MO: Monoterpenos oxigenados | - | - | 1.8 ± 0.4 |
| S: Sesquiterpenos | 32 ± 2 | 22 ± 3 | 81 ± 4 |
| SO: Sesquiterpenos oxigenados | 2.8 ± 0.9 | - | 5 ± 1 |

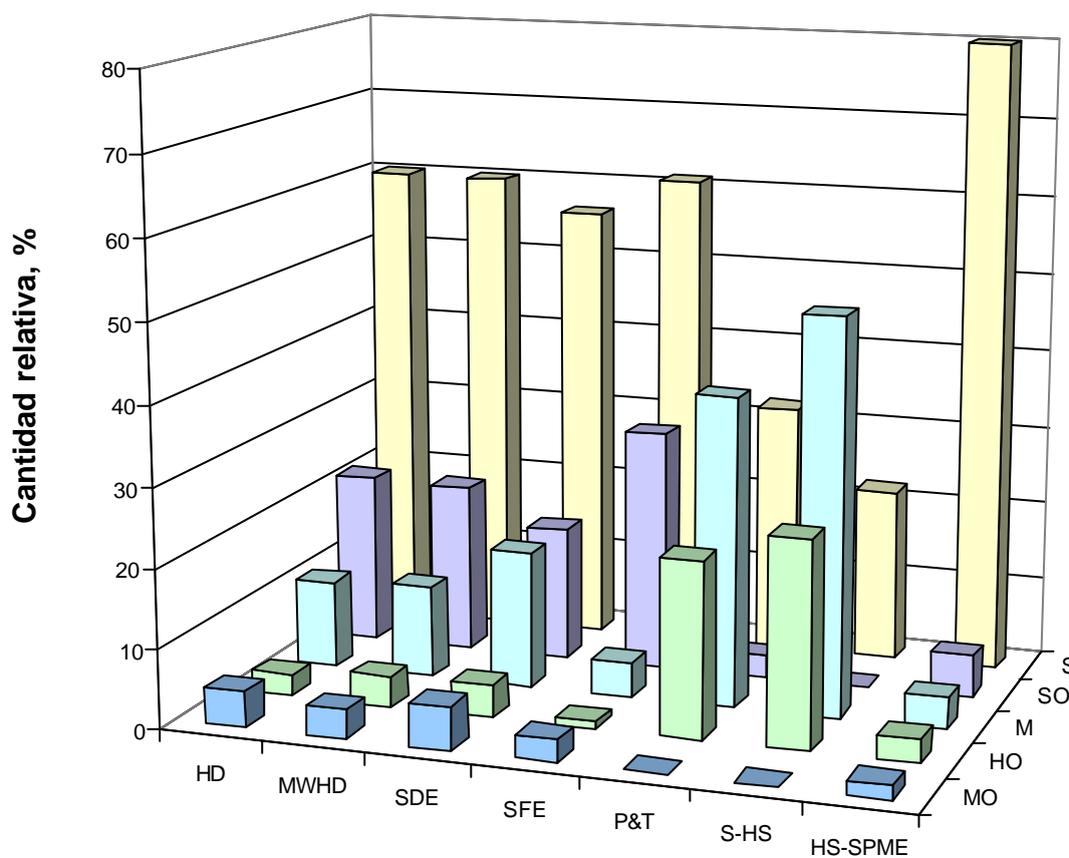
a. Número del pico en la **Figura 22**.

b. Promedio de tres extracciones independientes.

tr Trazas.

* Identificado por espectrometría de masas usando compuesto patrón.

Figura 23. Distribución de las principales familias de los compuestos en los aceites y extractos de *L. armata*, obtenidos por los diferentes métodos. HO: Hidrocarburos oxigenados, M: Monoterpenos, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Sesquiterpenos, SO: Sesquiterpenos oxigenados.



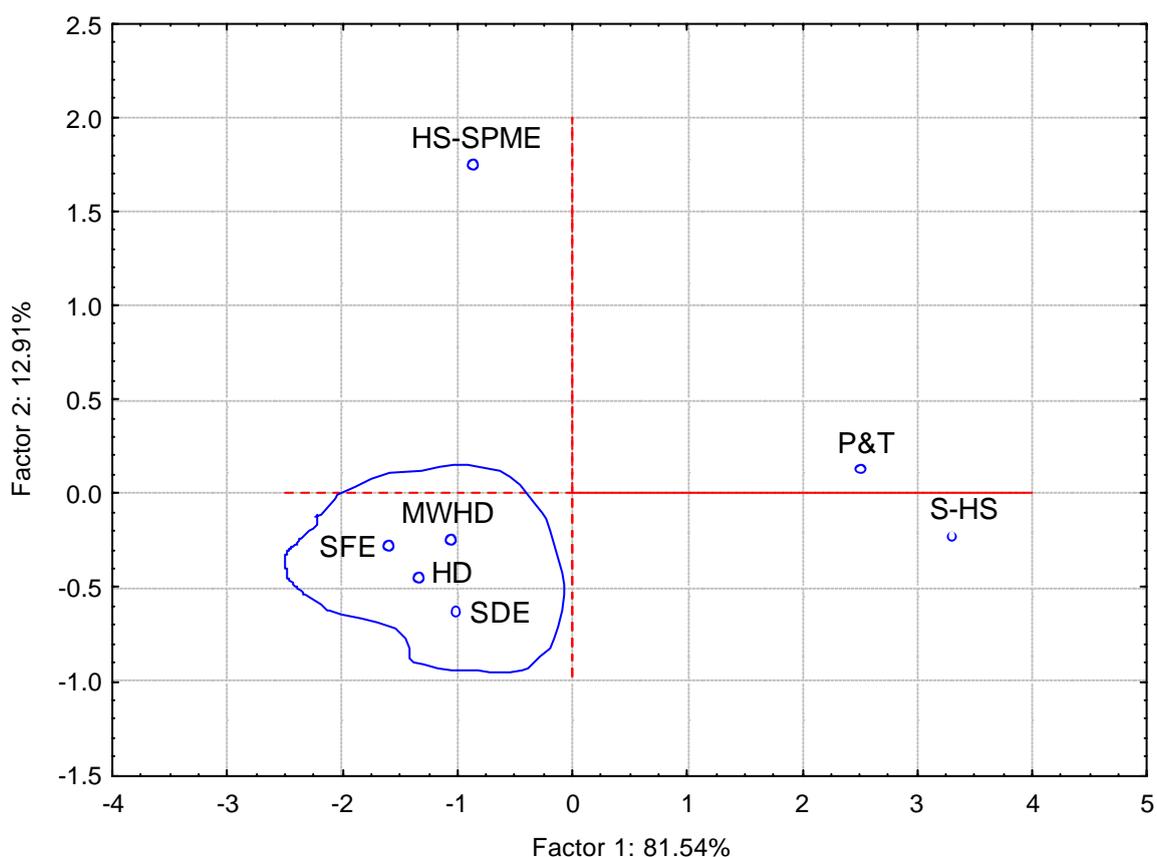
Varios investigadores han reportado la composición química de aceites esenciales obtenidos de hojas y/o flores de *Lantana camara* (sinónimo: *Lantana armata*) cultivada en diferentes países y se han encontrado marcadas diferencias entre ellos, como se evidencia en la **Tabla 10**, donde se comparan los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de *L. armata* colombiana [16] con los obtenidos en los aceites de *L. armata* cultivada en Brasil [37, 38], Camerún y Madagascar [39], Egipto [40], Irán [41] e India [42].

Tabla 10. Compuestos mayoritarios encontrados en aceites esenciales de *L. camara*, cultivada en diferentes países.

| Compuesto | Cantidad relativa, % | | | | | | |
|--|----------------------|-----------------|---------|------------|--------|-------|----------|
| | Brasil | Norte de Brasil | Camerún | Madagascar | Egipto | Irán | Colombia |
| Sabineno | - | 0.1-9 | 0.2 | 9.02 | 10-33 | 7-17 | 0.3-0.6 |
| β -Mirceno | - | - | - | - | - | - | ca. 3 |
| Δ^3 - Careno | - | - | - | 2.3 | - | - | - |
| α -Felandreno | - | 0.1-16 | 0.02 | 0.3 | - | - | 0.2-0.9 |
| Limoneno | - | 0.1-17 | 0.1 | 2 | 1-3 | - | ca. 0.1 |
| 1,8-Cineol | - | - | 0.1 | 3 | 7-17 | 6-10 | 1.4-1.6 |
| Safrol | 2 | - | - | - | - | - | - |
| γ -Curcumeno | 8 | - | 2 | 0.5 | - | - | - |
| <i>ar</i> -Curcumeno | 10 | - | 25 | 0.8 | - | - | ca. 1 |
| β -Curcumeno | 2 | ca. 5 | 1 | - | - | - | - |
| (-)- <i>epi</i> - β -Bisabolol | 14 | - | - | - | - | - | - |
| (-)- <i>epi</i> - α -Bisabolol | 1 | - | - | - | - | - | - |
| (-)- γ -Curcumen-15-al | 15 | - | - | - | - | - | - |
| α -Copaeno | - | 0.2-3 | 0.2 | 0.4 | 0.3-2 | - | - |
| <i>trans</i> - β -Cariofileno | - | 6-11 | 13 | 12 | 11-21 | 14-23 | ca. 14 |
| Óxido de cariofileno | - | - | - | - | - | - | 4-6 |
| α -Humuleno | - | 1-11 | 1 | 6 | 4-7 | 6-11 | 0.5-1 |
| Germacreno D | - | 13-28 | 0.9 | 1 | - | - | 1-2 |
| Biciclogermacreno | - | - | - | - | - | 8-18 | - |
| <i>ar</i> -Curcumeno + γ -Curcumeno | - | 28-32 | - | - | - | - | - |
| α -Zingibereno | - | 16-19 | 3 | 0.2 | - | - | ca. 6 |
| E,E- α -Farneseno | - | - | - | - | - | - | ca. 4 |
| γ -Bisaboleno | - | - | - | - | - | - | ca. 3 |
| Germacreno B | - | 3-9 | - | - | 1-5 | - | - |
| Biciclosquifelandreno | - | - | - | - | 10 | - | ca. 16 |

El resultado del análisis estadístico PCA, aplicado a las fracciones volátiles de *L. armata*, muestra que más de 90% de la información, reunida en las **Tablas 8 y 9**, puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones relativas de componentes en los diferentes extractos (**Figura 24**). En el **Anexo 2 (Tabla 3)** aparecen las contribuciones de cada una de las sustancias a los *Factores 1 y 2*.

Figura 24. Representación gráfica de las composiciones relativas de fracciones volátiles, aisladas de la planta fresca de *L. armata*, por diferentes métodos, en el espacio formado por los primeros dos componentes principales. En el **Anexo 2 (Tabla 3)** aparecen las contribuciones de los compuestos en los *Factores 1 y 2*.

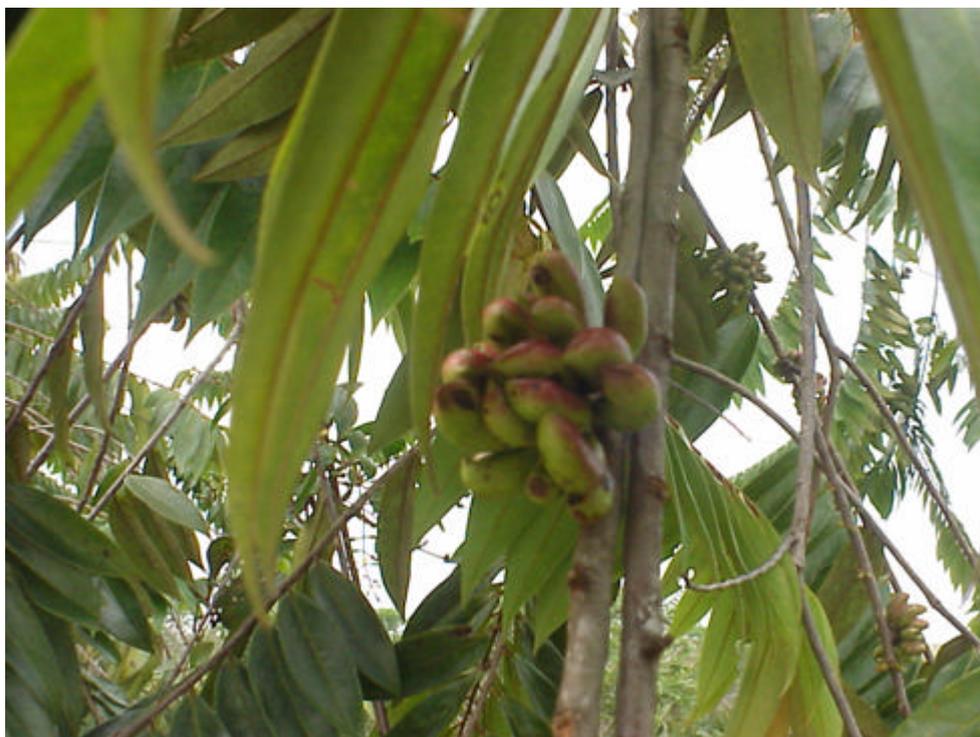


El *Factor 1* corresponde ca. 82% de la información y está representado básicamente por el *trans*- β -cariofileno y el biciclosesquifelandreno. El *Factor 2* corresponde al 12.9% de la información y está constituido por el 3-hexenol, α -tuyeno, α - pineno, sabineno y los sesquiterpenoides óxido de cariofileno, E,E- α -farneseno y γ -bisaboleno. Como se puede observar en la **Figura 24**, la proximidad de los puntos correspondientes a los métodos HD, MWHD y SDE, confirma la similitud de las composiciones obtenidas por estas técnicas (**Tabla 8**), así como las diferencias cuantitativas composicionales de las fracciones aisladas por los métodos *headspace* (e.g. S-HS estático Vs HS-SPME), como se aprecia en la **Tabla 9**.

Es interesante hacer un análisis global comparativo de la composición de metabolitos secundarios volátiles de las tres plantas Verbenáceas tratadas en esta investigación, según las principales familias de compuestos aislados, *i.e.* hidrocarburos monoterpénicos, C₁₀H₁₆, y sesquiterpénicos, C₁₅H₂₄, y sus análogos oxigenados. Para las tres plantas se destacan visibles diferencias (Véase **Figuras 15, 19, 23**). En la *L. alba* predominaron monotepenos (>30%) y monoterpenos oxigenados (ca. 55%); para la *A. triphylla*, la familia de compuestos mayoritarios fue la de monoterpenos oxigenados (>70%), de los cuales, ca. 60% correspondieron al citral; mientras que la *L. armata* fue “pobre” en monoterpenos y sus análogos oxigenados; la mayoría de sus metabolitos secundarios fueron hidrocarburos sesquiterpénicos (ca. 60%) y sus derivados oxigenados (ca. 30%). De la gran variedad de metabolitos secundarios volátiles (>60) encontrados en las tres plantas de la familia *Verbenaceae*, sólo el limoneno, el β -bourboneno, el *trans*- β -cariofileno y su óxido, el *allo*-aromadendreno y el biciclosesquifelandreno fueron comunes a las tres plantas, *L. alba*, *A. triphylla* y *L. armata*, siendo el último, posiblemente uno de los “marcadores” de Verbenáceas.

2.1.4 *Xylopia aromatica* Lamarck. Esta Annonácea, es una especie muy común en América tropical. Se encuentra desde América Central y las Antillas hasta el sur de Brasil. En Colombia se conoce con el nombre de “Achón”, “Fruta de burro”, “Malaguita” o “Sembe” [1, 43]. En la medicina tradicional se han utilizado las hojas y frutos en decocción como astringente, aperitivo, contra los cólicos y como tónico del útero para disminuir las dismenorreas; el aceite esencial de los frutos de *X. aromatica* se ha usado en la preparación de cosméticos y productos alimenticios [1, 44, 45]. En la **Figura 25** se muestran los frutos de *X. aromatica*.

Figura 25. Frutos del árbol de *Xylopia aromatica* Lamarck.



Los extractos de *X. aromatica* han demostrado propiedades antisépticas, analgésicas e insecticidas contra mosquitos y otros insectos [45-48]. Fournier y colaboradores [48], reportaron actividad antimicrobial moderada del aceite esencial obtenido de los tallos, hojas y corteza de *X. aromatica*.

2.1.4.1 Metabolitos secundarios volátiles de *Xylopiya aromatica* Lam. La **Figura 26** muestra el perfil cromatográfico de los metabolitos secundarios volátiles aislados de los frutos secos y molidos de *X. aromatica* Lam., por la técnica de hidrodestilación; la identificación de los compuestos aparece en la **Tabla 11**.

Figura 26. Cromatograma del aceite esencial de frutos secos de *Xylopiya aromatica* Lam., obtenido por HD, *istd* = *n*-tetradecano. Columna HP-5, *split* 1:30, FID. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 11**.

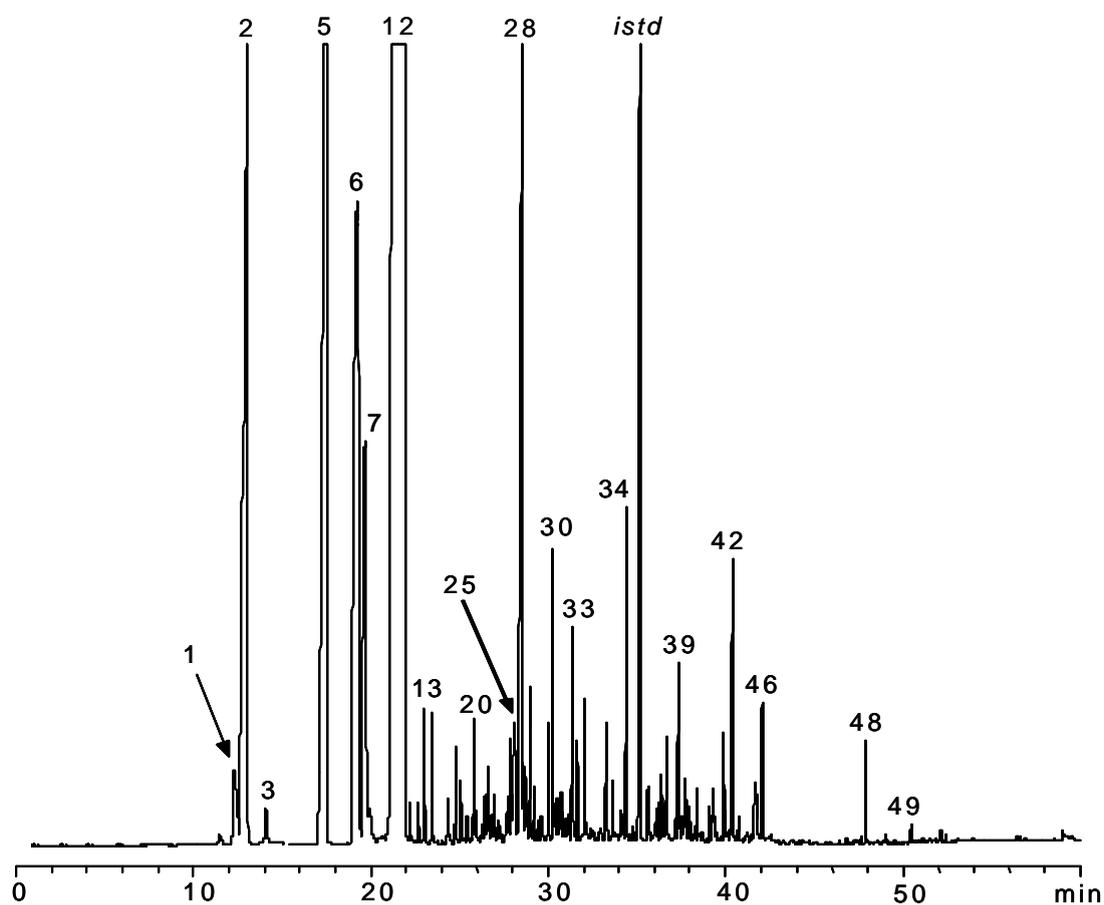


Tabla 11. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la *Xylopia aromatica* (Lamarck), obtenidos por diferentes técnicas de extracción.

| Pico N ^o a | Compuesto | Tipo | I _K ^b | Cantidad relativa, % ^c | | | | |
|--------------------------|-----------------------------------|------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|
| | | | | HP-5 | HD | MWHD | SDE | SFE |
| 1 | α -Tuyeno | M | 930 | 0.35 \pm 0.04 | 0.3 \pm 0.1 | 3.7 \pm 0.6 | 0.2 \pm 0.1 | |
| 2 | α -Pinoeno* | M | 939 | 8.1 \pm 0.4 | 7.3 \pm 0.2 | 8.1 \pm 0.2 | 5.9 \pm 0.3 | |
| 3 | Canfeno* | M | 976 | 1.7 \pm 0.2 | 1.4 \pm 0.2 | 1.4 \pm 0.3 | <i>tr</i> | |
| 4 | β -Pinoeno* | M | 980 | 0.04 \pm 0.02 | <i>tr</i> | 0.12 \pm 0.03 | <i>tr</i> | |
| 5 | β -Mirceno* | M | 991 | 9 \pm 2 | 9.3 \pm 0.3 | 8.2 \pm 0.6 | 5.1 \pm 0.3 | |
| 6 | <i>p</i> -Menta-1(7),8-dieno | M | 1004 | 3.70 \pm 0.05 | 3.1 \pm 0.2 | 2.3 \pm 0.3 | 0.05 \pm 0.01 | |
| 7 | α -Felandreno | M | 1005 | 3.44 \pm 0.03 | 2.3 \pm 0.6 | 3.8 \pm 0.3 | 2.6 \pm 0.3 | |
| 8 | Δ^3 -Careno | M | 1011 | 0.02 \pm 0.01 | 0.6 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.2 | <i>tr</i> | |
| 9 | α -Terpineno* | M | 1021 | 0.10 \pm 0.08 | <i>tr</i> | 0.52 \pm 0.01 | <i>tr</i> | |
| 10 | <i>p</i> -Cimeno* | M | 1029 | 1.2 \pm 0.1 | 1.3 \pm 0.2 | 2.3 \pm 0.4 | 8.4 \pm 0.3 | |
| 11 | Limoneno* | M | 1041 | 2.70 \pm 0.06 | 2.8 \pm 0.5 | 2.8 \pm 0.1 | 1.9 \pm 0.1 | |
| 12 | β -Felandreno* | M | 1041 | 61 \pm 1 | 64.8 \pm 0.4 | 57.2 \pm 0.2 | 39.5 \pm 0.3 | |
| 13 | <i>cis</i> - β -Ocimeno | M | 1046 | 0.19 \pm 0.03 | 0.2 \pm 0.1 | 1.07 \pm 0.2 | <i>tr</i> | |
| 14 | <i>trans</i> - β -Ocimeno | M | 1050 | 0.04 \pm 0.01 | 0.06 \pm 0.01 | 1.2 \pm 0.3 | <i>tr</i> | |
| 15 | γ -Terpineno* | M | 1062 | 0.02 \pm 0.01 | 0.05 \pm 0.01 | 0.83 \pm 0.03 | <i>tr</i> | |
| 16 | <i>cis</i> -Hidrato de sabineno | MO | 1068 | 0.06 \pm 0.02 | <i>tr</i> | 0.40 \pm 0.05 | <i>tr</i> | |
| 17 | Fenchona | MO | 1087 | 0.02 \pm 0.01 | <i>tr</i> | 1.4 \pm 0.3 | 0.95 \pm 0.05 | |
| 18 | α -Terpinoleno | M | 1088 | 0.06 \pm 0.02 | 0.03 \pm 0.01 | 0.14 \pm 0.03 | <i>tr</i> | |
| 19 | <i>trans</i> -Hidrato de sabineno | MO | 1100 | 0.02 \pm 0.01 | 0.02 \pm 0.01 | 0.30 \pm 0.02 | <i>tr</i> | |
| 20 | Fenchol | MO | 1112 | 0.02 \pm 0.01 | <i>tr</i> | 1.5 \pm 0.3 | <i>tr</i> | |
| 21 | α -Canfolenal | MO | 1130 | 0.16 \pm 0.02 | <i>tr</i> | 0.14 \pm 0.02 | <i>tr</i> | |
| 22 | Hidrato de canfeno | - | 1149 | 0.02 \pm 0.01 | 0.05 \pm 0.01 | 0.81 \pm 0.01 | <i>tr</i> | |
| 23 | Citronelal* | MO | 1152 | 0.06 \pm 0.01 | 0.2 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | <i>tr</i> | |
| 24 | Óxido de pinoeno | MO | 1156 | 0.06 \pm 0.01 | <i>tr</i> | 1.1 \pm 0.3 | <i>tr</i> | |
| 25 | Felandral | MO | 1159 | 0.2 \pm 0.1 | <i>tr</i> | 0.81 \pm 0.03 | 0.8 \pm 0.4 | |
| 26 | Tujanol | MO | 1159 | 0.02 \pm 0.01 | 0.06 \pm 0.02 | 1.4 \pm 0.1 | <i>tr</i> | |
| 27 | Terpinen-4-ol | MO | 1165 | 0.06 \pm 0.01 | 0.04 \pm 0.01 | 0.70 \pm 0.01 | 2.0 \pm 0.1 | |
| 28 | 4-Isopropil-2-ciclohexen-1-ona | MO | 1176 | 2.7 \pm 0.9 | 1.3 \pm 0.1 | 1.3 \pm 0.3 | 1.9 \pm 0.2 | |
| 29 | Metil-acetato de bencilo | BC | 1178 | 0.14 \pm 0.02 | 0.07 \pm 0.05 | 0.16 \pm 0.08 | 1.6 \pm 0.5 | |
| 30 | α -Terpineol | MO | 1189 | 0.05 \pm 0.04 | 0.2 \pm 0.1 | 0.80 \pm 0.02 | 0.9 \pm 0.1 | |
| 31 | Óxido de felandreno | MO | 1190 | 0.03 \pm 0.01 | 0.06 \pm 0.01 | 1.03 \pm 0.01 | 1.0 \pm 0.1 | |
| 32 | <i>cis</i> -Piperitol | MO | 1193 | 0.11 \pm 0.02 | 0.05 \pm 0.01 | 0.6 \pm 0.1 | 1.1 \pm 0.4 | |
| 33 | Mirtenol | MO | 1194 | 0.02 \pm 0.02 | 0.15 \pm 0.05 | 0.9 \pm 0.1 | 1.6 \pm 0.5 | |
| 34 | Salicilato de metilo* | BC | 1195 | 1.7 \pm 0.1 | 1.6 \pm 0.1 | 1.1 \pm 0.2 | 2.1 \pm 0.4 | |
| 35 | 4-Isopropil benzaldehído | BC | 1205 | 1.2 \pm 0.2 | 1.4 \pm 0.2 | 1.5 \pm 0.8 | 1.1 \pm 0.5 | |

Continuación de la **Tabla 11**.

| | | | | | | | |
|-------------------------------|---|----|------|-------------|-------------|-------------|------------|
| 36 | <i>trans</i> -Piperitol | MO | 1209 | 0.03 ± 0.01 | 0.06 ± 0.02 | 0.34 ± 0.04 | 1.1 ± 0.2 |
| 37 | Citronelol | MO | 1224 | 0.13 ± 0.02 | 0.06 ± 0.02 | 0.71 ± 0.03 | 0.9 ± 0.2 |
| 38 | <i>i-Pr</i> -Bencenometanol | BC | 1271 | 0.16 ± 0.06 | 0.02 ± 0.01 | 0.50 ± 0.07 | 2.0 ± 0.1 |
| 39 | α -Cubebeno | S | 1351 | 0.05 ± 0.03 | 0.4 ± 0.1 | 2.48 ± 0.04 | 1.9 ± 0.6 |
| 40 | α -Copaeno | S | 1376 | 0.3 ± 0.1 | <i>tr</i> | 0.60 ± 0.02 | 1.6 ± 0.2 |
| 41 | α - <i>cis</i> -Bergamoteno | S | 1415 | 0.04 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | 0.15 ± 0.02 | 1.8 ± 0.3 |
| 42 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | S | 1418 | 0.03 ± 0.01 | 0.20 ± 0.02 | 0.19 ± 0.03 | 2.5 ± 0.1 |
| 43 | α - <i>trans</i> -Bergamoteno | S | 1436 | 0.03 ± 0.01 | 0.03 ± 0.01 | 0.28 ± 0.05 | 2.2 ± 0.5 |
| 44 | β - <i>cis</i> -Farneseno | S | 1442 | 0.03 ± 0.01 | 0.03 ± 0.01 | 0.2 ± 0.1 | 1.9 ± 0.5 |
| 45 | Germacreno D | S | 1482 | 0.05 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | 0.12 ± 0.05 | 1.1 ± 0.3 |
| 46 | δ -Guaieno | S | 1490 | 0.06 ± 0.02 | 0.06 ± 0.04 | 0.13 ± 0.02 | 1.7 ± 0.7 |
| 47 | Espatuleno | SO | 1537 | 0.04 ± 0.01 | 0.09 ± 0.04 | 0.10 ± 0.04 | 1.6 ± 0.3 |
| 48 | Guaiol | SO | 1586 | 0.1 ± 0.1 | 0.16 ± 0.01 | <i>tr</i> | 1.3 ± 0.4 |
| 49 | Sesquiterpenol, C ₁₅ H ₂₆ O | SO | 1598 | 0.06 ± 0.02 | 0.06 ± 0.01 | <i>tr</i> | 1.5 ± 0.7 |
| 50 | β -Eudesmol | SO | 1622 | 0.05 ± 0.01 | 0.05 ± 0.02 | 0.08 ± 0.03 | 1.6 ± 0.1 |
| 51 | Sesquiterpenol, C ₁₅ H ₂₆ O | SO | 1661 | 0.02 ± 0.03 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 2.4 ± 0.5 |
| 52 | Hidrocarburo, C _n >18 | - | 1840 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 1.0 ± 0.2 |
| M: Monoterpenos | | | | 92 ± 3 | 93.5 ± 0.7 | 94.0 ± 0.7 | 63.7 ± 0.4 |
| MO: Monoterpenos oxigenados | | | | 3.8 ± 0.9 | 2.5 ± 0.5 | 4.4 ± 0.4 | 6.4 ± 0.3 |
| S: Sesquiterpenos | | | | 0.6 ± 0.1 | 0.8 ± 0.1 | 1.1 ± 0.5 | 14.6 ± 0.9 |
| SO: Sesquiterpenos oxigenados | | | | 0.22 ± 0.04 | 0.30 ± 0.01 | 0.18 ± 0.05 | 8.3 ± 0.1 |
| BC: Bencenoides | | | | 3.3 ± 0.1 | 3.2 ± 0.1 | 3.0 ± 0.2 | 6.8 ± 0.2 |

a. Número del pico en la **Figura 26**.

b. Índices de Kováts determinados experimentalmente en la columna HP-5 (30 m)

c. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos, promedio de tres extracciones.

* Identificado por espectrometría de masas usando compuesto estándar.

tr Trazas.

El componente mayoritario encontrado en los aceites esenciales (HD, MWHD) y extractos (SDE, SFE) de *X. aromatica* fue el β -felandreno (61, 65 y 57, 39%, respectivamente). Otros compuestos encontrados en alta proporción en los extractos fueron: α -pineno (6-8%), β -mirceno (5-9%), *p*-menta-1(7),8-dieno (0.1-4%), α -felandreno (2-4%) y 4-isopropil-2-ciclohexen-1-ona (1-3%).

Las fracciones volátiles aisladas por HD, MWHD, SDE y SFE contenían porcentaje de monoterpenos alto (92, 94, 94, 64%); también se hallaron monoterpenos oxigenados, pero en menor cantidad (4, 3, 4, 6%); en los extractos obtenidos por SFE se encontraron sesquiterpenos (15%), sesquiterpenos oxigenados (8%) y compuestos bencenoides (7%) en una proporción más alta, que en las fracciones obtenidas por otras técnicas (Véase **la Tabla 11**). La composición química de los aceites esenciales, obtenidos por HD y MWHD, fue muy similar, con un rendimiento del aceite aproximado de 1.5 %. Sin embargo, la técnica MWHD presentó una gran ventaja, ya que se obtuvo la misma cantidad del aceite esencial en un tiempo más corto (30 min), que el requerido por HD (2 horas).

El β -felandreno fue el compuesto aislado en mayor proporción (54, 36 y 39%) por las técnicas *headspace*, S-HS, P&T y SPME, respectivamente. Otros compuestos mayoritarios fueron el α -pineno (14, 15, 10%), β -mirceno (13, 12, 10%), *p*-menta-1(7),8-dieno (7, 11, 10%), α -felandreno (2, 5, 6%), *p*-cimeno (2, 5, 4%) y limoneno (2, 1, 2%), como se muestra en la **Tabla 12**. La diferencia en la composición química de los aceites esenciales, los extractos y fracciones volátiles, aisladas por las técnicas *headspace*, se muestra en la **Figura 27**, donde los resultados de las **Tablas 11 y 12** se agruparon según las familias de compuestos. En esta figura se puede apreciar que los monoterpenos predominaron en las fracciones volátiles de *X. aromatica*, obtenidas por los métodos *headspace*. La recuperación de monoterpenos y sus análogos oxigenados más eficiente se logró con las técnicas HD y MWHD y la de sesquiterpenoides, con SFE.

Los metabolitos secundarios volátiles de los aceites esenciales y extractos de frutos de *X. aromatica* colombiana [50] difieren de los encontrados en aceites obtenidos de plantas de otros países como Brasil [46], Bolivia [48] y Cuba [49]. Los principales compuestos encontrados en la esencia de flores de *X. aromatica* recolectada en Manaus, Brasil, fueron de carácter bencénico [46].

Tabla 12. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos de frutos secos de *X. aromatica* L., por métodos *headspace*.

| Pico ^a Nº | Compuesto | Cantidad relativa, % ^b | | |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| | | S-HS | P&T | HS-SPME |
| 1 | α -Tuyeno | 1.0 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.4 | 0.2 \pm 0.1 |
| 2 | α -Pinoeno* | 14.3 \pm 0.1 | 15.3 \pm 1 | 10.3 \pm 1 |
| 3 | Canfeno | 0.9 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.3 | 0.20 \pm 0.05 |
| 4 | β -Pinoeno* | 0.14 \pm 0.01 | 0.62 \pm 0.04 | 0.02 \pm 0.01 |
| 5 | β -Mirceno* | 13.3 \pm 0.2 | 12.3 \pm 0.2 | 10.1 \pm 0.7 |
| 6 | p-Menta-1(7),8-dieno | 7.12 \pm 0.01 | 10.6 \pm 0.4 | 10.4 \pm 0.2 |
| 7 | α -Felandreno | 2.26 \pm 0.02 | 4.95 \pm 0.05 | 6.4 \pm 0.2 |
| 8 | Δ^3 -Careno* | 0.3 \pm 0.1 | 0.23 \pm 0.02 | 3.5 \pm 0.5 |
| 9 | α -Terpineno* | 0.2 \pm 0.1 | 0.34 \pm 0.03 | 0.40 \pm 0.05 |
| 10 | p-Cimeno | 2.18 \pm 0.02 | 4.7 \pm 0.5 | 4.4 \pm 0.1 |
| 11 | Limoneno* | 2.3 \pm 0.1 | 1.1 \pm 0.5 | 2.2 \pm 0.7 |
| 12 | β -Felandreno* | 53.8 \pm 0.2 | 35.7 \pm 0.5 | 39 \pm 2 |
| 13 | cis- β -Ocimeno | 1.1 \pm 0.5 | 1.2 \pm 0.3 | 0.15 \pm 0.05 |
| 14 | trans- β -Ocimeno | tr | 0.3 \pm 0.3 | 0.96 \pm 0.05 |
| 15 | γ -Terpineno* | 0.1 \pm 0.1 | 1.1 \pm 0.1 | 0.10 \pm 0.01 |
| 16 | cis-Hidrato de sabineno | 0.02 \pm 0.01 | 0.35 \pm 0.04 | 0.10 \pm 0.02 |
| 17 | Fenchona | tr | 0.30 \pm 0.02 | 0.10 \pm 0.01 |
| 18 | α -Terpinoleno* | tr | 0.24 \pm 0.04 | 0.15 \pm 0.05 |
| 19 | trans-Hidrato de sabineno | tr | 0.4 \pm 0.4 | 0.4 \pm 0.1 |
| 20 | Fenchol | tr | 0.3 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 |
| 21 | α -Canfolenal | tr | 0.6 \pm 0.3 | 0.1 \pm 0.1 |
| 22 | Hidrato de Canfeno | tr | 0.4 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.1 |
| 23 | Citronelal* | tr | tr | 0.16 \pm 0.02 |
| 24 | Óxido de pinoeno | tr | tr | 0.1 \pm 0.1 |
| 25 | Felandral | tr | tr | 0.10 \pm 0.05 |
| 26 | Tujanol | tr | 0.12 \pm 0.01 | 0.6 \pm 0.1 |
| 27 | Terpinen-4-ol* | tr | tr | 0.30 \pm 0.05 |
| 28 | 4-Isopropil-2-ciclohexen-1-ona | 0.29 \pm 0.01 | 1.7 \pm 0.1 | 0.80 \pm 0.02 |
| 29 | Metil acetato de bencilo | tr | tr | 0.10 \pm 0.05 |
| 30 | α -Terpineol* | tr | 0.2 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 |
| 31 | Óxido de felandreno | tr | 0.2 \pm 0.1 | 0.19 \pm 0.01 |
| 32 | cis-Piperitol | tr | 0.1 \pm 0.1 | 0.28 \pm 0.01 |
| 33 | Mirtenol* | tr | 0.28 \pm 0.02 | 0.10 \pm 0.05 |
| 34 | Salicilato de metilo* | 0.10 \pm 0.01 | 0.49 \pm 0.05 | 1.1 \pm 0.5 |
| 35 | 4-Isopropil benzaldehído | tr | 1.3 \pm 0.4 | 0.3 \pm 0.1 |
| 36 | trans-Piperitol | tr | tr | 0.10 \pm 0.02 |
| 37 | Citronelol* | tr | tr | 0.1 \pm 0.1 |

Continuación de la **Tabla 12.**

| | | | | |
|-------------------------------|---|-------------|-------------|-------------|
| 38 | <i>i</i> -Pp-Bencenometanol | <i>tr</i> | 0.32 ± 0.05 | 0.10 ± 0.01 |
| 39 | α-Cubebeno | <i>tr</i> | 0.4 ± 0.1 | 1.1 ± 0.6 |
| 40 | α-Copaeno | <i>tr</i> | 0.28 ± 0.05 | 0.30 ± 0.03 |
| 41 | α- <i>cis</i> -Bergamoteno | <i>tr</i> | 0.11 ± 0.05 | 0.20 ± 0.02 |
| 42 | <i>trans</i> -β-Cariofileno* | <i>tr</i> | 0.2 ± 0.1 | 0.56 ± 0.04 |
| 43 | α- <i>trans</i> -Bergamoteno | <i>tr</i> | 0.12 ± 0.02 | 0.30 ± 0.01 |
| 44 | β- <i>cis</i> -Farneseno | 0.05 ± 0.01 | 0.05 ± 0.02 | 0.20 ± 0.01 |
| 45 | Germacreno D | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| 46 | δ-Guaieno | <i>tr</i> | 0.10 ± 0.04 | 1.0 ± 0.2 |
| 47 | Espatuleno | - | 0.12 ± 0.05 | <i>tr</i> |
| 48 | Guaiol | - | 0.3 ± 0.2 | <i>tr</i> |
| 49 | Sesquiterpenol, C ₁₅ H ₂₆ O | - | - | 0.5 ± 0.1 |
| 50 | β-Eudesmol | - | - | 0.4 ± 0.2 |
| 51 | Sesquiterpenol, C ₁₅ H ₂₆ O | - | - | 0.3 ± 0.1 |
| M: Monoterpenos | | 99.0 ± 0.6 | 90.3 ± 0.6 | 89 ± 2 |
| MO: Monoterpenos oxigenados | | 1.3 ± 0.2 | 5.0 ± 0.2 | 4.0 ± 1 |
| S: Sesquiterpenos | | - | 1.2 ± 0.1 | 3.7 ± 0.1 |
| SO: Sesquiterpenos oxigenados | | - | - | 1.5 ± 0.3 |
| BC: Bencenoides | | 0.10 ± 0.01 | 2.1 ± 0.6 | 1.6 ± 0.5 |

a. Número del pico en la **Figura 26.**

b. Índices de Kováts determinados experimentalmente en la columna HP-5 (30 m)

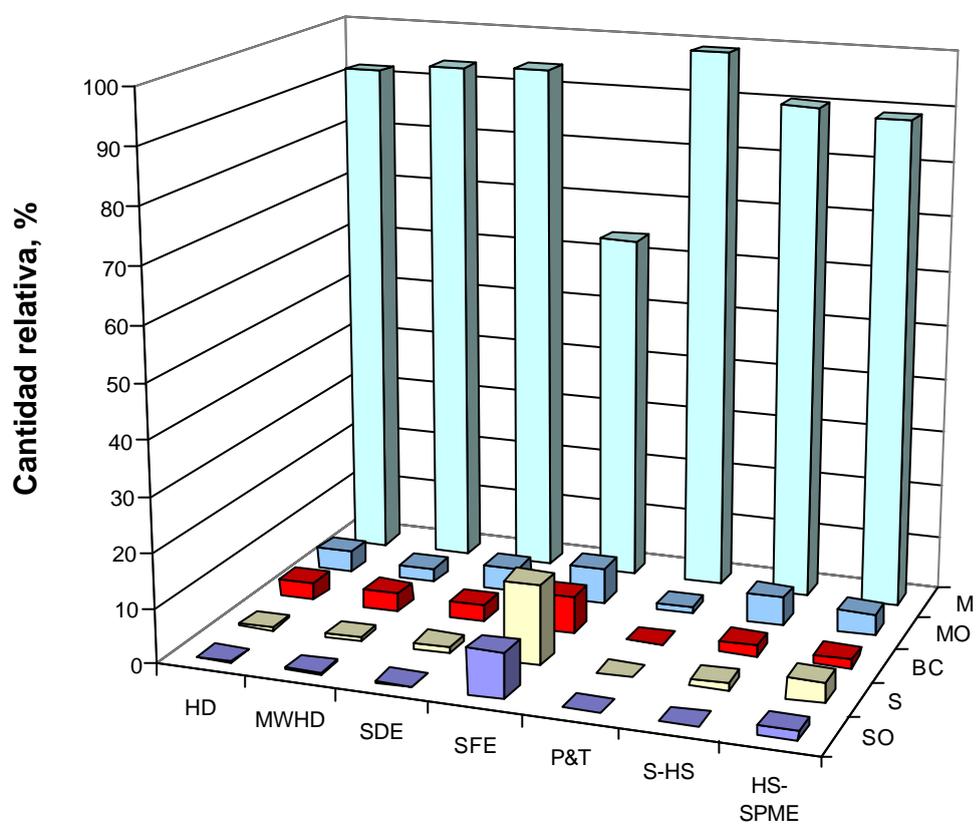
c. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos, promedio de tres extracciones.

* Identificado por espectrometría de masas usando compuesto estándar.

tr Trazas.

Moraes y colaboradores [47] han reportado también la presencia de diterpenoides del tipo atisano, labdano y kaurano en los frutos de *X. aromatica*, recolectada en Brasil; en el aceite esencial de hojas de *X. aromatica* cubana, predominaron los compuestos sesquiterpenoide, el compuesto principal encontrado fue el espatuleno (64%), se hallaron también el ciclosativeno (1%), terpinen-4-ol (0.6%), γ-muuroleño (0.8%) y *epi*-globulol (2.9%) [49].

Figura 27. Distribución de las principales familias de los compuestos en los aceites y extractos de *X. aromatica*, obtenidos por los diferentes métodos. M: Monoterpenos, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Sesquiterpenos, SO: Sesquiterpenos oxigenados, BC: Bencenoides.



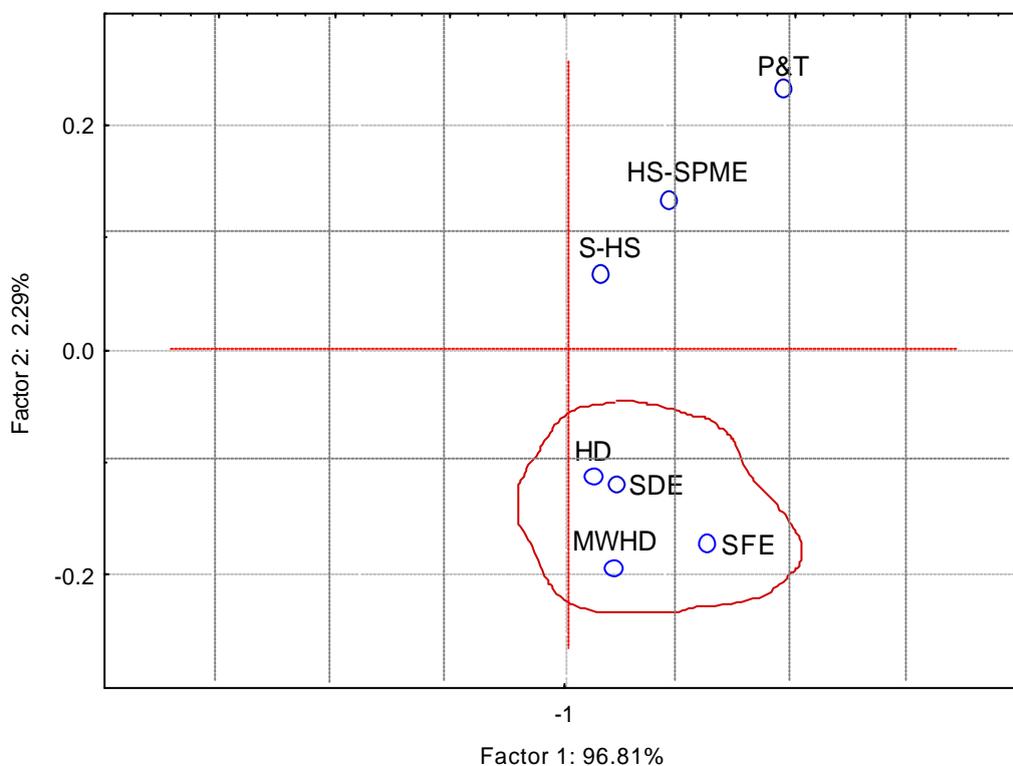
La composición del aceite esencial aislado de la corteza de *X. aromatica* (recolectada en Medellín, Colombia) reportada por Fournier y colaboradores [48] difiere significativamente de la reportada en este trabajo para el aceite esencial de los frutos de *X. aromatica*. En la **Tabla 13** se muestran las principales diferencias encontradas en los aceites esenciales obtenidos de *X. aromatica* de diferentes orígenes.

Tabla 13. Principales compuestos encontrados en los aceites esenciales de *X. aromatica* de diferentes orígenes geográficos.

| Compuesto | Cantidad relativa, % | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------|-----------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| | Brasil (flores) | Bolivia (hojas) | Cuba (hojas) | Colombia, Medellín (corteza) | Colombia , Bucaramanga (frutos) |
| Alcohol-2-feniletílico | 61.4 | - | - | - | - |
| Alcohol bencílico | 2.3 | - | - | - | - |
| Acetato de 2feniletilo | 2.8 | - | - | - | - |
| Benzaldehído | 0.9 | - | - | - | - |
| 3-Hexen-2-ona | 4.5 | - | - | - | - |
| 3-Hexen-1-ol | 2.6 | - | - | - | - |
| Limoneno | 3.7 | 5.1 | - | - | ca. 3 |
| α -Pino | - | - | - | 17.2 | 7-8 |
| α -Felandreno | - | - | - | - | 2-3 |
| β -Pino | - | - | - | 7.1 | 0.04 |
| β -Felandreno | - | - | - | - | ca. 60 |
| α -Canfolenal | - | - | - | 4.6 | ca. 0.2 |
| 4-isopropil-2-ciclohexen-1-ona | - | - | - | - | 1-3 |
| Mirtenal | - | - | - | 7.1 | - |
| β -Mirceno | - | - | - | - | ca. 9 |
| <i>trans</i> -Pinocarveol | - | - | - | 10.3 | - |
| Salicilato de metilo | - | - | - | - | ca. 2 |
| 4- <i>i-Pr</i> -Benz aldehído | - | - | - | - | ca. 1 |
| Verbenona | - | - | - | 5.9 | - |
| Mirtenol | - | - | - | 5.1 | ca. 0.1 |
| Terpinen-4-ol | - | - | 0.6 | - | ca. 0.1 |
| <i>trans</i> - β -Cariofileno | - | 5.2 | - | - | ca. 0.2 |
| <i>p</i> -Cimeno | - | 5.5 | - | - | ca. 1 |
| Espatuleno | - | 27.5 | 64.4 | - | ca. 0.1 |
| Ciclosativeno | - | - | 1.1 | - | - |
| <i>epi</i> -Globulol | - | - | 2.9 | - | - |

El resultado de PCA, aplicado a los diferentes extractos de *X. aromatica*, indica que más de 90% de la información de las **Tablas 11 y 12**, puede ser representado por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones relativas de componentes en diferentes extractos, tal como se aprecia en la **Figura 28**. La localización de cada fracción en este subespacio está determinada por su composición química. La proximidad de “puntos” correspondientes a las fracciones volátiles, obtenidas por HD, MWHD y SDE confirma, que éstas tienen composiciones químicas similares.

Figura 28. Representación gráfica de las composiciones relativas de fracciones volátiles, aisladas los frutos secos de *X. aromatica* por diferentes métodos de extracción, en el espacio formado por los primeros dos componentes principales: *Factor 1 Vs Factor 2*. En el **Anexo 2 (Tabla 4)** aparecen las contribuciones de los compuestos a los *Factores 1 y 2*.



En el **Anexo 2 (Tabla 4)** aparecen las contribuciones de los diferentes compuestos a los *Factores* 1 y 2, la mayor contribución para el primer *Factor* está dada por el β -felandreno y para el segundo *Factor* por α -pineno, β -mirceno y *p*-menta-1(7),8-dieno .

De otro lado, en la **Figura 28** se observa que las técnicas HS proporcionan fracciones volátiles con diferencias en su composición a lo largo de ambas componentes principales. Estas diferencias corresponden principalmente a las variaciones en el contenido de β -felandreno, α -tuyeno α -pineno y α -felandreno (**Tabla 12**).

2.1.5 *Satureja brownei* Briq. Esta planta pertenece a la familia *Labiatae* y se distribuye desde el sur de los Estados Unidos hasta Brasil y Paraguay. Se conoce también como *Thymus brownei* Swartz, *Clinopodium brownei* Kuntze, *Micromeria brownei* Bentham. Popularmente la llaman “Poleo” y “Ajedrea” [1, 25, 43]. Es una hierba semirrastrera, con estolones, todas las especies de esta familia, particularmente, sus hojas, contienen aceite esencial. La planta, cuando se corta, despide un olor agradable parecido al mentol. Se usa como condimento, especialmente, de carnes; en la medicina popular se utiliza la decocción o infusión de toda la planta como antigripal, estomáquico y carminativo [25, 43].

Varias investigaciones han mostrado la variabilidad composicional del aceite esencial de esta especie. Rojas y colaboradores [51], analizaron el aceite esencial de *S. brownei* de Venezuela, reportaron un rendimiento de 0.12% del aceite esencial y como compuestos mayoritarios la pulegona (64.3%), mentona (20.2%), isomentona (3.4%) e isopulegona (2.4%). Pino y colaboradores [52], estudiaron el aceite esencial de *S. brownei* cubana, en éste, la pulegona (54.6%) y la mentona (32.9%) fueron los compuestos mayoritarios obtenidos. El principal compuesto

encontrado en el aceite esencial de *S. parvifolia*, procedente de Argentina [53] fue el óxido de piperitona (69.8%), los de *S. boliviana*, también de Argentina [53], fueron γ -terpineno (15.4%), *trans*- β -cariofileno (10.2%), germacreno D (8.9%) y biclogermacreno (8.3%). Mientras que para otras especies peruanas como la *S. boliviana* y *S. brevicalex*, los compuestos mayoritarios fueron la mentona (24 y 36%) e isomentona (30 y 25%), respectivamente [54]. En la **Figura 29** se muestra la planta de *S. brownei*, utilizada en este estudio.

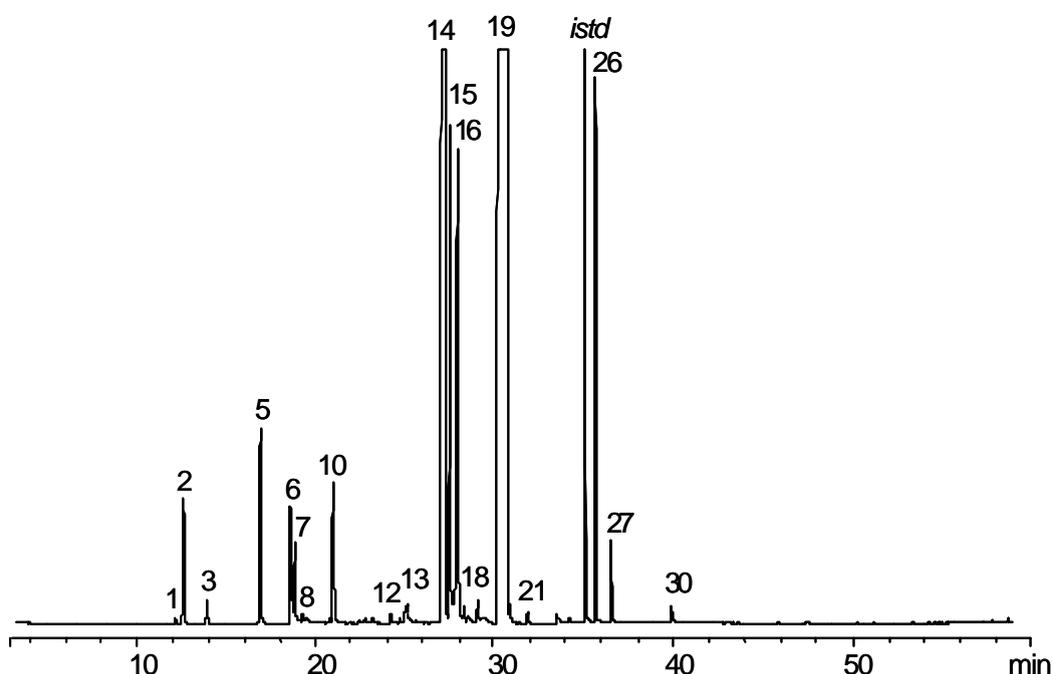
Figura 29. Planta de *Satureja brownei* Briq., usada en el presente estudio.



2.1.5.1 Metabolitos secundarios volátiles de *S. brownei*. En este trabajo, se estudio la composición química del aceite esencial, extractos y fracciones volátiles

de la *Satureja brownei* colombiana, empleando diferentes técnicas de extracción. La **Figura 30** muestra un perfil cromatográfico de metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles del aceite esencial de *S. brownei*, obtenido por HD.

Figura 30. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *S. brownei*, obtenido por HD. Columna HP-5 (30 m), *istd* = *n*-tetradecano, *split* 1:30, FID. En la **Tabla 14** aparece la respectiva identificación de los picos cromatográficos.



Como se puede apreciar en la **Tabla 14**, se encontraron 23, 26, 25 y 33 metabolitos secundarios en los aceites esenciales y extractos de *S. brownei* en concentraciones superiores al 0.1% aislados por las técnicas HD, MWHD, SDE y SFE, respectivamente. Los aceites esenciales obtenidos por HD y MWHD, contenían 23 y 26 compuestos; con un rendimiento de 0.35 y 0.27% respectivamente; la gran ventaja que presentó la extracción por MWHD resultó en un menor tiempo de destilación (30 min), en comparación con el requerido por HD (2 horas), para obtener la misma cantidad de esencia.

Tabla 14. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la *Satureja brownei* Briq., obtenidos por diferentes técnicas de extracción.

| Pico N ^a | Compuesto | Tipo | I _k ^b | | Cantidad relativa ^c , % | | | |
|------------------------------|----------------------------------|------|-----------------------------|---------|------------------------------------|-----------|------------|-----------|
| | | | HP-5 | Innowax | HD | MWHD | SDE | SFE |
| 1 | α-Tuyeno | M | 928 | 1032 | 0.10±0.04 | 0.10±0.02 | 0.09±0.01 | <i>tr</i> |
| 2 | α-Pineno* | M | 937 | 1040 | 0.57±0.04 | 0.21±0.01 | 0.72±0.01 | 0.8±0.2 |
| 3 | Sabineno* | M | 976 | 1128 | 0.3±0.1 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0.10±0.01 |
| 4 | <i>trans</i> - <i>p</i> -Mentano | M | 978 | 1038 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0.10±0.02 |
| 5 | β-Pineno* | M | 982 | 1123 | 0.90±0.01 | 0.66±0.02 | 0.70±0.01 | 1.1±0.1 |
| 6 | 3-Octanona | HO | 985 | 1310 | 0.60±0.01 | 0.50±0.01 | 0.60±0.01 | 0.7±0.2 |
| 7 | β-Mirceno* | M | 990 | 1154 | 0.50±0.04 | 0.20±0.01 | 0.14±0.01 | 0.4±0.1 |
| 8 | 3-Octanol | HO | 995 | 1515 | 0.10±0.01 | 0.74±0.03 | 0.1±0.1 | 0.20±0.05 |
| 9 | <i>p</i> -Menta-1(7),8-dieno | M | 1007 | 1186 | <i>tr</i> | 0.10±0.01 | <i>tr</i> | 0.1±0.1 |
| 10 | Limoneno* | M | 1032 | 1210 | 0.8±0.1 | 0.50±0.02 | 0.50±0.01 | 0.50±0.01 |
| 11 | β-Felandreno | M | 1035 | 1218 | 0.11±0.02 | <i>tr</i> | 0.10±0.04 | 0.10±0.01 |
| 12 | 1,8-Cineol* | MO | 1037 | 1230 | 0.10±0.05 | <i>tr</i> | 0.10±0.05 | 0.10±0.01 |
| 13 | Linalool* | MO | 1099 | 1504 | 0.10±0.01 | 0.20±0.02 | 0.4±0.1 | 0.40±0.01 |
| 14 | Mentona | MO | 1164 | 1470 | 16.2±0.3 | 17.7±0.5 | 31.5±0.1 | 27.1±0.9 |
| 15 | Isomentona | MO | 1171 | 1465 | 2.5±0.3 | 5.1±0.2 | 3.80±0.03 | 2.5±0.1 |
| 16 | Isomentol | MO | 1181 | 1662 | 1.6±0.5 | 2.1±0.2 | 2.10±0.02 | 1.8±0.2 |
| 17 | α-Terpineol* | MO | 1186 | 1657 | 0.99±0.02 | 1.3±0.2 | 1.1 ±0.1 | 1.3±0.5 |
| 18 | Piperitol | MO | 1201 | 1660 | 0.1±0.1 | 0.10±0.06 | 0.20 ±0.02 | 0.3±0.1 |
| 19 | Pulegona* | MO | 1235 | 1663 | 71±2 | 65.5±0.9 | 53.7±0.6 | 55.5±0.5 |
| 20 | Piperitona | MO | 1261 | 1740 | 0.12±0.01 | 0.30±0.01 | 0.20±0.01 | 0.4±0.1 |
| 21 | Timol | MO | 1289 | 2105 | 0.11±0.01 | 0.35±0.1 | 0.64±0.01 | 0.2±0.1 |
| 22 | <i>p</i> -Menten-9-ol* | MO | 1292 | 1736 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0.10±0.04 | 0.20±0.01 |
| 23 | Acetato de mentilo | MO | 1294 | 1543 | <i>tr</i> | 0.22±0.02 | 0.22±0.01 | 0.2±0.1 |
| 24 | Carvacrol | MO | 1298 | 2161 | 0.09±0.03 | <i>tr</i> | 0.20±0.01 | 0.3±0.1 |
| 25 | Acetato de terpinilo | MO | 1346 | 1689 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0.10±0.02 | 0.2±0.1 |
| 26 | <i>trans</i> -β-Cariofileno* | S | 1402 | 1612 | 2.10±0.05 | 2.20±0.04 | 1.7±0.1 | 2.7±0.1 |
| 27 | Geranil acetona | MO | 1447 | 1655 | 0.52±0.01 | 0.58±0.01 | 0.7±0.2 | 0.5±0.1 |
| 28 | α-Humuleno | S | 1450 | 1669 | <i>tr</i> | 0.10±0.03 | <i>tr</i> | 0.3±0.1 |
| 29 | <i>α/α</i> Aromadendreno | S | 1469 | 1680 | <i>tr</i> | 0.10±0.01 | <i>tr</i> | 0.10±0.03 |
| 30 | β-Selineno | S | 1481 | 1729 | 0.26±0.05 | 0.72±0.03 | 0.30±0.01 | 0.4±0.1 |
| 31 | γ-Cadineno | S | 1512 | 1770 | <i>tr</i> | 0.12±0.01 | <i>tr</i> | 0.13±0.03 |
| 32 | Óxido de cariofileno | SO | 1598 | 2004 | <i>tr</i> | 0.3±0.1 | <i>tr</i> | 0.50±0.02 |
| 33 | N.I. | - | - | - | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0.10±0.01 |
| 34 | N.I. | - | - | - | <i>tr</i> | 0.1±0.1 | <i>tr</i> | 0.7±0.5 |
| HO: Hidrocarburos oxigenados | | | | | 0.70±0.02 | 1.2±0.1 | 0.7±0.2 | 0.9±0.2 |
| M: Monoterpenos | | | | | 3.3±0.5 | 2.6±0.1 | 1.40±0.02 | 2.8±0.4 |

Continuación de la **Tabla 14**.

| | | | | |
|-------------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| MT: Monoterpenos | 90±2 | 89±1 | 89.2±0.3 | 86±2 |
| MO: Monoterpenos oxigenados | 3.60±0.02 | 4.3±0.9 | 6.5±0.2 | 5±1 |
| S: Sesquiterpenos | 2.3±0.05 | 3.20±0.04 | 2.0±0.1 | 4±1 |
| SO: Sesquiterpenos oxigenados | - | 0.4±0.2 | - | 0.50±0.02 |

- a. Número del pico en la **Figura 30**.
- b. Índice de Kováts determinados experimentalmente en las columnas HP -5 e Innowax.
- c. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos; promedio de tres extracciones.
- * Identificado por espectrometría de masas usando compuesto estándar.
- N.I. No identificado.
- tr* Trazas.

El principal compuesto encontrado en todos los extractos de *S. brownei* fue la pulegona (54-71%), identificada por comparación de su espectro de masas con el del compuesto patrón. Otros compuestos encontrados en alta proporción fueron mentona (16%-32%), isomentona (3 -5%), isomentol (ca. 2%) y *trans*- β - cariofileno (2-3%).

Los extractos de HD, MWHD, SDE y SFE fueron constituidos por hidrocarburos oxigenados (0.7-1.3%), monoterpenos, $C_{10}H_{16}$, (2-4%); monoterpenos oxigenados (91-95%), sesquiterpenos, $C_{15}H_{24}$, (2-4%) y sesquiterpenos oxigenados (<0.5%).

La **Tabla 15** muestra la composición química de las fracciones volátiles aisladas de las hojas y tallos frescos de *Satureja brownei* Briq., usando las técnicas de *headspace* (P&T, S-HS, HS-SPME). En ellas, 11, 13 y 15 metabolitos secundarios volátiles fueron detectados en concentraciones superiores a 0.1%. Los compuestos fueron α -pineno (0.9-9%), sabineno (<1%), β -pineno (1-8%), limoneno (1-2%), mentona (26-54%) isomentona (3-25%), pulegona (7-42%) y *trans*- β -cariofileno (0.9-3%).

En la **Figura 31** se observa la distribución de las principales familias de compuestos en los aceites esenciales, extractos y fracciones volátiles obtenidas por los diferentes métodos de extracción. En esta gráfica se aprecia que las monoterpenonas fueron los compuestos predominantes en todos los extractos.

Tabla 15. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la *Satureja brownei* Briq., obtenidos por técnicas *headspace*.

| Pico N ^o ^a | Compuesto | Área relativa, % ^b | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| | | P&T | S-HS | HS-SPME |
| 2 | α -Pino | 3,1 \pm 0.4 | 8,7 \pm 0.6 | 0,9 \pm 0.1 |
| 3 | Sabineno | <i>tr</i> | 1,10 \pm 0.01 | <i>tr</i> |
| 5 | β -Pino | 3,2 \pm 0.7 | 8,4 \pm 0.2 | 2 \pm 1 |
| 6 | 3-Octanona | 3,1 \pm 0.1 | 2,7 \pm 0.4 | <i>tr</i> |
| 7 | Mirceno | 2.1 \pm 0.2 | 0,78 \pm 0.02 | <i>tr</i> |
| 10 | Limoneno | 2,5 \pm 0.4 | 2,7 \pm 0.5 | 1,0 \pm 0.3 |
| 12 | 1,8-Cineol | <i>tr</i> | 0,7 \pm 0.2 | 0,30 \pm 0.01 |
| 13 | Linalool | <i>tr</i> | 0,4 \pm 0.1 | 0,3 \pm 0.1 |
| 14 | Mentona | 36 \pm 4 | 26 \pm 3 | 54 \pm 3 |
| 15 | Isomentona | 3,4 \pm 0.5 | 15 \pm 2 | 25 \pm 2 |
| 16 | Isomentol | 2,7 \pm 0.2 | 7 \pm 1 | 2,5 \pm 0.1 |
| 19 | Pulegona | 42 \pm 5 | 26 \pm 3 | 7 \pm 4 |
| 25 | Acetato de terpinilo | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 1,5 \pm 0.2 |
| 26 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 2,0 \pm 0.9 | 0,91 \pm 0.02 | 3.3 \pm 0.9 |
| 27 | Geranil acetona | 0,21 \pm 0.06 | <i>tr</i> | 0.6 \pm 0.1 |
| 28 | α -Humuleno | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0.4 \pm 0.1 |
| 29 | <i>allo</i> -Aromadendreno | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,46 \pm 0.02 |
| 30 | β -Selineno | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,55 \pm 0.05 |
| HO: Hidrocarburos oxigenados | | 3.1 \pm 0.2 | 2.7 \pm 0.4 | - |
| M: Monoterpenos | | 10.8 \pm 0.1 | 21.7 \pm 0.7 | 3.2 \pm 1.1 |
| MT: Monoterpenonas | | 81 \pm 2 | 67 \pm 3 | 87 \pm 2 |
| MO: Monoterpenos oxigenados | | 2.9 \pm 0.3 | 8 \pm 2 | 5.2 \pm 0.4 |
| S: Sesquiterpenos | | 2.0 \pm 0.1 | 0.90 \pm 0.02 | 5 \pm 1 |

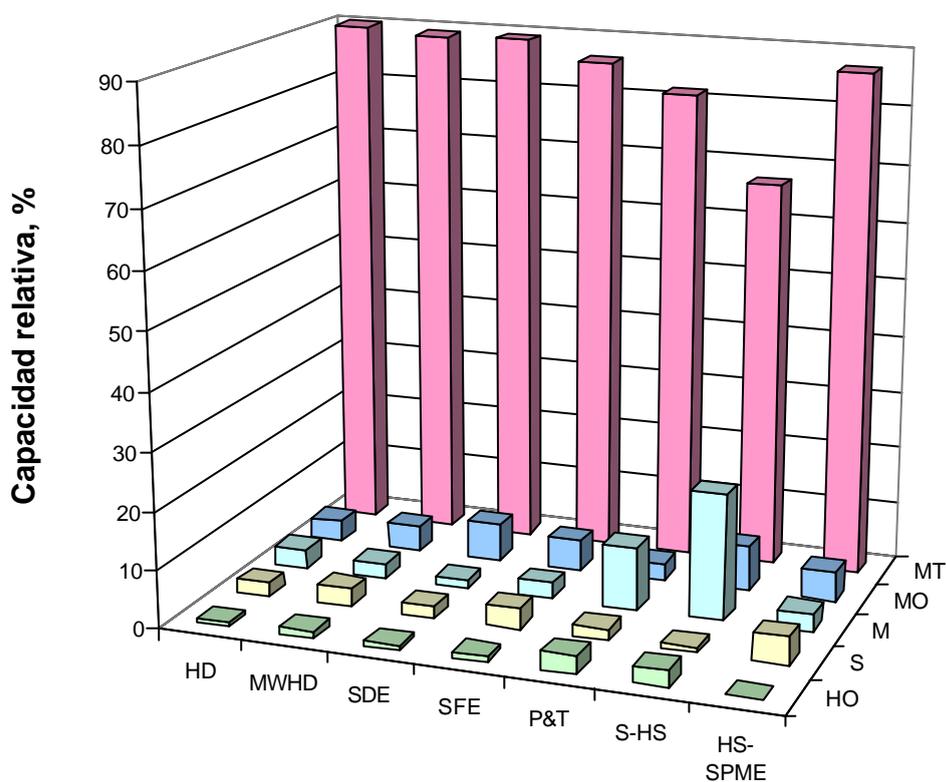
a. Número del pico en la **Figura 30**.

b. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos; promedio de tres extracciones.

* Identificado por espectrometría de masas usando compuesto estándar.

tr Trazas.

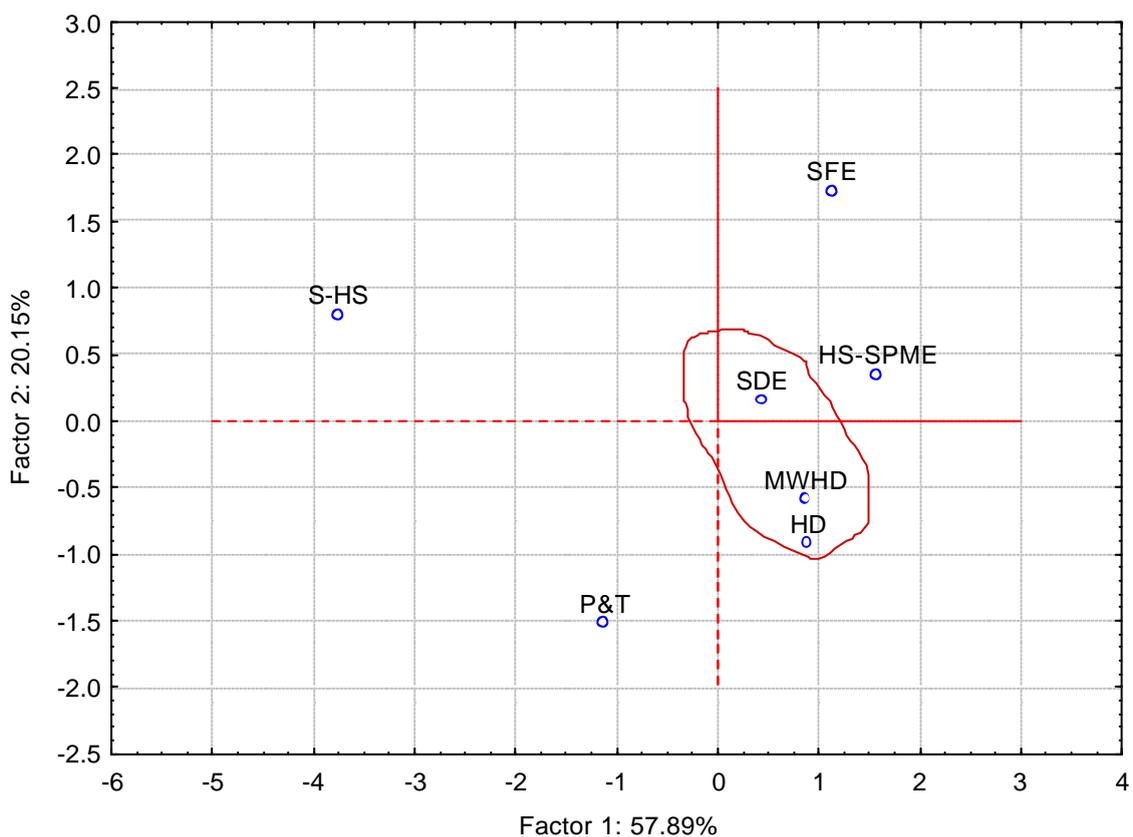
Figura 31. Distribución de las principales familias de los compuestos en los aceites y extractos de *S. brownei*, obtenidos por los diferentes métodos. HO: Hidrocarburos oxigenados, M: Monoterpenos, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Sesquiterpenos, SO: Sesquiterpenos oxigenados.



El resultado del PCA, aplicado a las fracciones volátiles de *S. brownei*, indica que ca. 78% de la información de las **Tablas 14 y 15**, puede ser representado por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones relativas (%) de componentes en diferentes extractos, como se aprecia en la **Figura 32**. El primer componente (*Factor 1*) corresponde al 57.9% de la variación y está relacionado principalmente con el limoneno, α -terpineol, piperitona, piperitol y acetato de

mentilo; el segundo componente (*Factor 2*) corresponde al 20.2% de la variación y las mayores contribuciones están dadas por los sesquiterpenos *cis*-cariofileno, α -humuleno y *allo*-aromadendreno. Las contribuciones de los componentes a los *Factores 1 y 2* para el análisis PCA, aparecen en el **Anexo 2 (Tabla 5)**.

Figura 32. Representación gráfica de las composiciones relativas de las fracciones volátiles, aisladas de la planta fresca de *S. brownei.*, por diferentes métodos de extracción, en el espacio formado por los dos primeros componentes principales. Las contribuciones de los componentes a los *Factores 1 y 2* aparecen en el **Anexo 2 (Tabla 5)**.



Nuevamente, la proximidad de los puntos correspondientes a los métodos HD, MWHD y SDE, confirma la similitud de las composiciones obtenidas por estas técnicas (**Tabla 14**), pero el método SFE fue más selectivo y eficiente hacia la extracción de los sesquiterpenoides; el punto correspondiente se ubica en otra región del espacio. La composición obtenida por *headspace*, muestra que la HS-SPME presentó una composición más parecida a la del aceite esencial a diferencia de otras técnicas de *headspace*, *i.e.* S-HS y P&T (**Tabla 15**).

2.1.6 Fraccionamiento de aceites esenciales por cromatografía en contracorriente. Para precisar sus características organolépticas, los efectos fisiológicos y/o de actividad biológica, es indispensable conocer la composición química de los aceites esenciales exacta, dado que uno de los principales objetivos de este trabajo fue la determinación de su actividad antioxidante *in vitro*. Se realizó el fraccionamiento de los aceites esenciales obtenidos usando la técnica de cromatografía en contracorriente (CCC), para determinar luego la capacidad de diferentes fracciones para “atrapar” el catión-radical ABTS⁺ y el radical DPPH. Ésto, con el fin de poder identificar los compuestos y/o sus mezclas responsables de la actividad antioxidante de los aceites esenciales bajo estudio.

La cromatografía en contracorriente (CCC) es una modalidad de la técnica de cromatografía líquida, desarrollada por el Dr. Yoichiro Ito a finales de los años 60's [55], en la cual, la partición líquido-líquido es el fenómeno responsable de la retención y separación de analitos. La característica particular de CCC, es que a diferencia de otras técnicas cromatográficas, la fase estacionaria es también un líquido sin ningún soporte sólido, donde campos centrífugos son usados para mantener la fase estacionaria líquida “fija”, mientras que la fase móvil pasa a través de ella. Un equipo para CCC comprende una unidad para la fase móvil, una válvula, una bomba de inyección, una columna, un detector y un procesador

de datos. La columna contiene partes rotando necesarias para crear y mantener un campo centrífugo [55].

La técnica CCC se ha empleado en la separación (fraccionamiento) de compuestos en extractos naturales [56, 57]; en éste trabajo, se usó como un método de separación preparativa para aislar las fracciones y los compuestos individuales de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla* y *X. aromatica*. La **Figura 33** muestra los cromatogramas obtenidos por CCC.

Las fracciones se recolectaron de acuerdo con la secuencia de salida de los componentes; como método complementario se usó cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography*, TLC), debido a que algunas sustancias no fueron detectadas a la longitud de onda utilizada (254 nm), las fracciones recogidas fueron “sembradas” en placas para TLC. Luego, las que al ser reveladas con *p*-anisaldehído (0,5% en metanol:ácido sulfúrico:ácido acético, 85:5:10) presentaron manchas con el mismo color e intensidad, se recogieron como una fracción. En la **Figura 34**, se pueden observar algunas imágenes de cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de los aceites esenciales de *A. triphylla*, *L. armata*, *L. alba* y *X. aromatica*. El aceite esencial de *S. brownei* no fue fraccionado, ya que previamente a la separación por CCC, se determinó su capacidad de atrapamiento de radicales y ésta fue muy baja, aún en concentraciones altas (>100000 ppm) del aceite.

Mediante CCC se obtuvieron 8, 12, 7 y 10 fracciones de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla* y *X. aromatica*, respectivamente. En la **Tabla 16**, se muestran los principales compuestos encontrados en cada fracción, ya que debido a la complejidad de los aceites la técnica no fue completamente eficiente en la separación de todos los componentes; la identificación de las sustancias en las fracciones se realizó mediante GC-MS.

Figura 33. Cromatogramas típicos de los aceites esenciales de: **A.** *Lippia alba*, **B.** *Lantana armata*, **C.** *Aloysia triphylla* y **D.** *Xylopia aromatica*, obtenidos por CCC. Sistema de solventes (acetonitrilo/*ter*-butilmetiléter/hexano). Columna PTFE (160 m x 1.6 mm D.I.). Detector UV (254 nm).

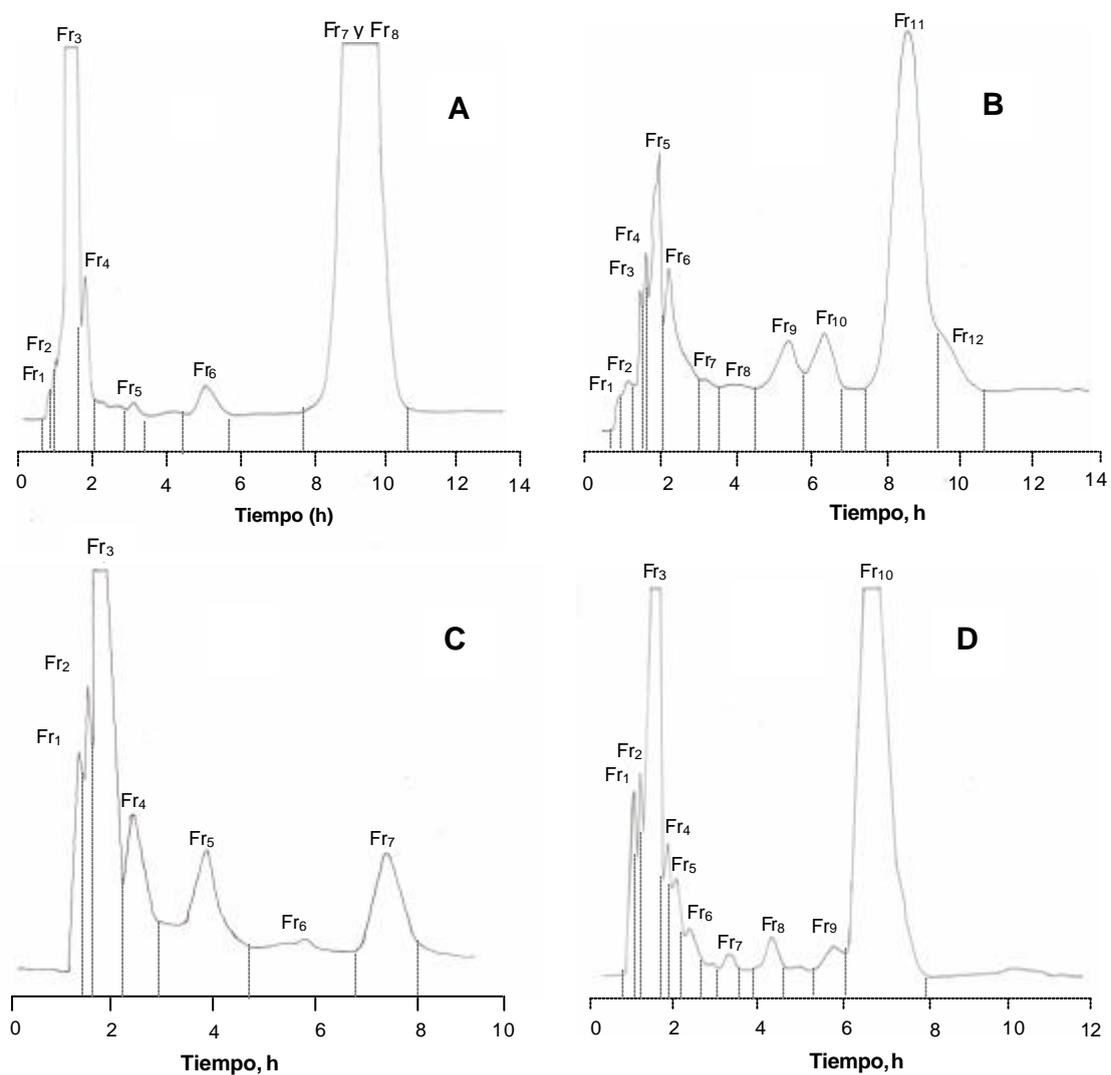


Figura 34. TLC de fracciones de los aceites esenciales de *L. alba*, *A. triphylla*, *L. armata* y *X. aromática*, aisladas por CCC.

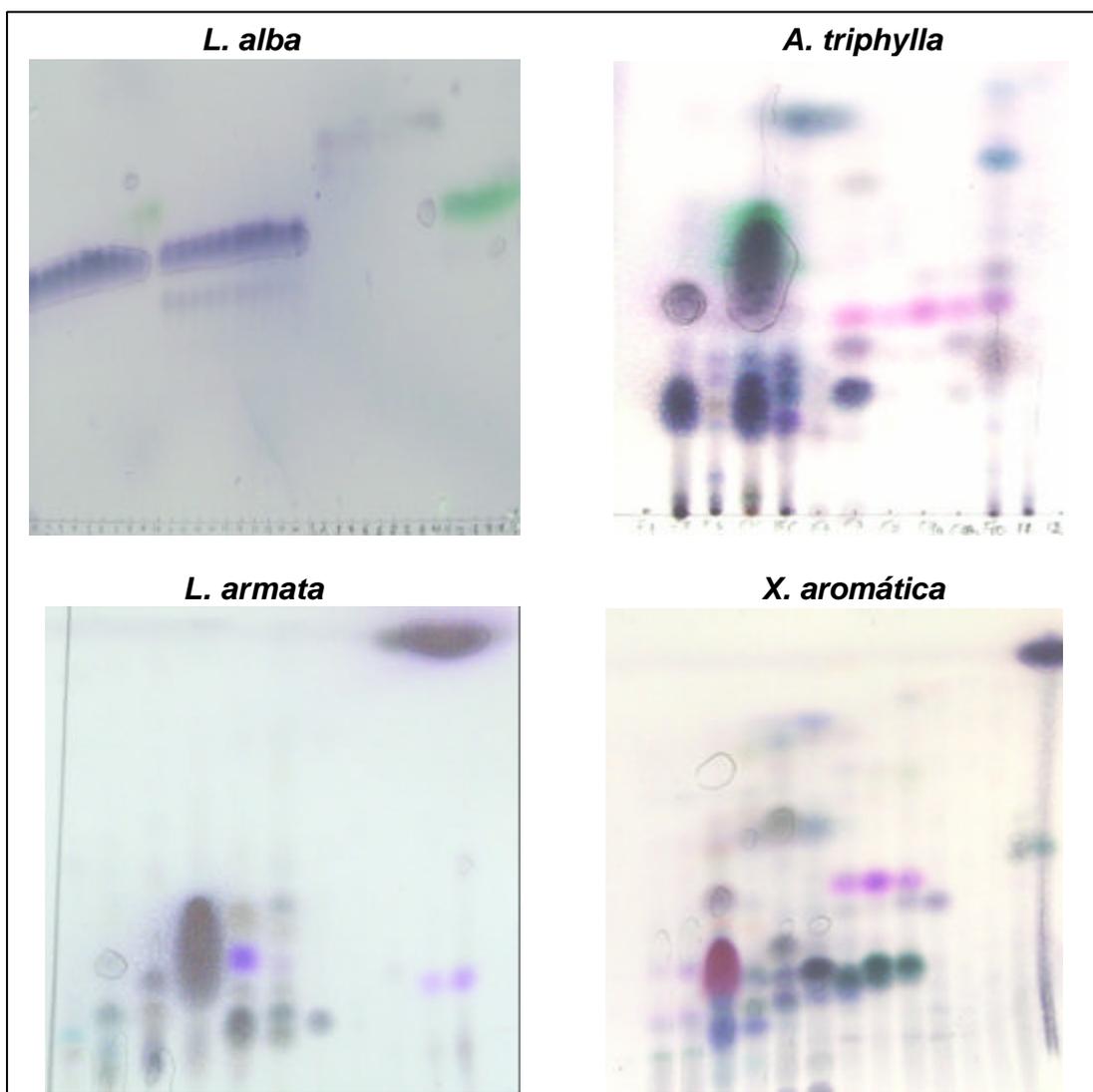


Tabla 16. Principales compuestos presentes en las fracciones de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla* y *X. aromatica*, obtenidas por CCC e identificados por GC-MS.

| Fracciones | Aceite esencial | | | |
|------------|--|--|---|--|
| | <i>L. alba</i> | <i>L. armata</i> | <i>A. triphylla</i> | <i>X. aromatica</i> |
| 1 | Linalool, carveol, piperitona. | 1-Octen-3-ol, β -pineno, verbenona. | Acetato de nerilo. | α -Pineno, <i>p</i> -cimeno, canfeno, α -felandral. |
| 2 | Pulegona, carvenona, <i>p</i> -ment-6-en-2-ona, piperitenona. | Sabineno, β -mirceno. | Linalool, verbenol, isopulegol. | <i>p</i> -Menta-1,7-dieno, <i>i</i> - <i>Pr</i> -bencenometanol, β -mirceno, limoneno. |
| 3 | Acetato de linalilo, α -terpineol, carvona. | Farnesol, nerol, geraniol, eugenol. | 6-Metil-5-hepten-2-ona, nerol, neral, geraniol, geranial, ment-2-en-1-ol. | β -Felandreno, <i>cis</i> -hidrato de sabineno, salicilato de metilo, 4-isopropilbenzaldehído. |
| 4 | Ocimeno, farnesol. | Elemol, nerolidol, ledol. | Terpinen-4-ol. | α -Terpineno, Δ^3 -careno, felandral. |
| 5 | β -Cubebeno, α -copaeno, germacreno B. | Eudesmol, α -copaeno, α -cubebeno, <i>trans</i> - β -cariofileno. | Nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno. | γ -Terpineno, 4-terpineol. |
| 6 | β -Mirceno, limoneno. | <i>trans</i> - β -Cariofileno, α -zingibereno, farneseno, <i>ar</i> -curcumeno. | <i>ar</i> -Curcumeno, cedranona, propanoato de nerilo, cadinol. | Espatulenol, α -copaeno, α -cubebeno. |
| 7 | Biciclosesquifelandreno, δ -cadineno, β -bourboneno. | Guaiol, germacrenol. | δ -Cadideno, cadina-1,4-dieno, biciclogermacreno, isobutirato de nerilo, hidroxycariofileno. | Guaiol, β -eudesmol. |
| 8 | <i>trans</i> - β -Cariofileno, β -farneseno, α -humuleno, cubenol, fitol. | α -Humuleno, δ -cadineno, γ -bisaboleno. | - | Sesquiterpenol, C ₁₅ H ₂₄ O. |
| 9 | - | Óxido de humuleno, α -cadinol. | - | 4-Isopropil-2-ciclohexen-1-ona, <i>cis</i> -piperitol. |
| 10 | - | Biciclosesquifelandreno, germacreno D, β -bourboneno. | - | Germacreno D, α -guieno. |
| 11 | - | Óxido de cariofileno, cariofilenol, óxido de himachaleno. | - | - |
| 12 | - | Cubenol, fitol. | - | - |

2.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC₅₀) DE LOS ACEITES ESENCIALES FRENTE A ARTEMIA SALINA

Para calcular la dosis letal media de un producto debe determinarse primero la *curva de toxicidad o curva de regresión "dosis-mortalidad"*, es decir, aquella línea que relaciona las dosis que se ensayan con las mortalidades que se obtienen. Para lograr una línea de regresión recta, las dosificaciones se expresan en logaritmos y los porcentajes de mortalidad en unidades *Probit* [58]. El método *Probit* consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población. Las líneas de regresión "dosis-mortalidad" facilitan las comparaciones entre los grados de toxicidad de diversos productos insecticidas, y permiten detectar los cambios que pueden producirse en el grado de susceptibilidad del microorganismo evaluado con el tiempo [59, 60].

Los resultados de la evaluación de la concentración letal media (LC₅₀) de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei*, se muestran en la **Tabla 17**. Se usó el aceite esencial de *Callistemon viminalis*, como mezcla de referencia, ya que este aceite ha demostrado una muy baja toxicidad frente a larvas e insectos [61]. Los porcentajes de mortalidad obtenidos fueron transformados a la escala *Probit* y, posteriormente, graficados contra el logaritmo de las concentraciones evaluadas, así como se muestra en la **Figura 35**.

Los datos reportados en la **Tabla 17** muestran que el aceite esencial de *L. armata* fue el más tóxico de todos los estudiados en el presente trabajo, con valores LC₅₀ de 3.8 y 2.1 µg/mL, comparados con el valor de referencia para el aceite esencial de *Callistemon viminalis* (80.5 y 118.3 µg/L), respectivamente, para 24 y 48 horas transcurridas después de haber sido expuestos los aceites a la *Artemia salina*.

La alta toxicidad del aceite de *L. armata*, coincide con la reportada por varios investigadores, quienes comprobaron su efectividad contra las larvas de los mosquitos *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* y *Culex pipien* [35], el nemátodo *Meloidogyne incognita* [36] y las larvas de *Spodoptera littoralis* y la mosca *Drosophyla melanogaster*[41].

Con el objeto de tener valores de referencia de aceites esenciales altamente nocivos, en la **Tabla 17** también se muestran los LC₅₀ de este tipo de aceites, los cuales han presentado toxicidad *in vivo* alta (empleando ratas de experimentación), como es el caso de los aceites esenciales de *Peumus boldus* (LC₅₀=0.13 µg/g) y *Chenopodium ambrosioides* (LC₅₀=0.25-0.38 µg/g), debido al contenido alto de ascaridol (16% en *Peumus boldus* y 60-80% en *Chenopodium ambrosioides*). Otros aceites esenciales de toxicidad muy alta son: *Prunus amygdalus* (LC₅₀= 0.9 µg/g), cuyos principales componentes son el benzaldehído (LC₅₀=1-2 µg/g) y el ácido cianhídrico (LC₅₀=0.0001 µg/g), a éste último se debe su elevada toxicidad; por ejemplo, la α-tuyona (LC₅₀=0.21 µg/g) es la responsable de la letalidad del aceite esencial de *Artemisia herba-alba* (LC₅₀=0.37 µg/g) y la pulegona (LC₅₀=0.5 µg/g), de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* (LC₅₀=0.4 µg/g) y *Chrysanthemum vulgare* (LC₅₀=0.30 µg/g) [62].

De los aceites estudiados en el presente trabajo, el aceite esencial de *A. triphylla* fue el segundo más tóxico frente la *A. salina* (LC₅₀ 6.9-19.7 µg/mL); la literatura ha reportado que las partes aéreas de *A. triphylla* demostraron actividad antimutagénica en extractos acuosos en concentraciones de 50 mg/L contra la *Salmonella typhimurium* [2, p. 554].

Tabla 17. Valores de LC₅₀ e intervalos de confianza (95%) de los aceites esenciales a 24 y 48 horas de exposición a la *A. salina*.

| Solución, mg/mL | Tiempo de exposición (hrs) | LC ₅₀ , mg/mL | Intervalos de confianza (95%) | |
|---|----------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------|
| | | | Superior | Inferior |
| <i>Lantana armata</i> | 24 | 3.82 | 4.04 | 3.61 |
| | 48 | 2.05 | 2.22 | 1.89 |
| <i>Aloysia triphylla</i> | 24 | 19.66 | 21.03 | 18.38 |
| | 48 | 6.92 | 7.6 | 6.3 |
| <i>Xylopia aromatica</i> | 24 | 53.58 | 57.84 | 49.63 |
| | 48 | 36.37 | 40.15 | 32.95 |
| <i>Lippia alba</i> | 24 | 104.68 | 108.24 | 101.24 |
| | 48 | 65.47 | 69.05 | 62.07 |
| <i>Satureja brownei</i> | 24 | 111.39 | 118.36 | 104.83 |
| | 48 | 76.06 | 81.56 | 70.93 |
| <i>Callistemon viminalis</i> | 24 | 118.31 | 127.42 | 109.85 |
| | 48 | 80.53 | 88.66 | 73.14 |
| <i>Prunus amigdalus</i> * | - | 0.96** | - | - |
| Ácido cianhídrico* | - | 0.0001** | - | - |
| Benzaldehído* | - | 1-2** | - | - |
| <i>Artemisia herba-alba</i> * | - | 0.37** | - | - |
| α-Tuyona* | - | 0.21** | - | - |
| <i>Peumus boldus</i> * (Ascaridol) | - | 0.13** | - | - |
| <i>Chenopodium ambrosioides</i> * (Ascaridol) | - | 0.25-0.38** | - | - |
| <i>Mentha pulegium</i> * | - | 0.40** | - | - |
| <i>Chrysanthemum vulgare</i> * | - | 0.30** | - | - |
| Pulegona* | - | 0.50** | - | - |

* Tisserand, R.; Balacs, T.; Caldwell, J., 1999. Essential Oil Safety. Harcourt Publishers Limited, London, p.p. 115-200. [62].

** En µg/g.

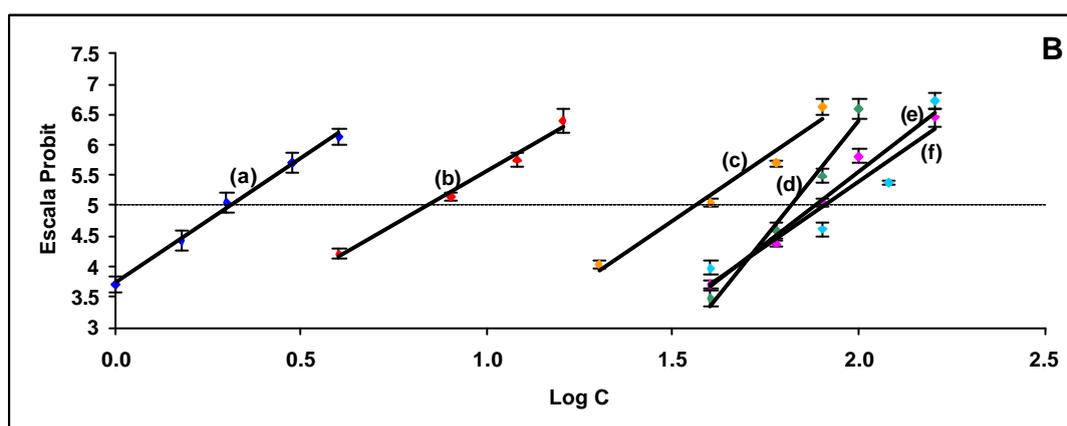
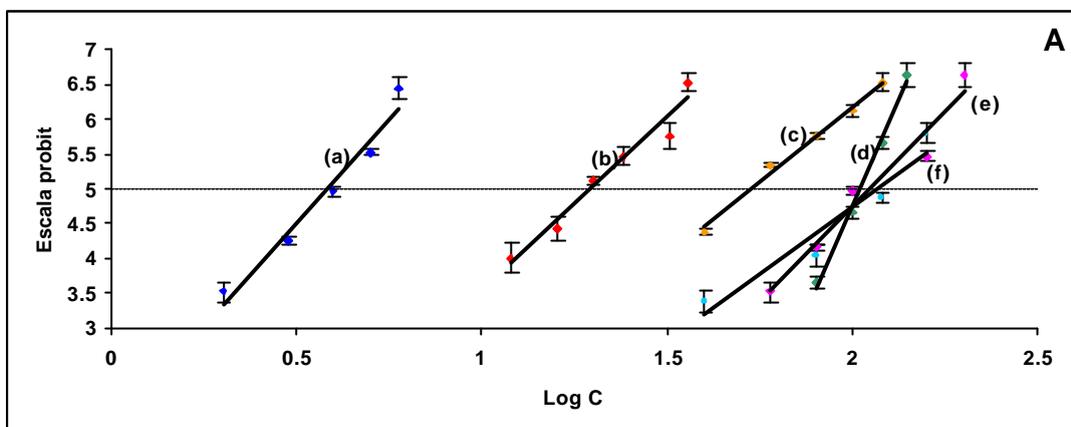


Figura 35. Valor *Probit* Vs el logaritmo de las concentraciones de los aceites esenciales de **a.** *L. armata*; **b.** *A. triphylla*; **c.** *X. aromatica*; **d.** *L. alba*; **e.** *S. brownei* y **f.** *Callistemon viminalis*. **A.** Después de 24 horas de exposición a la *A. salina*. **B.** Después de 48 horas de exposición a la *A. salina*.

El aceite esencial de *X. aromatica*, por su parte, presentó una toxicidad media (LC_{50} 36.4-53.6 $\mu\text{g/mL}$). Fournier *et al.* [48], reportaron que el aceite esencial de *X. aromatica*, obtenido de la corteza y hojas de la planta, mostró una moderada

actividad antibacterial y antifúngica, cuando se hicieron los ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC) contra *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*; sin embargo, no se registró ninguna actividad contra la *Escherichia coli* ni *Pseudomonas aeruginosa*. Los aceites esenciales menos tóxicos frente a la *A. salina* fueron *L. alba* ($LC_{50} = 65.5-104.7$ $\mu\text{g/mL}$) y *S. brownei* ($LC_{50} = 76.1-111.4$). Otros trabajos [2, p. 559] han reportado, que el aceite esencial de *L. alba* presenta actividad contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* y *Neurospora crassa*.

2.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES Y ALGUNAS DE SUS FRACCIONES

Un área muy importante en el campo de productos naturales es la determinación de la actividad biológica de sus extractos. Muchas plantas son fuente valiosa de compuestos y mezclas odoríferas (saborizantes, aromatizantes), efectivos agentes antisépticos y antioxidantes [63-66]. Los antioxidantes de origen natural se usan cada vez con mayor frecuencia no solamente en los alimentos, sino también en diferentes preparados farmacéuticos, cosméticos y productos de uso general (pinturas, bolsas plásticas, textiles, etc.). Uno de los objetivos de esta investigación fue la evaluación de la actividad antioxidante de cinco aceites esenciales colombianos, los cuales pueden tener aplicación en la industria, ya sea como tales o por la utilidad de alguno de sus componentes.

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que cuando está presente en concentraciones bajas, inhibe o previene la oxidación de un sustrato; el término "sustrato oxidable" incluye casi todo lo que se encuentra en las células vivas, e.g. proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA, entre otros componentes [67, 68].

Existen numerosas clasificaciones de los antioxidantes, a saber: exógenos, si éstos ingresan a través de la cadena alimenticia; endógenos, si son sintetizados por las células. De acuerdo con su solubilidad, los antioxidantes se dividen en liposolubles e hidrosolubles; y por su origen, en naturales o sintéticos. En general, los antioxidantes pueden ser divididos según su modo de acción en tres grupos principales [65-68]:

◆ **Antioxidantes primarios o “secuestradores” de radicales:** son sustancias atraparoras de radicales en el sistema, que bloquean la iniciación o propagación de reacciones de oxidación en cadena; forman parte de la primera línea de defensa; entre ellos, figuran las vitaminas A, C y E, ácido úrico, albumina,

ubiquinol, carotenoides, algunos antioxidantes sintéticos y naturales (e.g. flavonas, flavonoides y polifenoles, etc).

◆ **Antioxidantes secundarios o preventivos:** actúan como la segunda línea de defensa, suprimiendo la generación de radicales; entre ellos, se destacan las peroxidasas (e.g. glutatión peroxidasa), la catalasa, la superóxido dismutasa y proteínas quelantes de metales.

◆ **Antioxidantes de reparación y de *novo*:** forman parte de la tercera línea de defensa, entre ellos, se encuentran lipasas, proteasas, DNA transferasas y otras enzimas de *novo*, de reparación y de reconstrucción de membranas celulares.

La efectividad de un antioxidante depende, entre otras, de las siguientes características estructurales [65, 67]:

- ◆ Presencia de electrones o átomos de hidrógeno, que puedan ser donados fácilmente a los radicales;
- ◆ Capacidad de deslocalizar la carga formada por la pérdida de uno de sus átomos de hidrógeno;
- ◆ Facilidad de formar complejos con los iones metálicos de transición.

Es importante definir cómo va a ser medida la actividad antioxidante. Para esto, se deben usar sistemas modelo, los cuales constan de un **sustrato**, e.g. un aceite, una grasa o sus emulsiones; el **medio**, que origina el deterioro oxidativo y la **técnica analítica** con la cual se va a medir la reacción; ésta se escoge de acuerdo con el objetivo del ensayo. Para evaluar el mecanismo de acción del antioxidante, se pueden utilizar técnicas de atrapamiento de radicales, pero si se busca estudiar el efecto protector de un sustrato contra el deterioro oxidativo se realiza el

seguimiento de compuestos, tanto degradados como generados, productos intermedios y/o finales de oxidación.

Las espectroscopías ESR y UV-VIS se usan para estudiar procesos de atrapamiento de radicales; en UV-VIS los más empleados son los métodos de decoloración *i.e.* del catión-radical ABTS⁺ [65, p.73] y del radical DPPH [65, p. 73]. Las técnicas cromatográficas (HRGC, HPLC), métodos calorimétricos, conductimétricos, titrimétricos y de quimioluminiscencia se utilizan generalmente para determinar los compuestos generados o degradados, empleando técnicas con derivación de sustancias o sin ella [69, 70]. Por ejemplo, cuando se determina el efecto protector que ejerce una sustancia frente a la oxidación de un sistema lipídico, se evalúan los productos de descomposición, tales como aldehídos, cetonas, hidroperóxidos, alcoholes y ácidos grasos: las técnicas de HRGC y HPLC se utilizan ampliamente en la determinación de este tipo de compuestos [70-77].

La peroxidación lipídica puede ser inducida por diferentes métodos [67], a saber: la radiólisis, la fotólisis y/o por la reacción tipo Fenton, la cual se usó en el presente estudio. También es importante tener en cuenta, que el valor medido de la actividad antioxidante depende tanto del ensayo utilizado, *i.e.* el sistema lipídico modelo, como del modo de inducir la oxidación y de la propiedad físico-química que se monitorea durante este proceso [57].

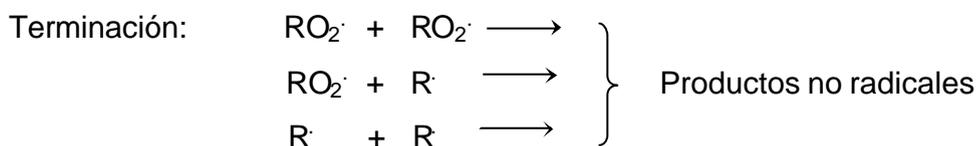
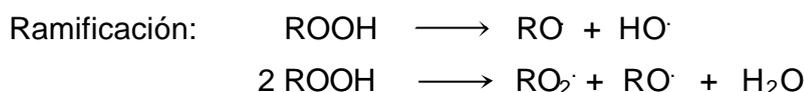
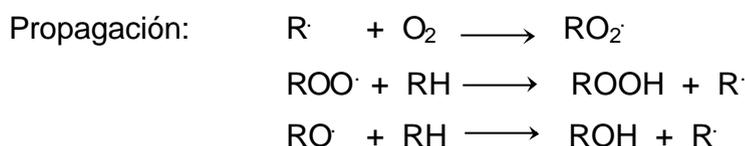
En la **Tabla 18** se muestra un resumen de los principales métodos usados para la evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales. En el presente trabajo, se utilizaron varios métodos para estudiar la actividad antioxidante de los aceites esenciales de *L. alba*, *A. triphylla*, *L. armata*, *X. aromatica* y *S. brownei*, basados en la capacidad de inhibir la oxidación lipídica (empleando una emulsión

de ácido linoleico como sistema lipídico modelo) y de atrapar radicales (usando los métodos de decoloración del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH).

Tabla 18. Métodos usados para la evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales.

| Aceite esencial | Sistema modelo | Medición |
|---|--|--|
| Tomillo y comino | Mantequilla | Índice de acidez, valor de peróxido y prueba del ácido tiobarbitúrico [78]. |
| <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Laurus nobilis</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Eucaplyptus globulus</i> , <i>Tagetes minuta</i> , <i>Satureja parvifolia</i> y <i>Lippia polystachya</i> | Aceite de soya | Índice de peróxido [79]. |
| Pimienta | Carne de cerdo | Prueba del ácido tiobarbitúrico [80]. |
| Limón | Plasma sanguíneo | Formación de eteno [81]. |
| Clavo y nuez moscada | Yema de huevo y ácido linoleico | Prueba del ácido tiobarbitúrico [83]. Ensayo de difusión de agar de β-caroteno [83, 84]. |
| Aceites esenciales de diferentes especies (23) | Plasma humano | Determinación de sustancias carbonílicas [85]. |
| Diferentes clases de aceites esenciales de cítricos (34) | Solución etanólica | Radical DPPH [86]. Medición de dienos conjugados [82]. |
| Tomillo | Solución metabólica. Ácido linoleico | Radical DPPH [87]. Determinación de sustancias carbonílicas [87]. |
| Orégano | Solución metabólica Solución etanólica Carne de pavo | Radical DPPH [57]. Cation-radical ABTS ⁺ [57]. Determinación de malondialdehído [88]. |

2.3.1 Determinación de la inhibición de la peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica es una reacción de propagación en cadena que está acompañada de la generación de hidroperóxidos lipídicos y una gran variedad de productos secundarios como epóxidos, hidrocarburos y compuestos carbonílicos, entre otros. Se conoce que la peroxidación lipídica transcurre a través de la producción de radicales y se lleva a cabo en varias etapas [65, 66, 89], a saber: iniciación, propagación, ramificación y terminación:

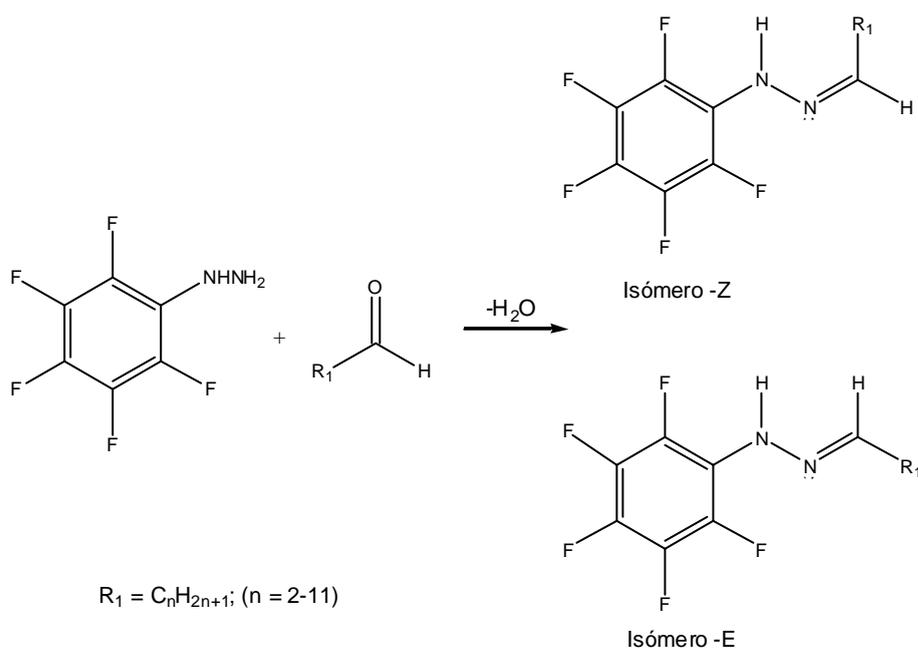


En este trabajo, se utilizó el ácido linoleico en emulsión como sistema lipídico modelo. El hexanal, producto final de la degradación oxidativa en la emulsión del ácido linoleico y la cantidad de este último, o sea la que “sobrevive” después de la oxidación inducida, se determinaron en la forma de sus derivados, hidrázono y éster metílico, por las técnicas GC-ECD y GC-FID, respectivamente.

Para la cuantificación de compuestos carbonílicos no se emplean detectores cromatográficos convencionales como el FID, porque se obtiene respuesta poco sensible; además, la inestabilidad térmica, la alta volatilidad y la solubilidad parcial

en agua de las moléculas carbonílicas hacen difícil su análisis por GC. Por ello, se emplea una metodología basada en la derivación del hexanal con pentaflúorfenilhidracina (PFPH), obteniendo un derivado térmicamente estable y de volatilidad y polaridad más bajas. Además, al aumentar la “especificidad” de la molécula, introduciendo en ella los cinco átomos de flúor, se incrementa notoriamente la respuesta del detector selectivo, *i.e.* ECD [90-92]. En la **Figura 36**, se muestra la reacción de derivación de un aldehído con la PFPH, obteniéndose una mezcla de las hidrazonas isoméricas *sin* (Z-) y *anti* (E-). Esta metodología fue previamente estandarizada por Stashenko *et al.* [71, 90-92].

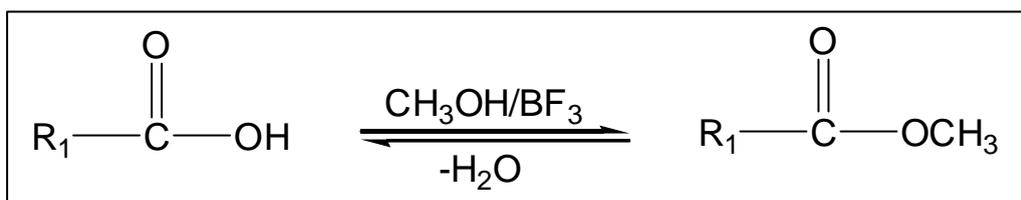
Figura 36. Derivación de aldehídos con pentaflúorfenilhidracina (PFPH).



Por otra parte, la cantidad del ácido linoleico que “sobrevive” el ataque del oxígeno, indica también cuánto avanzó la oxidación en el sistema lipídico. El ácido graso se determinó por HRGC-FID, en forma de su éster metílico; la obtención de este derivado se realiza por medio de reacciones de esterificación o transesterificación, catalizadas por ácidos o bases [93, 94]. En esta investigación,

como se mencionó anteriormente, la derivación del ácido linoleico se llevó a cabo utilizando BF_3 al 20% en metanol, así como se describió en el **Numeral 1.3.3**. En este caso, la esterificación del ácido linoleico fue catalizada por un ácido de Lewis. En la **Figura 37** se indica el esquema de la reacción.

Figura 37. Esterificación de lípidos catalizada por un ácido de Lewis.



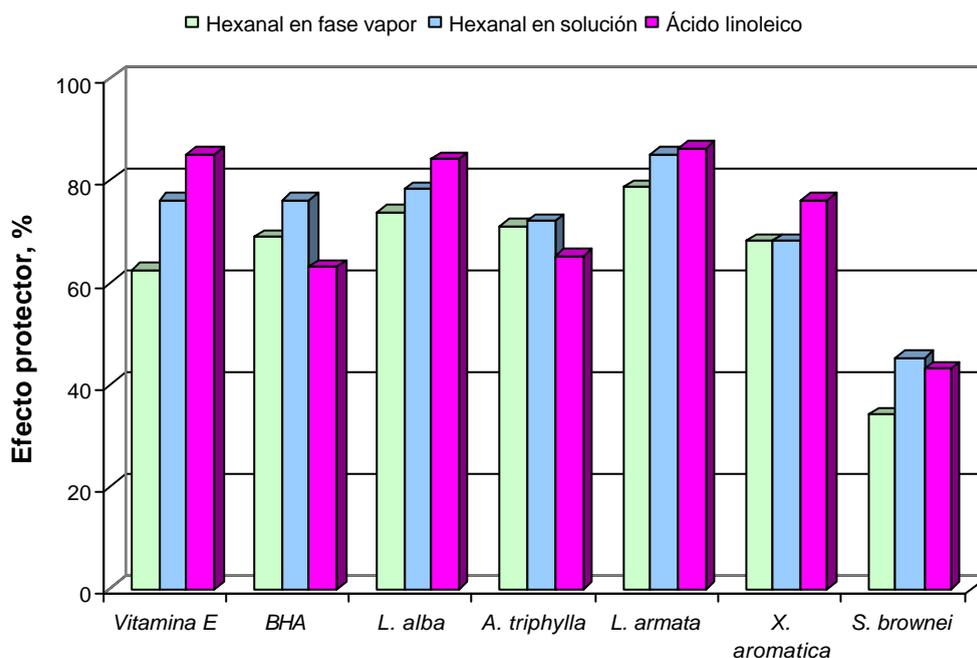
En la **Tabla 19**, se reportan las mediciones del hexanal en las fases vapor y condensada (líquida) de la emulsión del ácido linoleico (se determinó la disminución relativa de éste, con respecto a un blanco); el hexanal fue determinado en la fase vapor usando la fibra SPME (PDMS/DVB, 65 μm), previamente saturada con PFPH y realizando la extracción-derivación directa del hexanal sobre la fibra; en la fase condensada de la emulsión el hexanal se midió después de su derivación con PFPH en solución, seguida de la extracción líquido-líquido de la hidrazona, $\text{C}_6\text{-PFPH}$, con hexano; además, se reporta en la **Tabla 19** el porcentaje del ácido remanente sin oxidar (ver **Numerales 1.3.1-1.3.3** de la *Parte Experimental*).

Tabla 19. Efecto protector de los aceites esenciales de *L. alba*, *A. triphylla*, *L. armata*, *X. aromatica* y *S. brownei*, la vitamina E y el BHA, contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe²⁺ en la presencia de O₂.

| Antioxidante, g/L | Efecto protector, % | | | | | | |
|--|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|-------------------|------------|----------|
| | <i>L. alba</i> | <i>A. triphylla</i> | <i>L. armata</i> | <i>X. aromatica</i> | <i>S. brownei</i> | Vitamina E | BHA |
| % de la disminución del hexanal en la fase vapor de la emulsión | | | | | | | |
| 1.0 | 19±2 | 27±2 | 16±2 | 35±5 | 27.5±0.1 | 34.0±0.5 | 39±6 |
| 2.5 | 65±1 | 39.3±0.2 | 49.7±0.7 | 48±2 | 33±3 | 46.0±0.5 | 56±2 |
| 5. | 71±1 | 59±4 | 72±1 | 60.8±0.9 | 42±4 | 57.0±0.6 | 51±2 |
| 10 | 73.6±0.5 | 71±4 | 78.4±0.5 | 68±1 | 34±1 | 62.4±0.8 | 69±2 |
| 20 | 72.6±0.9 | 74.7±0.2 | 76±3 | 70±1 | 33.7±0.2 | 61±3 | — |
| % de la disminución del hexanal en la emulsión | | | | | | | |
| 1.0 | 27±2 | 10±2 | 28±2 | 37.4±0.9 | 14±5 | 36.1±0.1 | 72±1 |
| 2.5 | 44.9±0.4 | 48±4 | 69±4 | 54±2 | 30.8±5 | 56±0.5 | 73±3 |
| 5. | 72±1 | 65±3 | 71±2 | 68.6±0.7 | 35±4 | 64.4±0.4 | 75.1±0.8 |
| 10 | 78±0.2 | 72±2 | 85±2 | 68±2 | 45±5 | 75.9±0.9 | 76±1 |
| 20 | 78.5±0.6 | 70±4 | 87±4 | 72±3 | 46±1 | 75.5±0.9 | — |
| % del ácido linoleico remanente sin oxidar | | | | | | | |
| 1.0 | 32±2 | 50±1 | 45.9±0.1 | 56±2 | 50.1±0.7 | 23±2 | 36.7±0.9 |
| 2.5 | 69±5 | 59±4 | 66.7±0.7 | 69±3 | 53±3 | 42.2±0.8 | 38.6±2 |
| 5. | 72±5 | 63.7±0.3 | 71±1 | 75±0.8 | 49±1 | 55±2 | 55.3±0.7 |
| 10 | 84±3 | 65±5 | 86±2 | 76±1 | 43±4 | 85±3 | 63±3 |
| 20 | 85±5 | 73±1 | 89±4 | 87±0.9 | 31±2 | 72±2 | — |

El efecto protector de las esencias se incrementa con el aumento de su concentración en el sistema, alcanzando valores altos a las concentraciones de 10 ó 20 g/L. Los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla* y *X. aromatica* mostraron efectos protectores a la misma concentración, *i.e.* 10 g/L, igual o mayor que los de la vitamina E y del BHA, siendo el aceite de *L. armata* el más “activo” de todos, seguido de *L. alba*, mientras que el de *S. brownei* fue el que presentó menor actividad antioxidante, tal como se puede apreciar en la **Figura 38**.

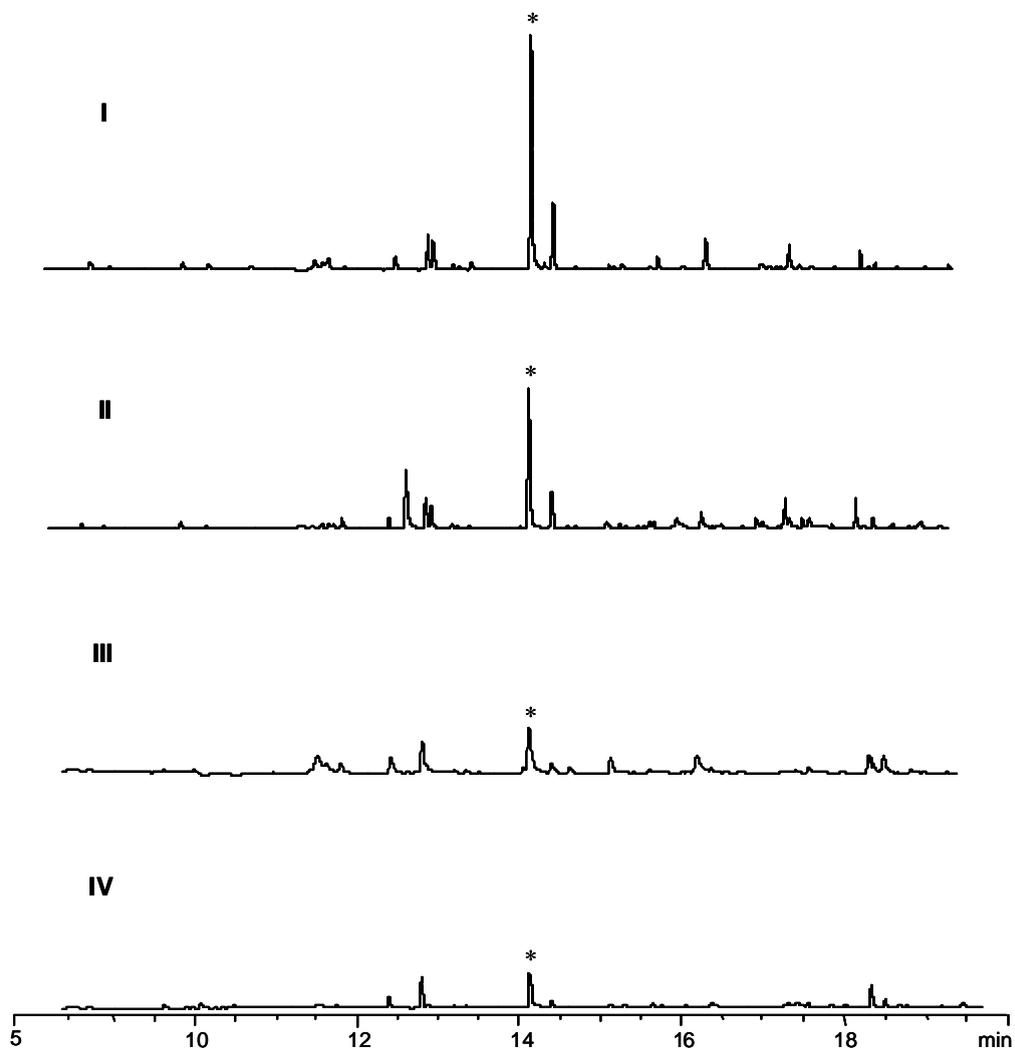
Figura 38. Efecto protector de los aceites esenciales de *L. alba*, *A. triphylla*, *L. armata*, *X. aromatica*, *S. brownei*, vitamina E y BHA (10 g/kg), contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe^{2+} en presencia de O_2 .



En la **Figura 39**, aparecen perfiles cromatográficos del hexanal (en forma de su hidrazona), generado durante la peroxidación lipídica del ácido linoleico sin adicionar sustancias antioxidantes (I) y con antioxidantes (BHA, vitamina E y aceite esencial de *L. armata*) (II-IV). La adición de sustancias antioxidantes al

sistema lipídico, lo “protege” contra el deterioro oxidativo, disminuyendo también la generación del hexanal.

Figura 39. Perfiles cromatográficos del hexanal [*] (medido como su derivado C₆-PFPH) en diferentes sistemas sometidos a oxidación: I. Ácido linoleico (Blanco); II. Ácido linoleico + BHA (10 g/L); III. Ácido linoleico + Aceite esencial de *L. armata* (10 g/L); IV. Ácido linoleico + Vitamina E (10 g/L). Columna HP-5 (30 m). ECD.

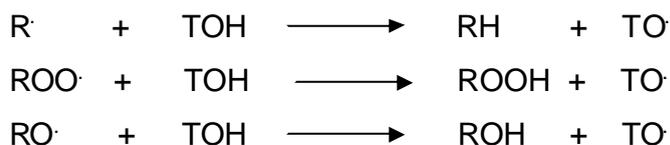
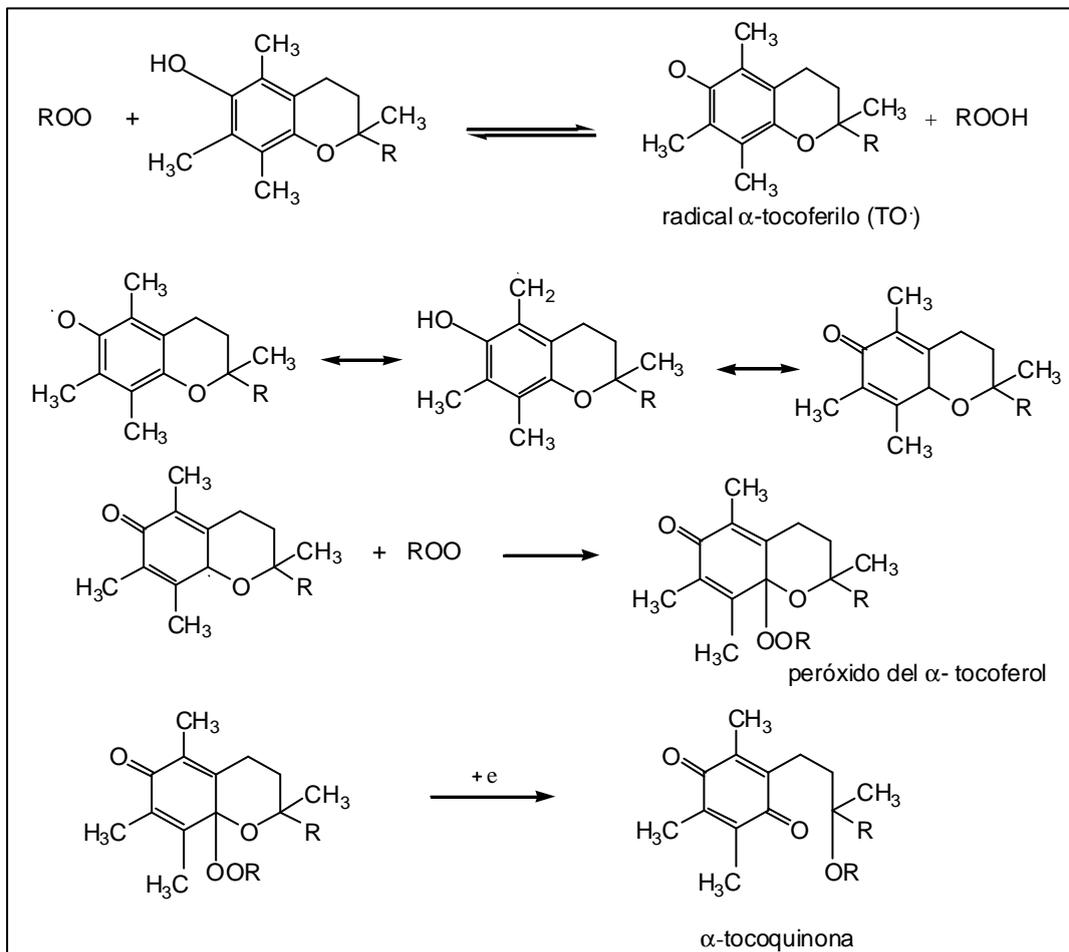


Los resultados obtenidos en este trabajo están en concordancia con los reportados por Ruberto y Baratta [95]. Los investigadores mostraron que compuestos fenólicos, como el timol (23-91.7%), carvacrol (30.7-89.9%) y eugenol (39.1-93.6%), presentaron actividad antioxidante alta y que sólo algunos monoterpenos poseían una significativa acción protectora en los sistemas lipídicos usados (yema de huevo y ácido linoleico); principalmente, el α -terpineno (31.8-71.5%), γ -terpineno (61.6-79.5%), terpinoleno (40.3-64.6%) y, en menor grado, el sabineno (43.0-59.9%), en concentraciones comprendidas entre 100 y 1000 ppm. Los demás compuestos presentaron poca o ninguna actividad antioxidante.

Se le atribuye la actividad antioxidante de los aceites esenciales generalmente al contenido de compuestos fenólicos [78-85], e.g. Teissedre *et al.* utilizaron 23 aceites esenciales de diferentes especies para inhibir la oxidación en lipoproteínas humanas de baja densidad; su estudio mostró que cuando el eugenol era el compuesto mayoritario, la inhibición de la oxidación de la LDL estuvo entre 68% (aceite esencial de clavo) y 100% (aceite esencial de laurel de *St Thomas*) [85].

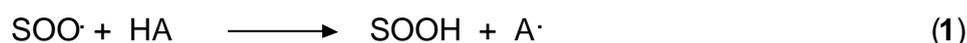
La mayoría de los antioxidantes primarios y secundarios contienen grupos fenólicos, un ejemplo de ellos es el α -tocoferol (TOH). En la **Figura 40** se muestran las posibles reacciones que ocurren entre el TOH y los radicales formados durante el proceso oxidativo. En todas estas reacciones el α -tocoferol cede el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo a los radicales alquilo, peroxilo y/o alcóxido de un ácido graso oxidado, produciendo especies no radicalarias estables (RH, ROOH, ROH) y el radical llamado tocoferoxilo (TO \cdot). Este último se estabiliza por la deslocalización del electrón en el anillo aromático, pero además puede reaccionar con radicales o moléculas neutras de tocoferol dando origen a tocoquinonas (TO) y/o compuestos diméricos (TO-OT) [65, 96].

Figura 40. Reacciones del α -tocoferol (TOH) con radicales alquílicos [65].



Pero existen muchos aceites esenciales, que no contienen compuestos fenólicos, por lo menos en concentraciones significativas, y que han presentado también una apreciable actividad antioxidante [79-84], como es el caso de los aceites estudiados en el presente trabajo.

La acción protectora de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei* se puede explicar con base en la naturaleza química de los componentes presentes en éstos. Como ya se mencionó, generalmente, la protección de un sustrato contra el deterioro oxidativo, se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos. Sin embargo, teniendo en cuenta que en este caso, fenoles como el eugenol y el timol se encuentran en cantidades muy bajas, y que los compuestos mayoritarios son hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos; se puede suponer que éstos también pueden actuar como “antioxidantes”, aunque por mecanismos distintos a los que operan los compuestos fenólicos. Ésto concuerda con la literatura, donde se reportan dos tipos de hidrocarburos antioxidantes (HA's) [97]. A los del **Tipo I** pertenecen compuestos como los carotenos (polienos), que terminan la propagación de la cadena de lipoxidación, al reaccionar rápidamente con los radicales peroxilo del sustrato (SOO·), que en este caso, serían los radicales peroxilo del ácido linoleico; a su vez, se obtienen los radicales del antioxidante (A·), que son estabilizados por resonancia. Los HA's **Tipo I**, únicamente son activos a concentraciones bajas de oxígeno (Véase a continuación, Reacciones 1-3):



Los HA's del **Tipo II**, como el γ -terpineno, α -terpineno y terpinoleno, también reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo del sustrato, reduciendo, de esta forma, la posibilidad de la propagación de la cadena de lipoxidación por abstracción de un átomo de hidrógeno del sustrato lipídico. Además, pueden

actuar como antioxidantes aún a altas concentraciones de oxígeno. Este tipo de sustancias disminuyen la velocidad de propagación de la lipoxidación al reaccionar con los radicales peroxilo del sustrato [97].

En resumen, la actividad antioxidante de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei*, se debe a que los terpenos presentes en ellos, se oxidan más rápidamente que el ácido linoleico, o sea “se sacrifican” primero, de esta manera “protegiendo” el sustrato lipídico.

2.3.2. Determinación *in vitro* de la capacidad de atrapamiento de radicales de los aceites esenciales, usando el catión-radical ABTS⁺ y el radical DPPH.

Estos métodos han sido utilizados para evaluar la capacidad de aceites esenciales, frutas y sustratos biológicos de eliminar o disminuir la cantidad de radicales y/o sustancias reactivas del oxígeno en un sistema modelo sometido a la oxidación [98-109]. Usando los dos métodos, el del catión-radical 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) y del radical α,α -difeníl- β -picrilhidracilo (DPPH), se evaluó el efecto protector (capacidad de atrapar radicales) *in vitro* de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla*, *X. aromatica*, *S. brownei* y algunas de las fracciones de éstos, obtenidas por cromatografía en contracorriente. La capacidad de “secuestrar” radicales de los aceites se comparó con la de los antioxidantes de referencia, *i.e.* la vitamina E, BHA y el ácido ascórbico.

2.3.2.1. Ensayo de descoloramiento del catión-radical ABTS⁺. Este ensayo mide la capacidad que tienen los compuestos de los aceites esenciales de transferir electrón(es) al catión-radical [57, 84].

En la **Tabla 20**, se observan los valores obtenidos de la capacidad equivalente al Trolox (TEAC), actividad antioxidante total (TAA) y la concentración efectiva media

(EC₅₀), para sustancias antioxidantes de referencia, tales como la vitamina E, BHA, BHT y el ácido ascórbico. Los TEAC correspondientes a la vitamina E y el ácido ascórbico fueron similares a los reportados por Re *et al.* (0.99 y 0.97, respectivamente) [110].

Tabla 20. Capacidad de atrapar radicales del ácido ascórbico, BHA, BHT, vitamina E, sustancias patrón de terpenos y de los aceites esenciales, medida por los métodos de descoloramiento del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH:

| Sustancia | TEAC* (mM Trolox/mM sustancia) | TAA* (mmol Trolox/kg sustancia) | EC ₅₀ * (mmol sustancia/mmol DPPH) |
|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---|
| BHA | 1.05±0.02 | 6194±8 | 0.23±0.02 |
| BHT | 0.50±0.07 | 2030±3 | 0.30±0.05 |
| Ácido ascórbico (vitamina C) | 1.20±0.18 | 6294±9 | 0.26±0.01 |
| Vitamina E (α-tocoferol) | 1.15±0.10 | 5990±8 | 0.23±0.05 |
| <i>Aloysia triphylla</i> | - | 6.9±0.1 | 45±5** |
| <i>Lantana armata</i> | - | 5.3±0.1 | 100±8** |
| <i>Lippia alba</i> | - | 2.3±0.3 | 280±7** |
| <i>Xylopiá aromática</i> | - | 4.6±0.2 | 110±4** |
| <i>Satureja brownei</i> | - | 0.6±0.1 | 330±10** |
| Eugenol | 1.07±0.11 | 5700±10 | 3.5±0.1 |
| (+)-Alcohol perílico | 0.027±0.003 | 18±2 | - |
| Óxido de limoneno | 0.020±0.002 | 14.8±0.3 | - |
| β-Pineno | 0.020±0.002 | 14±2 | - |
| α-Terpineno | 0.022±0.062 | 16±2 | - |
| γ-Terpineno | 0.038±0.001 | 27.9±0.3 | - |
| α-Terpineol | 0.019±0.001 | 12.1±0.8 | - |
| Terpinen-4-ol | 0.021±0.001 | 13.9±0.7 | - |
| (R)-Carvona | 0.037±0.003 | 13±3 | - |
| 1,8-Cineol | 0.020±0.002 | 15.60±0.07 | - |
| p-Menten-1-ol | 0.020±0.002 | 13.5±0.4 | - |
| Linalool | 0.031±0.002 | 19.6±0.7 | - |
| Citral (mezcla de isómeros) | 0.025±0.003 | 16±2 | - |

Continuación de la **Tabla 20**.

| | | | |
|-----------------------------|-------------|------------|---|
| Citronelal | 0.020±0.002 | 14±1 | - |
| Dihidrocarveol | 0.020±0.002 | 13.6±0.7 | - |
| Dihidrocarvona | 0.020±0.002 | 14.49±0.05 | - |
| Geraniol | 0.026±0.002 | 13.3±0.2 | - |
| Limoneno | 0.020±0.001 | 14.2±0.7 | - |
| Mirtenol | 0.021±0.001 | 13.5±0.4 | - |
| Nerol | 0.13±0.01 | 24±4 | - |
| <i>trans</i> -β-Cariofileno | 0.026±0.001 | 12.8±0.5 | - |
| Farnesol | 0.028±0.002 | 12.5±0.2 | - |
| Nerolidol | 0.031±0.005 | 14±2 | - |

* Promedio de tres mediciones ± s.

** EC₅₀ (kg de sustancia/mmol de DPPH).

En la **Figura 41**, se puede observar la actividad antioxidante del Trolox, medida con el radical ABTS⁺; se aprecia que la absorbancia del radical, determinada a una longitud de onda (?) de 734 nm, disminuyó linealmente con la cantidad de Trolox usado (0.2-1.5 mM), lo que indica que este compuesto sí posee una capacidad para atrapar radicales bastante alta. La **Figura 42** muestra la capacidad que tienen los aceites esenciales de atrapar el catión-radical ABTS⁺, expresada como porcentaje de inhibición del radical.

Figura 41. Porcentaje de inhibición del catión-radical ABTS⁺, en función de la cantidad de Trolox (λ = 734 nm).

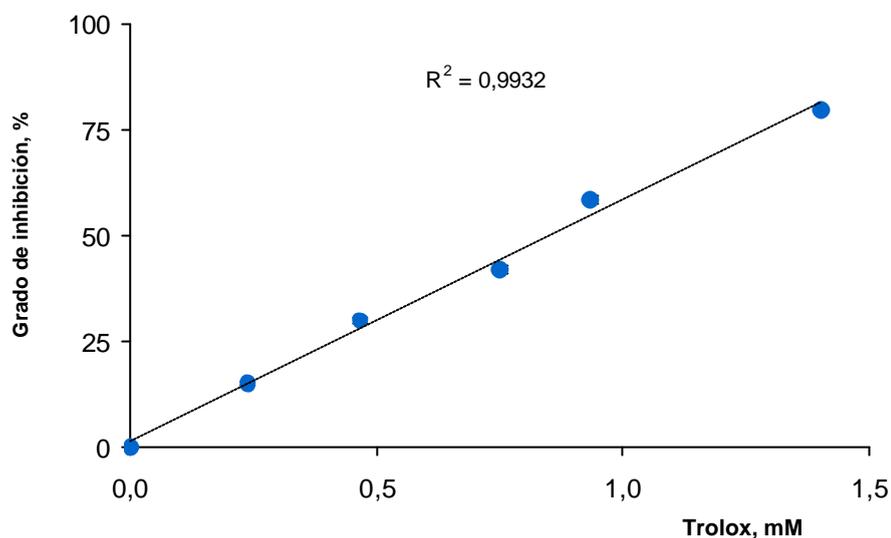
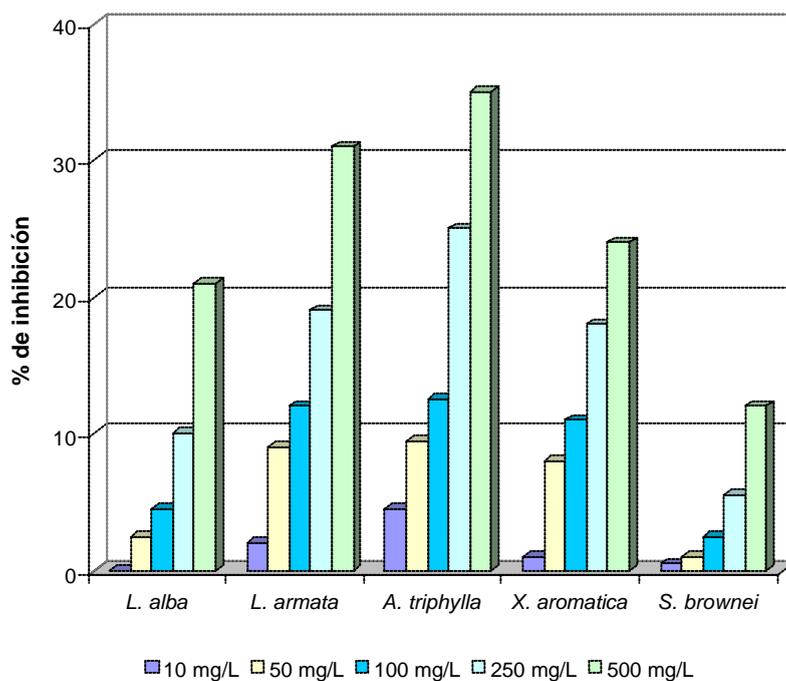


Figura 42. Capacidad de los aceites esenciales evaluados para atrapar el catión-radical ABTS⁺, en función de su concentración en la solución, medida como % de inhibición del catión-radical.



En la **Tabla 20** se indica la actividad antioxidante de los aceites esenciales, medida con base en su capacidad de atrapamiento de radicales y expresada como actividad antioxidante total (TAA). Los aceites presentaron la capacidad “secuestradora” de los radicales ABTS⁺ relativamente baja, comparada con la ejercida por antioxidantes frecuentemente usados en la industria de los alimentos, e.g. ácido ascórbico, vitamina E, BHA; entre ellos, fue más activo, según este método, el aceite de *A. triphylla*, seguido de *L. armata* y de *X. aromatica*. Para corroborar los resultados obtenidos, se determinaron los valores TEAC de 26 compuestos puros de terpenos, que se muestran también en la **Tabla 20**; sólo el eugenol, compuesto fenólico, presentó un valor TEAC comparable con el del ácido ascórbico, el BHA o la vitamina E. Ésto se debe a que el efecto protector antioxidante de los terpenos se realiza por otro mecanismo, diferente al de atrapamiento de radicales.

2.3.2.2. Método de descoloramiento del radical DPPH. La reducción del radical DPPH por una sustancia antioxidante o una especie radicalaria, se determina con base en la disminución de la absorbancia del DPPH, medida a una longitud de onda λ de 514 nm, durante el transcurso de la reacción.

En la **Figura 43** se presenta la concentración efectiva media, EC₅₀, del ácido ascórbico. Los valores de EC₅₀ obtenidos para el ácido ascórbico, vitamina E y BHA fueron de 0.26, 0.23 y 0.23, respectivamente, los cuales concuerdan con los reportados por Brand-Williams *et al.* [111]. La **Figura 44** muestra el posible mecanismo de atrapamiento del radical DPPH por el ácido ascórbico, se aprecia cómo el ácido ascórbico reduce dos moléculas del radical. De acuerdo con ésto, la velocidad de la reacción entre los compuestos antioxidantes y el radical DPPH generalmente, depende del número de átomos de hidrógeno disponibles para reaccionar con el radical [111].

Figura 43. Concentración efectiva media, EC_{50} , del ácido ascórbico, medida en función de la disminución de la cantidad del radical DPPH.

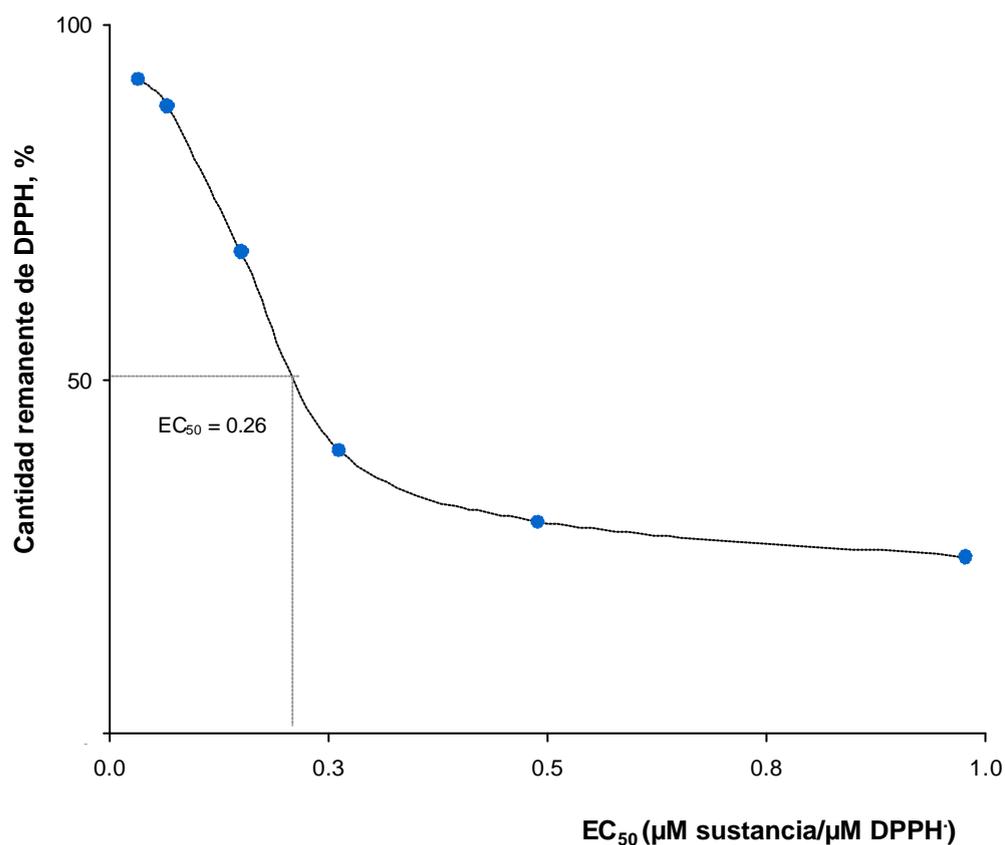
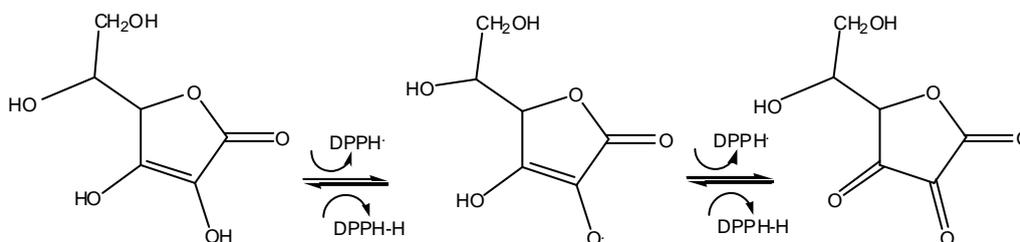
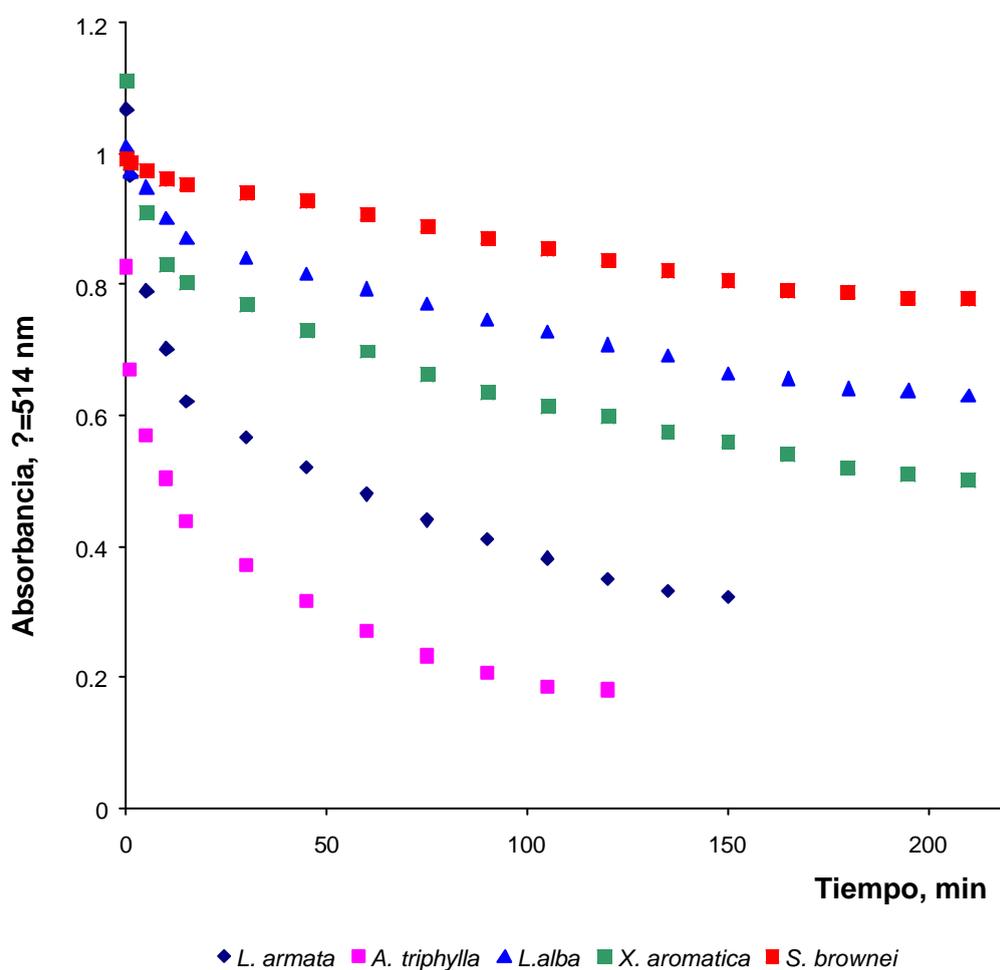


Figura 44. Posible mecanismo de reacción del ácido ascórbico con el radical DPPH· [111].



La **Figura 45** muestra el estado *estacionario*, cuando la absorbancia de la solución de DPPH· medida a través del tiempo, no cambia o es menor del 10%; que fue determinado para los aceites esenciales a una concentración de 500 mg/mL, durante la reacción con el DPPH·.

Figura 45. Determinación del estado estacionario de la reacción de los aceites esenciales con el DPPH·.



Para los aceites esenciales de *A. triphylla* y *L. armata*, la reacción transcurrió rápidamente durante los primeros 30 minutos, pero para los aceites esenciales de *L. alba*, *X. aromatica* y *S. brownei*, la velocidad de la reacción entre los compuestos de estos aceites y el DPPH fue lenta desde el inicio, tardándose más tiempo en alcanzar el estado estacionario, con respecto a *A. triphylla* y *L. armata*. El estado estacionario se escogió cuando la disminución en la absorbancia fue menor del 10%. Los aceites esenciales evaluados presentaron actividad de atrapamiento de radicales DPPH[•] baja, comparada con la de sustancias antioxidantes de referencia, tales como el ácido ascórbico, el BHA y la vitamina E, pero entre ellos, fue más activo, según este método, el aceite de *A. triphylla*, seguido de *L. armata* y *X. aromatica*. Con ello, se confirma, nuevamente, que el mecanismo antioxidante de estos aceites no es vía atrapamiento directo de radicales.

Para confirmar que los componentes de los aceites esenciales estudiados no son muy efectivos para atrapar radicales, se determinaron los EC₅₀ de los terpenos listados en la **Tabla 20**. Sólo el eugenol, compuesto fenólico, exhibió una actividad atrapadora de radicales, comparable con los EC₅₀ del BHA y del ácido ascórbico; los hidrocarburos terpénicos, así como se esperaba, no la demostraron, puesto que inhibieron la peroxidación por un mecanismo diferente.

Los aceites esenciales evaluados presentaron escasa actividad atrapadora del radical DPPH. En la **Tabla 20** se indican los valores de EC₅₀ para los aceites, ácido ascórbico, BHA, BHT, vitamina E y el eugenol. Para otros terpenos patrón, listados en la tabla, no fue posible determinar los EC₅₀ para las concentraciones ensayadas (100-10000 ppm), debido a la muy baja capacidad para atrapar los radicales.

Se determinó también la capacidad de atrapar radicales de las fracciones de los aceites esenciales, separadas por cromatografía en contracorriente. En la **Tabla 16** de la Sección **2.1.6**, aparece la composición química de cada una de las fracciones. En la **Tabla 21** se reportan aquellas fracciones de *A. triphylla*, *L. armata*, *L. alba* y *X. aromatica*, que mostraron una capacidad de inhibición del catión-radical ABTS⁺ mayor del 10%.

Tabla 21. Capacidad de atrapar radicales de algunas fracciones de los aceites esenciales obtenidas por CCC, medida por los métodos de descoloramiento de los radicales ABTS⁺ y DPPH[·].

| Aceite esencial | Fracción | Inhibición del catión-radical ABTS ⁺ , % | EC ₅₀ (kg sustancia/mmol DPPH [·]) |
|---------------------|-----------|---|---|
| <i>A. triphylla</i> | <u>4</u> | 16.9±0.5 | 250±15 |
| | <u>5</u> | 10.5±0.3 | 320±9 |
| | <u>6</u> | 30.9±0.5 | 95±10 |
| <i>L. armata</i> | <u>1</u> | 18.9±0.4 | 180±7 |
| | <u>2</u> | 16.8±0.6 | 230±10 |
| | <u>3</u> | 28.0±0.3 | 120±12 |
| | <u>5</u> | 22.0±0.7 | 180±10 |
| | <u>8</u> | 35.0±0.9 | 85±8 |
| | <u>14</u> | 10.9±0.2 | 280±10 |
| <i>L. alba</i> | <u>1</u> | 18.2±0.82 | 200±7 |
| <i>X. aromatica</i> | <u>2</u> | 19.4±0.8 | 210±12 |
| | <u>3</u> | 28.3±0.9 | 150±5 |

Al igual que los aceites esenciales, sus fracciones presentaron una capacidad baja para atrapar el catión-radical ABTS⁺ y el radical DPPH[·]. Sólo las fracciones 6 del aceite esencial de *A. triphylla* y la 8 de *L. armata* presentaron moderada actividad de atrapamiento de radicales (ver **Tabla 21**). La fracción 6 del AE de *A. triphylla*

estuvo constituida principalmente por *ar*-curcumeno, cedranona, propanoato de nerilo, cadinol; la fracción 8 del AE de *L. armata* por α -humuleno, δ -cadineno, γ -bisaboleno (ver **Tabla 16**).

El uso de dos técnicas analíticas de medición para la determinación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei* (inhibición de la peroxidación lipídica del ácido linoleico en emulsión y la capacidad de atrapamiento de radicales) se realizó con el objeto de comparar los valores de actividad antioxidante obtenidos, ya que estos métodos se basan en principios fisicoquímicos diferentes, por lo que la magnitud de la actividad antioxidante medida varía, como muestran los resultados obtenidos en este trabajo.

Los aceites esenciales de *L. armata*, *L. alba*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei* presentaron efecto protector alto contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, en orden descendente. El de menor actividad fue el aceite esencial de *S. brownei*. Mientras que por el método de atrapamiento de radicales estos aceites y sus fracciones mostraron una capacidad muy baja de “secuestrar” el catión-radical ABTS⁺ y el radical DPPH; comparados con la actividad ejercida por antioxidantes frecuentemente usados en la industria de los alimentos (vitamina E, BHA y/o ácido ascórbico y BHT), pero entre ellos los más activos en orden descendente fueron el de *A. triphylla*, *L. armata*, *X. aromatica*, *L. alba* y *S. brownei*. Usando diferentes técnicas de medición del efecto antioxidante, se puede concluir, que los aceites esenciales de *A. triphylla* y *L. armata*, dos plantas de la familia *Verbenaceae*, fueron más activos en cuanto a su efecto protector antioxidante.

2.4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE SUSTANCIAS SINTÉTICAS NITROGENADAS

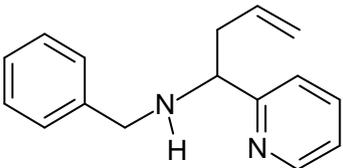
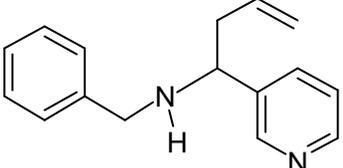
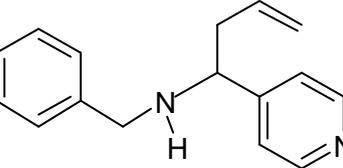
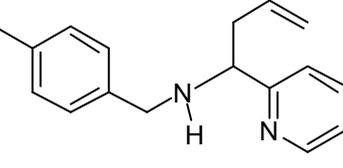
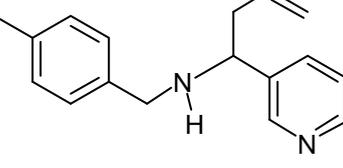
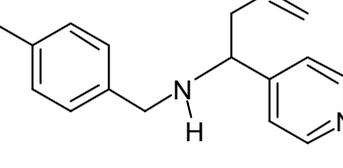
En este trabajo también se evaluó la capacidad antioxidante de algunos compuestos sintéticos derivados de las tetrahydroquinolinas, bencilaminas, benzazepinas y nitronas, los cuales han demostrado algún tipo de bioactividad (antiviral, analgésica, antibacteriana, antiarrítmica, antihipertensiva, antiscóptica, antidepresiva, antioxidante, etc.) [112-118]. A nivel industrial, estos compuestos podrían ser útiles como antioxidantes, puesto que muchos materiales plásticos, aceites lubricantes, polímeros, pinturas e hidrocarburos, entre otros, son degradados por el oxígeno presente en el aire y requieren de la adición de antioxidantes en su proceso de manufactura.

2.4.1 Efecto protector de las sustancias nitrogenadas sintéticas contra la oxidación del ácido linoleico inducida por iones Fe^{2+} en la presencia de O_2 .

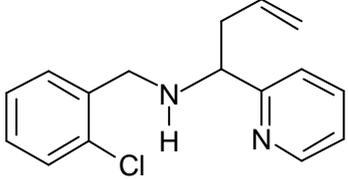
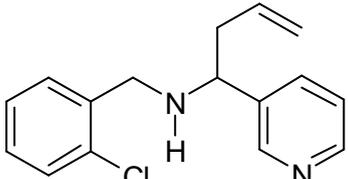
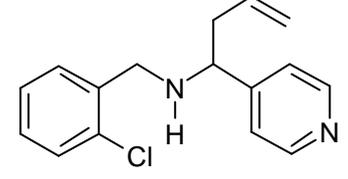
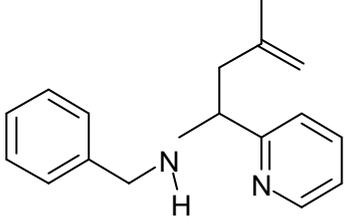
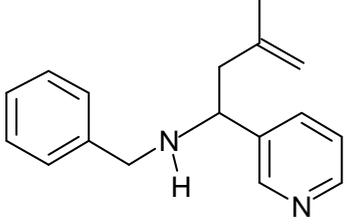
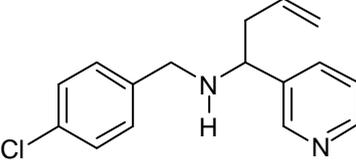
La actividad antioxidante de los compuestos sintéticos nitrogenados se determinó por la técnica HS-SPME, siguiendo la metodología usada para los aceites esenciales, como se describió en los **Numerales 1.3.1** y **1.3.2** de la *Parte Experimental*. Las estructuras químicas de los 70 derivados nitrogenados sintéticos aparecen en la **Tabla 1**. El efecto protector se evaluó en los siguientes grupos de derivados nitrogenados sintéticos: bencilaminas (1-27), benzazepinas (28-34), tetrahydroquinolinas (35-46), nitronas (57-70) y otros análogos nitrogenados (47-56). Estas sustancias fueron obtenidas en el Laboratorio de Síntesis Orgánica Fina de la Universidad Industrial de Santander, liderado por los profesores Vladimir Kouznetsov y Alirio Palma.

El efecto protector de los derivados de las bencilaminas, medido por el método de la inhibición de la oxidación del ácido linoleico en emulsión, se muestra en la **Tabla 22**. En esta tabla se presentan también las estructuras de las respectivas bencilaminas.

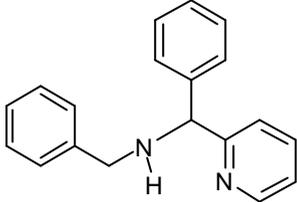
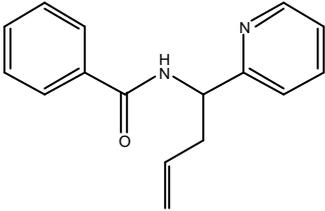
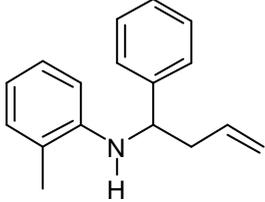
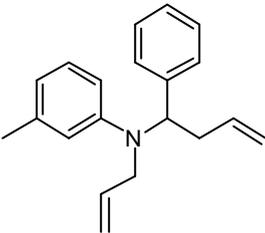
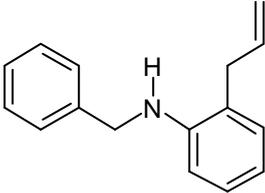
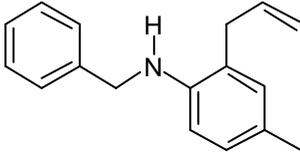
Tabla 22. Efecto protector *in vitro* de los derivados 1-27 de las bencilaminas, contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe²⁺ en presencia de O₂.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|----|---|-------------------|---------------------|
| 1 |  | 21.0 | 51±1 |
| | | 31.5 | 50.0±0.6 |
| | | 42.0 | 51.7±0.8 |
| 2 |  | 21.0 | 37.0±0.5 |
| | | 31.8 | 66.0±0.1 |
| | | 42.0 | 89.4±0.5 |
| 3 |  | 21.0 | 38.0±0.1 |
| | | 31.8 | 36.7±0.9 |
| | | 42.0 | 36±1 |
| 4 |  | 4.0 | 66.8±0.4 |
| | | 19.8 | 53±4 |
| | | 39.7 | 22±3 |
| 5 |  | 4.0 | 70.9±0.1 |
| | | 19.8 | 75.5±0.9 |
| | | 39.6 | 87.9±0.6 |
| 6 |  | 4.0 | 43.0±0.1 |
| | | 19.8 | 53±6 |
| | | 39.6 | 81±3 |

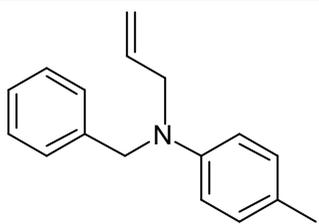
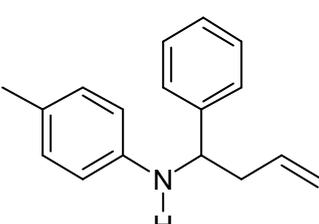
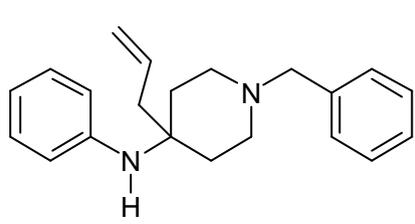
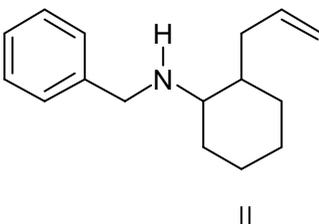
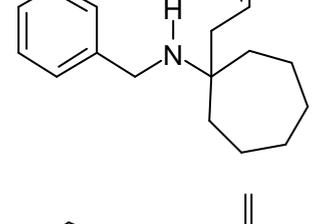
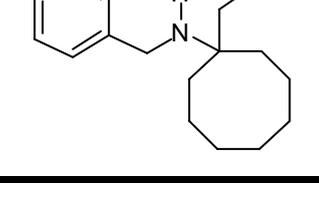
Continuación de la **Tabla 22**.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|----|---|-------------------|---------------------|
| 7 |  | 18.3 | 79.3±0.5 |
| | | 27.5 | 83.4±0.3 |
| | | 36.7 | 92.0±0.1 |
| 8 |  | 18.3 | 39.3±0.1 |
| | | 27.5 | 39.3±0.9 |
| | | 36.7 | 39.9±0.7 |
| 9 |  | 18.3 | 45.5±0.3 |
| | | 27.5 | 61.8±0.4 |
| | | 36.7 | 48.7±0.5 |
| 10 |  | 4.0 | 76±5 |
| | | 19.8 | 86±2 |
| | | 39.6 | 85.1±0.6 |
| 11 |  | 4.0 | 19±8 |
| | | 19.8 | 82±3 |
| | | 39.6 | 91±1 |
| 12 |  | 3.7 | 49.0±0.4 |
| | | 18.4 | 64±1 |
| | | 36.8 | 74.5±0.9 |

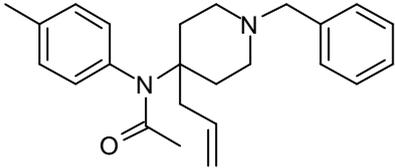
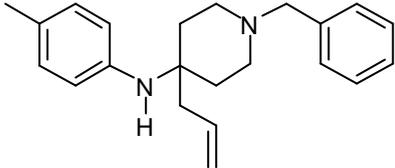
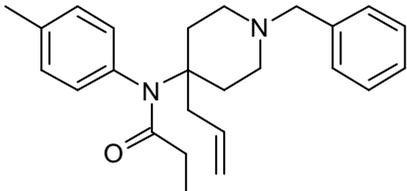
Continuación de la **Tabla 22**.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|----|---|-------------------|---------------------|
| 13 |  | 3.6 | 40±9 |
| | | 18.2 | 89.9±0.9 |
| | | 36.4 | 51±3 |
| 14 |  | 4.0 | 66.8±0.4 |
| | | 19.8 | 53±4 |
| | | 39.6 | 22±3 |
| 15 |  | 4.2 | 16±5 |
| | | 21.1 | 6±2 |
| | | 42.2 | -24±6 |
| 16 |  | 3.6 | 41±1 |
| | | 18.0 | 38±3 |
| | | 36.0 | 44±4 |
| 17 |  | 22.5 | 72.8±0.1 |
| | | 33.7 | 86.9±0.1 |
| | | 45.0 | 85.9±0.1 |
| 18 |  | 4.2 | 42±3 |
| | | 21.1 | 79±0.2 |
| | | 42.1 | 84.7±0.5 |

Continuación de la **Tabla 22**.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|-----------|---|-------------------|---------------------|
| <u>19</u> |  | 4.2 | 29±3 |
| | | 21.1 | 62.9±0.5 |
| | | 42.1 | 15±3 |
| <u>20</u> |  | 4.21 | 12±2 |
| | | 21.1 | 45.3±0.7 |
| | | 42.1 | 21±1 |
| <u>21</u> |  | 16.3 | 0.21±0.02 |
| | | 24.6 | 25±1 |
| | | 32.8 | 0.6±0.5 |
| <u>22</u> |  | 21.9 | 65.1±0.6 |
| | | 32.8 | 58.4±0.6 |
| | | 43.8 | 52.3±0.4 |
| <u>23</u> |  | 4.1 | 59±3 |
| | | 20.6 | 66±3 |
| | | 41.1 | 64.8±0.8 |
| <u>24</u> |  | 3.9 | 5.4±0.1 |
| | | 19.4 | 29±5 |
| | | 38.8 | 19±4 |

Continuación de la **Tabla 22**.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|----|--|-------------------|---------------------|
| 25 |  | 2.8 | 54±3 |
| | | 13.8 | 56±2 |
| | | 27.6 | 58±3 |
| 26 |  | 3.1 | 35±4 |
| | | 15.6 | 46±2 |
| | | 31.2 | 61±6 |
| 27 |  | 2.7 | 53±1 |
| | | 13.3 | 67±2 |
| | | 26.6 | 13±2 |

De este grupo de compuestos, la actividad antioxidante *in vitro* más alta se observó para los compuestos 2 (89.4%, 42 mM), 5 (87.9%, 39.6 mM), 6 (80.9%, 39.6 mM), 7 (92.0%, 36.7 mM), 10 (86.0%, 19.8 mM), 11 (91.0%, 39.6 mM), 13 (89.9%, 18.2 mM), 17 (86.9%, 33.7 mM) y 18 (84.7%, 42 mM), comparada con la de sustancias antioxidantes de referencia, tales como la vitamina E y el BHA (Véase **Tabla 23**).

Varias investigaciones sugieren que las aminas actúan como antioxidantes cediendo un protón a través de una ruptura homolítica del enlace N-H al radical peroxilo formado durante la oxidación del ácido linoleico en emulsión [119-121].

Las bencilaminas evaluadas en esta investigación poseen diferentes sustituyentes, e.g. anillos piridínicos con el átomo de nitrógeno en diferentes posiciones. Los

resultados muestran que el compuesto 2 con un nitrógeno piridínico en la posición *meta*- presentó mayor capacidad protectora que sus análogos en posición *orto*- y *para*- (compuestos 1 y 3). Igualmente, cuando a estos compuestos se les introdujo un sustituyente -CH₃ en el anillo bencénico o en el grupo alilo, los derivados con el nitrógeno piridínico en posición *meta*- (compuesto 5 y 11) presentaron la capacidad protectora más alta respecto a sus análogos 4 y 6, debido al efecto inductivo del sustituyente -CH₃, ya que es donador de electrones y aumenta la densidad electrónica del anillo bencénico.

Tabla 23. Efecto protector *in vitro* de la vitamina E y el BHA contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe²⁺ en presencia de O₂.

| Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|------------|-------------------|---------------------|
| Vitamina E | 5.8 | 41.5±0.5 |
| | 11.6 | 60.2±0.8 |
| | 23.2 | 75.6±0.6 |
| BHA | 13.9 | 56±2 |
| | 27.7 | 51±2 |
| | 55.5 | 69±2 |

El efecto protector de los compuestos 7-9, que poseen un átomo de cloro en su estructura en posición *orto* y un anillo piridínico con el átomo de nitrógeno en posición *orto*- (7), *meta*- (8) y *para*- (9) fue diferente de sus análogos 1-3, el efecto protector más bajo lo presentó el isómero 8.

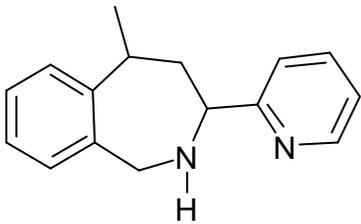
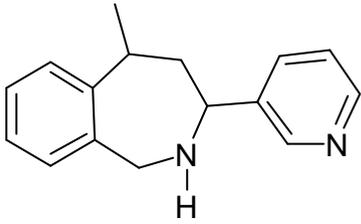
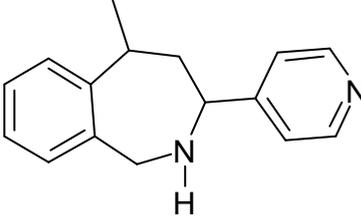
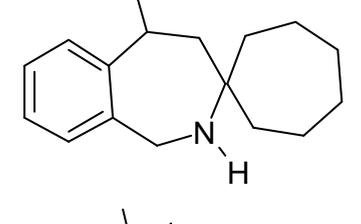
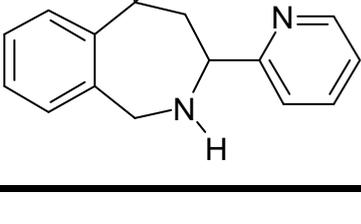
Cuando se reemplazó el anillo piridínico por otros sustituyentes, e.g. bencilo, piperidinilo, alilciclohexilo, alilcicloheptilo, alilciclooctilo (compuestos 15-27), los efectos protectores no fueron particularmente altos, a excepción de los compuestos 17 y 18, en los cuales un anillo bencílico directamente unido a la

amina, tiene un sustituyente alilo, lo cual hace que la deslocalización de la carga sea mayor y sea más fácil sustraer el hidrógeno unido al nitrógeno.

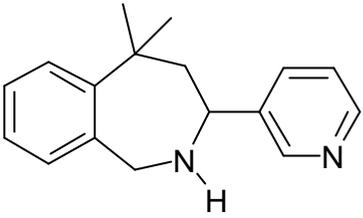
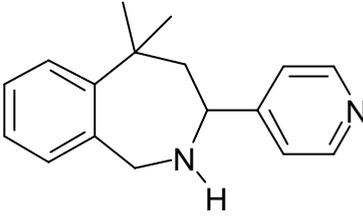
Efectos inductivos, contribuciones electrónicas y/o estéricas de los sustituyentes influyen sobre la capacidad protectora las benzilaminas estudiadas. Estudios sobre las entalpías de disociación de enlace (EDE) de aminas aromáticas han mostrado que los efectos de los sustituyentes sobre la disociación del enlace -NH se determinan por la contribución del sustituyente a la estabilidad tanto de la molécula de partida, como del radical formado. Por ejemplo, para la anilina, los grupos donores de electrones (-CH₃O, -OH, -NH₂) facilitan la donación del protón(es) a otros radicales, ya que aumentan la densidad electrónica del anillo bencénico y favorecen la formación del radical de la anilina [121].

En la **Tabla 24** se observa el efecto protector de los derivados de benzazepinas 28-34, medido por el método de la inhibición de la oxidación del ácido linoleico en emulsión. En general, las benzazepinas mostraron una actividad alta contra la oxidación de la emulsión de ácido linoleico, excepto los compuestos 29 y 30. Estructuralmente, estos derivados de benzazepinas sólo presentan diferencias en la posición del átomo de nitrógeno piridínico y la adición de un metilo al anillo de las benzazepinas 32, 33 y 34. Los compuestos que exhibieron mayor efecto protector fueron el 28 (91.5%, 44 mM) y el 33 (93.5%, 39.6 mM). En la **Tabla 24** se muestran las estructuras de las benzazepinas usadas en este trabajo.

Tabla 24. Efecto protector *in vitro* de los derivados 28-34 de las 2-benzazepinas, contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe²⁺ en presencia de O₂.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|-----------|---|-------------------|---------------------|
| <u>28</u> |  | 21.0 | 90.9±0.1 |
| | | 32.0 | 90.9±0.1 |
| | | 44.0 | 91.5±0.2 |
| <u>29</u> |  | 21.0 | -2±1 |
| | | 32.0 | 24±2 |
| | | 44.0 | 25±1 |
| <u>30</u> |  | 21.0 | 0.4±0.6 |
| | | 32.0 | 12±2 |
| | | 44.0 | -4.0±0.8 |
| <u>31</u> |  | 4.0 | 42±7 |
| | | 20.0 | 71.9±0.8 |
| | | 39.9 | 86.5±0.6 |
| <u>32</u> |  | 4.0 | 64±1 |
| | | 19.8 | 72.2±0.5 |
| | | 39.6 | 73.8±0.4 |

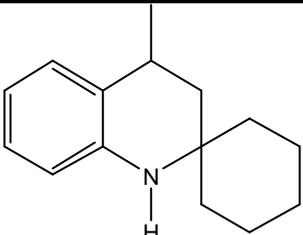
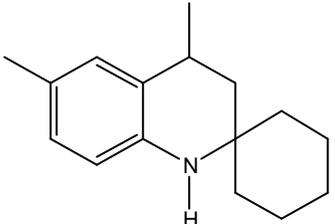
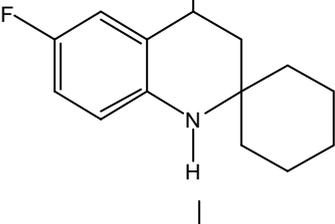
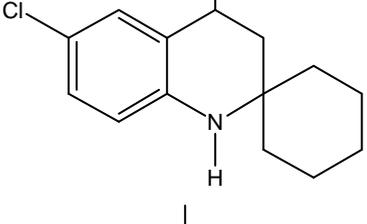
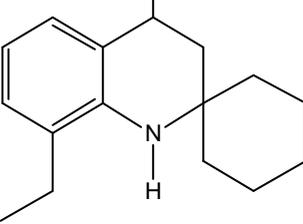
Continuación de la **Tabla 24**.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|----|---|-------------------|---------------------|
| 33 |  | 4.0 | 88.9±0.7 |
| | | 19.8 | 85±3 |
| | | 39.6 | 93.5±0.1 |
| 34 |  | 4.0 | 56.2±0.9 |
| | | 19.8 | 69±2 |
| | | 39.6 | 75±3 |

Las quinolinas y sus derivados hidrogenados, principalmente, las tetrahydroquinolinas, son objeto de intensa investigación, especialmente, en la medicina [122-129]. Se ha comprobado que algunos derivados de la tetrahydroquinolina poseen actividades antiprotozoaria, [125], antiviral [126-128], analgésica [122], antibacteriana [129], antiarrítmica y antihipertensiva potentes [124]. Otra aplicación importante de los derivados hidrogenados de la quinolina se relaciona con la propiedad antioxidante que presentan éstos. Esta actividad se incrementa, cuando los derivados de la quinolina se convierten en sus respectivos N-óxidos y/o nitronas [124].

En la **Tabla 25**, se muestran los efectos protectores antioxidantes de los compuestos derivados de la tetrahydroquinolina: en general, se presenta una baja actividad antioxidante relativamente baja, comparada con la de la vitamina E y el BHA (Véase **Tabla 23**).

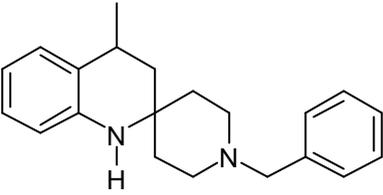
Tabla 25. Efecto protector *in vitro* de los derivados 35-46 de las tetrahidroquinolinas, contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe²⁺ en presencia de O₂.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|-----------|---|-------------------|---------------------|
| <u>35</u> |  | 23.2 | 2.1±0.7 |
| | | 34.8 | 5.9±0.2 |
| | | 46.4 | 7±1 |
| <u>36</u> |  | 21.8 | 43.9±0.2 |
| | | 32.7 | 49.6±0.1 |
| | | 43.6 | 61.6±0.6 |
| <u>37</u> |  | 21.4 | 7.9±0.6 |
| | | 32.1 | 15±2 |
| | | 42.9 | 23±2 |
| <u>38</u> |  | 20.0 | 75.4±0.3 |
| | | 30.0 | 87.2±0.3 |
| | | 40.0 | 91.8±0.1 |
| <u>39</u> |  | 20.5 | 6±2 |
| | | 30.8 | -5.7±0.5 |
| | | 41.1 | -12±3 |

Continuación de la **Tabla 25**.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|----|-----------|-------------------|---------------------|
| 40 | | 19.4 | 33±1 |
| | | 29.1 | 32±1 |
| | | 38.8 | -4.2±0.9 |
| 41 | | 24.1 | 50.5±0.2 |
| | | 36.2 | 53.6±0.3 |
| | | 48.2 | 49.8±0.1 |
| 42 | | 21.9 | 24.9±0.3 |
| | | 32.8 | 12.5±0.3 |
| | | 43.8 | -2.5±0.8 |
| 43 | | 19.5 | -31.4±0.9 |
| | | 29.2 | -28 ±2 |
| | | 25.4 | -25±0.1 |
| 44 | | 3.7 | 41±2 |
| | | 18.4 | 62±2 |
| | | 36.7 | 38±2 |
| 45 | | 2.8 | 54±2 |
| | | 13.8 | 64±2 |
| | | 27.6 | 48±1 |

Continuación de la **Tabla 25**.

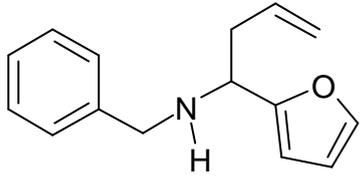
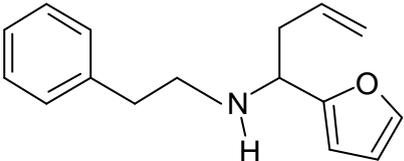
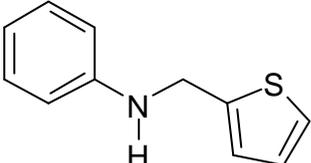
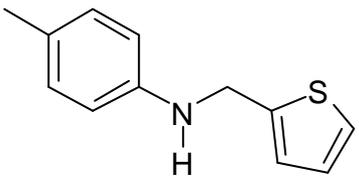
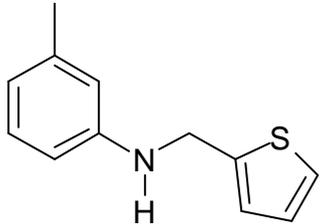
| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|----|---|-------------------|---------------------|
| 46 |  | 16.3 | 10.5±0.5 |
| | | 24.6 | -7.3±0.5 |
| | | 32.8 | -4.2±0.5 |

La tetrahydroquinolina 38 mostró el mayor efecto protector (91.8%), esta molécula posee un átomo de cloro en el anillo bencénico, que, como consecuencia del efecto inductivo del átomo electronegativo, debilita el enlace N-H. La baja actividad antioxidante exhibida por estos compuestos se debe probablemente al efecto estérico creado por un grupo espirociclohexilo, presente en las tetrahydroquinolinas 35, 36, 37, 39, 40, 42, 43. La molécula 41, que en vez de un grupo espirociclohexilo tiene una cadena alquílica, no presentó un efecto protector particularmente alto, pero su actividad fue mayor que la tetrahydroquinolina 37 de la cual sólo difiere en la cadena alquílica.

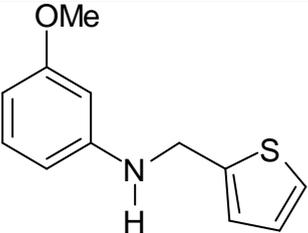
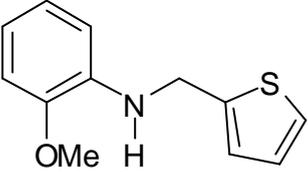
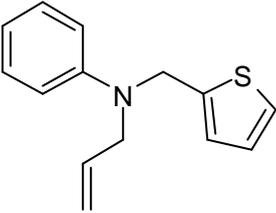
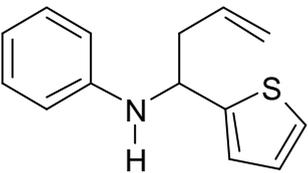
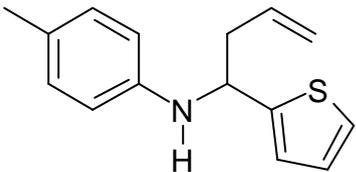
En la **Tabla 26**, se aprecia el efecto protector antioxidante de otro grupo de derivados de bencilaminas 47-56, que incluyen en su estructura grupo furano y tiofeno. Estos compuestos presentaron efectos protectores altos comparados con los antioxidantes de referencia (vitamina E y BHA; Véase **Tabla 23**). Los compuestos 50, 53 y 55 mostraron el efecto protector más alto (96.7, 95.5 y 95.5%, respectivamente). La diferencia entre estos tres compuestos y sus análogos (47-49, 51, 52, 54, 56) radicó en sus sustituyentes. Mientras que el compuesto 50 tiene un grupo metilo en posición *para*- en el anillo bencénico, el compuesto 53 presenta un grupo metoxi- en el anillo bencénico en posición *orto*- y el compuesto 55 un grupo alilo en el carbono próximo al nitrógeno amínico. Estos sustituyentes generan mayor densidad electrónica en el anillo bencénico,

facilitando así la liberación del hidrógeno de la amina [121]. En la **Tabla 26** se muestran las estructuras de estos compuestos y los efectos antioxidantes experimentalmente medidos.

Tabla 26. Efecto protector *in vitro* de los compuestos nitrogenados 47-56, contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe²⁺ en presencia de O₂.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|----|---|-------------------|---------------------|
| 47 |  | 22 | 60.8±0.6 |
| | | 33 | 62.3±0.4 |
| | | 44 | 70.3±0.4 |
| 48 |  | 4.1 | 58±2 |
| | | 20.7 | 64±2 |
| | | 41.4 | 69±1 |
| 49 |  | 5.3 | 43±2 |
| | | 26.4 | 71±2 |
| | | 52.8 | 63±2 |
| 50 |  | 4.9 | 81±1 |
| | | 24.6 | 96.6±0.7 |
| | | 49.3 | 97±1 |
| 51 |  | 4.9 | 6±2 |
| | | 24.6 | 38±2 |
| | | 49.2 | 83.8±0.7 |

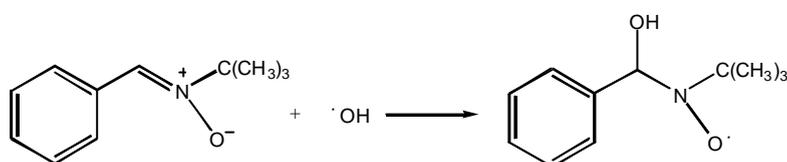
Continuación de la **Tabla 26**.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|-----------|---|-------------------|---------------------|
| <u>52</u> |  | 4.6 | 24.6±0.9 |
| | | 22.8 | 68.8±0.8 |
| | | 45.6 | 83 ±1 |
| <u>53</u> |  | 4.6 | 20±1 |
| | | 22.8 | 90±2 |
| | | 45.6 | 95.5±0.9 |
| <u>54</u> |  | 4.4 | 69±1 |
| | | 21.8 | 57±1 |
| | | 43.6 | 27.6±0.9 |
| <u>55</u> |  | 4.4 | 20±1 |
| | | 21.8 | 90±2 |
| | | 43.6 | 95.5±0.9 |
| <u>56</u> |  | 4.1 | 82.7±0.9 |
| | | 20.5 | 67.1±0.6 |
| | | 41.1 | 49±1 |

Además de las aminas, benzofuranos, tetrahydroquinolinas y ácidos ditiopropiónicos, las nitronas también han sido objeto de investigación, por su habilidad en descomponer los peróxidos en sustancias no reactivas [117-121, 124, 130-133]. Kotake y Janzen [134] evaluaron la capacidad de la α -fenil-N-terbutilnitrona (PBN) para atrapar radicales; ellos determinaron que esta nitrona

produce aductos relativamente estables de una amplia variedad de radicales. En la **Figura 46** se observa cómo el radical hidroxilo es atrapado por la α -fenil-N-terbutilnitrona. Becker y colaboradores [135] evaluaron una nitrona derivada del guaiazuleno como antioxidante bloqueador de reacciones en cadena de radicales y su efecto protector fue mayor que el de los antioxidantes BHT y el Probucol y similar al de la vitamina E.

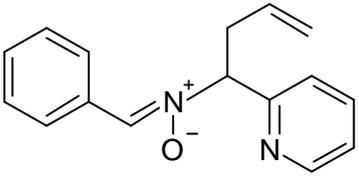
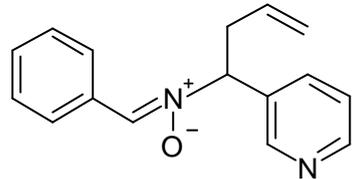
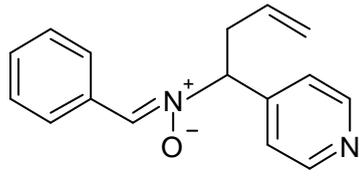
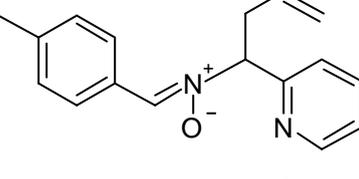
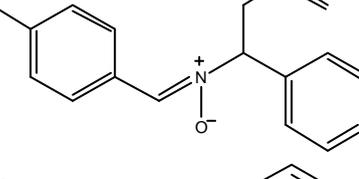
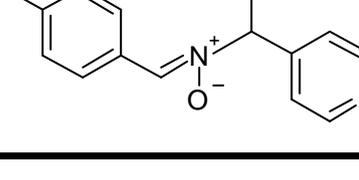
Figura 46. Posible reacción entre una nitrona y un radical HO \cdot [134].



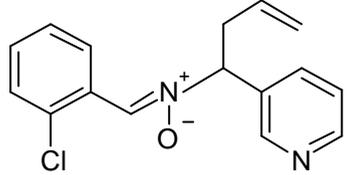
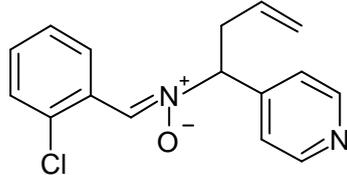
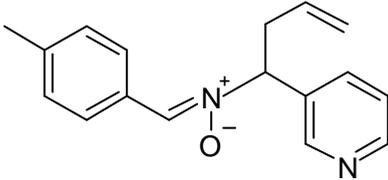
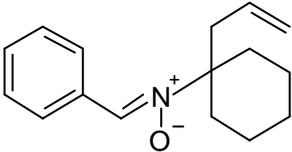
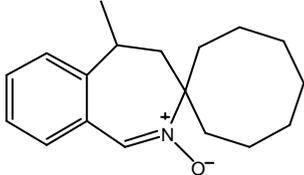
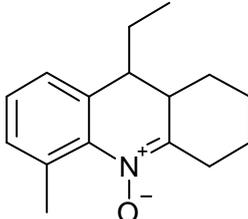
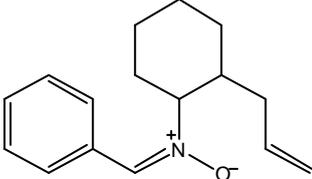
En la **Tabla 27** aparecen las estructuras y los resultados de la medición de la actividad antioxidante de las nitronas evaluadas en esta investigación. Casi todas las nitronas mostraron un efecto protector alto contra la oxidación del ácido linoleico, superior a sus bencilaminas análogas (1-9, 12, 22, 31, 47). Por ejemplo, las nitronas 57, 59, 60 y 63 tuvieron un efecto protector de 91, 97.4, 83.4 y 96.4%, respectivamente, en concentraciones comprendidas entre 35-42 mM, mientras que sus bencilaminas análogas 1, 3, 4 y 8 tuvieron un efecto protector de sólo 51.7, 35.7, 22.3 y 39.9%, respectivamente.

Fevig y colaboradores [118] determinaron la actividad antioxidante de la fenil-terbutilnitrona y nitronas análogas del 3,3-dimetil-3,4-dihidroisoquinolina-N-óxido en la inhibición de la peroxidación lipídica *in vitro*. Los autores observaron que nitronas cíclicas fueron más activas que la fenil-terbutilnitrona y, a su vez, cuando se aumentó el sistema de conjugación electrónica en la nitrona, se incrementó la actividad antioxidante.

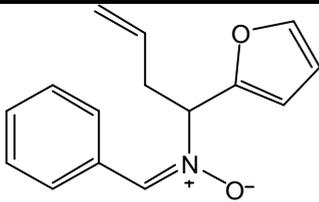
Tabla 27. Efecto protector *in vitro* de las nitronas 57-70, contra la oxidación del ácido linoleico en emulsión, inducida por Fe²⁺ en presencia de O₂.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|-----------|---|-------------------|---------------------|
| <u>57</u> |  | 19.8 | 77.4±0.5 |
| | | 29.8 | 89.7±0.1 |
| | | 39.7 | 91.2±0.1 |
| <u>58</u> |  | 19.8 | 84.2±0.3 |
| | | 29.8 | 87.3±0.2 |
| | | 39.7 | 90.9±0.1 |
| <u>59</u> |  | 19.8 | 93.3±0.1 |
| | | 29.8 | 95.9±0.1 |
| | | 39.7 | 97.4±0.1 |
| <u>60</u> |  | 3.8 | 51±2 |
| | | 18.8 | 74±2 |
| | | 37.5 | 83±2 |
| <u>61</u> |  | 3.8 | 43±1 |
| | | 18.8 | 55±2 |
| | | 37.5 | 70±1 |
| <u>62</u> |  | 3.5 | 70±2 |
| | | 17.4 | 70.5±0.5 |
| | | 34.9 | 70±1 |

Continuación de la **Tabla 27**.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|----|---|-------------------|---------------------|
| 63 |  | 17.5 | 95.5±0.1 |
| | | 26.3 | 95.9±0.1 |
| | | 35.0 | 96.4±0.1 |
| 64 |  | 17.5 | 79.4±0.2 |
| | | 26.3 | 80.4±0.4 |
| | | 35.0 | 86.2±0.1 |
| 65 |  | 3.5 | 87.9±0.6 |
| | | 17.4 | 88±3 |
| | | 34.9 | 75±5 |
| 66 |  | 4.1 | 48±1 |
| | | 20.6 | 79.9±0.5 |
| | | 41.1 | 91.3±0.7 |
| 67 |  | 4.1 | 36±1 |
| | | 20.6 | 36.1 |
| | | 41.1 | 40±1 |
| 68 |  | 20.6 | 8.7±0.8 |
| | | 30.9 | 0.7±0.5 |
| | | 41.2 | -0.5±0.9 |
| 69 |  | 20.6 | 50.9±0.3 |
| | | 30.9 | 54.3±0.8 |
| | | 41.2 | 90.3±0.1 |

Continuación de la **Tabla 27**.

| N° | Compuesto | Concentración, mM | Efecto protector, % |
|-----------|---|-------------------|---------------------|
| <u>70</u> |  | 20.7 | 40±1 |
| | | 31.1 | 52.0±0.6 |
| | | 41.5 | 76.6±0.3 |

Expandir el anillo de la nitrona o adicionar sistemas cíclicos aumentaron también su actividad, dado, presumiblemente, por un mayor acceso estérico al doble enlace de la nitrona [118]. Resultados similares fueron obtenidos en esta investigación. Por ejemplo, las nitronas con anillos piridínicos en su estructura (57, 58, 59, 63) presentaron efectos protectores altos contra la oxidación del ácido linoleico (>90%). Lo mismo, para las estructuras con la expansión del anillo: la nitrona cíclica C₆, 68 mostró un efecto protector bajo (-0.5-8.0%), mientras que la C₇, 67 lo aumentó sustancialmente (36-40%).

2.4.2. Evaluación de la capacidad de secuestrar radicales de los derivados sintéticos nitrogenados. Muchas sustancias con enlaces tipo -CH-, -NH-, -OH y -SH con capacidad de donar por lo menos un átomo de hidrógeno, o aquellas sustancias que tengan la facilidad de donar electrones, se han considerado como potenciales antioxidantes. En esta investigación se evaluó la capacidad de 37 compuestos nitrogenados para atrapar radicales, usando los métodos de decoloración del catión-radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) (ABTS⁺) y del radical α,α -difeníl- β -picrilhidracilo (DPPH). En la **Tabla 1** de la *Parte Experimental* se muestran las estructuras de las sustancias nitrogenadas y en el **Anexo 3**, aparecen reportadas las gráficas de los estados estacionarios determinados para estos compuestos durante la reacción con el radical DPPH. La capacidad de atrapar radicales de las sustancias se comparó con la de los compuestos patrón, *i.e.* la vitamina E (α -tocoferol), el BHA, el ácido ascórbico y el BHT.

En la **Tabla 28**, se puede observar que las sustancias nitrogenadas evaluadas 4-16, 18-20, 23-25, 27, 31-34, 41, 47-62, 65-67, presentaron, en general, una capacidad antioxidante baja comparada con las sustancias de referencia, para ambos métodos de ensayo. Sin embargo, el compuesto 41 presentó una actividad (TEA=2.2 y EC₅₀=1.0) igual o superior a la de los compuestos de referencia (TEAC 1.2, 1.0, 1.1 para el ácido ascórbico, la vitamina E y el BHA respectivamente) y EC₅₀ (0.25, 0.23 y 0.23 para el ácido ascórbico, la vitamina E y el BHA, respectivamente) y, en menor grado, los compuestos 18, 19, 49-51.

Tabla 28. Capacidad atrapadora de radicales de los compuestos nitrogenados 4-16, 18-20, 23-25, 27, 31-34, 41, 47-62, 65-67.

| Compuesto | TEAC (mmol de Trolox/mmol de derivado nitrogenado) | EC ₅₀ (mmol derivado nitrogenado/mmol de DPPH) |
|-----------|--|---|
| <u>4</u> | 0.010 ± 0.002 | 115 ± 1 |
| <u>5</u> | 0.01 ± 0.01 | 125 ± 5 |
| <u>6</u> | 0.010 ± 0.001 | 110 ± 9 |
| <u>10</u> | 0.010 ± 0.003 | 140 ± 4 |
| <u>11</u> | 0.02 ± 0.01 | 120 ± 4 |
| <u>12</u> | 0.003 ± 0.001 | 108 ± 2 |
| <u>13</u> | 0.29 ± 0.03 | 45.0 ± 0.2 |
| <u>14</u> | 0.50 ± 0.03 | 97 ± 1 |
| <u>15</u> | 0.011 ± 0.009 | 230 ± 9 |
| <u>16</u> | 0.010 ± 0.001 | 370 ± 10 |
| <u>18</u> | 0.42 ± 0.01 | 5.8 ± 0.3 |
| <u>19</u> | 1.10 ± 0.05 | 7.0 ± 0.6 |
| <u>20</u> | 0.520 ± 0.002 | 14 ± 1 |
| <u>23</u> | 0.0010 ± 0.0006 | 495 ± 9 |
| <u>24</u> | 0.02 ± 0.01 | 144 ± 3 |
| <u>25</u> | 0.20 ± 0.02 | 115 ± 6 |
| <u>27</u> | 0.090 ± 0.004 | 150 ± 2 |

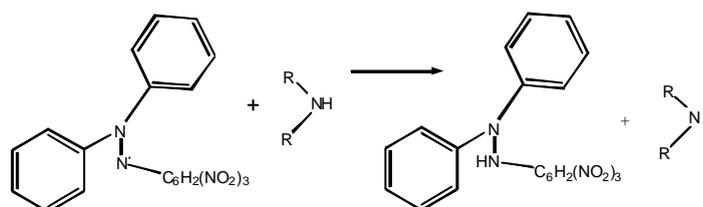
Continuación de la **Tabla 28**.

| | | |
|-----------------|-----------------|-------------|
| <u>31</u> | 0.04 ± 0.01 | 80 ± 3 |
| <u>32</u> | 0.030 ± 0.001 | 160 ± 3 |
| <u>34</u> | 0.060 ± 0.002 | 44.0 ± 0.5 |
| <u>41</u> | 2.2 ± 0.2 | 1.01 ± 0.25 |
| <u>47</u> | 0.02 ± 0.005 | 128 ± 2 |
| <u>48</u> | 0.0042 ± 0.0004 | 270 ± 5 |
| <u>49</u> | 0.70 ± 0.09 | 70 ± 4 |
| <u>50</u> | 1.1 ± 0.3 | 12.0 ± 0.6 |
| <u>51</u> | 0.94 ± 0.15 | 19 ± 2 |
| <u>52</u> | 1.0 ± 0.2 | 107 ± 7 |
| <u>53</u> | 0.98 ± 0.22 | 105 ± 1 |
| <u>54</u> | 0.13 ± 0.03 | 385 ± 6 |
| <u>55</u> | 0.72 ± 0.15 | 290 ± 3 |
| <u>56</u> | 0.93 ± 0.21 | 185 ± 5 |
| <u>60</u> | 0.010 ± 0.003 | 58 ± 6 |
| <u>61</u> | 0.030 ± 0.002 | 58 ± 1 |
| <u>62</u> | 0.020 ± 0.004 | 110 ± 7 |
| <u>65</u> | 0.010 ± 0.001 | 97 ± 6 |
| <u>66</u> | 0.020 ± 0.002 | 65 ± 1 |
| <u>67</u> | 0.020 ± 0.007 | 130 ± 3 |
| Ácido ascórbico | 1.2 ± 0.3 | 0.25 ± 0.05 |
| Vitamina E | 1.0 ± 0.1 | 0.23 ± 0.01 |
| BHA | 1.1 ± 0.1 | 0.23 ± 0.05 |
| BHT | 0.50 ± 0.01 | 0.6 ± 0.1 |

El principal proceso, que explica cómo actúan las aminas para atrapar radicales, es por su capacidad de ceder hidrógenos. Esto depende de varios factores, entre ellos, del tipo de sustituyente, ya que grupos donadores de electrones favorecen la estabilización del radical. Influyen también la electronegatividad de los sustituyentes, los efectos estéricos, la solubilidad en el medio, entre otros factores

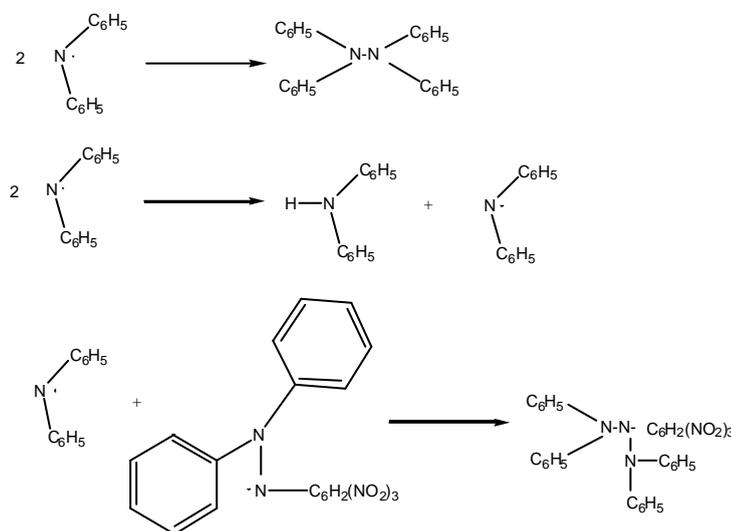
[119-121]. En la **Figura 47** se muestra el esquema de la reacción entre el DPPH· y una amina.

Figura 47. Posible reacción de aminas secundarias con el radical DPPH· [119].



Luego de haber cedido el protón, el radical amino resultante puede inducir otras reacciones, como la unión de dos radicales amino o la formación de un complejo entre los radicales DPPH y amino, como se aprecia en la **Figura 48**.

Figura 48. Posibles reacciones secundarias entre radicales amino y radicales DPPH [119].



McGowan *et al.* [120] investigaron las velocidades de reacción entre aminas, fenoles y el radical DPPH. Se encontró que, en general, fueron más reactivos los

fenoles que las aminas aromáticas utilizadas. Ley J.P. [117] realizó un estudio sobre la capacidad de algunas bencilaminas fenólicas de reducir el estrés oxidativo en la piel, inducido por la radiación ultravioleta. Este investigador evaluó la capacidad de atrapar radicales por varios métodos, incluyendo el del radical DPPH y encontró que todas las sustancias estudiadas tenían una excelente capacidad antioxidante como secuestradores de radicales. Con base en estos estudios, es posible suponer que la ausencia de los grupos hidroxilo en los compuestos evaluados en este trabajo, redujo la capacidad secuestradora de radicales, comparada con la vitamina E, el ácido ascórbico y el BHA.

Las bencilaminas pueden atrapar el catión-radical $ABTS^+$ o el radical DPPH, a través de la donación de electrones o hidrógenos [110,111]. La velocidad de este tipo de reacciones de atrapamiento de radicales está directamente relacionada con los valores de las entalpías de disociación del enlace NH (EDE) y de los potenciales de ionización (PI).

Las EDE y los PI de las bencilaminas son afectados por sus grupos sustituyentes, porque éstos modifican la densidad electrónica molecular e intervienen en fenómenos de conjugación o hiperconjugación. Así, e.g. los grupos electrodonadores, aumentan la densidad electrónica molecular y, por ende, la energía del orbital molecular ocupado más alto, HOMO, causando una desestabilización molecular relativa y, por lo tanto, una disminución de sus EDE y PI [120,121]. A su vez, los grupos electrodonadores que puedan intervenir en procesos de hiperconjugación o conjugación (metilos, bencilos, fenilos, alilos, hidroxilo y amino) ayudan a la estabilización de los radicales amínicos después de ceder el protón o electrón al DPPH \cdot o al $ABTS^+$, lo cual también influye en la disminución de las EDE y los PI [121].

Es importante anotar, que al comparar los dos métodos usados en esta parte del trabajo, la efectividad antioxidante de los compuestos nitrogenados sintéticos

presentó diferentes comportamientos. Se esperó, que, por ejemplo, las moléculas 2, 7 y 11 que mostraron un efecto protector alto (89.4%, 92.0% y 91.0%) contra la oxidación del ácido linoleico, también lo hicieran por el método de atrapamiento de radicales, pero no fue así; éstas moléculas tuvieron bajos valores de TEAC (0.01, 0.01 y 0.02) y de EC₅₀ (115, 125 y 120) comparados con los valores obtenidos para antioxidantes de referencia. Contrario a lo que se esperaba para el compuesto 41, que exhibió un efecto protector moderado (53.6%) contra la oxidación del ácido linoleico, éste presentó la mayor capacidad de atrapamiento de radicales por ambos métodos (ABTS⁺ y DPPH) entre los 37 compuestos nitrogenados sintéticos evaluados, como lo muestra la **Tabla 28**. Por lo que se concluye, que no todas estas sustancias actúan por el mecanismo de atrapamiento de radicales. También pueden intervenir otros mecanismos de acción antioxidante.

2.4.3 Relación cuantitativa de la actividad antioxidante con la estructura química de los compuestos nitrogenados sintéticos. Se han realizado muchos trabajos en donde se establecen relaciones empíricas entre estructura y actividad que han permitido obtener nuevas sustancias con bio-actividad superior. El establecimiento de la relación cuantitativa entre la estructura química y la actividad biológica consiste en desarrollar modelos matemáticos que relacionen cualquier forma de actividad (antiinflamatoria, insecticida, fungicida, antioxidante, etc) con las propiedades fisicoquímicas y electrónicas de un conjunto de moléculas [136-140]. La relación que se establezca permite predecir la actividad de un compuesto sin evaluación experimental previa, usando métodos estadísticos, tales como regresión lineal múltiple (MLR), mínimos cuadrados parciales (PLS), análisis de componentes principales (PCA), etc. Esto conduce al ahorro de tiempo y minimización de costos en la búsqueda y desarrollo de nuevos productos [141-145]. Pero, los estudios QSAR no sólo se han realizado para el diseño de drogas, también para controlar la contaminación ambiental generada por procesos industriales o por tratamiento inapropiado de desechos. Por ejemplo, Colón *et al.*

[146] desarrollaron modelos QSAR con el fin de controlar los procesos de absorción de aminas aromáticas en desechos. Estos investigadores determinaron las constantes de velocidad de absorción de las aminas y las correlacionaron con descriptores moleculares tales como constantes de disociación, constante de Hammett, potenciales de oxidación, HOMO, LUMO y energía de ionización, usando regresión lineal múltiple (MLR). En general, encontraron que la velocidad de absorción de las aminas aromáticas depende de la capacidad de sus sustituyentes para donar o aceptar electrones.

Grodnitzki y Coats [138] desarrollaron modelos QSAR efectivos para explicar y predecir la actividad insecticida de 30 monoterpenoides y sus derivados, ellos obtuvieron dos modelos, uno para monoterpenos no aromáticos y otro para monoterpenoides aromáticos. Los resultados de estos dos modelos independientes sugieren que los dos tipos de monoterpenoides tienen modos de acción insecticida diferentes.

En la presente investigación se determinó la relación entre el efecto protector contra la oxidación del ácido linoleico de 70 compuestos nitrogenados y sus descriptores moleculares (topológicos, geométricos, constitucionales, electrostáticos y cuánticos), usando la metodología de regresión lineal múltiple (MLR). De estas 70 sustancias se escogieron 37 con las cuales se realizó el estudio QSAR, correlacionando la capacidad de atrapar radicales con los descriptores moleculares.

Como ya se mencionó en la *Parte Experimental*, para este análisis, la siguiente ecuación fue utilizada como modelo base:

$$\text{Actividad antioxidante} = \sum_i SB_i \times Di + b_0$$

Ecuación 1

Donde los descriptores D_i contribuyen al efecto final antioxidante con una proporción indicada por el coeficiente B_i .

Con el fin de obtener las mejores combinaciones de descriptores que explicaran en forma más adecuada los datos, éstos fueron normalizados usando la siguiente ecuación [145]:

$$X^*_{ij} = \left[\frac{X_{ij} - X_{jmin}}{X_{jmax} - X_{jmin}} \right]$$

Ecuación 2

Donde:

X^*_{ij} = nuevo valor normalizado para la fila i (compuesto i) de la variable j ; $0 \leq X_{ij} < 1$.

X_{jmin} = valor mínimo de la variable j ;

X_{jmax} = valor máximo de la variable j .

Luego, se eliminaron los descriptores colineales para lo cual se determinaron los coeficientes de regresión entre los descriptores, descartando los que poseían coeficientes superiores o iguales a 0.7. Esta correlación mide la tendencia lineal entre los diferentes descriptores y debe poseer una mínima covarianza. De este modo, se escogieron 26 descriptores. Para caracterizar los modelos de MLR se usaron los siguientes parámetros:

B= coeficiente del modelo de regresión;

b= valor que indica el peso de cada variable en el modelo;

R=coeficiente de regresión simple, indica la dirección (signo) y grado (magnitud) de una correlación entre 2 variables;

R²= coeficiente de correlación múltiple, ésta es una medida de cuánto se ajusta un modelo de regresión a un conjunto de datos;

F= Medida de la significancia total de un modelo de regresión, éste F se debe comparar con el F reportado en las tablas estadísticas con un nivel de confianza del 95% [147].

Los valores de R^2 y F se obtuvieron empleando las siguientes ecuaciones:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i^* - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

Ecuación 3

Donde:

y_i = valor observado de la variable dependiente “y” para el caso i ;

y_i^* =valor calculado de la variable dependiente “y”, para el caso i ;

\bar{y} : valor promedio de la variable dependiente “y”, calculada y observada.

$$\mathbf{F_{calculado} = F(v_1, v_2)}$$

$$\mathbf{F(v_1, v_2) = \frac{MSE}{MSR}}$$

Ecuación 4;

Donde:

MSE: *explained mean square* (media cuadrada explicada);

MSR: *residual mean square* (media cuadrada residual);

v_1 = p grados de libertad de MSE, variables independientes en la **Ecuación 1**;

v_2 = $n-p-1$ grados de libertad de MSR; donde, n es el número de casos a estudiar.

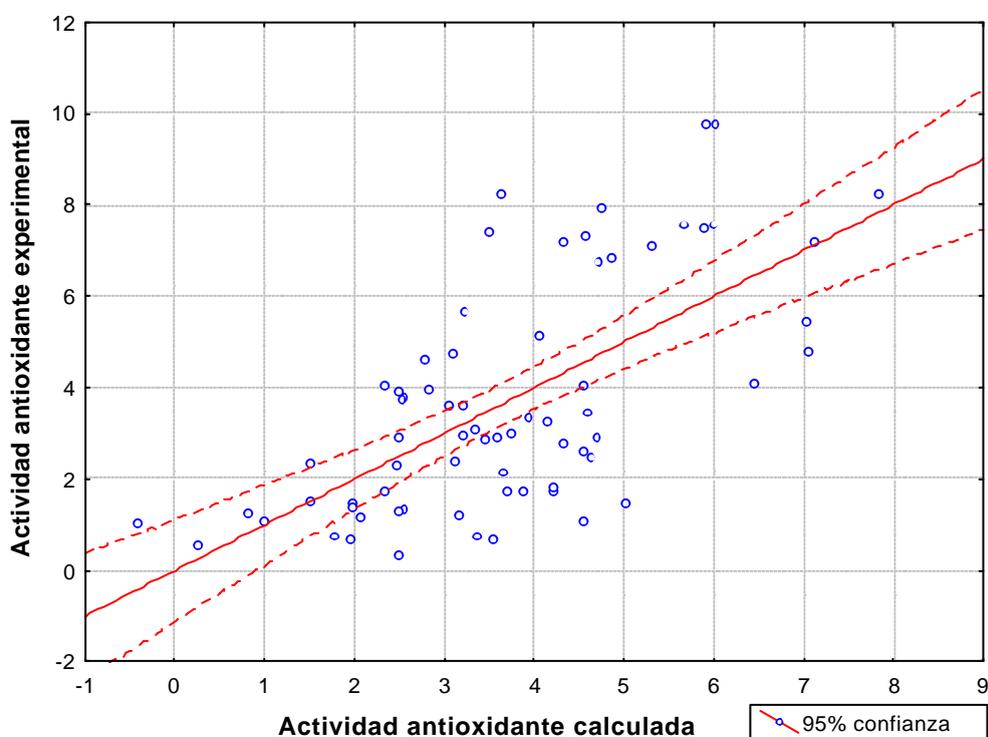
Los resultados de la correlación y los 26 descriptores moleculares o variables independientes que más aportaron a la actividad antioxidante (variable

dependiente) de los 70 compuestos nitrogenados aparecen indicados en el **Anexo 4 (Tabla 1)**.

La **Figura 49**, muestra la relación entre el efecto protector observado y el calculado, utilizando MLR *forward* para el conjunto de los 70 compuestos sintéticos nitrogenados, para el cual se obtuvo un coeficiente de correlación $R^2 = 0.66$. La MLR *forward* consiste en la adición sucesiva de las variables independientes a la ecuación de prueba, en orden descendente de correlación y termina cuando la variable sumada no tiene efecto significativo en la ecuación.

En el **Anexo 4 (Tabla 2)** se puede apreciar la actividad antioxidante experimental y la calculada para este modelo general.

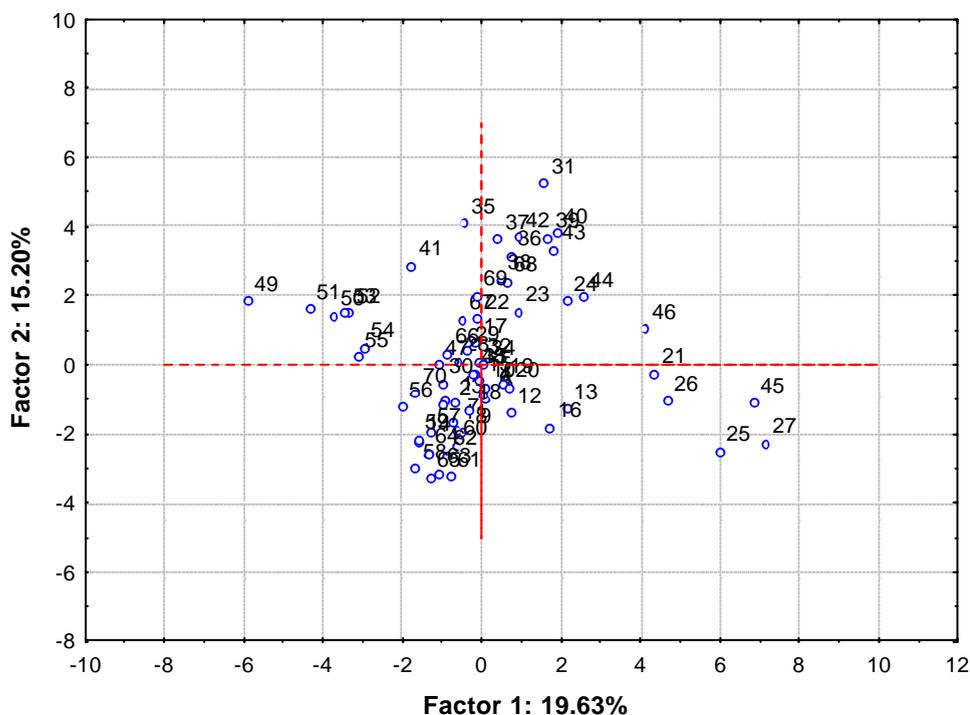
Figura 49. Relación entre los valores de la actividad antioxidante observados y calculados mediante la ecuación de MLR para los 70 compuestos nitrogenados sintéticos evaluados.



La actividad antioxidante de los compuestos sintéticos nitrogenados, determinada para el modelo QSAR se calculó como equivalentes de vitamina E, esto se logró dividiendo el efecto protector de la sustancia nitrogenada sobre el efecto protector de la vitamina E, ambos a una misma concentración 25 mM.

Con el fin de obtener mejores resultados, dado que el R^2 para el modelo usado con las 70 moléculas fue bajo (0.66), éstas se clasificaron en grupos con propiedades moleculares similares, se realizó entonces un análisis de componentes principales (PCA). De acuerdo con este análisis, se distribuyeron las moléculas semejantes en subconjuntos, según su distancia en el espacio formado por los primeros dos componentes principales, obtenidos del conjunto de 89 descriptores moleculares, como se muestra en la **Figura 50**.

Figura 50. Análisis de componentes principales de los 70 compuestos sintéticos nitrogenados empleados.



Los compuestos nitrogenados se agruparon en los siguientes 5 conjuntos:

- Grupo 1: Bencilaminas y benzazepinas (compuestos 1-34).
- Grupo 2: Moléculas 17, 18, 22-24, 31, 35-44, 66-69.
- Grupo 3: Moléculas 13, 16, 21, 25-27, 45, 46.
- Grupo 4: Moléculas 14, 57-65, 70
- Grupo 5: Moléculas 47-56.

La selección de los descriptores para estos grupos, se realizó empleando el método MLR *forward*.

2.4.3.1 Correlación del efecto protector con la estructura usando el Modelo

1. En la **Tabla 29** se presentan los resultados del análisis por regresión lineal múltiple con sus respectivos valores estadísticos. A mayor valor de F (valor estadístico que señala el nivel de confianza del modelo QSAR) más alta será la capacidad de predicción de la ecuación obtenida, pero para que el modelo sea significativo el F calculado debe ser mayor al F tabulado. El R^2 superior a 0.9 indica una mayor probabilidad de que el modelo sea confiable [145]. En la **Figura 51** se observan las estructuras del grupo de moléculas correspondientes a este modelo;

La **Tabla 29** muestra que el efecto protector antioxidante de los compuestos nitrogenados está fuertemente asociado con los descriptores *Kier Hall index (order 0)* (descriptor topológico), *DPSA-3 difference in CPSA (PPSA 3-PNSA3)* (descriptor relacionado con la distribución de carga) y de la energía del HOMO. La distribución espacial de los sustituyentes de los compuestos nitrogenados y los efectos estéricos que éstos ejercen, afectan la capacidad protectora antioxidante de estas sustancias, ya que facilita o impide la donación o transferencia de protones o electrones a los radicales formados en la oxidación del ácido linoleico. Las energías de los orbitales HOMO y LUMO están relacionadas con el efecto

protector por la capacidad de transferencia de electrones de estos dos orbitales [142].

Tabla 29. Coeficientes de regresión, obtenidos para el **Modelo 1** (34 moléculas).

| Descriptores moleculares | B | Beta | R | R ² | F _{observado} | F _{tabulado*} |
|---|--------|--------|-----|----------------|------------------------|------------------------|
| Intercepto | 2,856 | | 0,9 | 0,8 | 4,0 | 1.67 |
| 1. N° átomos | -0,766 | -0,056 | | | | |
| 2. N° de carbonos relativos | -5,907 | -0,403 | | | | |
| 3. N° anillos | 0,611 | 0,067 | | | | |
| 4. N° anillos bencénicos | -0,526 | -0,082 | | | | |
| 5. N° enlaces aromáticos | 1,272 | 0,154 | | | | |
| 6. N° de enlaces simples relativos | 0,527 | 0,033 | | | | |
| 7. Randic index (order 1) | 0,797 | 0,065 | | | | |
| 8. Kier&Hall index (order 0) | 12,787 | 0,621 | | | | |
| 9. Kier shape index (order 2) | -3,360 | -0,326 | | | | |
| 10. Kier shape index (order 3) | 1,112 | 0,111 | | | | |
| 11. Information content (order 0) | -5,246 | -0,451 | | | | |
| 12. Complementary Information content (order 0) | -6,590 | -0,309 | | | | |
| 13. 3D-Kier shape index (order 2) | 1,198 | 0,075 | | | | |
| 14. 3D-Structural Information content (order 0) | -1,469 | -0,192 | | | | |
| 15. 3D-Information content (order 2) | -1,578 | -0,106 | | | | |
| 16. 3D-Complementary Information content (order 2) | 2,739 | 0,260 | | | | |
| 17. 3D-Structural Information content (order 2) | -2,047 | -0,213 | | | | |
| 18. Moment of inertia A | -2,250 | -0,161 | | | | |
| 19. PPSA-3 Atomic charge weighted PPSA [Empirical PC] | 0,027 | 0,003 | | | | |
| 20. PNSA-3 Atomic charge weighted PNSA [Empirical PC] | 0,370 | 0,034 | | | | |
| 21. DPSA-1 Difference in CPSAs (PPSA1-PNSA1) [Empirical PC] | -0,797 | -0,036 | | | | |
| 22. DPSA-3 Difference in CPSAs (PPSA3-PNSA3) [Empirical PC] | 5,976 | 0,452 | | | | |
| 23. Energía optimizada | -0,390 | -0,026 | | | | |
| 24. HOMO | 2,899 | 0,151 | | | | |
| 25. LUMO | 0,315 | 0,030 | | | | |
| 26. Momento dipolar | -2,897 | -0,209 | | | | |

La F tabulada fue hallada en el libro de BOX, G.E.P.; HUNTER, W, G. and HUNTER, J.S., **1978**. Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building [145].

En la **Figura 52** se muestra la relación entre el efecto protector observado y calculado correspondiente al **Modelo 1** y sus valores se reportan en el **Anexo 4 (Tabla 3)**

Figura 51. Estructuras del grupo de moléculas usadas para el **Modelo 1**.

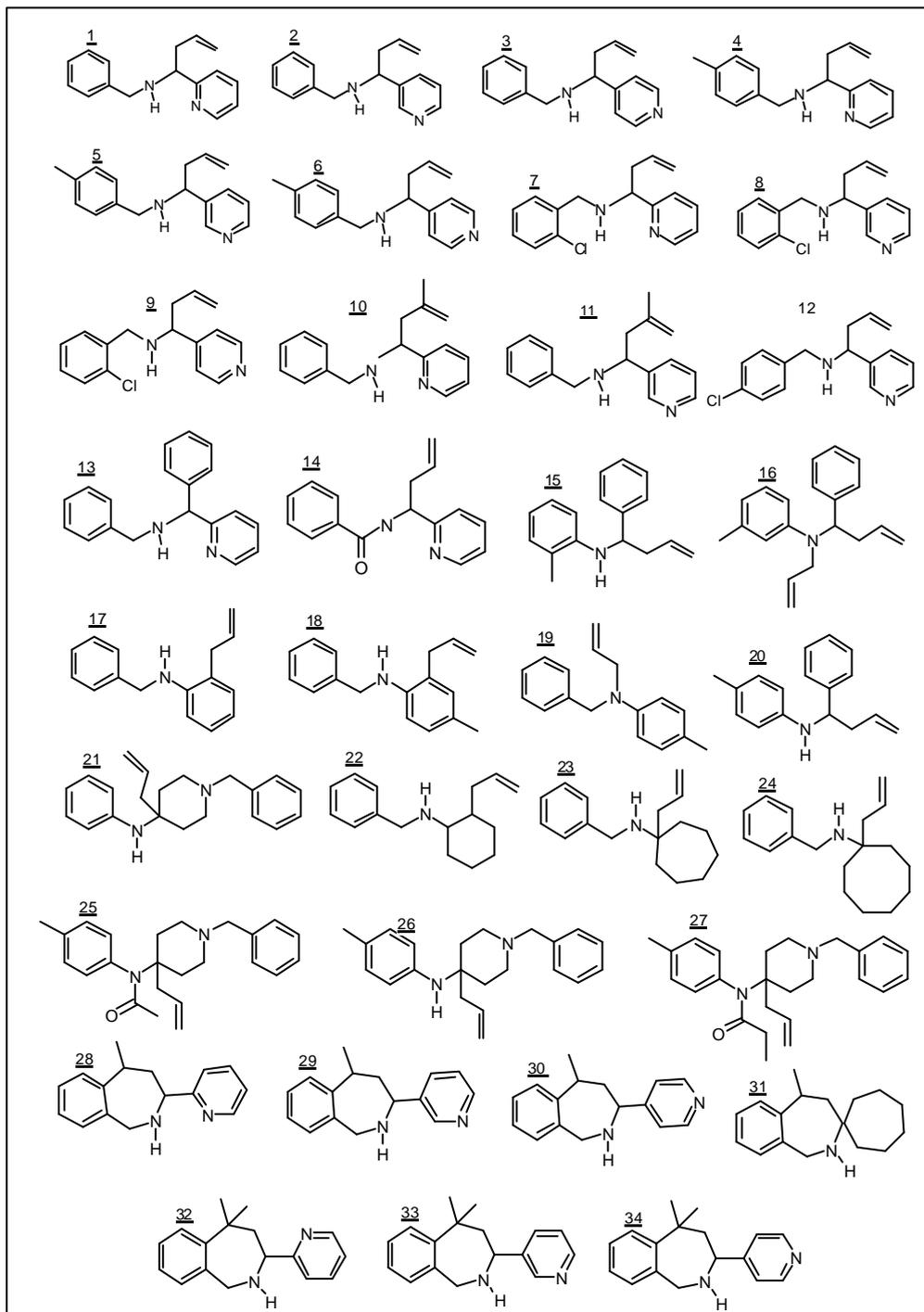
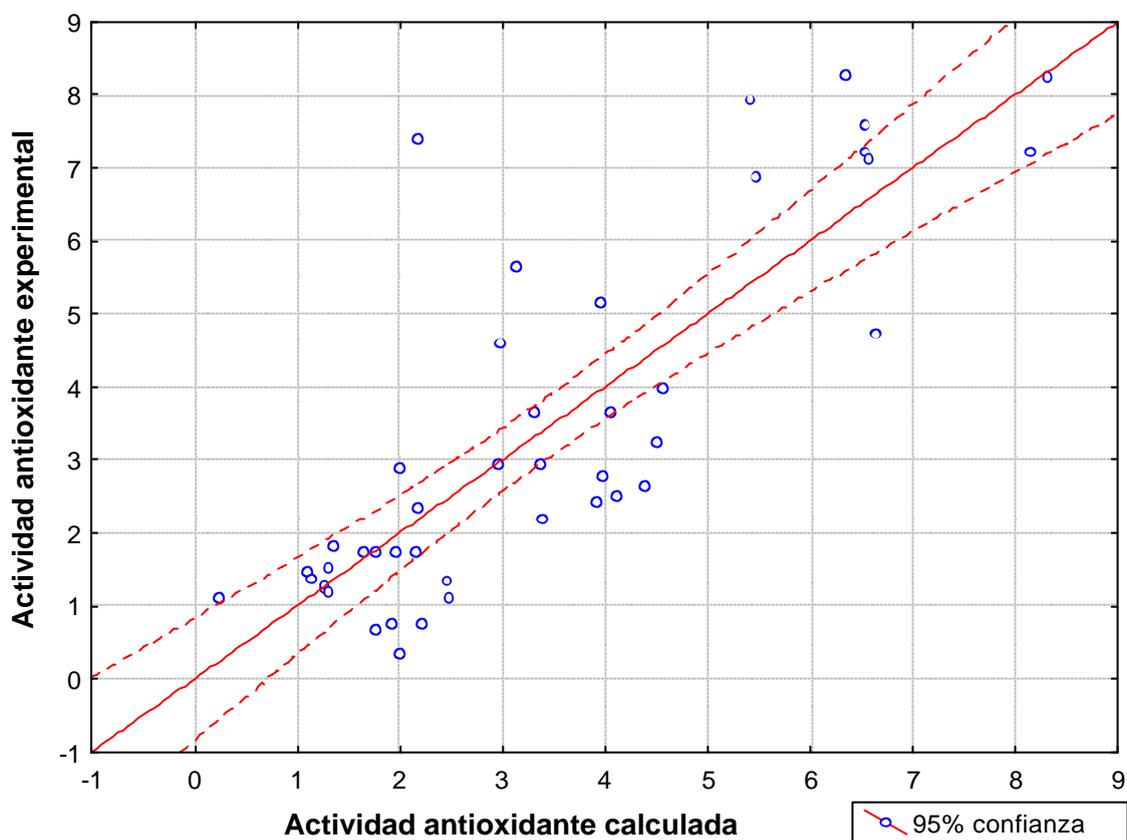


Figura 52. Relación entre el efecto protector observado y calculado del grupo de moléculas correspondiente al **Modelo 1**.



Los compuestos que presentaron mayor correlación entre la actividad antioxidante observada y la calculada para este modelo fueron: 1-3, 7, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 26, 27, 30, 32, 33 (Ver sus estructuras en la **Figura 51**).

2.4.3.2 Correlación del efecto protector con la estructura usando el Modelo 2. En la **Tabla 30** aparecen los coeficientes de regresión para 20 compuestos sintéticos nitrogenados, que involucran algunas bencilaminas sustituidas con bencilos y butenos, además de derivados de tetrahydroquinolinas; en la **Figura 53** se presentan las estructuras de estos compuestos.

Tabla 30. Coeficientes de regresión, obtenidos para el **Modelo 2** (20 moléculas).

| Descriptores | B | Beta | R | R ² | F _{calculado} | F _{tabulado} |
|------------------------------|---------|--------|------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Intercepto | -28,371 | | 0,94 | 0,90 | 4,90 | 1.68 |
| 1. N° átomos | 72,559 | 2,946 | | | | |
| 2. N° Carbonos | -51,376 | -1,474 | | | | |
| 3. N° H relativos | 30,010 | 1,538 | | | | |
| 4. N° anillos | 16,515 | 1,448 | | | | |
| 5. N° enlaces totales | -37,367 | -2,224 | | | | |
| 6. N° enlaces dobles | 52,547 | 3,771 | | | | |
| 7. N° enlaces aromáticos | -17,281 | -1,348 | | | | |
| 8. Energía optimizada | 10,489 | 0,499 | | | | |
| 9. Momento dipolar | 14,494 | 0,686 | | | | |
| 10. Carga sobre el nitrógeno | -18,285 | -1,059 | | | | |
| 11. HOMO | 21,542 | 0,796 | | | | |
| 12. LUMO | -6,896 | -0,932 | | | | |

En la **Figura 54** se muestra la actividad antioxidante experimental *Versus* actividad antioxidante calculada, correspondiente al **Modelo 2**. Los descriptores constitucionales como el número de átomos, el número relativo de hidrógenos, número de anillos, enlaces dobles; además de la energía optimizada, momento dipolar y energía del orbital HOMO, fueron los descriptores más relacionados con el efecto protector de los compuestos nitrogenados evaluados, con un coeficiente de determinación R² de 0.9. Estos resultados indican que aparte de la influencia estérica alrededor del enlace N-H, también influyen los factores electrónicos [142].

Figura 53. Estructuras del grupo de moléculas usadas para el **Modelo 2.**

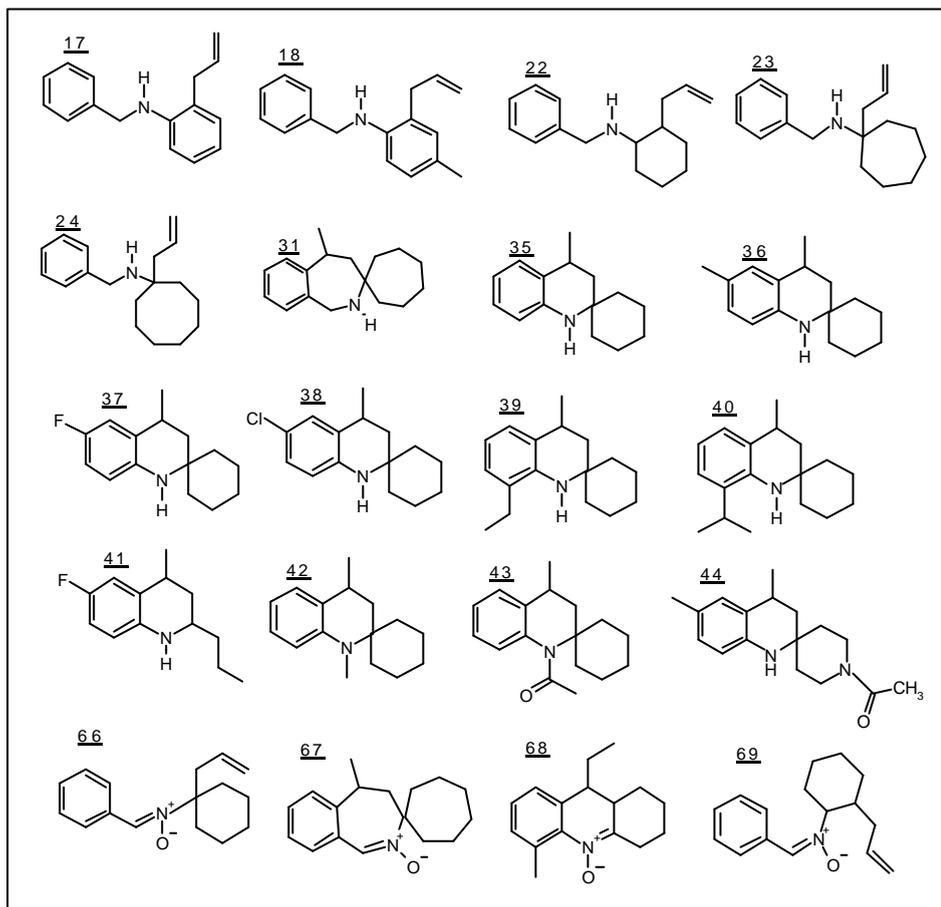
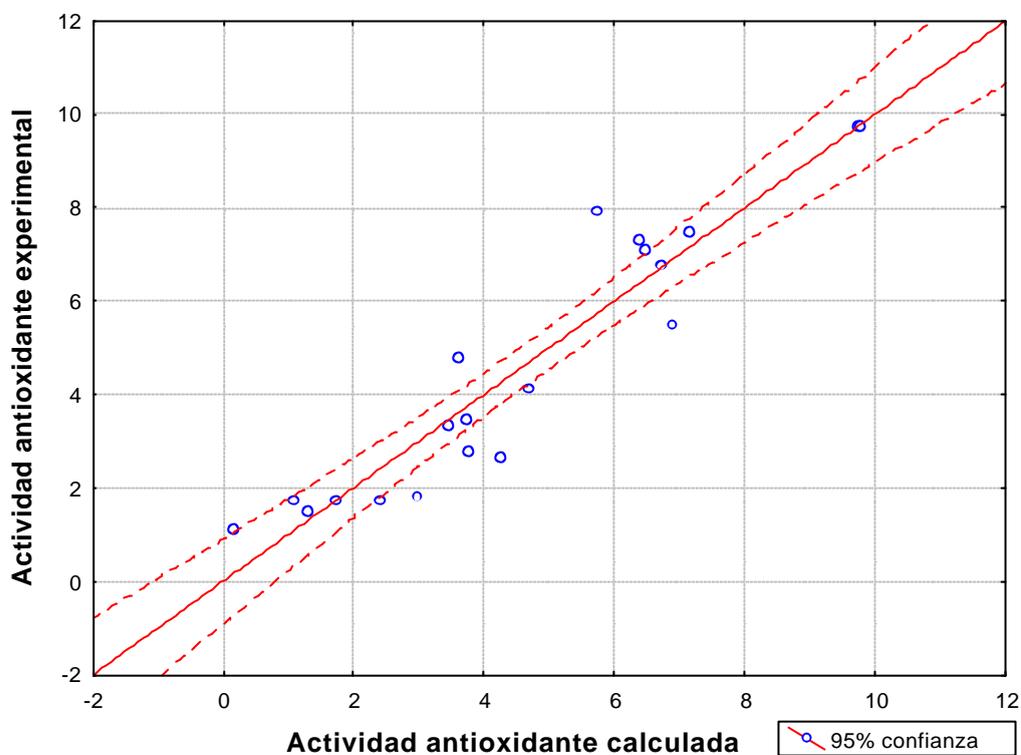


Figura 54. Actividad antioxidante experimental Vs actividad antioxidante calculada correspondiente al **Modelo 2**.



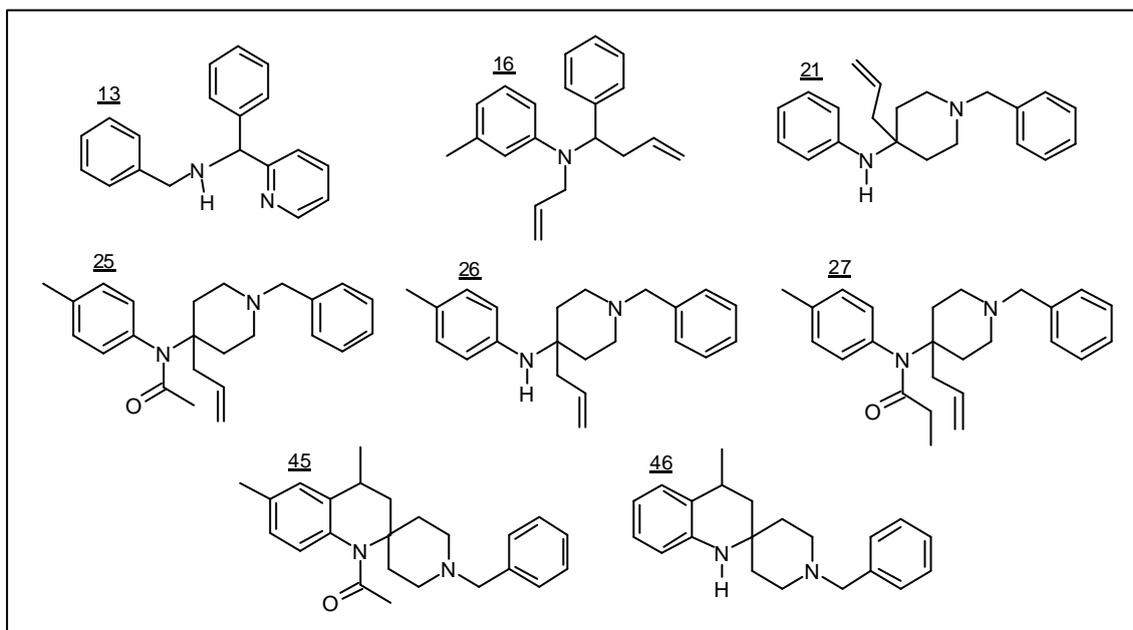
En el **Anexo 4 (Tabla 4)** se encuentran los valores de actividad antioxidante calculada *versus* la actividad antioxidante experimental; en este Anexo, se aprecia que las sustancias nitrogenadas que mostraron mayor correlación entre el efecto protector calculado y el observado fueron: 17, 31, 36, 37, 38, 39, 41, 43, 44, 69 (Ver sus estructuras en la **Figura 53**).

2.4.3.3 Correlación del efecto protector con la estructura usando el *Modelo*

3. Éste incluye seis derivados de bencilaminas y dos derivados de tetrahidroquinolinas con N-ciclohexil- y fenil- sustituyentes; en la **Figura 55** se muestran las estructuras correspondientes a estos compuestos. En la **Tabla 31**

aparecen los coeficientes de regresión para los 8 compuestos sintéticos nitrogenados evaluados en este modelo. El número de enlaces aromáticos y la energía optimizada fueron los descriptores que más “aportaron” a la actividad antioxidante de las moléculas usadas en este modelo; esto, debido quizás a la posibilidad de aumentar el sistema de conjugación electrónica de las moléculas. Pero a pesar de poseer un coeficiente de correlación alto ($R^2=0.97$) y (R^2 ajustado de 0,80) el F tabulado es mayor que el F calculado lo que indica que no es un modelo útil.

Figura 55. Estructuras del grupo de moléculas usadas para el **Modelo 3**.

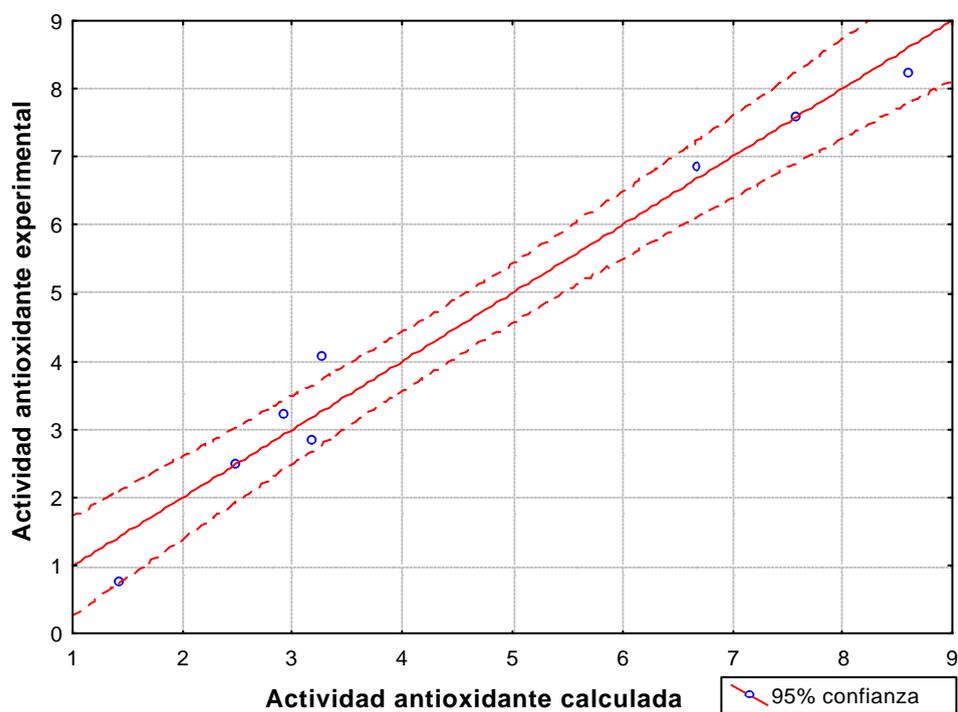


En la **Figura 56** se muestra la relación entre el efecto protector observado y calculado correspondiente al **Modelo 3** y sus valores se reportan en el **Anexo 4** (**Tabla 5**).

Tabla 31. Coeficientes de regresión, obtenidos para el **Modelo 3** (8 moléculas).

| Descriptor molecular | B | Beta | R | R ² | F _{calculado} | F _{tabulado} |
|-----------------------------|---------|--------|------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Intercepto | 8,678 | | 0,98 | 0,97 | 5,7 | 8.98 |
| 1. N° enlaces aromáticos | 29,109 | 1,263 | | | | |
| 2. Energía optimizada | 68,275 | 1,277 | | | | |
| 3. HOMO | -75,996 | -0,410 | | | | |
| 4. LUMO | -22,902 | -0,506 | | | | |
| 5. Momento dipolar | 0,501 | 0,030 | | | | |
| 6. Carga sobre el nitrógeno | 6,389 | 0,114 | | | | |

Figura 56. Actividad antioxidante experimental Vs actividad antioxidante calculada para el **Modelo 3**.



2.4.3.4 Correlación del efecto protector con la estructura usando el Modelo 4. Éste involucra casi todas las nitronas estudiadas en este trabajo (Véase **Figura 57**), a excepción de las nitronas que tienen sustituyentes cíclicos C₆ y C₇. Este modelo presenta un valor de predicción alto ($R^2 = 0.94$ y $F = 9.5$); es significativo, ya que el F calculado es mayor del F tabulado. Para este modelo la carga sobre el nitrógeno, las energías de HOMO y LUMO están muy relacionadas con la actividad antioxidante, como se observa en la **Tabla 32**. Ésto está asociado con la probabilidad de transferir electrones entre los orbitales HOMO y LUMO, lo cual contribuirá al aumento o disminución de la actividad antioxidante de los compuestos y se relaciona con efectos inductivos o de polarización que ejercen sus grupos sustituyentes [142].

Figura 57. Estructuras del grupo de moléculas usadas para el **Modelo 4**.

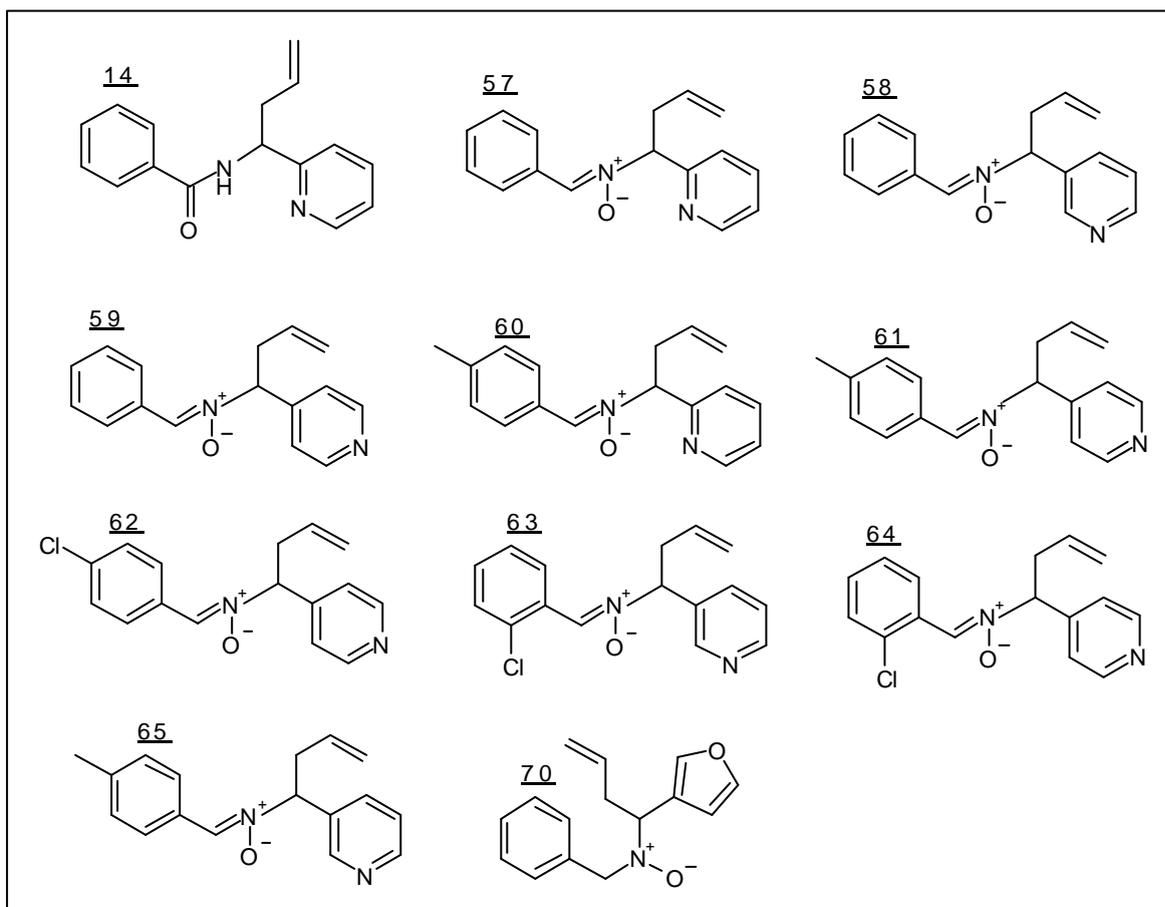
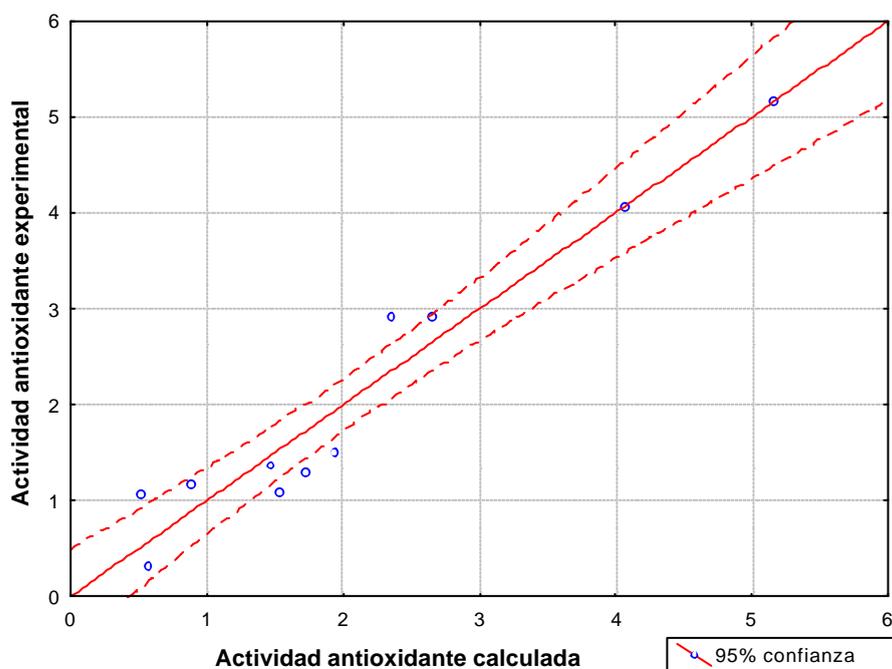


Tabla 32. Coeficientes de regresión para el **Modelo 4** (10 moléculas).

| Descriptor molecular | B | Beta | R | R ² | F _{calculado} | F _{tabulado} |
|-----------------------------|---------|--------|------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Intercepto | 4,829 | | 0,97 | 0,93 | 9,5 | 2.42 |
| 1. N° enlace aromático | -10,408 | -0,468 | | | | |
| 2. Energía optimizada | 1,937 | 0,359 | | | | |
| 3. HOMO | 5,778 | 0,701 | | | | |
| 4. LUMO | 9,995 | 0,477 | | | | |
| 5. Momento dipolar | -3,746 | -0,562 | | | | |
| 6. Carga sobre el nitrógeno | 4,387 | 0,514 | | | | |

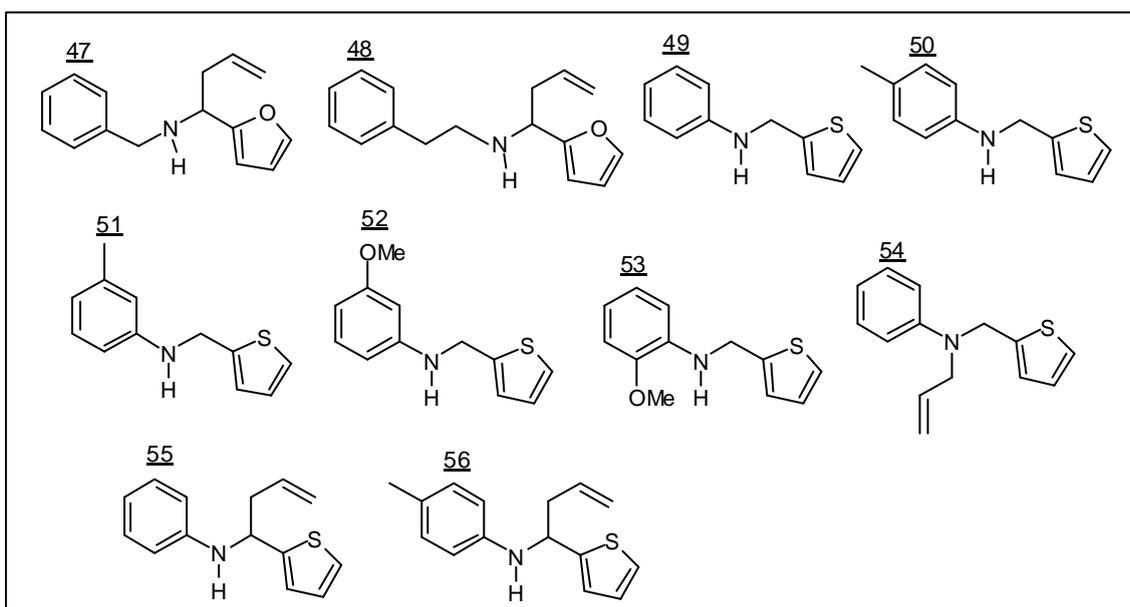
La **Figura 58** presenta la correlación de los datos experimentales y calculados de la actividad antioxidante de los compuestos nitrogenados evaluados por este modelo. El **Anexo 4 (Tabla 6)** presenta los resultados correspondientes a esta figura.

Figura 58. Correlación de la actividad antioxidante experimental Vs la calculada para el grupo de moléculas correspondientes al **Modelo 4**.



2.4.3.5 Correlación del efecto protector con la estructura usando el Modelo 5. Este modelo reúne los derivados de bencilaminas con grupos sustituyentes furanos y tiofenos, el cual presentó un valor de predicción alto, con un $R^2 = 0.95$ y un $F = 9.9$, es significativo, porque el F calculado es mayor del F tabulado. Las estructuras de las moléculas correspondientes a este modelo se muestran en la **Figura 59**.

Figura 59. Estructuras del grupo de moléculas usadas para el **Modelo 5**.

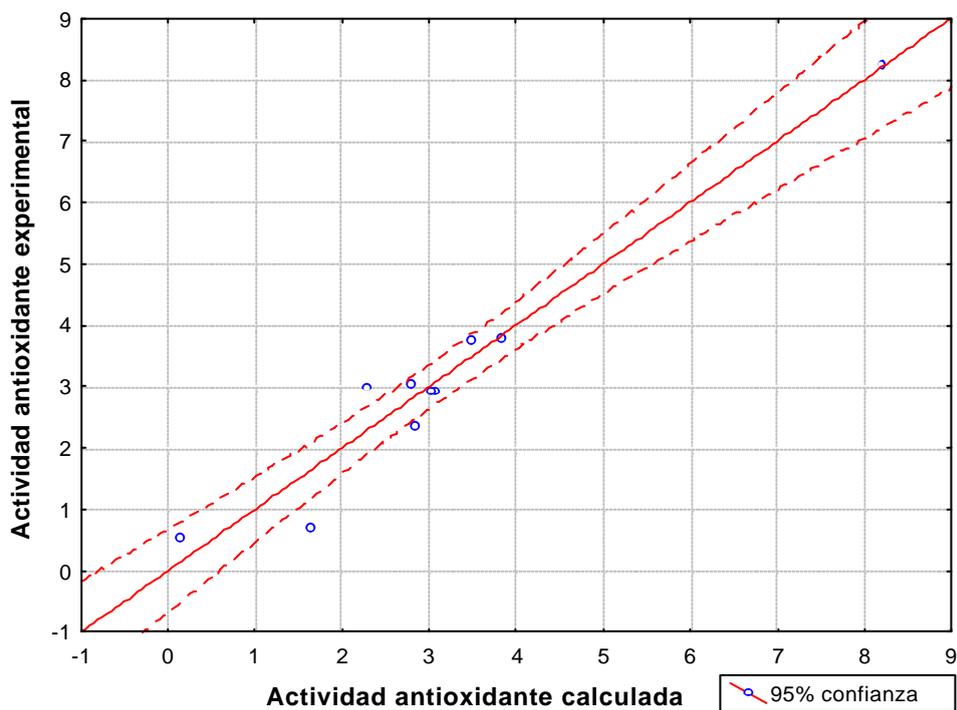


En la **Tabla 33** se indican los coeficientes y datos estadísticos correspondientes a este modelo; En la **Figura 60** se muestra la relación entre el efecto protector observado y calculado correspondiente al **Modelo 5** y sus valores se reportan en el **Anexo 4 (Tabla 7)**.

Tabla 33. Coeficientes de regresión, obtenidos para el **Modelo 5** (11 moléculas).

| Descriptor molecular | B | Beta | R | R ² | F _{calculado} | F _{tabulado} |
|--------------------------|----------|--------|------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Intercepto | -120,998 | | 0,97 | 0,95 | 9,9 | 2.08 |
| N° enlaces aromáticos | 15,684 | 0,555 | | | | |
| Energía optimizada | -32,317 | -0,774 | | | | |
| HOMO | 107,837 | 0,809 | | | | |
| LUMO | 82,782 | 1,651 | | | | |
| Momento dipolar | 21,740 | 0,696 | | | | |
| Carga sobre el nitrógeno | 11,738 | 0,744 | | | | |

Figura 60. Actividad antioxidante experimental Vs actividad antioxidante calculada, **Modelo 5**.



En general, todos los compuestos nitrogenados pertenecientes a este modelo mostraron una correlación alta entre el efecto protector experimental y el calculado, excepto para la molécula 55. Para este modelo, los descriptores más significativos para los derivados de bencilaminas con grupos sustituyentes furanos y tiofenos son los de energía del HOMO y LUMO. Estos orbitales juegan un papel importante en la determinación de la reactividad química, la energía del HOMO está directamente relacionada con el potencial de ionización y la energía del LUMO con la afinidad electrónica. El primero caracteriza la susceptibilidad de la molécula al ataque electrofílico y el segundo al nucleofílico, pero ambos son importantes en la determinación de la reactividad de un radical [142].

2.4.3.6 Correlación de la capacidad de atrapar radicales de los compuestos sintéticos nitrogenados con la estructura. Las capacidades de los compuestos sintéticos para atrapar el catión-radical ABTS⁺ y el radical DPPH[·] medidos en unidades TEAC (mmol Trolox/mmol de antioxidante) y EC₅₀ (mmol antioxidante/mmol iniciales de DPPH[·]), respectivamente se relacionaron con los descriptores moleculares obtenidos mediante los programas computacionales MOLDES y GAUSSIAN.

Los coeficientes de regresión presentados en las **Tablas 34** y **35** muestran que parámetros constitucionales (Nº de átomos, Nº de anillos, Nº relativo de carbonos), topológicos (*Kier-Hall index order 0*, *Kier shape index order 2*, *Kier shape index order 3*), de distribución de carga (PPSA-3, PNSA), y de energía (total, HOMO y LUMO) influyen en la capacidad de ceder protones o electrones en los 37 compuestos sintéticos nitrogenados evaluados, además la actividad de atrapamiento de radicales de estos compuestos se ve afectada por la posición y la naturaleza química de sus sustituyentes y de su facilidad de deslocalizar carga [142].

Tabla 34. Coeficientes de regresión, obtenidos para la correlación de la estructura y la capacidad atrapadora de radicales de los compuestos sintéticos nitrogenados, medida por el método del catión-radical ABTS⁺.

| Descriptores moleculares | B | Beta | R | R ² | F _{Calculado} | F _{tabulado} |
|---|-------|-------|------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Intercepto | 1,11 | | 0,97 | 0,95 | 6,4 | 1,51 |
| 1. N° átomos | 1,81 | 0,71 | | | | |
| 2. N° relativo de carbonos | 4,97 | 1,68 | | | | |
| 3. N° anillos | -3,04 | -1,26 | | | | |
| 4. N° anillos benceno | 0,37 | 0,32 | | | | |
| 5. N° enlaces aromáticos | -0,70 | -0,40 | | | | |
| 6. Randic index (order 1) | 0,60 | 0,30 | | | | |
| 7. Kier&Hall index (order 0) | -1,38 | -0,40 | | | | |
| 8. Kier shape index (order 2) | -5,62 | -2,99 | | | | |
| 9. Kier shape index (order 3) | -2,09 | -1,43 | | | | |
| 10. Information content (order 0) | 0,23 | 0,12 | | | | |
| 11. Complementary Information content (order 0) | 0,58 | 0,19 | | | | |
| 12. 3D-Kier shape index (order 2) | 0,91 | 0,40 | | | | |
| 13. 3D-Structural Information content (order 0) | 0,04 | 0,03 | | | | |
| 14. 3D-Information content (order 2) | 2,10 | 0,77 | | | | |
| 15. 3D-Complementary Information content (order 2) | 0,25 | 0,10 | | | | |
| 16. 3D-Structural Information content (order 2) | -0,44 | -0,29 | | | | |
| 17. Momento de inercia A | 0,59 | 0,27 | | | | |
| 18. PPSA-3 Atomic charge weighted PPSA [Empirical PC] | 2,57 | 1,16 | | | | |
| 19. PNSA-3 Atomic charge weighted PNSA [Empirical PC] | 1,11 | 0,48 | | | | |
| 20. DPSA-1 Difference in CPSAs (PPSA1-PNSA1) [Empirical PC] | -0,20 | -0,06 | | | | |
| 21. DPSA-3 Difference in CPSAs (PPSA3-PNSA3) [Empirical PC] | -0,65 | -0,34 | | | | |
| 22. Energía optimizada | -4,70 | -0,63 | | | | |
| 23. HOMO | 1,54 | 0,31 | | | | |
| 24. LUMO | -2,84 | -0,70 | | | | |
| 25. Momento dipolar | 0,62 | 0,22 | | | | |
| 26. Carga sobre el nitrógeno | -0,97 | -0,44 | | | | |

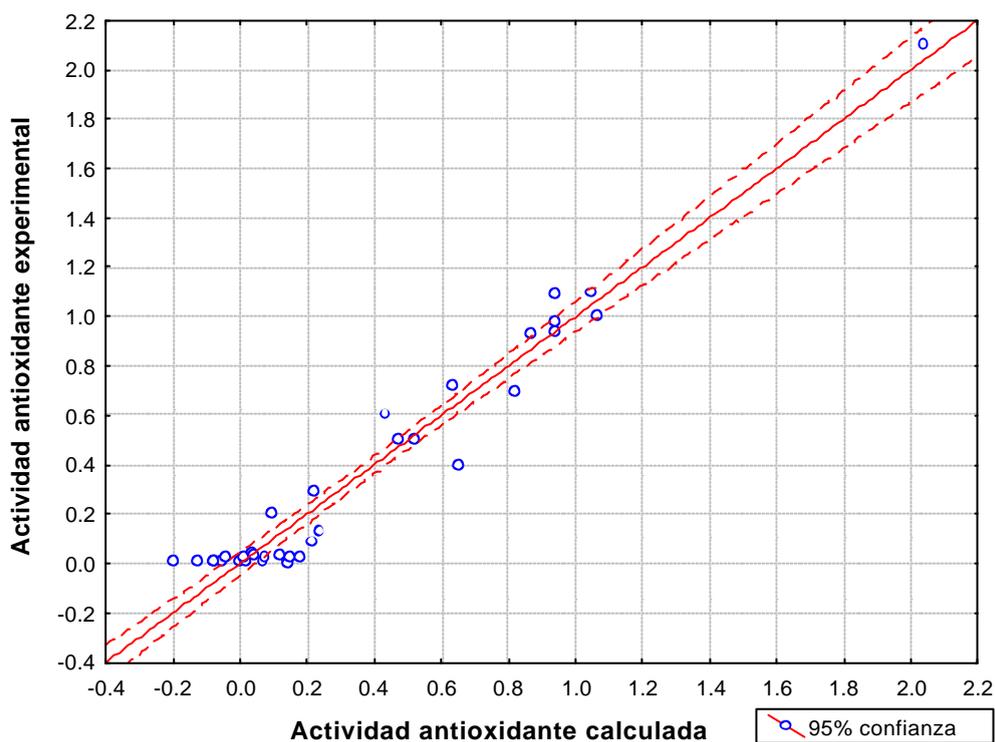
Tabla 35. Coeficientes de regresión obtenidos para los valores de EC₅₀ y los descriptores moleculares seleccionados.

| Descriptores moleculares | B | Beta | R | R ² | F _{Calculado} | F _{tabulado} |
|---|---------|------|------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Intercepto | -1105,4 | | 0,94 | 0,90 | 5.9 | 1.51 |
| 1. N° de átomos | 3345,1 | 6,7 | | | | |
| 2. N° relativo de carbonos | 979,0 | 1,7 | | | | |
| 3. N° anillos | 217,6 | 0,5 | | | | |
| 4. N° anillos de benceno | -436,7 | -1,9 | | | | |
| 5. N° enlaces aromáticos | -465,2 | -1,3 | | | | |
| 6. Randic index (order 1) | -1094,8 | -2,8 | | | | |
| 7. Kier&Hall index (order 0) | 121,7 | 0,2 | | | | |
| 8. Kier shape index (order 2) | 383,8 | 1,0 | | | | |
| 9. Kier shape index (order 3) | 1117,5 | 3,9 | | | | |
| 10. Information content (order 0) | -1052,8 | -2,8 | | | | |
| 11. Complementary Information content (order 0) | 47,5 | 0,1 | | | | |
| 12. 3D-Kier shape index (order 2) | -207,0 | -0,5 | | | | |
| 13. 3D-Structural Information content (order 0) | -45,6 | -0,2 | | | | |
| 14. 3D-Information content (order 2) | -986,5 | -1,8 | | | | |
| 15. 3D-Complementary Information content (order 2) | 241,7 | 0,5 | | | | |
| 16. 3D-Structural Information content (order 2) | 111,6 | 0,4 | | | | |
| 17. Momento de inercia A | -323,2 | -0,8 | | | | |
| 18. PPSA-3 Atomic charge weighted PPSA [Empirical PC] | -338,6 | -0,8 | | | | |
| 19. PNSA-3 Atomic charge weighted PNSA [Empirical PC] | -515,2 | -1,1 | | | | |
| 20. DPSA-1 Difference in CPSAs (PPSA1-PNSA1) [Empirical PC] | -45,9 | -0,1 | | | | |
| 21. DPSA-3 Difference in CPSAs (PPSA3-PNSA3) [Empirical PC] | 109,2 | 0,3 | | | | |
| 22. Energía optimizada | -867,8 | -0,6 | | | | |
| 23. HOMO | -223,1 | -0,2 | | | | |
| 24. LUMO | 1374,1 | 1,7 | | | | |
| 25. Momento dipolar | -29,1 | -0,1 | | | | |
| 26. Carga sobre el nitrógeno | 124,0 | | | | | |

Los coeficientes de correlación múltiple para estos dos modelos fueron altos (R² 0.95 y 0.90) y los F calculados (6.4 y 5.9) fueron mayores que los F tabulados (1.51 y 1.51), respectivamente, lo que indica que son significativos y la ecuación QSAR dada es confiable. La **Figura 61** muestra la correlación de los valores de

TEAC experimentales Vs teóricos de la capacidad de atrapar radicales de los compuestos sintéticos nitrogenados. Los datos correspondientes a esta figura están reportados en el **Anexo 4 (Tabla 8)**.

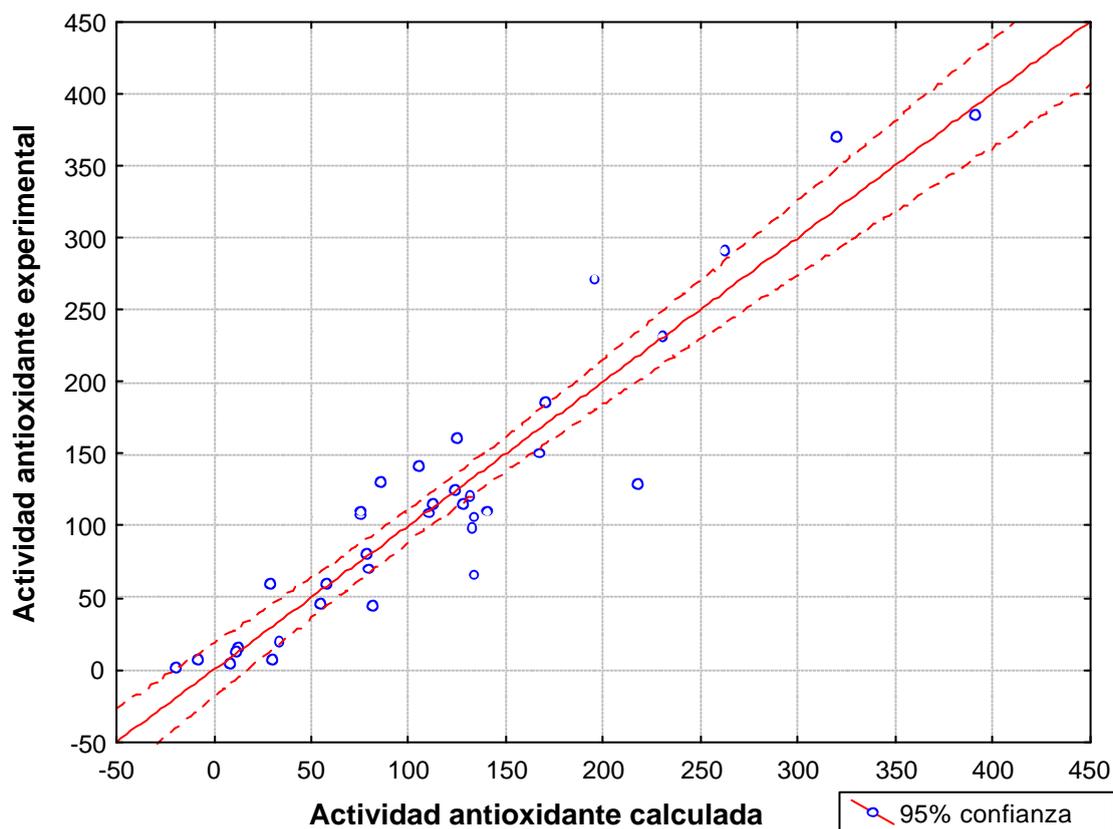
Figura 61. Correlación entre los valores de TEAC, obtenidos por el método ABTS⁺ y los calculados de los compuestos sintéticos nitrogenados



La correlación más alta entre la estructura y la actividad antioxidante en este modelo la presentaron los siguientes compuestos: 11, 13-15, 18-20, 31, 44, 41, 49-53, 56, 61 y 62 (Ver estructuras en la **Tabla 1** de la *Parte Experimental*).

La **Figura 62** muestra la correlación entre los valores de EC₅₀, obtenidos por el método DPPH y los calculados de los compuestos sintéticos nitrogenados por el método DPPH; el **Anexo 4 (Tabla 9)** presenta los datos correspondientes a esta figura.

Figura 62. Correlación entre los valores de EC_{50} obtenidos por el método DPPH y los calculados de los compuestos sintéticos nitrogenados.



La correlación más alta de la estructura con el EC_{50} de los compuestos correspondientes a este modelo la presentaron los compuestos 4-13, 15, 16, 20, 26, 27, 31, 49, 50, 53-56, 61, 65.

En conclusión, para los modelos obtenidos en este trabajo se observa que los descriptores comunes a todos ellos fueron: número de enlaces aromáticos (descriptor constitucional), momento dipolar (descriptor electrostático), energía optimizada, HOMO y LUMO (descriptores cuánticos) y, en general, estos últimos

presentaron los mayores coeficientes de regresión. Esto debido a que la actividad antioxidante de los compuestos estudiados involucra rompimiento de enlaces, *e.g.* las bencilaminas pueden atrapar el catión-radical ABTS⁺ o el radical DPPH, a través de la donación de electrones o hidrógenos [110-111]. Los modelos obtenidos en el presente trabajo, se pueden emplear para conocer la actividad antioxidante aproximada de moléculas con características estructurales similares a las utilizadas; así, es posible predecir la actividad antioxidante de una molécula, aún antes de ser sintetizada ésta.

3. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron las fracciones volátiles de cinco plantas colombianas, a saber: *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills, *Aloysia triphylla* (L'Héritier) Britton, *Lantana armata* Schauer, *Xylopia aromatica* Lamarck y *Satureja brownei* Briq, usando métodos destilativos (HD, MWHD), extractivos (SDE, SFE) y *headspace* (S-HS, P&T y SPME). La identificación de los compuestos se llevó a cabo usando criterios cromatográficos (tiempos de retención, índices de Kovàts) y de espectrometría de masas (EI, 70eV), así como compuestos patrón.

Los principales compuestos encontrados en los aceites esenciales y extractos se presentan en la **Tabla 36**.

- La composición de los metabolitos secundarios volátiles de las 5 plantas bajo estudio, de acuerdo con las principales familias de compuestos, presentó visibles diferencias. En la *L. alba*, predominaron monoterpenos (>30%) y monoterpenos oxigenados (ca. 60%); para la *A. triphylla*, la familia de compuestos mayoritarios fue la de monoterpenos oxigenados (>70%); la *L. armata*, por su parte, fue pobre en monoterpenos y sus análogos oxigenados: la mayoría de sus metabolitos secundarios fueron hidrocarburos sesquiterpénicos (ca. 60%) y sus derivados oxigenados (ca. 30%); en la *X. aromatica* predominaron los monoterpenos (ca. 94%), además se detectaron compuestos bencenoides (ca. 7%); y en la *S. brownei* fueron mayoritarios los monoterpenos oxigenados (>90%).
- La composición química de los aceites obtenidos por HD y MWHD fue similar, pero, para el mismo rendimiento del aceite, el tiempo para su obtención cuando se usó la radiación de microondas se redujo 4 veces.

• La composición de las fracciones volátiles de las plantas dependió de los métodos *headspace* empleados, el S-HS refleja más genuinamente la composición del olor propio de la planta, los métodos *headspace* P&T y HS-SPME incluyen una etapa de concentración, y, por ende, la composición de las fracciones volátiles obtenidas dependerá de los tiempos de purga (P&T) y de la exposición de la fibra (HS-SPME), respectivamente.

Tabla 36. Principales compuestos encontrados en los extractos de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei*.

| Planta | Cantidad relativa, % | | | | | Bencenoides |
|---------------------|---|--------------|-------------------------|----------------|---------------------------|-------------|
| | Compuestos principales | Monoterpenos | Monoterpenos oxigenados | Sesquiterpenos | Sesquiterpenos oxigenados | |
| <i>L. alba</i> | Limoneno (24-37%), carvona (41-57%), piperitona (1-2%), piperitenona (0.8-1%), biciclosesquifelandreno (5-22%). | 25-38 | 45-62 | 11-29 | 0.4-11 | - |
| <i>A. triphylla</i> | Nerol (2-5%), neral (19-22%), geraniol (2-6%), geranial (33-38%). | 0.1-3.6 | 66-77 | 11-20 | 7-10 | - |
| <i>L. armata</i> | <i>trans</i> - β -Cariofileno (14-15%), biciclosesquifelandreno (16-18%), α -Zingibereno (5-6%). | 4-17 | 3-5 | 56-61 | 17-31 | - |
| <i>X. aromatica</i> | α -Pino (6-8%), β -mirceno (5-9%), β -felandreno (34-65%), 4-isopropil-ciclohexen-1-ona (1-3%). | 64-94 | 2-6 | 0.1-8 | 3-7 | 3-7 |
| <i>S. brownei</i> | Mentona (16-32%), isomentona (3-5%), pulegona (54-71%). | 1-3 | 91-96 | 2-4 | 0.4-0.5 | - |

- Se determinó la concentración letal media, LC₅₀, de los aceites esenciales estudiados. La medición LC₅₀ se realizó 24 y 48 horas después de iniciado el ensayo con *Artemia salina*. El aceite esencial de *L. armata* fue el más tóxico (LC₅₀ = 2.1 y 3.8 µg/mL) frente a la *Artemia salina*. Los LC₅₀ para *A. triphylla*, *L. alba*, *X. aromatica* y *S. brownei* fueron, respectivamente, 6.9-19.7, 65.5-111.4, 36.4-53.6 y 76.1-111.4 µg/mL.
- Se realizó el estudio de la actividad antioxidante de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei*, éste se llevó a cabo en un sistema lipídico consistente en una emulsión de ácido linoleico, sometida a oxidación acelerada por Fe⁺² en presencia de O₂. El efecto protector (%) se midió por tres métodos diferentes, a saber: evaluando la disminución del hexanal tanto en la fase vapor de la emulsión, por HS-SPME con derivación directa sobre la fibra, como en la solución, usando extracción líquido-líquido y también determinando el porcentaje del ácido linoleico sin oxidar.
- El aceite esencial de *L. armata* presentó un efecto protector, a la misma concentración (10 g/L), igual o mayor de la vitamina E (62.4-75.9%) y del BHA (69.3-76%), seguido de la *L. alba* (74-78%), *A. triphylla* (71-72%), *X. aromatica* (68%) y *S. brownei* (34-45%).
- Los aceites esenciales y sus fracciones separadas por cromatografía en contracorriente, presentaron muy baja capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH, en comparación con sustancias antioxidantes como el ácido ascórbico, BHA, BHT y vitamina E. La actividad antioxidante de los aceites usados en este trabajo, no se realiza por atrapamiento de radicales, como un mecanismo principal. En el sistema lipídico usado activan, probablemente, otros mecanismos de protección contra la oxidación; entre éstos, el llamado “sacrificio” de terpenos o la oxidación más rápida de éstos, que la de ácidos

grasos, que reaccionan con especies reactivas de oxígeno; de esta manera, los terpenos “protegen” o retardan la oxidación del ácido linoleico.

- Los compuestos sintéticos nitrogenados evaluados presentaron diferente grado de protección contra la oxidación de la emulsión del ácido linoleico inducida por Fe^{+2} en la presencia de O_2 . Los compuestos que presentaron mayor efecto protector (92-97%) fueron la 4-N-(2-clorobencilamino)-4-(α -piridil)-1-buteno (92%), 5,5-dimetil-3-(β -piridil)-1,2,4,5-tetrahidro-3H-2-benzazepina (93.5%), 1,2,3,4-tetrahidro-6-cloro-4-metil espiro [quinolina-2-ciclohexano] (92%), N-(2-tienilmetil)-4-metilnilina, (97%), N-(2-tienilmetil)-2-anisidina (96%) y 4-(N-fenilamino)-4- α -tienil-1-buteno (96%) (Véase **Figura 63**). Los derivados de nitronas presentaron, en general, efecto protector alto, siendo las nitronas N-Óxido del 4-N-bencilamino-4-(γ -piridil)-1-buteno y N-Óxido del 4-N-(2-clorobencilamino)-4-(β -piridil)-1-buteno las más activas.

- Todas las sustancias nitrogenadas presentaron una capacidad de atrapamiento del ABTS^+ y del DPPH^{\cdot} baja. Sin embargo, el compuesto 6-fluoro-4-metil-2-propil-1,2,3,4-tetrahidroquinolina (Véase **Figura 63**) mostró una actividad (TEAC 2.2 ± 0.6) y EC_{50} (1.0 ± 0.3) igual o superior a la de los compuestos de referencia ácido ascórbico, BHA, BHT y vitamina E.

- Se estableció la relación cuantitativa entre la estructura de 70 compuestos sintéticos nitrogenados y su actividad antioxidante, medida como el efecto protector contra la oxidación de la emulsión del ácido linoleico. Las ecuaciones propuestas exhibieron un coeficiente de correlación R^2 , mayor de 0.9. Aunque se presentaron algunas excepciones, en los cinco modelos encontrados, el efecto protector antioxidante calculado fue similar al hallado experimentalmente. También se determinó la relación cuantitativa entre la estructura de los compuestos sintéticos nitrogenados (37 moléculas) y su actividad antioxidante, medida como la

capacidad de atrapar radicales (ABTS⁺ Y DPPH), los coeficientes de correlación de estos dos modelos (R^2 0.95 y 0.90) y los F calculados (6.4 y 5.9) fueron mayores de los F tabulados (1.5 y 1.5), lo que indica que son significativos. En la **Tabla 37** se indican los compuestos que presentaron mejor correlación entre la actividad antioxidante calculada y la hallada en los diferentes modelos.

Figura 63. Estructuras de los compuestos sintéticos nitrogenados que presentaron mayor actividad antioxidante.

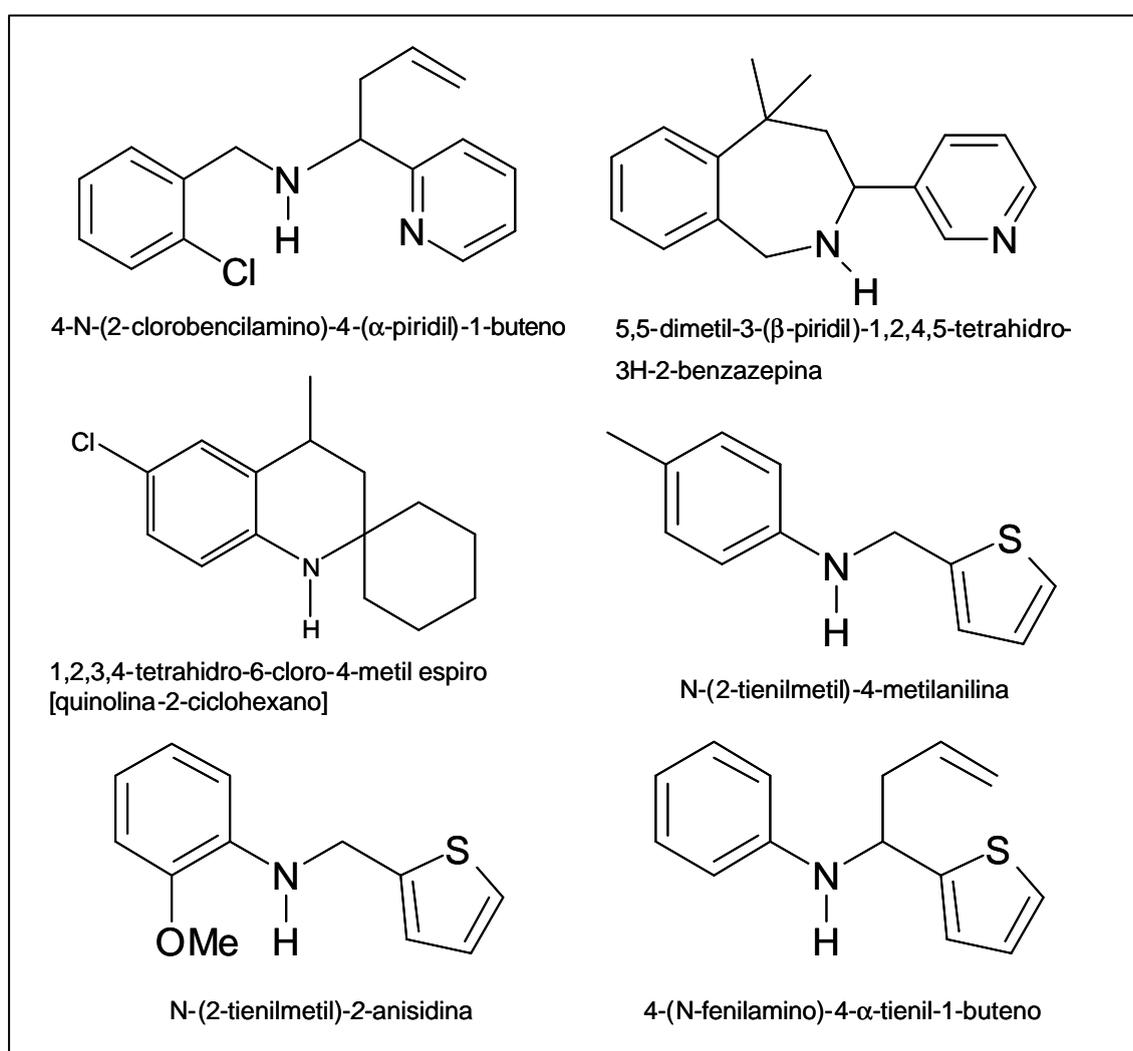
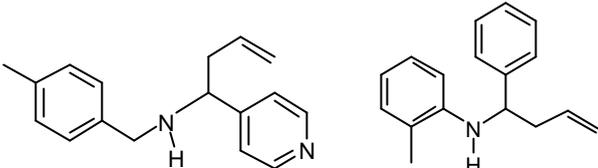
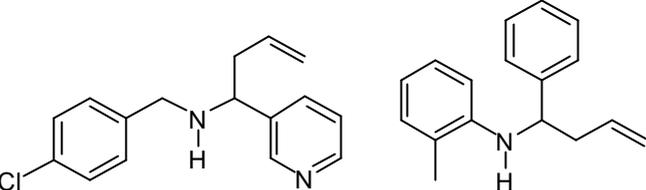
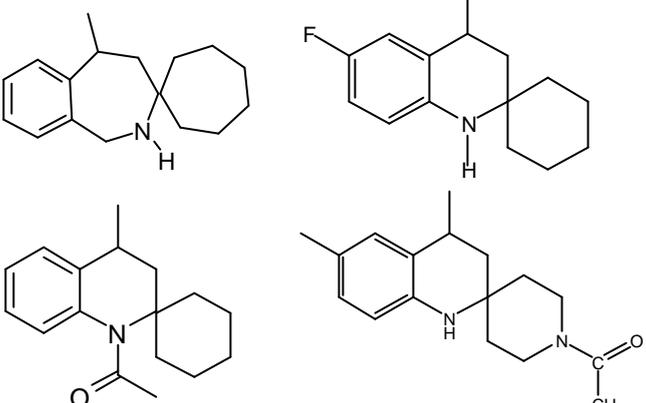
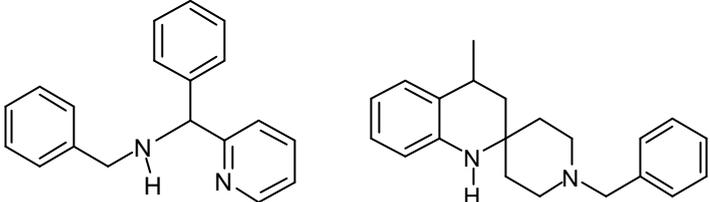
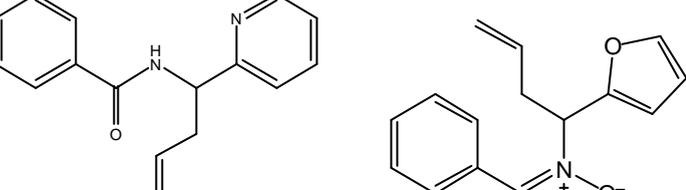
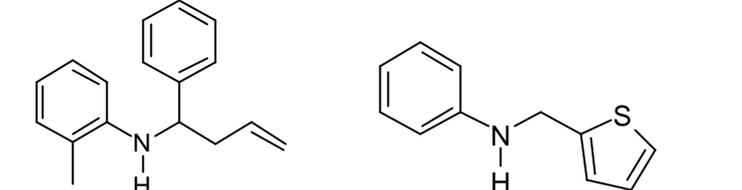
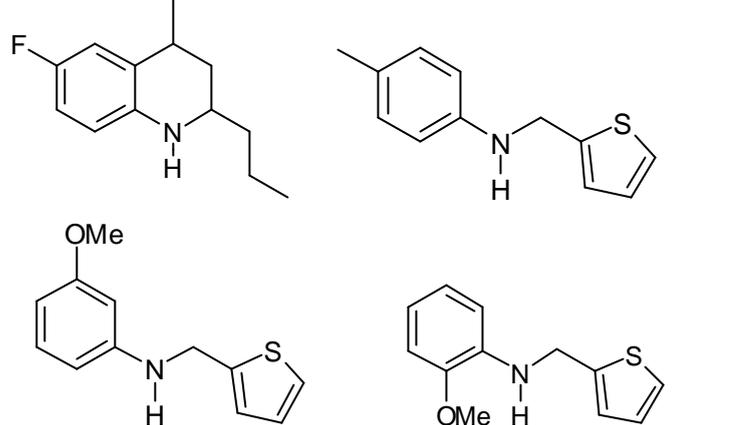
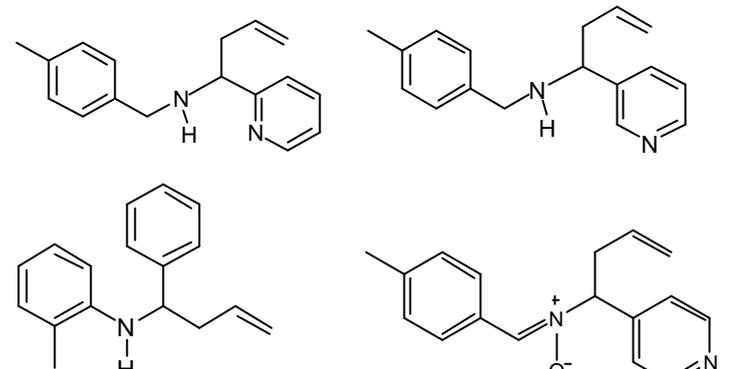


Tabla 37. Compuestos con mayor correlación para cada uno de los modelos obtenidos.

| Modelo | Número de Moléculas analizadas | Compuestos con mayor correlación |
|----------------|--------------------------------|--|
| Modelo general | 70 |  |
| Modelo 1 | 34 |  |
| Modelo 2 | 20 |  |
| Modelo 3 | 8 |  |
| Modelo 4 | 10 |  |

Continuación de la **Tabla 37**.

| | | |
|-------------------------------|----|--|
| Modelo 5 | 11 |  |
| Modelo para ABTS ⁺ | 37 |  |
| Modelo para DPPH [·] | 37 |  |

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GARGÍA B, H., **1992**. Flora Medicinal de Colombia, Tercer Mundo, Bogotá, Tomo II, p.p. 495, 498 y Tomo III p.p. 37.
2. GUPTA, MP. (Ed.), **1995**. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas; CYTED-SECAB, Editorial Presencia, Santa Fe de Bogotá, p.p. 554-559.
3. SIANI, A.S.; TAPPIN, M.; RAMOS, M.; MAZZEI, J.L., **2002**. "Linalool from *Lippia alba*: study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity". *J. Agric. Food Chem.*, 50, p.p. 3518-3521.
4. ZÉTOLA, M.; DELIMA, T.C.M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ-ORTEGA, C., **2002**. "CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba*-Verbenaceae (Brazilian false *Melissa*)". *J. Ethnopharm.*, 82, p.p. 207-215.
5. PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M.E.; VILLAR, A., **2001**. "Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)". *Il Farmaco*, 56, p.p. 501-504.
6. GUERRERO, M.F.; PUEBLA, P.; CARRON, R; MARTÍN, M.L., **2002**. "Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some colombian medicinal plants". *J. Ethnopharm.* 80, p.p. 37-42.
7. PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M.E.; VILLAR, E., **2001**. "*Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review". *J. Ethnopharm.*, 76, p.p. 201-214.
8. PINO, J.A., ORTEGA, A.G., ROSADO, A., RODRÍGUEZ, M., and BALUJAR, R., **1997**. "Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown". *Rev. Cubana Farm.*, 30, p.p. 1-8.
9. SENATORE, F.; RIGANO, D., **2001**. "Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala". *Flavour Fragr. J.*, 16, p.p. 169-171.

10. BAHL, J.R.; GARG, S.N.; SINGH, S.C.; BANSAL, R.P.; NAQVI, A.A.; KUMAR, S., **2000**. "Composition of linalool-rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plains". *Flavour Fragr. J.*, **15**, p.p. 199-200.
11. BAHL, J.R.; SHWETASINHA, A.; NAQVI, A.A.; BANSAL, R.P., **2002** "Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*". *Flavour Fragr. J.*, **17**, p.p. 127-132.
12. LORENZO, D, PAZ, D.; DAVIES, P.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E., **2001**. "Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay". *Flavour Fragr. J.*, **16**, p.p. 356-359.
13. VALE, J.; MATOS, F.J.A.; DE LIMA, T.C.M.; VIANA, G.S.B., **1999**. "Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes". *J. Ethnopharm.* **67**, p.p. 127-133.
14. ZOGHBI, M.D.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S., **1998**. "Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E Br. grown wild in the Brazilian Amazon". *Flavour Fragr. J.* **13**, p.p. 47-48.
15. MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J., **1996**. "The essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil". *J. Essent. Oil Res.* **8**, p.p. 695-698.
16. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E. and MARTÍNEZ, J.R., **2003**. "Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia *Verbenaceae*". *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, **27**, p.p. 579-597.
17. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E. and MARTÍNEZ, J.R., **2004**. "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". *Chromatogr. A.*; **1025**, p.p. 93-103.
18. AZCON-BIETO, J. y TALON, M. (Ed.) **1993**. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*, Interamericana - McGraw-Hill, Madrid, p. 132.

19. PÉREZ, S.G.; ZAVALA, M.A.; VARGAS, R.; PÉREZ, C., and PÉREZ, R.M., **1998**. "Antidiarrheal activity of C-9 aldehyde isolated from *Aloysia triphylla*". *Phytotherapy Research*, 12, p.p. S45-S46.
20. GUERRERA, P.M.; LEPORATTI, M.L.; FODDAI, S.; MORETTO, D, and MERCANTINI, R., **1995**. "Antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia citriodora* Kunth. (*Aloysia triphylla* Britton)". *Rev. Italiana EPPOS.*, 15, p.p. 23-25.
21. WANNMACHER, L.; FUCHS, F.D.; PAOLI, C.L.; FILMAN, C.H.; GIANLUPI, A.; LUBIANCA, N., **1990**. "Plants employed in the treatment of anxiety and insomnia: II. Effect of infusions *Aloysia triphylla* on experimental anxiety in normal volunteers". *Fitoterapia*, 61, p.p. 449-453.
22. NAKAMURA, I.; OKUYAMA, E.; TSUKADA, A.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M.; NISHIBE, S.; DEYAMA, T., **1997**. "Acteoside as the analgesic principle of cedron (*Lippia triphylla*), a peruvian medicinal plant". *Chem. Pharm. Bull.*, 45, p.p. 499-504.
23. VOGEL, H.; SILVA, M.L. and RAZMILIC, I., **1999**. "Seasonal fluctuation of essential oil content in Lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton) *Acta Horticult.*, 500, p.p. 75-79.
24. CARNAT, A.; CARNAT, A.P.; FRAISSE, D.; and LAMAISON, J.L., **1999**. "The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea". *Fitoterapia*, 70, p.p. 44-49.
25. BANDONI, A. (Ed.), **2000**. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. CYTED. Editorial de la Universidad de La Plata, La Plata, 410 p.
26. ZYGADLO, J.A.; LAMARQUE, A.L.; MAESTRI, D.M.; GUZMÁN, C.A., and GROSSO, N.R., **1995**. "Composition of the flower oils of some *Lippia* and *Aloysia* species from Argentina". *J. Essent. Oil Res.*, 7, p.p. 593-595.
27. ZYGADLO, J.A.; LAMARQUE, A.L.; MAESTRI, D.M.; GUZMÁN, C.A GROSSO, N.R., and ARIZA-ESPINAR, L., **1994**. "Volatile constituents of *Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton)". *J. Essent. Oil Res.*, 6, p.p. 407-409.
28. BRASIL E SILVA, G.A., **1979**. "O oleo esencial de *Lippia citriodora* Kunth, do Rio Grande do sul". *Trib. Farm.*, 47, p.p. 3-5.

29. BELLAKHDAR, J.; IL IDRISSE, A.; CAÑIGUERAL, S.; IGLESIAS, J., and VILA, R., **1994**. "Composition of lemon verbena *Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton) oil of Moroccan origin". *J. Essent. Oil Res.*, 6, p.p. 523-526.
30. ÖZEK, T.; KIRIMER, N.; BASER, K.H.C., and TUMEN, G., **1996**. "Composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton grown in Turkey". *J. Essent. Oil Res.*, 8, p.p. 581-583.
31. KIM, N, S. and LEE, D. S., **2004**. "Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry". *J. Sep. Sci.*, 27, p.p. 89-95.
32. O'NEIL, M.J.; LEWIS, J.A.; NOBLE, M.; *et al.*, **1998**. "Isolation of translactona-containing triterpenes with thrombin inhibitory activities from leaves *Lantana camara*". *J. Nat. Prod.*, 61, p.p. 1328-1331.
33. BOUDA, H.; TAPONDJOU, L.A.; FONTEM, D.A.; GUMEDZOE, M.Y.D., **2001**. "Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera Curculionidae)". *J. Stor. Res.*, 37, p.p. 103-109.
34. ADEBAYO, T. A.; GBOLADE, A. A.; OLAIFA, J. I., **1999**. "Comparative study of toxicity of some essential oils to larvae of three mosquito species". *Niger. J. Nat. Prod. Med.*, 3, p.p. 74-76.
35. BEGUM, S.; WAHAB, A.; SIDDIQUI, B.S.; QAMAR, F., **2000**. "Nematicidal constituents of the parts of *Lantana camara*". *J. Nat. Prod.*, 63, p.p. 765-767.
36. DEENA, M.J. and THOPPIL, J.E., **2000**. "Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*". *Fitoterapia*, 71, p.p. 453-455.
37. WEYERSTAL, P.; MARSCHALL, H.; ECKHARDT, A. and CHRISTINASEN, C., **1999**. "Constituents of commercial Brazilian *Lantana* oil". *Flavour Fragr. J.*, 14, p.p. 15-28.
38. SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; LUZ, A.I.R.; SILVA, J.D., and MAIA, J.G.S., **1999**. "The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in North Brazil". *Flavour Fragr. J.*, 14, p.p. 208-210.

39. NGASSOUM, M.B.; YONKEAU, S.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G., **1999**. "Chemical composition of essential oils of *Lantana camara* leaves flowers from Cameroon and Madagascar ". *Flavour Fragr. J.*, 14, p.p. 245-250.

40. FATHY, M.M., **2000**. "Comparative study of essential oils of the leaves and flowers of certain *Lantana* species growing in Egypt". *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.*, 38, p.p. 105-118.

41. SEFIDKON, F., **2002**. "Essential oil of *Lantana camara* L. occurring in Iran". *Flavour Fragr. J.*, 17, p.p. 78-80.

42. KHAN, M.; SRIVASTAVA, S. K.; SYAMASUNDAR, K.; SINGH, V. M.; NAQVI, A. A., **2002**. "Chemical composition of leaf and flower essential oil of *Lantana camara* from India". *Flavour Fragr. J.*, 17, p.p. 75-77.

43. CORREA, J.E y BERNAL, H.Y., **1989**. *Especies Vegetales Promisorias de los países del Convenio Andrés Bello*. Editorial Guadalupe, Bogotá, Tomo I, p.p. 269-271. Tomo X, p.p. 179-183.

44. EKUNDAYO. O., **1989**. "A Review of the Volatiles of the *Annonaceae*". *J. Essent. Oil Res.*, 1, p.p. 223-245.

45. SCHIEBERLE, P.; TAIRU, A.O. and HOFMANN, T., **1999**. "Characterization of the key aroma compounds in dried fruits of the west african Peppertree *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich (*Annonaceae*) using aroma extract dilution analysis". *J. Agric. Food Chem.*, 47, p.p. 3285-3287.

46. JÜRGENS, A.; WEBBER, A. and GOTTSBERGER, G., **2000**. "Floral scent compounds of amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips". *Phytochem.*, 55, p.p. 551-558.

47. MORAES, M.P. and ROQUE, N.E., **1988**. "Diterpenes from the fruits of *Xylopia aromatica*". *Phytochem.*, 27, p.p. 3205-3208.

48. FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; CHARLES, B.; FOURNIAT, J.; LEBOEUF, M., and CAVÉ, A., **1994**. "Chemical and biological studies of *Xylopiya aromatica* stem bark and leaf oils". *Planta Med.*, 60, p.p. 283-284.
49. PINO, J.; BELLO, A.; GARCÍA, S., **2000**. "Leaf oil of *Xylopiya aromatica* Lam. Mart. from Cuba". *J. Essent. Oil Res.*, 12 (6), p.p. 751-752.
50. STASHENKO, E.E. MARTÍNEZ, J.R. and JARAMILLO, B.E., **2004**. "Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiya aromatica* (Lamarck) by different extractive and headspace methods and gas chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1025, p.p. 105-113.
51. ROJAS, L.B. and USUBILLAGA, A., **2000**. "Composition of the Essential Oil of *Satureja brownei* (Sw.) Briq. from Venezuela". *Flavour Fragr. J.*, 15, p.p. 21-22.
52. PINO, J.; ESTARRON, M. and FUENTES, V., **1997**. "Essential Oil of *Satureja brownei* grown in Cuba". *J. Essent. Oil Res.*, 9, p.p. 595-596.
53. VITURRO, C.I.; MOLINA, A.; GUY, I.; CHARLES, B.; GUINAUDEAU, H., and FOURNET, A., **2000**. "Essential oils of *Satureja boliviana* and *S. parvifolia* growing in the region of Jujuy, Argentina". *Flavour Fragr. J.*, 15, p.p. 377-382.
54. SENATORE, F., URRUNAGA, S., URRUNAGA, R., DELLA PORT, G., and DE FEO, V., **1998**. "Essential oils from two Peruvian *Satureja* species". *Flavour Fragr. J.*, 13, p.p. 1-4.
55. BERTHOD, A (Ed.). **2002**. Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. 38: Countercurrent chromatography: the support free liquid stationary phase". Elsevier Science B.V, Amsterdam, 397 p.
56. FISCHER, N.; WEINREICH, B.; NITZ, S., and DRAWERT, F., **1991**. "Applications of high-speed counter-current chromatography for the separation and isolation of natural products". *J. Chromatogr. A.*, 538, p.p. 193-202.
57. PUERTAS, M.A.; HILLEBRAND, S.; STASHENKO, E.; WINTERHALTER, P. **2002**. "In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil". *Flavour Fragr. J.*, 17, p.p. 380-384.

58. AGUILERA, L.; NAVARRO, A.; TACORONTE, J.E.; LEYVA, M. y MARQUETTI., **2003**. "Efecto letal de myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae)". *Rev. Cubana Med. Trop.*, **55**, 100-104.
59. www.avocadosource.com/books/cisnerosfausto/CPA_9_PG_148-231.pdf. Página Web consultada el 2 de julio del 2004.
60. www.monografias.com/trabajos14/dosil-letal/dosis-letal.shtml/#RESUM. Página Web consultada el 2 de julio de 2004.
61. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE AGRICULTURAL, RESEARCH SERVICE OFFICE OF INTERNATIONAL RESEARCH PROGRAMS-AUSTRALIAN BIOLOGICAL CONTROL LABORATORY. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation Division of Entomology. Annual Report, **2001**, p.p. 16-17. <http://www.ars-grin.gov/ars/SoAtlantic/aust/2001annual.pdf>
62. TISSERAND, R.; BALACS, T.; CALDWELL, J., **1999**. Essential Oil Safety. Harcourt Publishers Limited, London, p.p. 115-200.
63. RISCH, S. J. and CHI-TANG HO (Eds.) **1997**. Spices: flavor chemistry and antioxidant properties, ACS, Washington, 253 p.
64. ABURJARAI, T. and NATSHEH, F.M., **2003**. "Plants used in cosmetics". *Phytotherapy Res.*, **17**, p.p. 987-1000.
65. POKORNY, J., YANISHLIEVA, N. AND GORDON, M., **2001**. Antioxidants in Food., Woodhead Publishing Limited, CRC, Press, Cambridge, p.p. 11-33, 45, 71-84, 148-155, 244-247.
66. MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S. and SALUNKHE, D.K. (Eds.), **1996**. Food Antioxidants: technological, and health perspectives, Marcel Dekker, Inc., New York, p.p. 6-9, 41, 86-106.
67. HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. **1989**. Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford, 543 p.
68. GUTTERIDGE, J. and HALLIWELL, B., **1994**. Antioxidants in nutrition; health and disease, Oxford University Press, N.Y, 143 p.

69. MOYA, M.; MENDOZA, D. and AMEZQUITA, F., **1999**. "Analytical evaluation of polyunsaturated fatty acids degradation during thermal oxidation of edible oils by fourier transform infrared spectroscopy". *Talanta*, 50, p.p. 269-275.
70. HENDERSON, D.E. and SLICKMAN, M., **1999**. "Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: a comparative study against BHT and melatonin". *J. Agric. Food Chem.*, 47, p.p 2563-2570.
71. STASHENKO, E.E.; FERREIRA, C.; SEQUEDA, G.; MARTÍNEZ, J.R., and WONG, J.W., **1997**. "Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatography analysis of volatile carbonyl compounds". *J. Chromatogr. A*, 779, p.p. 360-369.
72. LOIDL-STAHLOFEN, A., HANNEMANN, A. and SPITELLER, G., **1994**. "Generation of α -hydroxyaldehydic compounds in the course of lipid peroxidation". *Biochim. Biophys. Acta*, 1213, p.p. 140-148.
73. LOIDL-STAHLOFEN, A. and SPITELLER, G., **1994**. " α -Hydroxyaldehydes, products of lipid peroxidation". *Biochim. Biophys. Acta*, 1211, p.p. 156-160.
74. MLAKAR, A. and SPITELLER, G., **1994**. "Reinvestigation of lipid peroxidation of linolenic acid". *Biochim. Biophys. Acta*, 1214, p.p. 209-220.
75. TOMITA, M., OKUYAMA, T., HATTA., Y. and KAWAI, S., **1990**. "Determination of free malondialdehyde by gas chromatography with an electron-capture detector". *J. Chromatogr. A*, 526, p.p. 174-179.
76. DEIGHTON, N., MAGILL, W., BREMNER, D.H., and BENSON, E.E., **1997**. "Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal in plant tissue cultures: LC-MS determination of 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives". *Free Rad. Res.*, 27, p.p. 255.-265.
77. LIU, J., YEO, H.C., DONIGER, S.J., and AMES B.N., **1997**. "Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid". *Anal. Biochem.*, 245, p.p. 161-166.

78. FARAG, R.S.; ALI, M.N. and TAHA, S.H., **1998**. "Use of some essential oils as natural preservatives for butter". *Grasas y Aceites*, 39, p.p. 28-30.
79. ZYGADLO, J.A.; LAMARQUE, A.L.; MAESTRI, D.M. and GROSSO, N.R., **1995**. "Empleo de aceites esenciales como antioxidantes naturales". *Grasas y Aceites*, 46, p.p. 285-288.
80. TIPSRIKOND, N.; FERNANDO, L.N. and CLARKE, A.D., **1998**, "Antioxidant effects of essential oil and oleoresin of black pepper from supercritical carbon dioxide extractions in ground pork". *J. Agric. Food Chem.*, 46, p.p. 4329-4333.
81. GRAßMANN, J.; HIPPELI, S., DORNISH, K.; ROHNERT, U.; BEUSCHER, N., **2000**. "Antioxidant properties of essential oils: possible explanations for their anti-inflammatory effects". *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 50, p.p. 135-139.
82. GRAßMANN, J.; SCHNEIDER, D.; WEISER, D. and ELSTNER, E.F., **2001**. "Antioxidative effects of lemon oil and its components on copper induced oxidation of low density lipoprotein". *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 51, p.p. 799-805.
83. DAMIEN, H.J.; FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G.; DEANS, S.G., **2000**. "In Vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components". *Flavour Fragr. J.*, 15, p.p. 12-16.
84. DAMIEN-DORMAN, H.J.; SURAI, P. and DEANS, S.G., **2000**. "In vitro antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents". *J. Essent. Oil Res.*, 12, p.p. 241-248.
85. TEISSEDRE, P.L. and WATERHOUSE, A.L., **2000**. "Inhibition of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties". *J. Agric Food Chem.*, 48, p.p. 3801-3805.
86. CHOI, H.S.; SONG, H.S; UKEDA, H. and SAWAMURA, M., **2000**. "Radical scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl". *J. Agric. Food Chem.*, 48, p.p. 4156-4161.
87. VARDAR-ÜNLÜ, G.; CANADAN, F.; SÖKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M., **2003**. "Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et ey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae)". *J. Agric. Food Chem.*, 51, p.p. 63-67.

88. BOTSOGLOU, N.; GOVARIS, A.; BOTSOGLOU, E., **2003**. "Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored Turkey meat". *J. Agric. Food Chem.*, 51, p.p. 2930-2936.
89. BADUI, S., **1996**. Química de los Alimentos. Alhambra Mexicana, México, p.p. 251-256, 259-269.
90. STASHENKO, E.E.; PUERTAS, M.A. and MARTÍNEZ, J.R., **2002**. "SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of *in vitro* antioxidant activity". *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, p.p. 70-74.
91. STASHENKO, E.E.; PUERTAS, M.A.; SALGAR, W.; DELGADO, W., and MARTÍNEZ, J. R., **2000**. "Solid-phase microextraction with on fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds". *J. Chromatogr. A*, 886, p.p. 175-181.
92. STASHENKO, E.E.; FERREIRA, C.; SEQUEDA, G.; MATEUS, A.; CERVANTES, M., and MARTÍNEZ, J.R., **1997**. "Desarrollo de un método para monitoreo de la degradación oxidativa en lípidos y evaluación de la actividad antioxidante de productos naturales". *Arte y Ciencia Cosmética*, 12, p.p. 20-27.
93. HAMILTON, R.J and HAMILTON, S., 1992. Lipid analysis: A practical approach. Oxford University press, Oxford, p.p. 47-78.
94. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1990. Fatty acids in oils and fats, preparation of methyl esters. AOAC 965.33, 965.49, Virginia, p.p. 963-965.
95. RUBERTO, G. and BARATTA, M.T., **2000**. "Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems". *Food Chem.*, 69 p.p. 167-174.
96. SIMIC, M.G., **1981**. "Free radical mechanisms in autoxidation processes". *J. Chem. Educ.*, 58, p. 125.
97. FOTI, M.C. and INGOLD, K.U., **2003**. "Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by γ -terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant". *J. Agric. Food Chem.*, 51, p.p. 2758-2765.

98. SOAREZ, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M., **2003**. "Sequestering ability of butylated hydroxitoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E againsts ABTS⁺, DPPH[•], and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems". *J. Agric. Food Chem.*, 51, p.p. 1077-1080.
99. GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D.M., and KADER, A.A., **2000**. "Antioxidant activity of Pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing". *J. Agric. Food Chem.*, 48, p.p. 4581-4589.
100. KOLEVA, I.; NIEDERLANDER, H.A.G.; VAN BEEK, T.A., **2001**. "Application of ABTS⁺ radical cation for selective on-line detection of radical scavenger in HPLC eluates". *Anal. Chem.*, 73, p.p. 3373-3381.
101. FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A., **1999**. "Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines". *J. Agric. Food Chem.*, 47, p.p. 1035-1040.
102. YU, T.W. and ONG, CHN., **1999**. "Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application, and limitation". *Anal. Biochem.*, 275, p.p. 217-223.
103. RUIZ-LARREA, M.G.; MARTIN, C.; MARTINEZ, R.; NAVARRO, R.; LACORT, M., and MILLER, N.J., **2000**. "Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens". *Chem. Phys. Lipids.*, 105, p.p. 179-188.
104. VAN DER BERG, R.; HAENEN, R.M.M.; VEN DER BERG, H.; VEN DER VIJGH, W., and BAST, A., **2000**. "The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay". *Food Chem.*, 70, p.p. 391-395.
105. BANDONIENE, D. and MURKOVIC, M., **2002**. "On line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica L.*)". *J. Agric. Food Chem.*, 50, p.p. 2482-2487.

106. SAWAI, Y. and MOON, J.H., **2000**. "NMR Analytical approach to clarify the molecular mechanism of the antioxidative and radical-scavenging activities of antioxidants in tea using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl". *J. Agric. Food Chem.*, 48, p.p. 3247-6253.
107. GOUPY, P.; DUFOUR, C.; LOONIS, M., and DANGLES, O., **2003**. "Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical". *J. Agric. Food Chem.*, 51, p.p. 615-622.
108. DA PORTO, C.; CALLIGARIS, S.; CELOTTI, E., and NICOLI, M.C., **2000**. "Antiradical properties of commercial Cognacs assessed by the DPPH Test". *J. Agric. Food Chem.*, 48, p.p. 4241-424.
109. MILLER, E; RIGELHOF, F.; MARQUART, L.; PAKASH, A., and KANTER, M., **2000**. "Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables". *J. Amer. Coll. Nutrit.*, 19, p.p. 312S-319S.
110. RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M., and RICE-EVANS, C., **1999**. "Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay". *Free Rad. Biol. Med.*, 26, p.p. 1231-1237.
111. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E. and BERSET, C., **1995**. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". *Lebens. Wiss. U.Technol.*, 28, p.p. 25-30.
112. KOUZNETSOV, V.; PALMA, A.; SALAS, S., *et al.*, **1997**. "Chemistry of functionalized benzazepines. 5 [1]. Synthesis and chemical transformation of the 1,2,4,5-Tetrahydrospiro-[3H-2-benzazepine-3,1'-cycloalkanes]. *J. Heterocyclic Chem.*, 34, p.p. 1591-1595
113. PALMA, A., ROZO, W.; STASHENKO, E., *et al.*, **1998**. "4-Methyl-3,4-dihydrospiro[cycloheptane-1',2(1H)-quinoline] and 4-methyl-3,4-dihydrospiro[cyclooctane-1',2(1H)-quinoline]. Synthesis of derivatives and chemical transformations". *J. Heterocyclic Chem.*, 35, p.p. 183-188.
114. MACDONALD, G. J.; BRANCH, C. L.; HADLEY, M. S.; JOHNSON, C. N., *et al.*, **2003**. "Design and Synthesis of *trans*-3-(2-(4-((3-(3-(5-Methyl-1,2,4-oxadiazolyl)) phenyl) carboxamido) cyclohexyl) ethyl)-7-methylsulfonyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine (SB-

- 414796): A Potent and Selective Dopamine D₃ Receptor Antagonist". *J. Med. Chem.*, **46**, p.p. 4952-4964.
115. KOUZNETSOV, V.; URBINA, J.; PALMA, A.; LÓPEZ, S., *et al.*, **2000**. "Synthesis and *in vitro* antifungal properties of 4-aryl-4-N-arylamine-1-butenes and related compounds". *Molecules*, **5**, p.p. 428-430.
116. KOUZNETSOV, V.; PALMA, A.; SALAS, S., *et al.*, **2000**. "Synthesis of new 4-allyl-4-N-benzylaminopiperidines and their spirocyclic products". *Heterocycl. Commun.*, **6**, p.p. 519-523.
117. LEY, J. P., **2001**. "Phenolic acid amides of phenolic benzylamines against UVA-induced oxidative stress in skin". *Internat. J. Cosmetics Sci.*, **23**, p.p. 35-48.
118. FEVIG, T.; BOWEN, S. M.; JANOWICK, D. A.; JONES, B. K., and MUNSON, R., **1996**. "Design, synthesis and *in vitro* evaluation of cyclic nitrones as free radical traps for the treatment of stroke". *J. Med. Chem.*, **39**, p.p. 4988-4996.
119. HAZELL, J.E. and RUSSELL, E., **1958**. "The reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl with secondary amines". *Can. J. Chem.*, **36**, p.p. 1729-1734.
120. MCGOWAN, J.C.; POWELL, T. and RAW, R., **1959**. "The rates of reaction of α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl with certain amines and phenols". *J. Amer. Chem. Soc.*, **630**, p.p. 3103-3110.
121. PRATT, D.A.; DILABIO, G.A.; VALGIMIGLI, L.; PEDULLI, G.F., and INGOLD, K.U., **2002**. "Substituent effects on the bond dissociation enthalpies of aromatic amines". *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, p.p. 11085-11092.
122. FILLA, S. A.; WINTER, M. A.; JOHNSON, K. W., *et al.*, **2002**. "Ethyl 3*S*,4*aR*,6*S*,8*aR*)-6-(4-Ethoxycarbonylimidazol-1-ylmethyl)decahydroisoquinoline-3-carboxylic ester: A prodrug of a GluR5 kainate receptor antagonist active in two animal models of acute migraine". *J. Med. Chem.*; **45**, p.p. 4383-4386.
123. HEWAWASAM, P.; FAN, W.; DING, M., *et al.*, **2003**. "4-Aryl-3-(hydroxyalkyl)quinoline-2-ones: novel maxi-K channel opening relaxants of corporal smooth muscle targeted for erectile dysfunction". *J. Med. Chem.*, **46**, p.p. 2819-2822.

124. THOMAS, C.E.; BERNARDELLI, P.; BOWEN, S.M., *et al.*, **1996**. "Cyclic nitron free radical traps: Isolation, identification, and synthesis of 3,3-dimethyl-3,4-dihydroisoquinoline-4-ol N-oxide, a metabolite with reduced side effects". *J. Med. Chem.*, 39, p.p. 4997-5004.
125. MEYER, T. and GEFFKEN, D., **2004**. "Synthesis and antiprotozoal activity of [1,3]oxazino[4,5,6-de]quinolines". *Pharmazie*, 59, p.p. 593-596.
126. GORLITZER, K.; GABRIEL, B.; FROHBERG, P., *et al.*, **2004**. "Thieno[2,3-c]quinolines synthesis and biological investigation". *Pharmazie*, 59, p.p. 439-442.
127. RAMHARTER, M.; WERNSDORFER, W.H. AND KREMSNER, P.G., **2004**. "In vitro activity of quinolines against *Plasmodium falciparum* in Gabon". *Acta Trop.* 90, p.p. 55-60.
128. BHATTACHARJEE, A.K.; HARTELL, MG.; NICHOLS, D.A., *et al.*, **2004**. "Structure-activity relationship study of antimalarial indolo [2,1-b]quinazoline-6,12-diones (tryptanthrins). Three dimensional pharmacophore modeling and identification of new antimalarial candidates". *Eur. J. Med. Chem.*, 39, p.p. 59-67.
129. ABDEL-AZIZ, A.S.; EL-AGRODY, A.M., and BEDAIR, A.H., *et al.*, **2004**. "Synthesis of hydroxyquinoline derivatives, amino-hydroxychromene, aminocoumarin and their antibacterial activities". *Heterocycles*, 63, p.p. 1793-1801.
130. GRISAR, J. M.; BOLKENIUS, F. N.; PETTY, M. A., and VERNE, J., **1995**. "2,3-Dihydro-1-benzofuran-5-ols as analogues of α -tocopherol that inhibit *in vitro* and *ex vivo* lipid autoxidation and protect mice against central nervous system trauma". *J. Med. Chem.*, 38, p.p. 453-458.
131. GOLDSTEIN, S.; and LESTAGE, P., **2000**. "Chemical and pharmacological aspects of heteroaryl-nitrones". *Curr. Med. Chem.*, 7, p.p. 1255-1267.
132. KRISHNA, M.; DEGRAFF, W.; HANKOVSKY, O.H.; SÁR, C.P.; KÁLAI, T.; JEKÓ, J.; RUSSO, A.; MITCHELL, J.B., and HIDEG, K., **1998**. "Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage". *J. Med. Chem.*, 41, p.p. 3477-3492.

133. HENSLEY, K.; TABATABAIE, T.; STEWART, CH. A.; PYE, Q., and FLOYD, R. A., **1997**. "Nitric oxide and derived species as toxic agents in stroke, AIDS dementia, and chronic neurodegenerative disorders". *Chem. Res. Toxicol.*, 10, p.p. 527-532.
134. KOTAKE, Y. and JANZEN, E. G., **1991**. "Decay and fate of the hydroxyl radical adduct of α -phenyl-N-tert-butyl nitron in aqueous media". *J. Am. Chem. Soc.*, 113, p.p. 9503-9506.
135. BECKER, D. A.; LEY, J. J.; ECHEGOYEN, L., and ALVARADO, R., **2002**. "Stilbazulenyl nitron (STAZN): a nitronyl-substituted hydrocarbon with the potency of classical phenolic chain-breaking antioxidants". *J. Am. Chem. Soc.*, 124, p.p. 4678-4684.
136. ZOU, X.J.; JIN, G.Y., and ZHANG, Z.X., **2002**. "Synthesis, Fungicidal Activity, and QSAR of Pyridazinonethiadiazoles". *J. Agric. Food Chem.*, 50, p.p. 1451-1454.
137. SERGEDIENÉ, E.; JONSON, K.; SZYMUSIA, K.; TYRAKOWSKA, B.; RIETJENS, I., and CENAS, N., **1999**. "Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships". *FEBS Letters*, 462, p.p. 392-396.
138. GRODNITZKY, J.A. and COATS, J.R., **2002**. "QSAR evaluation of monoterpenoids insecticidal activity". *J. Agric. Food Chem.*, 50, p.p. 4576-4580.
139. DEARDEN, J. C. and GHAFOURIAN, T., **1999**. "Hydrogen bonding parameters for QSAR: Comparison of indicator variables, hydrogen bond counts, molecular orbital and other parameters". *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 39, p.p. 231-235.
140. FORESMAN, J.B. and FRISCH, E., **1996**. "Exploring chemistry with electronic structure methods". *Gaussian, Inc.*, Pittsburg, 301p.
141. YOUNG, D., **2001**. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to real-World Problems*. Wiley-Interscience, N.Y, 381 p.
142. KARELSON, M., **2000**. *Molecular descriptors in QSAR/QSPR*. Wiley-Interscience, N.Y, p.p. 1-11, 141-292.
143. FORESMAN, J. B. and FRISCH, E., **1996**. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, Second Edition*, Gaussian, Inc., Pittsburgh, 301 p.

144. MEDVEN, Z.; GÜSTEN, H. and SABLJIC, A., **1996**. "Comparative QSAR study on hydroxyl radical reactivity with unsaturated hydrocarbons: PLS versus MLR". *J. Chemometrics*, **10**, p.p. 135-147.
145. LIVINGSTONE, D., **1995**. *Data analysis for Chemist: Applications to QSAR and chemical product design*, Oxford University Press Inc., New York, p.p. 2, 57, 121-125.
146. COLÓN, D.; WEBER, E.J.; BAUGHMAN, G.L., **2002**. "Sediment-associated reactions of aromatic amines. 2. QSAR development". *Environ. Sci. Technol.*, **36**, p.p. 2443-2450.
147. BOX, G.E.P.; HUNTER, W, G., and HUNTER, J.S., **1978**. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building*, John Wiley & Sons, New York, p.p. 636-640.

ANEXO 1

Publicaciones y participaciones en Congresos científicos

PUBLICACIONES:

E.E. Stashenko, J.R. Martínez and B.E. Jaramillo., **2003**. “Comparación de la composición química y la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia *Verbenaceae*”. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 27 (105), p.p. 579-597.

E.E. Stashenko, J.R., Martínez and B.E. Jaramillo., **2004**. “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*, 1025, p.p. 93-103.

E.E. Stashenko, J.R. Martínez and B.E. Jaramillo., **2004**. “Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiya aromatica* (Lamarck) by different extractive and headspace methods and gas chromatography”. *J. Chromatogr. A*, 1025, p.p.105-113.

E.E. Stashenko, J.R. Martínez and B.E. Jaramillo., **2004**. “Estudio de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales de tres plantas de la familia *Verbenaceae*”. *Revista Arte y Ciencia Cosmética*, 15 (27), p.p.16-25.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES:

E.E. Stashenko, J.R. Martínez y B.E. Jaramillo. Ponencia: “Análisis por HRGC/FID/MSD de compuestos volátiles y semivolátiles en *Lippia alba* Mill”. XII Congreso Colombiano de Química, Asociación Química Colombiana, Bogotá, septiembre 5-7, 2001.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES:

E.E. Stashenko, W.A, Delgado and B.E. Jaramillo. "Comparison of *Lippia alba* (Mill) extracts obtained by different isolation techniques, using HRGC-MSD". 24th *International Symposium on Capillary Chromatography and Electrophoresis*, Las Vegas, EE.UU., mayo 20-24, 2001.

E.E. Stashenko, J.R. Martínez y B.E. Jaramillo. "Determinación por HRGC/FID/MSD de compuestos volátiles y semivolátiles en *Xylopia aromatica* Lam.". IX Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines COLACRO, Cartagena de Indias, Colombia, febrero 20-22, 2002.

E.E. Stashenko, J.R. Martínez y B.E. Jaramillo. "Determinación por HRGC/FID/MSD de compuestos volátiles y semivolátiles en *Lippia alba* Mill.". IX Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines COLACRO, Cartagena de Indias, Colombia, febrero 20-22, 2002.

E.E. Stashenko, J.R. Martínez y B.E. Jaramillo. "Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Lippia alba* Mill, determinando compuestos carbonílicos volátiles por HRGC/ECD y metilésteres de ácidos grasos por HRGC/FID". IX Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines COLACRO, Cartagena de Indias, Colombia, febrero 20-22, 2002.

E.E. Stashenko, J.R. Martínez and B.E. Jaramillo. "HRGC/FID/MSD Analysis of secondary metabolites from *Lippia alba* Mill and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity". 25th *International Symposium on Capillary Chromatography*, Riva del Garda, Italia, mayo 13-17, 2002.

E.E. Stashenko, J.R Martínez and B.E Jaramillo. "HRGC/FID/MSD Analysis of secondary metabolites isolated from *Xylopia aromatica* by different extraction

techniques". *25th International Symposium on Capillary Chromatography*, Riva del Garda, Italia, mayo 13-17, 2002.

E.E. Stashenko, J.R. Martínez and B.E. Jaramillo. "Prediction of the antioxidant activity of some synthetic heterocyclic compounds". *3rd Int. Symposium on Separations in Bioscience SBS 2003*, Russian Academy of Sciences, "100 years of Chromatography", Moscú, Rusia, mayo 13-18, 2003.

E.E. Stashenko, J.R. Martínez and B.E. Jaramillo. "Chromatographic analysis and comparison of volatile fractions obtained from tropical plants by different extraction and headspace methods". *3rd Int. Symposium on Separations in Bioscience SBS 2003*, Russian Academy of Sciences, "100 years of Chromatography", Moscú, Rusia, mayo 13-18, 2003.

B.E. Jaramillo, J.D. Molina, C. Durán, J.R. Martínez and E.E. Stashenko. "HS-SPME Determination of trace level compounds in essential oils". *3rd Int. Symposium on Separations in Bioscience SBS 2003*, Russian Academy of Sciences, "100 years of Chromatography", Moscú, Rusia, mayo 13-18, 2003.

E.E. Stashenko, J.R. Martínez and B.E. Jaramillo. "Análisis de compuestos volátiles y semivolátiles de tres plantas de la familia *Verbenaceae* y evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de sus aceites esenciales". XVI Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, COLAMIQC, Cartagena de Indias, Colombia, septiembre 15-18, 2003.

E.E. Stashenko, J.R. Martínez and B.E. Jaramillo. "Obtención por diferentes técnicas análisis de metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de *Satureja brownei* Briq. colombiana y evaluación de su actividad antioxidante *in vitro*". XVI Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, COLAMIQC, Cartagena de Indias, Colombia, septiembre 15-18, 2003.

E.E. Stashenko, J.R. Martínez and B.E. Jaramillo. "Análisis cromatográfico y evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de compuestos volátiles y semivolátiles de frutos de *Xylopia aromatica* Lam.". XVI Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, COLAMIQC, Cartagena de Indias, Colombia, septiembre 15-18, 2003.

Jaramillo, B.E.; Stashenko, E.E.; Martínez, J.R.; Winterhalter, P. "HRGC/FID/MSD Analysis of Secondary Volatile Metabolites from three *Verbenaceae* Plants and Evaluation of the *in Vitro* Antioxidant Activity". *GDCh-Jahrestagung Chemie 2003*, 32 Deutscher Lebensmittelchemikertag, München, Alemania, octubre 6-11, 2003.

Elena E. Stashenko, Beatriz E. Jaramillo, Jairo René Martínez. "Comparative study of volatile extract composition from three aromatic plants (*Verbenaceae* Fam.)". *25th International Symposium on Chromatography*, Paris, Francia, octubre 4-8, 2004.

Elena E. Stashenko, Beatriz E. Jaramillo, Jairo René Martínez. "Comparative study of volatile extract composition from three aromatic plants (*Verbenaceae* Fam.)". *Tenth Latin American Congress on Chromatography and Related Techniques*, Campos do Jordão, Brasil, octubre 18-22, 2004.

Premios: E.E. Stashenko, B.E. Jaramillo y J.R. Martínez. Conferencia plenaria: "Volátiles y semivolátiles de 3 plantas de la familia *Verbenaceae* y evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de sus aceites esenciales", ganadora del **Premio de la Cámara de Productos de Aseo y Cosméticos de la ANDI**. XVI Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, COLAMIQC, Cartagena de Indias, Colombia, septiembre 15-18, 2003.

ANEXO 2

Contribuciones de cada compuesto de *L. alba*, *L. armata*, *A. triphylla*, *X. aromatica* y *S. brownei* a los componentes principales, usados para clasificar las fracciones volátiles obtenidas por las diferentes técnicas de extracción.

Anexo 2-Tabla 1. Contribuciones a los componentes principales de cada uno de los constituyentes de las fracciones volátiles de *L. alba*, obtenidas por diferentes técnicas de extracción.

| N° | Compuesto | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 |
|-----------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | α -Pinoeno | 0.000261 | 0.064404 | 0.028094 |
| 2 | Canfeno | 0.016286 | 0.044750 | 0.015372 |
| 3 | β -Mirceno | 0.009986 | 0.041340 | 0.000163 |
| 4 | Limoneno | 0.012573 | 0.038341 | 0.001020 |
| 5 | (Z)- β -Ocimeno | 0.047142 | 0.010846 | 0.005876 |
| 6 | Óxido de pinoeno | 0.034041 | 0.001272 | 0.053285 |
| 7 | <i>cis</i> -Tuyona | 0.031512 | 0.001344 | 0.015771 |
| 8 | Óxido de limoneno | 0.044731 | 0.032437 | 0.023341 |
| 9 | <i>trans</i> -Dihidrocarvona | 0.030982 | 0.027793 | 0.016629 |
| 10 | Pulegona | 0.047021 | 0.014160 | 0.010956 |
| 11 | Carvona | 0.026021 | 0.033976 | 0.018330 |
| 12 | Piperitona | 0.030405 | 0.033460 | 0.000531 |
| 13 | Geranial | 0.008500 | 0.001564 | 0.199198 |
| 14 | <i>trans</i> -Óxido de carvona | 0.016182 | 0.038486 | 0.000770 |
| 15 | <i>trans</i> -Acetato de carveilo | 0.037128 | 0.017503 | 0.006455 |
| 16 | Piperitenona | 0.022865 | 0.041600 | 0.000233 |
| 17 | β -Bourboneno | 0.047262 | 0.017151 | 0.001091 |
| 18 | α -Copaeno | 0.015514 | 0.051424 | 0.000007 |
| 19 | β -Cubebeno | 0.041919 | 0.021497 | 0.008252 |
| 20 | γ -Elemeno | 0.000861 | 0.050943 | 0.031069 |
| 21 | β -Cedreno | 0.047368 | 0.015887 | 0.004097 |
| 22 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 0.048582 | 0.014270 | 0.004027 |
| 23 | α -Humuleno | 0.007276 | 0.058343 | 0.018616 |
| 24 | β -Farneseno | 0.048297 | 0.015307 | 0.001956 |
| 25 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0.049093 | 0.012685 | 0.007102 |

Continuación del **Anexo 2-Tabla 1.**

| | | | | |
|----|--------------------------------|----------|----------|----------|
| 26 | Germacreno D | 0.027658 | 0.020178 | 0.039892 |
| 27 | Biciclosesquifelandreno | 0.029094 | 0.039049 | 0.004470 |
| 28 | Germacreno A | 0.002689 | 0.064508 | 0.020558 |
| 29 | β -Bisaboleno | 0.049921 | 0.013150 | 0.001137 |
| 30 | Cubebol | 0.023442 | 0.006137 | 0.036325 |
| 31 | δ -Cadineno | 0.005400 | 0.025532 | 0.133739 |
| 2 | α -Bisaboleno | 0.005400 | 0.025532 | 0.133739 |
| 33 | Óxido de cariofileno | 0.040074 | 0.024423 | 0.004345 |
| 34 | Germacreno B | 0.026108 | 0.014874 | 0.009977 |
| 35 | Óxido de α -humuleno | 0.029857 | 0.018063 | 0.009188 |
| 36 | Cedranona | 0.033148 | 0.022242 | 0.000650 |
| 37 | <i>epi</i> - α -Murolol | 0.005400 | 0.025532 | 0.133739 |

Anexo 2-Tabla 2. Contribuciones a los componentes principales de cada uno de los constituyentes de las fracciones volátiles de *A. triphylla*, obtenidas por diferentes técnicas de extracción.

| N° | Componente | Factor 1 | Factor 2 |
|----|-------------------------------------|----------|----------|
| 1 | Fencheno | 0.038015 | 0.032964 |
| 2 | 1-Octen-3-ol | 0.008384 | 0.017652 |
| 3 | 6-Metil-5-hepten -2-ona | 0.000138 | 0.014907 |
| 4 | 3-Octand | 0.053393 | 0.008830 |
| 5 | Limoneno | 0.014754 | 0.057797 |
| 6 | 1,8-Cineol | 0.004830 | 0.085443 |
| 7 | <i>cis</i> - β -Ocimeno | 0.036898 | 0.036243 |
| 8 | Linalool | 0.027422 | 0.005371 |
| 9 | <i>cis</i> -Fotocitral | 0.023986 | 0.004790 |
| 10 | <i>trans</i> -Fotocitral | 0.009099 | 0.065039 |
| 11 | Mentol | 0.058252 | 0.000641 |
| 12 | Terpinen-4-ol | 0.038236 | 0.033347 |
| 13 | α -Terpineol | 0.044528 | 0.012935 |
| 14 | Dihidrocitronelol | 0.006843 | 0.070833 |
| 15 | Nerol | 0.042626 | 0.025308 |
| 16 | Neral | 0.050716 | 0.000010 |
| 17 | Geraniol | 0.035845 | 0.037383 |
| 18 | Geranial | 0.045425 | 0.022021 |
| 19 | <i>cis</i> -Acetato de verbenilo | 0.035029 | 0.038749 |
| 20 | α -Copaeno | 0.057103 | 0.000684 |
| 21 | β -Burboneno | 0.021491 | 0.056685 |
| 22 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 0.033685 | 0.004464 |
| 23 | β -Copaeno | 0.005304 | 0.049338 |
| 24 | <i>ar</i> -Curcumeno | 0.013958 | 0.066186 |
| 25 | <i>epi</i> -Biciclosesquifelandreno | 0.026551 | 0.049268 |
| 26 | Biciclogermacreno | 0.021130 | 0.046557 |
| 27 | γ -Cadineno | 0.030309 | 0.043195 |
| 28 | β -Sesquifelandreno | 0.000219 | 0.037937 |
| 29 | Nerolidol | 0.038015 | 0.032964 |

Continuación del Anexo 2-Tabla 2.

| | | | |
|----|----------------------|----------|----------|
| 30 | Espatulenol | 0.023973 | 0.025957 |
| 31 | Óxido de cariofileno | 0.030941 | 0.024681 |
| 32 | Cedranona | 0.031127 | 0.004789 |
| 33 | γ - Eudesmol | 0.036482 | 0.006496 |
| 34 | α -Muurolol | 0.035283 | 0.006242 |
| 35 | α -Cadinol | 0.018943 | 0.002343 |
| 36 | Cariofilenol | 0.025069 | 0.003438 |

Anexo 2-Tabla 3. Contribuciones a los componentes principales de cada uno de los constituyentes de las fracciones volátiles de *L. armata*, obtenidas por diferentes técnicas de extracción.

| N° | Compuesto | Factor 1 | Factor 2 |
|-----------|------------------------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 3-Hexenol | 0.020093 | 0.026751 |
| 2 | α -Tuyeno | 0.019118 | 0.031098 |
| 3 | α -Pino | 0.016663 | 0.031970 |
| 4 | Sabineno | 0.019995 | 0.027427 |
| 5 | 3-Octenol | 0.011782 | 0.041124 |
| 6 | β -Pino | 0.010196 | 0.039960 |
| 7 | β -Mirceno | 0.012298 | 0.015903 |
| 8 | Octan-3-ol | 0.010370 | 0.008617 |
| 9 | α -Felandreno | 0.011345 | 0.004820 |
| 10 | <i>p</i> -Cimeno | 0.011374 | 0.005788 |
| 11 | 1,8-Cineol | 0.017174 | 0.006935 |
| 12 | Limoneno | 0.007000 | 0.004000 |
| 13 | <i>trans</i> - β -Ocimeno | 0.008795 | 0.004904 |
| 14 | γ -Terpineno | 0.013965 | 0.006182 |
| 15 | Terpinoleno | 0.018413 | 0.006193 |
| 16 | Linalool | 0.021628 | 0.005383 |
| 17 | Nerol | 0.011308 | 0.001328 |
| 18 | Neral | 0.016933 | 0.001493 |
| 19 | Geraniol | 0.014545 | 0.033109 |
| 20 | Geranial | 0.008577 | 0.002381 |
| 21 | δ -Elemeno | 0.000020 | 0.002425 |
| 22 | β -Bourboneno | 0.011427 | 0.001399 |
| 23 | β -Cubebeno | 0.004267 | 0.072838 |
| 24 | α -Cedreno | 0.020503 | 0.000377 |
| 25 | <i>trans</i> - β -carofileno | 0.002848 | 0.077444 |

Continuación del Anexo 2-Tabla 3.

| | | | |
|----|-----------------------------------|----------|----------|
| 26 | Aromadendreno | 0.000399 | 0.091559 |
| 27 | α -Humuleno | 0.004354 | 0.090917 |
| 28 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0.016494 | 0.017002 |
| 29 | γ -Himahaleno | 0.011973 | 0.056437 |
| 30 | Germacreno D | 0.000020 | 0.111909 |
| 31 | <i>ar</i> -Curcumeno | 0.000477 | 0.002130 |
| 32 | Biciclosesquifelandreno | 0.019534 | 0.012846 |
| 33 | α -Zingibereno | 0.009379 | 0.000390 |
| 34 | E,E- α -Farneseno | 0.021883 | 0.012519 |
| 35 | γ -Bisaboleno | 0.026705 | 0.000871 |
| 36 | <i>cis</i> -Calameneno | 0.024447 | 0.000002 |
| 37 | δ -Cadineno | 0.017037 | 0.001177 |
| 38 | Nerolidol | 0.003416 | 0.059582 |
| 39 | α -Calacoreno | 0.022692 | 0.000061 |
| 40 | Elemol | 0.020103 | 0.002140 |
| 41 | δ -Calacoreno | 0.025280 | 0.005662 |
| 42 | Ledol | 0.024834 | 0.006255 |
| 43 | Óxido de himachaleno | 0.024725 | 0.005391 |
| 44 | Germacrenol | 0.023922 | 0.004172 |
| 45 | Óxido de cariofileno | 0.021606 | 0.001281 |
| 46 | <i>trans</i> - β -elemenona | 0.024645 | 0.006360 |
| 47 | Óxido de humuleno | 0.019940 | 0.004067 |
| 48 | Sesquilandulol | 0.017529 | 0.001475 |
| 49 | β -Óxido de himachaleno | 0.021748 | 0.003262 |
| 50 | Cedranona | 0.021819 | 0.003903 |
| 51 | <i>epi</i> - γ -Eudesmol | 0.021513 | 0.002619 |
| 52 | Cubenol | 0.019805 | 0.002624 |
| 53 | γ -Eudesmol | 0.022431 | 0.006718 |

Continuación del Anexo 2-Tabla 3.

| | | | |
|----|--------------------------------|----------|----------|
| 54 | β -Acorenol | 0.020408 | 0.004294 |
| 55 | <i>epi</i> - α -Cadinol | 0.024824 | 0.005563 |
| 56 | Himachalol | 0.023700 | 0.005778 |
| 57 | α -Cadinol | 0.020253 | 0.002592 |
| 58 | Dihidroeudesmol | 0.019499 | 0.002377 |
| 59 | Isocedranol | 0.018605 | 0.002533 |
| 60 | Óxido de bisaboleno | 0.019008 | 0.002121 |
| 61 | Acarenona | 0.005003 | 0.000012 |
| 62 | Germacrona | 0.021582 | 0.004190 |
| 63 | β -Sinensal | 0.005003 | 0.000012 |
| 64 | Farnesol | 0.005003 | 0.000012 |
| 65 | Acetato de cariofilenilo | 0.014762 | 0.001340 |

Anexo 2- Tabla 4. Contribuciones a los componentes principales de cada uno de los constituyentes de las fracciones volátiles de *X. aromatica*, obtenidas por diferentes técnicas de extracción.

| N° | Compuesto | Factor 1 | Factor 2 |
|----|-----------------------------------|----------|----------|
| 1 | α -Tuyeno | 0.00045 | 0.00009 |
| 2 | α -Pineno | 0.02714 | 0.28795 |
| 3 | Canfeno | 0.00062 | 0.00096 |
| 4 | β -Pineno | 0.00142 | 0.00008 |
| 5 | β -Mirceno | 0.02409 | 0.15517 |
| 6 | <i>p</i> -Menta-1(7),8-dieno | 0.00540 | 0.36886 |
| 7 | α -Felandreno | 0.00141 | 0.03189 |
| 8 | Δ^3 -Careno | 0.00062 | 0.00465 |
| 9 | α -Terpineno | 0.00129 | 0.00000 |
| 10 | <i>p</i> -Cimeno | 0.00153 | 0.00024 |
| 11 | Limoneno | 0.00002 | 0.00175 |
| 12 | β -Felandreno | 0.89413 | 0.06724 |
| 13 | <i>cis</i> - β -Ocimeno | 0.00087 | 0.00071 |
| 14 | <i>trans</i> - β -Ocimeno | 0.00107 | 0.00001 |
| 15 | γ -Terpineno | 0.00113 | 0.00047 |
| 16 | <i>cis</i> -Hidrato de sabineno | 0.00143 | 0.00004 |
| 17 | Fenchona | 0.00102 | 0.00186 |
| 18 | α -Terpinoleno | 0.00149 | 0.00003 |
| 19 | <i>trans</i> -Hidrato de sabineno | 0.00135 | 0.00005 |
| 20 | Fenchol | 0.00123 | 0.00019 |
| 21 | α -Canfolenal | 0.00137 | 0.00010 |
| 22 | Hidrato de canfeno | 0.00133 | 0.00005 |
| 23 | Citronelal | 0.00138 | 0.00060 |
| 24 | Óxido de pineno | 0.00138 | 0.00071 |
| 25 | Felandral | 0.00119 | 0.00215 |
| 26 | Tujanol | 0.00118 | 0.00022 |
| 27 | Terpinen-4-ol | 0.00091 | 0.00509 |
| 28 | 4-Isopropil-2-ciclohexen-1-ona | 0.00013 | 0.00091 |
| 29 | Metil acetato de bencilo | 0.00113 | 0.00352 |

Continuación del Anexo 2-Tabla 4.

| | | | |
|----|--------------------------------------|---------|---------|
| 30 | α -Terpineol | 0.00111 | 0.00140 |
| 31 | Óxido de felandreno | 0.00103 | 0.00184 |
| 32 | <i>cis</i> -Piperitol | 0.00110 | 0.00181 |
| 33 | Mirtenol | 0.00094 | 0.00326 |
| 34 | Salicilato de metilo | 0.00027 | 0.00505 |
| 35 | 4-Isopropil benzaldehído | 0.00044 | 0.00079 |
| 36 | <i>trans</i> -Piperitol | 0.00123 | 0.00227 |
| 37 | Citronelol | 0.00120 | 0.00225 |
| 38 | <i>i-Pr</i> -Bencenmetanol | 0.00090 | 0.00377 |
| 39 | α -Cubebeno | 0.00044 | 0.00365 |
| 40 | α -Copaeno | 0.00093 | 0.00246 |
| 41 | <i>cis</i> - α -Bergamoteno | 0.00104 | 0.00331 |
| 42 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 0.00077 | 0.00440 |
| 43 | <i>trans</i> - α -Bergamoteno | 0.00091 | 0.00444 |
| 44 | <i>cis</i> - β - Farneseno | 0.00102 | 0.00386 |
| 45 | Germacreno D | 0.00129 | 0.00227 |
| 46 | δ -Guaieno | 0.00089 | 0.00131 |
| 47 | Espatuleno | 0.00114 | 0.00324 |
| 48 | Guaiol | 0.00116 | 0.00169 |
| 49 | Sesquiterpenol | 0.00110 | 0.00195 |
| 50 | β -Eudesmol | 0.00111 | 0.00237 |
| 51 | Sesquiterpenol | 0.00095 | 0.00522 |
| 52 | Hidrocarburo, Cn > 18 | 0.00136 | 0.00178 |

Anexo 2-Tabla 5. Contribuciones a los componentes principales de cada uno de los constituyentes de las fracciones volátiles de *S. brownei*, obtenidas por diferentes técnicas de extracción.

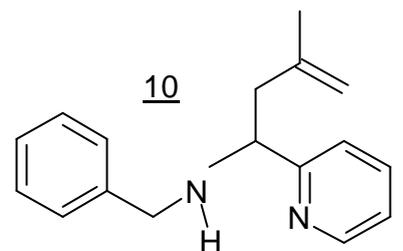
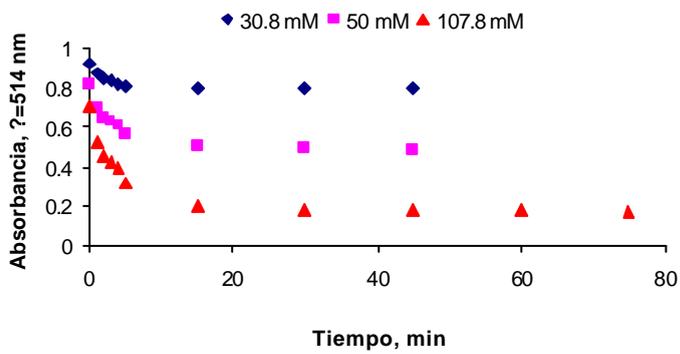
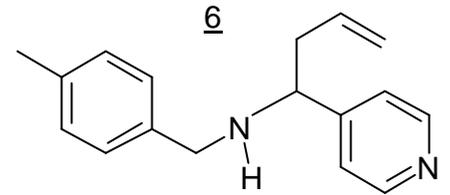
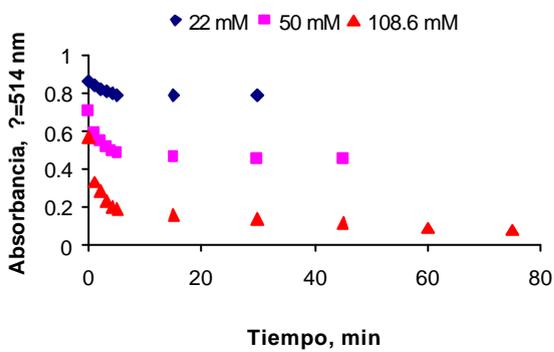
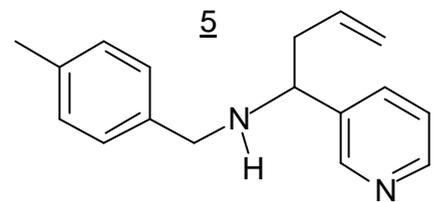
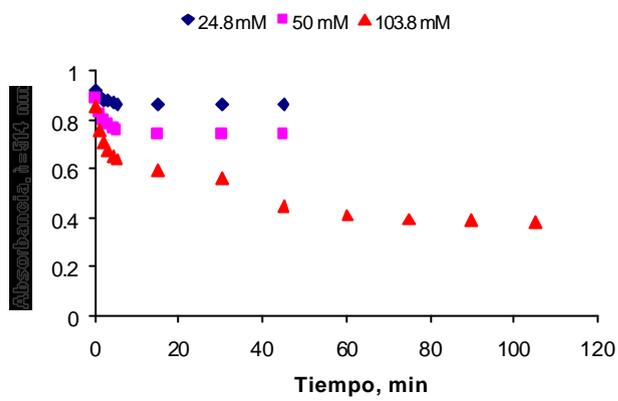
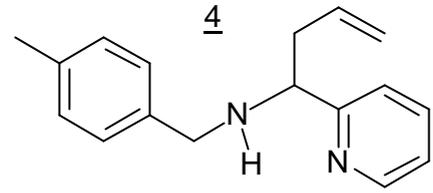
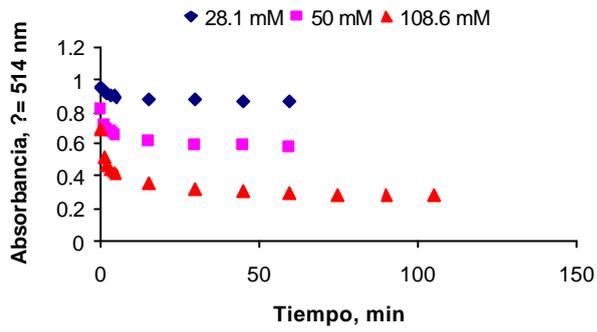
| ° | Compuesto | Factor 1 | Factor 2 |
|----|-------------------------------------|----------|----------|
| 1 | α -Tuyeno | 0.016117 | 0.000495 |
| 2 | α -Pino | 0.044671 | 0.042453 |
| 3 | Sabineno | 0.035247 | 0.049140 |
| 4 | <i>trans</i> - <i>p</i> -mentano | 0.019873 | 0.021660 |
| 5 | β -Pino | 0.045127 | 0.040725 |
| 6 | 3-Octanona | 0.043997 | 0.039986 |
| 7 | β -Mirceno | 0.029691 | 0.013496 |
| 8 | 3-Octanol | 0.023273 | 0.001373 |
| 9 | <i>p</i> -Menta-1(7)dieno | 0.030893 | 0.011460 |
| 10 | Limoneno | 0.054491 | 0.023605 |
| 11 | α -Felendreno | 0.030011 | 0.020958 |
| 12 | 1,8-Cineol | 0.037481 | 0.027092 |
| 13 | Linalool | 0.008776 | 0.044907 |
| 14 | Mentona | 0.035352 | 0.004573 |
| 15 | Isomentona | 0.037754 | 0.002782 |
| 16 | Isomentol | 0.043510 | 0.037425 |
| 17 | α -Terpineol | 0.055908 | 0.019558 |
| 18 | Piperitol | 0.046448 | 0.030532 |
| 19 | Pulegona | 0.002365 | 0.110091 |
| 20 | Piperitona | 0.052078 | 0.024529 |
| 21 | Timol | 0.029679 | 0.010043 |
| 22 | <i>p</i> -Meten-9-ol | 0.030312 | 0.030415 |
| 23 | Acetato de mentilo | 0.045969 | 0.021180 |
| 24 | Carvacrol | 0.033940 | 0.029800 |
| 25 | Acetato de terpinilo | 0.030312 | 0.030415 |
| 26 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 0.000210 | 0.058447 |
| 27 | Geranil acetona | 0.040408 | 0.034877 |
| 28 | α -Humuleno | 0.002806 | 0.060254 |
| 29 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0.000119 | 0.100827 |

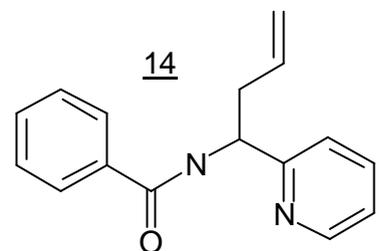
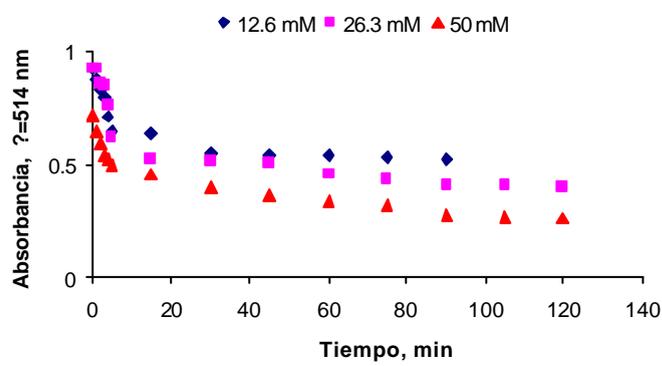
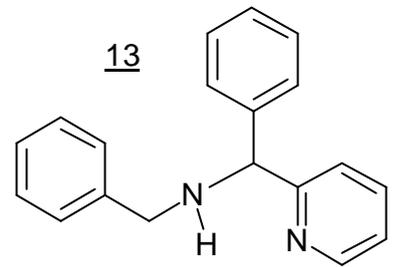
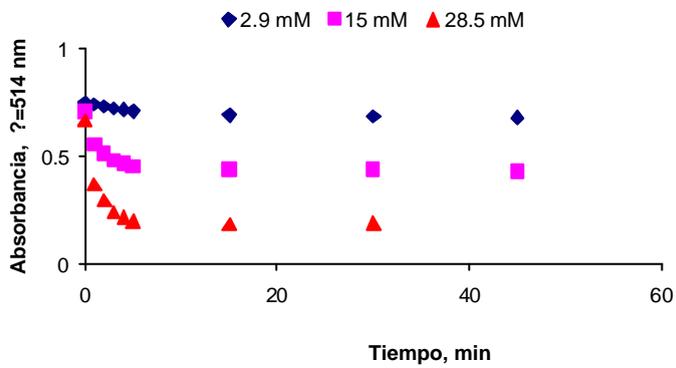
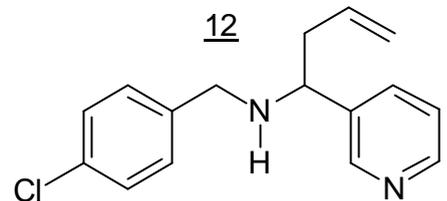
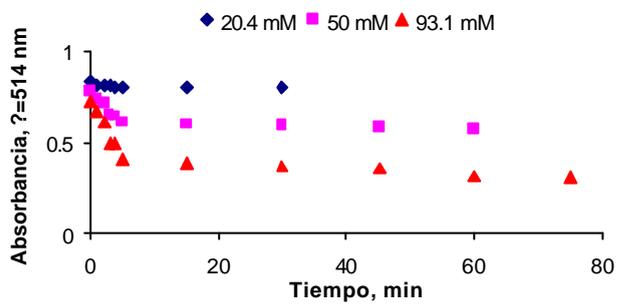
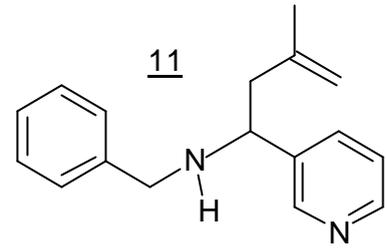
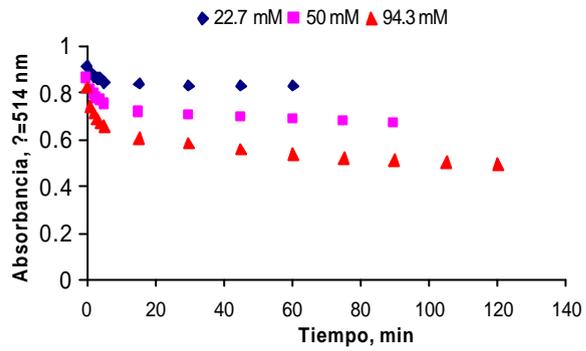
Continuación del **Anexo 2-Tabla 5.**

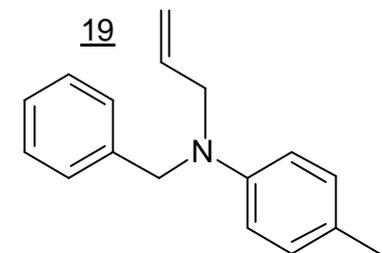
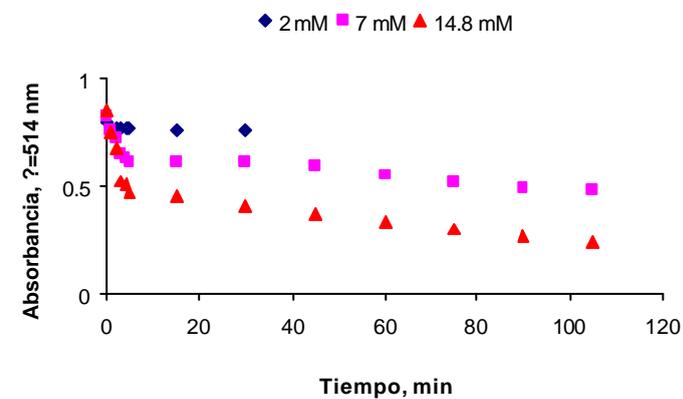
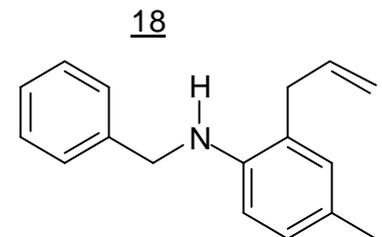
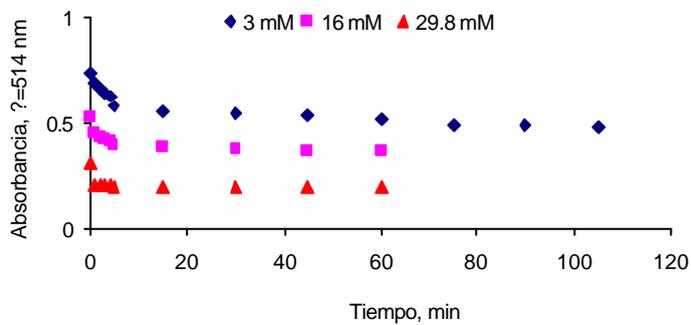
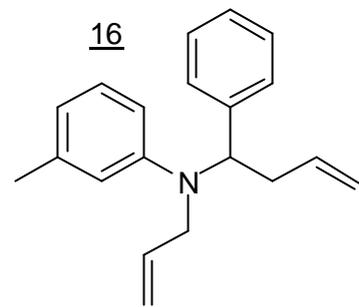
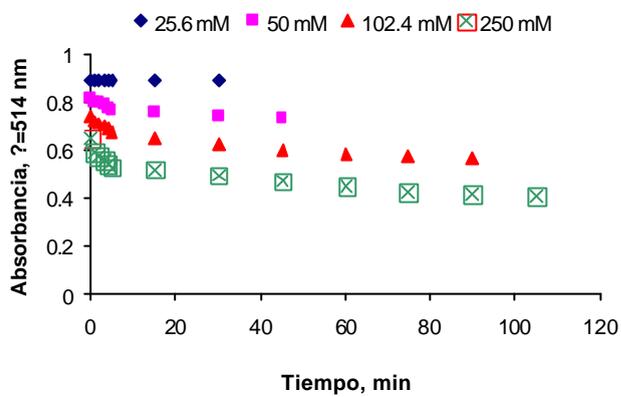
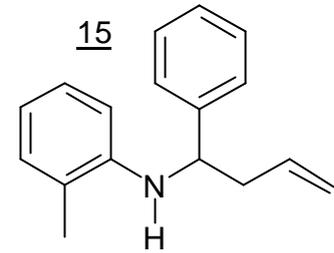
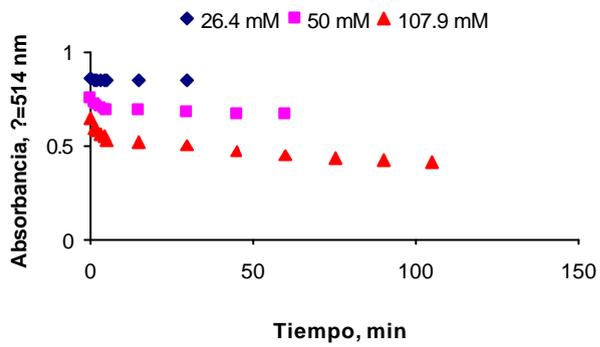
| | | | |
|----|----------------------|----------|----------|
| 30 | β -Selineno | 0.030936 | 0.031310 |
| 31 | γ -Cadineno | 0.030893 | 0.011460 |
| 32 | Óxido de cariofileno | 0.031354 | 0.014134 |

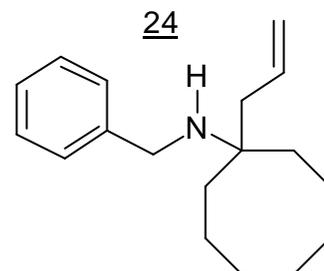
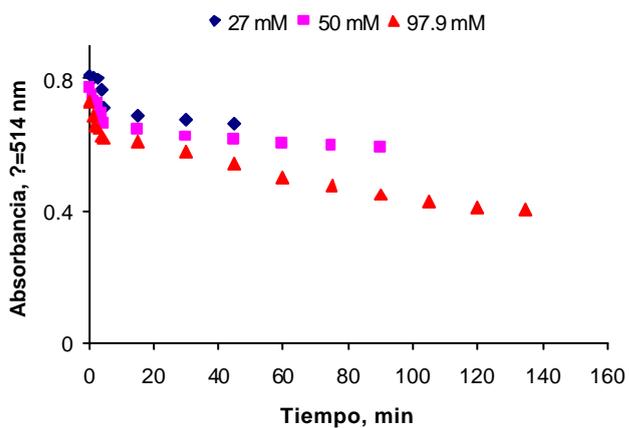
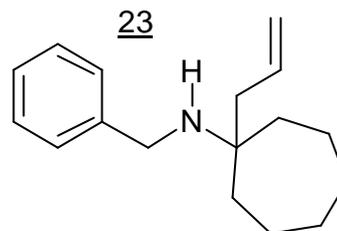
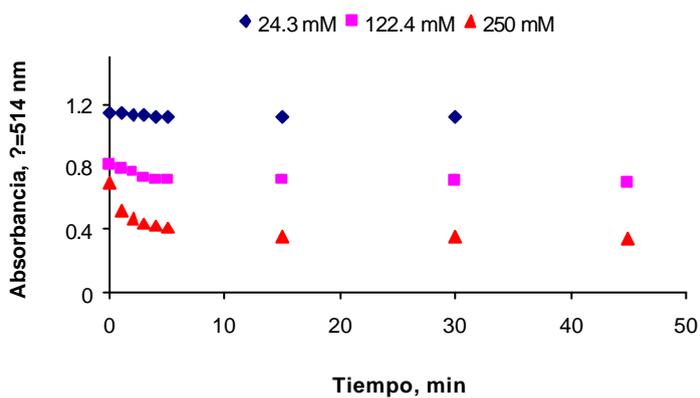
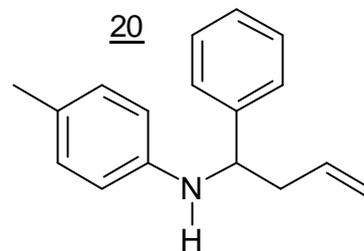
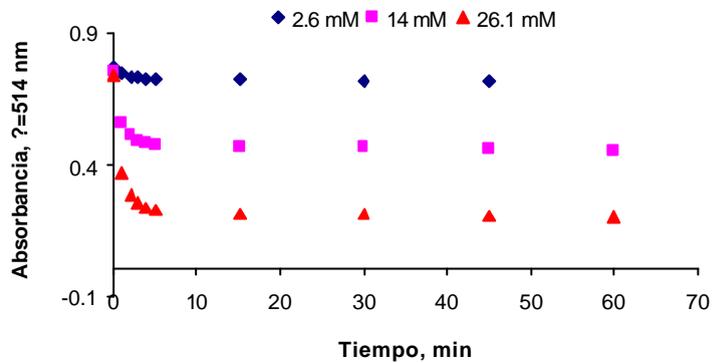
ANEXO 3

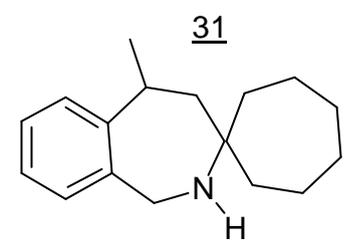
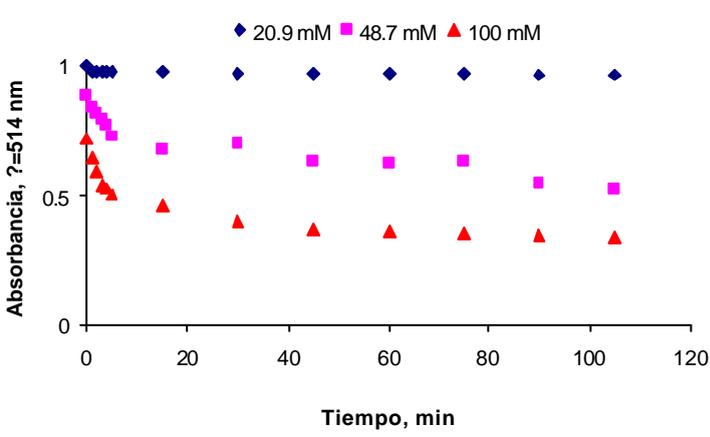
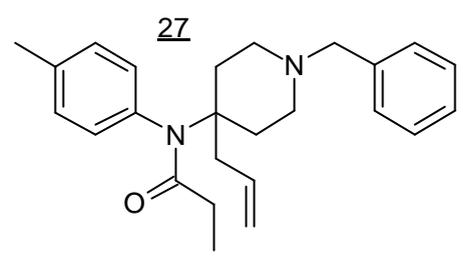
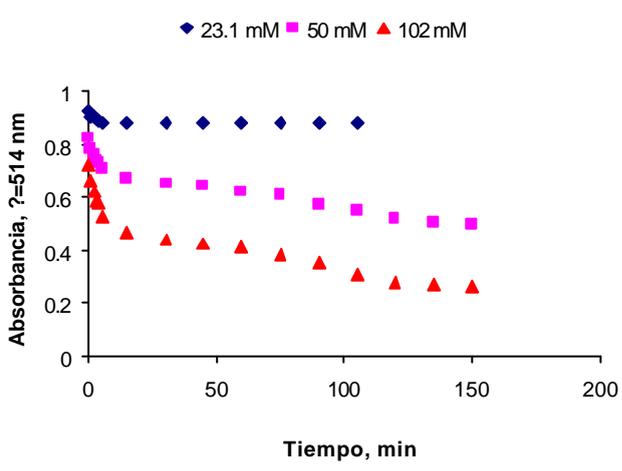
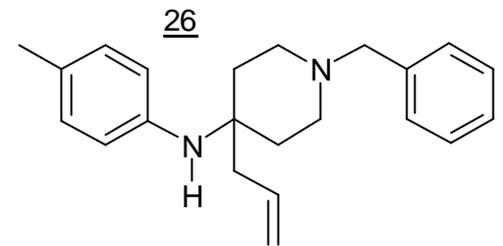
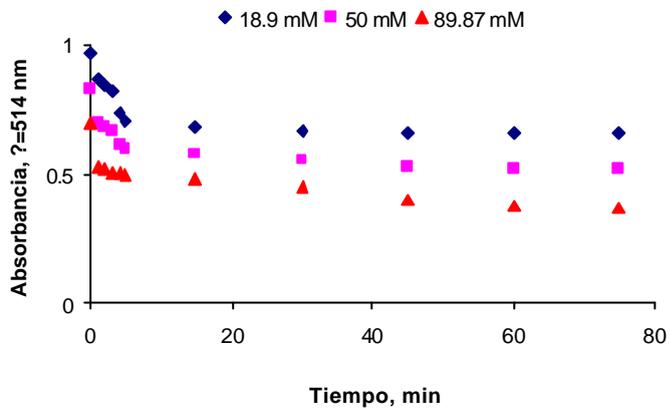
Estados estacionarios de 37 compuestos nitrogenados sintéticos en la reacción con el radical DPPH.

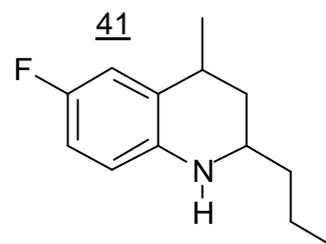
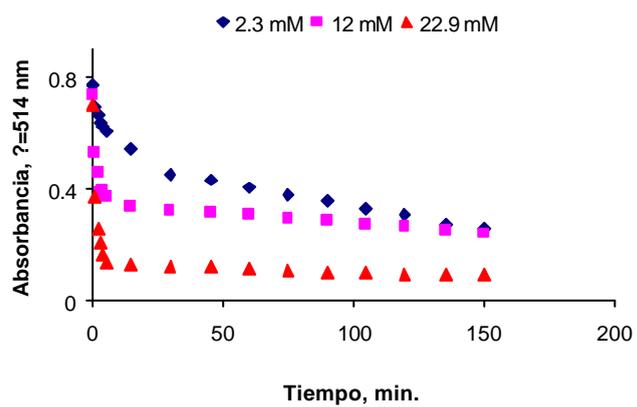
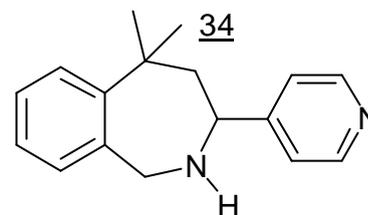
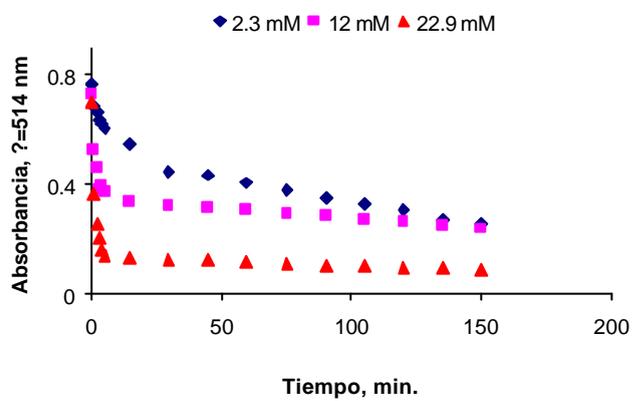
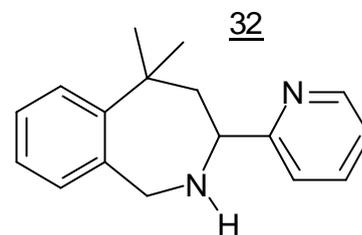
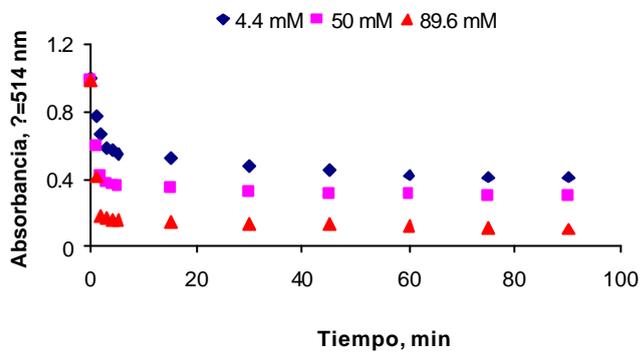


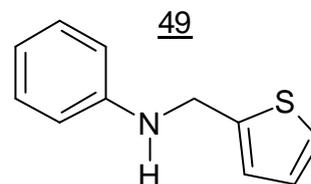
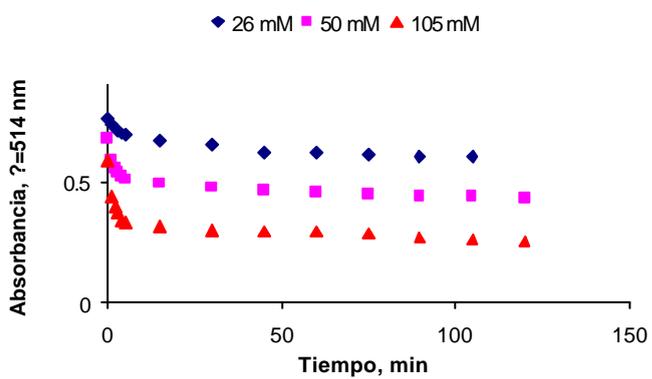
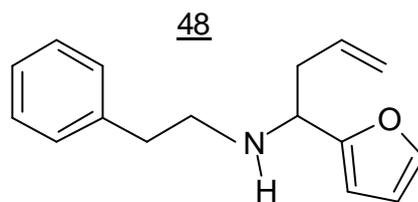
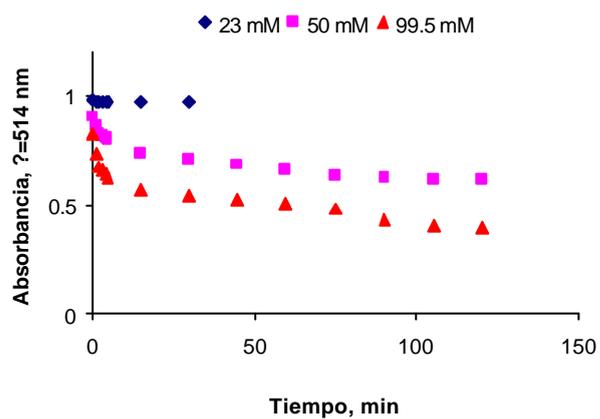
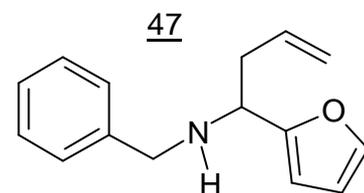
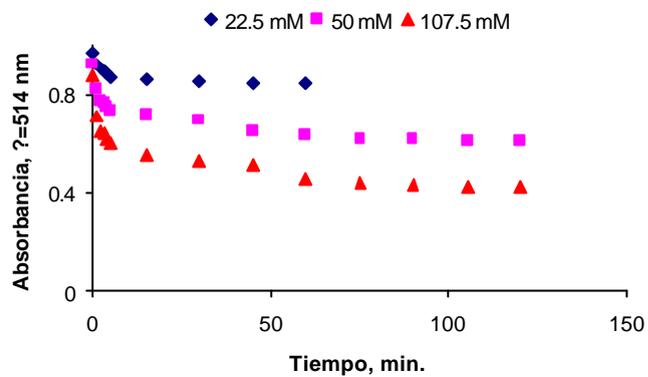


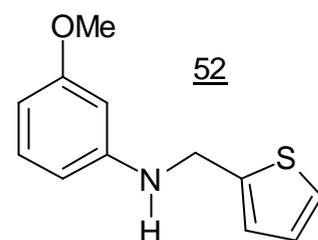
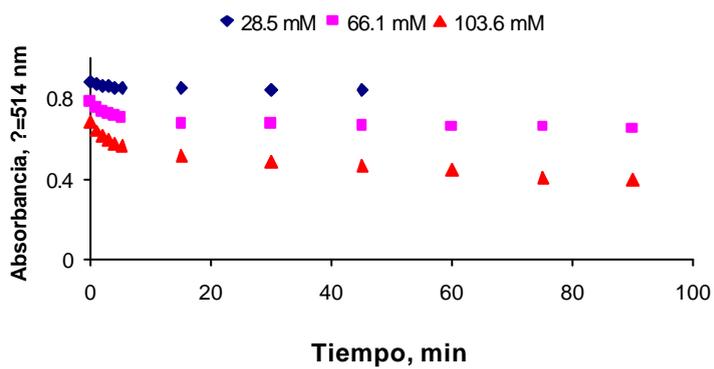
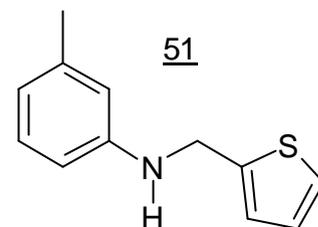
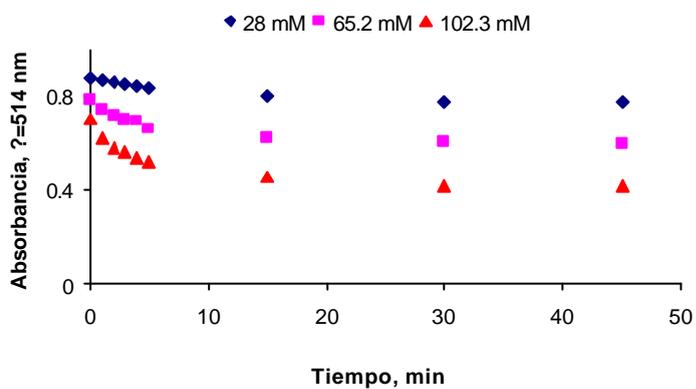
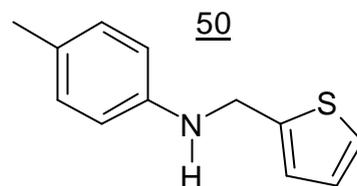
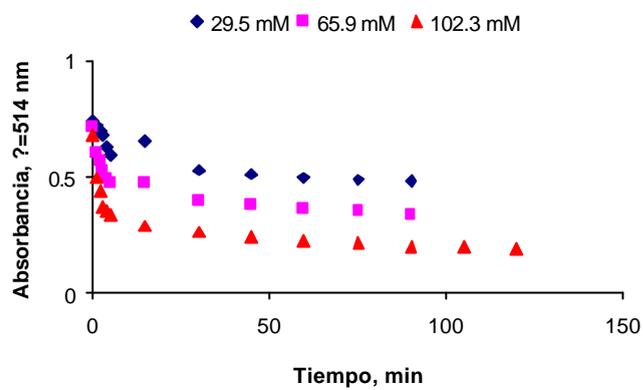


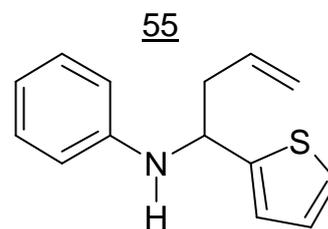
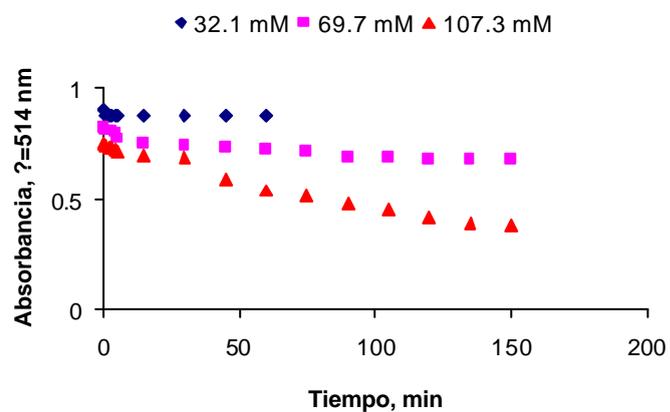
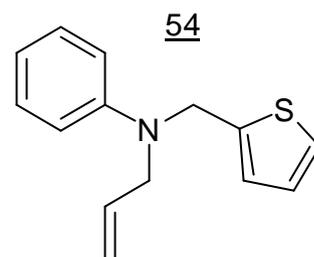
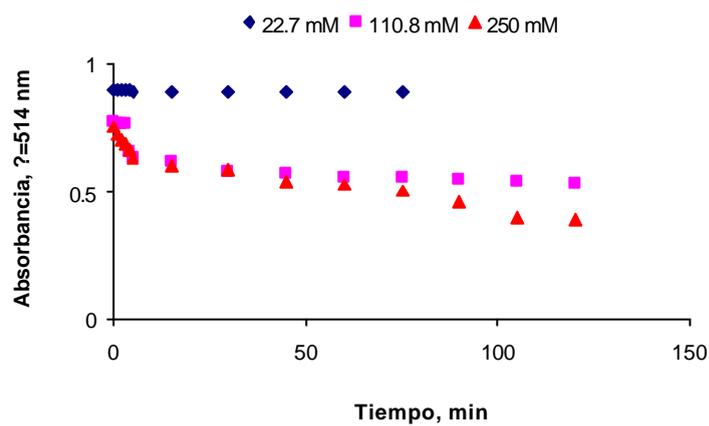
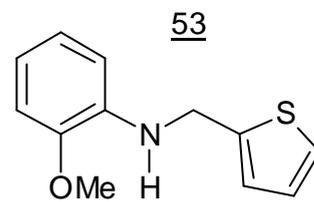
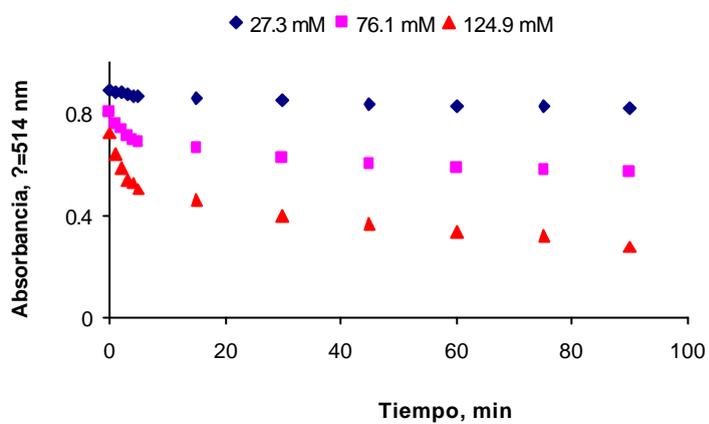


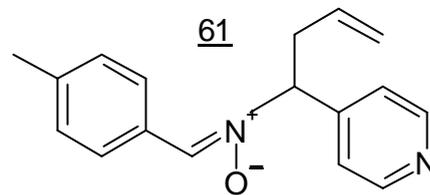
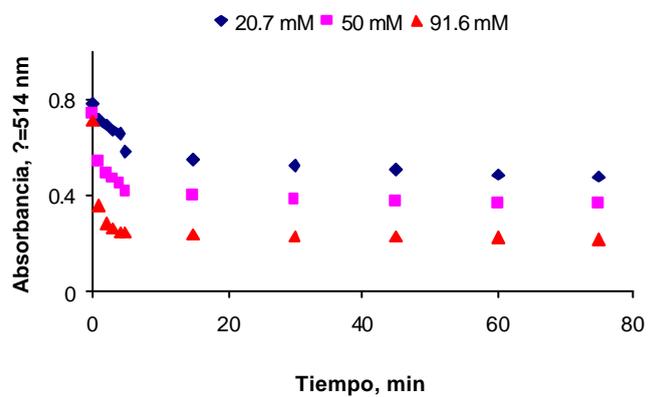
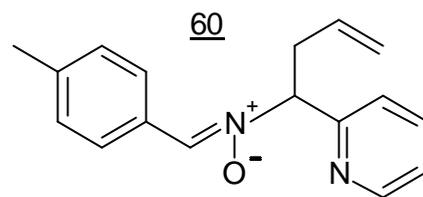
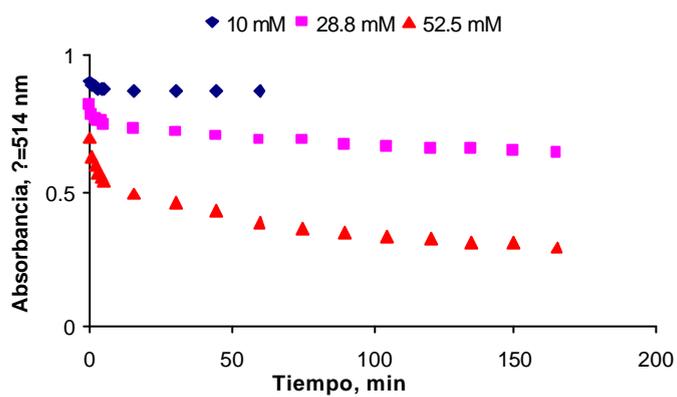
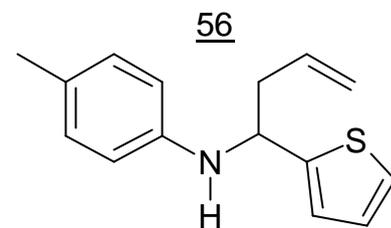
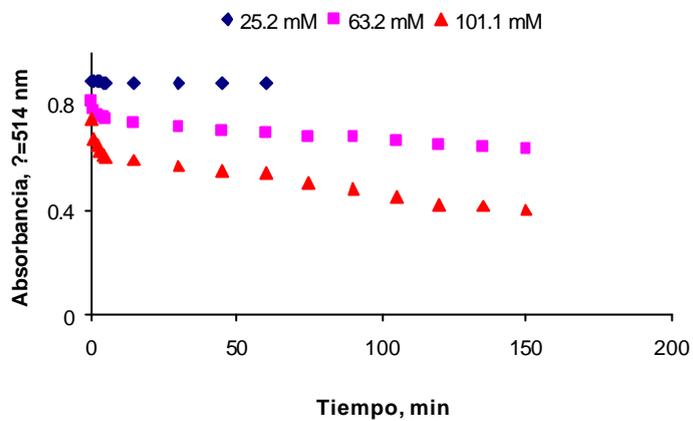


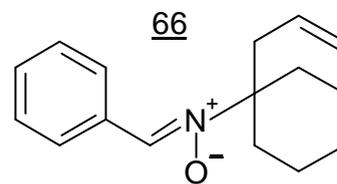
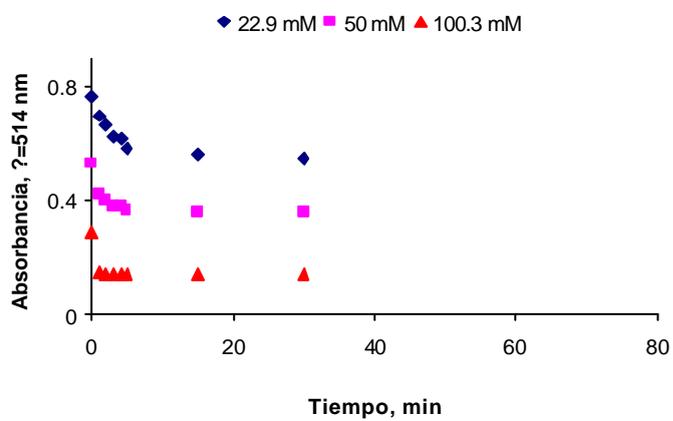
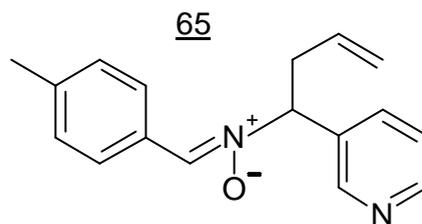
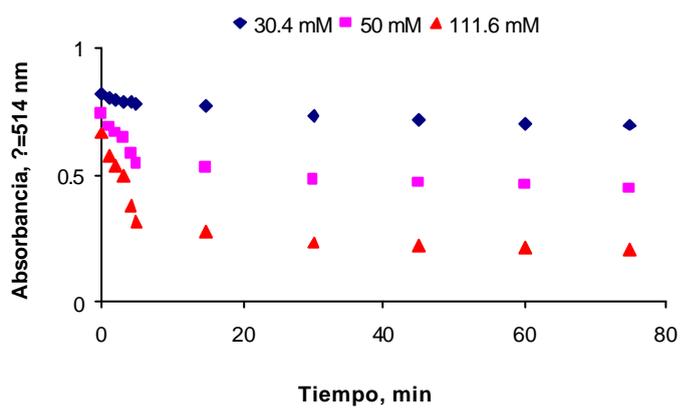
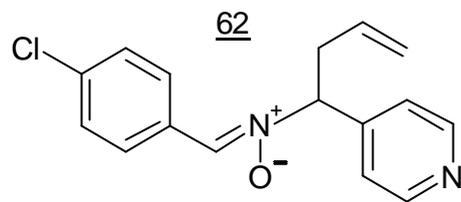
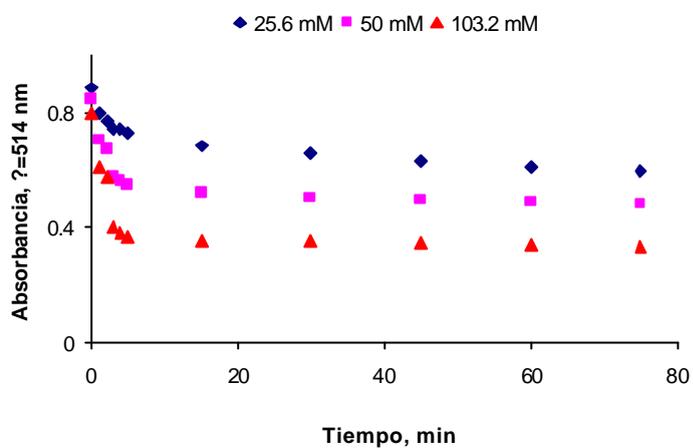


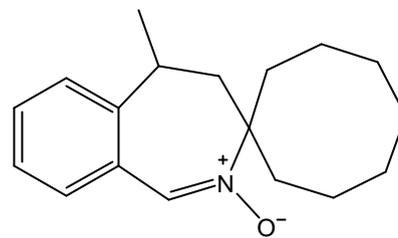
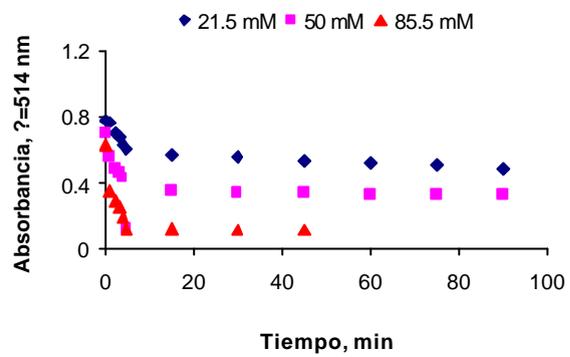












ANEXO 4

Tablas de correlación entre el efecto protector medido experimentalmente y el calculado de los compuestos sintéticos nitrogenados.

Anexo 4-Tabla 1. Descriptores colineales con coeficientes de regresión inferiores o iguales a 0.7.

| N° del descriptor* | | | | | | | | | |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1.00 | | | | | | | | | |
| -0.47 | 1.00 | | | | | | | | |
| 0.61 | -0.44 | 1.00 | | | | | | | |
| 0.51 | 0.24 | 0.27 | 1.00 | | | | | | |
| -0.03 | 0.66 | -0.16 | 0.18 | 1.00 | | | | | |
| 0.02 | 0.04 | -0.03 | -0.11 | 0.16 | 1.00 | | | | |
| 0.64 | 0.18 | 0.29 | 0.66 | 0.13 | 0.12 | 1.00 | | | |
| 0.56 | 0.13 | 0.34 | 0.45 | 0.25 | 0.04 | 0.59 | 1.00 | | |
| 0.43 | 0.34 | -0.22 | 0.36 | 0.50 | 0.21 | 0.65 | 0.47 | 1.00 | |
| -0.45 | 0.17 | -0.26 | -0.12 | 0.07 | 0.11 | -0.34 | -0.24 | -0.48 | 1.00 |
| 0.41 | -0.28 | 0.32 | 0.15 | 0.08 | 0.16 | 0.19 | 0.15 | -0.09 | 0.54 |
| 0.27 | -0.15 | 0.19 | 0.18 | -0.02 | 0.01 | 0.14 | 0.16 | 0.18 | -0.42 |
| -0.04 | 0.04 | -0.12 | -0.08 | 0.08 | 0.04 | -0.06 | 0.00 | 0.07 | -0.04 |
| 0.07 | -0.13 | -0.14 | -0.16 | 0.10 | 0.13 | -0.09 | -0.20 | 0.12 | -0.14 |
| 0.51 | -0.55 | 0.48 | 0.24 | -0.47 | -0.16 | 0.20 | -0.01 | -0.13 | -0.29 |
| -0.11 | 0.10 | -0.02 | -0.14 | 0.18 | 0.08 | -0.10 | 0.00 | -0.01 | -0.09 |
| -0.55 | -0.05 | -0.08 | -0.27 | -0.21 | 0.02 | -0.60 | -0.49 | -0.67 | 0.39 |
| -0.39 | -0.18 | -0.03 | -0.37 | -0.47 | -0.26 | -0.54 | -0.41 | -0.59 | 0.08 |
| 0.67 | -0.68 | 0.67 | 0.25 | -0.32 | -0.28 | 0.22 | 0.29 | -0.13 | -0.27 |
| 0.13 | -0.46 | 0.35 | 0.17 | -0.46 | -0.25 | -0.26 | -0.22 | -0.56 | 0.07 |
| 0.06 | -0.15 | 0.15 | 0.04 | -0.14 | -0.06 | -0.04 | -0.02 | -0.13 | -0.02 |
| 0.01 | -0.12 | -0.05 | 0.06 | 0.03 | 0.09 | -0.10 | -0.42 | 0.01 | -0.11 |
| -0.10 | -0.04 | -0.03 | -0.12 | -0.08 | -0.03 | -0.14 | -0.12 | -0.04 | -0.16 |
| -0.13 | 0.25 | -0.10 | 0.01 | 0.24 | -0.03 | 0.00 | -0.07 | 0.07 | 0.06 |
| 0.07 | 0.15 | -0.15 | 0.28 | 0.24 | -0.06 | 0.15 | -0.01 | 0.17 | 0.16 |
| -0.08 | -0.03 | 0.07 | -0.38 | 0.17 | -0.09 | -0.29 | 0.02 | -0.02 | -0.16 |
| -0.15 | 0.17 | -0.08 | -0.07 | -0.08 | -0.05 | 0.08 | -0.07 | 0.03 | -0.10 |

Continuación del Anexo 4-Tabla 1.

| N° de descriptor* | | | | | | | | | |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 1.00 | | | | | | | | | |
| -0.19 | 1.00 | | | | | | | | |
| -0.10 | -0.02 | 1.00 | | | | | | | |
| -0.04 | 0.19 | 0.33 | 1.00 | | | | | | |
| 0.06 | 0.16 | -0.07 | 0.19 | 1.00 | | | | | |
| -0.14 | 0.24 | 0.58 | 0.57 | -0.11 | 1.00 | | | | |
| -0.12 | 0.19 | -0.03 | 0.01 | -0.16 | 0.15 | 1.00 | | | |
| -0.25 | -0.19 | -0.07 | -0.18 | 0.13 | -0.15 | 0.20 | 1.00 | | |
| 0.29 | 0.20 | -0.11 | -0.04 | 0.46 | -0.12 | -0.10 | -0.17 | 1.00 | |
| -0.02 | 0.13 | 0.00 | -0.03 | 0.57 | -0.09 | 0.34 | 0.35 | 0.40 | 1.00 |
| 0.00 | 0.03 | 0.03 | -0.17 | 0.12 | 0.06 | 0.07 | 0.12 | 0.16 | 0.25 |
| 0.02 | 0.53 | -0.04 | 0.40 | 0.09 | 0.14 | 0.23 | 0.03 | -0.04 | 0.02 |
| -0.21 | -0.04 | -0.05 | -0.07 | 0.06 | -0.11 | 0.00 | 0.21 | -0.02 | 0.02 |
| -0.03 | -0.04 | 0.00 | 0.00 | -0.27 | 0.00 | 0.06 | -0.12 | -0.15 | -0.09 |
| 0.16 | 0.05 | 0.06 | 0.11 | -0.15 | 0.03 | 0.00 | -0.26 | 0.02 | 0.11 |
| -0.06 | -0.10 | -0.04 | 0.02 | -0.22 | 0.01 | -0.10 | 0.33 | -0.06 | -0.29 |
| -0.15 | -0.11 | -0.09 | -0.01 | -0.17 | -0.03 | 0.01 | 0.05 | -0.17 | -0.21 |

Continuación del Anexo 4-Tabla 1.

| N° de descriptor* | | | | | |
|-------------------|----|----|----|----|----|
| 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |

| | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 1.00 | | | | | |
| -0.01 | 1.00 | | | | |
| 0.03 | -0.01 | 1.00 | | | |
| -0.04 | 0.04 | -0.11 | 1.00 | | |
| 0.07 | 0.11 | -0.14 | 0.41 | 1.00 | |
| -0.08 | -0.07 | 0.21 | -0.03 | -0.33 | 1.00 |
| -0.21 | -0.11 | -0.03 | 0.32 | -0.16 | 0.13 |

*1. N° de átomos, 2. N° relativo de carbonos, 3. N° de anillos, 4. N° de anillos de benceno, 5. N° de enlaces aromáticos, 6. N° relativo de enlaces simples, 7. Randic index (order 1), 8. Kier&Hall index (order 0), 9. Kier shape index (order 2), 10. Kier shape index (order 3), 11. Information content (order 0), 12. Complementary information content (order 0), 13. 3D-Kier shape index (order 2), 14. 3D-Structural Information content order (0), 15. 3D-Information content (order2), 16. 3D-Complementary Information content (order 2), 17. 3D-Structural Information content (order 2), 18. Momento de inercia A, 19. 3D-Structural Information Charge-weighted PPSA [Empirical PC], 20. DPISA-1 Difference (PPSA1-PNSA1) [Empirical PC], 21. DPISA-3 Difference CPAs (PPSA3-PNSA3) [Empirical PC], 22. Energía optimizada, 23. Energía del HOMO, 24. Energía del LUMO, 25. Momento dipolar, 26. Carga sobre el nitrógeno.

Anexo 4-Tabla 2. Efecto protector observado Vs calculado de los 70 compuestos sintéticos nitrogenados, correspondiente a la **Figura 49 (Análisis de Resultados, Sección 2.4.3)**.

| Compuesto | Efecto protector*, equivalentes de vitamina E | |
|-----------|---|-----------|
| | Experimental* | Calculado |
| <u>1</u> | 3,6 | 3,2 |
| <u>2</u> | 4,0 | 3,0 |
| <u>3</u> | 4,7 | 3,1 |
| <u>4</u> | 2,4 | 3,2 |
| <u>5</u> | 1,3 | 2,4 |
| <u>6</u> | 2,3 | 2,3 |
| <u>7</u> | 1,2 | 3,0 |
| <u>8</u> | 4,6 | 3,0 |
| <u>9</u> | 3,6 | 3,4 |
| <u>10</u> | 5,7 | 3,4 |
| <u>11</u> | 1,3 | 1,6 |
| <u>12</u> | 7,2 | 4,5 |
| <u>13</u> | 2,5 | 4,9 |
| <u>14</u> | 5,2 | 4,0 |
| <u>15</u> | 8,2 | 8,0 |
| <u>16</u> | 8,3 | 3,1 |
| <u>17</u> | 1,7 | 2,8 |
| <u>18</u> | 1,7 | 3,1 |
| <u>19</u> | 1,7 | 3,7 |
| <u>20</u> | 7,6 | 5,5 |
| <u>21</u> | 6,9 | 4,9 |
| <u>22</u> | 2,8 | 4,6 |
| <u>23</u> | 2,6 | 4,6 |
| <u>24</u> | 7,9 | 5,0 |
| <u>25</u> | 0,8 | 3,1 |
| <u>26</u> | 3,2 | 3,9 |
| <u>27</u> | 2,9 | 3,1 |
| <u>28</u> | 0,7 | 3,5 |
| <u>29</u> | 7,4 | 3,6 |

Continuación del Anexo 4-Tabla 2.

| | | |
|-----------|-----|------|
| <u>30</u> | 7,2 | 7,2 |
| <u>31</u> | 1,7 | 1,9 |
| <u>32</u> | 1,5 | 1,5 |
| <u>33</u> | 0,8 | 1,3 |
| <u>34</u> | 2,2 | 3,7 |
| <u>35</u> | 7,3 | 4,7 |
| <u>36</u> | 4,1 | 6,5 |
| <u>37</u> | 6,8 | 4,2 |
| <u>38</u> | 1,5 | 4,5 |
| <u>39</u> | 7,5 | 6,0 |
| <u>40</u> | 5,5 | 7,7 |
| <u>41</u> | 3,3 | 3,6 |
| <u>42</u> | 4,8 | 7,0 |
| <u>43</u> | 9,7 | 6,1 |
| <u>44</u> | 9,7 | 5,9 |
| <u>45</u> | 4,1 | 4,3 |
| <u>46</u> | 7,6 | 6,6 |
| <u>47</u> | 2,9 | 3,3 |
| <u>48</u> | 2,9 | 3,7 |
| <u>49</u> | 3,8 | 2,6 |
| <u>50</u> | 0,5 | 0,5 |
| <u>51</u> | 3,9 | 2,5 |
| <u>52</u> | 3,1 | 3,8 |
| <u>53</u> | 3,0 | 4,2 |
| <u>54</u> | 3,7 | 2,6 |
| <u>55</u> | 0,7 | 1,9 |
| <u>56</u> | 2,4 | 2,0 |
| <u>57</u> | 1,3 | 2,7 |
| <u>58</u> | 1,1 | -0,2 |
| <u>59</u> | 1,2 | 2,3 |
| <u>60</u> | 1,5 | 1,4 |
| <u>61</u> | 2,9 | 3,0 |
| <u>62</u> | 2,9 | 4,7 |
| <u>63</u> | 0,3 | 2,6 |

Continuación del Anexo 4-Tabla 2.

| | | |
|-----------|-----|-----|
| <u>64</u> | 1,4 | 1,8 |
| <u>65</u> | 1,1 | 0,5 |
| <u>66</u> | 1,1 | 4,4 |
| <u>67</u> | 1,8 | 4,4 |
| <u>68</u> | 7,1 | 5,1 |
| <u>69</u> | 3,5 | 4,5 |
| <u>70</u> | 4,1 | 2,4 |

* La actividad antioxidante de los compuestos sintéticos nitrogenados, determinada para el modelo QSAR se calculó como equivalentes de vitamina E, ésto se logró dividiendo el efecto protector de la sustancia nitrogenada sobre el efecto protector de la vitamina E, ambos a una misma concentración 25 mM.

Anexo 4-Tabla 3. Actividad antioxidante experimental Vs la calculada, obtenida para el primer subconjunto de compuestos sintéticos nitrogenados del estudio QSAR, correspondiente a la **Figura 52 (Análisis de Resultados, Sección 2.4.3.1)**.

| Compuesto | Efecto protector*, equivalentes de vitamina E | |
|-----------|---|-----------|
| | Experimental | Calculado |
| <u>1</u> | 3,6 | 3,8 |
| <u>2</u> | 4,0 | 4,5 |
| <u>3</u> | 4,7 | 4,8 |
| <u>4</u> | 2,4 | 3,9 |
| <u>5</u> | 1,3 | 0,2 |
| <u>6</u> | 2,3 | 3,8 |
| <u>7</u> | 1,2 | 1,1 |
| <u>8</u> | 4,6 | 3,0 |
| <u>9</u> | 3,6 | 4,2 |
| <u>10</u> | 5,7 | 4,4 |
| <u>11</u> | 1,3 | 1,3 |
| <u>12</u> | 7,2 | 7,1 |
| <u>13</u> | 2,5 | 3,3 |
| <u>14</u> | 5,2 | 5,7 |
| <u>15</u> | 8,2 | 8,3 |
| <u>16</u> | 8,3 | 7,2 |
| <u>17</u> | 1,7 | 1,7 |
| <u>18</u> | 1,7 | 2,4 |
| <u>19</u> | 1,7 | 0,3 |
| <u>20</u> | 7,6 | 8,2 |
| <u>21</u> | 6,9 | 6,8 |
| <u>22</u> | 2,8 | 3,5 |
| <u>23</u> | 2,6 | 4,8 |
| <u>24</u> | 7,9 | 5,5 |
| <u>25</u> | 0,8 | 1,7 |
| <u>26</u> | 3,2 | 3,0 |
| <u>27</u> | 2,9 | 2,6 |
| <u>28</u> | 0,7 | 2,1 |

Continuación del Anexo 4-Tabla 3.

| | | |
|-----------|-----|-----|
| <u>29</u> | 7,4 | 4,3 |
| <u>30</u> | 7,2 | 6,8 |
| <u>31</u> | 1,7 | 1,7 |
| <u>32</u> | 1,5 | 1,0 |
| <u>33</u> | 0,8 | 1,2 |
| <u>34</u> | 2,2 | 3,2 |

Anexo 4-Tabla 4. Actividad antioxidante experimental Vs la calculada, obtenida para el segundo subconjunto de compuestos sintéticos nitrogenados del estudio QSAR, correspondiente a la **Figura 54 (Análisis de Resultados, Sección 2.4.3.2).**

| Compuesto | Efecto protector, equivalentes de vitamina E | |
|-----------|--|-----------|
| | Experimental | Calculado |
| <u>17</u> | 1,7 | 2,4 |
| <u>18</u> | 1,7 | 1,1 |
| <u>22</u> | 2,8 | 3,8 |
| <u>23</u> | 2,6 | 4,3 |
| <u>24</u> | 7,9 | 5,7 |
| <u>31</u> | 1,7 | 1,7 |
| <u>35</u> | 7,3 | 6,4 |
| <u>36</u> | 4,1 | 4,7 |
| <u>37</u> | 6,8 | 6,7 |
| <u>38</u> | 1,5 | 1,3 |
| <u>39</u> | 7,5 | 7,2 |
| <u>40</u> | 5,5 | 6,9 |
| <u>41</u> | 3,3 | 3,5 |
| <u>42</u> | 4,8 | 3,6 |
| <u>43</u> | 9,7 | 9,7 |
| <u>44</u> | 9,7 | 9,8 |
| <u>66</u> | 1,1 | 0,2 |
| <u>67</u> | 1,8 | 3,0 |
| 68 | 7,1 | 6,5 |
| <u>69</u> | 3,5 | 3,7 |

Anexo 4-Tabla 5. Actividad antioxidante experimental Vs la calculada, obtenida para el tercer subconjunto de compuestos sintéticos nitrogenados del estudio QSAR, correspondiente a la **Figura 56 (Análisis de Resultados, Sección 2.4.3.3)**.

| Compuesto | Efecto protector, equivalentes de vitamina E | |
|-----------|--|-----------|
| | Experimental | Calculado |
| <u>13</u> | 2,5 | 2,5 |
| <u>16</u> | 8,3 | 8,6 |
| <u>21</u> | 6,9 | 6,7 |
| <u>25</u> | 0,8 | 1,4 |
| <u>26</u> | 3,2 | 2,9 |
| <u>27</u> | 2,9 | 3,2 |
| <u>45</u> | 4,1 | 3,3 |
| <u>46</u> | 7,6 | 7,6 |

Anexo 4-Tabla 6. Actividad antioxidante experimental Vs la calculada, obtenida para el cuarto subconjunto de compuestos sintéticos nitrogenados del estudio QSAR, correspondiente a la **Figura 58 (Análisis de Resultados, Sección 2.4.3.4)**.

| Compuesto | Efecto protector, equivalentes de vitamina E | |
|-----------|--|-----------|
| | Experimental | Calculado |
| <u>14</u> | 5,2 | 5,2 |
| <u>57</u> | 1,3 | 1,7 |
| <u>58</u> | 1,1 | 0,5 |
| <u>59</u> | 1,2 | 0,9 |
| <u>60</u> | 1,5 | 1,9 |
| <u>61</u> | 2,9 | 2,3 |
| <u>62</u> | 2,9 | 2,6 |
| <u>63</u> | 0,3 | 0,6 |
| <u>64</u> | 1,4 | 1,5 |
| <u>65</u> | 1,1 | 1,5 |
| <u>70</u> | 4,1 | 4,1 |

Anexo 4-Tabla 7. Actividad antioxidante experimental Vs la calculada, obtenida para el quinto subconjunto de compuestos sintéticos nitrogenados del estudio QSAR, correspondiente a la **Figura 60 (Análisis de Resultados, Sección 2.4.3.5)**.

| Compuesto | Efecto protector, equivalentes de vitamina E | |
|-----------|--|-----------|
| | Experimental | Calculado |
| <u>15</u> | 8,2 | 8,2 |
| <u>47</u> | 2,9 | 3,1 |
| <u>48</u> | 2,9 | 3,0 |
| <u>49</u> | 3,8 | 3,8 |
| <u>50</u> | 0,5 | 0,1 |
| <u>52</u> | 3,1 | 2,8 |
| <u>53</u> | 3,0 | 2,3 |
| <u>54</u> | 3,7 | 3,5 |
| <u>55</u> | 0,7 | 1,6 |
| <u>56</u> | 2,4 | 2,8 |

Anexo 4-Tabla 8. Actividad antioxidante observada Vs la calculada de 37 compuestos nitrogenados, usando el método ABTS⁺, correspondiente a la **Figura 61 (Análisis de Resultados, Sección 2.4.3.6).**

| Compuesto | TEAC (mmol Trolox/mmol compuesto) | |
|-----------|-----------------------------------|-----------|
| | Observada | Calculada |
| <u>4</u> | 0,01 | 0,15 |
| <u>5</u> | 0,01 | 0,07 |
| <u>6</u> | 0,01 | 0,001 |
| <u>7</u> | 0,01 | -0,07 |
| <u>11</u> | 0,02 | 0,07 |
| <u>12</u> | 0,001 | 0,14 |
| <u>13</u> | 0,29 | 0,22 |
| <u>14</u> | 0,50 | 0,52 |
| <u>15</u> | 0,01 | 0,01 |
| <u>16</u> | 0,01 | -0,13 |
| <u>18</u> | 0,40 | 0,66 |
| <u>19</u> | 1,10 | 1,05 |
| <u>20</u> | 0,50 | 0,47 |
| <u>26</u> | 0,20 | 0,10 |
| <u>27</u> | 0,09 | 0,21 |
| <u>31</u> | 0,04 | 0,04 |
| <u>32</u> | 0,03 | 0,12 |
| 34 | 0,60 | 0,43 |
| 41 | 2,10 | 2,04 |
| 47 | 0,02 | 0,18 |
| 48 | 0,001 | -0,20 |
| 49 | 0,70 | 0,82 |
| 50 | 0,94 | 0,94 |
| 51 | 1,09 | 0,94 |
| 52 | 1,00 | 1,06 |
| 53 | 0,98 | 0,94 |
| 54 | 0,13 | 0,24 |
| 55 | 0,72 | 0,64 |
| 56 | 0,93 | 0,87 |
| 60 | 0,01 | -0,05 |

Continuación del **Anexo 4-Tabla 8**.

| | | |
|----|------|-------|
| 61 | 0,03 | 0,04 |
| 62 | 0,02 | 0,01 |
| 65 | 0,01 | -0,07 |
| 66 | 0,02 | -0,04 |
| 67 | 0,02 | 0,15 |

Anexo 4-Tabla 9. Correlación de los valores experimentales, obtenidos por el método DPPH, y teóricos de la capacidad de atrapar radicales de 37 compuestos sintéticos nitrogenados (**Figura 62, Análisis de Resultados Sección 2.4.3.6**).

| Compuesto | EC ₅₀ (mmol de compuesto/mmol DPPH) | |
|-----------|--|-----------|
| | Observada | Calculada |
| 4 | 115,0 | 112,6 |
| 5 | 125,0 | 124,2 |
| 6 | 110,0 | 141,4 |
| 7 | 140,0 | 105,9 |
| 11 | 120,0 | 131,7 |
| 12 | 108,0 | 110,8 |
| 13 | 45,0 | 55,2 |
| 14 | 3,7 | 9,3 |
| 15 | 230,0 | 231,2 |
| 16 | 370,0 | 319,7 |
| 18 | 5,8 | 29,7 |
| 19 | 7,0 | -8,2 |
| 20 | 13,9 | 12,9 |
| 26 | 115,0 | 128,2 |
| 27 | 150,0 | 168,1 |
| 31 | 80,0 | 79,2 |
| 32 | 160,0 | 125,4 |
| 34 | 44,0 | 82,2 |
| 41 | 1,0 | -18,9 |
| 47 | 128,0 | 218,2 |
| 48 | 270,0 | 196,1 |
| 49 | 70,0 | 80,3 |
| 50 | 12,0 | 11,7 |
| 51 | 19,0 | 33,5 |
| 52 | 107,0 | 76,4 |
| 53 | 105,0 | 133,8 |
| 54 | 385,0 | 392,4 |
| 55 | 290,0 | 263,4 |

Continuación del Anexo 4-Tabla 9.

| | | |
|----|-------|-------|
| 56 | 185,0 | 171,2 |
| 60 | 58,0 | 29,3 |
| 61 | 58,0 | 57,6 |
| 62 | 110,0 | 75,7 |
| 65 | 97,0 | 132,6 |
| 66 | 65,0 | 133,9 |
| 67 | 130,0 | 85,8 |