

**COMPARACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE
DOS ESPECIES DE *Ocimum sp.* (LABIATAE), EN FUNCIÓN DEL MÉTODO
DE SU EXTRACCIÓN Y ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE,
CITOTÓXICA Y ANTIFÚNGICA**

JOHAN AUGUSTO REYES BARAJAS

JOSÉ GREGORIO PATIÑO PORRAS

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

2007

**COMPARACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE
DOS ESPECIES DE *Ocimum sp.* (LABIATAE), EN FUNCIÓN DEL MÉTODO
DE SU EXTRACCIÓN Y ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE,
CITOTÓXICA Y ANTIFÚNGICA**

JOHAN AUGUSTO REYES BARAJAS

JOSÉ GREGORIO PATIÑO PORRAS

Trabajo de Grado presentado como requisito
parcial para optar al título de Químico.

Directora:

Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.

Co-director:

Jairo René Martínez. Químico, Ph.D.

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

2007

*Dedicado a mis padres Fabio Nelson y Maria Stella,
y a mi hermana Fahiesa Ivonne, ya que con su
apoyo y paciencia e culminado este logro.*

Johan Augusto Reyes Barajas

*“Al todo poderoso por las bendiciones recibidas,
Ni la ciencia, ni la cromatografía, logran separarme
de Dios y de mi fe”.*

José Gregorio Patiño Porras

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los doctores Elena Stashenko y Jairo René Martínez, por la colaboración en la realización de este proyecto, y por su interés de hacer del Laboratorio de Cromatografía y CENIVAM, más que un grupo de trabajo una gran familia.

Agradezco a todos los amigos y compañeros que me hicieron más ameno el transcurso por la Universidad (Juan Pablo, Fredy, Carlos, Gregorio, Kata, Monis, Lala, German), a los compañeros del Laboratorio de Cromatografía (Geovana, Amner, Elkin, Victor, entre otros) que me colaboraron en el proyecto y me dejaron alguna enseñanza.

Johan Augusto Reyes Barajas

A todas aquellas personas que contribuyeron no solo en la realización de este proyecto, si no en el transcurso de mi vida universitaria y a todos los que han influenciado positivamente mi vida...no quiero olvidar a nadie...por eso cuando lean esto se sentirán identificados...muchas GRACIAS.

Especialmente a mis padres...GRACIAS por haberse encontrado, y bendito el día en que cruzaron sus caminos.

A EMPERITA...GRACIAS por ser ejemplo de humildad y sacrificio, por haber hecho de mi un hombre de bien, y por luchar todos los días para brindarme lo mejor.

A los que ya no están y siempre estuvieron a mi lado...José del C. Patiño y mi abuelita Ana Rita...GRACIAS por sus cuidados terrenales y por protegerme desde el cielo...ahora si pueden estar más orgullosos.

A KT...GRACIAS por repetirme en todos mis días, por la amistad incondicional, por los momentos de alegría, por ser la cómplice y el viento que impulsa mis locuras, por la colaboración y el toque estético de este trabajo...y mas que nada GRACIAS por haber creído en mi en los momentos en que yo había perdido la fe en mi mismo.

José Gregorio Patiño Porras

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	26
1. MARCO DE ANTECEDENTES	30
2. ANÁLISIS CIENCIOMÉTRICO	38
3. MARCO TEÓRICO	49
3.1. ACEITES ESENCIALES	49
3.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LOS ACETES ESENCIALES Y EXTRACTOS	51
3.2.1. HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR RADIACIÓN DE MICROONDAS (MWHHD)	51
3.2.2. DESTILACIÓN-EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA CON SOLVENTES (SDE)	52
3.2.3. EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE)	53
3.2.4. <i>HEADSPACE</i> ESTÁTICO (S-HS)	55
3.2.5. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)	56
3.3. ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES	59
3.3.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES	59
3.3.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS	61
3.3.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	61
3.4. <i>OCIMUM BASILICUM</i>	62
3.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	65
3.5.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	67
3.6. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	69
3.7. ACTIVIDAD CITOTÓXICA	71
4. METODOLOGÍA	73
4.1. MATERIAL VEGETAL	74
4.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	74
4.3. PLANTACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	74
4.4. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	75

4.5. OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES	76
4.5.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	76
4.5.1.1. RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL	77
4.5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	78
4.5.3. OBTENCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES	80
4.6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	82
4.7. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	84
4.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES.	85
4.8.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	85
4.8.1.1. Ensayo de decoloración del radical DPPH	85
4.8.1.2. Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	86
4.8.2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	87
4.8.3. ACTIVIDAD CITOTÓXICA	89
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	92
5.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE <i>OCIMUM sp1</i> . “Sígueme blanco”, OBTENIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.	92
5.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES OBTENIDOS POR SDE, DE FLORES, HOJAS Y TALLOS DE <i>OCIMUM sp1</i> .	109
5.3 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES, OBTENIDOS POR SDE, DE HOJAS DE <i>OCIMUM sp1</i> ., RECOLECTADAS EN TRES ÉPOCAS DE CULTIVO (ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DE FLORACIÓN).	115
5.4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE <i>OCIMUM sp2</i> . “Sígueme morado”, OBTENIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.	122

5.5 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES OBTENIDOS POR SDE, DE FLORES, HOJAS Y TALLOS DE <i>OCIMUM sp2</i> .	135
5.6 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES, OBTENIDOS POR SDE, DE HOJAS DE <i>OCIMUM sp2</i> ., RECOLECTADAS EN TRES ÉPOCAS DE CULTIVO (ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DE FLORACIÓN).	141
5.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ATRAPAMIENTO DE RADICALES DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>OCIMUM spp.</i> , USANDO EL RADICAL DPPH· Y EL CATION-RADICAL ABTS ⁺ .	146
5.7.1. MÉTODO DE DECOLORACIÓN DEL RADICAL DPPH·	147
5.7.2. ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATION-RADICAL ABTS ⁺ .	153
5.8. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	155
5.8.1. Actividad anti- <i>Candida</i>	156
5.8.2. Actividad anti- <i>Aspergillus</i>	157
5.9. ACTIVIDAD CITOTÓXICA	158
6. CONCLUSIONES	160
7. RECOMENDACIONES	163
8. BIBLIOGRAFÍA	164
ANEXO 1	183
ANEXO 2	186
ANEXO 3	188
ANEXO 4	191

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAO	Actividad antioxidante
ABTS^{•+}	<i>2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical-cation</i> [Cación-radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6)].
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Aceite esencial o aceites esenciales
AO	Antioxidante o antioxidantes
AN	Ácidos nucleicos
ARN	Ácido ribonucleico
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
ca.	<i>Circa</i> (aproximadamente)
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas
CW/DVB	Carbowax/Poli(divinilbenceno)
D.I.	Diámetro interno
d_f	Grosor de la fase estacionaria
DPPH[•]	<i>2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical</i> (Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo).
e.g.	<i>Exempli Gratia</i> (Por ejemplo)
EI	<i>Electron impact</i> (Impacto de electrones)
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Potential</i> (Poder antioxidante reductor férrico)

GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatógrafo de gases o Cromatografía de gases, según el contexto)
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
GSH	Glutación
HS-SPME	<i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida (SPME) en el modo <i>Headspace</i> (HS))
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases de alta resolución)
HRGC-MS	<i>High Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas)
<i>i.e.</i>	<i>In Exempla</i> (es decir, o sea)
I_k	Índice(s) de Kováts
Istd	<i>Internal Standard</i> (Patrón interno)
L	Longitud
MDA	Malondialdehído
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas)
MW	<i>Microwave(s)</i> (microonda(s))
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydro-Distillation</i> (Hidrodestilación asistida por radiación de microondas)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
PA	Poli(acrilato)
PCA	Principal component analysis (Análisis por Componentes Principales)
PCL	<i>Photochemiluminescence</i> (Fotoquimioluminiscencia)
PFPH	Pentaflúorfenilhidracina
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PDMS/DVB	Poli(dimetilsiloxano)/Poli(divinilbenceno)
PG	Galato de propilo
PL	Peroxidación lipídica

RL	Radical(es) libre(s)
SDE	<i>Simultaneous Distillation-Extraction</i> (Destilación-extracción simultánea con solventes)
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
S-HS	<i>Headspace</i> (HS) estático (S)
SOD	Superóxido de dismutasa
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
TAA	<i>Total Antioxidant Activity</i> (Actividad antioxidante total)
TBHQ	<i>ter</i> -Butil hidroquinona
t_R	Tiempo de retención

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Registros en las bases de datos <i>Elsevier (Scopus)</i> y <i>ISI Web of Science</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	38
Figura 2. Relación de los años y el número de registros sobre el género <i>Ocimum</i> . Base de datos: <i>Elsevier (Scopus)</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	39
Figura 3. Relación de las revistas y el número de publicaciones sobre el género <i>Ocimum</i> , Base de datos: <i>Elsevier (Scopus)</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	40
Figura 4. Relación del área de conocimiento y el número de registros sobre el género <i>Ocimum</i> . Base de datos: <i>Elsevier (Scopus)</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	41
Figura 5. Relación de los autores principales y el número de publicaciones sobre el género <i>Ocimum</i> . Base de datos: <i>Elsevier (Scopus)</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	42
Figura 6. Relación del tipo de documento y el número de registros sobre el género <i>Ocimum</i> . Base de datos: <i>Elsevier (Scopus)</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	42
Figura 7. Relación de las oficinas de patentes con el número de patentes registradas. Base de datos: <i>Elsevier (Scopus)</i> . Periodo de observación: 1969-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	43

Figura 8. Relación de los años y el número de registros sobre el género <i>Ocimum</i> . Base de datos: <i>ISI Web of Science</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	44
Figura 9. Relación del área de conocimiento y el número de registros sobre el género <i>Ocimum</i> . Base de datos: <i>ISI Web of Science</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	45
Figura 10. Relación de las revistas y el número de publicaciones sobre el género <i>Ocimum</i> . Base de datos: <i>ISI Web of Science</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	46
Figura 11. Relación de los autores principales y el número de publicaciones sobre el género <i>Ocimum</i> . Base de datos: <i>ISI Web of Science</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	47
Figura 12. Relación del tipo de documento y el número de registros sobre el género <i>Ocimum</i> . Base de datos: <i>ISI Web of Science</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	47
Figura 13. Relación de los principales países y el número de publicaciones sobre el género <i>Ocimum</i> . Base de datos: <i>ISI Web of Science</i> . Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “ <i>Ocimum</i> ”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.	48
Figura 14. Montaje utilizado para la técnica MWHD.	52
Figura 15. Aparato utilizado para la técnica SDE [42].	53
Figura 16. Equipo utilizado para la técnica SFE.	54
Figura 17. Vial utilizado para el análisis <i>headspace</i> . “S” representa la fase condensada de la muestra y “G” corresponde al espacio de cabeza [53].	55
Figura 18. Dispositivo de SPME [59].	56

Figura 19. Modos de extracción por SPME: A. Directo; B. <i>Headspace</i> ; C. Con membrana [55,56].	57
Figura 20. Compuestos mayoritarios presentes en diferentes quimiotipos del aceite esencial de <i>Ocimum spp.</i>	64
Figura 21. Diagrama de flujo de la metodología desarrollada durante el Proyecto.	73
Figura 22. Parcela de cultivo de <i>Ocimum sp1.</i> “Sígueme blanco”, del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM. Campus principal, UIS.	75
Figura 23. Parcela de cultivo de <i>Ocimum sp2.</i> “Sígueme morado”, del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM. Campus principal, UIS.	75
Figura 24. Montaje empleado para obtener los AE por medio de la técnica MWHD.	77
Figura 25. Equipo a microescala de destilación-extracción con solvente simultánea [42], SDE, empleado en el presente Proyecto.	78
Figura 26. Extractor Soxhlet de alta presión, para la obtención de extractos vegetales con fluido supercrítico SFE (CO ₂).	79
Figura 27. Equipo <i>Headspace Sampler</i> HP 7694 (<i>Hewlett-Packard</i> , Palo Alto, CA, EE.UU.), empleado para la técnica de <i>headspace</i> estático.	80
Figura 28. Montaje utilizado para la extracción por HS-SPME.	81
Figura 29. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus</i> , con un inyector automático <i>Agilent 7863</i> , un sistema de datos <i>HP-MS ChemStation</i> (Versión 1.05), acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies MSD 5973</i> .	83
Figura 30. Planta cultivada de <i>Ocimum sp1.</i> “Sígueme blanco”, utilizada en el presente estudio.	92
Figura 31. Cromatogramas típicos de extractos de <i>Ocimum sp1.</i> , aislados de hojas de la planta antes de su floración por diferentes técnicas, a saber: A. MWHD; B. SDE y C. SFE. Columna DB-5MS (60 m), <i>split</i> 1:30, MSD. La identificación de los picos aparece en la Tabla 6 .	93

Figura 32. Espectro de masas del cinamato de metilo. EI, 70 eV.	96
Figura 33. Espectro de masas del linalool. EI, 70 eV.	98
Figura 34. Espectro de masas del eucaliptol (1,8-cineol). EI, 70 eV.	100
Figura 35. Cromatogramas típicos de las fracciones volátiles de <i>Ocimum sp1.</i> , obtenidas por diferentes métodos de <i>headspace</i> : A. HS-SPME y B. S-HS. Columna DB-5MS (60 m), <i>split</i> 1:30, FID. La identificación de los picos aparece en la Tabla 7 .	103
Figura 36. Distribución de las principales familias de los compuestos en el aceite esencial, extractos y fracciones volátiles de <i>Ocimum sp1.</i> “Sígueme blanco”.	106
Figura 37. Dendograma de <i>clusters</i> para metabolitos secundarios de <i>Ocimum sp1.</i> , obtenidos por diferentes técnicas de extracción.	107
Figura 38. Cromatogramas típicos de metabolitos secundarios volátiles aislados por SDE de diferentes partes de <i>Ocimum sp1.</i> : A. FLORES; B. HOJAS y C. TALLOS. Columna DB-5MS (60 m), <i>split</i> 1:30, MSD. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la Tabla 8 .	108
Figura 39. Cromatogramas típicos de metabolitos secundarios volátiles aislados por SDE de diferentes partes de <i>Ocimum sp1.</i> : A. FLORES; B. HOJAS y C. TALLOS. Columna DB-5MS (60 m), <i>split</i> 1:30, MSD.	110
Figura 40. Distribución de las principales familias de los compuestos en los extractos SDE, obtenidos de las flores, hojas y tallos de <i>Ocimum sp1.</i> “Sígueme blanco”. M: Hidrocarburos monoterpénicos; S: Hidrocarburos sesquiterpénicos; MO: Monoterpenos oxigenados; SO: Sesquiterpenos oxigenados; FP: Fenilpropanoides; OCO: Otros compuestos oxigenados.	113
Figura 41. Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “ <i>ista</i> ”, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de diferentes partes de la planta de <i>Ocimum sp1.</i> “Sígueme blanco”.	115

- Figura 42.** Distribución de las principales familias de los compuestos en los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” antes, durante y después de floración. M: Hidrocarburos monoterpénicos; S: Hidrocarburos sesquiterpénicos; MO: Monoterpenos oxigenados; SO: Sesquiterpenos oxigenados; FP: Fenilpropanoides; OCO: Otros compuestos oxigenados. 119
- Figura 43.** Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “*istd*”, para los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” recolectadas en tres diferentes épocas de cultivo. 121
- Figura 44.** Planta cultivada de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, utilizada en presente estudio. 122
- Figura 45.** Cromatogramas típicos de extractos aislados de hojas de *Ocimum sp2*, antes de su floración, por diferentes técnicas, a saber: **A.** MWHD; **B.** SDE y **C.** SFE. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD. La identificación de los picos se aparece en la **Tabla 12**. 123
- Figura 46.** Espectro de masas del estragol. EI, 70 eV. 126
- Figura 47.** Cromatogramas típicos de las fracciones volátiles de *Ocimum sp2*, obtenidas por diferentes métodos de *headspace*: **A.** S-HS y **B.** HS-SPME. Columna DB-5MS (60 m); *split* 1:30, FID. La identificación de los compuestos aparece en la **Tabla 13**. 129
- Figura 48.** Distribución de las principales familias de los compuestos en el aceite esencial, extractos y fracciones volátiles de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, obtenidos por diferentes técnicas de extracción, a saber: Fenilpropanoides (FP), hidrocarburos monoterpénicos (M), monoterpenos oxigenados (MO), hidrocarburos sesquiterpénicos (S), sesquiterpenos oxigenados (SO), hidrocarburos (H) y otros compuestos oxigenados (OCO). 132
- Figura 49.** Dendograma de *clusters* para metabolitos secundarios de *Ocimum sp2*, obtenidos por diferentes técnicas de extracción. 133

- Figura 50.** Análisis de componentes principales (PCA) de las cantidades relativas (%) de las mezclas de compuestos volátiles y semivolátiles, aisladas de las plantas de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, por diferentes métodos de extracción. 134
- Figura 51.** Cromatogramas típicos de metabolitos secundarios volátiles obtenidos por SDE, de diferentes partes de planta de *Ocimum sp2*: **A.** FLORES; **B.** HOJAS y **C.** TALLOS. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 14**. 136
- Figura 52.** Distribución de las principales familias de los compuestos en los extractos SDE, obtenidos de las flores, hojas y tallos de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”. M: Hidrocarburos monoterpénicos; S: Hidrocarburos sesquiterpénicos; MO: Monoterpenos oxigenados; SO: Sesquiterpenos oxigenados; FP: Fenilpropanoides; OCO: Otros compuestos oxigenados. 139
- Figura 53.** Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “*istd*”, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de diferentes partes de la planta de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”. 141
- Figura 54.** Distribución de las principales familias de los compuestos en los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, recolectadas antes, durante y después de floración. M: Hidrocarburos monoterpénicos; S: Hidrocarburos sesquiterpénicos; MO: Monoterpenos oxigenados; SO: Sesquiterpenos oxigenados; FP: Fenilpropanoides; OCO: Otros compuestos oxigenados. 144
- Figura 55.** Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “*istd*”, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, recolectadas en tres diferentes épocas de cultivo. 146
- Figura 56.** Reacción de reducción de DPPH[·] (Radical α,α -difeníl- β -picrilhidracilo). RH = antioxidante. 147
- Figura 57.** Desaparición del DPPH[·] en función de la cantidad de la vitamina E (mg) por mg del radical. 149

- Figura 58.** Desaparición de DPPH· en función de la cantidad de Trolox® (mg) por mg del radical. 150
- Figura 59.** Cinética de la reacción del AE de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, con el radical DPPH·. 151
- Figura 60.** Cinética de la reacción del AE de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, con el radical DPPH·. 151
- Figura 61.** Comparación del poder antirradicalario (ARP) de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, y sustancias de referencia. 152
- Figura 62.** Porcentaje de inhibición del catión-radical ABTS⁺, en función de la concentración de Trolox®. 154
- Figura 63.** Comparación de las actividades antioxidantes totales (TAA), de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, y sustancias de referencia. 155

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Información recopilada sobre los compuestos mayoritarios de diferentes especies de plantas de <i>Ocimum spp.</i> (Labiatae).	30
Tabla 2.	12 variedades de <i>Ocimum sp.</i> detectadas en Ibagué (Colombia).	32
Tabla 3.	Estudios sobre las actividades antifúngica, antibacterial y citotóxica de <i>Ocimum spp.</i>	33
Tabla 4.	Estudios reportados sobre la actividad antioxidante de <i>Ocimum spp.</i>	35
Tabla 5.	Recubrimientos de las fibras que se emplean en la SPME [54,56].	58
Tabla 6.	Composición química de los extractos de <i>Ocimum sp1.</i> "Sígueme blanco", obtenidos por diferentes técnicas de extracción, de hojas de la planta antes de su floración.	94
Tabla 7.	Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos en las fracciones volátiles obtenidas por HS-SPME y S-HS, de <i>Ocimum sp1.</i> "Sígueme blanco".	104
Tabla 8.	Composición química de los extractos SDE de <i>Ocimum sp1.</i> "Sígueme blanco", obtenidos de diferentes partes de la planta.	111
Tabla 9.	Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) " <i>istd</i> ", de los compuestos mayoritarios de los extractos SDE de <i>Ocimum sp1.</i> "Sígueme blanco", obtenidos de diferentes partes de la planta.	114
Tabla 10.	Composición química de los extractos SDE de hojas de <i>Ocimum sp1.</i> "Sígueme blanco", obtenidos en tres diferentes épocas de cultivo.	116

Tabla 11.	Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “ <i>istd</i> ”, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE de <i>Ocimum sp1</i> . “Sígueme blanco”, obtenidos en tres diferentes épocas de cultivo.	120
Tabla 12.	Composición química de los extractos, obtenidos por diferentes técnicas de extracción, de hojas de <i>Ocimum sp2</i> . “Sígueme morado”, antes de su floración.	124
Tabla 13.	Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en las fracciones volátiles de <i>Ocimum sp2</i> . “Sígueme morado”, obtenidas por HS-SPME y S-HS.	130
Tabla 14.	Composición química de los extractos obtenidos por SDE, de diferentes partes de la planta de <i>Ocimum sp2</i> . “Sígueme morado”.	137
Tabla 15.	Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “ <i>istd</i> ”, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE de <i>Ocimum sp2</i> . “Sígueme morado”, obtenidos de diferentes partes de la planta.	140
Tabla 16.	Composición química de los extractos SDE de hojas de <i>Ocimum sp2</i> ., obtenidos de plantas recolectadas en tres diferentes épocas de crecimiento.	142
Tabla 17.	Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “ <i>istd</i> ”, de los compuestos mayoritarios de los extractos SDE de <i>Ocimum sp2</i> . “Sígueme morado”, obtenidos en tres diferentes épocas de cultivo.	145

Tabla 18.	Capacidad de atrapamiento de radicales del Trolox [®] , vitamina E, BHT, BHA y AE de <i>Ocimum spp.</i> , medida por los métodos de decoloración del radical DPPH [·] y el catión-radical ABTS ⁺ .	148
Tabla 19.	Concentración mínima inhibitoria, CMI, de los aceites esenciales de <i>Ocimum sp1</i> . "Sígueme blanco" y <i>Ocimum sp2</i> . "Sígueme morado", en <i>Candida parapsilosis</i> y <i>Candida krusei</i> (%v de AE/ v de DMSO).	156
Tabla 20.	Concentración mínima inhibitoria, CMI, de los AE de <i>Ocimum sp1</i> . "Sígueme blanco" y <i>Ocimum sp2</i> . "Sígueme morado", estudiados en <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i> (%v de AE/v de DMSO).	157
Tabla 21.	Toxicidad aguda (CL ₅₀) del aceite esencial de <i>Ocimum sp1</i> . "Sígueme blanco".	159
Tabla 22.	Resultados generales de los ensayos y determinaciones realizadas a los aceites esenciales de <i>Ocimum sp1</i> . "Sígueme blanco" y <i>Ocimum sp2</i> . "Sígueme morado".	162

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Reducción del radical DPPH [•] , por la acción de un radical (R [•]) o un antioxidante (AH).	68
Esquema 2. Generación del catión-radical ABTS ^{•+}	69
Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación del cinamato de metilo.	97
Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación del linalool.	99
Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del eucaliptol (1,8-cineol)	101
Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación del estragol.	127

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Determinación de las condiciones de extracción (fibra, tiempo y temperatura) para la técnica de extracción HS-SPME	183
ANEXO 2. Contribuciones de cada familia de compuestos de <i>Ocimum spp.</i> a los componentes principales, usados para clasificar las fracciones volátiles y semivolátiles obtenidas por las diferentes técnicas de extracción.	186
ANEXO 3. Cinéticas de reacción (estados estacionarios) de la vitamina E, Trolox [®] y compuestos sintéticos en la reacción con el radical DPPH.	188
ANEXO 4. Curvas de desaparición del DPPH en función de la cantidad de AE y compuestos sintéticos.	191

RESUMEN:

TÍTULO: COMPARACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE DOS ESPECIES DE *Ocimum sp.* (LABIATAE), EN FUNCIÓN DEL MÉTODO DE SU EXTRACCIÓN Y ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA Y ANTIFÚNGICA*

Autores: Johan Augusto Reyes Barajas**
José Gregorio Patiño Porras**

Palabras Claves: Aceite esencial, *Ocimum*, MWHD, SDE, SFE, S-HS, HS-SPME, actividad antioxidante, citotóxica y antifúngica.

Se realizó el estudio sobre la composición química de los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de dos especies de *Ocimum spp.* (*Ocimum sp1.* "Sígueme blanco", *Ocimum sp2.* "Sígueme morado") y de sus actividades antioxidante, citotóxica y antifúngica. La obtención de los metabolitos se realizó mediante diferentes técnicas de extracción: hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), destilación-extracción simultánea con solvente (SDE), extracción con fluido supercrítico (SFE), *headspace* estático (S-HS) y microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME). De igual manera, se estableció una comparación de la composición química de extractos obtenidos por SDE en diferentes etapas de crecimiento de la planta (antes, durante y después de la floración), así como de extractos provenientes de las diversas partes de la planta (flores, hojas y tallos). Las dos especies de *Ocimum sp.* se caracterizan por su alto contenido de fenilpropanoides en cantidades relativas (%) superiores al 50%, representados por sus compuestos mayoritarios: *Ocimum sp1.* (cinamato de metilo) y *Ocimum sp2.* (estragol), y por la presencia de monoterpenos oxigenados (> 20%), principalmente, por el linalool (8-12%) y eucaliptol (2-8%).

La actividad antioxidante de los aceites esenciales (AE) de *Ocimum spp.* presentaron una baja capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH[·], en comparación con las sustancias antioxidantes evaluadas como referencia (Trolox[®], vitamina E, BHT y BHA). De los dos, el AE de *Ocimum sp1.* presentó mayor actividad antirradicalaria, por los dos métodos evaluados. La actividad antifúngica de los AE de *Ocimum spp.* no fue comparable con la actividad de la sustancia de referencia (*itraconazol*). Para la actividad citotóxica, el AE de *Ocimum sp1.*, presentó valor de CL₅₀ 20.41 µg/mL después de 24 horas de exposición, clasificándose como un aceite de baja toxicidad, mientras que para el *Ocimum sp2.* el resultado de esta actividad no fue reproducible.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias, Escuela de química. Directores Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez.

ABSTRACT:

TITLE: COMPARISON OF THE VOLATILE SECONDARY METABOLITES OF TWO SPECIES OF *Ocimum sp.* (LABIATAE), BASED ON EXTRACTION METHODS AND EVALUATION OF THEIR ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES *

Authors: Johan Augusto Reyes Barajas **
José Gregorio Patiño Porras **

Key words: Essential oil, *Ocimum*, MWHD, SDE, SFE, S-HS, HS-SPME, antioxidant, cytotoxic and antifungal activity.

Volatile and semivolatile secondary metabolites of two species of *Ocimum spp.* (*Ocimum sp1.* "Sígueme blanco", *Ocimum sp2.* "Sígueme morado") were obtained by different extraction methods: microwave-assisted hydrodistillation (MWHD), simultaneous distillation-extraction (SDE), supercritical fluid extraction (SFE), static headspace (S-HS) and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). Additionally, SDE was used to obtain extracts of diverse parts (flowers, leaves and stems) of plants at different growth stages (before, during and after flowering). The two species of *Ocimum sp.* were characterized by their high content of phenylpropanes in relative amounts (%) over 50%. Methyl cinnamate and estragole were the distinctive compounds of the extracts and oils obtained from *Ocimum sp1.* and *Ocimum sp2.*, respectively. The main common components were oxygenated monoterpenes (> 20%), where linalool (8-12%) and eucaliptol (2-8%).

The essential oils (EO) of *Ocimum spp.* presented lower quenching capacities against radical-cation ABTS⁺ and radical DPPH, in comparison with the antioxidant reference substances (Trolox®, vitamin E, BHT and BHA). The EO of *Ocimum sp1.* presented higher anti-radical activity than that of the *Ocimum sp2.* The antifungal activity of the *Ocimum spp.* EO was much smaller than that shown by the reference substance (*itraconazol*). The cytotoxic activity of *Ocimum sp1.* EO, presented a CL₅₀ value of 20,41 µg/mL after 24 hours of exhibition. Thus, this is classified as an oil of low toxicity.

*Degree Project

** Universidad Industrial de Santander, Sciences Faculty, Chemistry Department. Directors Elena E. Stashenko and Jairo René Martínez.

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda a nivel mundial de productos naturales, se debe a los múltiples problemas que se les atribuyen a los productos sintéticos que afectan el ambiente y la salud humana. Esta problemática ha despertado gran interés por el uso de los aceites esenciales (AE) como materia prima de múltiples productos, (alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos, textiles, polímeros, entre otros), y ha originado numerosas e importantes investigaciones en el área de las ciencias naturales, para estudiar sus propiedades organolépticas, así como buscar las nuevas aplicaciones, gracias a la diversa actividad biológica de plantas aromáticas.

Además, la búsqueda de cultivos alternos que permitan reemplazar los cultivos ilícitos y la necesidad de la agroindustrialización a favor de la producción a gran escala de AE en nuestro país, son una invitación a encaminar esfuerzos investigativos y poner todo el conocimiento científico y tecnológico en este campo para fomentar y desarrollar la industria de los AE en Colombia.

El mercado de los AE es un mercado dinámico, competitivo y en continua expansión, debido a la gran y variada aplicación de esencias naturales en las industrias alimenticia, cosmética y de bebidas. Colombia es un país privilegiado en cuanto a su biodiversidad; sin embargo, la explotación de cultivos solo se ha basado en una agricultura tradicional (café, banano, flores, etc.) y no se ha hecho un aprovechamiento total de nuestra flora en cuanto a especies aromáticas y medicinales se refiere. La explotación a nivel agroindustrial de las plantas aromáticas y su aprovechamiento para la extracción de AE surge como una importante alternativa para suplir la demanda de los AE como materia prima, ya que en la actualidad más de 60% de la demanda interna de estos productos se satisface a través de las importaciones [1].

El valor comercial de un AE está determinado por su composición, la cual varía de acuerdo con las condiciones climáticas, según los “quimiotipos”, que pueda tener una planta, y con factores fisiológicos de las plantas. La composición de un AE se determina por medio de las técnicas analíticas de cromatografía de gases y espectrometría de masas.

En nuestro país se han desarrollado diversas investigaciones sobre la composición de los AE de plantas tropicales, que potencialmente podrían competir en el mercado internacional, pero aún no se han realizado suficientes estudios relacionados con sus posibles aplicaciones a nivel de agentes farmacológicos (antibacteriales, antifúngicos, antioxidantes, etc.); tampoco se cuenta con los estudios sobre cultivos que permitan establecer el grado de mejoramiento de parámetros tales como: uso de fertilizantes, mejor época de recolección, pH, riego, sombra, densidad de siembra, etc., para obtener un AE de altos rendimiento y calidad.

En la búsqueda de nuevas alternativas de cultivos agroindustriales que permitan crecimiento económico, se ha encontrado una serie de plantas aromáticas muy interesantes desde el punto de sus AE, dentro de las cuales se encuentran varias especies de *Ocimum*, las cuales gozan de una gran demanda mundial y un buen precio en el mercado, por sus diversas aplicaciones en la elaboración de saborizantes, aromatizantes, perfumes, licores, artículos de aseo, productos farmacéuticos, así como por su utilización en la síntesis orgánica fina.

Por estas razones y por la necesidad y el interés de fomentar y fortalecer la industria de AE en nuestro país, con base en la producción a gran escala y la implementación de cultivos alternos de plantas aromáticas, surgió la presente investigación, como un aporte, de la Universidad pública para el desarrollo de este campo, particularmente, con el fin de establecer la composición química de los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de dos especies de *Ocimum sp.*, extracción de AE, estudio de sus posibles actividades

antioxidante, antifúngica y citotóxica. En busca de obtener AE de buena calidad, que posean aplicaciones a nivel biológico y que puedan competir en el mercado internacional.

En la presente investigación, se realizó un estudio sobre la variación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de dos especies de *Ocimum* (conocidas comúnmente como “Sígueme blanco” y “Sígueme morado”), en función del método de su extracción. El aislamiento de los metabolitos secundarios de las plantas de *Ocimum sp.* se realizó por diferentes métodos, tales como: hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), destilación-extracción simultánea con solvente (SDE), extracción con fluido supercrítico (SFE), *headspace* estático (S-HS) y microextracción en fase sólida en el modo *headspace* (HS-SPME).

De igual manera, se estableció una comparación de la composición química de extractos obtenidos por SDE en diferentes etapas de crecimiento de la planta (antes, durante y después de la floración), así como de extractos provenientes de las diversas partes de la planta (flores, hojas y tallos).

La caracterización espectroscópica de los AE, extractos y fracciones volátiles, se llevó a cabo utilizando cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), en columnas capilares con fases estacionarias polar y apolar.

Como respuesta a la problemática del uso de productos de origen sintético, se evaluó la actividad antioxidante de los AE de las dos especies de *Ocimum*, obtenidos por MWHD (en la etapa antes de floración), como agentes secuestradores de radicales, usando los métodos de decoloración del radical α, α -difeníl- α -picrilhidracilo (DPPH \cdot) y de el catión-radical del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbencen-tiazolina-6-sulfónico) (ABTS \cdot^+), y comparando la actividad del AE con la de los antioxidantes como BHA, BHT, la vitamina E y el Trolox[®].

Se espera, que con el aporte de este estudio y los esfuerzos mancomunados de los miembros del CENIVAM, se provea al sector agrario de una visión más amplia acerca de los aceites esenciales, conocimientos y herramientas suficientes que incentiven la participación de los diferentes sectores (comunidades campesinas, asociaciones de productores y la industria), lo cual servirá de base para la creación de la industria de aceites esenciales en nuestro país. Esta industria dará origen a nuevas fuentes de trabajo y, por tal motivo, contribuirá al crecimiento de la economía colombiana.

1. MARCO DE ANTECEDENTES

En forma condensada, a continuación, se resumen algunos estudios sobre la composición química, variedades y quimiotipos de diferentes especies de *Ocimum* (familia Labiatae) (Véase la **Tabla 1**).

Tabla 1. Información recopilada sobre los compuestos mayoritarios de diferentes especies de plantas de *Ocimum spp.* (Labiatae).

PLANTA	COMPUESTOS MAYORITARIOS	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	REF.
<i>O. gratissimum</i>	p-Cimeno (12.84-14.00%); timol (19.35-27.33%).	HD	[2]
<i>O. basilicum</i> var. <i>glabratum</i>	Linalool (43.73%); (E)-cinamato de metilo (27.28%).	HD	[3]
<i>O. basilicum</i>	Metil chavicol (47.66%); (E)-cinamato de metilo (4.80%); metil eugenol (21.50%)	SFE	[4]
<i>O. basilicum</i>	Linalool (54.06%); metil chavicol (8.68%).	HD	[5]
<i>O. gratissimum</i>	Eugenol (19.26%); metil eugenol (46.83%).	HD	[6]
<i>O. gratissimum</i>	Quimiotipo 1: Linalool (46.1%); metil chavicol (20.6%). Quimiotipo 2: 1,8-Cineol (0.1-30.9%); β -cariofileno (2.5-27.3%); eugenol (21.1-56.7%).	HD	[7]
<i>O. gratissimum</i>	1,8-Cineol (12.0%); eugenol (40.3%).	HD	[8]
<i>O. basilicum</i> L. var. <i>glabratum</i>	Quimiotipo 1: Metil chavicol (55-75%); linalool (22-35%). Quimiotipo 2: Eugenol (55-75%); ocimeno (10-15%). Quimiotipo 3: Alcanfor (60-76%); canfeno (11-18%).	HD	[9]
<i>O. basilicum</i>	Metil chavicol (83.58-87.21%).	SDE	[10]
<i>O. basilicum</i>	Quimiotipo 1: Linalool (44.34-56.84%). Quimiotipo 2: Sabineno (53.14%).	HD	[11]

Continuación, **Tabla 1.**

<i>O. basilicum</i>	Eugenol (28.19%). 1,8-Cineol (30.44-31.15%). Linalool (43.07%).	SDE HS MWHD	[12]
<i>O. basilicum</i>	Tipo 1: Linalool (90-90%). Tipo 2: Linalool (60%); metil chavicol (5-10%); geraniol (5-10%); eugenol (5-10%). Tipo 3: Linalool (33-45%); metil chavicol (33-45%). Tipo 4: Metil chavicol (80-93%).	HD	[13]
<i>O. basilicum</i>	var. 'Kinos': Linalool (54.4%); metil chavicol (29.9%); eugenol (7.3%). var. 'Sgouros': Linalool (41.0%); metil chavicol (13.0%); geraniol (9.0%). var. 'Mauromytikos': Cinamato de metilo (37.8%); linalool (22.6%); 1,8-cineol (7.9%).	HD	[14]
<i>O. basilicum</i>	Linalool (2.09-2.58%); metil chavicol (58.03-70.82%).	MWHD	[15]
<i>O. basilicum</i>	var. canum: Linalool (21.7-26.2%); cinamato de metilo (28.8-34.5%). var. crispa: Linalool (67.5-73.4%); geraniol (4.3-8.1%). var. glabratum: Metil chavicol (43.1-51.7%); cinamato de metilo (15.7-26.9%). var. glabratum x var. purpurascens: Linalool (21.8-27.4%); cinamato de metilo (33.7-39.3%). var. minimum: Metil eugenol (43.7-49.8%); geraniol (21.4-27.2%). var. pilosum: Metil isoeugenol (15.2-26.1%); acetato de geranilo (31.9-43.6%). var. purpurascens: Linalool (36.2-41.6%); citronelal (20.2-24.2%). var. thyrsoflorum: Metil eugenol (2.8-4.7%); cinamato de metilo (74.6-81.8%).	HD	[16]

REF: Referencias bibliográficas.

Viña y Murillo [17], realizaron un estudio sobre diferentes variedades de *Ocimum*, recolectadas en Colombia, y reportaron quimiotipos presentados en la **Tabla 2**, donde también aparecen compuestos mayoritarios de cada uno.

Tabla 2. 12 variedades de *Ocimum sp.* detectadas en Ibagué (Colombia).

Nombre común	Nombre científico	Quimiotipo (Compuesto principal)	Subtipo
Canela	<i>O. micranthum</i>	Cinamato de metilo	E-Cinamato de metilo > estragol
Querendona morada	<i>O. americanum</i>	Cinamato de metilo	E-Cinamato de metilo > estragol
Castilla morada	<i>O. americanum</i>	Cinamato de metilo	Cinamato de metilo > metil eugenol
Dulce de castilla	<i>O. basilicum</i>	Cinamato de metilo	Cinamato de metilo > linalool > 1,8-cineol
Zancona morada	<i>O. americanum</i>	Cinamato de metilo	Cinamato de metilo > linalool > estragol
Crespa morada	<i>O. sp</i>	Cinamato de metilo	Cinamato de metilo > linalool
Virgen pequeña	<i>O. minimum</i>	Cinamato de metilo	Cinamato de metilo > linalool
Virgen morada	<i>O. minimum</i>	Cinamato de metilo	Cinamato de metilo > linalool
Crespa blanca	<i>O. sp</i>	Cinamato de metilo	Cinamato de metilo > linalool > 1,8-cineol
Blanca compacta	<i>O. basilicum</i>	Cinamato de metilo	Cinamato de metilo > linalool > 1,8-cineol
Verde de hojas grandes	<i>O. basilicum</i>	Linalool	Linalool > cinamato de metilo
Clavo	<i>O. americanum</i>	Cariofileno	Cariofileno > metil eugenol

Los trabajos realizados sobre la evaluación de las actividades antifúngica, antibacteriana y citotóxica, de los aceites esenciales de diferentes variedades de *Ocimum*, se recopilan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Estudios sobre las actividades antifúngica, antibacterial y citotóxica de *Ocimum spp.*

PLANTA	COMPUESTOS MAYORITARIOS	MICROORGANISMOS	TÉCNICA	REF
<i>O. gratissimum</i>	Eugenol	Bacterias: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , Hongos: Dermatofitos	Efecto inhibitor <i>in vitro</i>	[18]
<i>O. gratissimum</i>	Eugenol	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Método de susceptibilidad de la dilución de agar	[19]
<i>O. gratissimum</i>	Estragol	Agente carcinógeno genotóxico	Exposición crónica o después de algunas dosis repetidas	[20]
<i>O. gratissimum</i>	Cinamato de metilo	Dermatofitos y <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , causando micosis de la piel y onicomicosis; contra <i>Cryptococcus neoformans</i> , implicados en enfermedades de VIH; y contra <i>Malassezia pachydermatis</i> , encontraron otitis externa en perros.	Actividad antifúngica interesante <i>in vitro</i> , por el método de la dilución del agar	[21]
<i>O. gratissimum</i>	Eugenol	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , y <i>Candida tropicalis</i> .	Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	[22]
<i>O. basilicum</i>	Linalool (46.0-50.0%); metil chavicol (8.1-16.5%).	Genotoxicidad: <i>Saccaromyces cerevisiae</i> Citotóxicidad: <i>Salmonella typhimurium</i>	Técnica de Zimmermann	[23]

Continuación, **Tabla 3.**

<i>O. americanum</i>	Timol (43.5%); eugenol (8.1%).	<i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicales</i> .	Método de difusión	[24]
<i>O. gratissimum</i>	Timol (53.2%); γ -terpineno (25.7%)	Hongos: <i>Aspergillus nigel</i> . Dermatofitos: <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ; <i>Microsporum canis</i> .		
<i>O. campechianum</i>	Eugenol (46.55%), β -cariofileno (11.94%), β -elemeno (9.06%) y linalool (1.49%)	<i>Staphylococcus aureus</i> (0.104), <i>Enterococcus foecalis</i> (0.104), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (0.173), <i>Escherichia coli</i> (0.035), <i>Saccharomyces cerevisiate</i> (0.069), <i>Rhodotorula glutinis</i> (0.139), <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (0.104), <i>Yarrowia lypolityca</i> (0.069) y <i>Candida albicans</i> (0.069).	Se encontró la actividad antibacterial expresada como concentración mínima inhibitoria (MIC) (mg/mL)	[25]

REF: Referencias bibliográficas.

En la **Tabla 4**, se presentan algunos estudios sobre la actividad antioxidante de los AE de diferentes especies y variedades de *Ocimum*, éstos reflejan un buen comportamiento de los aceites esenciales y extractos de *Ocimum sp.* con alto contenido de eugenol, como atrapadores de radicales. En algunos casos esta actividad es comparable o superior con la actividad presentada por los antioxidantes sintéticos BHT y BHA.

Tabla 4. Estudios reportados sobre la actividad antioxidante de *Ocimum spp.*

PLANTA	COMPUESTOS MAYORITARIOS	MÉTODO	ACTIVIDAD	REF.
<i>O. campechianum</i>	Eugenol (46.55%) β -cariofileno (11.44%) 1,8-cineol (5.35%) γ -elemeno (4.175)	DPPH[·] Decoloración del β-caroteno Fotoquimoluminiscencia (PCL)	DPPH[·] : Mostró un mayor porcentaje de atrapamiento de radicales libres comparado con el del <i>Ocimum basilicum</i> . Decoloración del β-caroteno : Mostró un mayor porcentaje de inhibición comparado con BHA y similar al <i>Ocimum basilicum</i> .	[25]
<i>O. basilicum</i>	Eugenol (59%); chavicol (0.7%); linalool (28.6%); estragol (21.7%); α -cadinol (7.1%); 1,8-cineol (4.0%); E-cinamato de metilo (14.3%).	DPPH[·] FRAP	DPPH[·] y FRAP : El aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> mostró una actividad antioxidante similar a la del BHT.	[26]
<i>O. basilicum</i>	Linalool (3.94 mg/g); estragol (2.03 mg/g); cinamato de metilo (1.28 mg/g); eugenol (0.896 mg/g); 1,8-cineol (0.288 mg/g).	Aldehído/ácido carboxílico	Eugenol : Mostró una fuerte actividad antioxidante comparada con las del BHT y del α -tocoferol.	[27]

Continuación, **Tabla 4.**

<i>O. basilicum</i>	Metil chavicol (45.8%); linalool (24.2%).	DPPH Peroxidación lipídica	El <i>Ocimum basilicum</i> mostró una mayor actividad antioxidante IC ₅₀ (0.39 µg/mL) que el BHT (5.37 µg/mL), pero menor que las del orégano 0.17 µg/mL y tomillo 0.19 µg/mL; en la peroxidación lipídica inducida por la reacción de Fenton, todos los AE mostraron actividades muy similares a la del BHT (44.12-67.14%).	[28]
<i>O. basilicum</i>	Ácido rosmarínico.	DPPH	Se analizó la AAO de un extracto metanólico del <i>O. basilicum</i> L. y se encontró como principal responsable de la actividad antioxidante al ácido rosmarínico.	[29]
<i>O. tenuiflorum</i>	Eugenol, metil eugenol, β-elemeno, β-cariofileno, (E)-acetato de cinamilo.	DPPH	Se encontró AAO con un valor de IC ₅₀ de 76 µg/mL	[30]

REF: Referencias bibliográficas.

Según la información encontrada en las **Tablas 1- 4**, se observa la existencia de gran variedad de especies pertenecientes al género *Ocimum*, así como la existencia de quimiotipos, lo cual se ve reflejado en las diferencias que se presentan en las composiciones de cada AE. Por tales razones, se hace necesario el estudio de la composición química de los metabolitos secundarios de las especies *Ocimum spp.*, que permitan establecer cuáles son sus compuestos mayoritarios. Para esto, se hace uso de diferentes técnicas extractivas y de herramientas analíticas como cromatografía de gases y espectrometría de masas, que permitan separar e identificar los diferentes componentes del AE.

Los resultados sobre actividad biológica (**Tabla 3**) y antioxidante (**Tabla 4**), de especies de *Ocimum spp.*, dejan ver una buena actividad antibacteriana, antifúngica y antirradicalaria, por parte de dichas especies, lo cual hace muy atractivo el estudio de plantas del género *Ocimum*, cultivadas en Colombia, y de sus propiedades biológicas, en la búsqueda para establecer las posibles aplicaciones y usos de sus AE, en las industrias farmacológica y alimenticia, como agentes antioxidantes de origen natural.

2. ANÁLISIS CIENCIOMÉTRICO

En la búsqueda para determinar nuevas líneas de investigación, soluciones tecnológicas y oportunidades de desarrollo en una determinada área, se hace vigilancia tecnológica fundamentada en las bases de datos (publicaciones y patentes), los buscadores de *Internet* y la *cienciometría*, como herramientas para evaluar y examinar el desarrollo de organizaciones científicas, y sus productos en determinadas áreas de conocimiento.

El desarrollo científico y estudios realizados sobre el género *Ocimum*, se analizaron mediante las herramientas de la producción científica sobre este género, usando dos bases de datos de artículos científicos, a saber: **Elsevier (Scopus)** y **ISI Web of Science**, consultadas desde el año 2000 hasta el 10 de abril de 2007. En la **Figura 1** se observa el número de registros relacionados con el género *Ocimum*, que aparecen en estas bases de datos.

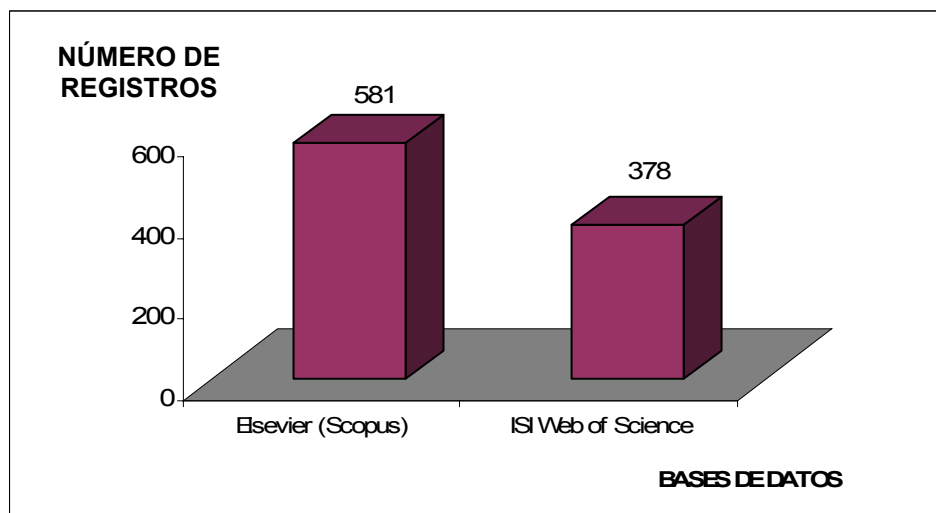


Figura 1. Registros en las bases de datos *Elsevier (Scopus)* y *ISI Web of Science*. Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “*Ocimum*”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

- BASE DE DATOS : **ELSEVIER (SCOPUS)**

El análisis cuantitativo, usando la base de datos *Elsevier (Scopus)*, muestra un aumento en número de registros entre los años 2000 y 2006 (Véase **Figura 2**), siendo los años 2005 y 2006 que presentan el mayor número de registros.

De igual manera, las revistas de alto impacto (**Figura 3**), que presentan la mayor cantidad de artículos publicados sobre *Ocimum* son: *Journal of Ethnopharmacology* y *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

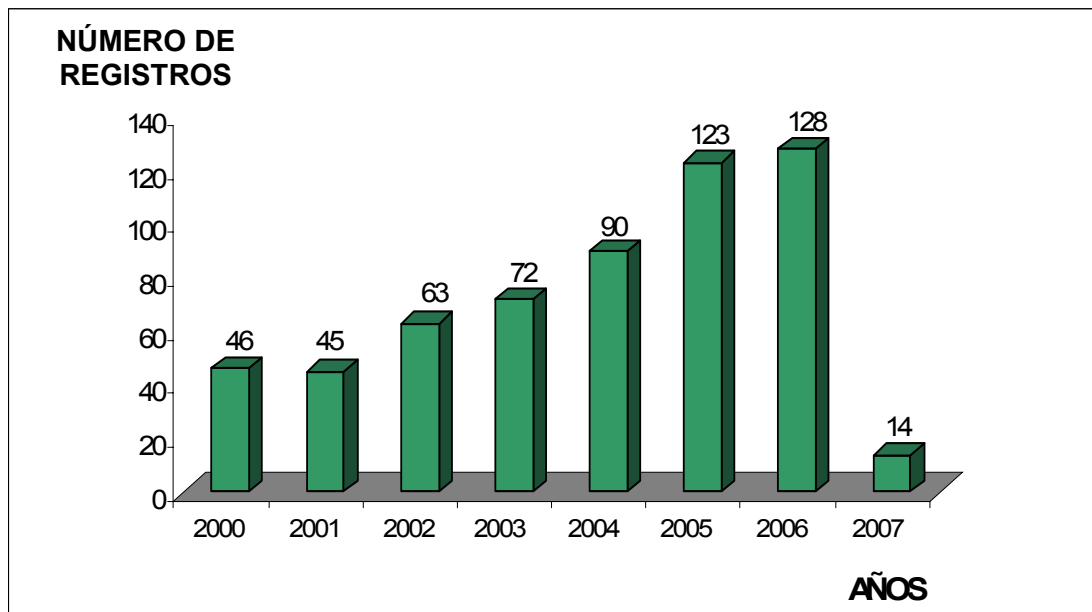


Figura 2. Relación de los años y el número de registros sobre el género *Ocimum*. Base de datos: *Elsevier (Scopus)*. Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH "*Ocimum*". Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

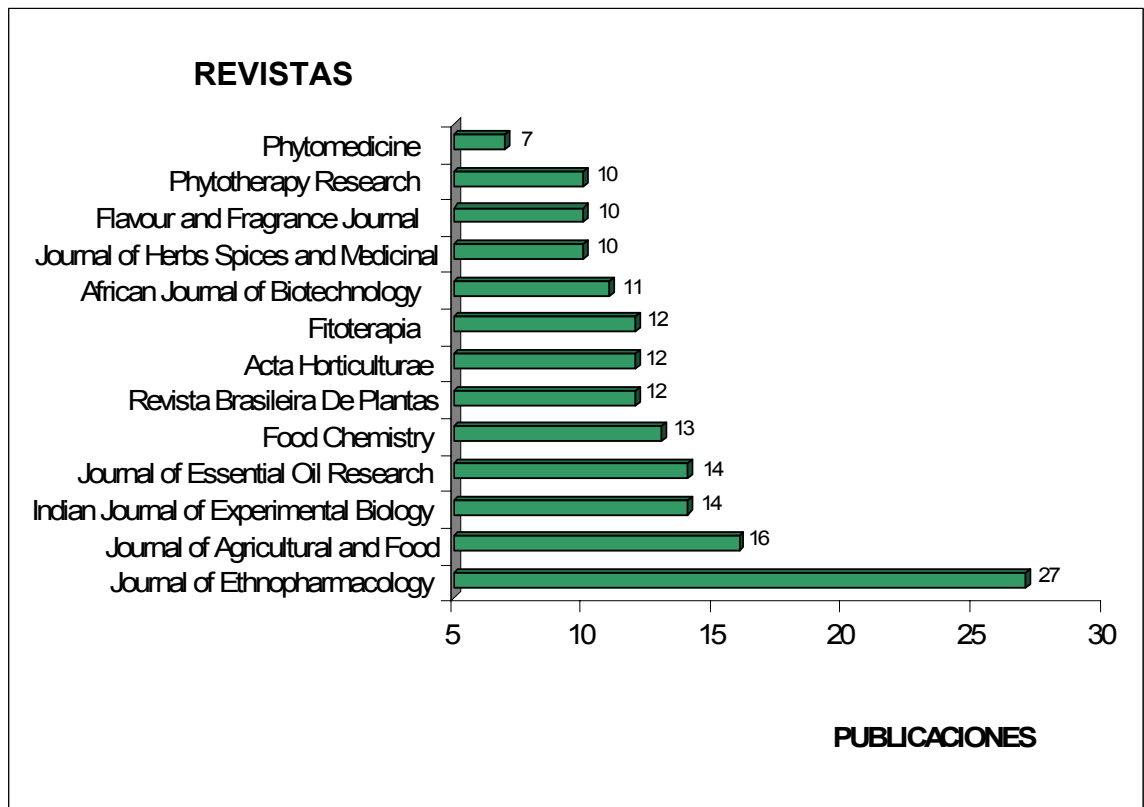


Figura 3. Relación de las revistas y el número de publicaciones sobre el género *Ocimum*, Base de datos: Elsevier (Scopus). Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH "*Ocimum*". Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

Los datos registrados en la **Figura 4**, reportan que el área de conocimiento más "activa" en el estudio de las plantas del género *Ocimum* es "Agricultura y Ciencias Biológicas", seguida de farmacología, toxicología y farmacéutica, las cuales presentan un alto número de registros.



Figura 4. Relación del área de conocimiento y el número de registros sobre el género *Ocimum*. Base de datos: *Elsevier (Scopus)*. Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH "*Ocimum*". Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

Usando la base de datos de *Elsevier (Scopus)*, se logró relacionar el número de publicaciones con sus autores; se encontró que el científico J.E Simon, fue el autor que figuraba en más de 12 publicaciones (Véase **Figura 5**). El artículo fue la modalidad más frecuente de documento, usado por diferentes autores para reportar sus resultados (**Figura 6**), destacándose, entre otros tipos de documentos, a saber: reseñas, cartas, comunicaciones cortas y notas.

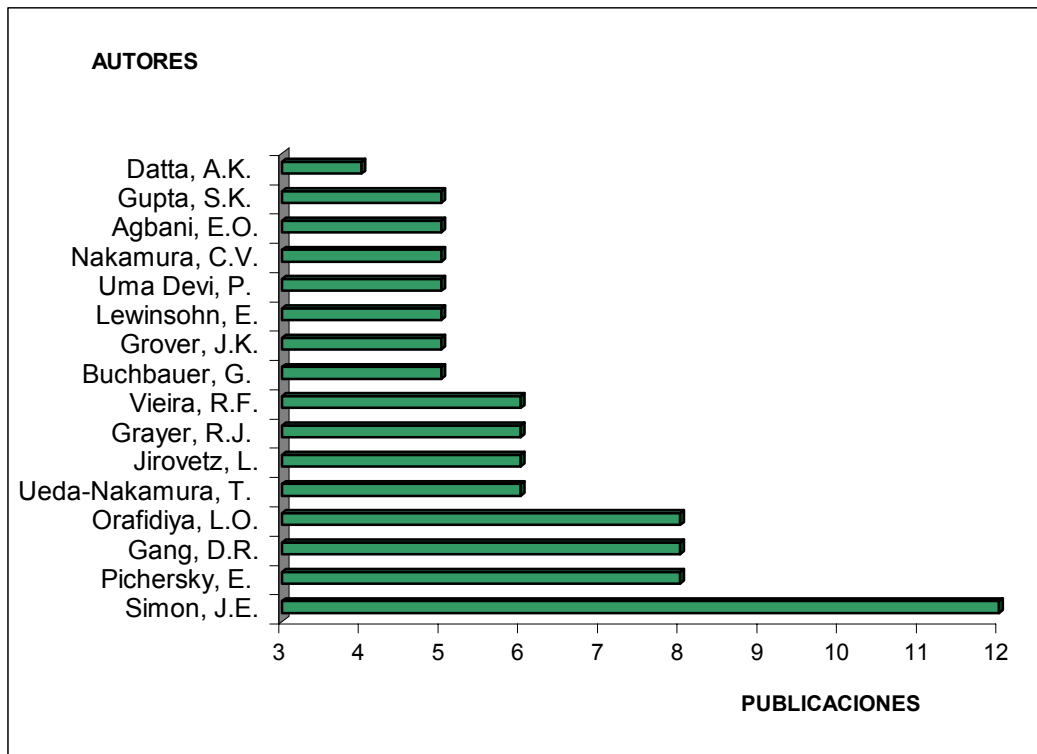


Figura 5. Relación de los autores principales y el número de publicaciones sobre el género *Ocimum*. Base de datos: *Elsevier (Scopus)*. Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “*Ocimum*”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

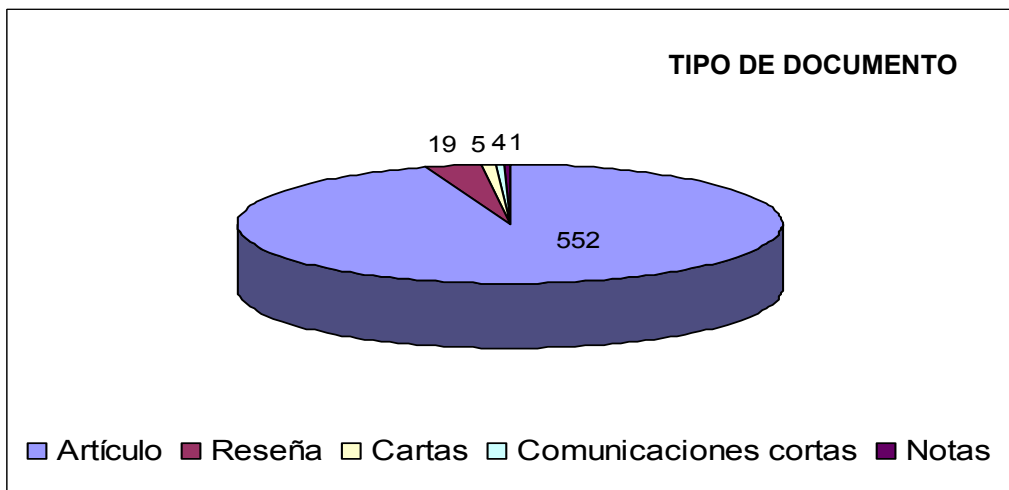


Figura 6. Relación del tipo de documento y el número de registros sobre el género *Ocimum*. Base de datos: *Elsevier (Scopus)*. Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “*Ocimum*”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

La *US Patent Office* y *World Intellectual Property Organization* (**Figura 7**), son las oficinas con mayor número de patentes registradas. En total, se encontraron 573 patentes relacionadas con el genero *Ocimum*, las cuales reflejan la importancia de su estudio y abarcan sus usos, propiedades y aplicaciones en diferentes áreas del conocimiento.

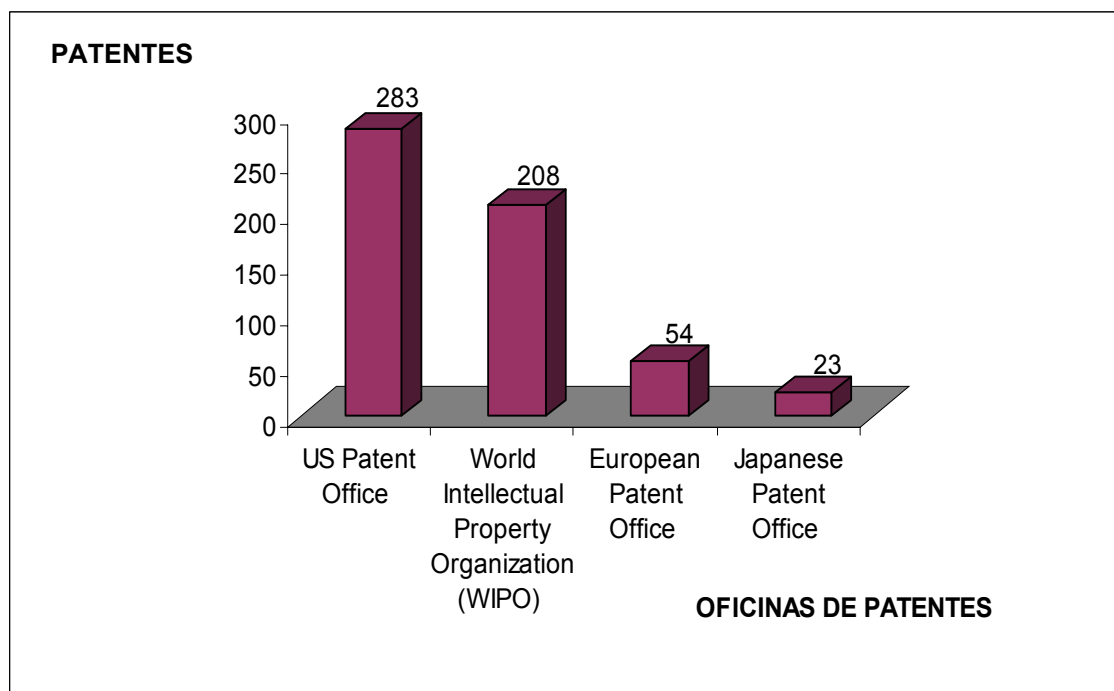


Figura 7. Relación de las oficinas de patentes con el número de patentes registradas. Base de datos: *Elsevier (Scopus)*. Periodo de observación: 1969-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH "*Ocimum*". Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

- BASE DE DATOS: **ISI WEB OF SCIENCE**

El número de registros es menor en la base de datos *ISI Web of Science*, en comparación con la base de datos *Elsevier (Scopus)* (Véase, la **Figura 1**). En la **Figura 8**, se observa un aumento progresivo en cuanto al número de registros, siendo los años 2004-2006 el periodo cuando se realizó el mayor número de registros, sobre el género *Ocimum*.

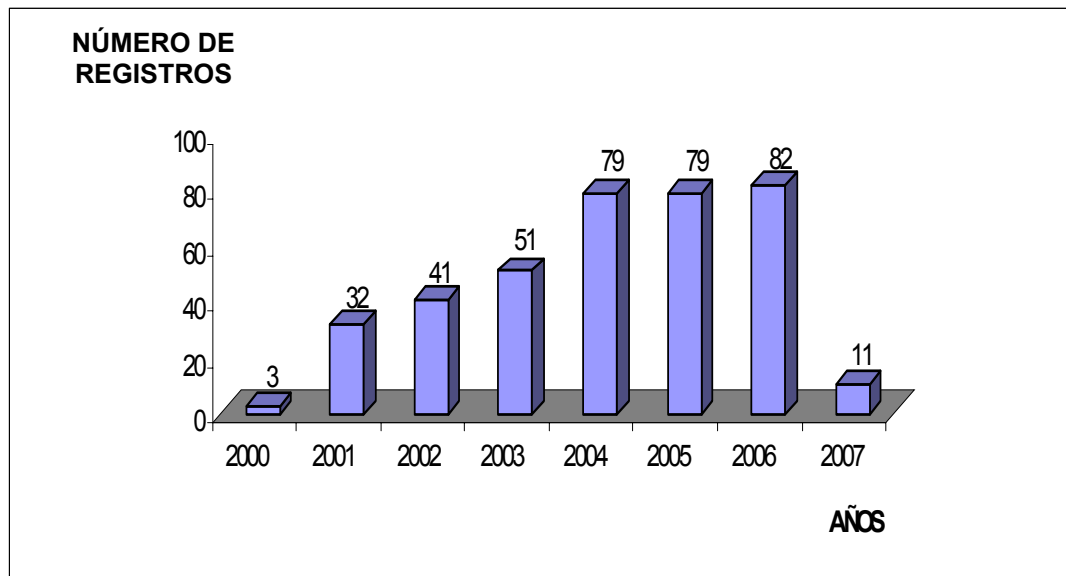


Figura 8. Relación de los años y el número de registros sobre el género *Ocimum*. Base de datos: *ISI Web of Science*. Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH "*Ocimum*". Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

Las siguientes son las áreas de conocimiento que tienen más registros sobre el género *Ocimum*: Ciencia de plantas, farmacología y farmacia, ciencia de alimentos y tecnología (**Figura 9**), que están relacionadas con el tipo de revistas de mayor impacto en cuanto a este tema, a saber: *Journal of Ethnopharmacology*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* y *Journal of Essential Oil Research* (**Figura 10**).

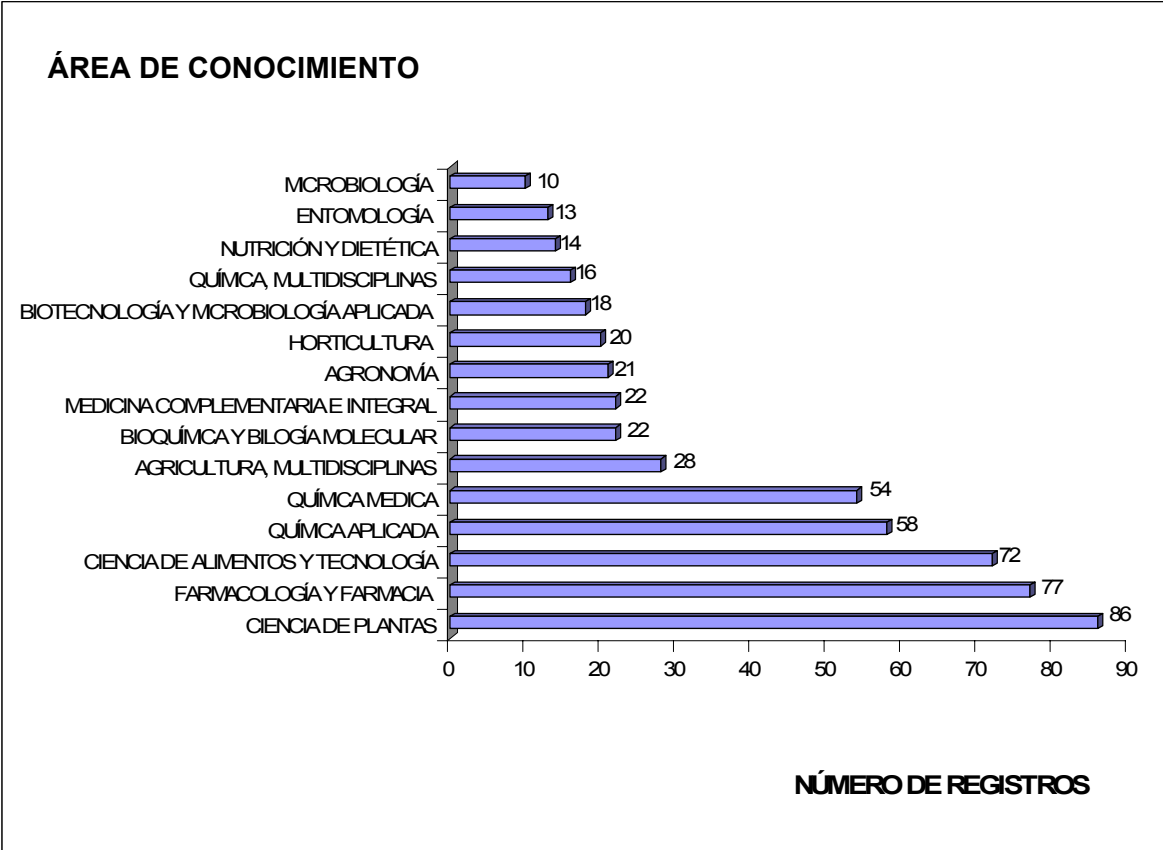


Figura 9. Relación del área de conocimiento y el número de registros sobre el género *Ocimum*. Base de datos: *ISI Web of Science*. Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH "*Ocimum*". Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

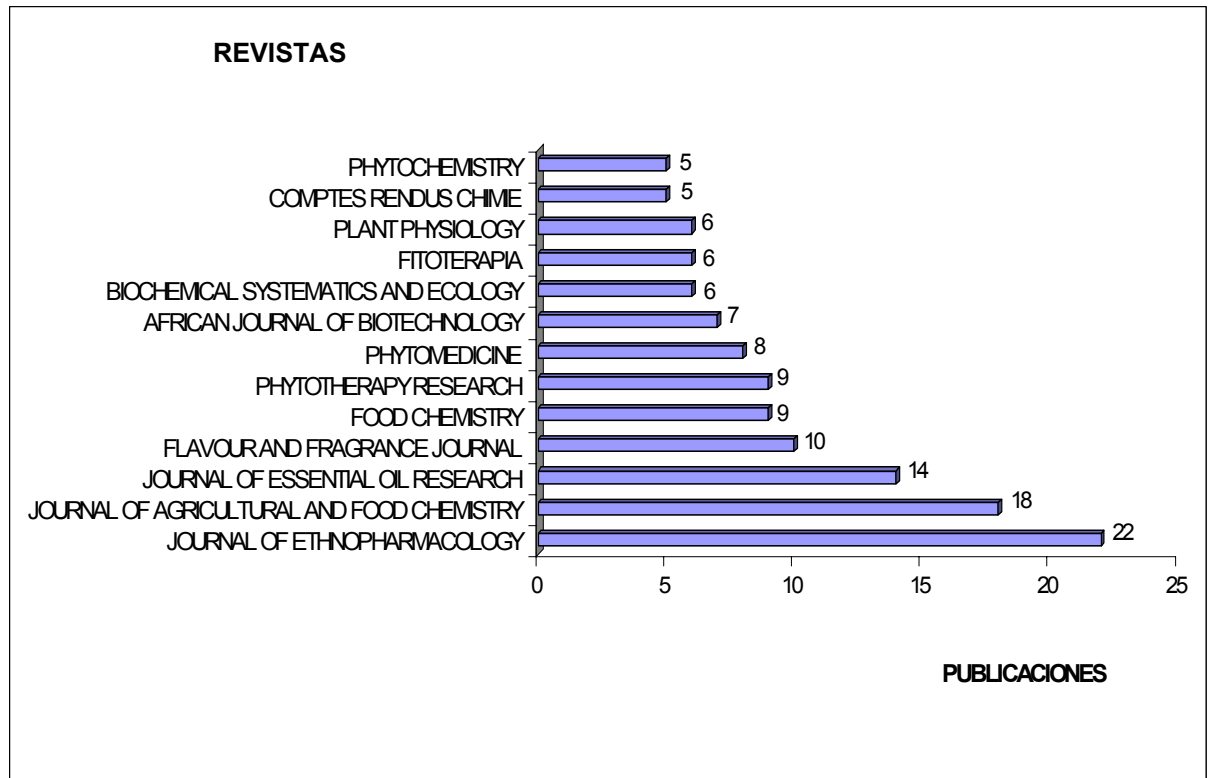


Figura 10. Relación de las revistas y el número de publicaciones sobre el género *Ocimum*. Base de datos: *ISI Web of Science*. Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH "*Ocimum*". Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

En la **Figura 11**, aparecen los autores con el número más alto de publicaciones sobre el género *Ocimum*, destacándose los científicos R. J. Grayer, y J.E Simón, por tener cada uno nueve publicaciones a su nombre.

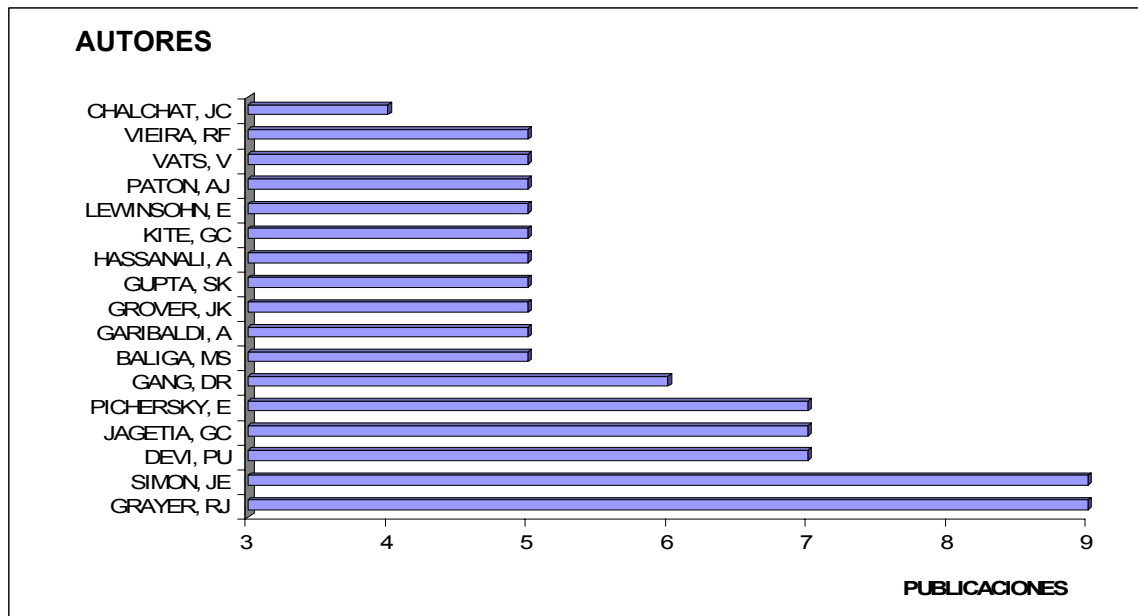


Figura 11. Relación de los autores principales y el número de publicaciones sobre el género *Ocimum*. Base de datos: *ISI Web of Science*. Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “*Ocimum*”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

En cuanto al tipo de documento, el “artículo” sigue siendo la forma predominante de publicación sobre el género *Ocimum* (Véase **Figura 12**), muy por encima de otros tipos de publicaciones tales como resúmenes y reseñas.

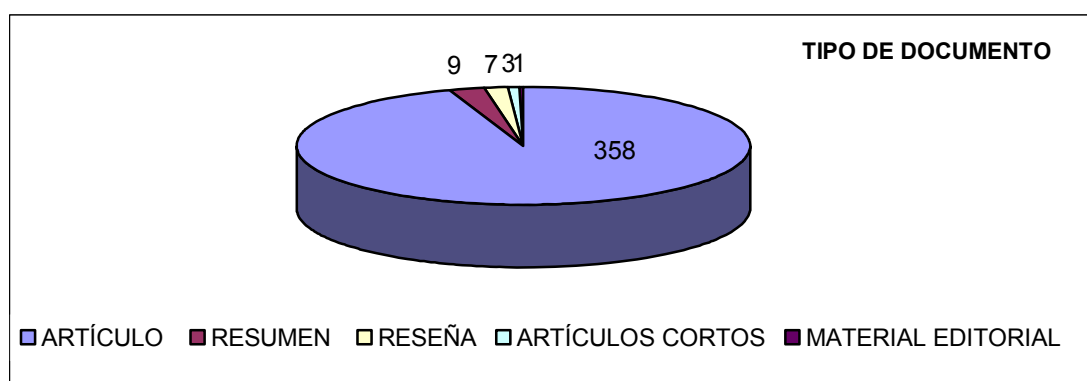


Figura 12. Relación del tipo de documento y el número de registros sobre el género *Ocimum*. Base de datos: *ISI Web of Science*. Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH “*Ocimum*”. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

Los principales países con mayor número de publicaciones son India, Estados Unidos y Brasil (**Figura 13**).

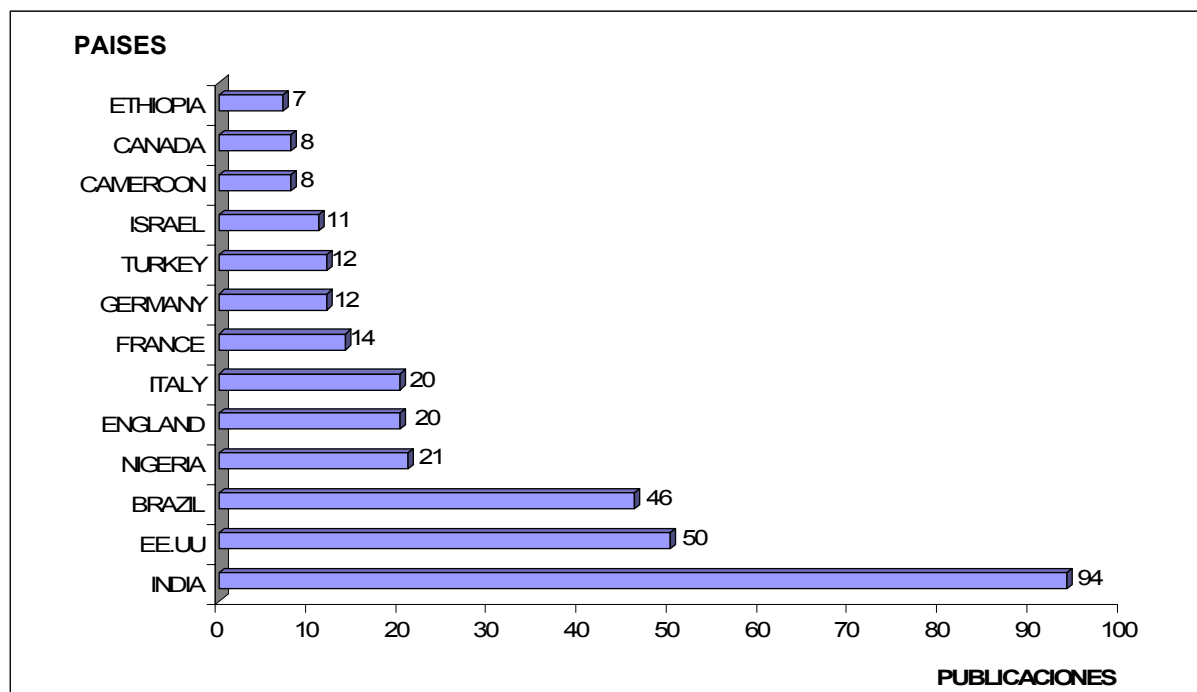


Figura 13. Relación de los principales países y el número de publicaciones sobre el género *Ocimum*. Base de datos: *ISI Web of Science*. Periodo de observación: 2000-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH "*Ocimum*". Fecha de consulta: 10 de abril de 2007.

Con el análisis realizado, usando diferentes bases de datos, *Elsevier (Scopus)*, *ISI Web of Science*, se pudo concluir, que en los últimos años se presentó un notable aumento en las publicaciones sobre el género *Ocimum*, lo cual es un indicativo del interés por el estudio de estas plantas y la búsqueda de aplicaciones en las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. ACEITES ESENCIALES

Los AE son mezclas complejas de sustancias volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas, y que generan en conjunto el olor característico de los vegetales [31-33].

Los AE pueden encontrarse en diferentes partes de la planta, por ejemplo: en tallos y hojas (albahaca, menta, salvia, etc.), en la madera (cedro, sándalo, etc.), en las flores (rosa, jazmín, ylang-ylang, etc.), en las raíces (vetiver, valeriana, cálamo, etc.), en el pericarpio de la fruta (limón, naranja, etc.), en los frutos (anís, cardamomo, etc.) [32-36].

La mayoría de los AE poseen una densidad menor que la del agua, excepto en algunas esencias como la del clavo. Generalmente, son líquidos incoloros o amarillentos; algunos presentan coloraciones azules como el aceite de manzanilla o verdes, en el caso del aceite de bergamota. Los aceites se destacan por su alta volatibilidad, la inestabilidad frente a los factores como la luz, el oxígeno, algunos oxidantes, reductores, pH extremos o la presencia de trazas de metales, que pueden catalizar reacciones de descomposición.

Son solubles en medios no polares y son más liposolubles cuanto mayor sea el contenido de hidrocarburos monoterpénicos. Son altamente solubles en etanol, lo que es aprovechado en la industria de fragancias. Los AE también refractan la luz polarizada y poseen un índice de refracción característico, propiedades que son usadas para el control de su calidad y grado de pureza [31].

Los principales componentes volátiles de un AE pertenecen a una clase de sustancias químicas llamadas "terpenos". La característica estructural que distingue a los terpenos de otros productos naturales es la unidad de isopreno, C_5H_8 . Los terpenos se denominan a menudo compuestos isoprenoides. Se

clasifican según el número de átomos de carbono que contienen, como: monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) y tetraterpenos (C₄₀) [32,33,37].

Los AE extraídos de las plantas aromáticas tienen una gran y variada aplicación en diferentes ramas de la industria (fármacos, alimentos, aromas, cosméticos, etc.) [31-33].

Los AE son utilizados en la industria cosmética y perfumería, en productos de uso externo, lociones, cremas (jazmín, geranio, rosa, etc.), en productos de higiene personal y uso doméstico, como base de jabones y pastas dentífricas (hierbabuena, menta, eucalipto, albahaca, etc.), en la industria de alimentos y licores se usan como aromatizantes y saborizantes (anís, clavo, naranja, limón, cardamomo, etc.), en preparaciones farmacéuticas para medicina humana y veterinaria (caléndula, manzanilla, menta, eucalipto, etc.), para la protección de diversos cultivos como pesticidas y repelentes de insectos (albahaca, ajeno, citronella, enebro, pino, etc.), como agentes antimicrobianos para el control de bacterias y hongos (*crisantemo, lemongrass*) [31-33].

Los AE debido a su heterogeneidad química, presentan una amplia gama de propiedades biológicas, *i.e.* antisépticos, sedantes, antiespasmódicos, diuréticos y digestivos, y como estimulantes de la respiración y la circulación [32].

En cuanto al valor comercial y el uso de los AE, éstos dependen de su composición química, la cual está condicionada por factores de tipo botánico, agrícola y extractivo [33].

3.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LOS ACETES ESENCIALES Y EXTRACTOS

Los AE se extraen de los tejidos vegetales que los contienen por diversos métodos de acuerdo con la estabilidad térmica de sus componentes, su localización en la planta y acorde con las necesidades particulares de cada industria. Los principales métodos de extracción se dividen en técnicas destilativas y métodos por expresión [31-35].

3.2.1. HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR RADIACIÓN DE MICROONDAS (MWHD)

Esta técnica se lleva a cabo usando un equipo de destilación tipo Clevenger [38], y el uso de las microondas como fuente de energía [39], el material vegetal se introduce en un balón de fondo redondo con agua (aproximadamente la tercera parte del material), el agua se calienta hasta ebullición en un horno microondas y, el vapor generado hace que el material vegetal se distienda y se produzca la ruptura de las glándulas y receptáculos oleíferos liberando así los AE que son arrastrados por el vapor de agua y, posteriormente, condensados y recolectados. Dentro de las ventajas de este procedimiento están la rapidez, la economía y el hecho que durante la extracción no se afecta la naturaleza química del aceite [31,40].

En la **Figura 14**, se observa el montaje utilizado para la obtención del AE mediante la técnica MWHD.

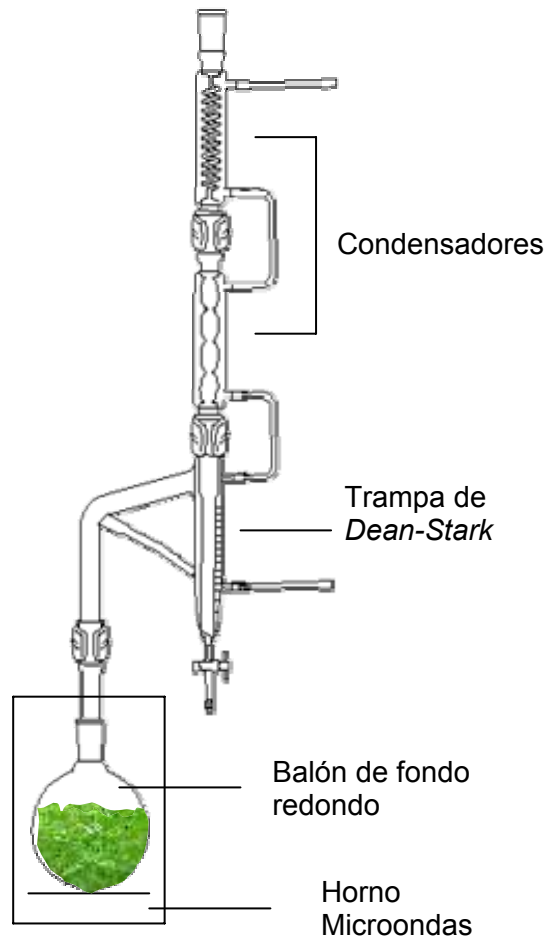


Figura 14. Montaje utilizado para la técnica MWHD.

3.2.2. DESTILACIÓN-EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA CON SOLVENTES (SDE)

Este proceso se realiza en un aparato desarrollado por Likens y Nickerson [41], que posteriormente ha sido modificado por Godefroot *et al.* [42], el cual permite operar con solventes tanto de mayor, como de menor densidad que el agua; siendo entre los de mayor densidad, el diclorometano el más aplicado en la obtención de AE. La mayor ventaja de este método consiste en que el extracto no requiere una concentración posterior, simplemente, se recoge una pequeña fracción y se inyecta directamente al cromatógrafo. Otra ventaja es que este método extrae un gran número de componentes utilizando pequeñas

cantidades de solvente lo cual minimiza la contaminación y reduce costos [32,33,41-45].

En la **Figura 15**, se observa el aparato diseñado para destilación-extracción simultánea con solvente, SDE [42].

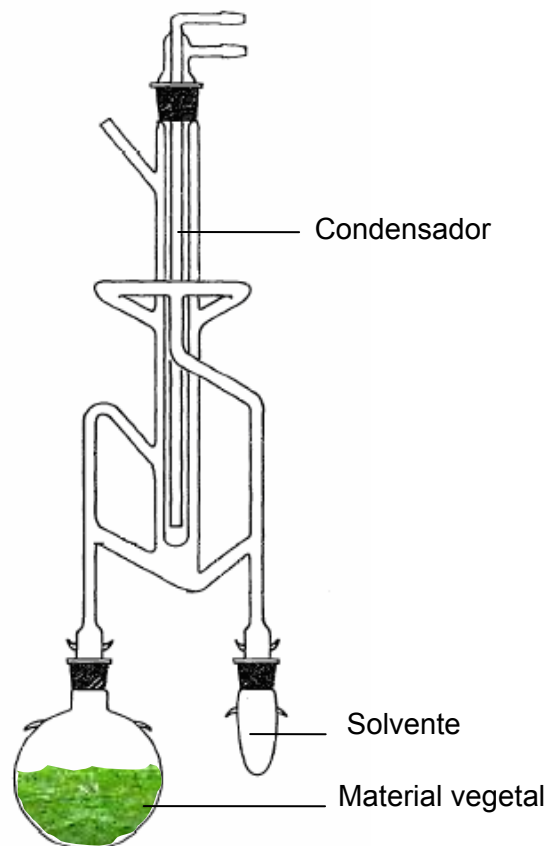


Figura 15. Aparato utilizado para la técnica SDE [42].

3.2.3. EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE)

Es una técnica sencilla, donde el material vegetal se empaca en una cámara de acero inoxidable a través de la cual se hace circular un fluido en estado supercrítico (CO_2), que actúa como solvente y permite separar los componentes volátiles del material vegetal. El fluido, luego, se elimina por descompresión hasta alcanzar la presión y la temperatura ambiente.

Finalmente, se obtiene un extracto cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Las ventajas de esta técnica son que los extractos tienen fragancia más intensa, se evita la degradación térmica de los componentes, hay mayor rendimiento en la extracción, los extractos quedan libres de solvente y, presumiblemente, no hay cambios químicos de los componentes [31,32,44,46-48].

En la **Figura 16**, se observa el equipo utilizado para la obtención de extractos mediante la técnica SFE.

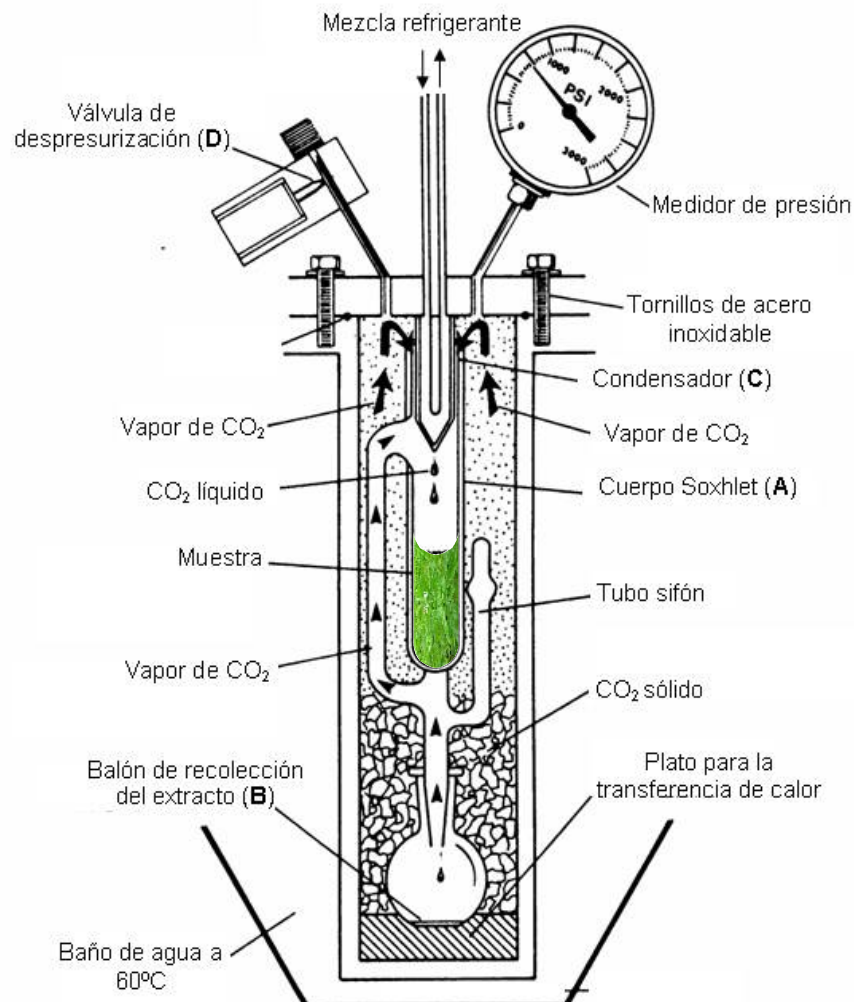


Figura 16. Equipo utilizado para la técnica SFE.

3.2.4. HEADSPACE ESTÁTICO (S-HS)

La técnica S-HS acoplada a la cromatografía de gases, con detección de ionización en llama (FID), es una técnica utilizada para el análisis de compuestos volátiles. Para realizar la extracción, se introduce la muestra en un recipiente con tapa sellable (*vial*). En algunas ocasiones se emplea un solvente de dilución o un modificador de la matriz. Después de introducida la muestra en el *vial*, éste se sella para permitir el paso de los componentes volátiles a la fase gaseosa hasta que se alcanza el equilibrio. Finalmente, una alícuota del vapor del *vial* se introduce al sistema cromatográfico para la separación de los componentes. El análisis S-HS es una técnica que reduce el tiempo y costos, debido a que el muestreo se realiza directamente en el espacio de cabeza del recipiente donde se coloca la muestra, sin ninguna manipulación previa de ésta [49-53].

En la **Figura 17**, se observa un *vial* utilizado para el análisis *headspace*. Donde “S” representa la fase condensada de la muestra y “G” corresponde al espacio de cabeza (HS).

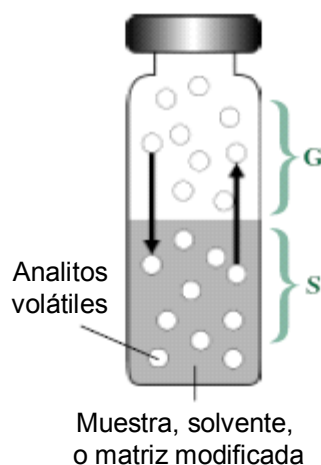


Figura 17. *Vial* utilizado para el análisis *headspace*. “S” representa la fase condensada de la muestra y “G” corresponde al espacio de cabeza [53].

3.2.5. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)

La SPME es una técnica de preparación de muestras que no utiliza solventes, desarrollada hace 15 años por Pawliszyn y colaboradores [54]. El método está basado en la distribución de los analitos entre la matriz y una fibra recubierta por una fase estacionaria polimérica (líquido de alto peso molecular o un absorbente sólido de alta porosidad) [55,56].

Los analitos se ab(d)sorben sobre el recubrimiento de la fibra y son desorbidos, luego, en el inyector de un instrumento analítico (cromatógrafo de gases o cromatógrafo líquido), para su separación o identificación [55,57,58].

En la **Figura 18**, se observa el dispositivo utilizado para la microextracción en fase sólida SPME.

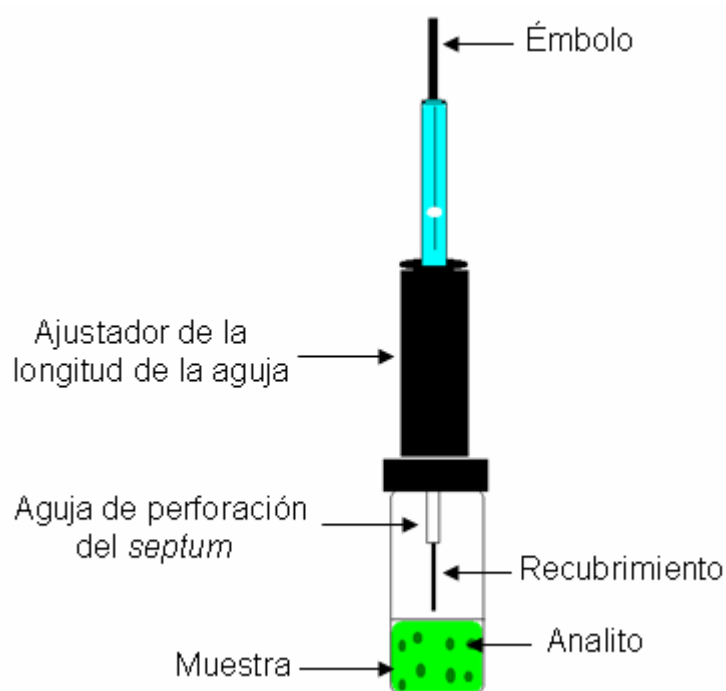


Figura 18. Dispositivo de SPME [59].

El proceso de extracción puede realizarse en tres modos básicos (**Figura 19**), a saber: extracción directa, extracción en el modo *headspace* y extracción con membrana de protección [55,56].

En la extracción directa la fibra está en contacto con la matriz y los analitos son transportados a su superficie directamente [55,56].

En el modo *headspace* no hay contacto entre la fibra y la matriz. Los analitos son extraídos de la fase gaseosa que se encuentra en equilibrio con la fase condensada. Este modo disminuye el efecto de interferencias y protege la fibra [60].

En el modo con membrana protectora, la fibra está en contacto con la matriz, pero protegida por una membrana selectiva que impide el paso de compuestos de alto peso molecular, como proteínas u otras sustancias pesadas, que pueden deteriorar la fibra [55,56].

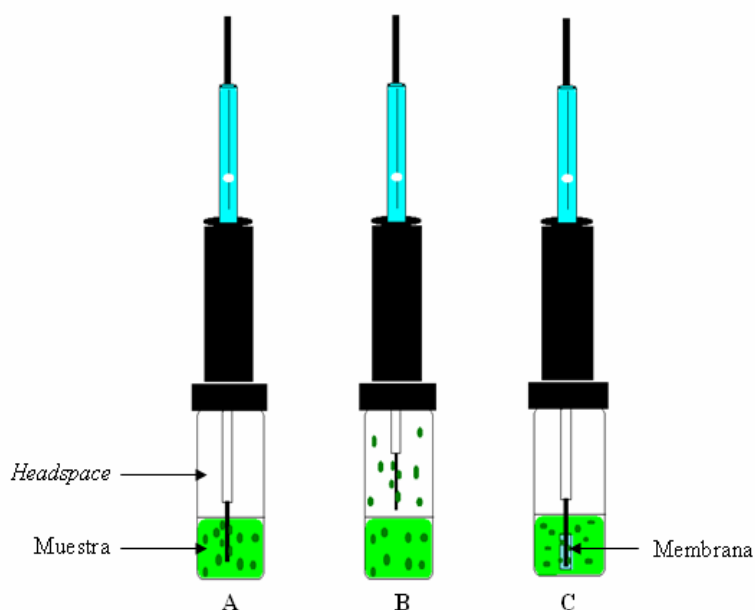


Figura 19. Modos de extracción por SPME: **A.** Directo; **B.** *Headspace*; **C.** Con membrana [55,56].

Para la SPME, existen varios tipos de fibras diferentes en la polaridad y el espesor de sus fases estacionarias. La selección de la fase estacionaria o recubrimiento depende principalmente de la naturaleza química de los analitos bajo estudio (polaridad y volatilidad), como se observa en la **Tabla 5** [54,56].

Tabla 5. Recubrimientos de las fibras que se emplean en la SPME [54,56].

Tipo de recubrimiento	Espesor, μm	Polaridad	Color de identificación de la fibra	Tipos de aplicaciones (extracción/análisis)
PDMS Poli(dimetilsiloxano)	100	Apolar	Rojo	Volátiles
PDMS	30	Apolar	Amarillo	Semivolátiles apolares
PDMS	7	Apolar	Verde	Volátiles, semivolátiles de alto peso molecular
PA Poli(acrilato)	85	Polar	Blanco	Volátiles, semivolátiles polares
PDMS/DVB Poli(dimetilsiloxano)/ Poli(divinilbenceno)	65	Bipolar	Azul	Volátiles, aminas y compuestos nitroaromáticos
CW/ PDMS Carbowax/ Poli(dimetilsiloxano)	75	Bipolar	Negro	Gases y compuestos de bajo peso molecular
CW/DVB Carbowax/ Poli(dimetilsiloxano)	65	Polar	Naranja	Alcoholes y compuestos polares

3.3. ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES

La utilización de un AE, el estudio de factibilidad de su producción, su aplicación específica, características fisicoquímicas y organolépticas son necesarios para establecer normas de calidad que debe cumplir un AE en el mercado mundial. Para satisfacer estas normas es necesario estudiar las variables que afectan la composición del AE tales como modo de cultivo, condiciones geobotánicas, métodos de extracción, época de recolección, partes de la planta, métodos de almacenamiento, manejo de material vegetal, edad y actividad biológica. Estos aspectos de composición y parámetros de calidad se obtienen a través de diferentes métodos de separación, identificación y cuantificación [31,32,35,43].

El método de análisis del AE está fundamentado básicamente en la cromatografía de gases capilar usando detectores convencionales, principalmente, de ionización en llama (FID) y selectivo de masas (MSD) [31,33].

3.3.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases es una técnica de separación, basada principalmente en fenómenos de repartición entre fases móvil gaseosa (helio, argón, hidrógeno, nitrógeno) y estacionaria constituida por un sólido o líquido soportado sobre las paredes de la columna. El cromatógrafo consta de un sistema de inyección, que permite introducir la muestra en la columna y un detector, que detecta las diferentes sustancias a medida que éstas van saliendo de la columna, una vez separadas. La columna se coloca en un horno con temperatura regulable y programable, lo que permite influir de forma decisiva sobre la separación de los componentes de la mezcla [31-33,40,61-63].

Las columnas utilizadas actualmente son de tipo capilar y están constituidas por un tubo de sílice fundido de diámetro de 0,25 mm y largo de 25 a 60 m, proporcionando alta resolución y permitiendo separar las mezclas por su polaridad y peso molecular. Las columnas más utilizadas en aceites esenciales son las de poli(etilenglicol) (CARBOWAX 20m), que es una fase polar y poli(dimetilsiloxano) (DB-1, HP-1, DB-5) que es una fase apolar [33,40,45].

La parte más importante del sistema cromatográfico es la columna, cuya elección está regida por la naturaleza de las muestras a analizar. La polaridad de la fase estacionaria, diámetro y longitud de la columna influyen directamente sobre la eficiencia de la separación y la velocidad de análisis [40,61].

El análisis de los componentes de un aceite esencial mediante cromatografía gaseosa utiliza la comparación de sus tiempos de retención (tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatográfico), con los de los patrones. Los tiempos de retención dependen de la técnica de inyección, las variaciones de temperatura, flujo de gases, tipo de columna y el diseño del equipo. Por este motivo, se introducen parámetros como los tiempos de retención relativos y los índices de retención calculados a partir de los tiempos de retención y por comparación de una serie de sustancias a las cuales se les asignan valores arbitrarios de índices de retención. Los más utilizados son los índices de Kováts definidos respecto a una serie de *n*-alcanos. Estos índices se utilizan para el análisis de aromas de alimentos, extractos de bebidas, muestras biológicas, gasolinas, pesticidas, esencias de frutas y aceites esenciales. La identificación de los componentes de aceites se realiza a través de comparación de los índices de retención de las sustancias patrón en dos fases estacionarias, polar y apolar, con los índices obtenidos para los componentes del aceite esencial [32,40,63].

Los índices de retención proporcionan información respecto a la identidad de los componentes, pero ésta no puede basarse exclusivamente en ellos, ya que muchos componentes poseen índices de retención similares. Por esto es

necesario aplicar otra técnica como la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) [32,40,63].

3.3.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Es una herramienta analítica más eficiente para el estudio de la composición de los aceites esenciales, adecuada para su identificación, debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular. La inyección de la muestra se hace directamente al cromatógrafo, sin ningún tratamiento previo, eliminando las posibles modificaciones en la composición o la estructura de los constituyentes de aceites. En el cromatógrafo, los componentes de la muestra se separan, pasan al espectrómetro de masas, permitiendo registrar el espectro de cada una de las sustancias separadas. Los constituyentes de la muestra (aceite esencial) se identifican mediante los diferentes patrones de su fragmentación que se observan en sus espectros de masas [62,64-66].

3.3.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas comprende el estudio de los iones fragmento provenientes de la ionización de compuestos puros, generados en una cámara de ionización. Los iones se aceleran hacia el analizador de masas del instrumento, donde ocurre su separación según la relación masa/carga (m/z) y se registran de acuerdo con su abundancia o corriente iónica parcial. Este registro se conoce como espectro de masas y es característico para cada compuesto [61,62,66].

El equipo de masas está conformado por un sistema de vacío, cámara de ionización, analizador de masas o separador de iones, y un detector acoplado a

un sistema que amplifica y registra, luego, las señales en forma de una gráfica, *i.e.* espectro de masas [61,62,66].

En la obtención de los iones de las especies bajo estudio, se usa la ionización con impacto de electrones. En esta técnica, se emplean electrones con una energía cercana a 70 eV, producidos por emisión termoiónica de un filamento de tungsteno. El haz de electrones choca con las moléculas neutras que pasan a través de la cámara de ionización y la energía transmitida produce su ionización y subsecuente fragmentación de las moléculas de la muestra [61,66].

La identificación de los componentes del AE se realiza a través de comparación de los índices de retención de las sustancias patrón, obtenidos en dos fases estacionarias, polar y apolar, con los índices de Kováts experimentales calculados para los componentes del AE [33,45,64], y mediante los diferentes patrones de fragmentación que se observan en sus espectros de masas [62,63,65,66].

3.4. OCIMUM BASILICUM

El genero *Ocimum* pertenece a la familia Lamiaceae o Labiatae, la cual se caracteriza por poseer flores con un número determinado de partes, ovarios súperos, pétalos fusionados y flores irregulares completas. La flor es especialmente característica, su corola tubular tiene dos labios: el labio superior es bilobulado, mientras que el labio inferior posee tres lóbulos. Las plantas de esta familia dan frutos que constan de cuatro lóbulos, poseen tallos cuadrados y hojas opuestas [67].

De la familia Labiatae, numerosas especies se cultivan con fines comerciales (salvia, lavanda, menta, tomillo, orégano, albahaca, etc.), así como otras que

son fuentes importantes de aceites esenciales que se utilizan en perfumería y farmacia [67].

El AE de *Ocimum* se obtiene de las plantas durante la floración del *Ocimum basilicum*. La albahaca ha sido cultivada y usada durante miles de años en culinaria y medicina. Se han encontrado reportes sobre su uso en el antiguo Egipto, Roma y Grecia. En cuanto a la aplicación del AE en perfumería y sabores, es de práctica más reciente y originado en Europa [35].

Existen aproximadamente 150 especies de *Ocimum*, de las cuales la mayor parte posee AE. Sólo los AE de *O. basilicum* y *O. gratissimum* son producidos comercialmente [35,68].

Se encuentran también cuatro distintos tipos comerciales de variedades químicas, las cuales son cultivadas en diferentes partes del mundo, a saber:

- **Tipo metil chavicol (Tipo Reunión, Tipo “Exótico”):** Es obtenido por destilación con vapor de las hojas y flores de *Ocimum basilicum*. Este aceite es producido principalmente en las islas Reunión, Comoro y Madagascar. Tiene un olor característico a estragol, es empleado primordialmente en la sazón de comidas y los componentes mayoritarios son metil chavicol (75-87%) y linalool (0.5-3%) [64,68].
- **Tipo linalool (Tipo Europeo o Mediterráneo):** Es producido principalmente en el área Mediterránea (Francia, Egipto) y es usado como condimento en comidas y en perfumería, sus compuestos mayoritarios son linalool (45-62%), metil chavicol (30%) y eugenol (2-15%) [64,68].
- **Tipo Hindú:** Se produce exclusivamente en la India. Es utilizado para aislamiento de compuestos puros, donde el metil chavicol es

aprovechado como material de partida para la producción de anetol, contiene metil chavicol (70%) y linalool (25%) [64].

- **Quimiotipo Cinamato de metilo:** Es cultivado en la India, Guatemala, Haití, países africanos, Bulgaria, sureste Asiático y China. El mayor constituyente de este aceite es el cinamato de metilo y, adicionalmente, linalool y metil chavicol [68].

En la **Figura 20**, se muestran las estructuras de los compuestos mayoritarios de los principales quimiotipos de *Ocimum spp.*

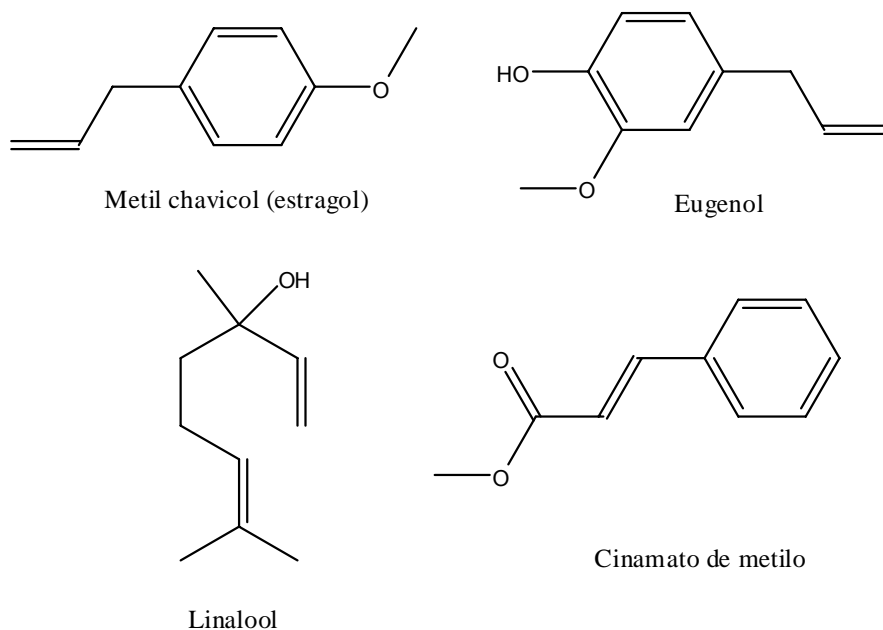


Figura 20. Compuestos mayoritarios presentes en diferentes quimiotipos del aceite esencial de *Ocimum spp.*

La variación de la composición química del AE de albahaca es grande, debido a que esta planta crece en diferentes partes del mundo, lo cual dificulta también la estandarización internacional de su aceite.

Los siguientes son constituyentes principales del aceite de albahaca europea: linalool (39-43%), metil chavicol (23-31%) y alcohol fenchílico (5.2-9.2%). Entre componentes minoritarios figuran α -pineno (0.11-0.17%), mirceno (0.16-0.18%), limoneno (0.12-0.2%), citronelol (0.63-3.8%), cinamato de metilo (0.16-0.5%), metil eugenol (0.49-0.48%) y eugenol (3.4-6.6%), entre otros.

La albahaca "típica" contiene metil chavicol (85.5%), linalool (1.1%), y limoneno (2.6%). Los componentes minoritarios son: α -pineno (0.18%), alcohol fenchílico (1.2%), citronelol (0.65%), geraniol (0.03%), cinamato de metilo (0.5%) y eugenol (0.78%), entre otros [68].

El AE de albahaca es usado en perfumería y productos de aseo (como cremas dentales, lociones, perfumes, etc.) y en la industria de alimentos para la preparación de salsas, condimentos para carnes, pastas, salchichas y pasteles [68].

3.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Durante los últimos años, se ha estudiado el papel de los radicales libres (RL) en un gran número de enfermedades [69-76]. La oxidación de los componentes lipídicos de un alimento, conocida como rancidez oxidativa, es una de las reacciones que deteriora y afecta de forma importante la calidad de un producto. La rancidez oxidativa es iniciada por RL del oxígeno o por el ataque del oxígeno molecular a RL preformados en los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de grasas y aceites [72,77-80].

La peroxidación lipídica iniciada por los RL, causa muchos daños a nivel biológico, entre los cuales se destacan, arterioesclerosis [81], enfermedades del hígado [82], diabetes [83] y envejecimiento [84]. Además, la formación de peróxidos lipídicos y sus productos secundarios tales como compuestos carbonílicos reactivos, también causan algunos daños biológicos. En particular,

los aldehídos como el formaldehído, acetaldehído, malonaldehído (MA) y el 4-hidroxinonenal son conocidos como mutagénicos y carcinogénicos [80,85-87].

La oxidación puede ser prevenida o retrasada por los antioxidantes, sustancias orgánicas de origen sintético o natural, que actúan como atraparoras de los RL del oxígeno involucrados en la oxidación de los ácidos grasos [69,75]. Los antioxidantes sintéticos son los más usados; entre ellos, se destacan butilato de hidroanisilo (BHA), butirato de hidrotolueno (BHT), *ter*-butilhidroquinona (TBHQ) [72,88-91], sin embargo, existe preocupación respecto a la seguridad de éstos para la salud tanto humana como animal, debido a su potencial acción carcinogénica y a problemas relacionados con la toxicidad [72,89,90]. Esta situación ha estimulado la investigación sobre sustancias de origen natural con potencial actividad antioxidante [89].

Dentro de los antioxidantes estudiados se encuentran: derivados de ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, tocoferoles, fosfolípidos y ácidos orgánicos polifuncionales [92-94]. De igual forma, se ha estudiado la importancia del consumo de frutas y vegetales, en la disminución de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y del cáncer, debido a varios antioxidantes presentes, especialmente, vitaminas, dentro de las cuales se incluyen el ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E) y el β -caroteno [74,75,89,95-102].

El interés por el desarrollo de antioxidantes naturales también ha llevado a evaluar las propiedades de algunos AE [103-107] y extractos vegetales [108-113], cuyas fracciones con mayor actividad antioxidante son aquellas que presentan tocoferoles [114,115], carotenoides [116] y compuestos fenólicos [117-121].

3.5.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

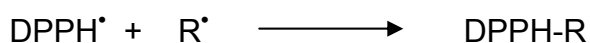
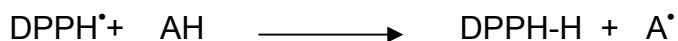
Para el estudio de la actividad antioxidante de diferentes sustancias, ya sea de origen natural o sintético, se han ideado diferentes métodos, entre los cuales se encuentran:

- Métodos que monitorean al producción de compuestos primarios o finales del proceso de peroxidación lipídica, tales como la resonancia electrónica o de spin (**ERS**) [122], la medición de quimioluminiscencia iniciada por hidroperóxidos (ROOH) sobre homogenados lipídicos (hígado de ratas) [123], prueba del ácido tiobarbitúrico, en la cual se monitorea la formación de malondialdehído (**MDA**) libre, el cual reacciona con el ácido tiobarbitúrico (**TBA**), dando origen a un compuesto coloreado que absorbe la radiación a 532 nm [69], y medición de aldehídos y cetonas que son productos finales de la peroxidación lipídica, los cuales se identifican y cuantifican mediante cromatografía gaseosa de alta resolución (HRGC) con previa derivatización utilizando agentes derivatizantes tales como 2,4-dinitrofenilhidracina [123,124] o pentaflúorfenilhidracina (**PFPH**) [125-127].
- Métodos que miden la capacidad para secuestrar radicales formados en los procesos de peroxidación lipídica. El método consiste en medir la concentración de antioxidante requerido para secuestrar el cincuenta por ciento de los radicales por parte del agente antioxidante en un tiempo determinado. Los radicales comúnmente utilizados son el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (**DPPH'**) y ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) (**ABTS⁺**). Ambos radicales presentan excelente estabilidad bajo ciertas condiciones de ensayo y exhiben importantes diferencias en sus respuestas a diferentes concentraciones de varios antioxidantes [128-133].

Para determinar la actividad antioxidante, muchos experimentos han utilizado condiciones para acelerar oxidación, provocando la peroxidación lipídica por medio de aumento de temperatura, presencia de iones metálicos e incremento de la disponibilidad de oxígeno [134].

En el método de decoloración del radical DPPH[•], la eficiencia antioxidante se mide a temperatura ambiente, de este modo, se eliminan los riesgos de la degradación térmica de las moléculas evaluadas [129,135]. La actividad de diferentes compuestos con DPPH[•] en solución (metanol), puede monitorearse mediante la disminución en la absorbancia a una determinada longitud de onda durante la reacción como consecuencia de la reducción del radical (Véase, **Esquema 1**).

En su forma radical, el DPPH[•], absorbe a 515 nm, pero bajo las condiciones de reducción, su absorción disminuye, por la acción de un antioxidante (AH) o por una especie radicalaria (R[•]) [129,135].

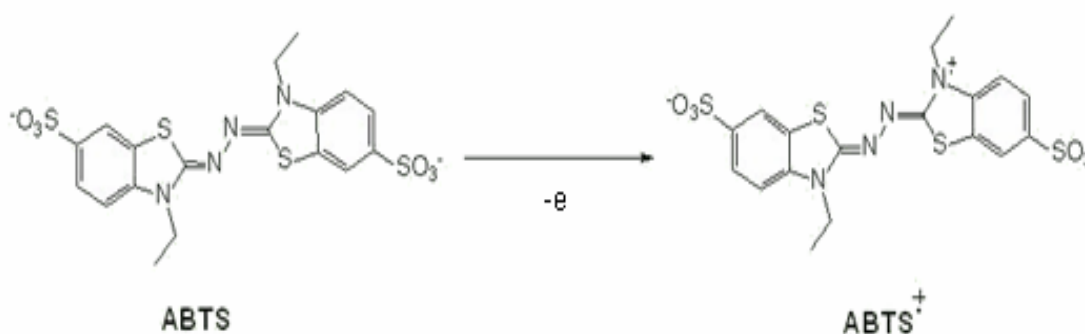


Esquema 1. Reducción del radical DPPH[•], por la acción de un radical (R[•]) o un antioxidante (AH).

El ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} es aplicable a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos y puede ser implementado en sistemas tanto acuosos, como lipofílicos [132,133].

La forma más apropiada es la de generar el catión-radical directamente antes de que reaccione con los antioxidantes a evaluar [133,136]. El monocatión-radical, ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) (ABTS^{•+}), es

generado por la oxidación de ABTS con el persulfato de potasio [133,136], según se aprecia en el **Esquema 2**.



Esquema 2. Generación del catión-radical ABTS^{•+}

El ABTS^{•+} es un cromógeno artificial que presenta un espectro con tres máximos de absorbancia a 414, 752 y 842 nm, en medio acuoso, y a 414, 713, 873 nm, en medio etanólico [133,136,137]. La reducción del catión-radical depende de la concentración del antioxidante y del tiempo de la reacción. El grado de decoloración permite conocer el porcentaje de inhibición del catión-radical ABTS^{•+} en función de la concentración y el tiempo, y es calculado respecto a la concentración del Trolox[®], utilizado como estándar, bajo las mismas condiciones [133,136].

3.6. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Uno de los métodos usados comúnmente en la determinación del efecto antifúngico es la prueba con discos de difusión en agar, en la cual se utilizan discos de nitrocelulosa impregnados con el compuesto que se debe ensayar [138-142].

El método de difusión en agar mediante discos de nitrocelulosa es uno de los más usados en el mundo [140,143,144], por la gran ventaja que posee sobre

los demás, y sus parámetros han sido bien regulados por el Comité Nacional de Estandarización del Laboratorio Clínico de los Estados Unidos (*Nacional Committee for Clinical Laboratory Standard, NCCLS*).

En 1982 se estableció un Subcomité Coordinador del trabajo de pruebas de susceptibilidad a antifúngicos. La meta del Subcomité fue desarrollar un método eficaz de referencia para pruebas de susceptibilidad de levaduras *in vitro* y buscar que se correlacionara con la respuesta clínica. Como resultado, el Comité Nacional de Estandarización del Laboratorio Clínico (NCCLS), propuso el método de referencia M27-A para levaduras como *Candida spp.*, *Torulopsis glabrata* y *Criptococcus neoformans* [145], y, a la vez, ha comenzado la tarea de estandarización plasmada en el documento M38-P para los hongos filamentosos más comunes, que causan infección invasiva [146].

El documento M27-A es un “*Estándar de referencia*”, que se ha desarrollado a través de un proceso de aceptación para facilitar un acuerdo sobre la forma de evaluar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos [145]. Estos métodos siguen los mismos principios que las pruebas para agentes antibacterianos y proveen resultados cuantitativos, representados por la Concentración Mínima Inhibitoria (**CMI**), que es una medida de la actividad antimicrobiana *in vitro* del agente bajo estudio [147-149].

El estudio de la sensibilidad *in vitro* de los microorganismos a los antibióticos se basa generalmente en la determinación de la concentración mínima de fármaco capaz de inhibir completamente los mismos (CMI). La metodología para la determinación de las CMI ha sido bien establecida para bacterias de crecimiento rápido [150-152], para algunas levaduras y hongos filamentosos [145,153], y empleando el método de las diluciones seriadas dobles en medio líquido, con caldo de Triptona soya como medio de cultivo para las bacterias y caldo Sabouraud dextrosa para los hongos [154].

Hasta el momento, y para el estudio de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, solamente se han propuesto valores de CMI para flucitosina (5FC), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITC), correspondientes a concentraciones críticas de estos antifúngicos para *Candida* y *Aspergillus* [145,153,155].

La actividad antimicrobiana de aceites esenciales en la fase vapor se determina por el método microatmosférico. En este método el agente difunde hacia el agar en un plato de Petri invertido o en un frasco. El crecimiento microbiano se monitorea detectando un crecimiento visible, en el caso de un plato de Petri invertido y en el caso de un frasco, este crecimiento es supervisado por la presencia en el equilibrio en el espacio libre del dióxido de carbono metabólico, producido por el microorganismo [149,156].

3.7. ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Desde hace mucho tiempo las personas han utilizado plantas como remedios caseros. Este uso tiene gran importancia, porque las plantas proporcionan información química en el desarrollo de drogas a nivel terapéutico [157]; sin embargo, algunas se conocen como tóxicas. Por esta razón, se realizan investigaciones para determinar la acción y la toxicidad farmacológica de plantas medicinales. Entre las plantas medicinales que se han estudiado se encuentran: *Aloe vera* (L.) Burm. F. (Aloeaceae); *Cymbopogon citratus* (DC. Exnees) Stapf (Poaceae); *Ocimum basilicum* L.; *Ocimum gratissimum* L.; *Ocimum tenuiflorum* L. (Lamiaceae); *Ruta graveolens* L. (Rutaceae); entre otras, las cuales tienen gran importancia farmacológica y son usadas popularmente [158].

La evaluación toxicológica preliminar realizada rutinariamente en ratones, es de gran importancia para la validación del uso tradicional de plantas medicinales. Actualmente existe una tendencia de sustituir el uso de animales de laboratorio

en pruebas toxicológicas, debido a su alto costo y sufrimiento causado a los animales durante estas pruebas. Los métodos alternativos incluyen procedimientos que reemplazan los experimentos con animales, reduciendo el número de individuos utilizados en cada prueba o refinando el procedimiento para reducir el dolor y la tensión [159,160].

La *Artemia salina* L. (Artemiidae), es un invertebrado de la fauna acuático salina y de los ecosistemas marinos, juega un papel importante en el flujo de la energía de la cadena alimenticia [161] y puede ser utilizada en pruebas biológicas de laboratorio para determinar la actividad citotóxica con la valoración de la Concentración Letal Media (LC₅₀) [162] de algunas toxinas y extractos de plantas [163,164].

Este método, que determina el valor de la Concentración Letal Media (LC₅₀) de compuestos y extractos activos en µg/mL [165], se ha utilizado en la investigación de plantas medicinales de diversos países para evaluar la toxicidad, la acción gastro-protectora y otras actividades biológicas, las cuales en algunos casos tienen relación con los estudios farmacológicos realizados para diversos compuestos químicos [166,167] como método principal de investigación para los productos de origen natural.

4. METODOLOGÍA

El trabajo se realizó por etapas; el esquema aparece en la **Figura 21**, donde se vislumbran 7 pasos principales.

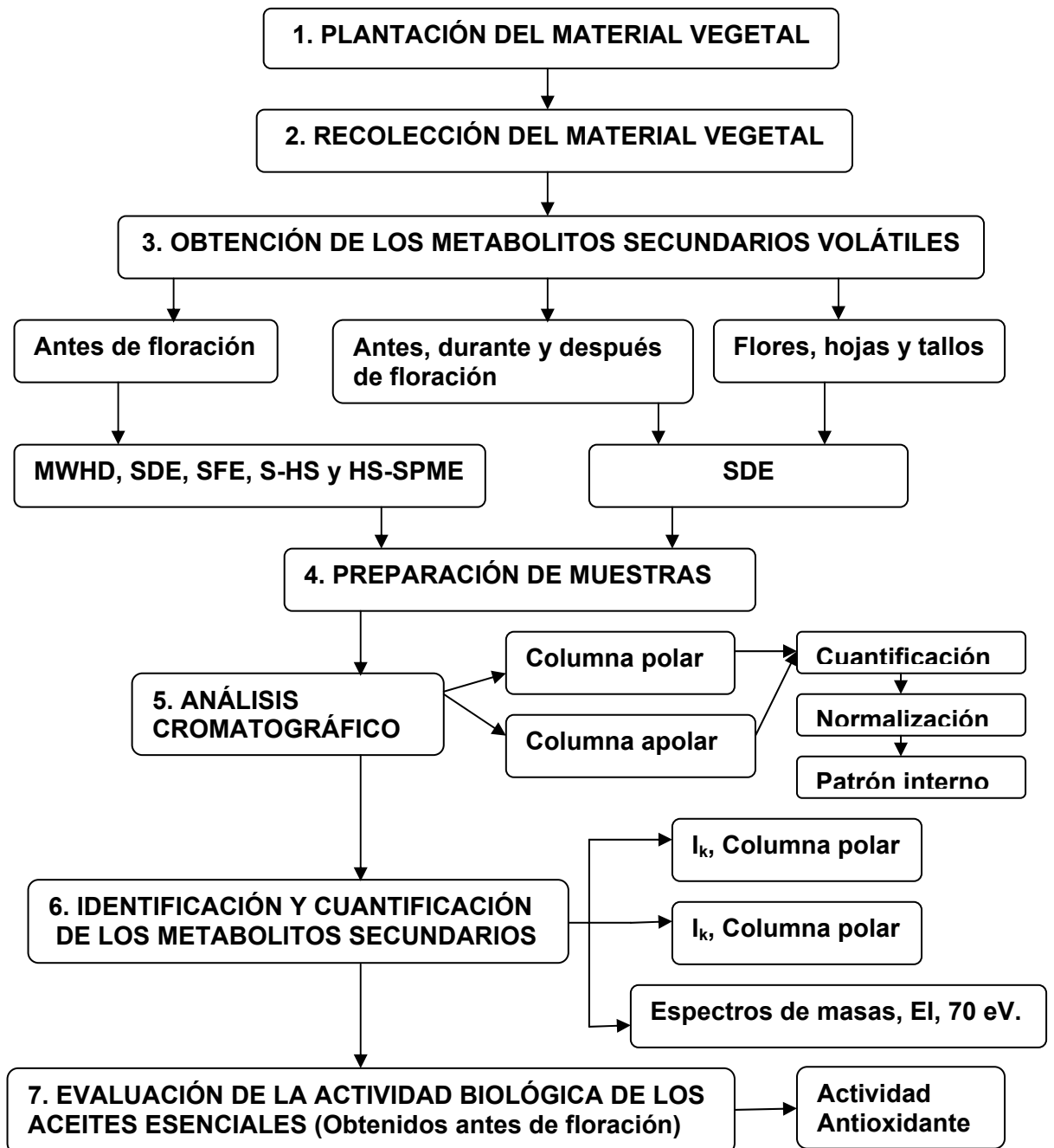


Figura 21. Diagrama de flujo de la metodología desarrollada durante el Proyecto.

4.1. MATERIAL VEGETAL

Las plantas fueron adquiridas en el mercado local de Bucaramanga en diciembre de 2005, traídas de la parte alta de Piedecuesta (1200 m de altura), para su posterior reproducción y siembra en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, y la posterior extracción por diferentes métodos.

4.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La identificación taxonómica se realizó en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) por el Dr. José Luis Fernández. Se caracterizaron dos plantas, a saber: “Sígueme blanco”, *Ocimum sp1.*, Familia Labiatae, N° registro COL 512283, y “Sígueme morado”, *Ocimum sp2.*, Familia Labiatae, N° registro COL 512280.

4.3. PLANTACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La propagación de las dos especies de *Ocimum spp.* se realizó por medio de esquejes (10-15 cm de longitud), los cuales presentaban por lo menos tres yemas, que fueron sembradas de manera tal que una o dos de las yemas presentadas quedaban bajo la superficie, por donde salían las raíces, y las restantes sobre el terreno, por donde emergían los brotes aéreos.

Los esquejes se plantaron en semilleros que contenían una mezcla adecuada de materia orgánica y arena, fueron colocados a la sombra y regadas regularmente. Los esquejes enraizados se plantaron a campo abierto en las parcelas del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, ubicados en la Universidad Industrial de Santander; 30 días después de sembrados, a una distancia de 40 cm entre filas y a una separación de 60 cm entre cada planta, como se observan en las **Figuras 22 y 23**.



Figura 22. Parcela de cultivo de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM. Campus principal, UIS.



Figura 23. Parcela de cultivo de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM. Campus principal, UIS.

4.4. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal fue recolectado a 90, 150, 180 días de sembrado, tiempo correspondiente a las etapas antes, durante y después de floración, respectivamente. El material empleado fue seleccionado al azar de las plantas de cada parcela, para obtener una muestra representativa del material vegetal. Todas las recolecciones se realizaron por triplicado en días diferentes, manteniendo constante la hora de colecta (2 p.m.) durante días soleados, conservando así las mismas condiciones de recolección, con el fin de observar

la posible variación en la composición de los metabolitos secundarios, obtenidos mediante diferentes técnicas extractivas. Una vez recolectado el material vegetal, se realizó su secado a campo (oreado), durante 24 horas, para reducir el contenido de agua en los tejidos vegetales. Finalmente fue picado y homogenizado para su posterior extracción.

4.5. OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES

Los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de dos especies de *Ocimum spp.* de la familia Labiatae fueron aislados por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), destilación-extracción simultánea con solvente (SDE), extracción con fluido supercrítico (SFE), *headspace* estático (S-HS) y microextracción en fase sólida en el modo *headspace* (HS-SPME); cada extracción se realizó por triplicado.

4.5.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

El aceite de *Ocimum spp.* se obtuvo a partir de las hojas cosechadas durante la época antes de floración, mediante la técnica MWHD, así como se describe a continuación:

- La hidrodestilación asistida por radiación de microondas, se llevó a cabo utilizando un equipo de destilación tipo Clevenger, empleando un horno microondas (LG, modelo MS-1242ZK, 1200 W de potencia), siguiendo la metodología descrita por Stashenko *et al.* [38]. Se utilizaron 250 g de material vegetal y 300 mL de agua. El tiempo total de extracción fue de 30 min (3x10min), a potencia aproximada de 720 W (70% del total). El AE obtenido se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se tomó una alícuota de 50 µL del AE, se adicionó 1 µL de hexadecano (estándar interno) y se aforó a 1 mL con diclorometano, para su posterior análisis cromatográfico. En la **Figura 24** se muestra el montaje empleado para la extracción.

4.5.1.1. RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL

El rendimiento de los AE obtenidos por MWHD, se calculó mediante la fórmula (1):

$$\% \text{ Rendimiento} = \left[\frac{W_{AE}}{W_{MV}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Donde:

W_{AE} : Peso del aceite esencial (g);

W_{MV} : Peso del material vegetal (g).

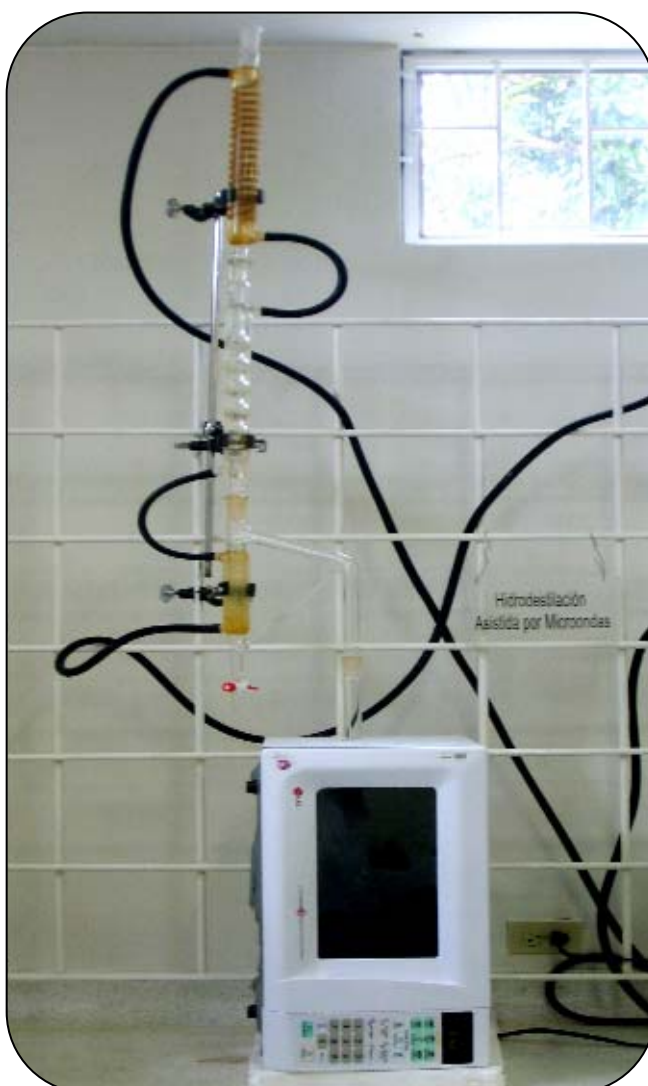


Figura 24. Montaje empleado para obtener los AE por medio de la técnica MWHD.

4.5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Se obtuvieron los extractos SDE de *Ocimum spp.* de las hojas recolectadas durante cada una de las tres épocas de crecimiento de las plantas (antes, durante y después de floración), y de flores y tallos recolectados durante la floración. Los extractos SFE fueron obtenidos únicamente de las hojas recolectadas en la época antes de floración.

- La destilación-extracción con solvente simultánea (SDE) se llevó a cabo en un equipo a micro-escala para solventes de alta densidad, diseñado por Godefroot *et al.* [42], que se observa en la **Figura 25**. Se usó material vegetal (aproximadamente 10 g) finamente picado y como solvente se utilizó diclorometano (grado analítico). El tiempo de extracción fue de 2 horas. El extracto obtenido se concentró hasta 0.5 mL, se adicionó 1 μ L de hexadecano y se aforó a 1 mL con diclorometano, para su análisis cromatográfico.

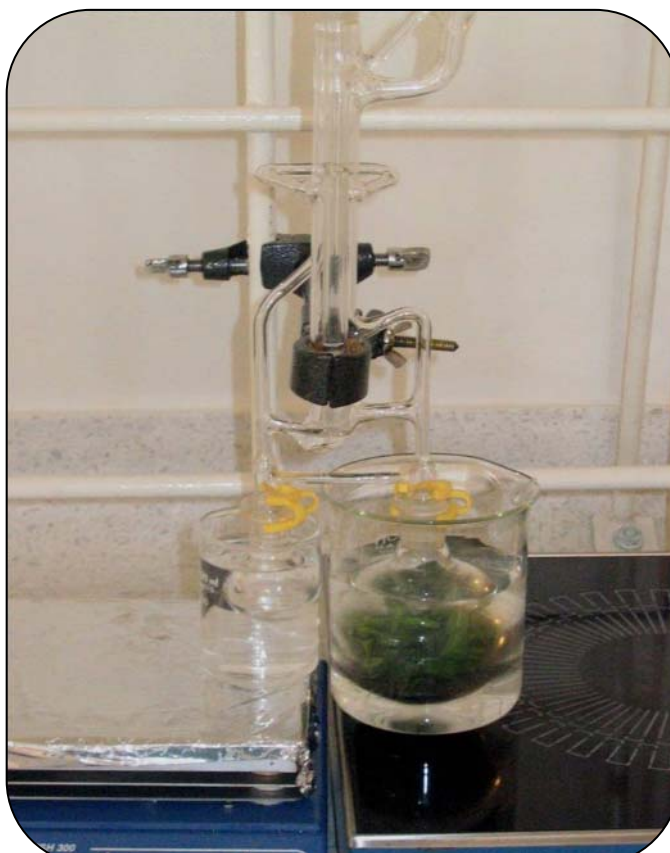


Figura 25. Equipo a microescala de destilación-extracción con solvente simultánea [42], SDE, empleado en el presente Proyecto.

- La extracción con fluido supercrítico (SFE), se llevó a cabo en un extractor Soxhlet de alta presión (*J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) que se aprecia en la **Figura 26**. Se empleó CO₂ sólido comercial (hielo seco) para obtención del fluido de extracción, siguiendo la metodología descrita de Stashenko *et al.* [168]. Se usaron 10 g de material vegetal y 300 g de CO₂; la extracción duró 2 horas a una temperatura de 50-55 °C y la presión de 1000-1100 psi. El extracto obtenido se disolvió en diclorometano (2 mL), se adicionó 1 µL de hexadecano, se aforó a 1 mL con diclorometano y se concentró, para ser inyectado al cromatógrafo.



Figura 26. Extractor Soxhlet de alta presión, para la obtención de extractos vegetales con fluido supercrítico SFE (CO₂).

4.5.3. OBTENCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES

La obtención de la fracción volátil se realizó por dos técnicas *headspace*, *i.e.* *headspace* estático (S-HS) y microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME), de hojas obtenidas de plantas en la etapa antes de su floración.

- La obtención de volátiles por el método *headspace* estático (S-HS), se llevó a cabo en un *Headspace Sampler* HP 7694 (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, EE.UU.), que se observa en la **Figura 27**. Se emplearon los siguientes parámetros operacionales: temperatura del horno: 40 °C, temperatura de *loop*: 100 °C, temperatura del *vial*: 40 °C, temperatura de la línea de transferencia: 180 °C y un tiempo de equilibrio de 30 minutos. Se usaron aproximadamente 4 g de material vegetal fresco en un frasco de 20 mL, y se inyectó 1 mL de la fase vapor a la columna cromatográfica.



Figura 27. Equipo *Headspace Sampler* HP 7694 (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, EE.UU.), empleado para la técnica *headspace* estático.

- La extracción de los metabolitos secundarios por HS-SPME, se llevó a cabo empleando una fibra de poli(dimetilsiloxano) (PDMS, 100 μm de espesor), se utilizaron 4 g de material vegetal fresco, colocados en un frasco de 20 mL, el tiempo de exposición de la fibra fue de 30 min a una temperatura de 40 $^{\circ}\text{C}$ (la selección de estos parámetros se basó en experimentos preliminares, véase **Anexo 1**). Finalmente, las sustancias extraídas fueron térmicamente desorbidas en el puerto de inyección de un GC a 250 $^{\circ}\text{C}$, durante 10 min, para su separación y posterior identificación. El montaje utilizado para HS-SPME, se observa en la **figura 28**.



Figura 28. Montaje utilizado para la extracción por HS-SPME.

4.6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

El aceite esencial se analizó mediante la técnica instrumental de cromatografía de gases de alta resolución con detector selectivo de masas y la identificación de los compuestos se realizó con base en los índices de Kováts medidos en columnas polar y apolar y por espectrometría de masas (EI, 70 eV).

- **Columna apolar**

El análisis GC-MS, se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus (Figura 29)*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (relación *split* 1:30, 250 °C), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos *HP-MS ChemStation* (Versión 1.05) y acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*. Las temperaturas del inyector, la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 250, 230 y 285 °C, respectivamente.

Para la separación de componentes se utilizó una columna apolar DB-5MS (60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f) de 5% fenil-poli (metilsiloxano). La temperatura del horno se programó desde 45°C (5 min) @ 4°C/min, hasta 150°C (2 min) @ 5°C/min, hasta 250°C (5 min) @ 10°C/min, hasta 275°C (5 min).



Figura 29. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus*, con un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos *HP-MS ChemStation* (Versión 1.05), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*.

- **Columna polar**

También se realizó la caracterización química empleando un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network*, equipado con puerto de inyección *split/splitless* (relación *split* 50:1, 250 °C), y un inyector automático *Agilent Technologies 7683B Series Inyector*, acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5975 Inert XL*, con sistema de datos *MS ChemStation* (Versión D.02.00.275).

Para la separación de componentes se empleó una columna capilar polar DB-WAX (*J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*), con fase estacionaria entrecruzada e inmobilizada de poli(etilenglicol), de 60 m (L) x 0.25 mm (D.I.) x 0.25 μm (d_f). La temperatura del horno se programó desde 45°C (5 min) @ 3°C/min, hasta 120°C (3 min) @ 4°C/min, hasta 220°C (5 min).

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI) con energía de 70 eV. Los compuestos volátiles se identificaron con base en sus patrones de fragmentación y por comparación de sus espectros de masas con los espectros de las bases de datos, a saber: NBS 75K, WILEY 138K, ADAMS 2004 y NIST 2002, y por comparación de los índices reportados en la literatura [169], con los índices de Kováts (I_k) obtenidos experimentalmente.

4.7. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

La identificación de los componentes presentes en los AE, extractos y fracciones volátiles, se realizó con base en sus espectros de masas y mediante la determinación de los índices de retención de Kováts (I_k), utilizando una serie de alcanos lineales como estándares de referencia (C_{10} - C_{25}) analizados por GC-MS bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras.

Los índices de Kováts fueron calculados mediante la fórmula (2):

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

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, min.

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

t_{RN} : Tiempos de retención de n -alcano que eluye después del compuesto x , min.

En la cuantificación de los componentes presentes en los AE y extractos se empleó como estándar interno el *n*-hexadecano. La concentración de cada compuesto se calculó mediante la fórmula (3):

$$C_x = C_{istd} \times \left[\frac{A_x}{A_{istd}} \right] \quad (3)$$

Donde:

C_x : Concentración del compuesto de interés (g/L);

C_{istd} : Concentración del estándar interno (*n*-hexadecano) (g/L);

A_x : Área del compuesto de interés, *cuentas*,

A_{istd} : Área del estándar interno (*n*-hexadecano), *cuentas*.

4.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES.

4.8.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

4.8.1.1. Ensayo de decoloración del radical DPPH:

La capacidad antioxidante de los componentes del AE de *Ocimum spp.* fue medida en términos de su capacidad de donar hidrógeno o su habilidad de secuestrar el radical estable DPPH[•], siguiendo la metodología descrita por Brand-Williams *et al.* [129].

Para cada sustancia antioxidante, AE y compuestos de referencia Trolox[®] y la vitamina E, se ensayaron diversas concentraciones. A la solución de antioxidante en etanol (0.5 mL) se adicionaron 2.5 mL de DPPH[•] (0.09 mM). La disminución de la absorbancia fue medida a 514 nm cada minuto hasta transcurrir 15 min, posteriormente, las mediciones se realizaron cada 15 min, hasta que la reacción alcanzó el estado estacionario ($\Delta A = 0.002 \text{ min}^{-1}$), donde ΔA , es la diferencia en la absorbancia en un intervalo de 15 min.

La concentración inicial de DPPH· en el medio de reacción fue calculada con base en una curva de calibración de soluciones de DPPH· medidas a 514 nm, utilizando concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 90 µM, mediante la ecuación: $y = 0,0120x + 0,0017$.

Para cada concentración utilizada de antioxidantes se graficó la cinética de reacción. La capacidad antirradicalaria de las sustancias de referencia y AE se expresó como el número de moles de sustancia antioxidante necesarios para reducir la concentración 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 de DPPH_{t=0} es la concentración inicial medida antes de la adición de la sustancia antioxidante, *i.e.* absorbancia del blanco. 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·).

4.8.1.2. Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺.

La actividad antioxidante de los AE y compuestos de referencia (Trolox[®] y vitamina E) fueron evaluados de acuerdo con el procedimiento descrito por Re R. *et al.* [133]. Este método se basa en la habilidad que poseen ciertos antioxidantes para atrapar al catión-radical ABTS⁺, en comparación con la del Trolox[®], análogo hidrosoluble de la vitamina E.

El catión-radical ABTS⁺ fue preparado tras la reacción de ABTS (19.5 mg) con persulfato de potasio (3.45 mg). Los compuestos se disolvieron en agua, grado HPLC, y la solución se aforó a 5 mL, luego, se dejó reaccionar a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el

cación-radical ABTS⁺, se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 (\pm 0,1) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Los AE se diluyeron en etanol hasta que se produjo una inhibición del 20 al 60%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir AE (30 μ L) a la dilución del ABTS⁺ (300 μ L) generado.

La absorbancia se midió exactamente seis (6) min después de la adición. El antioxidante sintético de referencia, Trolox[®], se ensayó en un rango de concentraciones entre 2,4 y 14,8 μ M en etanol, bajo las mismas condiciones. El efecto protector se determinó como la actividad antioxidante total (*Total Antioxidant Activity*, TAA), expresada como mmol de Trolox[®] por kg de aceite esencial. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, al igual, que los blancos de solvente.

4.8.2 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

INFECCIÓN Y CÁNCER (Universidad de Antioquia)

a) **Aceites:** Las soluciones *stock* se preparan a partir de diluciones seriadas v/v 1:2 de cada aceite puro (100%) en DMSO hasta una concentración final de 0,195%. De cada una de estas soluciones *stock* se realizan diluciones 1:25 en agua destilada con *tween* 80 al 0.001% para obtener las concentraciones finales: 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,062%, 0,031%, 0,0156%, 0,0078% y 0,0039% [170]. Estas diluciones se sirven, en 10 pozos, en orden de concentración en placas de 96 pozos de fondo plano. Los pozos 11 y 12 correspondieron al control de crecimiento y control del medio, respectivamente. Los platos se mantienen a -70°C hasta la realización de los bioensayos.

- b) **Cepas:** Para la evaluación de la bioactividad de los aceites, se utilizan las cepas control de calidad aprobadas por el NCCLS (CLSI) *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.
- c) **Preparación del inóculo:** Cada cepa se cultiva en *Sabouraud* a 35°C durante veinticuatro horas. El inóculo se obtiene tomando del cultivo aproximadamente cinco colonias que son suspendidas en cinco mililitros de solución salina al 0,85% hasta llegar al estándar 0,5 de *McFarland* para un inóculo de 1×10^6 - 5×10^6 blastoconidias/mL. Finalmente se realiza una dilución 1:10 con RPMI-1640 de la cual se obtiene el inóculo deseado, 1×10^5 - 5×10^5 blastoconidias/mL.
- d) **Estandarización protocolo M27-A2:** La técnica se estandariza según el protocolo del NCCLS, para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del itraconazol (Sigma) a concentraciones de 16 µg/mL a 0,03125 µg/mL.
- e) **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los AE:** Posterior a la estandarización se realizan los bioensayos con cada aceite, para lo cual se aplican 100 µL del inóculo sobre cada uno de los 10 pozos que se han llenado previamente con las diez concentraciones decrecientes de los aceites. El pozo No. 11 contiene 100µL del inóculo más 100 µL de agua destilada como control de crecimiento y el pozo 12 contiene 100µL de medio RPMI 1640 más 100 µL del aceite al 2% como control del medio. Las placas se incuban a 35°C por 24 horas y se realiza lectura visual con el espejo de lectura. El valor de la CMI se obtiene comparando el pozo 11 (100% crecimiento) con cada uno de los pozos a las diferentes concentraciones evaluadas.

4.8.3 ACTIVIDAD CITOTÓXICA

QUÍMICA AMBIENTAL Y COMPUTACIONAL (Universidad de Cartagena)

Ensayo de toxicidad de aceites esenciales frente a Artemia salina.

Este ensayo permite la evaluación de actividad citotóxica de extractos de plantas y ha sido ampliamente usado como ensayo exploratorio básico en la búsqueda de metabolitos activos [164].

MÉTODOS Y REQUERIMIENTOS. La metodología incluye la exposición de los nauplios de *Artemia salina* a diversas concentraciones de los aceites en agua (predisueitos en DMSO) y el respectivo conteo de los organismos muertos a 24 y 48 horas, procesos detallados a continuación.

- a) **Colección y tratamiento del agua de mar utilizado como medio de bioensayo:** El agua de mar es colectada aproximadamente a 100-200 m de la playa de Manzanillo del Mar, 5 km al Norte de Cartagena. En el laboratorio el agua de mar es filtrada con un filtro Whatman N° 40, posteriormente se realizan dos filtraciones adicionales, realizadas con filtros de 0.45 micras.
- b) **Siembra de *Artemia salina*:** En cajas de petri, se adicionan aproximadamente 10 mg de quistes del crustáceo *Artemia salina* adquiridos en el CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE LA ACUICULTURA DE COLOMBIA (**CENIACUA**). Luego de 24 horas de la eclosión de los quistes de *Artemia salina* a nauplios, 10 de estos son cuidadosamente colocados en viales de 10 mL con sus respectivas concentraciones de ensayo por aceite esencial.
- c) **Determinación de la CL₅₀:** La determinación de la CL₅₀ es realizada contando el número de nauplios muertos, luego de períodos de incubación de 24 y 48 horas.

- d) **Ensayo preliminar:** Para la evaluación de la CL_{50} de los aceites esenciales sobre *Artemia salina*, se realizan ensayos preliminares con el fin de establecer el rango de concentración para la determinación de la CL_{50} por el método de análisis Probit [171].

Para realizar los bioensayos de letalidad es preparada una solución inicial de cada aceite esencial en agua de mar a una concentración de 1 mg/mL, utilizando DMSO (Dimetilsulfóxido) como disolvente a una concentración de 20% v/v [172]. Las diluciones preparadas son: 1, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$ utilizando agua de mar. A las 24 y 48 horas el porcentaje de mortalidad fue evaluado. Luego la concentración más alta donde no existe mortalidad y la concentración más baja donde la mortalidad es del 100% son seleccionadas para establecer el rango de concentraciones para determinar de manera más exacta la CL_{50} de cada aceite esencial.

- e) **Ensayo definitivo:** Por cada bioensayo son preparadas tres réplicas por concentración y en cada vial son colocadas 10 larvas en 10 mL de las soluciones a evaluar. La cantidad de DMSO utilizado es tenido en cuenta para preparar el control negativo con agua de mar. El conteo de organismos muertos es realizado a las 24 y 48 horas después de colocar las larvas en las diferentes soluciones sobre bioensayos efectuados por cuadruplicado [173].
- f) **Cálculo de la Concentración Letal Media (CL_{50}):** Para la determinación de la Concentración Letal Media (CL_{50}) de los aceites esenciales frente a *Artemia salina*, inicialmente es calculado el porcentaje de mortalidad para cada bioensayo y luego son transformados a la escala Probit. Las concentraciones utilizadas son transformadas al logaritmo en base 10. Posteriormente son graficados los valores de la escala Probit contra los logaritmos de las concentraciones obteniendo la ecuación de la curva mediante regresión lineal, la cual permite calcular la CL_{50} .

Los límites de confianza al 95% son calculados mediante la formula (4) [171]:

$$\log f_{95} = \frac{2.77}{\sqrt{N}} \times \log S \quad (4)$$

Donde f es el factor por el que se debe multiplicar o dividir la CL_{50} para obtener los límites de confianza superior e inferior respectivamente, N es el número de organismos tratados que son encontrados entre la CL_{16} y la CL_{84} y S es la pendiente que es calculada mediante la formula (5):

$$S = \frac{\frac{LC_{84}}{LC_{50}} + \frac{LC_{50}}{LC_{16}}}{2} \quad (5)$$

Límite de confianza al 95%

Los límites de confianza al 95% son calculados de la siguiente manera:

Límite de confianza superior es igual a $LC_{50} \times f$

Límite de confianza inferior es igual a $LC_{50} \div f$

Relación CL_{50} -24 h/ CL_{50} -48 h

La relación CL_{50} -24h/ CL_{50} -48h (r), puede considerarse como un índice de sensibilidad de un organismo a una sustancia cuando es expuesto a un tóxico, de esta forma, la sensibilidad de los nauplios a un aceite esencial es proporcional al valor de r [174].

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE *OCIMUM sp1*. “Sígueme blanco”, OBTENIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

En la **Figura 30**, aparece la planta cultivada de *Ocimum sp1*, utilizada en el presente estudio.



Figura 30. Planta cultivada de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, utilizada en el presente estudio.

En la **Figura 31**, se registran los perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por CG-MS, de los metabolitos secundarios volátiles, aislados por MWHD, SDE y SFE de hojas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, recolectadas antes de floración de la planta. En la **Tabla 6**, se registran la composición química y las cantidades relativas (%) de los compuestos aislados mediante las técnicas MWHD, SDE y SFE.

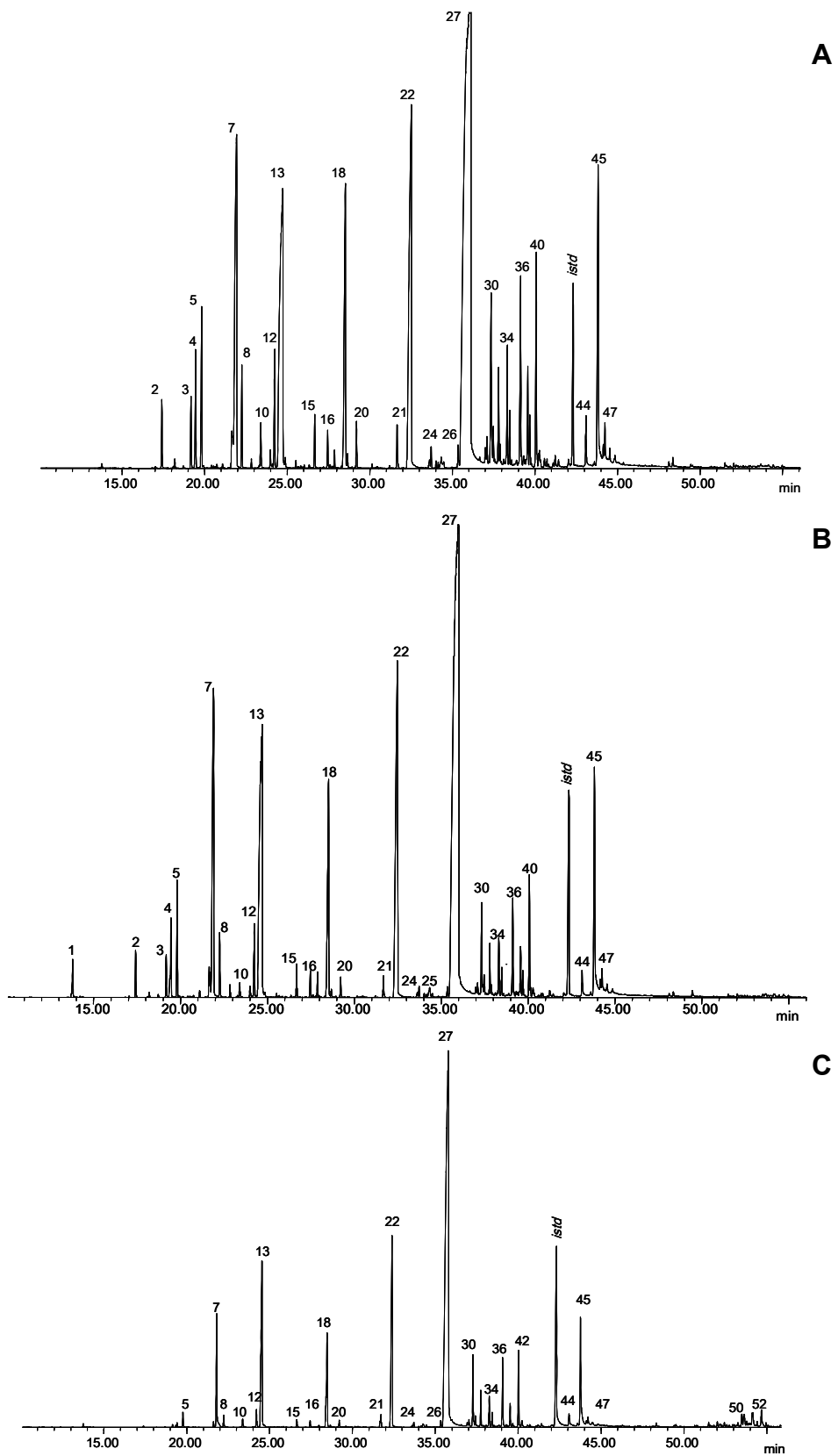


Figura 31. Cromatogramas típicos de extractos de *Ocimum sp1.*, aislados de hojas de la planta antes de su floración por diferentes técnicas, a saber: **A.** MWHD; **B.** SDE y **C.** SFE. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Composición química de los extractos de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, obtenidos por diferentes técnicas de extracción, de hojas de la planta antes de su floración.

Pico a N°	Compuestos	I _k ^b		Cantidad relativa ^c , % (n= 3)		
		DB-5	DB-WAX	MWHD	SDE	SFE
1	<i>trans</i> -2-Hexenal + <i>trans</i> -3-Hexen-1-ol	844 846	1215 1382	0.11±0.07	0.51±0.01	tr
2	α-Pineno	932	1019	0.54±0.02	0.55±0.04	tr
3	Sabineno	975	1118	0.61±0.02	0.53±0.04	0.17±0.03
4	1-Octen-3-ol + β-Pineno	981 983	1450 1104	1.10±0.03	1.23±0.04	0.3±0.1
5	β-Mirceno	990	1164	1.59±0.02	1.50±0.09	0.7±0.1
6	Limoneno	1034	1197	0.75±0.02	0.613±0.002	0.26±0.02
7	Eucaliptol (1,8-cineol)	1040	1212	7.63±0.05	7.5±0.3	5.29±0.08
8	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1048	1251	0.83±0.03	0.76±0.04	0.485±0.001
9	γ- Terpineno	1062	1250	tr	0.13±0.01	-
10	<i>trans</i> -4-Tujanol	1076	1555	0.49±0.03	0.19±0.04	0.34±0.03
11	α-Terpinoleno + <i>cis</i> -Óxido de linalol (furanóide)	1089 1090	1282 1446	0.15±0.01	0.154±0.005	-
12	Fenchona	1096	1400	1.11±0.07	0.86±0.06	0.54±0.01
13	Linalool	1108	1550	10.445±0.004	12.2±0.9	7.8±0.3
14	<i>cis</i> -4-Tujanol	1113	1469	0.108±0.003	tr	-
15	Alcanfor	1157	1525	0.44±0.02	0.40±0.03	0.24±0.03
16	δ-Terpineol	1177	1678	0.32±0.01	0.34±0.01	0.19±0.01
17	Terpinen-4-ol	1188	1608	0.14±0.01	0.27±0.02	-
18	α-Terpineol + Estragol	1202 1204	1703 1675	4.5±0.2	4.3±0.3	3.3±0.2
19	Acetato de octilo	1208	1477	0.128±0.001	tr	-
20	Acetato de fenchilo	1223	1474	0.35±0.02	0.25±0.02	0.25±0.01
21	Acetato de bornilo + <i>trans</i> -Anetol	1290 1292	1591 1883	0.38±0.01	0.30±0.02	0.52±0.08
22	<i>cis</i> -Cinamato de metilo	1312	1966	10.8±0.4	11.5±0.4	8.3±0.6
23	δ-Elemento + Acetato de epoxi-α-terpenilo*	1340 1342	1488 -	0.103±0.005	tr	-
24	Acetato de <i>exo</i> -2-hidroxicineoico	1344	1735	0.19±0.01	0.16±0.03	0.14±0.01
25	Eugenol	1360	2175	0.1879±0.003	0.23±0.01	-
26	α-Copaeno	1386	1500	0.225±0.003	0.16±0.01	0.18±0.01
27	<i>trans</i> -Cinamato de metilo	1404	2098	38.4±0.6	41±3.0	42.3±0.7
28	β-Ylangeno*	1433	-	0.136±0.004	tr	-
29	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1436	1610	0.22±0.01	0.13±0.01	0.19±0.03
30	<i>trans</i> -α-Bergamoteno + β-Copaeno	1442 1444	1577 -	1.76±0.04	1.3±0.13	1.81±0.09
31	α-Guaieno	1447	1603	0.35±0.01	0.22±0.01	0.276±0.002
32	<i>trans</i> -β-Farneseno	1456	1667	0.82±0.03	0.58±0.01	1.0±0.1
33	<i>cis</i> -Muurolo-3,5-dieno*	1459	1651	0.186±0.003	0.12±0.01	-
34	α-Humuleno	1472	1684	1.06±0.03	0.76±0.07	0.71±0.07
35	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	1477	-	0.444±0.003	0.29±0.04	0.31±0.03
36	Germacreno D	1496	1723	2.04±0.05	1.27±0.09	1.8±0.1
37	α-Zingiberene + Valenceno	1501 1502	- -	0.124±0.004	tr	-
38	Biciclogermacreno	1510	1748	0.90±0.01	0.64±0.02	0.56±0.04
39	α-Bulneseno	1514	1728	0.53±0.01	0.33±0.03	-

Continuación, **Tabla 6.**

40	γ -Cadineno + δ -Cadineno	1527 1529	1774 1769	2.16±0.03	1.4±0.2	-
41	β -Sesquifelandreno + <i>trans</i> -Calameneno + 7- <i>epi</i> - α -Selineno	1532 1534 1536	1778 1780 1846	0.294±0.005	0.22±0.03	-
42	<i>trans</i> - Nerolidol	1566	2042	0.13±0.01	tr	1.8±0.2
43	<i>cis</i> -Muurool-5-en- α -4-ol*	1572	-	tr	tr	0.28±0.04
44	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1631	2082	0.46±0.03	0.48±0.09	0.462±0.003
45	τ -Cadinol	1659	2188	4.20±0.03	4.3±0.4	4.0±0.3
46	α -Cadinol	1671	2249	0.23±0.01	0.25±0.04	0.14±0.02
47	β -Eudesmol	1675	2252	0.60±0.03	0.60±0.08	0.25±0.01
48	N.I. C ₁₅ H ₂₄	1686	-	0.21±0.03	0.20±0.02	-
49	α -Bisabolol	1697	2224	0.11±0.02	tr	tr
50	N.I. C ₁₈ H ₁₆ O ₂ **	2127	-	-	-	0.78±0.08
51	Acido linoleico	2135	-	-	-	0.12±0.02
52	N.I. C ₁₈ H ₁₆ O ₂ **	2152	-	-	-	0.76±0.05
53	N.I. C ₁₈ H ₁₆ O ₂ **	2266	-	-	-	0.31±0.01
54	N.I. C ₁₈ H ₁₆ O ₂ **	2306	-	tr	tr	3.2±0.3
55	N.I. C ₁₈ H ₁₆ O ₂ **	2322	-	-	-	1.5±0.3
56	N.I. C ₁₈ H ₁₆ O ₂ **	2327	-	-	tr	3.1±0.4
57	N.I. C ₁₈ H ₁₆ O ₂ **	2339	-	-	-	0.576±0.005
58	N.I. C ₁₈ H ₁₆ O ₂ **	2346	-	-	-	0.264±0.004
59	Heptacosano	2737	-	-	-	0.31±0.09
60	Escualeno	2914	-	-	-	0.5±0.4
61	Nonacosano	3077	-	-	-	1.1±0.9
M: Hidrocarburos monoterpénicos				5,75	5,61	2,05
S: Hidrocarburos sesquiterpénicos				11,94	8,12	6,77
MO: Monoterpenos oxigenados ^d				24,29	25,17	17,01
SO: Sesquiterpenos oxigenados ^e				6,08	6,27	7,09
FP: Fenilpropanoides				51,75	54,97	52,26
OCO: Otros compuestos oxigenados				0,24	0,75	12,86
H: Hidrocarburos				0,00	0,00	1,95

a. Número del pico cromatográfico en la **Figura 31.**

b. Índices de Kováts determinados experimentalmente en las columnas DB-5 y DB-WAX.

c. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna DB-5; promedio de tres extracciones para cada técnica (n= 3).

d. Óxidos, aldehídos, alcohol y acetatos.

e. Óxidos, alcoholes y cetonas.

tr: Trazas (valores menores de 0,1 %)

* Identificado tentativamente.

**Iones principales en m/z 302 (M⁺), 282 (M⁺),...

En el AE y extractos obtenidos mediante SDE y SFE se identificaron cerca de 50 componentes en concentraciones superiores a 0.1%.

Los componentes mayoritarios obtenidos mediante las tres técnicas de extracción (MWH, SDE y SFE), fueron *trans*-cinamato de metilo (38-42%) y *cis*-cinamato de metilo (8-11%). En la **Figura 32**, se presenta el espectro de masas del cinamato de metilo. Las rutas de ionización disociativa por impacto de electrones a 70 eV, se observan en el **Esquema 3**. El ión molecular corresponde al fragmento $C_{10}H_{10}O_2^+$ ubicado en m/z 162 con intensidad alta (65%), el cual, por pérdida de un radical hidrógeno da origen al fragmento $(M-H)^+$, $C_{10}H_9O_2$, en m/z 161 (34%). La ruptura α , típica para aldehídos, cetonas, ácidos, amidas y ésteres, genera el catión $C_9H_7O^+$ en m/z 131 (100%), por la eliminación del radical OCH_3 ; el cual, por pérdida de una molécula de monóxido de carbono, forma el catión $C_8H_7^+$ en m/z 103, con intensidad alta 52%; éste, por la eliminación de una molécula de C_2H_2 , genera el fragmento $C_6H_5^+$, en m/z 77 (24%).

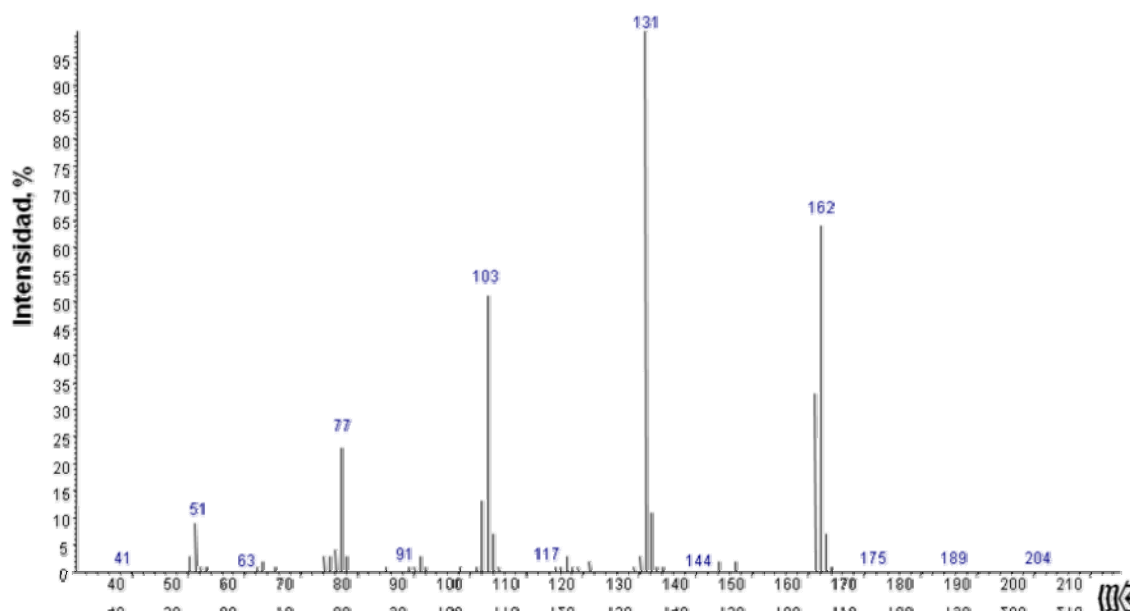
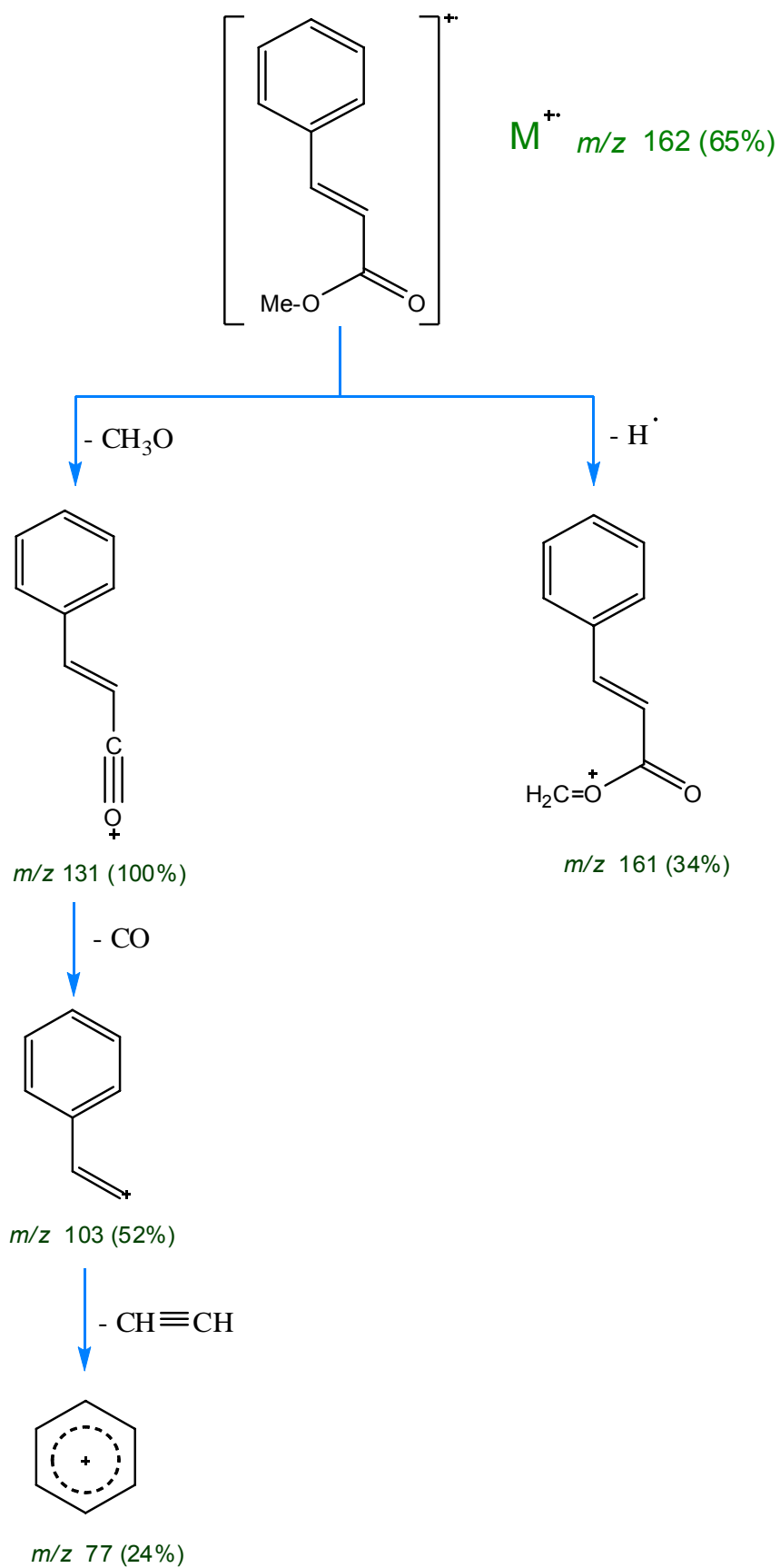


Figura 32. Espectro de masas del cinamato de metilo. EI, 70 eV.

Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación del cinamato de metilo.



Otro compuesto presente en cantidad alta fue el linalool (8-12%). En la **Figura 33**, se presenta su espectro de masas. Las rutas de ionización disociativa por impacto de electrones a 70 eV, se observan en el **Esquema 4**. El ión molecular M^+ (m/z 154), con una intensidad baja (2%), experimenta la pérdida de una molécula de agua, generando el fragmento en m/z 136 ($C_{10}H_{16}^+$), con una intensidad media 16%; este fragmento por eliminación de radicales alquílicos, CH_3 y C_3H_7 , da origen a los cationes ($C_9H_{13}^+$), m/z 121 (42%), y ($C_7H_9^+$) en m/z 93 (100%), siendo este último, el ión pico de base.

El ión molecular sufre dos rupturas alílicas, a saber: la ruptura **1**, da origen al catión $C_4H_7O^+$ en m/z 71(93%) y la ruptura **2**, genera el catión, $C_5H_9^+$, en m/z 69 (38%). Estos cationes, por la posterior pérdida de una molécula de C_2H_4 , generan los fragmentos $C_2H_3O^+$ en m/z 43(40%) y $C_3H_5^+$ en m/z 41(36%), respectivamente.

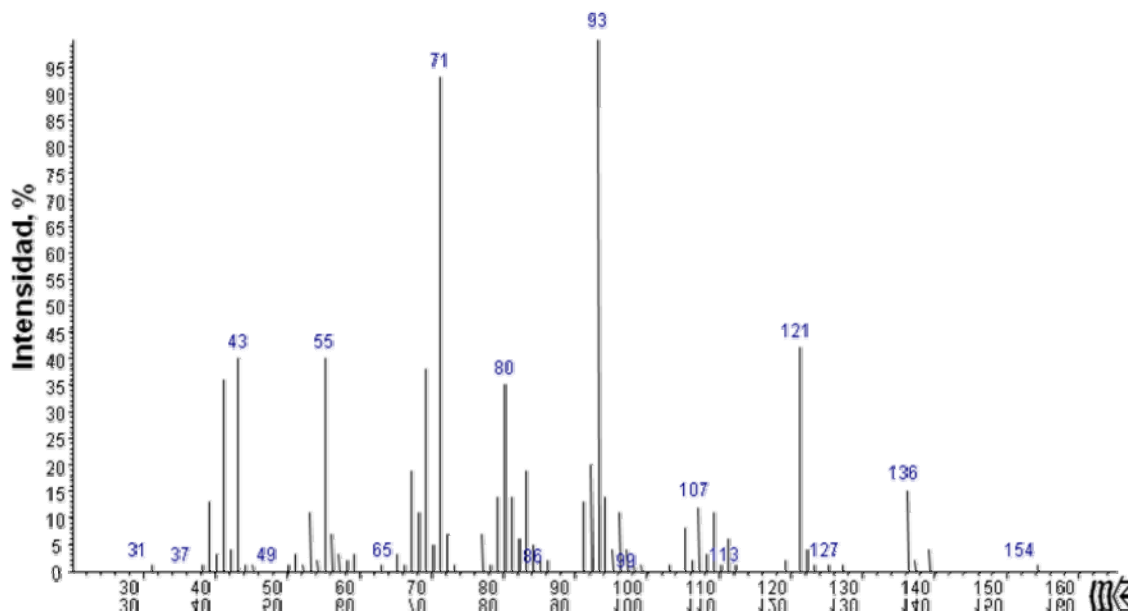
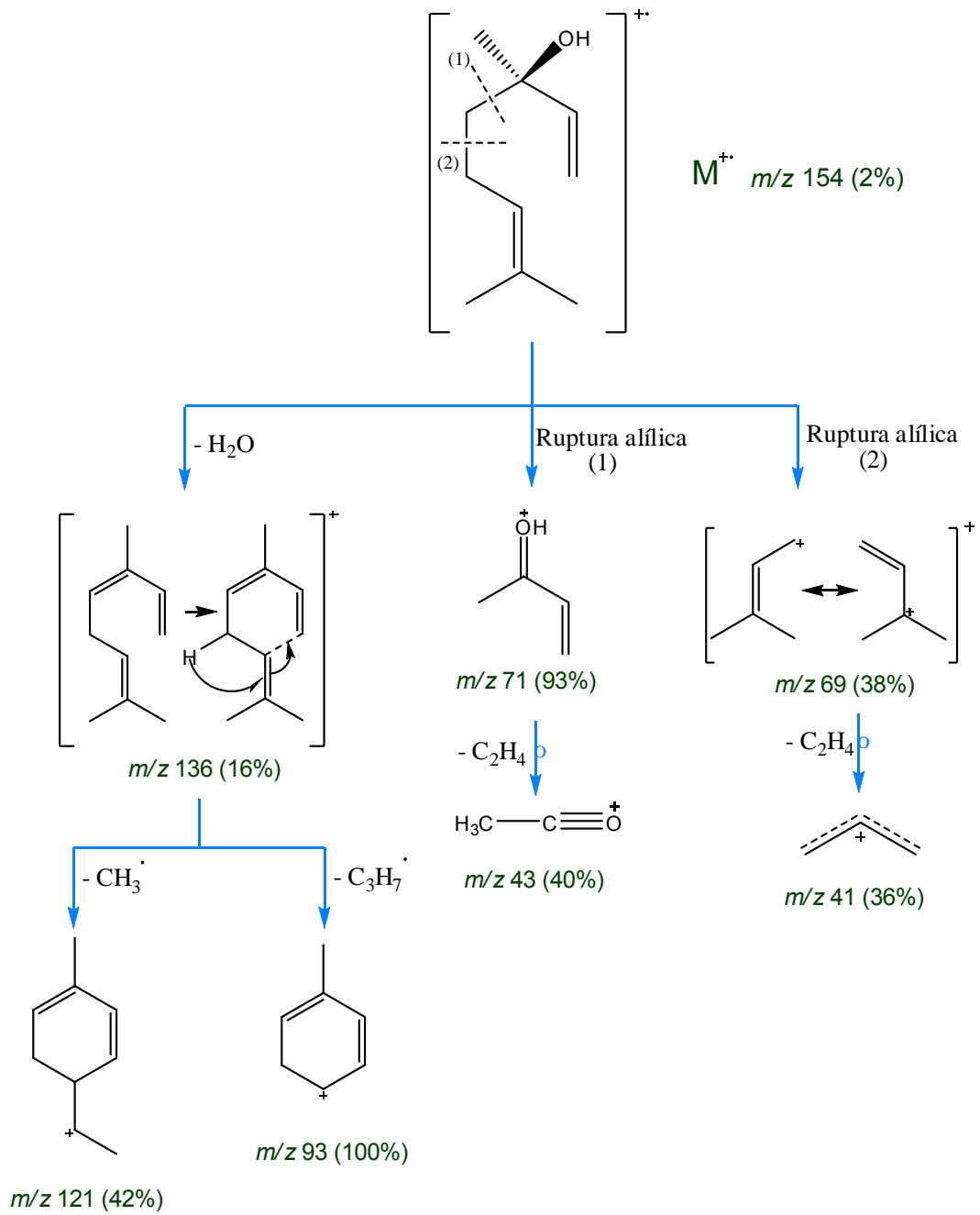


Figura 33. Espectro de masas del linalool. EI, 70 eV.

Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación del linalool.



El eucaliptol (1,8-cineol), otro compuesto identificado en el aceite esencial y extractos de *Ocimum sp1*, se encontró en un porcentaje considerable (5-8%). En la **Figura 34**, se presenta su espectro de masas. Las rutas de ionización disociativa por impacto de electrones a 70 eV, se observan en el **Esquema 5**. El ión molecular del 1,8-cineol en m/z 154 (100%), presenta la pérdida de un radical alquílico $\text{CH}_3\cdot$ formando el catión $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}^+$ en m/z 139 (85%). Por reordenamiento del ión molecular y posterior ruptura, se forman los iones $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^+$ en m/z 43 (66%) y $\text{C}_8\text{H}_{15}^+$ en m/z 111, con intensidad media (82%).

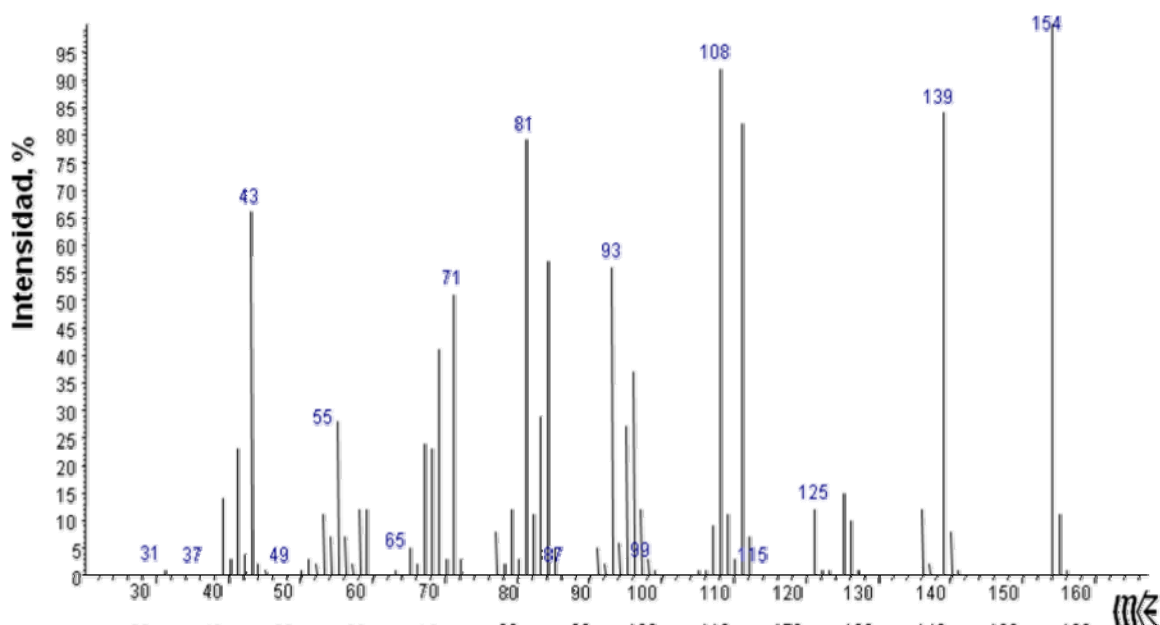
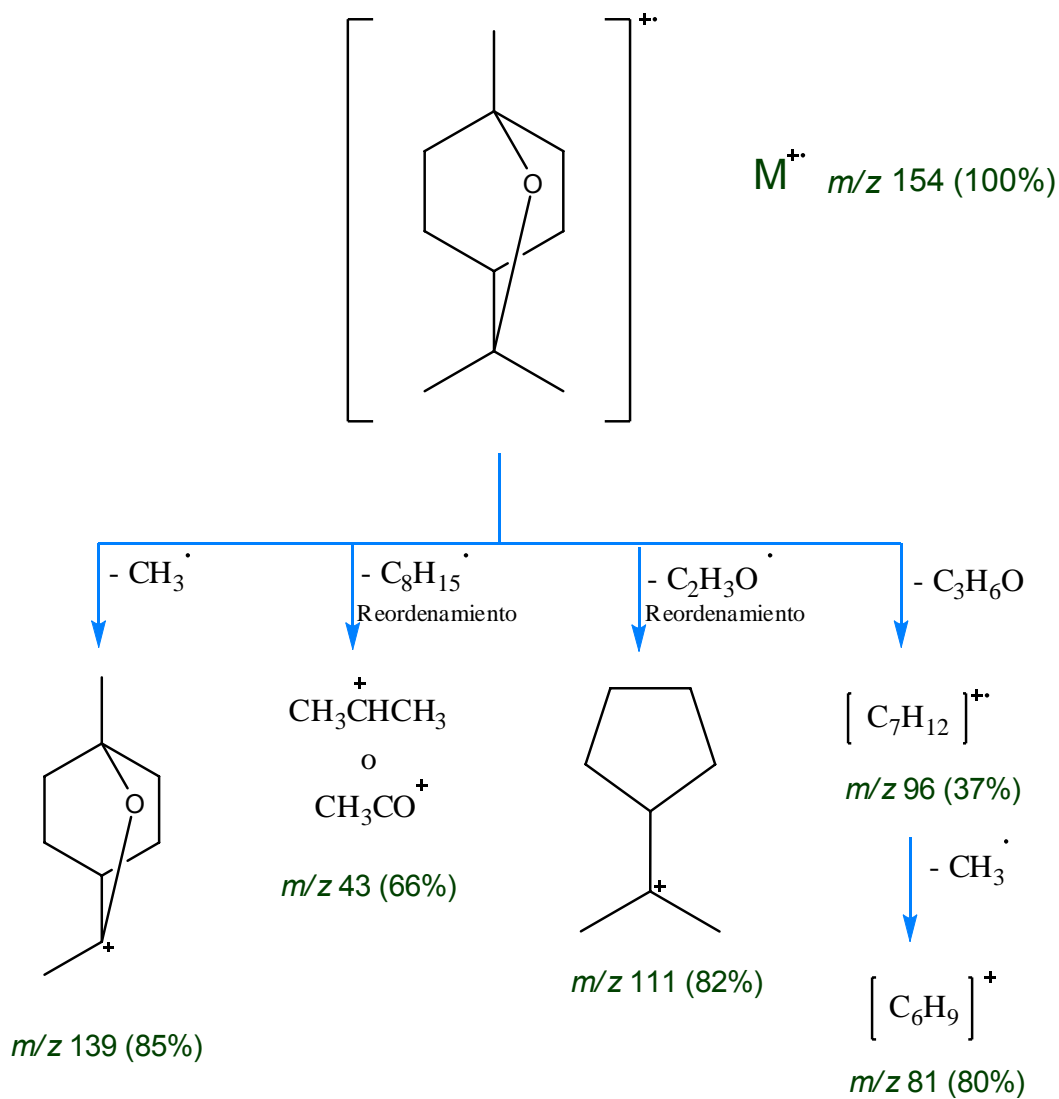


Figura 34. Espectro de masas del eucaliptol (1,8-cineol). EI, 70 eV.

Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del eucaliptol (1,8-cineol).



El mayor componente del AE de las hojas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, fue el *trans*-cinamato de metilo (38.4%), seguido del isómero, *cis*-cinamato de metilo (10.8%). Los cinamatos de metilo están presente como compuestos mayoritarios en el quimiotipo tropical [175] y en algunas especies de *Ocimum*, tales como *Ocimum americanum* var. *Americanum* de Brasil [176], *Ocimum canum* de S.Tome y las islas Principe [177] y las especies descritas por Simon *et al.* [178], Viera *et al.* [176] y Ozek *et al.* [179], que reportaron quimiotipos de *Ocimum basilicum basilicum* con alto contenido de cinamato de metilo y linalool, provenientes de Estados Unidos, Brasil y Turquía, respectivamente.

Las tres técnicas extractivas (MWHD, SDE y SFE) presentaron un alto contenido de fenilpropanoides (51-57%) y monoterpenos oxigenados (17-25%), la fracción de sesquiterpenos presentó un porcentaje más alto, cuando se usó MWHD (11.94%), en comparación con lo obtenido por SDE (8.12%) y SFE (6.77%), respectivamente.

En la **Figura 35**, se registran perfiles cromatográficos de los metabolitos secundarios volátiles aislados por las técnicas de *headspace*.

Las cantidades relativas (%) de los metabolitos en las fracciones volátiles de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, obtenidas por las técnicas de *headspace* (HS-SPME y S-HS) presentaron una diferencia notoria con respecto a sus composiciones, obtenidas por MWHD o por las técnicas SDE y SFE. Las cantidades relativas (%) de los componentes de las fracciones volátiles de *Ocimum*, obtenidas por las técnicas de *headspace*, se muestran en la **Tabla 7**.

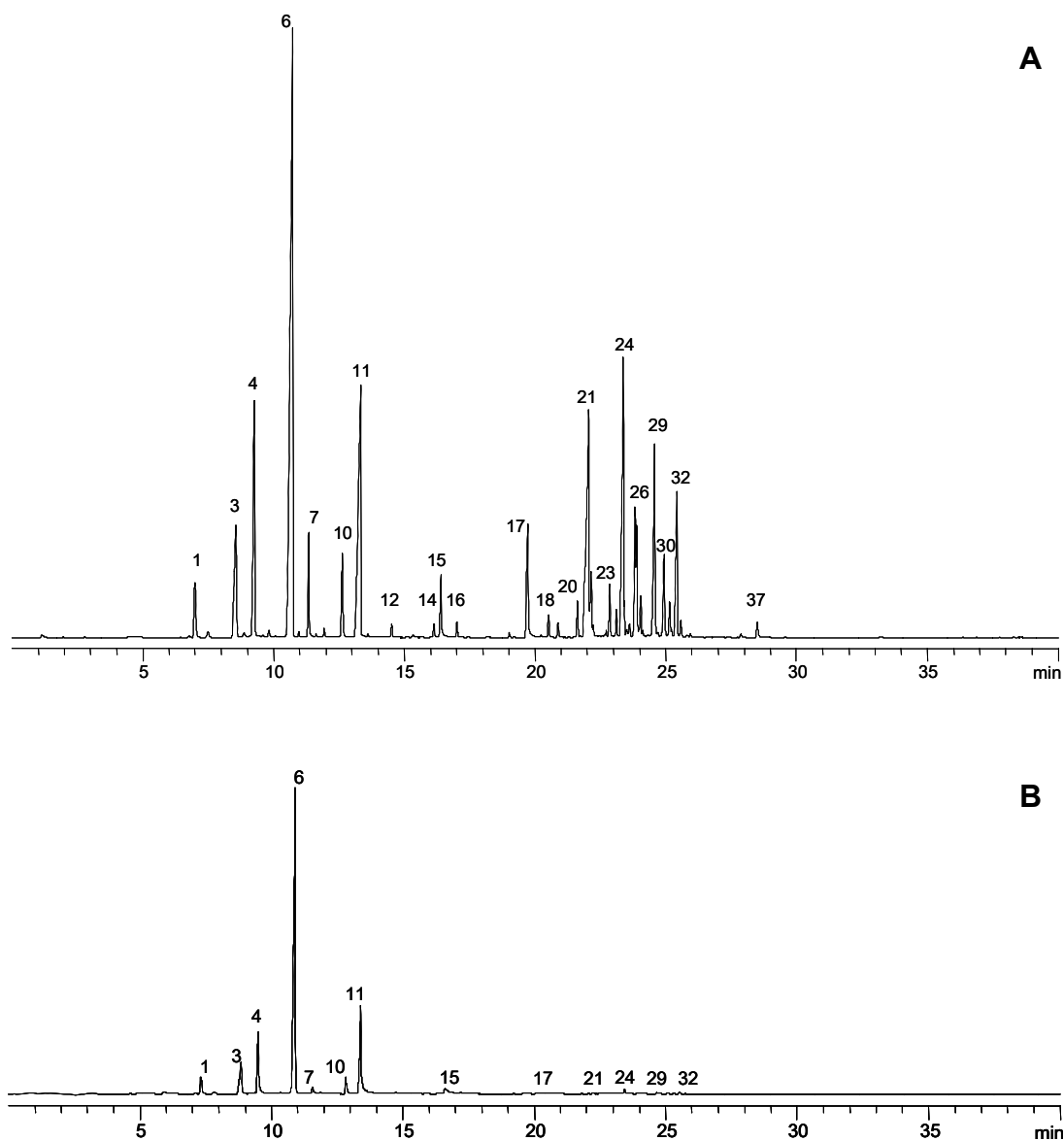


Figura 35. Cromatogramas típicos de las fracciones volátiles de *Ocimum sp1.*, obtenidas por diferentes métodos de *headspace*: **A.** HS-SPME y **B.** S-HS. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, FID. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 7.**

Tabla 7. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos en las fracciones volátiles obtenidas por HS-SPME y S-HS, de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”.

Pico ^a N°	Compuestos	Cantidad relativa ^b , % (n= 3)	
		HS-SPME	S-HS
1	α -Pineno	1.50±0.01	2.9±0.2
2	Sabineno	0.179±0.003	0.39±0.02
3	1-Octen-3-ol + β -Pineno	3.78±0.09	6.5±0.2
4	β -Mirceno	5.7±0.4	9.3±0.5
5	Limoneno	0.09±0.01	0.36±0.02
6	Eucaliptol (1,8-cineol)	28±1.7	52±3.6
7	trans- β -Ocimeno	1.96±0.08	1.38±0.04
8	γ - Terpineno	0.11±0.01	0.47±0.02
9	trans-4-Tujanol	0.22±0.02	0.29±0.02
10	Fenchona	2.1±0.2	0.167±0.004
11	Linalool	11.1±0.9	14.9±0.2
12	Alcanfor	0.29±0.02	1.67±0.03
13	δ -Terpineol	0.10±0.01	0.49±0.05
14	Terpinen-4-ol	0.30±0.03	0.19±0.03
15	α -Terpineol + Estragol	1.50±0.06	2.1±0.4
16	Acetato de fenchilo	0.27±0.01	0.57±0.04
17	cis-Cinamato de metilo	3.2±0.1	0.51±0.09
18	Acetato de exo-2-hidroxicineoico	0.37±0.03	0.15±0.02
19	Eugenol	0.29±0.02	0.07±0.01
20	α -Copaeno	0.72±0.07	0.19±0.08
21	trans-Cinamato de metilo	10±1.0	0.5±0.1
22	cis- α -Bergamoteno	1.5±0.2	0.07±0.02
23	trans- β -Cariofileno	1.0±0.2	0.17±0.02
24	trans- α -Bergamoteno	7±1.2	0.59±0.03
25	α -Guaieno	0.19±0.02	-
26	α -Humuleno	2.4±0.4	0.13±0.03
27	trans- β -Farneseno	1.84±0.05	0.18±0.03
28	cis-Muurola-4(14),5-dieno	1.1±0.2	0.12±0.02
29	Germacreno D	4.5±0.6	0.27±0.05
30	Biclogermacreno	1.7±0.2	0.15±0.04
31	α -Bulneseno	0.66±0.09	0.08±0.01
32	γ -Cadineno	3.1±0.5	0.22±0.03
33	β -Sesquifelandreno	0.35±0.02	0.040±0.003
34	10- <i>epi</i> -Cubebol	0.08±0.01	-
35	trans- Nerolidol	0.013±0.003	-
36	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	0.10±0.01	-
37	τ -Cadinol	0.40±0.05	-
M: Hidrocarburos monoterpénicos		13.34	21.32
S: Hidrocarburos sesquiterpénicos		26.37	2.20
MO: Monoterpenos oxigenados ^c		42.91	71.92
SO: Sesquiterpenos oxigenados ^d		0.59	0.00
FP: Fenilpropanoides		13.98	2.12

- a. Número del pico en la **Figura 35**.
 - b. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna DB-5; promedio de tres extracciones para cada técnica (n= 3).
 - c. Óxidos, aldehídos, alcoholes y acetatos.
 - d. Óxidos, alcoholes y cetonas.
- tr* : Trazas.

Mediante las técnicas de *headspace* fueron detectados e identificados 37 componentes en concentraciones superiores a 0.1%, el número más bajo en comparación con los compuestos detectados en extractos obtenidos por las tres técnicas extractivas, *i.e.* MWHD, SDE y SFE, de acuerdo con lo que se observa en las **Tablas 6 y 7**.

Los componentes mayoritarios aislados por las técnicas de *headspace* (S-HS y HS-SPME) fueron eucaliptol (52 y 27%) en la fracción volátil obtenida por S-HS y en la obtenida por HS-SPME, respectivamente, seguido del linalool (14.9 y 11.1%).

En el caso de las fracciones volátiles, aislados por las técnicas de *headspace*, cabe destacar la baja cantidad relativa de *trans*-cinamato de metilo (0.5-10%) en comparación con la obtenida por las técnicas extractivas (MWHD, SDE y SFE) (38-42%), lo cual puede ser atribuido a su punto de ebullición relativamente alto (261 °C), el cual lo hace menos susceptible a ser extraído mediante el uso de las técnicas de *headspace*.

La **Figura 36**, muestra la comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de *Ocimum sp1.*, aislados por las cinco (5) técnicas de extracción, agrupándolos en siete familias de compuestos: Fenilpropanoides (FP), hidrocarburos monoterpénicos (M), monoterpenos oxigenados (MO), hidrocarburos sesquiterpénicos (S), sesquiterpenos oxigenados (SO), hidrocarburos (H) y otros compuestos oxigenados (OCO).

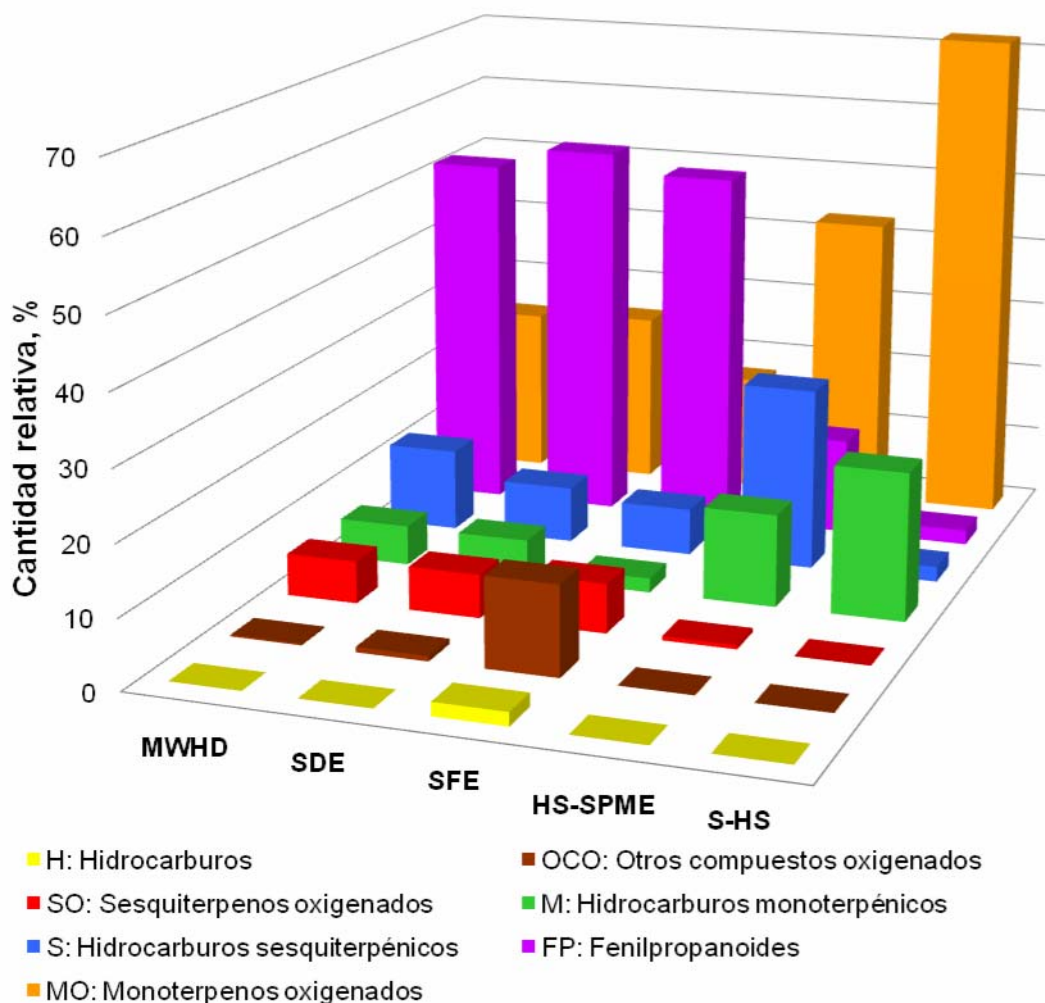


Figura 36. Distribución de las principales familias de los compuestos en el aceite esencial, extractos y fracciones volátiles de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”.

Las técnicas extractivas (MWHD, SDE y SFE) permiten una mayor recuperación de fenilpropanoides (51-54%), las técnicas de *headspace* aíslan en mayor grado la fracción volátil, *i.e.* para S-HS, las cantidades relativas de hidrocarburos monoterpénicos fueron de 21.32% y de sus análogos oxigenados, 71.92%, seguidos de HS-SPME, con cantidades relativas de 13,34 y 42.91%, respectivamente. Para estas familias de compuestos, adicionalmente, la técnica HS-SPME permitió aislar y concentrar una mayor cantidad de hidrocarburos sesquiterpénicos, en comparación con S-HS.

Para apreciar mejor la influencia del método de extracción sobre la composición final de las fracciones volátiles obtenidas, se aplicó el análisis *cluster*, utilizando distancias euclidianas completas (*Software* STATISTICA, Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

Para el “Sígueme blanco” (*Ocimum sp1.*) (**Figura 37**), el dendograma de *clusters* muestra similitud en la composición química obtenida mediante las técnicas MWHD, SDE y SFE, las cuales se caracterizaron por la obtención de un alto contenido de fenilpropanoides (FP, 52-55%) y monoterpenos oxigenados (MO, 17-25%), y se observan diferencias notorias respecto a las técnicas de *headspace*, en las cuales se obtuvo un alto contenido de MO (43-72%), hidrocarburos sesquiterpénicos (S, 26%) para HS-SPME y hidrocarburos monoterpénicos (M, 21%) para S-HS.

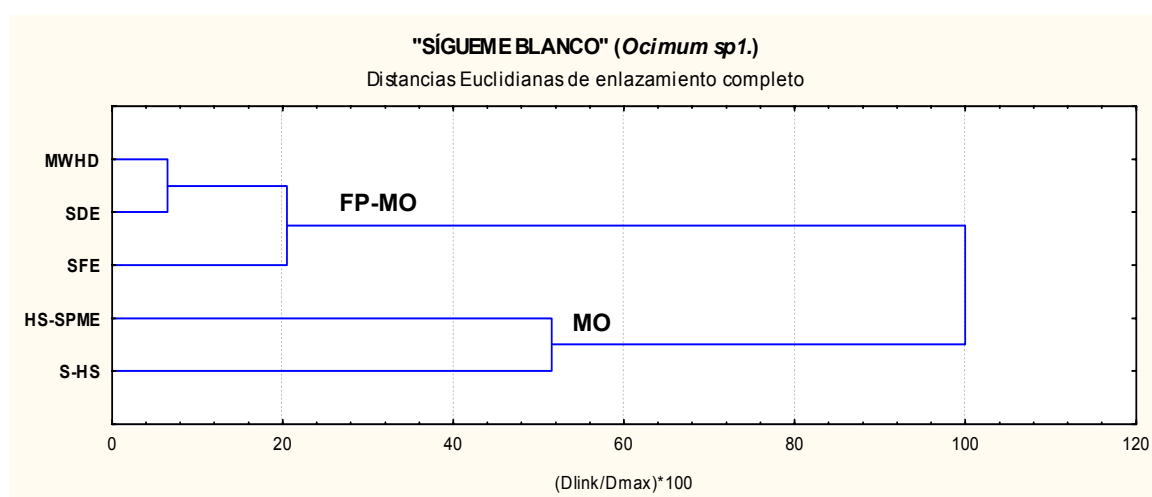


Figura 37. Dendrograma de *clusters* para metabolitos secundarios de *Ocimum sp1.*, obtenidos por diferentes técnicas de extracción.

Para apreciar mejor el efecto del método de extracción sobre la composición final obtenida, las composiciones relativas (%) de AE, extractos y fracciones volátiles, obtenidos por diferentes técnicas extractivas (MWHD, SDE y SFE) y de *headspace* (S-HS y HS-SPME), se compararon por medio del análisis estadístico de Componentes Principales (PCA, STATISTICA, Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). La matriz utilizada para el estudio

estaba formada por 5 casos, que corresponden al número de técnicas extractivas utilizadas y por 7 variables, que representan los grupos de familias de compuestos obtenidos mediante cada técnica.

El resultado del análisis estadístico, señala que el 97% de la información de las **Tablas 6 y 7**, puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (las componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las cantidades relativas de los componentes presentes en el AE, extractos y fracciones volátiles. Como se observa en la **Figura 38**, el *factor 1*, representa el 88.66% de la información y se encuentra conformado por los fenilpropanoides (53%), monoterpenos oxigenados (40%), e hidrocarburos monoterpénicos (5%). El *factor 2*, constituye el 8.7% y está constituido por hidrocarburos sesquiterpénicos (73%), monoterpenos oxigenados (14%) y fenilpropanoides (10%) (Véase **Anexo 2-Tabla 1**).

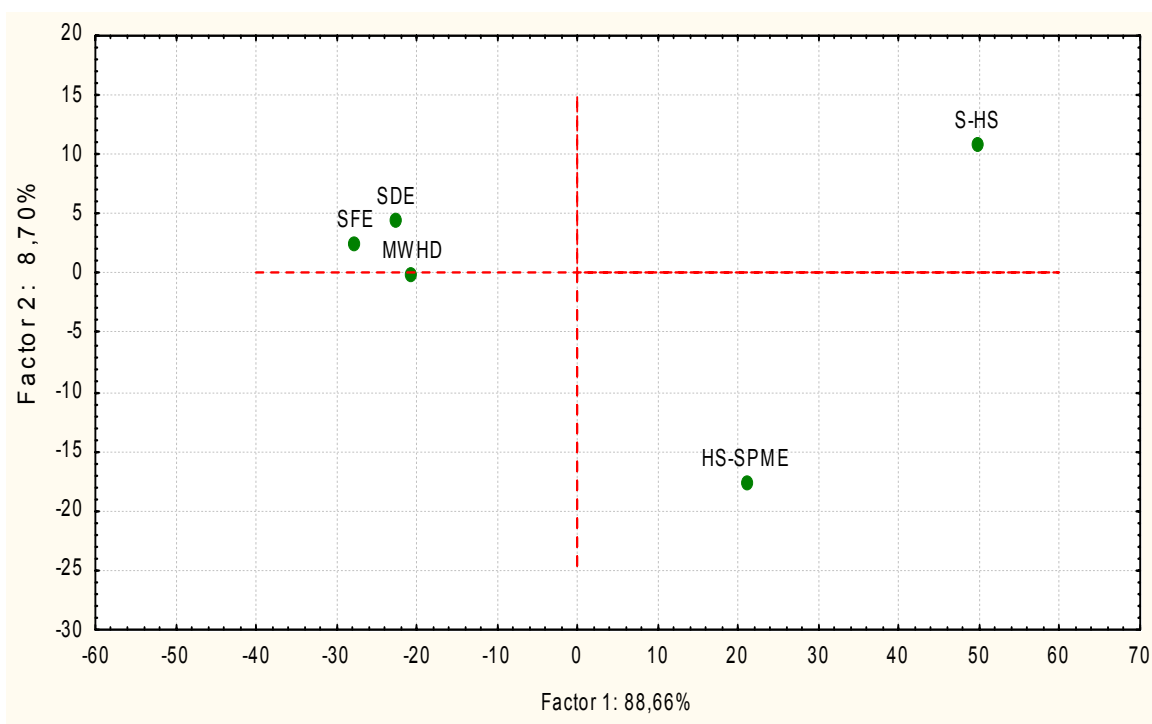


Figura 38. Análisis de componentes principales (PCA) de las cantidades relativas (%) de las mezclas de compuestos volátiles y semivolátiles, aisladas de las plantas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, por diferentes métodos de extracción.

De acuerdo con la **Figura 38**, se observa un grupo muy definido, compuesto por las técnicas extractivas MWHD, SDE y SFE, las cuales se encuentran ubicadas en el segundo cuadrante por encima del eje de las abscisas. El desplazamiento hacia la izquierda en la gráfica corresponde a las técnicas que extraen mayor cantidad de fenilpropanoides (MWHD, SDE y SFE), mientras que desplazamientos hacia la derecha indican un mayor porcentaje de recuperación de hidrocarburos monoterpénicos por parte de las técnicas de extracción (S-HS, HS-SPME). En el caso de las técnicas de *headspace*, la separación observada en la gráfica entre estas dos técnicas, esta dada por la diferencia en la cantidad de hidrocarburos sesquiterpénicos extraídos por cada una de ellas, S-HS (2,2%), la cual es muy baja en comparación con el 26,37%, obtenida mediante HS-SPME.

La proximidad de los puntos correspondientes a los extractos, obtenidos por MWHD, SDE y SFE, confirma su similitud (**Tabla 6**), así como sus diferencias con las fracciones aisladas por las técnicas de *headspace* (**Tabla 7**).

5.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES OBTENIDOS POR SDE, DE FLORES, HOJAS Y TALLOS DE *OCIMUM sp1*.

En la **Figura 39**, se muestran los perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por CG-MS de los metabolitos secundarios volátiles, aislados por destilación-extracción simultánea con solvente (SDE) de flores, hojas y tallos de *Ocimum sp1*. "Sígueme blanco". En la **Tabla 8**, se registra la composición química de los extractos SDE de flores, hojas y tallos de *Ocimum sp1*.

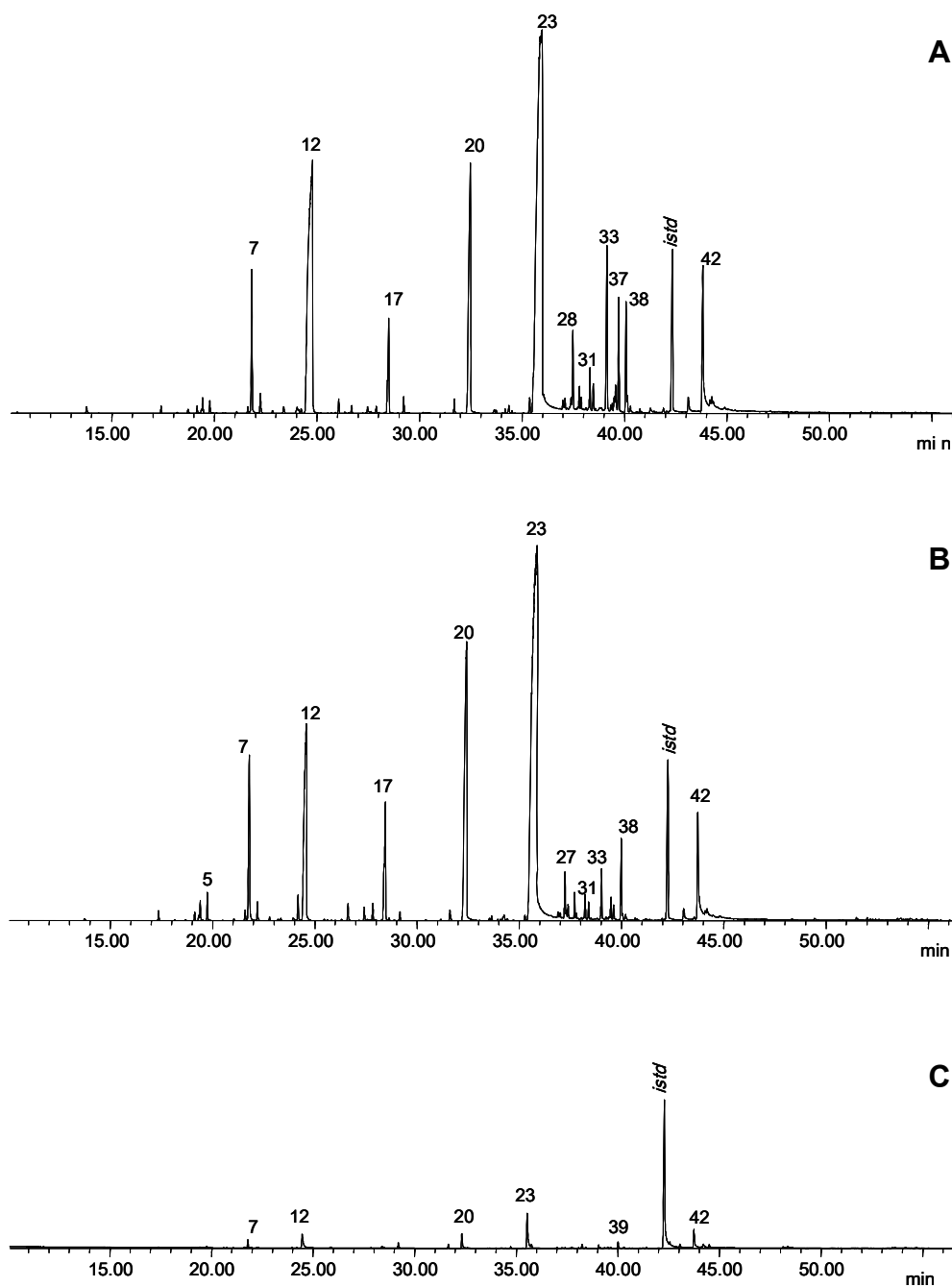


Figura 39. Cromatogramas típicos de metabolitos secundarios volátiles aislados por SDE de diferentes partes de *Ocimum sp1*: **A.** FLORES; **B.** HOJAS y **C.** TALLOS. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Composición química de los extractos SDE de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, obtenidos de diferentes partes de la planta.

Pico ^a Nº	Compuestos	I _k ^b		Cantidad relativa ^c , % (n=3)		
		DB-5	DB-WAX	FLORES	HOJAS	TALLOS
1	<i>trans</i> -2-Hexenal + <i>trans</i> -3-Hexen-1-ol	844 846	1215 1382	0.13±0.01	tr	-
2	α-Pineno	932	1019	0.12±0.02	0.23±0.07	-
3	Sabineno	975	1118	0.11±0.02	0.21±0.06	-
4	1-Octen-3-ol + β-Pineno	981 983	1450 1104	0.35±0.05	0.6±0.2	-
5	β-Mirceno	990	1164	0.24±0.04	0.7±0.3	-
6	Limoneno	1034	1197	0.11±0.01	0.30±0.08	-
7	Eucaliptol (1,8-cineol)	1040	1212	2.7±0.1	5.36±1.39	6.7±0.7
8	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1048	1251	0.352±0.003	0.5±0.1	-
9	<i>trans</i> -4-Tujanol	1076	1555	0.14±0.01	-	-
10	α-Terpinoleno + <i>cis</i> -Óxido de linalol (furanoide)	1090 1091	1282 1446	0.14±0.02	tr	-
11	Fenchona	1096	1400	0.073±0.004	0.50±0.05	-
12	Linalool	1108	1550	22±1.6	13.1±0.7	24±1.6
13	<i>cis</i> -Miroxido	1145	1469	0.22±0.03	-	-
14	Alcanfor	1157	1525	0.23±0.02	0.26±0.03	-
15	δ-Terpineol	1177	1678	0.15±0.03	0.24±0.01	-
16	Terpinen-4-ol	1188	1608	0.106±0.001	0.31±0.02	-
17	α-Terpineol + Estragol	1202 1204	1703 1675	2.8±0.3	3.53±0.03	-
18	Acetato de fenchilo	1223	1474	0.26±0.01	0.171±0.005	tr
19	Acetato de bornilo + <i>trans</i> -Anetol	1290 1292	1591 1883	0.36±0.01	0.16±0.01	tr
20	<i>cis</i> -Cinamato de metilo	1312	1966	9.7±0.2	15.2±0.4	12.8±0.4
21	Eugenol	1360	2175	0.14±0.02	0.208±0.002	-
22	α-Copaeno	1386	1500	0.30±0.02	0.12±0.01	-
23	<i>trans</i> -Cinamato de metilo	1404	2098	41±1.4	51±1.6	34±6.0
24	<i>cis</i> -α-Bergamoteno	1422	1528	tr	tr	-
25	β-Ylangeno*	1433	-	0.196±0.002	0.13±0.02	-
26	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1436	1610	0.18±0.02	0.12±0.03	-
27	<i>trans</i> -α-Bergamoteno + β-Copaeno	1442 1444	1577 -	0.25±0.03	0.97±0.09	-
28	α-Guaieno	1447	1603	1.28±0.03	0.29±0.03	-
29	<i>trans</i> -β-Farneseno	1456	1667	0.4±0.1	0.49±0.01	-
30	<i>cis</i> -Muurolo-3,5-dieno*	1459	1651	0.215±0.005	0.13±0.01	-
31	α-Humuleno	1472	1684	0.74±0.02	0.50±0.03	tr
32	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	1477	-	0.453±0.002	0.31±0.03	-
33	Germacreno D	1496	1723	3.7±0.2	1.12±0.05	tr
34	β-Selineno	1498	-	0.113±0.005	-	-
35	α-Zingiberene + Valenceno	1501 1502	- -	0.13±0.01	tr	-
36	Biciclogermacreno	1510	1748	0.82±0.04	0.57±0.04	-
37	α-Bulneseno	1514	1728	2.0±0.1	0.35±0.01	tr
38	γ-Cadineno + δ-Cadineno	1527 1529	1774 1769	2.00±0.09	1.6±0.1	-
39	β-Sesquifelandreno + <i>trans</i> -Calameneno + Eudesma-3,7(11)-dieno*	1532 1534 1536	1778 1780 1846	0.102±0.004	0.16±0.02	3.8±0.1

Continuación, **Tabla 8.**

40	<i>trans</i> - Nerolidol	1566	2042	0.13±0.01	-	-
41	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1631	2082	0.35±0.04	0.32±0.04	tr
42	τ -Cadinol	1659	2188	3.8±0.2	3.4±0.3	15±1.7
43	α -Cadinol*	1671	2249	0.26±0.03	0.20±0.01	tr
44	β -Eudesmol	1675	2252	0.72±0.07	0.33±0.03	tr
M: Hidrocarburos monoterpénicos				1.47	2.86	0.00
S: Hidrocarburos sesquiterpénicos				13.20	7.08	10.87
MO: Monoterpenos oxigenados ^d				28.28	21.59	35.94
SO: Sesquiterpenos oxigenados ^e				5.26	4.26	16.8
FP: Fenilpropanoides				52.06	67.84	46.97
OCO: Otros compuestos oxigenados				0.19	0.36	0,00

a. Número del pico en la **Figura 39**.

b. Índices de Kováts determinados experimentalmente en las columnas DB-5 y DB-WAX.

c. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en columna DB-5; promedio de tres extracciones para cada técnica (n= 3).

d. Óxidos, aldehídos, alcoholes y acetatos.

e. Óxidos, alcoholes y cetonas.

tr Trazas (< 0,1 %)

* Identificado tentativamente.

La composición química de los extractos SDE de las flores y hojas descubrió gran similitud, pero existen algunas diferencias en las cantidades relativas, mientras que el extracto SDE de los tallos presentó un menor número de componentes.

El componente mayoritario fue el *trans*-cinamato de metilo, presente en los tres extractos, pero en mayor proporción, obtenido de las hojas (51%), comparado con su cantidad en los extractos de flores (41%) y tallos (34%).

El segundo compuesto más abundante en los extractos SDE de flores y tallos fue el alcohol monoterpénico, linalool, (22 y 24%, respectivamente), mientras que en el extracto SDE de las hojas, el segundo compuesto mayoritario fue el *cis*-cinamato de metilo (15.2%). El contenido de linalool en este mismo extracto fue menor respecto a lo observado en los extractos de flores y tallos (13.1%). Otros compuestos importantes presentes en todos los extractos fueron

eucaliptol (1,8-cineol) (2-7%) y τ -cadinol en el extracto SDE de tallos (15%), en comparación con su menor cantidad en los extractos de flores y hojas, *i.e.* 3.8 y 3.4%, respectivamente.

La comparación de la composición química de los extractos SDE de flores, hojas y tallos se muestra en la **Figura 40**, donde se destaca el alto contenido de fenilpropanoides (47-68%), en los tres extractos, en el siguiente orden: hojas > flores > tallos. Los monoterpenos oxigenados también se encuentran en cantidades altas (22-36%), presentándose la mayor cantidad de estos compuestos en el extracto SDE de tallos (35.94%), seguido de las flores (28.28%) y hojas (21.59%).

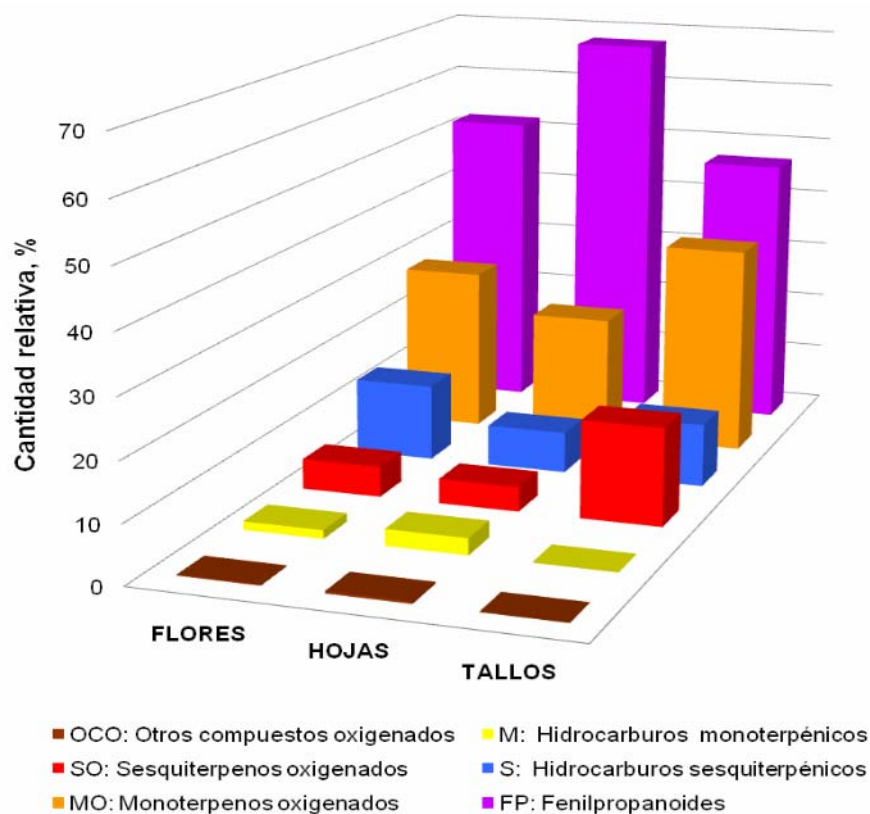


Figura 40. Distribución de las principales familias de los compuestos en los extractos SDE, obtenidos de las flores, hojas y tallos de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”. M: Hidrocarburos monoterpénicos; S: Hidrocarburos sesquiterpénicos; MO: Monoterpenos oxigenados; SO: Sesquiterpenos oxigenados; FP: Fenilpropanoides; OCO: Otros compuestos oxigenados.

La **Tabla 9**, muestra la relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno "*istd*" (hexadecano), de los compuestos mayoritarios de los extractos SDE, obtenidos de las flores, hojas y tallos de *Ocimum sp1*. "Sígueme blanco". Puede observarse en la **Tabla 9**, que la relación de áreas de *trans*-cinamato de metilo e *istd* es mayor en los extractos SDE obtenido de las hojas (11) y flores (10.8), con respecto a la de las áreas en el extracto de tallos (0.16).

Tabla 9. Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) "*istd*", de los compuestos mayoritarios de los extractos SDE de *Ocimum sp1*. "Sígueme blanco", obtenidos de diferentes partes de la planta.

Compuestos mayoritarios	Área compuesto/Área <i>istd</i>		
	FLORES	HOJAS	TALLOS
Eucaliptol (1,8-cineol)	0.7±0.1	1.3±0.5	0.01±0.01
Linalool	5.9±0.4	2.4±0.1	0.06±0.02
<i>cis</i> -Cinamato de metilo	2.7±0.3	3.30±0.03	0.03±0.01
<i>trans</i> -Cinamato de metilo	10.8±0.9	11±1.4	0.16±0.06

De igual forma, se observa que la relación de áreas de *cis*-cinamato de metilo es mayor en el extracto de las hojas (3.30), en comparación con la de las áreas en extractos de flores (2.7) y tallos (0.03).

Por el contrario, la relación de áreas del linalool es mayor en el extracto de las flores (5.9), con respecto a la de las áreas en los extractos de hojas (2.4) y tallos (0.01).

Las diferencias en la relación de las áreas del compuesto y del hexadecano (*istd*), se muestran en la **Figura 41**, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de las flores, hojas y tallos de *Ocimum sp1*. "Sígueme blanco".

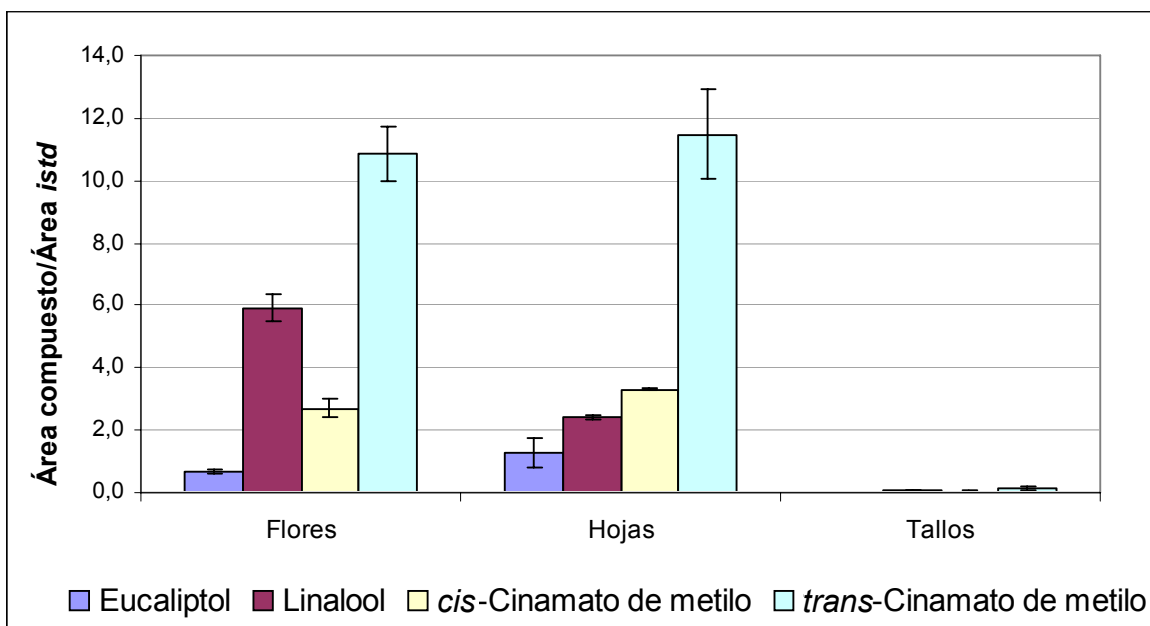


Figura 41. Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “*istd*”, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de diferentes partes de la planta de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”.

5.3 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES, OBTENIDOS POR SDE, DE HOJAS DE *OCIMUM sp1*., RECOLECTADAS EN TRES ÉPOCAS DE CULTIVO (ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DE FLORACIÓN).

La **Tabla 10**, muestra la composición química de los extractos SDE de las hojas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, recolectadas en tres épocas diferentes de crecimiento de la planta, a saber: antes, durante y después de su floración.

Tabla 10. Composición química de los extractos SDE de hojas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, obtenidos en tres diferentes épocas de cultivo.

Pico Nº	Compuestos	I _k ^a		Cantidad relativa ^b , % (n= 3)		
		DB-5	DB-WAX	FLORACIÓN		
				ANTES	DURANTE	DESPUÉS
1	<i>trans</i> -2-Hexenal +	844	1215	0.51±0.01	tr	0.87±0.07
	<i>trans</i> -3-Hexen-1-ol	846	1382			
2	α-Pineno	932	1019	0.55±0.04	0.23±0.07	0.53±0.02
3	Sabineno	975	1118	0.53±0.04	0.21±0.06	0.49±0.01
4	1-Octen-3-ol +	981	1450	1.23±0.04	0.6±0.2	1.19±0.07
	β-Pineno	983	1104			
5	β-Mirceno	990	1164	1.50±0.09	0.7±0.3	1.56±0.03
6	Limoneno	1034	1197	0.613±0.002	0.30±0.08	0.57±0.03
7	Eucaliptol (1,8-cineol)	1040	1212	7.5±0.3	5±1.4	7.9±0.3
8	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1048	1251	0.76±0.04	0.5±0.1	0.76±0.04
9	γ-Terpineno	1062	1250	0.13±0.01	tr	0.110±0.001
10	<i>trans</i> -4-Tujanol	1076	1555	0.19±0.04	-	0.31±0.04
11	α-Terpinoleno +	1090	1282	0.154±0.005	tr	0.18±0.02
	<i>cis</i> -Óxido de linalol (furanoide)	1091	1446			
12	Fenchona	1096	1400	0.86±0.06	0.50±0.05	0.94±0.05
13	Linalool	1108	1550	12.2±0.9	13.1±0.7	12.0±0.2
14	Alcanfor	1157	1525	0.40±0.03	0.26±0.03	0.31±0.02
15	δ-Terpineol	1177	1678	0.34±0.01	0.24±0.01	0.284±0.001
16	Terpinen-4-ol	1188	1608	0.27±0.02	0.31±0.02	0.233±0.002
17	α-Terpineol +	1202	1703	4.3±0.3	3.53±0.03	4.5±0.2
	Estragol	1204	1675			
18	Acetato de fenchilo	1223	1474	0.25±0.02	0.171±0.005	0.17±0.03
19	Acetato de bornilo +	1290	1591	0.30±0.02	0.16±0.01	0.216±0.003
	<i>trans</i> -Anetol	1292	1883			
20	<i>cis</i> -Cinamato de metilo	1312	1966	11.5±0.4	15.2±0.4	11.0±0.4
21	Acetato de <i>exo</i> -2-hidroxicineoico	1344	1735	0.16±0.03	tr	tr
22	Eugenol	1360	2175	0.23±0.01	0.208±0.002	0.126±0.004
23	α-Copaeno	1386	1500	0.16±0.01	0.12±0.01	0.16±0.01
24	<i>trans</i> -Cinamato de metilo	1404	2098	41±3.0	51±1.6	45.4±0.9
25	<i>cis</i> -α-Bergamoteno	1422	1528	tr	tr	0.169±0.005
26	β-Ylangeno*	1433	-	tr	0.13±0.02	tr
27	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1436	1610	0.13±0.01	0.12±0.03	0.165±0.004
28	<i>trans</i> -α-Bergamoteno +	1442	1577	1.3±0.1	0.97±0.09	1.2±0.1
	β-Copaeno	1444	-			
29	α-Guaieno	1447	1603	0.22±0.01	0.29±0.03	0.17±0.02
30	<i>trans</i> -β-Farneseno	1456	1667	0.58±0.01	0.49±0.01	0.42±0.01
31	<i>cis</i> -Muurolo-3,5-dieno*	1459	1651	0.12±0.01	0.13±0.01	0.11602±0.00002
32	α-Humuleno	1472	1684	0.76±0.07	0.50±0.03	0.86±0.04
33	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	1477	-	0.29±0.04	0.31±0.03	0.26±0.01
34	Germacreno D	1496	1723	1.27±0.09	1.12±0.05	1.36±0.07
35	Biciclogermacreno	1510	1748	0.64±0.02	0.57±0.04	0.74±0.05
36	α-Bulneseno	1514	1728	0.33±0.03	0.35±0.01	0.27±0.02
37	γ-Cadineno +	1527	1774	1.4±0.2	1.6±0.1	1.35±0.05
	δ-Cadineno	1529	1769			

Continuación, **Tabla 10**.

38	β -Sesquifelandreno + <i>trans</i> -Calameneno + Eudesma-3,7(11)-dieno*	1532 1534 1536	1778 1780 1846			
39	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1631	2082	0.22±0.03	0.16±0.02	0.17±0.01
40	τ -Cadinol	1659	2188	4.3±0.4	3.4±0.3	2.8±0.2
41	α -Cadinol*	1671	2249	0.25±0.04	0.20±0.01	0.158±0.004
42	β -Eudesmol	1675	2252	0.60±0.08	0.33±0.03	0.36±0.01
43	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄	1686	-	0.20±0.02	-	-
M: Hidrocarburos monoterpénicos				5.61	2.86	5.50
S: Hidrocarburos sesquiterpénicos				8.12	7.08	7.46
MO: Monoterpenos oxigenados ^c				25.17	21.59	24.86
SO: Sesquiterpenos oxigenados ^d				6.27	4.26	3.62
FP: Fenilpropanoides				54.97	67.84	58.73
OCO: Otros compuestos oxigenados				0.75	0.36	0.87

a. Índices de Kováts determinados experimentalmente en las columnas DB-5 y DB-WAX.

b. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos cromatográficos determinados en columna DB-5, promedio de tres extracciones para cada técnica (n= 3).

c. Óxidos, aldehídos, alcoholes y acetatos.

d. Óxidos, alcoholes y cetonas.

tr: Trazas (< 0,1 %)

* Identificado tentativamente.

Más de 40 componentes en cantidades relativas > 0.1%, fueron identificados, el componente mayoritario en los extractos SDE fue el *trans*-cinamato de metilo (41-50%).

En la **Tabla 10**, puede observarse que la cantidad relativa (%) de *trans*-cinamato de metilo fue mayor en el extracto SDE obtenido de las hojas durante la época de floración (51%), con respecto a su contenido en extractos aislados de hojas, recolectadas en las épocas antes (41%) y después de floración (45.4%).

De igual forma, se observa que la cantidad relativa del *cis*-cinamato de metilo fue mayor durante la floración (15.2%), en comparación con su contenido en la planta recolectada antes (11.5%) y después de floración (11.0%).

Para los extractos SDE obtenidos antes y después de floración, el segundo compuesto mayoritario presente fue el linalool (12%), mientras que en el extracto SDE de hojas recolectadas durante la floración, el contenido de linalool fue de 13%, siendo éste el tercer compuesto mayoritario en este caso, pues el *cis*-cinamato de metilo fue el segundo compuesto mayoritario en el extracto obtenido de plantas en floración (15.2%).

Las diferencias en la composición química de los extractos SDE de las hojas del *Ocimum sp1*. obtenidos en diferentes estados fenológicos, se muestran en la **Figura 42**, donde los resultados de la **Tabla 10**, se agruparon según las familias de compuestos identificados. Puede observarse, que no existen diferencias significativas en cuanto a la composición química; sobresale sin embargo, el aumento de la cantidad de fenilpropanoides durante la época de floración: se registra la mayor cantidad relativa (%) de *cis*- y *trans*-cinamatos de metilo, así como la disminución en un 50% de la cantidad relativa (%) de hidrocarburos monoterpénicos.

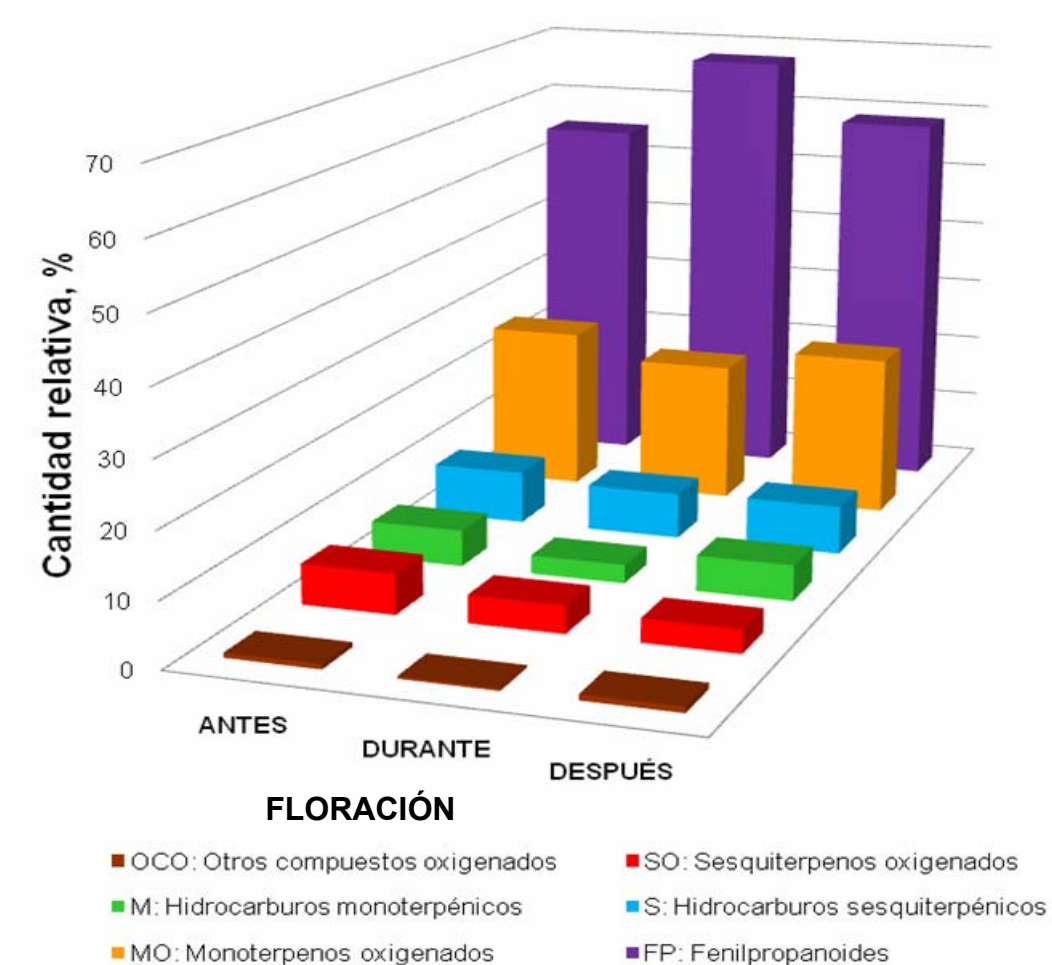


Figura 42. Distribución de las principales familias de los compuestos en los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” antes, durante y después de floración. M: Hidrocarburos monoterpénicos; S: Hidrocarburos sesquiterpénicos; MO: Monoterpenos oxigenados; SO: Sesquiterpenos oxigenados; FP: Fenilpropanoides; OCO: Otros compuestos oxigenados.

La **Tabla 11**, muestra la relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno “*istd*” (hexadecano), de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” antes, durante y después de floración.

Tabla 11. Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “*istd*”, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, obtenidos en tres diferentes épocas de cultivo.

Compuestos mayoritarios	Área compuesto/Área <i>istd</i>		
	FLORACIÓN		
	ANTES	DURANTE	DESPUÉS
Eucaliptol (1,8-cineol)	2.0±0.1	1.3±0.5	1.82±0.06
Linalool	3.3±0.2	2.4±0.1	2.6±0.1
<i>cis</i> -Cinamato de metilo	3.1±0.2	3.30±0.03	2.39±0.06
<i>trans</i> -Cinamato de metilo	11±1.0	11±1.4	10.34±0.07

Como puede observarse en la **Tabla 11**, la relación de áreas del *trans*-cinamato de metilo e *istd* es levemente mayor en los extractos SDE obtenido en las etapas antes y durante la floración (11), con respecto a la presentada en el extracto, obtenida de plantas recolectadas después de floración (10.34).

De igual forma, se observa que la relación de áreas de *cis*-cinamato de metilo e *istd* es mayor en los extractos antes (3.1) y durante la floración (3.30), en comparación con la de las áreas en el extracto obtenido después de floración (2.39).

Por el contrario, la relación de áreas del linalool e *istd* es mayor en el extracto obtenido de plantas antes de floración (3.3), con respecto a la de las áreas en los extractos durante (2.4) y después de floración (2.6).

En la **Figura 43** se muestran las diferencias de las relaciones de áreas cromatográficas del compuesto y del hexadecano (*istd*), para los componentes mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” antes, durante y después de floración.

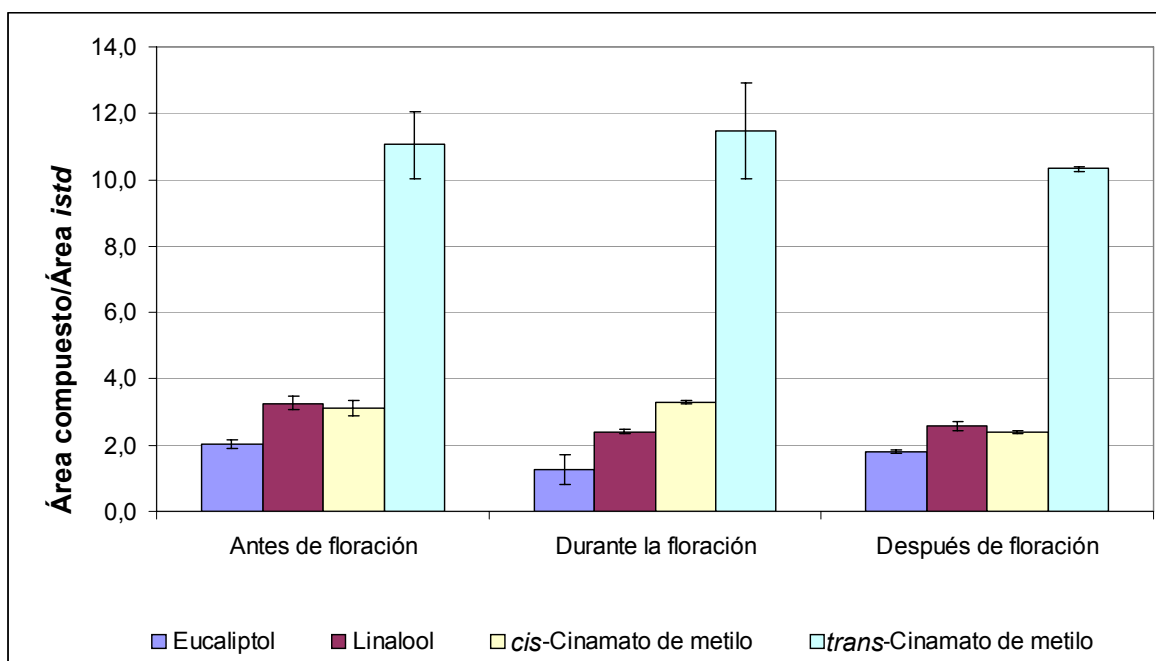


Figura 43. Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “*istd*”, para los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” recolectadas en tres diferentes épocas de cultivo.

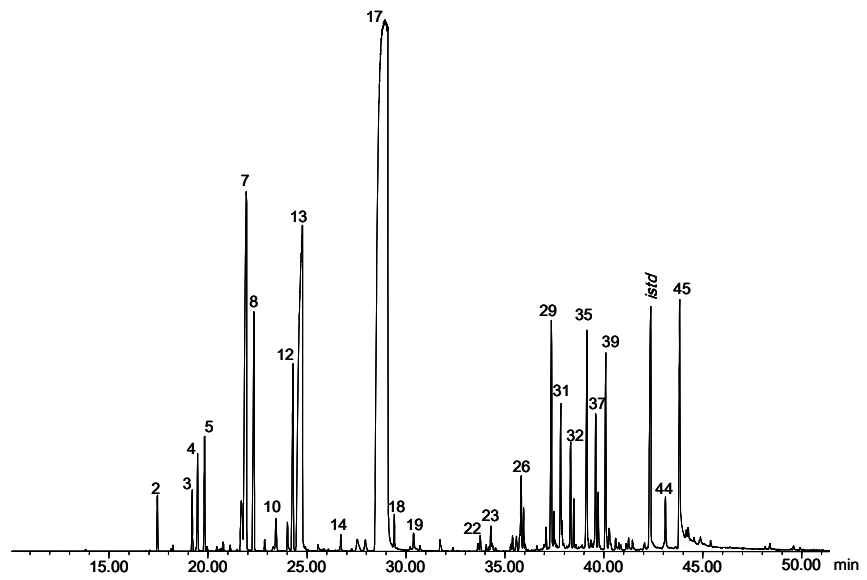
5.4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE *OCIMUM sp2*. “Sígueme morado”, OBTENIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

En la **Figura 44**, aparece la planta cultivada de *Ocimum sp2*, utilizada en el presente estudio.

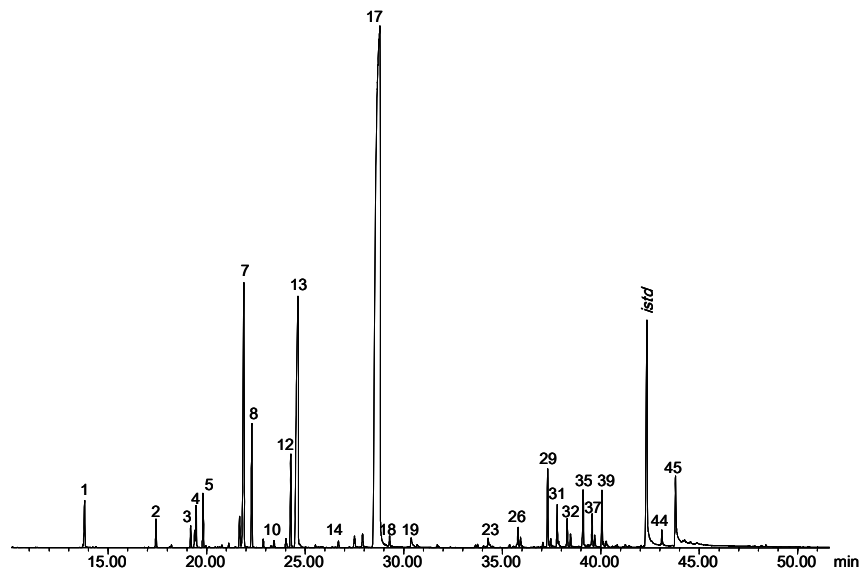


Figura 44. Planta cultivada de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, utilizada en presente estudio.

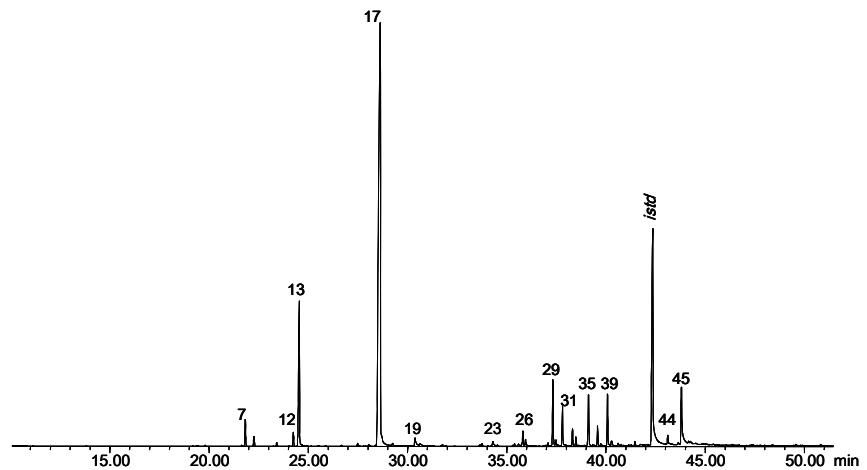
En la **Figura 45**, aparecen los perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por CG-MS, de los metabolitos secundarios volátiles aislados por MWHD, SDE, SFE de hojas de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, recolectados antes de floración. En la **Tabla 12**, se registran la composición química y las cantidades relativas (%) de los compuestos identificados en el AE y extractos SDE, SFE de hojas recolectadas antes de floración.



A



B



C

Figura 45. Cromatogramas típicos de extractos aislados de hojas de *Ocimum sp2.*, antes de su floración, por diferentes técnicas, a saber: **A.** MWHD; **B.** SDE y **C.** SFE. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD. La identificación de los picos se aparece en la **Tabla 12.**

Tabla 12. Composición química de los extractos, obtenidos por diferentes técnicas de extracción, de hojas de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, antes de su floración.

Pico a N°	Compuestos	I _k ^b		Cantidad relativa ^c , % (n= 3)		
		DB-5	DB-WAX	MWHD	SDE	SFE
1	<i>trans</i> -2-Hexenal +	846	1215			
	<i>trans</i> -3-Hexen-1-ol	848	1386	0.12±0.05	1.02±0.06	tr
2	α-Pineno	934	1018	0.42±0.02	0.55±0.03	tr
3	Sabineno	976	1118	0.46±0.02	0.40±0.04	tr
4	1-Octen-3-ol +	981	1450			
	β-Pineno	983	1104	0.81±0.02	1.06±0.05	tr
5	β-Mirceno	991	1163	0.88±0.06	0.91±0.06	tr
6	Limoneno	1035	1197	0.93±0.07	0.73±0.05	tr
7	Eucaliptol (1,8-cineol)	1038	1252	6.9±0.4	7.6±0.4	1.25±0.07
8	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1051	1245	2.8±0.2	2.3±0.2	0.04±0.09
9	γ-Terpineno	1064	1250	tr	0.154±0.002	-
10	<i>trans</i> -4-Tujanol	1077	1555	0.37±0.03	0.20±0.03	0.3±0.1
11	α-Terpinoleno	1091	1282	0.27±0.01	0.24±0.02	tr
12	Fenchona	1098	1401	2.2±0.2	2.1±0.2	0.6±0.1
13	Linalool	1109	1550	11.8±0.4	12.1±0.1	9.9370±0.0004
14	Alcanfor	1161	1525	0.16±0.01	0.14±0.01	tr
15	δ-Terpineol	1178	1678	0.279±0.005	0.28±0.02	0.1853±0.0002
16	Terpinen-4-ol	1193	1608	0.20±0.01	0.33±0.01	-
17	Estragol	1222	1680	49.7±0.3	57.5±0.4	54.7±0.4
18	Acetato de fenchilo	1231	1474	0.26±0.03	0.22±0.01	0.18±0.01
19	Chavicol	1257	2341	0.22±0.02	0.40±0.05	0.7±0.2
20	<i>p</i> -Anisaldehído	1266	2039	tr	0.16±0.01	0.25±0.06
21	Acetato de bornilo +	1292	1591			
	<i>trans</i> -Anetol	1294	1883	0.13±0.01	tr	-
22	Acetato de <i>exo</i> -2-hidroxicineoico	1345	1636	0.14±0.01	tr	0.14±0.03
23	Eugenol	1359	2175	0.28±0.03	0.29±0.01	0.3±0.3
24	α-Copaeno	1387	1503	0.132±0.005	0.079±0.002	0.13±0.02
25	Isómero de β-Elemeno +	1391	-	0.15±0.02	tr	tr
	<i>trans</i> -Cinamato de metilo	1393	2089			
26	β-Bourboneno +	1397	-	0.82±0.02	0.47±0.04	0.68±0.05
	β-Elemeno	1399	1591			
27	Metil eugenol +	1400	2015			
	β-Cubebeno*	1403	-	0.43±0.04	0.30±0.03	0.41±0.06
28	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1435	1612	0.22±0.01	tr	0.17±0.02
29	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	1444	1596	2.4±0.1	1.6±0.1	2.8±0.2
30	α-Guaieno	1447	1603	0.413±0.001	0.206±0.004	0.25±0.01
31	<i>trans</i> -β-Farneseno +	1457	1669			
	<i>cis</i> -Muurolo-3,5-dieno*	1459	1651	1.63±0.06	0.98±0.07	1.4±0.1
32	α-Humuleno	1472	1688	1.02±0.05	0.55±0.03	0.80±0.07
33	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	1477	-	0.45±0.02	0.204±0.004	0.30±0.01
34	Sesquiterpeno C ₁₅ H ₂₄ *	1489	-	0.114±0.004	-	-
35	Germacreno D	1496	1723	2.40±0.05	1.23±0.06	1.9±0.2
36	Valenceno +	1502	-	0.15±0.01	-	-
	β-Selineno*	1504	-			
37	Biciclogermacreno	1510	1744	1.24±0.03	0.69±0.03	0.90±0.09
38	α-Bulneseno	1514	1727	0.57±0.03	0.30±0.01	tr

Continuación, **Tabla 12.**

39	γ -Cadineno + δ -Cadineno	1527 1529	1773 1768			
				1.81±0.04	1.11±0.08	1.7±0.2
40	β -Sesquifelandreno + <i>trans</i> -Calameneno + 7- <i>epi</i> - α -Selineno	1533 1534 1536	1776 1780 1845			
				0.33±0.01	0.226±0.003	0.31±0.02
41	10- <i>epi</i> -Cubebol	1544	-	0.12±0.01	-	0.12±0.05
42	<i>trans</i> -Nerolidol	1566	2042	0.12±0.01	-	-
43	<i>cis</i> - α -Muurool-5-en-4-ol*	1573	-	tr	-	0.17±0.07
44	1,10-di- <i>epi</i> -Cubebol	1630	2076	0.43±0.02	0.41±0.02	0.472±0.002
45	τ -Cadinol	1659	2187	3.1±0.1	2.4±0.1	3.0±0.4
46	α -Cadinol	1670	2249	0.23±0.01	0.12±0.01	0.16±0.08
47	β -Eudesmol	1673	2251	0.50±0.01	0.19±0.02	0.17±0.08
48	Compuesto Oxigenado C ₁₅ H ₂₆ O*	1686	-	0.24±0.01	tr	-
49	α -Bisabolol	1698	2224	0.29±0.01	-	-
50	Hidrocarburo	2320	-	-	-	2.8±0.7
51	Hidrocarburo ramificado > C ₃₁ H ₆₄ *	2550	-	-	-	1.9±0.7
52	Hidrocarburo ramificado > C ₃₁ H ₆₄ *	2719	-	-	-	1.3±0.7
53	Heptacosano	2737	-	-	-	0.38±0.02
54	Escualeno	2915	-	-	-	0.99±0.03
55	Nonacosano	3078	-	-	-	0.6±0.3
M: Hidrocarburos monoterpénicos				6.9	6.6	2.2
S: Hidrocarburos sesquiterpénicos				14.4	7.9	11.7
MO: Monoterpenos oxigenados ^d				22.9	23.1	12.7
SO: Sesquiterpenos oxigenados ^e				5.4	3.4	4.1
FP: Fenilpropanoides				50.7	58.5	56.1
OCO: Otros compuestos oxigenados				0.4	1.2	2.5
H: Hidrocarburos				0.0	0.0	11.6

- Número del pico cromatográfico en la **Figura 45**.
 - Índices de Kováts determinados experimentalmente en las columnas DB-5 y DB-WAX.
 - Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en columna DB-5; promedio de tres extracciones para cada técnica (n= 3).
 - Óxidos, aldehídos, alcoholes y acetatos.
 - Óxidos, alcoholes y cetonas.
- tr: Trazas (< 0,1 %)
- * Identificado tentativamente.

Se identificaron más de 50 componentes en concentraciones relativas > 0.1%, en el AE y extractos de *Ocimum sp2*. Las composiciones químicas del AE de *Ocimum sp2*., obtenido por MWHF, y de los extractos SDE y SFE, presentaron una gran similitud, se caracterizaron por su alto contenido de fenilpropanoides (50-59%), seguidos de monoterpenos oxigenados (12-23%) e hidrocarburos sesquiterpénicos (8-15%).

El metil chavicol (estragol), fue el componente mayoritario en el AE y extractos (50-58%), seguido del linalool (Véase, **Figura 33** y **Esquema 4**) (10-12%), eucaliptol (1,8-cineol) (1-8%) (Véase, **Figura 34** y **Esquema 5**) y τ -cadinol (2-3%).

En la **Figura 46**, se presenta el espectro de masas del estragol. Las rutas de ionización disociativa por impacto de electrones a 70 eV, se observan en el **Esquema 6**. En m/z 148 se observa el ión molecular el cual, a su vez, es el ión pico de base con una intensidad máxima (100%). La pérdida de hidrógeno (H^{\cdot}) origina el catión $C_{10}H_{11}O^+$ en m/z 147 (56%), la posterior eliminación de una molécula de CH_2O genera el catión $C_9H_9^+$ en m/z 117 (31%). La pérdida del radical alquílico CH_3^{\cdot} por parte del ión molecular da como resultado el catión $C_9H_9O^+$ en m/z 133 (21%), el cual, por la eliminación de una molécula de CO , produce el fragmento $C_8H_9^+$ en m/z 105 (17%).

El catión $C_8H_9O^+$ en m/z 121 (34%), es el producto de la eliminación del radical $C_2H_3^{\cdot}$ del ión molecular, el cual, por eliminación de una molécula de CH_2O , conduce a la formación del fragmento $C_7H_7^+$ en m/z 91(16%), que posee la estructura del ión tropilio, y se disocia eliminando una molécula de C_2H_2 , a $C_5H_5^+$ en m/z 65(4%).

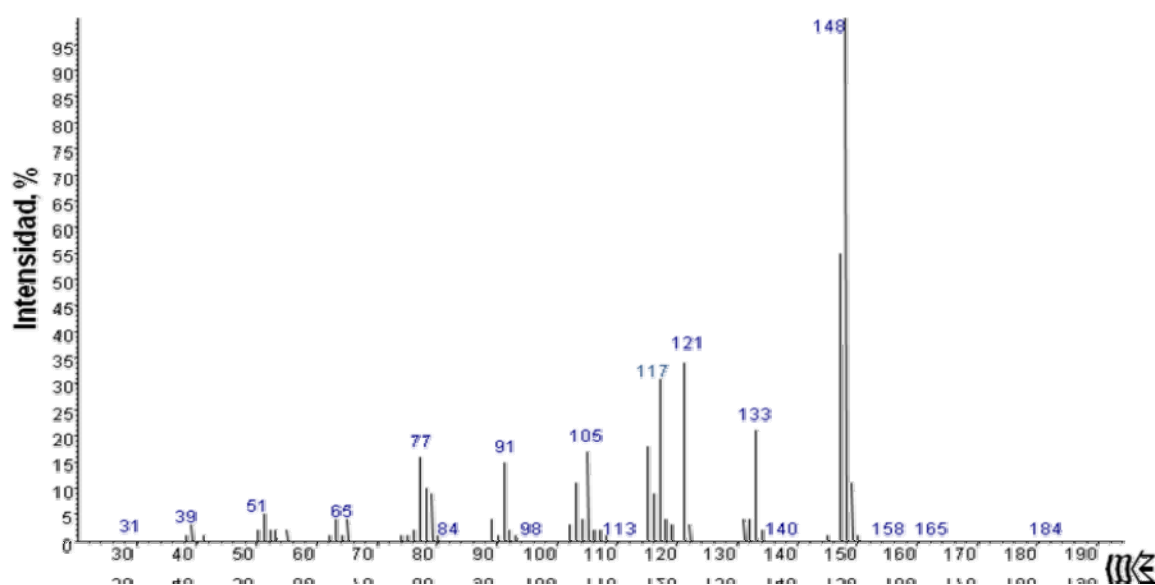
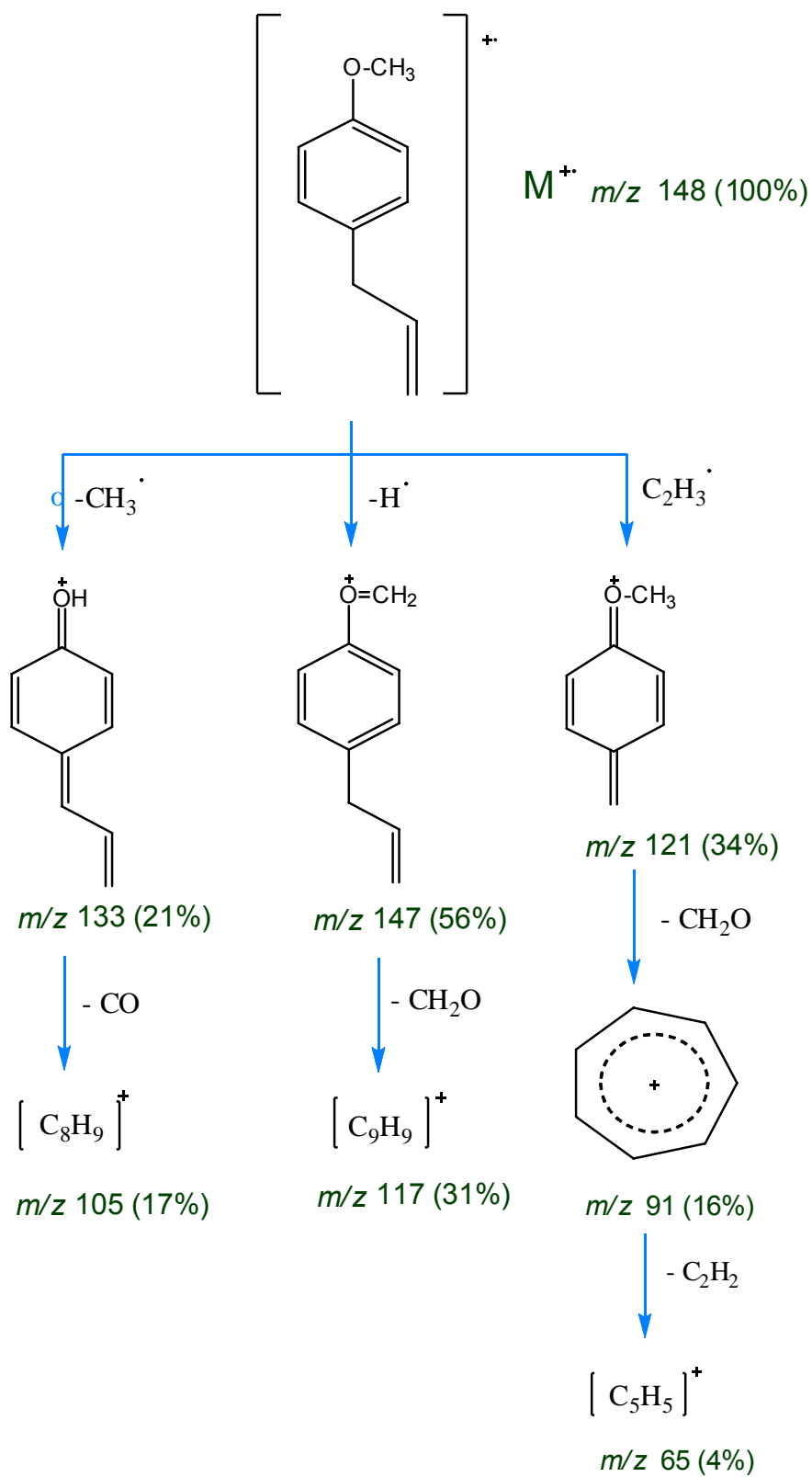


Figura 46. Espectro de masas del estragol. EI, 70 eV.

Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación del estragol.



De acuerdo con el sistema de clasificación de quimiotipos de Grayer [180], el *Ocimum sp2.*, puede clasificarse como quimiotipo: Metil chavicol (Estragol). El estragol es un compuesto comúnmente encontrado en diversas variedades de albahacas [181]. El *Ocimum sp2.* “Sígueme morado” colombiano presenta gran similitud con los quimiotipos de *Ocimum* de Egipto, los cuales presentan un alto contenido de estragol y linalool [175]. También se han reportado quimiotipos con alto contenido de estragol en Yemen, Estados Unidos, Tailandia, Ucrania [180] y Brasil [176].

Durante la extracción mediante las técnicas MWHD, SDE y SFE, la composición química de los extractos puede alterarse debido a la formación de artefactos a través de la hidrólisis y/o termo-descomposición, por esta razón, para el estudio de la fragancia natural de la planta se emplearon técnicas de *headspace* (HS) estático (S-HS) y HS-SPME, las cuales reflejan mejor el olor propio del vegetal tal como se percibe por la nariz [182]. La técnica HS-SPME incluye una etapa de extracción-concentración, por lo tanto, la composición de las fracciones volátiles obtenidas dependen del tiempo de exposición de la fibra, de su tipo y de la temperatura, entre otros parámetros, que fueron seleccionados de acuerdo con experimentos realizados previamente.

Más de 30 componentes en concentraciones relativas > 0.1 %, se encontraron en las fracciones volátiles de las hojas de *Ocimum sp2.*, obtenidas por S-HS y HS-SPME.

En la **Figura 47**, se muestran los perfiles cromatográficos típicos, de las fracciones volátiles aislados por técnicas de *headspace* (S-HS y HS-SPME) de hojas de *Ocimum sp2.* “Sígueme morado”, recolectadas antes de floración. En la **Tabla 13**, se registran los componentes identificados y sus cantidades relativas (%).

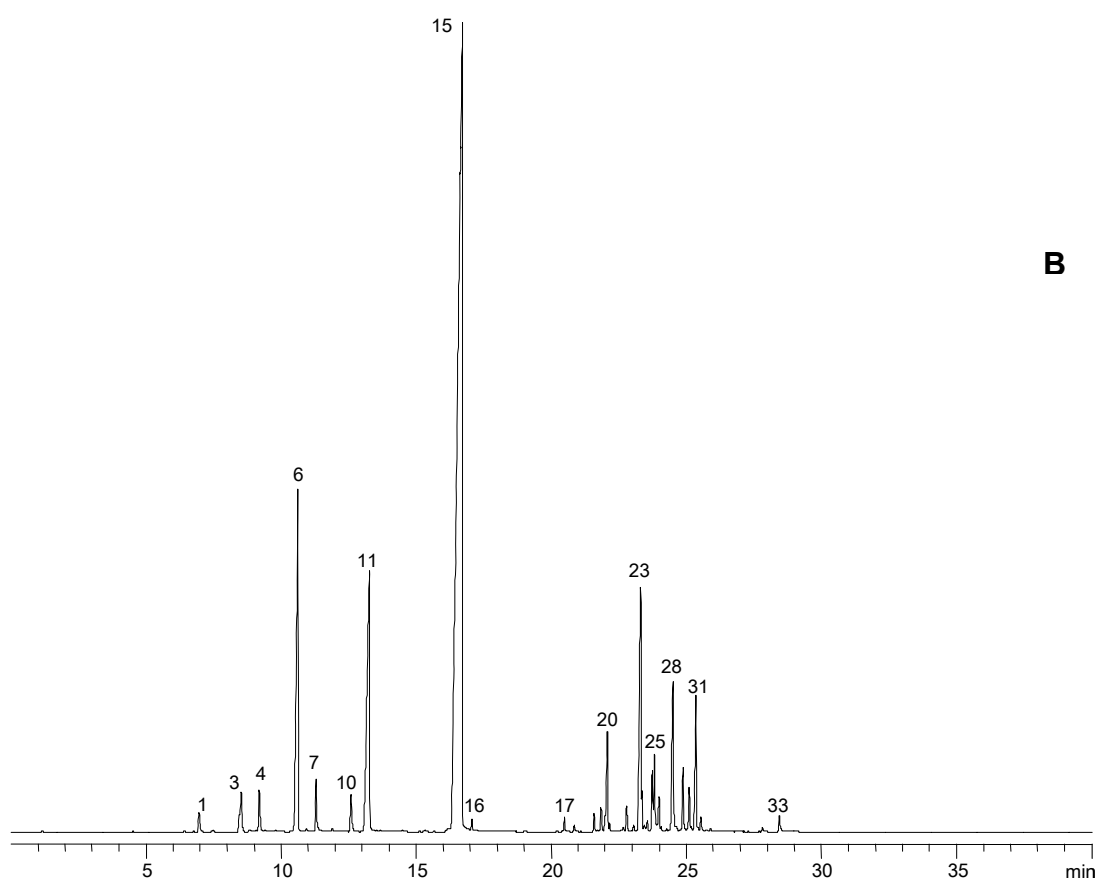
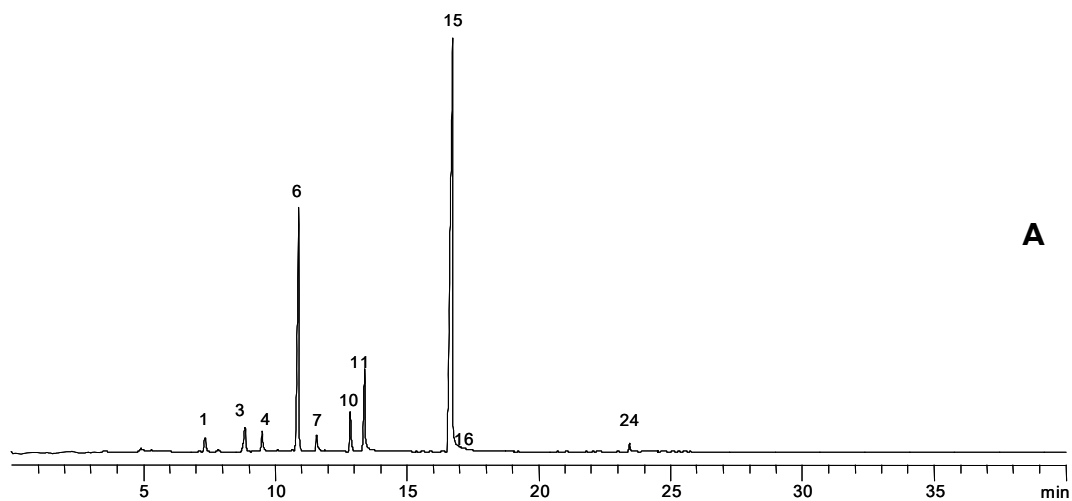


Figura 47. Cromatogramas típicos de las fracciones volátiles de *Ocimum sp2.*, obtenidas por diferentes métodos de *headspace*: **A.** S-HS y **B.** HS-SPME. Columna DB-5MS (60 m); *split* 1:30, FID. La identificación de los compuestos aparece en la **Tabla 13.**

Tabla 13. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en las fracciones volátiles de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, obtenidas por HS-SPME y S-HS.

Pico ^a Nº	Compuestos	Cantidad relativa ^b , % (n= 3)	
		HS-SPME	S-HS
1	α -Pino	0.40±0.06	1.46±0.04
2	Sabineno	tr	0.231±0.002
3	1-Octen -3-ol + β -Pino	1.0±0.2	2.7±0.2
4	β -Mirceno	0.89±0.01	1.8±0.2
5	Limoneno	tr	0.17±0.03
6	Eucaliptol (1,8-cineol)	8.4±0.2	19±2.0
7	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0.8±0.3	1.5±0.1
8	γ - Terpineno	tr	0.31±0.03
9	<i>trans</i> -4-Tujanol	0.12±0.02	0.13±0.01
10	Fenchona	1.3±0.2	0.15±0.01
11	Linalool	8.8±0.7	6.7±0.6
12	Alcanfor	tr	0.67±0.03
13	δ -Terpineol	tr	0.21±0.01
14	Terpinen-4-ol	tr	0.20±0.02
15	Estragol	63±1.2	58±2.8
16	Acetato de fenchilo	0.47±0.06	1.69±0.03
17	Acetato de <i>exo</i> -2-hidroxicineico	0.10±0.01	-
18	Eugenol	0.12±0.01	tr
19	α -Copaeno	0.26±0.05	tr
20	β -Elemeno	0.8±0.3	-
21	<i>cis</i> - α -Bergamoteno	0.12±0.02	tr
22	<i>trans</i> - β -Cariofileno	0.42±0.06	tr
23	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	3.7±0.6	-
24	α -Guaieno	0.13±0.03	0.71±0.08
25	α -Humuleno	1.02±0.01	-
26	<i>trans</i> - β -Farneseno	1.32±0.08	-
27	<i>cis</i> -Muurola-4(14),5-dieno	0.32±0.06	0.14±0.01
28	Germacreno D	1.45±0.09	0.13±0.01
29	Biclogermacreno	0.50±0.07	tr
30	α -Bulneseno	0.34±0.07	0.1414±0.0001
31	γ -Cadineno	1.2±0.4	tr
32	β -Sesquifelandreno	0.18±0.05	0.15±0.01
33	τ -Cadinol	0.12±0.03	-
M: Hidrocarburos monoterpénicos		3.3	8.2
S: Hidrocarburos sesquiterpénicos		11.8	1.5
MO: Monoterpenos oxigenados ^c		19.3	28.7
SO: Sesquiterpenos oxigenados ^d		0.2	0.0
FP: Fenilpropanoides		62.7	58.4

- a. Número del pico en la **Figura 47**.
 - b. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna DB-5; promedio de tres extracciones para cada técnica (n=3).
 - c. Óxidos, aldehídos, alcoholes y acetatos.
 - d. Óxidos, alcoholes y cetonas.
- tr* : Trazas.

Como se puede observar en la **Tabla 13**, el número de componentes aislados por los métodos de *headspace* es menor que el obtenido por las técnicas extractivas (**Tabla 12**). En las fracciones volátiles de las hojas de *Ocimum sp2.*, el estragol (58-63%), fue el compuesto que se extrajo en mayor proporción.

Con la técnica S-HS se aislaron predominantemente, excluyendo el componente mayoritario, los compuestos más volátiles: hidrocarburos monoterpénicos y sus análogos oxigenados, y mediante la técnica HS-SPME se obtuvieron, en mayor proporción, los hidrocarburos sesquiterpénicos. Para el S-HS, los componentes mayoritarios fueron el estragol (58%), eucaliptol (1,8-cineol) (19%) y linalool (6.7%); para HS-SPME los compuestos mayoritarios fueron los mismos en cantidades relativas de 63, 8.8 y 8.4%, respectivamente.

En la **Figura 48**, se ilustran las diferencias en la composición química del AE, extractos (SDE y SFE) y las fracciones volátiles (S-HS y HS-SPME), de acuerdo con las familias de compuestos aislados mediante las cinco (5) técnicas de extracción (**Tablas 12 y 13**). Los fenilpropanoides (particularmente, estragol), predominaron como familia de compuestos para todas las técnicas de extracción; la mejor recuperación de hidrocarburos monoterpénicos y sus análogos oxigenados se obtuvo usando técnicas S-HS, seguida de las de MWHD y SDE; mediante SFE se pudo aislar también un porcentaje importante de hidrocarburos sesquiterpénicos (S) e hidrocarburos (H).

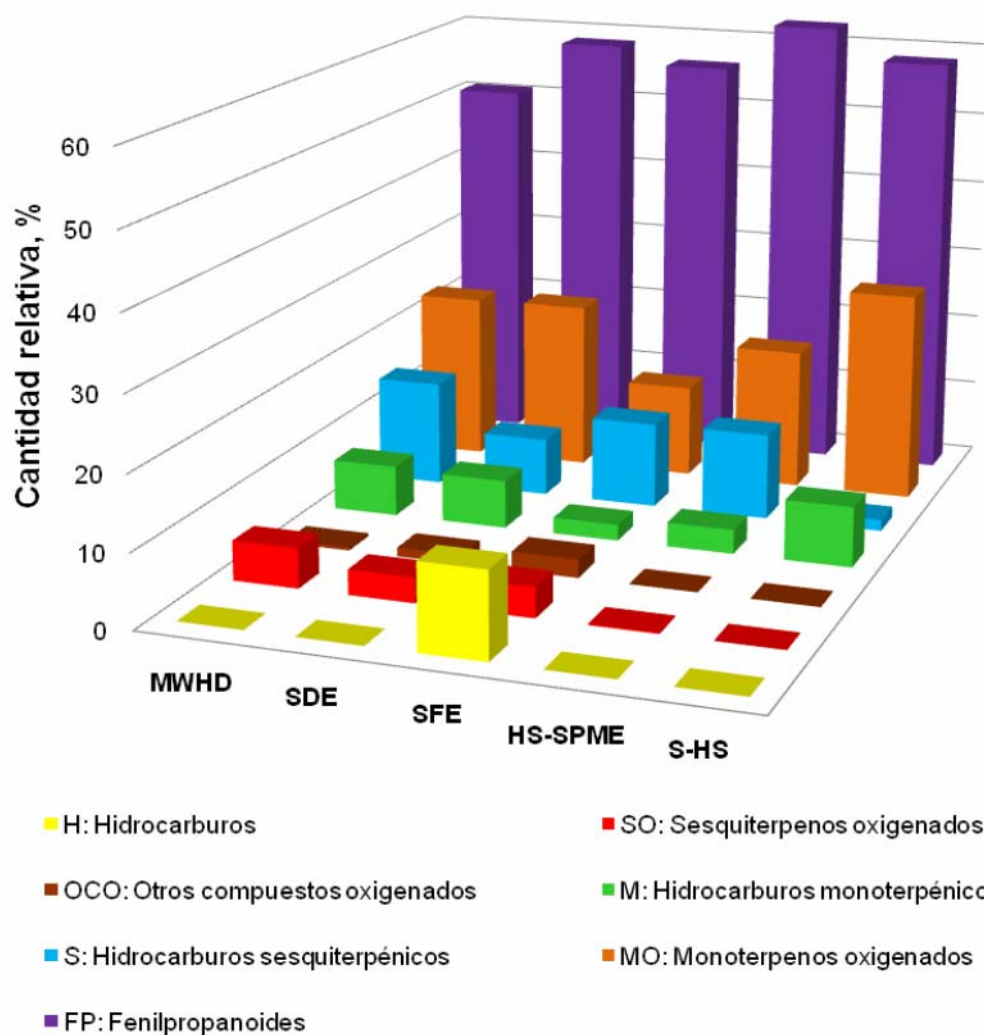


Figura 48. Distribución de las principales familias de los compuestos en el aceite esencial, extractos y fracciones volátiles de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, obtenidos por diferentes técnicas de extracción, a saber: fenilpropanoides (FP), hidrocarburos monoterpénicos (M), monoterpénos oxigenados (MO), hidrocarburos sesquiterpénicos (S), sesquiterpenos oxigenados (SO), hidrocarburos (H) y otros compuestos oxigenados (OCO).

La composición de los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles del *Ocimum sp2*, se estudió mediante la técnica de análisis de *clusters*, utilizando distancias euclidianas completas (*Software* STATISTICA, Versión 6.0, StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.), con el fin de apreciar el efecto de la técnica de extracción sobre la composición final del extracto.

Para el “Sígueme morado” (*Ocimum sp.2*) (Figura 49), el dendograma de *clusters* muestra una relación entre las técnicas MWHD, SDE y HS-SPME, más cercana que las demás técnicas, *i.e.* SFE y S-HS. Todas las técnicas de extracción se caracterizaron por el aislamiento de un alto contenido de fenilpropanos (FP) y monoterpenos oxigenados (MO), mostrando, sin embargo, las diferencias en cuanto a la relación entre ellos.

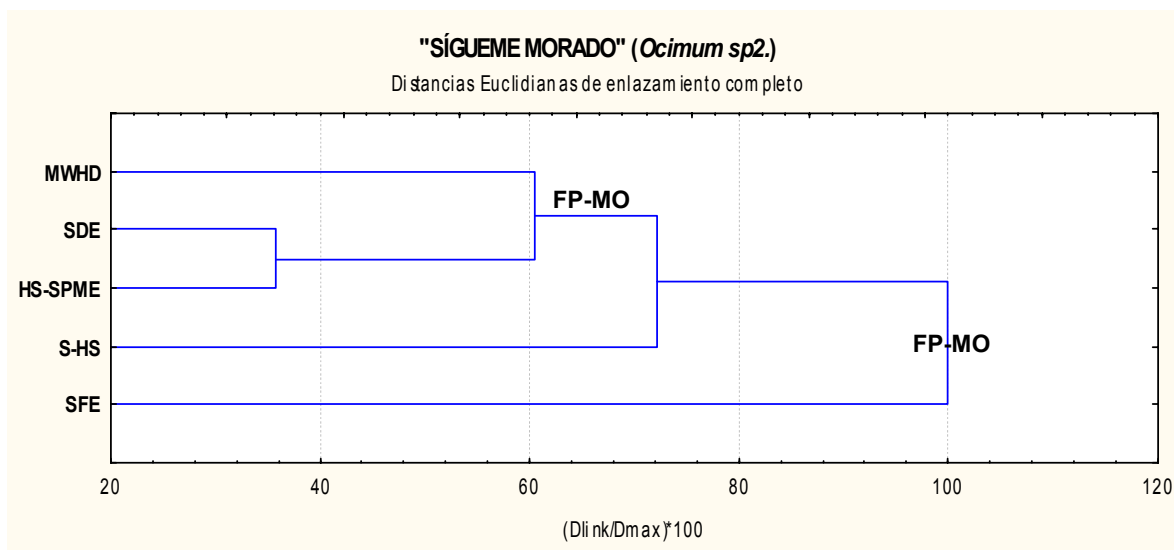


Figura 49. Dendrograma de *clusters* para metabolitos secundarios de *Ocimum sp2.*, obtenidos por diferentes técnicas de extracción.

Para apreciar mejor el efecto del método de extracción sobre la composición final obtenida, las composiciones relativas de fracciones volátiles, obtenidas por diferentes técnicas extractivas (MWHD, SDE y SFE) y de *headspace* (S-HS, HS-SPME), se compararon por medio del análisis estadístico de Componentes Principales (PCA, STATISTICA, Versión 6.0, StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). La matriz utilizada para el estudio estaba formada por 5 casos, que correspondían al número de técnicas extractivas utilizadas y por 7 variables, que representaban los grupos de familias de compuestos obtenidos mediante cada técnica.

El resultado del análisis estadístico, señala que el 85% de la información de las **Tablas 12 y 13**, puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (los componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las cantidades relativas de los componentes presentes en el AE, extractos y fracciones volátiles. Como se observa en la **Figura 50**, el Factor 1, representa el 61% de la información y se encuentra conformado por los monoterpenos oxigenados (45%), hidrocarburos (25%), e hidrocarburos sesquiterpénicos (18%). El Factor 2, constituye el 24% y está constituido por fenilpropanoides (52%), hidrocarburos sesquiterpénicos (21%) y sesquiterpenos oxigenados (11%) (Véase **Anexo 2-Tabla 2**).

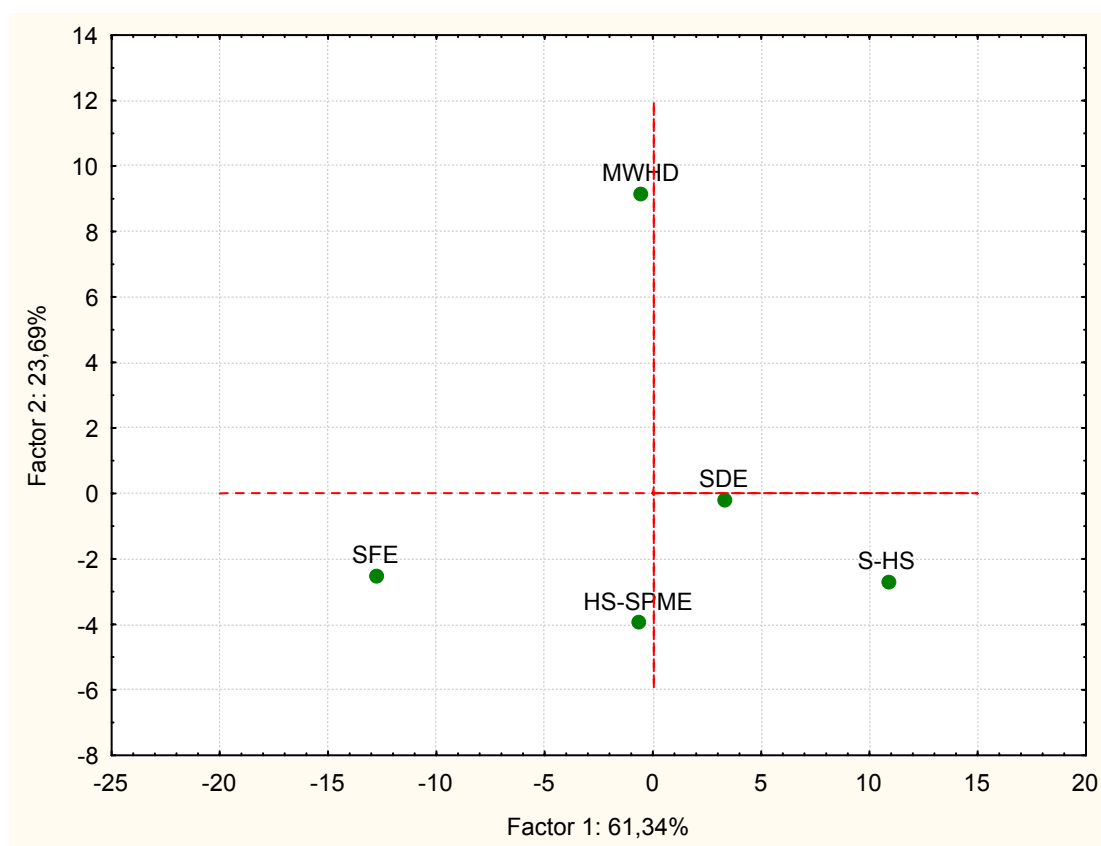


Figura 50. Análisis de componentes principales (PCA) de las cantidades relativas (%) de las mezclas de compuestos volátiles y semivolátiles, aisladas de las plantas de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, por diferentes métodos de extracción.

En la **Figura 50**, se registra la representación gráfica de las composiciones relativas (%) de las fracciones volátiles y semivolátiles, aisladas de las plantas de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, por diferentes métodos de extracción. Debido a la dispersión presentada por los puntos, no pueden identificarse grupos de técnicas que posean una relación clara entre ellos, así como se observó para el caso del “Sígueme blanco” (Véase **Figura 38**). El desplazamiento hacia la derecha en la gráfica, muestra un aumento en la cantidad relativa (%) de monoterpenos oxigenados extraídos por cada técnica.

Se observa, que los puntos ubicados cerca al eje de las ordenadas (HS-SPME, SDE y MWHD), se encuentran relacionados por la cantidad relativa de monoterpenos oxigenados e hidrocarburos sesquiterpénicos, pero las distancias euclidianas son grandes como consecuencia del mayor contenido de fenilpropanoides (63%), extraídos mediante la técnica de *headspace*, comparado con la técnica destilativa (51%). Esto como consecuencia, ya que para el “Sígueme morado”, su compuesto mayoritario estragol es más volátil (Temperatura de ebullición 214°C), en comparación con el cinamato de metilo (Temperatura de ebullición 261°C) presente en el “Sígueme blanco”, lo cual, lo hace mucho más susceptible a ser recuperado mediante técnicas de *headspace*, a diferencia de la recuperación deficiente presentada por el cinamato de metilo mediante el uso de estas técnicas. Los desplazamientos hacia arriba en el *Factor 2* están relacionados con una disminución del contenido de fenilpropanoides en la mezcla.

5.5 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES OBTENIDOS POR SDE, DE FLORES, HOJAS Y TALLOS DE *OCIMUM sp2*.

En la **Tabla 14**, se registran los componentes extraídos e identificados por SDE/GC-MS de las flores, hojas y tallos de *Ocimum sp2*. En la **Figura 51**, aparecen los perfiles cromatográficos de los metabolitos secundarios volátiles aislados por SDE.

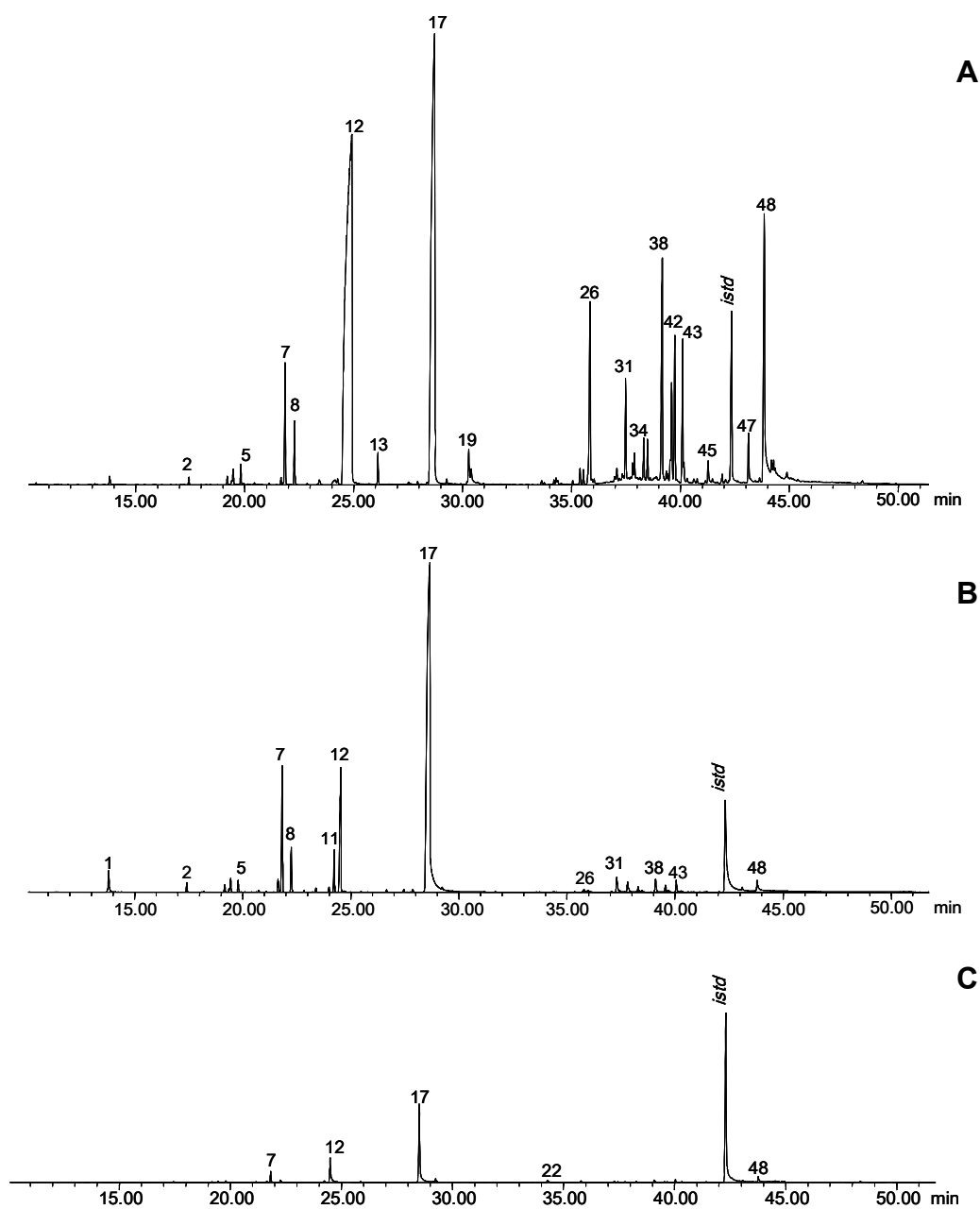


Figura 51. Cromatogramas típicos de metabolitos secundarios volátiles obtenidos por SDE, de diferentes partes de planta de *Ocimum sp2*: **A.** FLORES; **B.** HOJAS y **C.** TALLOS. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Composición química de los extractos obtenidos por SDE, de diferentes partes de la planta de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”.

Pico a Nº	Compuestos	I _k ^b		Cantidad relativa ^c , % (n= 3)		
		DB-5	DB-WAX	FLORES	HOJAS	TALLOS
1	<i>trans</i> -2-Hexenal + <i>trans</i> -3-Hexen-1-ol	845 847	1212 1385	0.1518±0.0005	0.54±0.02	-
2	α-Pineno	933	1017	0.14±0.01	0.56±0.08	-
3	Sabineno	975	1118	0.13±0.01	0.44±0.06	-
4	1-Octen-3-ol + β-Pineno	980 982	1448 1102	0.32±0.03	0.9±0.1	-
5	β-Mirceno	990	1161	0.28±0.01	0.84±0.01	-
6	Limoneno	1034	1197	0.14±0.02	0.8±0.1	-
7	Eucaliptol (1,8-cineol)	1038	1207	2.2±0.2	7.5±0.6	5.6±0.2
8	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1048	1249	1.17±0.08	1.8±0.3	-
9	<i>trans</i> -4-Tujanol	1075	1555	0.13±0.01	0.23±0.01	-
10	α-Terpinoleno	1090	1282	0.24±0.01	0.272±0.001	-
11	Fenchona	1095	1397	0.13±0.01	1.9±0.3	-
12	Linalool	1112	1545	35.6±0.5	14.3±0.9	14±6.3
13	<i>trans</i> -Miróxido	1142	-	0.33±0.03	-	-
14	Alcanfor	1157	1525	-	0.15±0.01	-
15	δ-Terpineol	1177	1678	tr	0.28±0.02	-
16	Terpinen-4-ol	1189	1608	tr	0.26±0.02	-
17	Estragol	1210	1676	25.34±0.03	55.3±0.5	56±4.3
18	Acetato de fenchilo	1225	1474	0.15±0.01	0.18±0.01	tr
19	Acetato de linalilo + Geraniol	1250 1252	1559 -	0.63±0.07	-	-
20	Chavicol	1255	2341	0.42±0.02	0.36±0.04	-
21	δ-Elemeno + Acetato de epoxi-α-terpenilo*	1341 1342	1488 -	0.111±0.001	-	-
22	Eugenol	1358	2175	0.124±0.003	0.27±0.06	8±1.5
23	Compuesto oxigenado, C ₁₂ H ₂₀ O ₃ *	1360	-	0.12±0.01	-	-
24	α-Copaeno	1386	1503	0.29±0.01	0.112±0.001	-
25	α-Elemeno	1390	-	0.24±0.01	-	-
26	β-Bourboneno + β-Elemeno	1395 1401	- 1591	2.4±0.3	0.6±0.1	-
27	Metil eugenol	1402	2015	1.2±0.3	0.26±0.01	-
28	β-Ylangeno*	1431	-	0.11±0.02	-	-
29	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1440	1612	0.23±0.01	0.105±0.003	-
30	<i>trans</i> -α-Bergamoteno + β-Gurjuneno	1441 1443	1596 -	0.27±0.02	1.5±0.2	-
31	α-Guaieno	1446	1590	1.62±0.05	0.22±0.02	-
32	<i>trans</i> -β-Farneseno + <i>cis</i> -Muuro-la-3,5-dieno*	1453 1455	1667 1651	0.57±0.04	1.07±0.09	-
33	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄ *	1458	-	0.58±0.04	-	-
34	α-Humuleno	1470	1685	0.67±0.04	0.55±0.04	-
35	<i>cis</i> -Muuro-la-4(14),5-dieno	1475	-	0.66±0.05	0.346±0.004	-
36	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄ *	1485	-	0.20±0.01	-	-
37	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄ *	1487	-	0.16±0.02	-	-
38	Germacreno D	1495	1720	4.5±0.3	1.7±0.2	-
39	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄ *	1501	-	0.19±0.01	-	-

Continuación, **Tabla 14.**

40	β -Selineno*	1503	-	0.15±0.01	-	-
41	Biciclogermacreno	1508	1746	1.8±0.1	0.9±0.2	-
42	α -Bulneseno	1514	1727	2.5±0.2	0.44±0.09	-
43	γ -Cadineno +	1526	1771	2.4±0.2	1.71±0.04	tr
	δ -Cadineno	1528	1766			
44	β -Sesquifelandreno +	1532	1776	0.12±0.01	0.27±0.04	-
	<i>trans</i> -Calameneno*	1534	1780			
45	<i>trans</i> -Nerolidol	1565	2042	0.43±0.04	-	-
46	Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₆ O*	1586	-	0.165±0.003	-	-
47	1,10- <i>di-epi</i> -Cubenol	1630	2076	0.95±0.07	0.56±0.08	-
48	τ -Cadinol	1658	2187	6.6±0.4	4.1±0.2	14±1.4
49	α -Cadinol	1670	2249	0.45±0.02	0.24±0.01	-
50	β -Eudesmol	1673	2251	0.43±0.01	0.45±0.08	-
51	Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₆ O*	1676	-	0.5±0.1	-	-
52	α -Bisabolol*	1697	2224	0.14±0.01	-	-
M: Hidrocarburos monoterpénicos				2.50	6.01	0.00
S: Hidrocarburos sesquiterpénicos				20.24	9.66	1.46
MO: Monoterpenos oxigenados ^d				39.66	25.06	21.03
SO: Sesquiterpenos oxigenados ^e				10.10	5.60	13.57
FP: Fenilpropanoides				27.08	56.19	63.94
OCO: Otros compuestos oxigenados				0.24	0.73	0.00

a. Número del pico en la **Figura 51**.

b. Índices de Kováts determinados experimentalmente en las columnas DB-5 y DB-WAX.

c. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en columna DB-5; promedio de tres extracciones para cada técnica (n= 3).

d. Óxidos, aldehídos, alcoholes y acetatos.

e. Óxidos, alcoholes y cetonas.

tr Trazas (< 0,1 %)

* Identificado tentativamente.

Como se puede observar en la **Tabla 14** y en la **Figura 51**, el número de componentes aislados por SDE de *Ocimum sp2.*, aumentan en el siguiente orden: 51 (flores) > 37 (hojas) > 7 (tallos).

Las flores de *Ocimum sp2.* "Sígueme morado" se caracterizan por poseer como compuesto mayoritario el linalool (35.6%), seguido del estragol (25.34%). En las hojas, el componente mayoritario fue el estragol (55.3%), seguido del linalool (14.3%) y eucaliptol (1,8-cineol) (7.5%). Los tallos contienen compuestos mayoritarios el estragol (56%), linalool (14%), τ -cadinol (14%), eugenol (8%) y eucaliptol (1,8-cineol) (5.6%).

En la **Figura 52**, se muestran las diferencias de la composición química de los extractos SDE, obtenidos de flores, hojas y tallos de *Ocimum sp2.*, de acuerdo con las familias de compuestos, registradas en la **Tabla 14**.

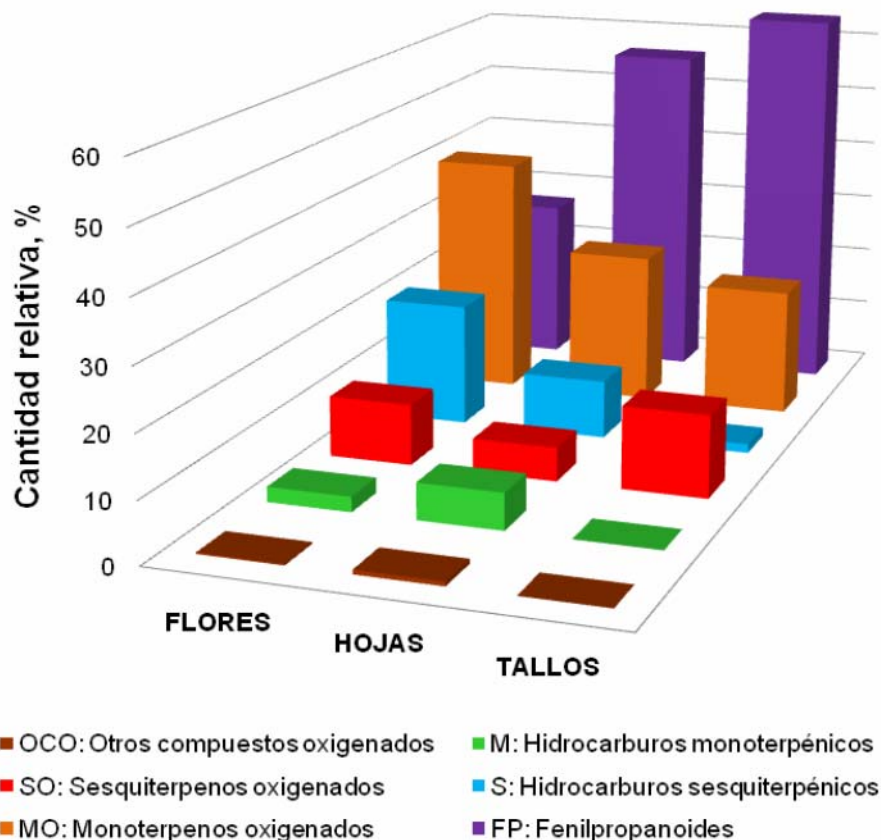


Figura 52. Distribución de las principales familias de los compuestos en los extractos SDE, obtenidos de las flores, hojas y tallos de *Ocimum sp2.* “Sígueme morado”. M: Hidrocarburos monoterpénicos; S: Hidrocarburos sesquiterpénicos; MO: Monoterpenos oxigenados; SO: Sesquiterpenos oxigenados; FP: Fenilpropanoides; OCO: Otros compuestos oxigenados.

Los fenilpropanoides (compuesto mayoritario, estragol), representan entre 56 y 60% de los compuestos obtenidos por SDE, de hojas y tallos, respectivamente; mientras que en las flores sólo representan un 27%, pero se observa una mayor proporción de monoterpenos oxigenados e hidrocarburos sesquiterpénicos, *i.e.* 39.66 y 20.24%, respectivamente; en comparación con su contenido en los extractos obtenidos por SDE de hojas (25.06 y 9.66%) y tallos (21.03 y 1.46%), respectivamente.

La **Tabla 15**, muestra la relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno “*istd*” (hexadecano), de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de las flores, hojas y tallos de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”. La relación de áreas de estragol e *istd* es mayor en el extracto SDE, obtenido de las hojas (10), con respecto a la de las áreas en extractos de flores (7.7) y tallos (0.3).

Tabla 15. Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “*istd*”, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, obtenidos de diferentes partes de la planta.

Compuestos mayoritarios	Área compuesto/Área <i>istd</i>		
	FLORES	HOJAS	TALLOS
Eucaliptol (1,8-cineol)	0.75±0.01	1.4±0.3	0.03±0.02
Linalool	10.3±0.9	2.6±0.2	0.08±0.08
Estragol	7.7±0.4	10±1.7	0.3±0.2

Para el linalool, se presenta un aumento en la relación de las áreas del extracto SDE de las flores (10.3), con respecto a la de las áreas de los extractos de hojas (2.6) y tallos (0.08).

La relación de áreas del eucaliptol (1,8-cineol) es mayor en el extracto SDE obtenido de las hojas (1.4), con respecto a la de las áreas en los extractos de flores (0.75) y tallos (0.03).

Las diferencias en la relación del área cromatográfica del compuesto y del hexadecano (*istd*), se muestran en la **Figura 53**, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de las flores, hojas y tallos de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”.

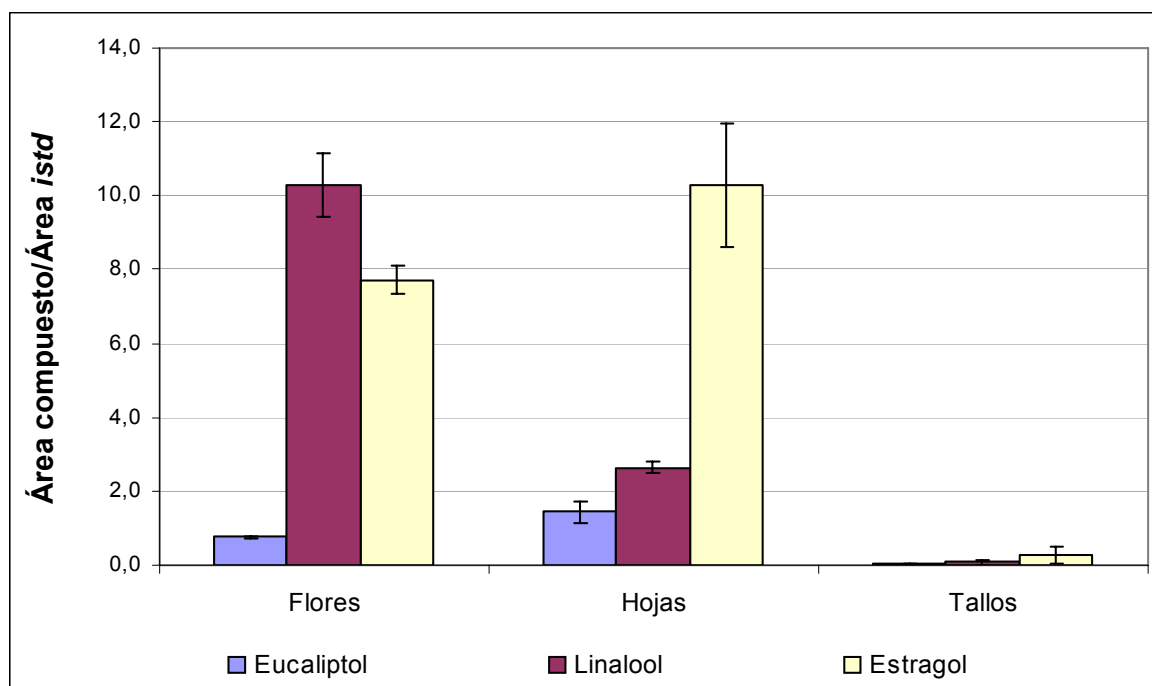


Figura 53. Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “*istd*”, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de diferentes partes de la planta de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”.

5.6 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES, OBTENIDOS POR SDE, DE HOJAS DE *OCIMUM sp2*., RECOLECTADAS EN TRES ÉPOCAS DE CULTIVO (ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DE FLORACIÓN).

En la **Tabla 16**, se registra la composición química de los extractos SDE, obtenidos de hojas de *Ocimum sp2*., recolectadas antes, durante y después de su floración.

Tabla 16. Composición química de los extractos SDE de hojas de *Ocimum sp2.*, obtenidos de plantas recolectadas en tres diferentes épocas de crecimiento.

Pico Nº	Compuestos	I _k ^a		Cantidad relativa ^b , % (n= 3)		
		DB-5	DB-WAX	FLORACIÓN		
				ANTES	DURANTE	DESPUÉS
1	<i>trans</i> -2-Hexenal + <i>trans</i> -3-Hexen-1-ol	844 846	1212 1385	1.02±0.06	0.54±0.02	2.2±0.1
2	α-Pineno	932	1017	0.55±0.03	0.56±0.08	0.51±0.04
3	Sabineno	974	1118	0.40±0.04	0.44±0.06	0.374±0.002
4	1-Octen-3-ol + β-Pineno	979 981	1448 1102	1.06±0.05	0.9±0.1	0.99±0.09
5	β-Mirceno	989	1161	0.91±0.06	0.84±0.01	0.64±0.04
6	Limoneno	1033	1197	0.73±0.05	0.8±0.1	0.79±0.05
7	Eucaliptol (1,8-cineol)	1038	1207	7.6±0.4	7.5±0.6	7.6±0.2
8	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1048	1249	2.3±0.2	1.8±0.3	2.3±0.2
9	γ- Terpineno	1061	1250	0.154±0.002	0.13±0.01	tr
10	<i>trans</i> -4-Tujanol	1075	1555	0.20±0.03	0.23±0.01	0.23±0.02
11	α-Terpinoleno	1089	1282	0.24±0.02	0.272±0.001	0.27±0.02
12	Fenchona	1095	1397	2.1±0.2	1.9±0.3	2.7±0.08
13	Linalool	1104	1545	12.1±0.1	14.3±0.9	6.5±0.7
14	Alcanfor	1156	1525	0.14±0.01	0.15±0.01	0.15±0.01
15	δ-Terpineol	1176	1678	0.28±0.02	0.28±0.02	0.24±0.02
16	Terpinen-4-ol	1187	1608	0.33±0.01	0.26±0.02	0.237±0.005
17	Estragol	1209	1676	57.5±0.4	55.3±0.5	65.8±0.2
18	Acetato de fenchilo	1223	1474	0.22±0.01	0.18±0.01	0.34±0.03
19	Chavicol	1253	2341	0.40±0.05	0.36±0.04	-
20	<i>p</i> -Anisaldehído	1262	2039	0.16±0.01	0.1940±0.0004	-
21	Eugenol	1359	2175	0.29±0.01	0.27±0.06	-
22	α-Copaeno	1385	1503	tr	0.112±0.001	-
23	β-Bourboneno + β-Elemeno	1395 1397	- 1591	0.47±0.04	0.6±0.1	0.38±0.07
24	Metil eugenol + β-Cubebeno*	1400 1403	2015 -	0.30±0.03	0.26±0.01	0.33±0.04
25	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1433	1612	tr	0.105±0.003	-
26	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	1440	1590	1.6±0.1	1.5±0.2	1.5±0.2
27	α-Guaieno	1446	1603	0.206±0.004	0.22±0.02	-
28	<i>trans</i> -β-Farneseno + <i>cis</i> -Muurolo-3,5-dieno*	1455 1460	1667 1651	0.98±0.07	1.07±0.09	0.95±0.09
29	α-Humuleno	1469	1685	0.55±0.03	0.55±0.04	0.59±0.06
30	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	1474	-	0.204±0.004	0.346±0.004	tr
31	Germacreno D	1493	1720	1.23±0.06	1.7±0.2	1.2±0.1
32	Biciclogermacreno	1509	1746	0.69±0.03	0.9±0.2	0.52±0.03
33	α-Bulneseno	1513	1727	0.30±0.01	0.44±0.09	tr
34	γ-Cadineno + δ-Cadineno	1525 1528	1771 1766	1.11±0.08	1.71±0.04	0.80±0.03
35	β-Sesquifelandreno + <i>trans</i> -Calameneno + 7- <i>epi</i> -α-Selineno	1531 1533 1536	1776 1780 1845	0.226±0.003	0.27±0.04	tr
36	1,10- <i>di-epi</i> -Cubenol	1629	2076	0.41±0.02	0.56±0.08	0.30±0.01
37	τ-Cadinol	1655	2184	2.4±0.1	4.1±0.2	1.03±0.05

Continuación, **Tabla 16.**

38	α -Cadinol	1669	2249	0.12±0.01	0.24±0.01	-
39	β -Eudesmol	1673	2251	0.19±0.02	0.45±0.08	-
<hr/>						
M:	Hidrocarburos monoterpénicos			6.55	6.01	6.05
S:	Hidrocarburos sesquiterpénicos			7.89	9.66	6.57
MO:	Monoterpenos oxigenados ^c			23.15	25.06	18.16
SO:	Sesquiterpenos oxigenados ^d			3.44	5,60	1.34
FP:	Fenilpropanoides			58.45	56.19	66.11
OCO:	Otros compuestos oxigenados			1.18	0.73	2.2

a. Índices de Kováts determinados experimentalmente en las columnas DB-5 y DB-WAX.

b. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en columna DB-5; promedio de tres extracciones para cada técnica (n= 3).

c. Óxidos, aldehídos, alcoholes y acetatos.

d. Óxidos, alcoholes y cetonas.

tr Trazas (< 0,1 %)

* Identificado tentativamente.

En la **Tabla 16**, puede observarse, que la cantidad relativa (%) del estragol es mayor en el extracto SDE obtenido de las hojas, recolectadas después de floración de la planta (65.8%), con respecto a su cantidad en extractos, aislados de hojas, antes (57.5%) y durante la floración (55.3%).

De igual forma, se observa, que la cantidad relativa (%) del linalool es mayor en la época durante la floración (14.3%), en comparación con la obtenida antes (12.1%) y después de floración (6.5%).

Las diferencias en la composición química de los extractos SDE, obtenidos de las hojas del *Ocimum sp2.*, en diferentes etapas fenológicas, se muestran en la **Figura 54**, donde los datos de la **Tabla 16**, se agruparon según las familias de compuestos identificados. Puede observarse, que sobresale, el aumento de la cantidad de fenilpropanoides después de floración, se registra la mayor cantidad relativa del estragol, lo cual contrasta con una disminución en la cantidad relativa de linalool, ca. en 50 %.

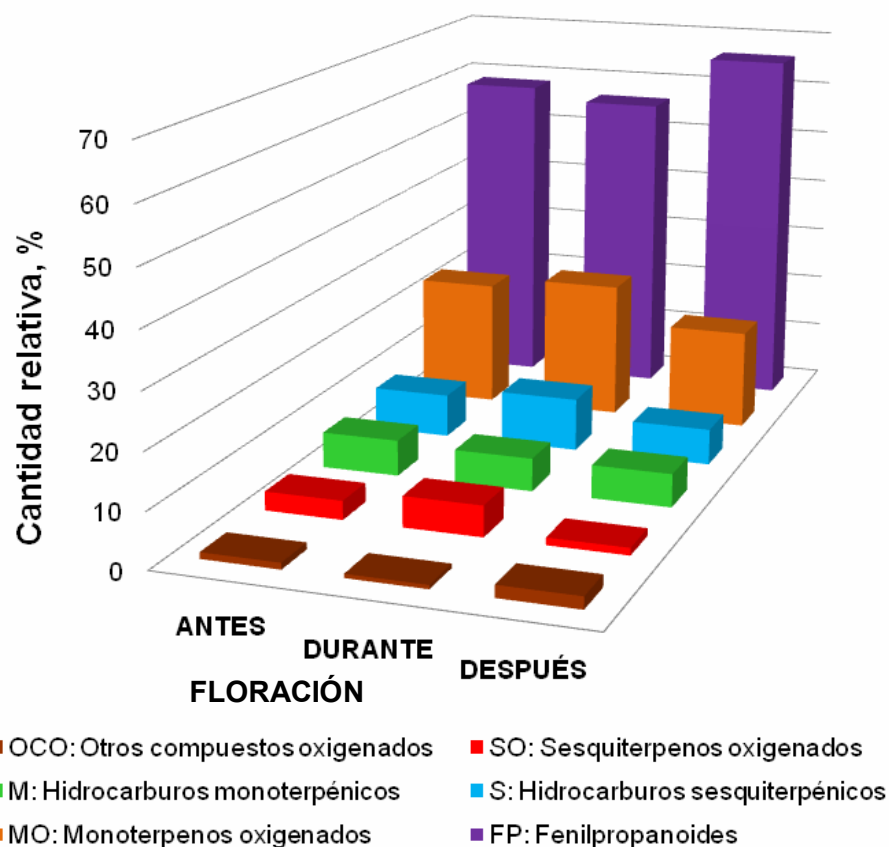


Figura 54. Distribución de las principales familias de los compuestos en los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, recolectadas antes, durante y después de floración. M: Hidrocarburos monoterpénicos; S: Hidrocarburos sesquiterpénicos; MO: Monoterpenos oxigenados; SO: Sesquiterpenos oxigenados; FP: Fenilpropanoides; OCO: Otros compuestos oxigenados.

La **Tabla 17**, muestra la relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno “*istd*” (hexadecano), de los compuestos mayoritarios de los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado” antes, durante y después de floración.

Tabla 17. Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “*istd*”, de los compuestos mayoritarios de los extractos SDE de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, obtenidos en tres diferentes épocas de cultivo.

Compuestos mayoritarios	Área compuesto/Área <i>istd</i>		
	FLORACIÓN		
	ANTES	DURANTE	DESPUÉS
Eucaliptol (1,8-cineol)	1.02±0.06	1.4±0.3	0.64±0.02
Linalool	1.83±0.05	2.6±0.2	0.4±0.1
Estragol	8.7±0.3	10±1.7	5.45±0.07

En la **tabla 17** puede observarse, que la relación de áreas de estragol es mayor en los extractos SDE aislado de plantas antes (8.7) y durante la floración (10), con respecto a la de áreas en el extracto obtenido de plantas después de floración (5.45).

Durante la etapa de floración se observó un aumento en la relación de áreas del linalool (2.6), en comparación con la de áreas en extractos antes (1.83) y después de floración (0.4).

La relación de áreas del eucaliptol (1,8-cineol) es mayor en el extracto, obtenido de plantas durante la floración (1.4), con respecto a la de las áreas en los extractos antes (1.02) y después de su floración (0.64).

Las diferencias en la relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del hexadecano (*istd*), se muestran en la **Figura 55**, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado” antes, durante y después de floración.

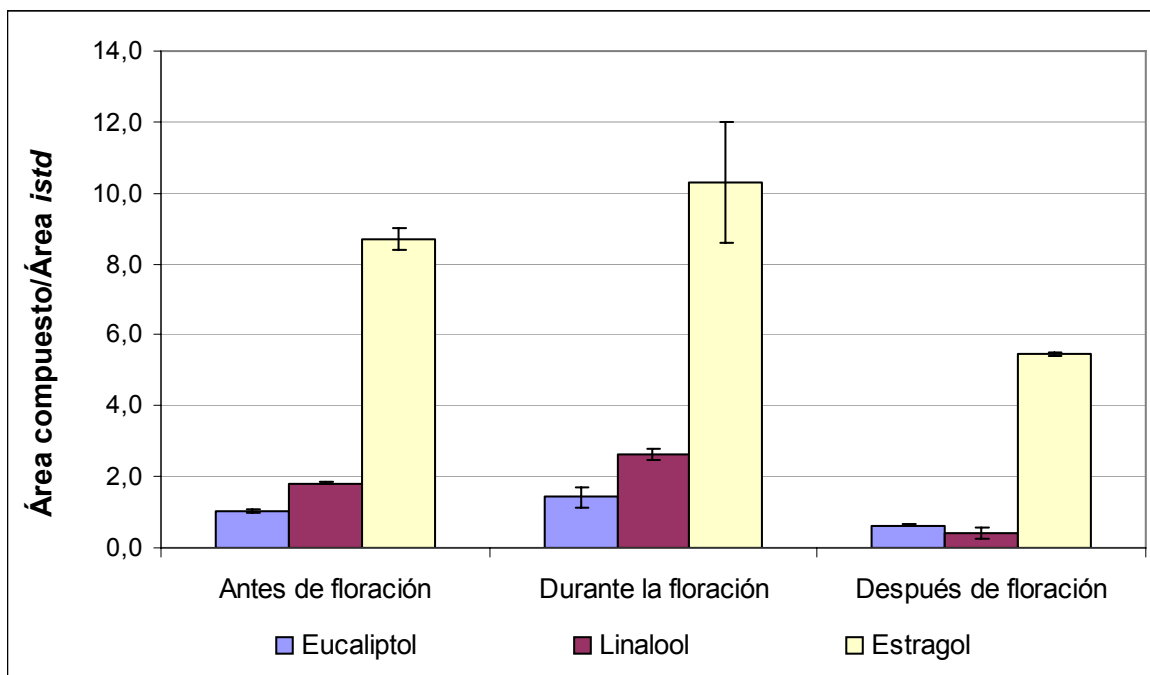


Figura 55. Relación de las áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (hexadecano) “*istd*”, de los compuestos mayoritarios en los extractos SDE, obtenidos de las hojas de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, recolectadas en tres diferentes épocas de cultivo.

5.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ATRAPAMIENTO DE RADICALES DE LOS COMPONENTES DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *OCIMUM spp.*, USANDO EL RADICAL DPPH· Y EL CATION-RADICAL ABTS⁺.

La evaluación de la actividad antioxidante en sistemas de prueba a través de fuentes generadoras de radicales, está basada en la suposición, que la oxidación se inhibe en un alto grado por el atrapamiento de radicales; por tanto, se enfoca en monitorear la capacidad de sustancias con posible capacidad para capturar de radicales o inhibir su formación. Éste es el principio de los métodos de ensayo con DPPH· (radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo) y de ABTS⁺ [ácido 2,2-azinobis-(3-etiltiazolina bencenosulfónico-6) [129,133,135-137].

Los valores EC_{50} de los AE y compuestos de referencia fueron calculados gráficamente, de acuerdo con el valor de R^2 , para cada sustancia utilizada como antioxidante. Un valor bajo de EC_{50} indica la actividad antioxidante más alta, porque se requiere una cantidad mucho menor de sustancia antioxidante para disminuir en 50% la absorbancia de la solución de DPPH· (Tabla 18).

La eficiencia de la capacidad antioxidante de una sustancia se mide en términos de su poder antirradicalario (ARP) que corresponde al inverso de la concentración necesaria para reducir el 50% de la concentración de DPPH· ($ARP=1/EC_{50}$). Los valores de ARP de las sustancias y AE utilizados como antioxidantes se registran en la Tabla 18.

Tabla 18. Capacidad de atrapamiento de radicales del Trolox[®], vitamina E, BHT, BHA y AE de *Ocimum spp.*, medida por los métodos de decoloración del radical DPPH· y el catión-radical ABTS⁺.

Sustancia	TAA (mmol Trolox/kg de sustancia)	EC_{50} (mg sustancia /mg DPPH·)	Valor estequiométrico (mg sustancia /mg DPPH·)	ARP (1/ EC_{50})
Trolox [®]	-	0.25±0.02	0.50	4.0±0.3
Vitamina E	2600±33	0.242±0.009	0.48	4.1±0.2
“Sígueme blanco”	7.7±0.4	29.6±0.4	59.2	0.0338±0.0005
“Sígueme morado”	5.1±0.2	35±1.5	70.6	0.028±0.001
BHT	920 ± 71	0.240±0.09	0.48	4.2±0.2
BHA	6400±487	0.23±0.02	0.46	4.5±0.4

En la Figura 57, se presenta la concentración efectiva EC_{50} de la vitamina E (0.242 mg vitamina E/ mg DPPH·), valor que fue concordante con los resultados reportados por Brand-Williams *et al.* [129].

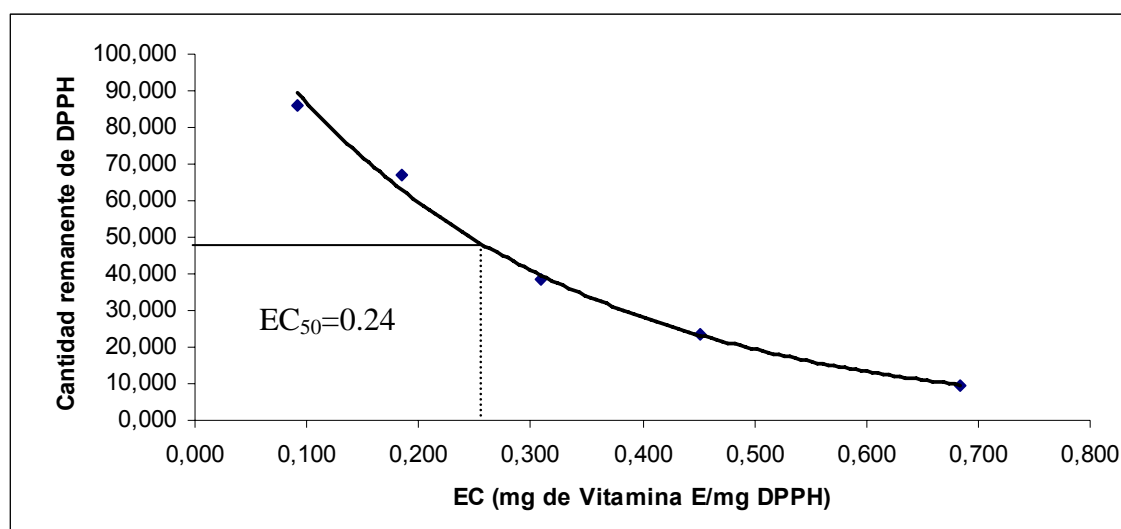
La velocidad de la reacción es relativamente alta, debido a que el estado estacionario se alcanza a los 15 min después que inicia la reacción, resultado que también concuerda con lo reportado por Brand-William *et al.* [129], quien

define su comportamiento como una cinética de reacción intermedia, por presentar el estado estacionario en un intervalo de tiempo comprendido entre los 5 y 30 min.

La estequiometría de la reacción, es el resultado de multiplicar el EC_{50} por dos, y representa la concentración teórica necesaria de un antioxidante para reducir el 100% de DPPH. En la **Tabla 18**, se reportan los valores estequiometricos para las sustancias de referencia y AE.

En el caso de la vitamina E, la estequiometría de reacción es de 0.5 (mg sustancia /mg DPPH), lo cual indica que una molécula de la vitamina E reduce dos moléculas de radical DPPH.

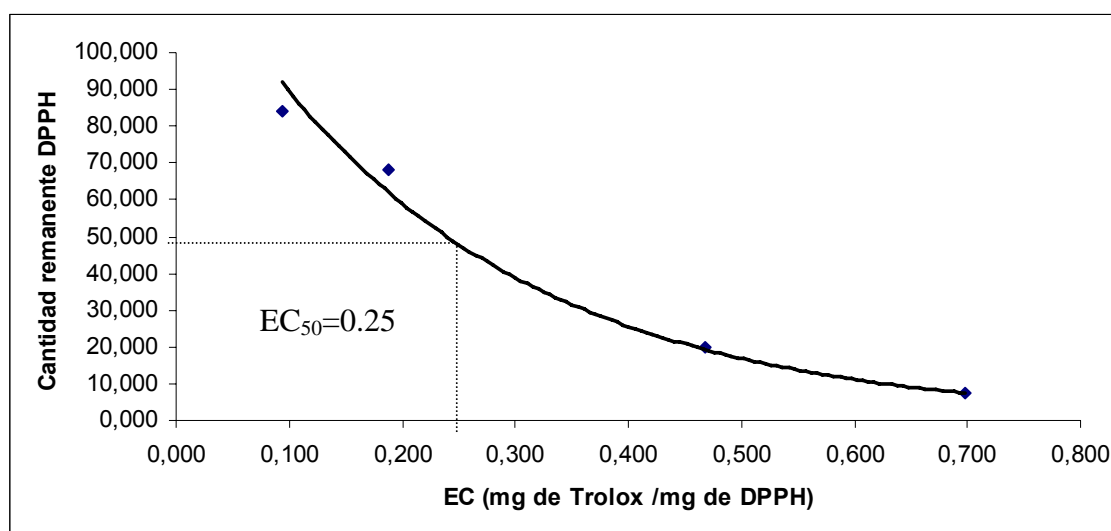
Figura 57. Desaparición del DPPH en función de la cantidad de la vitamina E (mg) por mg del radical.



El Trolox[®], análogo hidrosoluble de la vitamina E, fue usado también como sustancia de referencia para determinar su actividad antirradicalaria. En la **Figura 58**, se presenta la concentración efectiva media EC_{50} del Trolox[®]. El valor obtenido fue de 0.25 mg de Trolox[®] / mg de DPPH.

La cinética de reacción del Trolox[®] fue similar a la presentada por la vitamina E, alcanzó el estado estacionario a los 15 min, después de iniciada la reacción y su valor estequiométrico con respecto al DPPH[·] fue de 0.5 (mg sustancia /mg DPPH[·]).

Figura 58. Desaparición de DPPH[·] en función de la cantidad de Trolox[®] (mg) por mg del radical.



Los valores de ARP de los compuestos sintéticos BHT (4.2) y BHA (4.5) (Véase **Tabla 18**), fueron muy similares a los presentados por la vitamina E (4.1) y el Trolox[®] (4.0), pero a diferencia de estos, los compuestos sintéticos presentaron cinéticas de reacción muy lentas, debido a que alcanzaron el estado estacionario (variación de la absorbancia = $2 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$) a tiempos muy largos, que van desde 180 min para concentraciones bajas, hasta tiempos superiores a 600 min para soluciones de mayor concentración (Véase **Anexo 3**).

El estado estacionario para los AE se determinó experimentalmente cuando la variación de la absorbancia fue de $2 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. Los AE de *Ocimum spp.* presentaron una cinética de reacción lenta, los tiempos necesarios para alcanzar el estado estacionario variaron en un intervalo entre 150 y 480 min, de acuerdo con la concentración de AE utilizado, como posible antioxidante, tal como se ilustra en las **Figuras 59 y 60**.

Figura 59. Cinética de la reacción del AE de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, con el radical DPPH:

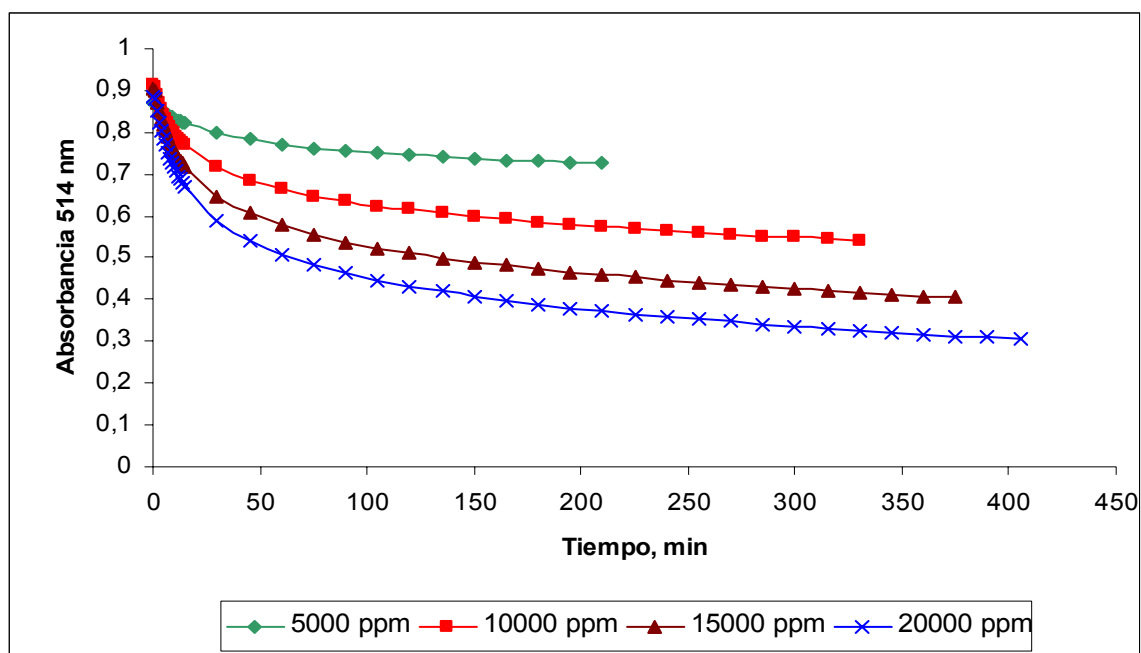
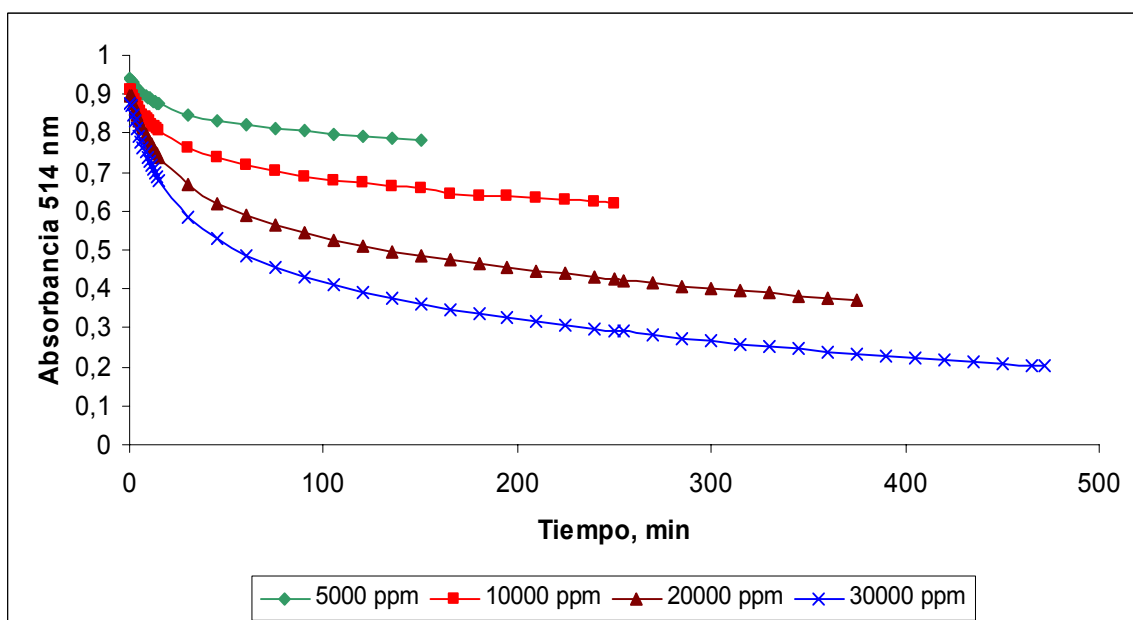


Figura 60. Cinética de la reacción del AE de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, con el radical DPPH:



La actividad antirradicalaria presentada por los AE evaluados fue baja comparada con la de las sustancias utilizadas como antioxidantes de referencia (Trolox®, Vitamina E, BHT y BHA), como se observa en la **Figura 61**. Pudo observarse también (**Tabla 18**), que no hay una diferencia significativa en cuanto al poder antirradicalario de los AE estudiados. De acuerdo con las curvas de desaparición del DPPH· en función de la cantidad de AE (Véase **Anexo 4**), el EC₅₀ para el *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” fue de 29.6 mg de AE por mg de DPPH· y para el *Ocimum sp2*. “Sígueme morado” fue de 35 mg de AE por mg de DPPH·.

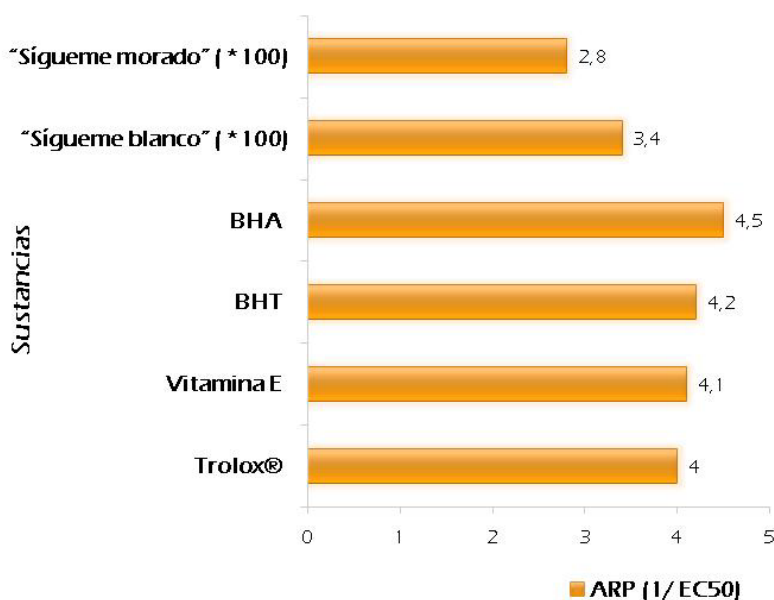


Figura 61. Comparación del poder antirradicalario (ARP) de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, y sustancias de referencia.

La baja actividad presentada por los AE se puede atribuir a la composición química de los mismos, debido a la ausencia de compuestos fenólicos capaces de donar fácilmente hidrógenos para reducir el radical DPPH·. Los compuestos como el eugenol y metil eugenol, presentan una buena actividad antirradicalaria, incluso comparable o mayor a la de los compuestos sintéticos, BHT y BHA [25-26].

De acuerdo con las cinéticas lentas de reacción de los AE y debido a su bajo poder antirradicalario, se puede concluir, que su aplicación en productos propensos al deterioro oxidativo, eventualmente, no es muy atractivo desde el punto de vista comercial.

5.7.2. ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATIÓN-RADICAL ABTS⁺

Entre los métodos utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante para capturar radicales, figura la prueba con el catión-radical ABTS⁺, que es uno de los agentes más aplicados, por ser altamente sensible, práctico y versátil [133], que mide la capacidad que poseen sustancias antioxidantes para decolorar la solución de ABTS⁺. Esto refleja la capacidad de sustancias para donar electrones o átomos de hidrógeno para inactivar el catión-radical, que se mide como el porcentaje de inhibición del catión-radical a 734 nm.

A pesar de las ventajas presentadas por el método, los valores de actividad antioxidante pueden depender del tiempo escogido para efectuar la medida. Los resultados mostrados por algunos investigadores indican que la reacción del catión-radical ABTS⁺ no se completa hasta pasado un minuto y según Re et al. [132], el tiempo de 4 min es el más apropiado, no obstante, Sellappan et al. [183], sugieren tiempos de medida de 6 min, para los patrones de referencia y de 7 min, para los compuestos puros, extractos de plantas o alimentos.

La disminución de la absorbancia fue medida entre los minutos uno (1) y seis (6), después de iniciada la reacción. En la **Figura 62**, se ilustra la actividad antioxidante del Trolox[®] usado como patrón de referencia, con el ABTS⁺. Se observa una disminución lineal de la absorbancia con respecto a la concentración de Trolox[®] utilizado. La capacidad antioxidante de las sustancias antioxidantes AE, vitamina E, BHA y BHT, fue determinada como la actividad antioxidante total (TAA) y expresada como mmol Trolox[®] por kg de sustancia utilizada.

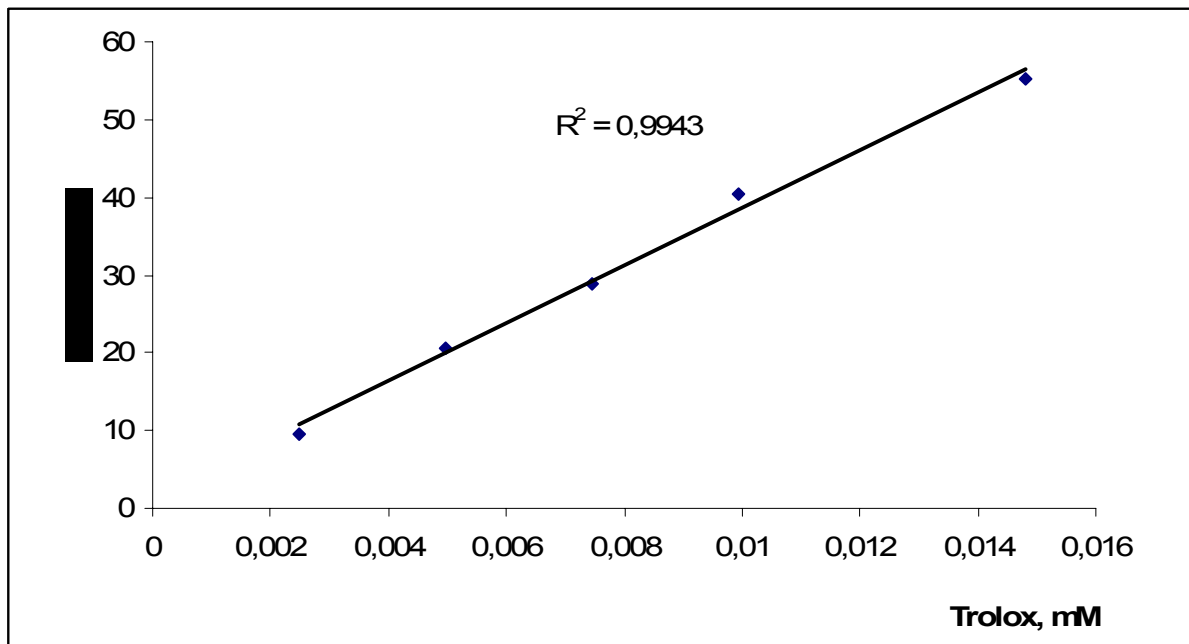


Figura 62. Porcentaje de inhibición del catión-radical $ABTS^+$, en función de la concentración de Trolox[®].

En **Tabla 18**, se registra la actividad antioxidante de las sustancias antioxidantes. Los AE presentaron baja capacidad secuestradora de los radicales $ABTS^+$ en comparación con los compuestos utilizados como referentes (Vitamina E, BHA, BHT), lo que puede ser atribuido a la ausencia de compuestos capaces de donar fácilmente hidrógeno. Entre los dos AE, el AE de *Ocimum* sp1. “Sígueme blanco” mostró una actividad más alta frente al $ABTS^+$ (**Figura 63**), que el del AE de *Ocimum* sp2. “Sígueme morado”, comprobando, de esta manera su mayor capacidad antirradicalaria de acuerdo con lo observado también en el método de DPPH.

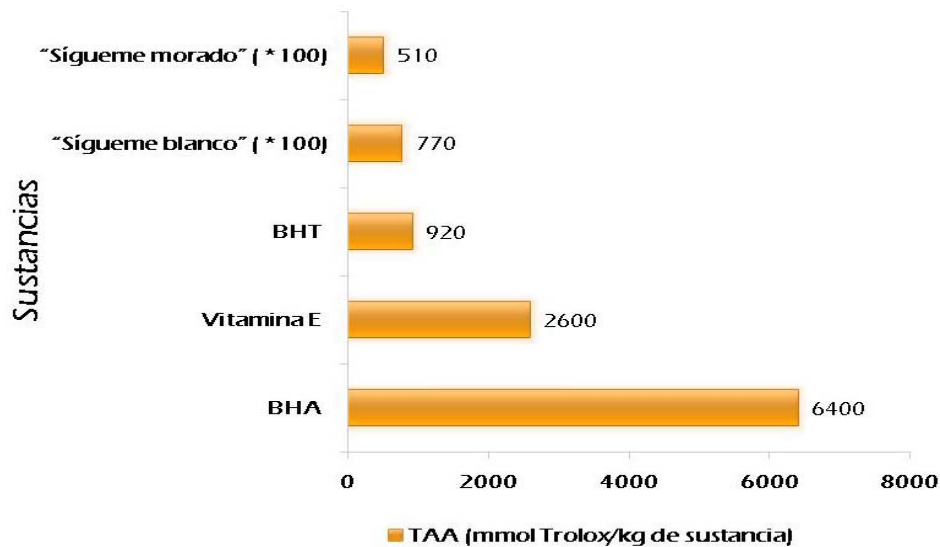


Figura 63. Comparación de las actividades antioxidantes totales (TAA), de *Ocimum sp1*. "Sígueme blanco", *Ocimum sp2*. "Sígueme morado", y sustancias de referencia.

5.8. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Especies de los géneros *Candida* y *Aspergillus*, causan la mayoría de las enfermedades asociadas a infecciones fúngicas. Aunque especies de *Candida sp.*, son comunes en la flora digestiva de seres humanos sanos, éstas han estado relacionadas con enfermedades que comprometen el sistema inmunológico. Las infecciones fúngicas son una causa importante de mortalidad en pacientes inmuno-comprometidos, que presentan tasas de mortalidad superiores al 40 %, en infecciones del torrente sanguíneo causadas por *Candida sp.* y mayores del 50 % en *Aspergillus sp.* [184].

El desarrollo de terapias efectivas contra infecciones fúngicas serias, ha presentado grandes complicaciones por el limitado número de agentes antifúngicos. Algunas drogas usadas en el tratamiento de enfermedades causadas por hongos como la *anfotericina B*, son muy tóxicas, y otros como el *fluconazol*, son limitados por su amplio rango de acción, debido a que pueden presentar mutaciones espontáneas, como consecuencia de la resistencia de especies de hongos a este tipo de drogas [185].

5.8.1. Actividad anti-*Candida*

La actividad antifúngica se evaluó, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (concentración mínima de un aceite, extracto o molécula que inhibe el crecimiento del hongo), de los aceites esenciales obtenidos mediante hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHd), de hojas de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” y *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, recolectadas durante la época antes de floración.

Los resultados alcanzados por el Laboratorio de Infección y Cáncer de la Universidad de Antioquia, en la evaluación de la efectividad de los AE, para inhibir el desarrollo de levaduras del género *Candida*, se registran en la **Tabla 19**.

Para el control de las pruebas se utilizó como sustancia de referencia el *itraconazol*, un antifúngico perteneciente a la familia de los triazoles, empleado ampliamente para inhibir el desarrollo de hongos infecciosos.

Tabla 19. Concentración mínima inhibitoria, CMI, de los aceites esenciales de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” y *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, en *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* (%v de AE/ v de DMSO).

Especies	<i>Candida parapsilosis</i> ($\mu\text{g/ mL}$)	<i>Candida krusei</i> ($\mu\text{g/ mL}$)
<i>Ocimum sp1</i> . “Sígueme blanco”	>500	>500
<i>Ocimum sp2</i> . “Sígueme morado”	>500	>500
<i>Itraconazol</i>	0.107	0.125

Los aceites esenciales de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” y *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, mostraron poca efectividad como antifúngicos comparado con la sustancia utilizada como referencia (*itraconazol*), debido, posiblemente, a la ausencia de compuestos antifúngicos, presentes en los aceites analizados, como en el caso de fenoles y citral, los cuales han demostrado una buena actividad anti-*Candida* [21].

5.8.2. Actividad anti-*Aspergillus*

La actividad antifúngica también fue evaluada contra dos diferentes especies de *Aspergillus*, *A. flavus* y *A. fumigatus*. Los resultados obtenidos en el laboratorio de Infección y Cáncer de la Universidad de Antioquia, en la evaluación de la efectividad de los AE para inhibir el desarrollo de *Aspergillus sp.*, se registran en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Concentración mínima inhibitoria, CMI, de los AE de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” y *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, estudiados en *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* (%v de AE/v de DMSO).

Especies	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	($\mu\text{g}/\text{mL}$)	($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Ocimum sp1</i> . “Sígueme blanco”	>500	>500
<i>Ocimum sp2</i> . “Sígueme morado”	>500	>500
<i>Itraconazol</i>	0.25	0.125

Los aceites esenciales de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” y *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, mostraron poca efectividad como antifúngicos, comparado con el *itraconazol* utilizado como control positivo.

La baja actividad antifúngica presentada por los aceites esenciales de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” y *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, puede ser atribuida a la poca actividad presentada por los compuestos mayoritarios de dichos aceites contra especies de *Candida* y *Aspergillus* [21]. Para el caso de compuestos como el linalool y cinamato de etilo (sustancias presentes en otros AE del género *Ocimum*), estudios realizados han mostrado su baja efectividad contra *Candida sp.* y *Aspergillus sp.*, en comparación con compuestos como timol, citral y, en algunos, casos eugenol [21].

Otros estudios han mostrado la posible utilización de cinamatos (e.g. cinamato de etilo) en dermatología y cosmetología, debido a la dulce fragancia de estos productos naturales y a la actividad presentada contra dermatofitos, *Scopulariopsis brevicaulis*, causantes de micosis en la piel, *Cryptococcus neoformans*, implicados en enfermedades de VIH [186] y contra *Malassezia pachydermatis*, encontrados en otitis externa de los perros [187].

5.9. ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Las investigaciones sobre productos naturales están basadas a menudo en la información etnobotánica y muchas de las drogas usadas hoy día han sido obtenidas de plantas medicinales, empleadas tradicionalmente por muchas comunidades indígenas. El estudio de estos extractos de plantas, está siendo sometido a investigaciones etnofarmacológicas para validar y garantizar sus efectos terapéuticos [188].

Una parte importante de las investigaciones etnofarmacéuticas en los últimos años, han estado dirigidas hacia una mejor comprensión de los efectos farmacológicos de plantas medicinales individuales. Los estudios fitoquímicos sobre las plantas medicinales son relativamente abundantes. Sin embargo, son menos frecuentes los estudios detallados de un enfoque tanto fitoquímico como farmacológico, acerca de los efectos sobre la salud humana [189].

La toxicidad aguda (CL₅₀) de los aceites esenciales, frente a *Artemia franciscana*, fue determinada en el grupo de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena. En la **Tabla 21**, se observan los resultados obtenidos sobre la toxicidad aguda (CL₅₀) del aceite esencial de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”.

Tabla 21. Toxicidad aguda (CL₅₀) de aceites esenciales de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”.

Aceite esencial	Tiempo de exposición (h)	CL₅₀ (µg/mL)	CL₅₀(24h)/CL₅₀(48h)
<i>Ocimum sp1</i> .	24	20.41 (19.17-21.73)	
“Sígueme blanco”	48	10.75 (9.48-12.19)	1.90

El aceite esencial de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, evaluado presentó un valor de CL₅₀ después de 24 horas de exposición de 20.41 µg/mL, lo cual lo clasifica como un aceite de baja toxicidad. Para el AE de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, el resultado de la actividad citotóxica no fue reproducible mediante la metodología utilizada.

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de *Ocimum spp*, usando cinco técnicas de extracción (MWHD, SDE, SFE, S-HS, HS-SPME), la identificación se llevó a cabo utilizando criterios cromatográfico (tiempos de retención, índices de Kováts) y espectroscópico, espectros de masas (EI, 70 eV) y empleando sustancias patrón.
- Las dos especies de *Ocimum sp.* se caracterizan por su alto contenido de fenilpropanoides en cantidades relativas (%) superiores al 50%, representados por sus compuestos mayoritarios: *Ocimum sp1.* (cinamato de metilo) y *Ocimum sp2.* (estragol), y por la presencia de monoterpenos oxigenados (> 20%), principalmente, por el linalool (8-12%) y eucaliptol (1,8-cineol) (2-8%).
- De acuerdo con la composición química presentada por las dos plantas de *Ocimum spp.*, éstas pueden clasificarse como dos quimiotipos, así: *Ocimum sp1.* N° registro COL 512283 “Sígueme blanco”: Quimiotipo “Cinamato de metilo”, *Ocimum sp2.* N° registro COL 512280 “Sígueme morado”: Quimiotipo “Metil chavicol (estragol)”.
- Las flores de las especies de *Ocimum sp.* se caracterizaron por su alto contenido de linalool, siendo éste el componente mayoritario de las flores de *Ocimum sp2.* “Sígueme morado” (36%), mayor que el de estragol (25%).
- La composición química de los extractos SDE de hojas de *Ocimum spp.*, cosechadas antes, durante y después de floración, no mostró cambios significativos de los compuestos mayoritarios, y dada la similitud en la composición obtenida por MWHD y SDE, se puede concluir, que durante

las épocas de antes y durante la floración podrá obtenerse ligeramente mayor cantidad de estragol (*Ocimum sp2.*) y cinamato de metilo (*Ocimum sp1.*).

- El análisis de *clusters*, utilizando distancias euclidianas completas y análisis de componentes principales (PCA), permitió apreciar el efecto de la técnica de extracción sobre la composición química de extractos. De las cinco técnicas utilizadas como métodos de extracción (MWHD, SDE, SFE, S-HS y HS-SPME), la MWHD y SDE permiten obtener una composición química muy similar en cuanto a componentes y a cantidades relativas (%) de éstos se refiere.
- Los AE de *Ocimum spp.* presentaron una baja capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH[•], en comparación con las sustancias antioxidantes evaluadas como referencia (Trolox[®], vitamina E, BHT y BHA), ésto, posiblemente, a los pocos compuestos fenólicos y a posibles antagonismos químicos como consecuencia de la composición de los AE, por tratarse de mezclas complejas. De los dos, el AE de “Sígueme blanco” (*Ocimum sp1.*) presentó mayor actividad antirradicalaria, por los dos métodos evaluados.
- El rendimiento del aceite esencial de hojas de *Ocimum sp1.* “Sígueme blanco”, fue más alto (0.36%), obtenido por MWHD, en época antes de floración, en comparación con el obtenido de *Ocimum sp2.* “Sígueme morado” (0.2%), bajo las mismas condiciones.
- La actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Ocimum sp.* no es comparable con la actividad de la sustancia de referencia, *itraconazol*.

- El aceite esencial de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, presentó valor de CL₅₀ 20.41 µg/mL después de 24 horas de exposición, lo cual lo clasifica como un aceite de toxicidad baja.
- Los datos de la composición química de los metabolitos secundarios y actividades biológicas evaluadas de los aceites esenciales de *Ocimum spp*, se reportan en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Resultados generales de los ensayos y determinaciones realizadas a los aceites esenciales de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco” y *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”.

Planta, Aceite esencial	<i>Ocimum sp1</i>. "Sígueme blanco"	<i>Ocimum sp2</i>. "Sígueme morado"
No.voucher, COL (UN, Bogotá)	512283	512280
Rendimiento AE, %	0.366±0.003	0.22±0.03
Compuestos mayoritarios, Cantidad relativa, %		
Eucaliptol (1,8-cineol)	7.63±0.05	6.9±0.4
<i>trans</i> -β-Ocimeno	tr	2.8±0.2
Fenchona	tr	2.2±0.2
Linalool	10.445±0.004	11.8±0.4
Estragol	2.3±0.2	49.7±0.3
<i>cis</i> -Cinamato de metilo	10.8±0.4	-
<i>trans</i> -Cinamato de metilo	38.4±0.6	tr
<i>trans</i> -α-Bergamoteno	tr	2.4±0.1
Germacreno D	2.04±0.05	2.40±0.05
τ-Cadinol	4.20±0.03	3.1±0.1
ACTIVIDADES BIOLÓGICAS		
Antioxidante		
ABTS ⁺	X X X X	X X X _{1/2}
DPPH [·]	X X X X	X X X
Antifungica	baja efectividad	baja efectividad
Citotoxico	baja toxicidad	No es reproducible

tr: Trazas(< 0,2%)

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer un estudio de la influencia de variables de cultivo (luz, fertilizante, pH del suelo, riego, etc) sobre la composición y sobretodo, el rendimiento de los aceites esenciales obtenidos de las especies estudiadas en el presente Proyecto.
- Se recomienda realizar experimentos que midan la capacidad antioxidante de los AE por métodos diferentes al atrapamiento de radicales, que permitan tener una visión más amplia de su comportamiento como antioxidantes, en diferentes sistemas, e.g. lipídicas.
- Se recomienda evaluar otro tipo de actividades biológicas, tales como: antibacterial y antiparasitaria, que permitan ampliar el perfil de actividad biológica de los AE estudiados.
- Debido a que los AE son mezclas complejas, se sugiere desarrollar ensayos de actividad biológica para sustancias de referencia de los metabolitos mayoritarios de cada uno de los aceites, a saber: estragol, cinamato de metilo, linalool y eucaliptol (1,8-cineol), con el fin identificar el impacto de éstos sobre la actividad de los AE estudiados.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT. Biocomercio sostenible: Estudio del mercado nacional de aceites esenciales. Bogotá, Colombia, **2003**, 1-85.
2. PINO, J. A., ROSADO, A. and FUENTES, V. Composition of the essential oil from the leaves and flowers of *Ocimum gratissimum* L. grown in Cuba. *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8, 139-141.
3. PÉREZ-ALONSO, M. J., VELASCO-NEGUERUELA, A., DURA, M. D., et al. Composition of the essential oils of *Ocimum basilicum* var. *Glabratum* and *Rosmarinus officinalis* from Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, **1995**, 7, 73-75.
4. REVERCHON, E., OSSEO, L. S. and GORGOGNONE, D. Supercritical CO₂ extraction of basil oil: Characterization of products and process modelling. *J. Supercrit. Fluids*, **1994**, 7, 185-190.
5. KOSTRZEWA, E. and KARWOWSKA, K., Chemical composition of the essential oil from sweet basil grown in Poland. *Prace Inst. Lab. Bad. Przem Spoz.*, **1991**, 44, 97-107.
6. VOSTROWKSY, O., GARBE, W. and MAIA, G. S., Essential oil of Alfavaca. *Ocimum gratissimum* from Brazilian Amazon. *Ziet Naturforsch.*, **1990**, 45c, 1073-1076.
7. LAWRENCE, B. M., Labiatae oils—mother nature's chemical factory. In: *Essential Oils 1988-1991*. Edit., B. M. Lawrence, Allured Publ., Carol Stream, IL, **1992**, 188-206.
8. DE MEDICI, D., PIERETTI, S., SALVATORE, G., NICOLETTI, and ROSOANAIVO, P., Chemical analysis of medicinal plants by gas chromatography and NMR spectroscopy. *Flav. Fragr. J.*, **1992**, 7, 275-281.
9. GUPTA, S. C., Genetic analysis of some chemotypes in *Ocimum basilicum* var. *glabratum*. *Plant Breeding*, **1994**, 112, 135-140.

10. RIAZ, M., RASHID KHALID, M., HANIF, M., and CHAUDHRY, F. M., Extraction and GC-MS analysis of the essential oil of *Ocimum basilicum* (Comoro). *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, **1994**, 37, 362-364.
11. RETAMAR, J. A., MOLLI, J. S., MALIZIA, R. A., and RISSO, G. A., Estudio del rendimiento y composición de diferentes variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas en Santa Fe. *Essenze Deriv. Agrum.*, **1995**, 65, 503-510.
12. DICESARE, L. F., RIVA, M. and SCHIRALDI, A., Microwave extraction: Generation, analysis and process influence, In: Food Flavors: generation, analysis and process influence. Edit., G. Charalambous, *Elsevier Science B. V.*, Amsterdam, **1995**, 857-868.
13. HETHELYI, E., PALINKAS, G. and MOSONYI, A., *Ocimum basilicum* essential oils capillary gas chromatographic analyses. *Olaj Szappan Kozmetika*, **1995**, 44(1), 21-26.
14. PETROPOULOS, G. and VLACHOU, A-M., GLC analysis and comparison of the flavour of different population of Basil. In: Food Flavors: generation, analysis and process influence. Edit. G. Charalambous, *Elsevier Science B. V.*, Amsterdam, **1995**, 849-855.
15. THACH, L. N., ANH, T. H., TRAM, H. D., et al., Microwave-assisted extraction process of the Basil oil (south Vietnam). *Tap. Chi. Hoa. Hoc*, **1996**, 34(2), 94-98.
16. THOPPIL, J. E., Contribution to the study of essential oil biosynthesis in eight varieties of *Ocimum basilicum* L., *Acta Pharm.*, **1996**, 46, 195-199.
17. VIÑA, A. and MURILLO, E., Essential Oil Composition from Twelve Varieties of Basil (*Ocimum spp*) Grown in Colombia. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**, 14 (5), 744-749.
18. LIMA E.O, GOMPERTZ O.F, GIESBRECHT A.M, PAULO M.Q. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses*. **1993**, 36, 333-336.
19. DE AQUINO LEMOS, J., SENA PASSOS, X., DE FÁTIMA, O., FERNANDES, L., et al., Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L.

- towards *Cryptococcus neoformans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **2005**, 100(1), 55-58.
20. VINCENZI, M., SILANO, M., MAIALETTI, F., SCAZZOCCHIO, B., Constituents of aromatic plants: II Estragole. *Fitoterapia*, **2000**, 71, 725-729.
 21. DUBEY, N. K., TIWARI, T.N., MANDIN, D., ANDRIAMBOAVONJY, H., CHAUMONT, J-P., Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). *Fitoterapia*, **2000**, 71, 567-569.
 22. NAKAMURA, C. V., ISHIDA, K., FACCIN, L. C., PRADO, B., et al., *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species, *Res. Microbiol.*, **2004**, 155, 579–586.
 23. TATEO, F., SANTAMARIA, L., BIANCHI, L. and BRANCHI, A. Basil oil and tarragon oil: Composition and genotoxicity evaluation. *J. Essent. Oil Res.*, **1989**, 1, 111-118.
 24. KANYANGA CIMANGA, SANDRA APERS, et. al. Chemical composition and Antifungal Activity of Essential Oils of Some Aromatic Medicinal Plants Growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Essent. Oil Res.*, **2002**, 79, 213-220.
 25. SACCHETTI, G.; MEDICI, A.; MAIETTI, S.; et al., Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian Basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 3486-3491.
 26. POLITEO, O., JUKIC, M., MILOS, M., Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil, *Food Chem.*, **2007**, 101, 379-385.
 27. LEE, S-J., UMANO, K., SHIBAMOTO, T., LEE, K-G., Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus Vulgaris* L.) and their antioxidant properties, *Food Chem.*, **2005**, 91, 131-137.

28. BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SIMIN, N., and ANACKOV, G., Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 1822-1828.
29. JAYASINGHE, C., GOTOH, N., AOKI, T., and WADA, S., Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.), *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4442-4449.
30. RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; et al., Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, **2003**, 87, 241–246.
31. BANDONI, A., (Ed.), Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata. Primera edición. Argentina, **2000**, 410 p.
32. JIROVETZ, L., Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent. *Recent Res. Devel. Agron. Horticul.*, **2006**, 2, 1-12.
33. STASHENKO, E., COMBARIZA, M., PUERTAS, M., Aceites esenciales, técnicas de extracción y análisis. UIS. Facultad de Ciencias. Bucaramanga, **1998**.
34. COMBARIZA, M., BLANCO, C. Estudio comparativo de los aceites esenciales de hojas y frutos cítricos colombianos. Tesis de Grado, UIS, Facultad de Ciencias, Bucaramanga, **1995**.
35. GUENTER, E. The Essential Oils. Volúmenes I y III, Edition Van Nostrand, New York, **1995**, Vol. I p. 427 y Vol. III p. 777.
36. MUÑOZ, F., Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Ed. Mundi Prensa, España **1986**, 365 p.
37. CAREY, F. A., Química Orgánica McGraw-Hill. 3ª Edición, Madrid, **1999**, 945-947.
38. STASHENKO, E.E., CERVANTES, M., COMBARIZA, Y., FUENTES, H. and MARTÍNEZ, J.R., 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.*, **1999**, 22, 343-349.
39. PARÉ, J. R. J., BEANGER, J. M. R. , Microwave-asisted process (MAPTM): A new tool for the analytical laboratory, *TrAC*, **1993**, 13, 176-184.
 40. JENNINGS, W., MITTFELDLT, E., STREMPLE, P., Analytical gas chromatography. Second Edition. Academic Press. San Diego, California, **1987**, 259 p.
 41. LIKENS, S. T. and NICKERSON. G.B., Detection of certain hop oil constituents in brewing products, In: SANDRA. P., BICCHI. C., Capillary gas chromatography in essential oil analysis. New York: Huethig Verlag, **1987**, 89 p.
 42. GODEFROOT, M., SANDRA, P. and VERZELE, M., New Method for Quantitative Essential Oil Analysis. *J. Chromatogr.*, **1981**, 203, 325-335.
 43. RAY, M., Flavor, fragrance and odor analysis. Ed. Marcel Dekker, INC., New York. **2002**, 424 p.
 44. DEAN, R. J., Extraction Methods for Environmental Analysis. John Wiley & Sons. Ltd. England, **1998**, 301 p.
 45. SHIBAMOTO. T., Analysis of Essential Oils, In: Jennings, W. Gedt, Applications of Glass Capillary Gas chromatography, Ed. Marcel Decker, N.Y, **1981**. 472 p.
 46. CASTRO, M.D. LUQUE DE, V. M. and TENA, M.T., Analytical Supercritical Fluid Extraction. Ed Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1994**. 321 p.
 47. McHUGH, M.A., KRUKONIS, V. J., Supercritical Fluid Extraction, Principles and Practice. Ed Butter Worths, Boston, 1-12, 497 p.
 48. WENCLAWIAK, B., Analysis with supercritical fluid: Extraction and chromatography, Ed. Springer-Verlag, Berlin, **1992**. 213 p.
 49. <http://www.restekcorp.com/headspace/headspace1.htm> [consultada el 15 de agosto de 2006].
 50. http://members.kr.inter.net/guesu/gs/r_hs-gc/whatishs.html [consultada el 15 de agosto de 2006].

51. McNALLY, M.E. and GROB, R.L. A Review: Current applications of static and dynamic headspace analysis: part one: Environmental application. *Amer. Lab.*, **1985** (January), 20-33.
52. <http://www.varianinc.com/csb/gcnotes/gc40.pdf> [consultada el 10 de septiembre de 2006].
53. <http://www.restek.com/restek/images/external/59895A.pdf> [consultada el 18 de julio de 2007].
54. ZHANG, Z., YANG, M. and PAWLISZYN, J., Solid-phase microextraccion. A solvent-free alternative for sample preparation. *Anal. Chem.*, **1994**, 66 (17), 844A-854A.
55. PAWLISZYN, J., Solid phase microextraction: Theory and practice. Ed. John Wiley, New York: **1997**. 241 p.
56. PAWLISZYN, J., Applications of solid phase microextraction. Ed. RSC chromatography monographs, Cornwall: **1999**. 653 p.
57. <http://www.info.sial.com/graphics/supelco/objects/4600/4547.pdf> [consultada el 10 de septiembre de 2006].
58. CHEN, J. and PAWLISZYN, J., Solid-Phase Microextraction coupled to High-Performance Liquid Chromatography. En: *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2530-3.
59. VAS. G. and VÉKEY. K., Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.*, **2004**, 39: 233–254.
60. STEFFEN, A. and PAWLISZYN, J., Analysis of flavour volatiles using headspace solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44 (8), 2187-2193.
61. GROB, L. R., Modern practice of gas chromatography. John Wiley & Sons, Inc, New York: **1995**, 896 p.
62. MASADA, Y., Analysis of Essential Oils by gas chromatography and Mass spectrometry, Ed, John Wiley, N.Y, **1997**. 330 p.
63. SATINDER AHUJA. Chromatography and separation science. Ed, *Acad. Press*. Elsevier Science (USA). **2003**,

64. BAUER, Kurt., GARBE, Dorothea. Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses. Fourth Completely Revised Edition. Wiley-VCH. Weinheim (Germany) **2001**, 176-177.
65. KITSON, G. Fulton., LARSEN, S. Barbara., McEWEN, N. Charles. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. Academic Press, San Diego, California, **1996**, 192 p.
66. LAWRENCE, Brian M. Essential Oils 1995-2000. Editor Natural Flavor and Fragrance, Materials Perfumer & Flavorist. Published by Allured Publishing Corporation. **2003**. pp. 26-29; 146-148; 225-235.
67. JENSEN, A. W., SALISBURY, B. F., Botánica, Segunda Edición. McGRAW-HILL. México, **1988**, 614 p.
68. HUSAIN, A., VIRMANI, OP., SHARMA, A. Major Essential oil-Bearing Plants of India. Central Institute of Medicinal & Aromatic Plants, Lucknow, India. **1998**. 82-87 p.
69. GUTTERIDGE, J. C. M. and HALLIWELL, B., Antioxidants in nutrition, health, and disease, Oxford University Press, New York, **1994**, pp. 40-74; 90-93.
70. MARTÍNEZ CAYUELA M., Toxicidad de Xenobióticos medida por radicales libres de oxígeno. *Ars. Pharmaceutica*, **1998**, 39, 5-18.
71. FREEMAN, B. A. and GRAPO, J. D., "Biology of disease. Free radicals and tissue injury". *Lab. Invest.*, **1982**, 47, 412-426.
72. NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1990**, 29, 273-300.
73. SIES HELMUNT., Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants, *Acad. Press: London*, **1991**, 650 p.
74. AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K. and HAGEN, T. M., Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, **1990**, 90, 7915-7922.
75. PERCIVAL, M. Antioxidants. *Clin. Nutr. Insight*, **1998**, 31, 1-4.
76. YOUNG, I. S. and WOODSIDE, J. V., Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.*, **2001**, 54, 176-186.

77. STASHENKO, E. E., FERREIRA, M. C., SEQUEDA, L. G., MATEUS, A., CERVANTES, M., MARTÍNEZ, J. R., "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*, **1997**, 8, 21-27.
78. FANKEL, E. N., Review Recent Advances in Lipid Oxidation. *J. Sci. Food Agric.*, **1991**, 495-511.
79. BORS, W., ERBEN-RUSS, M. and SARAN, M., Fatty Acids Peroxyl Radical: Their Generation and Reactivities, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1987**, 18, 37-49.
80. CHAUDHARY, A. K., NOKUBO, M., REDDY, G. R., YEOLA, S. N., et al., Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science*, **1994**, 265, 1580-1582.
81. IWAKAMI, M. Peroxides as a factor of atherosclerosis. *Nagoya J. Med. Sci.*, **1965**, 28, 50-56.
82. SUEMATSU, T., ABE, H., Liver and serum lipid peroxide level in patients with liver diseases. In: *Lipid Peroxides in Biology and Medicine*, Yagi, K., Ed., *Acad. Press*: New York, **1982**, 285-293.
83. SAITO, Y., HOTTA, N., SAKAMOTO, N., MATSUOKA, S., OHISHI, N., YAGI, K., Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem.*, **1979**, 79, 267-270.
84. SAGAI, M., ICHINOSE, T., Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. *Life Sci.*, **1980**, 27, 731-738.
85. ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J., ZOLLNER, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, 11, 81-128.
86. FEINMAN, S. E., Structure-activity relationships of formaldehyde. In: *Formaldehyde Sensitivity and Toxicity*, Feinman, S. E., CRC Press, Inc.: Boca Raton, FL, **1988**, 197-204.

87. MARNETT, L. J., HURD, H. K., HOLLSTEIN, M. C., et al., Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104. *Mutation Res.* **1985**, 148, 25-34.
88. SHERWIN, E. R., Antioxidant for vegetable oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1976**, 53, 430-436.
89. VALENZUELA, A. and NIETO, S., Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, **1996**, 47(3), 186-196.
90. FORD, S. E., HOOK, J. B., BOND, J. T., The effects of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on renal function in the rat. II. Effects on organics acid and base transport. *Food Cosmet. Toxicol.* **1980**, 18, 21-26.
91. POKORNY, J., YANISHLIEVA, N. and GORDON, M., (Ed.), Antioxidants in food practical applications, Woodhead Publ. Cambridge, **2001**, 381 p.
92. DUGAN, L. R., Natural antioxidants. In: *Autoxidation in Food and Biological Systems*, Eds., Plenum Press; New York, **1980**, 261-282.
93. SHAHIDI, F., KE, P. J., et al., Antioxidative activity of green and black tea in meat model systems. In: *Proceedings of the 38th International Congress of Meat Science and Technology*, Aug 23-28, Clermont-Ferrand, France, **1992**, 599-602.
94. WANASUNDARA, U., AMAROWICZ, R., SHAHIDI, F., Isolation and identification of antioxidative component in canola meal. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 1285-1290.
95. VALGIMIGLI, L., BANKS, J. T., LUSZTYK, J., and INGOLD, K. U., Solvent effects on the antioxidants activity of vitamine E, *J. Org Chem.*, **1999**, 64, 3581-83.
96. AMES, B. M., Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, **1983**, 221, 1256-1263.
97. GEY, K. F., The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.*, **1990**, 18, 1041-1045.

98. GEY, K. F., PUSKA, P., JORDAN, P., MOSER, U. K., Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1991**, 53, 326S-324S.
99. RIEMERSMA, R. A., WOOD, D. A., et al., Low plasma vitamins E and C increased risk of angina in Scottish men. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1989**, 570, 291-295.
100. STÄHELING, H. B., GEY, F. K., EICHHOLZER, M., LÜDIN, E., β -Carotene and cancer prevention: the Basel study. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1991b**, 53, 265S-269S.
101. STEINBERG, D., Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation*. **1991**, 84, 1420-1425.
102. WILLETT, C. W., Micronutrients and cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1994b**, 59, 162S-165S. CUVELIER, M.E., BERSET, C. and RICHARD. H., Antioxidant constituents in Sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 665-669.
103. ZYGADLO, J. A., LAMARQUE, A. L., MAESTRI, D. M., GROSSO, N. R., Empleo de aceites esenciales como antioxidantes naturales. *Grasas y Aceites*, **1995**, 46 (4-5), 285-288.
104. KULISIC T., RADONIC A., KATALINIC V., MILOS M., Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.*, **2004**, 85, 633-640.
105. DEIGHTON, N., GLIDEWELL, S. M., DEAN, S. M., and GOODMAN, B. A., Identification by EPR spectroscopy of carvacrol and thymol as the major sources of free radicals in the oxidation of plant essential oils. *J. Sci. Food Agric.*, **1993**, 63, 221-225.
106. DEIGHTON, N., GLIDEWELL, S. M., DEAN, S. M., and GOODMAN, B. A., The chemical fate of the endogenous plant antioxidants carvacrol and thymol during oxidative stress. *Proc. Royal Soc. Edinburgh*, **1994**, 102B, 247-252.
107. SIX, P., Current research in natural food antioxidants, INFORM, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1994**, 5, 679-688.

108. ATOUI, A. K., MANSOURI, A., BOSKOU, G., KEFALAS, P., Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*, **2005**, 89, 27-36.
109. LARSON, R. A., The antioxidants of higher plants. *Phytochem.*, **1988**, 27, 969-978.
110. SHAHIDI, F., Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, **2000**, 44, 158-163.
111. TRIANTAPHYLLOU, K., BLEKAS, G. and BOSKOU, D., Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species of *Lamiaceae*. *Inter. J. Food Sci. Nutr.*, **2001**, 52, 313-317.
112. MIYAKE, T. and SHIBAMOTO, T., Antioxidative activities of natural compounds founds in plants. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1819-1822.
113. CAO, G., SOFIC, E. and PRIOR, R. L., Antioxidant capacity of tea and common vegetables, *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, 3426-3431.
114. JUNG, M. Y., and MIN, D. B., Effects of α - γ and δ -tocopherols and oxidative stability of soybean oil. *J. Food Sci.*, **1990**, 55, 1464-1465.
115. BRUUN-JENSEN, L., SKOVGAARD, M., SKIBSTED, L. H., and BERTELSEN, G., Antioxidant synergism between tocopherols and ascorbyl palmitate in cooked, minced turkey. *Z. Lebensm Unters Forsch.* **1994**, 199, 210-213.
116. JUNG, M. Y., and MIN, D. B., Effects of quenching mechanism of carotenoids on the photosensitized oxidation of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1991**, 68, 653-658.
117. BUDOWSKI, P., Recent research on sesamin, sesamol and related compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1964**, 41, 441-445.
118. CHIMI, H., CILLARD, P. and RAHMANI, M., Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1991**, 68, 307-312.
119. DUVE, K. J. and WHITE, P. J., Extraction and identification of antioxidants in oats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1991**, 68, 365-370.

120. KANNER, J., FRANKEL, E., GRANIT, R., GERMAN, B. and KINSELLA, J. E., Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 64-69.
121. WU, K., ZHANG, W., ADDIS, P. B., et al., Antioxidant properties of wild rice. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 34-37.
122. SARA, J. and CHI-TANG-HO, Spicer flavour chemistry and antioxidants properties. ACS Serie 660, Washington D.C. 1996.
123. DESMARCHELIER, C., E MONGELLIE, C. J. and CICCIA, G., Inhibition of lipid peroxidation of lipid peroxidation and iron (II)-dependent DNA damage by extracts of *Pothomaphr peltafa* (L.) Miq. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **1997**, 30(1), 95-91.
124. JEN-KUN LIN. and HUNG-YI WU, Determination of aldehydic lipid peroxidation products with dabsylhydrazine by high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 1603-12.
125. STASHENKO, E. E., PUERTAS, M. A., SALGAR, W., DELGADO, W., and MARTINEZ, J. R., Solid-phase micro-extraction with on-fiber derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 886, 175-181.
126. HOSHIKA YASUYUKI, Sensitive gas chromatographic determination of lower aliphatic carbonyl compounds as their pentafluoropnenylhydrazones, *J. Chromatogr.*, **1978**, 152, 224-27.
127. YASUHARA, A. and SHIBAMOTO, T., Quantitative analysis of volatile aldehydes formed from various kinds of fish flesh during heat treatment, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 94-7.
128. BLOIS, M. S., Antioxidant determination by the use of a free radical. *Nature*, **1958**, 26, 1199-1200.
129. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol*, **1995**, 28, 25-30.
130. ARNAO, M. B., CANO, A., ACOSTA, M., Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Rad. Res.*, **1999**, 31, 89-96.

131. ARNAO, M. B., Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends Food Sci. Tech.*, **2000**, 11, 419-421.
132. RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., PAGANGA, G., A Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, 7, 933-956.
133. RE, R., PELLEGRINI, A., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 26, 1231-1237.
134. FRANKEL, E. N., In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci. Tech.*, **1993**, 4, 220-225.
135. BONDET, V., BRAND-WILLIAMS, W. and BERSET, C., Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] free radical method, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, **1997**, 30, 609-615.
136. NENADIS, N., WANG, L-F., TSIMIDOU, M., and ZHANG, H-Y., Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} Assay, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 4669-4674.
137. BRANCHI, B., GALLI, C. and GENTILI, P., Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the cation and radical-cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 2604-2614.
138. LENNETTE, E. H., et al., Manual de microbiología clínica, Editorial Científico-Técnica, La Habana, **1984**, t2, 776 p.
139. GUTIÉRREZ, C. E., et al., Acción antimicótica de cremas que contienen aceite de *Cymbopogon citratus* (Caña santa). *Rev. Plantas Med.*, **1990**, 10, 21-8.
140. UCHIDA, K., et al., In vitro antifungal activity of Itraconazole, a new triazole antifungal agent, against clinical isolates from patient with dermatomycoses. *Jap. J. Antifungal*, **1991**, 44(5), 571-9.

141. BARRY, A. L., Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: Theoretical considerations. *In: Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2nd Ed., Larian, V. (Ed.), Williams and Wilkins: Baltimore, MD, **1986**.
142. ZAIKA, L. L., Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Safety*. **1988**, 9, 97-118.
143. KONCMAN, E. W., et al., Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Médico Panamericana S. A., **1989**, 116 p.
144. PARISH, M. E., DAVIDSON, P. M., Method for evaluation. *In: Antimicrobials in Foods*, 2nd ed., Davidson, P. M., Branen, A. L. (Eds.), Marcel Decker; New York, **1993**, 597-615.
145. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for both dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Standard M27A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania, **1997**.
146. III Curso Hispano-Argentino de Micología Médica. "Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio". Memorias. Buenos Aires, Argentina. **2000**.
147. ESPINEL-INGROFF A. Clinical relevance of antifungal resistance. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, **1997**, 11, 929-944.
148. REX, J. H., PFALLER, M. A., GALGANI, J. N., BARRTLETT, M. S., ESPINEL, I. A., GHANNOUM, M. A., et al., Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro* and *in vivo* correlation data for fluconazol itraconazole, and *Candida* infections. *Clin. Infect. Dis.*, **1997**, 24, 235-247.
149. AMVAM ZOLLO, P. H., BIYITI, L., TCHOUMBOUGNANG, F., MENUT, C., LAMATY, G., BOUCHET, P., Aromatic plants of tropical central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flav. Fragr. J.*, **1998**, 13, 107-114.
150. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters;

- approved guidelines, 2nd ed. Document M23-A2, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, **2000**.
151. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, **2000**.
 152. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard M7-A7, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, **2000**.
 153. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-A, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, **2002**.
 154. VANDEN, B. D., VLITEINCK, A., Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Meth. Plant Biochem.*, **1991**, 6, 47-69.
 155. ESPINEL-INGROFF, A., BARTLETT, M., CHATURVEDI, V., GHANNOUM, M., HAZEN, K. C., PFALLER, M. A., RINALDI, M., WALSH, T. J., Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp., NCCLS collaborative evaluation. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2001**, 45, 1828-1835.
 156. CACCIONI, D. R. L., GARDINI, F., LANCIOTTI, R., GUERZONI, M. E., Antifungal activity of natural volatile compounds in relation to their vapour pressure. *Sci. Aliments.*, **1997**, 17, 21-34.
 157. JARAMILLO, S., Naturismo como sistema sanitario social. Barcelona: Léima. **1989**, 1–101.
 158. ROIG, J. T., Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba. Ed. *Ciencia y Técnica*. Habana. **1974**.
 159. JOHNSTON, N. E. and RUSCHE, B., Ethics committees: Synopsis of the workshop. Animal Alternative, Welfare and Ethics. Edited by L.F.M.

- Van Zutphen and M. Balls Elsevier Developments in Animal and Veterinary Sciences*, **1997**, 391–5.
160. YAJES, R., Animal ethics committees and the implementation. *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. Edited by LFM., *Van Zutphen and M. Balls Elsevier Developments in Animal and Veterinary Sciences*, **1997**, 367–71.
 161. SANCHEZ-FORTUN, S., SANZ-BARRERA, F., BARAHONA-GOMARIZ, M. V., Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1995**, 54(1), 76–82.
 162. LEWAN, L., ANDERSSON, M., MORALES-GOMEZ, P., The use of *Artemia salina* in toxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, **1992**, 20, 297–301.
 163. MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., Mc LAUGHLIN, J. L., Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, **1982**, 45, 31–4.
 164. De S Luna, J., dos Santos, A.F., de Lima, M.R., de Omena, M.C., de Mendonca, F.A., Bieber, L.W., and Sant'Ana, A.E., A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J. Ethnopharmacol*, **2005**, 97, 199-206.
 165. MASSELE, A. Y., NSHIMO, C. M., Brine shrimp bioassay for biological activity of medicinal plants in traditional medicines in Tanzania. *East Afr. Med. J.*, **1995**, 72(10), 661–3.
 166. MATHEWS, R. S., *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. *Free Radia Biol. Med.*, **1995**, 18(5), 919–22.
 167. FUMARAL, F., GARCHITORENA, M., *Artemia salina*. Recolección, descapsulación y desarrollo. *Revista Aquamar*, **1996**, 3, 22–4.
 168. STASHENKO, E. E., ACOSTA, R., MARTÍNEZ, J. R. High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained

- by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2000**, 43, 379–390.
169. ADAMS, R., Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy, Ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, **2004**, 469 p.
 170. VAZQUEZ, J. A., ARGANOZA, M. T., BOIKOV, D., VAISHAMPAYAN, J. K., AKINS, R. A., In vitro susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Revista iberoamericana de micología*, **2000**, 17, 60-63.
 171. FINNEY, D., Probit analysis, 3rd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. London and New York. **1971**, 76-80.
 172. MASSELE, A. y NSHIMO, C., Brine shrimp bioassay for biological activity of medicinal plants used in traditional medicines in Tanzania. *East Afr. Med. J.*, **1995**, 72, 661-663.
 173. AWAL, M. A., NAHAR, A., SHOSSAIN, M., BARI, M. A., RAHMAN, M., y HAQUE, M. E., Brine Shrimp Toxicity of Leaf and Seed Extracts of *Cassia alata* Linn. and Their Antibacterial Potency. *J. Med. Sci.*, **2004**, 4(3), 188-193.
 174. SLEET, R. B. y BRENDEL, K., Homogeneous populations of *Artemia nauplii* and their potential use for in vitro testing in developmental Toxicology. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **1985**, 5, 41-54.
 175. VERNIN, G., METZGER, J., Analysis of basil oils by GC-MS data bank. *Perfum. Flavor.*, **1984**, 9, 71-86.
 176. VIEIRA, R. F., SIMON, J. E., Chemical characterization of basil (*Ocimum spp.*) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. *Econ. Bot.*, **2000**, 54, 207-216.
 177. MARTINS, A. P., SALGUEIRO, L. R., VILA, R., TOMI, F., *et al.*, Composition of the essential oils of *Ocimum canum*, *O. gratissimum* and *O. minimum*, *Planta Med.* **1999**, 65, 187-189.
 178. SIMON, J. E., QUINN, J., MURRAY, R. G., Basil: a source of essential oils. In: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.), *Advanced in New Crops*. Timber Press, Portland, OR, **1999**, 484-489.

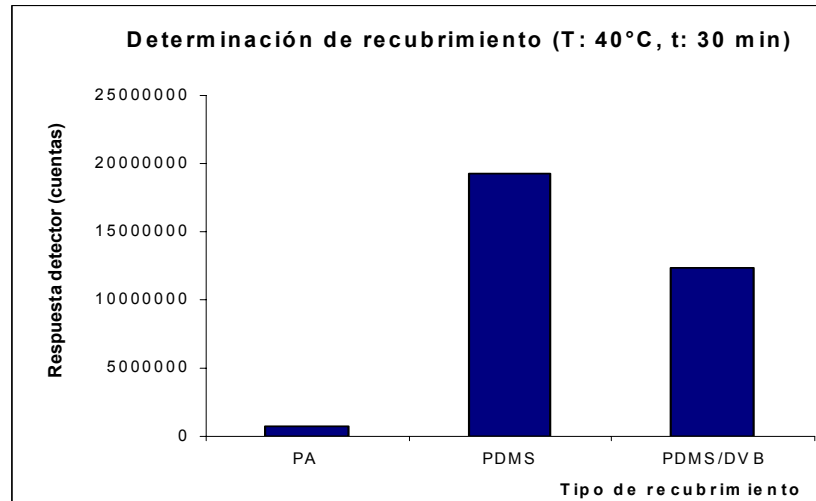
179. OZEK, T., BEIS, S. H., DEMIRCAKMAK, B., BASER, K.H.C., Composition of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. cultivated in the Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, **1995**, 7, 203-205.
180. GRAYER, R. J., KITE, G. C., GOLDSTONE, F. J., BRYAN, S. E., PATON, A., PUTIEVSKY, E., Infraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochem.*, **1996**, 43, 1033-1039.
181. JULIANI, H. R., SIMON, J. E., Antioxidant activity of basil. *In*: Janic, J., Whipkey, A. (Eds.), Trends in New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria, VA, **2002**, 575-579.
182. STASHENKO, E. E., JARAMILLO, B. E., MARTÍNEZ, J. R. Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiya aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1025, 105–113.
183. SELLAPPAN, S., AKOH, C. C., KREWER, G., Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 2432-2438.
184. DUPONT. B., DENNING. D. W., MARRIOT. D., SUGAR. A., VIVIANI. M. A., SIRISANTHANA. T., Mycoses in AIDS patients, *J. Med. Vet. Mycol.*, **1994**, 32, 65–77.
185. WHITE. T. C., MARR. K. A., BOWDEN. R. A., Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance, *Clin. Microbiol. Rev.*, **1998**, 11, 382–402.
186. DROMER. F., DUPONT. B., The increasing problem of fungal infections in the immunocompromised host. *J. Med. Mycol.*, **1996**, 6(1), 1-6.
187. KISS. G., RADVANYIS. S., SZIGETTI. G., New combination for the therapy of canine otitis externa: Microbiology of otitis externa, *J. Small Anim. Pract.*, **1997**, 38(2), 51-56.
188. HEINRICH. M., GIBBONS. S., Ethnopharmacology in Drug Discovery: An Analysis of its Role and Potential Contribution. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2001**, 53, 425-432.

189. HEINRICH. M., Ethnobotany and Natural Products: The Search for New Molecules, New Treatments of Old Diseases or a Better Understanding of Indigenous Cultures. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2003**, 3, 29-42.

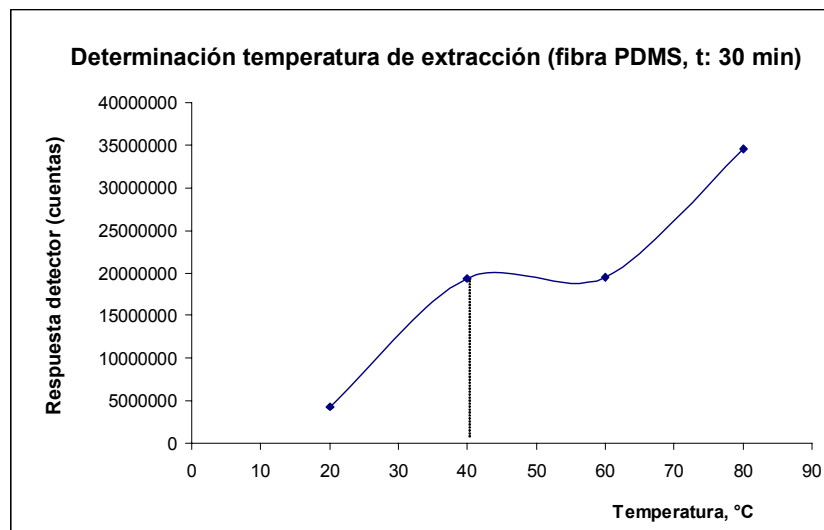
ANEXO 1

Determinación de las condiciones de extracción (fibra, tiempo y temperatura) para la técnica de extracción HS-SPME

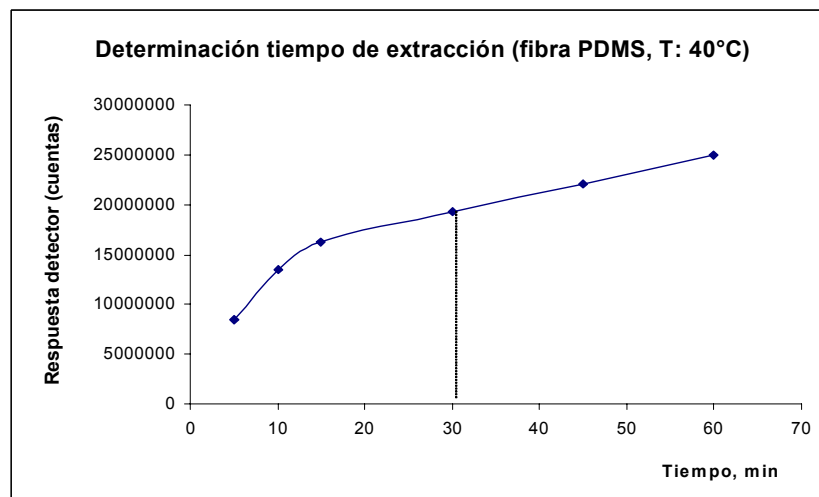
Anexo 1-Figura 1. Determinación del tipo de recubrimiento para la técnica de extracción HS-SPME



Anexo 1-Figura 2. Determinación de la temperatura de extracción para la técnica de extracción HS-SPME



Anexo 1-Figura 3. Determinación del tiempo de extracción para la técnica de extracción HS-SPME



ANEXO 2

Contribuciones de cada familia de compuestos de *Ocimum spp.* a los componentes principales, usados para clasificar las fracciones volátiles y semivolátiles obtenidas por las diferentes técnicas de extracción.

Anexo 2-Tabla 1. Contribuciones a los componentes principales de cada uno de las familias de compuestos de las fracciones volátiles y semivolátiles de *Ocimum sp1*. “Sígueme blanco”, obtenidas por diferentes técnicas de extracción.

Familias de compuestos	Factor 1	factor 2
Hidrocarburos	0,000136	0,000118
Otros compuestos oxigenados	0,006687	0,006238
Sesquiterpenos oxigenados	0,009509	0,005756
Hidrocarburos monoterpénicos	0,050715	0,002946
Hidrocarburos sesquiterpénicos	0,000110	0,738641
Fenilpropanoides	0,526613	0,101785
Monoterpenos oxigenados	0,406228	0,144516

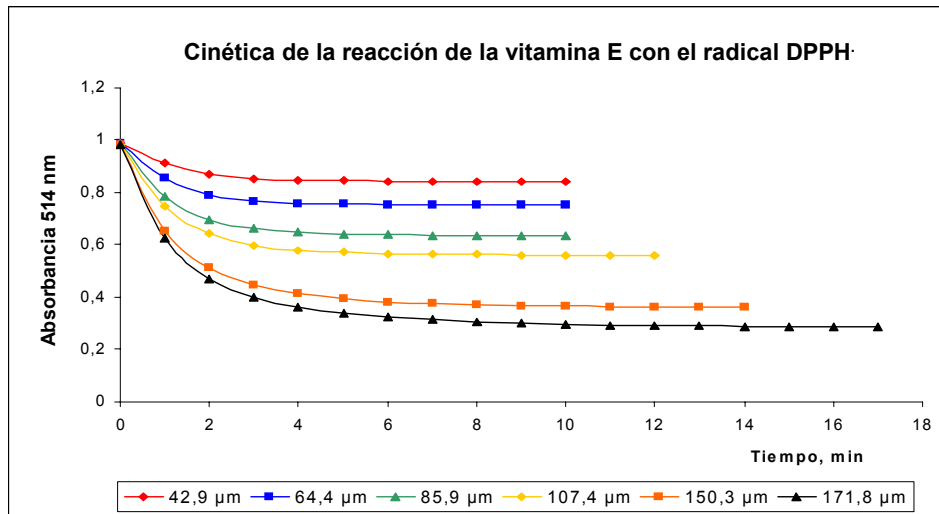
Anexo 2-Tabla 2. Contribuciones a los componentes principales de cada uno de las familias de compuestos de las fracciones volátiles y semivolátiles de *Ocimum sp2*. “Sígueme morado”, obtenidas por diferentes técnicas de extracción.

Familias de compuestos	Factor 1	Factor 2
Hidrocarburos	0,257586	0,064489
Sesquiterpenos oxigenados	0,023191	0,114039
Otros compuestos oxigenados	0,009344	0,000570
Hidrocarburos monoterpénicos	0,067111	0,038930
Hidrocarburos sesquiterpénicos	0,180571	0,212164
Monoterpenos oxigenados	0,450861	0,044725
Fenilpropanoides	0,011336	0,525083

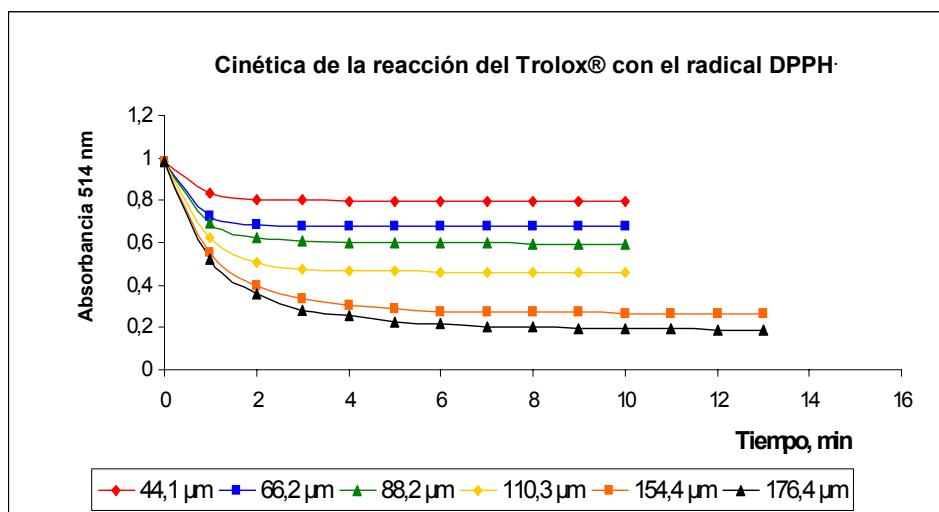
ANEXO 3

Cinéticas de reacción (estados estacionarios) de la vitamina E, Trolox[®] y compuestos sintéticos en la reacción con el radical DPPH.

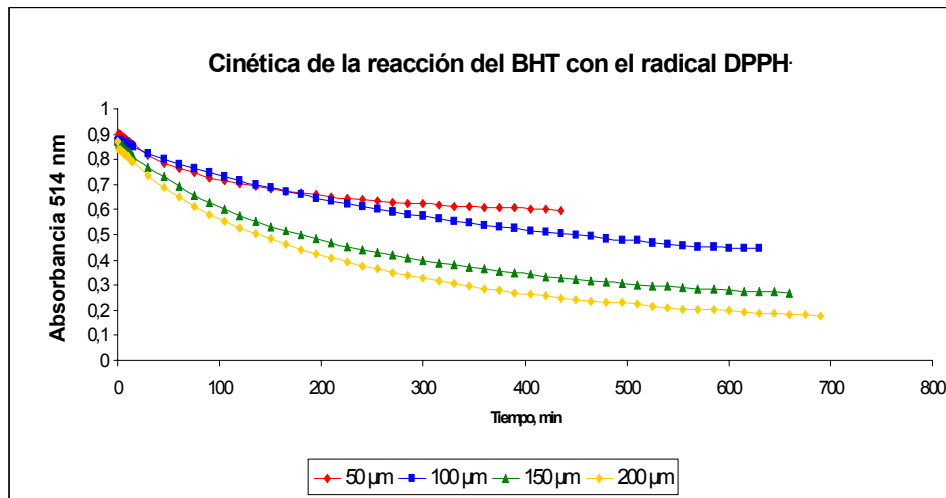
Anexo 3-Figura 1.



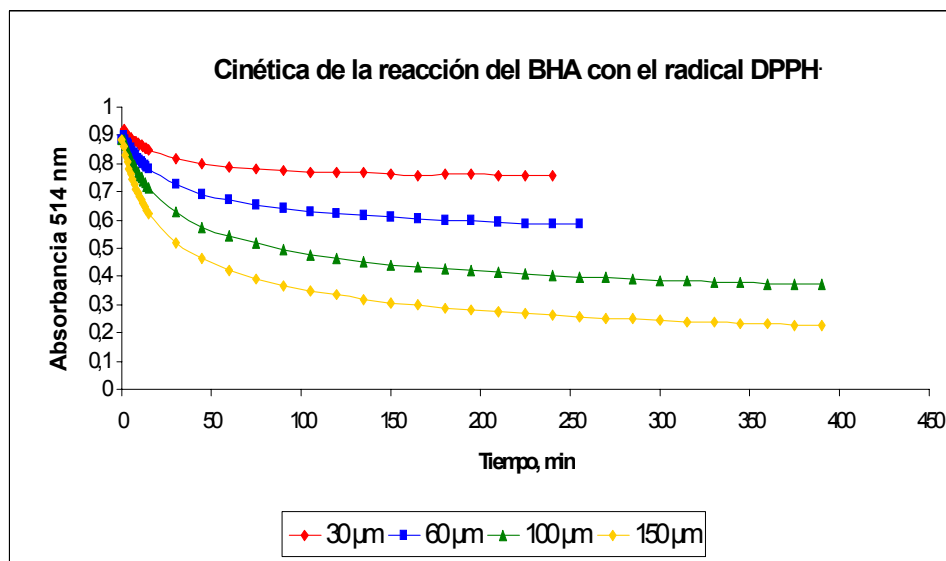
Anexo 3-Figura 2.



Anexo 3-Figura 3.



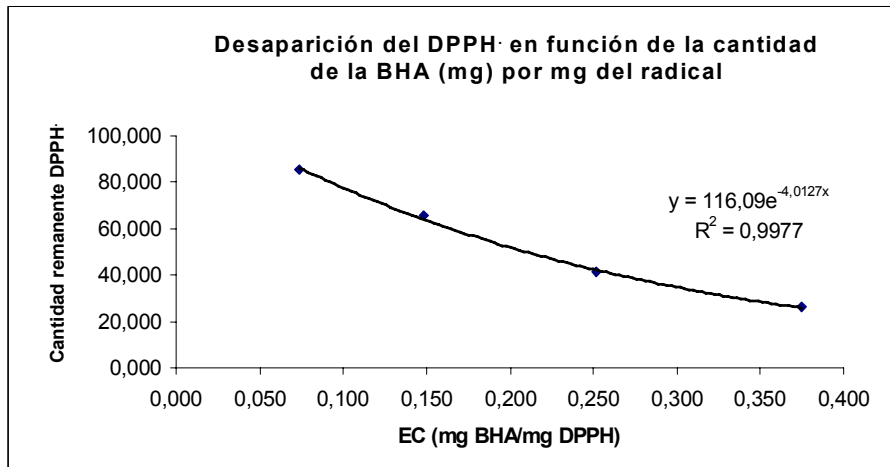
Anexo 3-Figura 4.



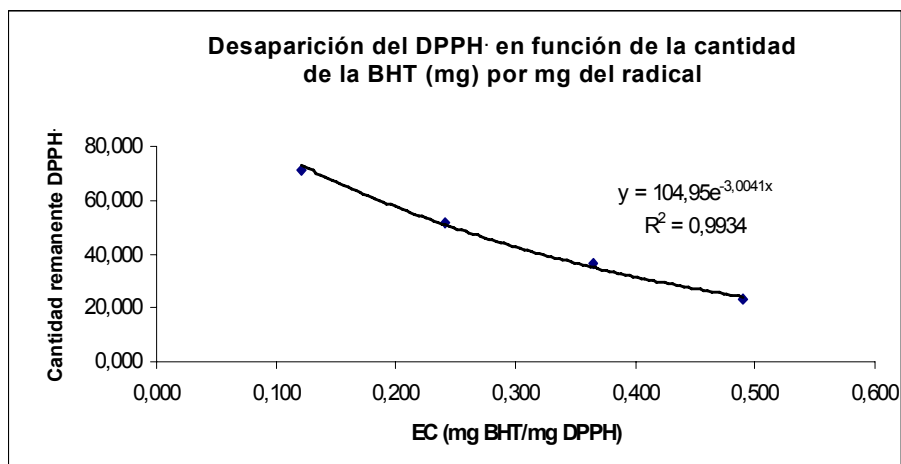
ANEXO 4

Curvas de desaparición del DPPH en función de la cantidad de AE y compuestos sintéticos.

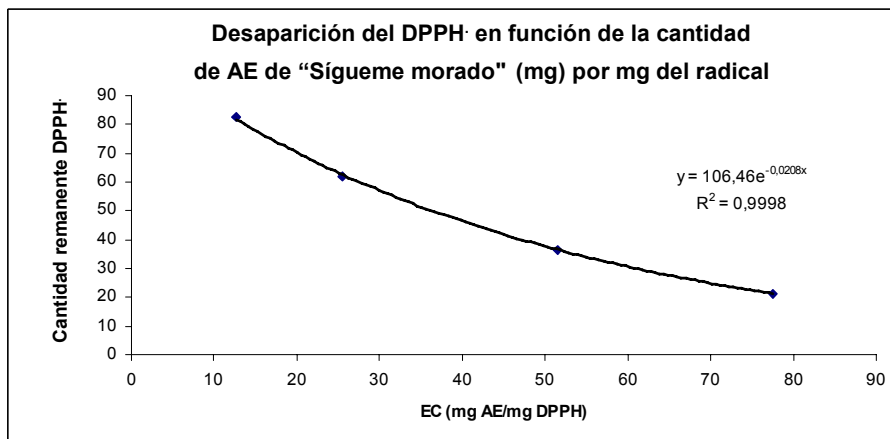
Anexo 4-Figura 1.



Anexo 4-Figura 2.



Anexo 4-Figura 3.



Anexo 4-Figura 4.

