

EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE TRES  
QUIMIOTIPOS DE *Lippia origanoides* H.B.K.

DAVID LEONARDO JAIMES JAIMES  
GERSON GILBERTO MORENO ELLES

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2012

EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE TRES  
QUIMIOTIPOS DE *Lippia origanoides* H.B.K.

DAVID LEONARDO JAIMES JAIMES  
GERSON GILBERTO MORENO ELLES

Trabajo de grado presentado como requisito  
parcial para optar al título de Químico

Directores:

**Dra. Elena E. Stashenko**

**Dr. Jairo René Martínez**

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2012

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo y lo que representa, a mis padres; Don Marco y Doña Nelly, quienes con sus cuidados y cariño me han permitido perseguir mis sueños y conocer las aristas de la vida.*

*A Nicolás, por su compañía y buenos deseos.*

*A Gerson, mi cómplice, amigo y hermano.*

*A quienes han confiado en mí y me han apoyado a pesar de todo.*

*A Nathalia, mi roca y mi futuro, la luz en mi oscuridad.*

*David*

*A mi Dios, mi fortaleza y la roca fuerte, que hizo lo imposible posible. A mis padres Gilberto y Candy que dieron más allá de lo que podían por ver realizado este sueño mutuo. A mis hermanos Edwin, Yudy y Sebastián, que fueron los brazos que me sostuvieron en momentos difíciles. A mi mejor amiga, mi compañera, mi sol y mi luna: Judith, que es luz en medio de la oscuridad, este es un logro mutuo, podemos decir con seguridad: lo logramos. De ti para mí. A mis amigos de Construyendo Hogares Sólidos, especialmente Boris y Myriam. Muy pero muy especialmente a mi hermano, mi amigo, mi compañero David Jaimes.*

*Las innumerables fotos que permiten revivir los espacios y los tiempos de los cuales no tienes memoria, si no de las imágenes intrépidas de este malabarista que se balancea en un vaivén sin precedentes entre lo que dijiste y lo que realmente quieres decir. Así como lo diría una filósofa de sueño, las fotos mentales como los eclipses lunares.*

*De ti para mí*

*Gerson*

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresamos nuestra mayor gratitud a:

La doctora Elena y el doctor Jairo René por ser nuestros maestros de muchas más cosas que química, además de todo su interés y asesoría en la realización de este proyecto.

A nuestros padres Marco y Nelly, Gilberto y Candy. Sin los cuales este proyecto no hubiera sido posible.

A Silvia Nathalia y Judith, nuestro apoyo en los momentos difíciles.

A nuestra amiga incondicional: Yury, por todos los aportes y ayudas en los momentos difíciles.

Al profesor Javier, por sus asesorías y ayudas continuas

Carlos Ruiz, Néstor, Joaquín, Carlos Bathuel y Yaride por ser nuestros amigos y maestros.

Al Laboratorio CROM-MASS, por el financiamiento del proyecto.

A nuestros compañeros del laboratorio, por los aportes hechos a esta investigación.

Y a todas las demás personas que contribuyeron al desarrollo de esta empresa.

## CONTENIDO

	pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	21
<b>1. REVISIÓN DE LA LITERATURA</b>	26
1.1 ESPECIES VEGETALES AROMÁTICAS Y METABOLISMO SECUNDARIO	26
1.1.1 Metabolismo secundario	26
1.1.2 Familia <i>Verbenaceae</i>	28
1.1.3 Género <i>Lippia</i>	29
1.1.4 Bioactividad del timol y del carvacrol	31
1.2 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES	33
1.2.1 Hidrodestilación asistida por microondas	34
1.2.2 Destilación-extracción simultánea con solvente	35
1.3 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES	36
1.3.1 Cromatografía de gases	36
1.3.2 Espectrometría de masas	37
1.3.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	38
1.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	39

1.4.1 Mecanismo de transferencia de protón y ensayo ORAC	39
1.4.2 Mecanismo de transferencia de electrón y ensayo ABTS	39
<b>2. METODOLOGÍA</b>	<b>41</b>
2.1 OBTENCIÓN Y PROPAGACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	41
2.2 MUESTREO Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	42
2.3 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS VOLÁTILES SECUNDARIOS	44
2.3.1 Extracción mediante MWHHD	44
2.3.2 Extracción mediante SDE	46
2.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	47
2.4.1 Preparación de los aceites esenciales	47
2.4.2 Preparación de los extractos	47
2.5 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES	47
2.5.1 Determinación de la densidad relativa	48
2.5.2 Determinación del índice de refracción	48
2.6 ANÁLISIS POR GC-MS	48
2.6.1 Uso de columna apolar	48

2.6.2	Uso de columna polar	49
2.7	ANÁLISIS POR GC-FID	50
2.8	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	51
2.8.1	Ensayo ORAC	52
2.8.2	Ensayo ABTS	52
2.9	FORMULACIÓN DE ENJUAGUE BUCAL	53
2.9.1	Formulación	54
2.9.2	Selección y ajuste del pH	55
2.9.3	Evaluación de la estabilidad del color	55
2.9.4	Evaluación de la estabilidad de la fase volátil	56
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
3.1	RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	57
3.2	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS	58
3.3	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES	59
3.3.1	Análisis de los extractos obtenidos y diferencial de composición	59
3.3.2	Análisis de los aceites esenciales obtenidos	63

3.3.3 Cuantificación de sustancias mayoritarias por el método por patrón externo	69
3.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	70
3.4.1 Ensayo ORAC	71
3.4.2 Ensayo ABTS	71
3.5 FORMULACIÓN DE ENJUAGUE BUCAL	73
3.5.1 Estabilidad del color	73
3.5.2 Estabilidad del olor	75
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>77</b>
<b>5. RECOMENDACIONES</b>	<b>78</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>87</b>

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Actividad antimicrobiana del carvacrol y del timol en términos de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	33
<b>Tabla 2.</b> Constantes dieléctricas de diferentes solventes.	34
<b>Tabla 3.</b> Número de especímenes analizados por quimiotipo.	42
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones de trabajo de los AE estudiados.	51
<b>Tabla 5.</b> Propósito, en el enjuague bucal, de los ingredientes empleados en la formulación.	54
<b>Tabla 6.</b> Rendimiento de extracción de los tres diferentes quimiotipos estudiados.	57
<b>Tabla 7.</b> Comparación con la literatura de los rendimientos de extracción de los AE.	57
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la densidad y el índice de refracción de los AE de los tres quimiotipos.	58
<b>Tabla 9.</b> Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios volátiles presentes en flores y hojas de los tres quimiotipos de <i>L. origanoides</i> , aislados mediante la técnica SDE.	60
<b>Tabla 10.</b> Componentes mayoritarios en hojas y flores de los tres quimiotipos de <i>L. origanoides</i> .	61
<b>Tabla 11.</b> Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios volátiles aislados AE de <i>L. origanoides</i> , aislados por la técnica MWHD.	64
<b>Tabla 12.</b> La cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios, hallada en el AE del quimiotipo carvacrol comparada con la reportado en la literatura.	67

<b>Tabla 13.</b> Comparación de la cantidad relativa de los componentes mayoritarios del AE, quimiotipos timol y felandreno, con lo reportado por Ruiz y colaboradores.	67
<b>Tabla 14.</b> Cantidad de cada una de las sustancias mayoritarias en los aceites esenciales de los quimiotipos estudiados de <i>L. origanoides</i> .	70
<b>Tabla 15.</b> Comparación de resultados mediante GC-MS y cuantificación por GC-FID por el método de patrón externo.	70
<b>Tabla 16.</b> Resultados del ensayo ORAC de los aceites esenciales de los tres quimiotipos y de la sustancia de referencia BHT.	71
<b>Tabla 17.</b> Resultados del ensayo ABTS de los AE de los tres quimiotipos y de las sustancias de referencia carvacrol, timol y felandreno.	72
<b>Tabla 18.</b> Resultados de la evaluación de la respuesta del color del enjuague bucal ante las condiciones de estrés.	74
<b>Tabla 19.</b> Resultados de la evaluación de la estabilidad del olor de enjuague bajo diversas condiciones de estrés.	75

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Izquierda: territorio ocupado (en naranja) por el punto caliente "Tropical Andes". Derecha: territorio ocupado (en naranja) por el punto caliente "Tumbes-Chocó-Magdalena".	21
<b>Figura 2.</b> Volumen de ventas generadas en sectores relacionados con la biodiversidad.	22
<b>Figura 3.</b> Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.	27
<b>Figura 4.</b> Distribución geográfica de la familia <i>Verbenaceae</i> .	29
<b>Figura 5.</b> Resumen esquemático de la metodología del trabajo.	41
<b>Figura 6.</b> Primer plano de planta de <i>Lippia origanoides</i> H.B.K. en floración.	43
<b>Figura 7.</b> Relación de tamaño de hojas (izquierda) y flores (derecha) recogidas.	44
<b>Figura 8.</b> Montaje de extracción de hidrodestilación asistida por radiación de microondas.	45
<b>Figura 9.</b> Montaje de destilación-extracción simultánea con solvente.	46
<b>Figura 10.</b> Relación de contenido de metabolitos secundarios volátiles por familia de compuestos.	63
<b>Figura 11.</b> Perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de los tres diferentes quimiotipos.	66
<b>Figura 12.</b> Relación de contenido de metabolitos secundarios volátiles por familia de compuestos.	69
<b>Figura 13.</b> Espectro UV-Vis del enjuague ante las diferentes condiciones de estrés.	74
<b>Figura 14.</b> Efecto de las condiciones de estrés sobre el área cromatográfica relativa de los compuestos volátiles mayoritarios.	76

#### LISTA DE ANEXOS

	pág.
<b>Anexo 1.</b> Curvas de calibración, con patrones certificados, para la cuantificación de las tres sustancias mayoritarias en los aceites esenciales de los tres quimiotipos.	88
<b>Anexo 2.</b> Certificaciones de participación en el VIII congreso internacional de química e ingeniería química celebrado en La Habana, Cuba.	92
<b>Anexo 3.</b> Resultados del estudio de suelos.	95

## GLOSARIO

ABTS	<i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid).</i>
AE	Aceite esencial.
BHT	Butilhidroxitolueno.
EUA	Estados Unidos de América.
EI	<i>Electron impact</i> (impacto de electrones).
FID	<i>Flame ionization detector</i> (detector de ionización en llama).
GC	<i>Gas chromatography</i> (cromatografía de gases).
GC-MS	<i>Gas chromatography – mass spectrometry</i> (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
GTC	Guía técnica colombiana
ISO	<i>International organization for standarization</i> (organización internacional para la estandarización)
Istd	Estándar interno
<i>m/z</i>	<i>Relación masa carga.</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i> (espectrometría de masas)
MSD	<i>Mass selective detector</i> (detector selectivo de masas).
MWHD	<i>Microwave – assisted hydrodistillation</i> (hidrodestilación asistida por microondas).
NTC	Norma técnica colombiana
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i> (capacidad de absorción del radical oxígeno)
SDE	<i>Simultaneous distillation-extraction</i> (destilación- extracción)

simultánea)

SFE *Supercritical fluid extraction* (extracción con fluido supercrítico).

SPME *Solid phase microextraction*(microextracción en fase sólida)

## RESUMEN

**TITULO\***: EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE TRES QUIMIOTIPOS DE *Lippia origanoides* H.B.K.

**AUTORES\*\***: MORENO, GERSON y JAIMES, DAVID.

**PALABRAS CLAVE**: *Lippia origanoides*, hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD), destilación - extracción simultánea (SDE), timol, carvacrol, felandreno, capacidad antioxidante.

## CONTENIDO

Se obtuvieron los aceites esenciales mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD) de tres diferentes quimiotipos de plantas de *Lippia origanoides* H.B.K., sembrados y cultivados en los jardines del complejo agroindustrial del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (Cenivam), ubicado en Bucaramanga, Colombia. También se obtuvieron los metabolitos secundarios volátiles de las flores y de las hojas, por separado, mediante destilación - extracción simultánea. Se analizaron los extractos y los aceites esenciales obtenidos, haciendo uso de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y acoplada a detector de ionización de llama, se identificaron los componentes mayoritarios; se halló que las plantas de quimiotipo timol contenían timol (57%), p-cimeno (7%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (5%) y  $\gamma$ -terpineno (5%); las de quimiotipo carvacrol contenían carvacrol (41%), p-cimeno (12%),  $\gamma$  terpineno (8%) y *trans*- $\beta$ -cariofileno (5%) y las de quimiotipo felandreno contenían  $\alpha$ -felandreno(9%),  $\beta$ -felandreno(11%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (10%) y p-cimeno (7%), principalmente.

Adicionalmente, se evaluó la capacidad antioxidante de los aceites esenciales mediante los ensayos ABTS y ORAC. En el primero se obtuvo para el quimiotipo timol, 5,53  $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{mg}$ ; para el quimiotipo carvacrol, 6,54  $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{mg}$ ; y para el quimiotipo felandreno, 0,16  $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{mg}$ . En el segundo ensayo se obtuvo para el quimiotipo timol, 3,24  $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{mg}$ ; para el quimiotipo carvacrol, 3,7  $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{mg}$ ; y para el quimiotipo felandreno, 2,09  $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{mg}$ .

\* Trabajo de grado

\*\*Universidad, Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez.

## ABSTRACT

**TITLE\***: EXTRACTION, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE ANTIOXYDANT ACTIVITY OF VOLATILE SECONDARY METABOLITES OF THREE CHEMOTYPES OF *Lippia origanoides* H.B.K.

**AUTHORS\*\*** : MORENO, GERSON and JAIMES, DAVID.

**KEY WORDS**: *Lippia origanoides*, microwave assisted hydrodistillation (MWHD), simultaneous distillation-extraction (SDE), thymol, carvacrol, antioxidant capacity.

## CONTENT

Essential oils from plants of three different chemotypes of *Lippia origanoides* H.B.K. was obtained by using microwave assisted hydrodistillation. Those plants were planted and cultivated in the gardens of the agro-industrial complex of the *Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales* (CENIVAM), located in Bucaramanga, Colombia. Also was obtained the volatile secondary metabolites from the flowers and the leaves by using simultaneous distillation extraction. The obtained extracts and essential oils was analyzed by gas chromatography coupled to mass selective detector and flame ionization detector, the majority components were identified. The plants of thymol chemotype contained thymol (57%), p-cymene (7%), *trans*- $\beta$ -caryophyllene (5%) and  $\gamma$ -terpinene (5%); plants of carvacrol chemotype contained carvacrol (41%), p-cymene (12%),  $\gamma$ -terpinene (8%) y *trans*- $\beta$ -caryophyllene (5%) and plants of phellandrene chemotype contained  $\alpha$ -phellandrene (9%),  $\beta$ -phellandrene(11%), *trans*- $\beta$ -cariophyllene (10%) and p-cymene (7%), mainly. Furthermore, essential oils antioxidant capacity was evaluated by the ORAC and ABTS assays. For the first assay were obtained the following results: thymol chemotype, 5.53  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /mg; carvacrol chemotype, 6.54  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /mg; and for the phellandrene chemotype, 0.16  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /mg. For the second assay were obtained the following results: thymol chemotype, 3.24  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /mg; carvacrol chemotype, 3.7  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /mg; and for the phellandrene chemotype, 2.09  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /mg.

\* Undergraduate project

\*\*Universidad Industrial de Santander, Sciences Faculty, Chemistry School. Directors: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez.

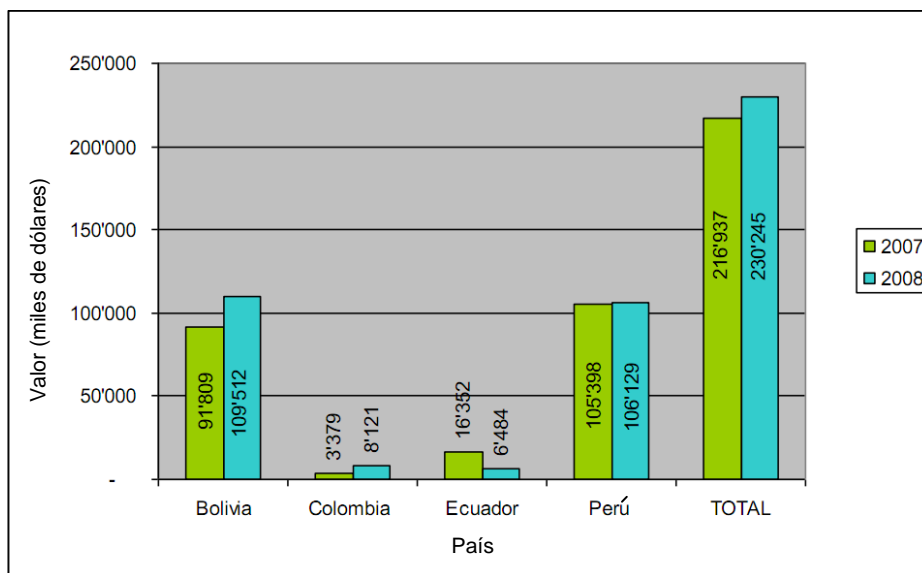
## INTRODUCCIÓN

Colombia se encuentra en una posición geográfica privilegiada está ubicada en la zona intertropical, y por tanto no experimenta estaciones [1]; el clima de sus diferentes regiones está determinado por la elevación sobre el nivel del mar, y como en su territorio se encuentra la cordillera de Los Andes, la variedad de climas y condiciones ambientales es muy amplia [2]. En un reporte publicado por la *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* [3], de Australia (2011), se encuentra que Colombia era el cuarto país con mayor diversidad en plantas vasculares, solo superado por Brasil, Indonesia y Sudáfrica. Además, se han incluido dos de los llamados *hot spots* (sitios calientes) de biodiversidad en territorio colombiano [4]. El primero de ellos [5] es el de “*Tropical Andes*”, que cubre la cordillera de Los Andes y la Sierra Nevada de Santa Marta. El segundo punto caliente [6], que es vecino del primero, es conocido como “*Tumbes-Choco-Magdalena*” y ocupa toda la costa pacífica, la frontera con Panamá, el valle entre las ramas occidental y central de la cordillera de Los Andes y todo el territorio continental al norte de la rama occidental de esta cordillera. En la **Figura 1** se muestra el espacio ocupado por estas zonas.



**Figura 1.** Izquierda: territorio ocupado (en naranja) por el punto caliente “*Tropical Andes*” [5]. Derecha: territorio ocupado (en naranja) por el punto caliente “*Tumbes-Chocó-Magdalena*” [6].

El uso inteligente de las materias primas producidas en estas zonas podría proveer a Colombia de una fuente de recursos. En un reporte publicado por el programa de desarrollo de las Naciones Unidas [7] se muestran los beneficios (Figura 2), en millones de dólares, que han recibido los cuatro países que tienen territorio sobre el punto caliente de biodiversidad “*Tropical Andes*”. En ese reporte queda claro que Colombia, con respecto a los otros tres países, se ha atrasado en el desarrollo de cadenas de valor de sus materias primas relativas al biocomercio y ha permitido que sus vecinos le ganen ventaja en la explotación de las posibilidades que le confiere su biodiversidad.



**Figura 2.** Volumen de ventas generadas en sectores relacionados con la biodiversidad [7].

Por tanto, se presenta una enorme oportunidad para que los empresarios y los trabajadores rurales aprovechen las condiciones únicas del paisaje colombiano, para lo cual es necesario el acompañamiento de la academia, que explore la biodiversidad nacional, en busca de variedades de flora y fauna, que puedan explotarse de forma rentable, o que encuentre aplicaciones que conviertan desechos en subproductos y elementos de valor. El complemento entre investigación y aplicación debe comenzar en la universidad, como está

consagrado en la misión institucional de la Universidad Industrial de Santander [8], “...la participación activa liderando procesos de cambio por el progreso y mejor calidad de vida de la comunidad”. El Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (Cenivam) se conformó [9] con el propósito de llevar a la práctica ese empeño. El Cenivam ha emprendido expediciones en el área rural de algunas regiones de Colombia [9], y ha encontrado que los aceites esenciales producidos por algunas plantas que crecen en su territorio contienen sustancias de interés para la industria y para la academia [10].

En una de esas expediciones, particularmente, en el municipio santandereano de Jordán-Sube, se recolectaron especímenes de la planta de la familia *Verbenaceae*, *Lippia origanoides* (conocida comúnmente como orégano de monte), que posteriormente fueron estudiados por Stashenko *et al.* [11]. Se encontraron cantidades superiores al 50% del monoterpenoide timol en uno de los quimiotipos y cercanas al 10% de *p*-cimeno y  $\alpha$ -felandreno, en otro. Con el propósito de mejorar la rentabilidad y la eficacia de la extracción, se han hecho estudios en los que se ha determinado que el periodo de corte con el que se consigue un mayor rendimiento del aceite esencial es durante el estado fenológico de floración; Ruiz y colaboradores [12] reportaron esto para los quimiotipos ricos en timol y felandreno de *L. origanoides*. Senatore [13] coincide en eso para la especie *Thymus pulegioides*, también rica en timol. Sin embargo, aún no se conoce si existe alguna diferencia en la composición de los metabolitos secundarios volátiles que pueden obtenerse mediante hidrodestilación de las diferentes partes de la planta de *L. origanoides*. Por ejemplo, Buttery y Ling [14] reportan diferente composición de los metabolitos secundarios de diferentes partes de la planta de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) reportaron también una marcada diferencia entre hojas y frutos, y que la formación de terpenoides está contenida en las hojas, la formación de derivados volátiles de lípidos de un alto número de carbonos como el 4,5-epoxi-(E)-2-decenal y de terpenoides como

el 6-metil-5-hepten-2-ona, sucede solo en el fruto, y que otras sustancias, como las volátiles derivadas de lípidos de 6 carbonos se presentan en ambas partes, casi indistintamente.

El conocimiento de que una diferencia similar exista en las plantas de *L. origanoides*, sugeriría al productor de aceites esenciales que puede aumentar su beneficio separando las partes de la planta en la etapa de preparación del material vegetal. Antes de iniciar este trabajo se asumió que dicha diferencia existe, y, por tanto, se utilizaron dos técnicas de hidrodestilación del material vegetal, a pequeña y mediana escala, destilación-extracción simultánea (SDE) e hidrodestilación asistida por microondas (MWH) respectivamente. Se utilizó SDE como técnica de extracción de las hojas y las flores.

Uno de los quimiotipos estudiados produce un aceite esencial rico en timol, sustancia con propiedades bactericidas; Celikel y Kavas [15] mostraron que el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, que contiene timol y carvacrol, es más potente que los aceites esenciales de otras plantas, ricos en 1,8-cineol (laurel, salvia y mirto) o en limoneno (naranja). Burt *et al.* [16] reportan que el timol y su isómero, el carvacrol, obtenidos del aceite esencial del orégano y del tomillo son muy efectivos en la prevención de la propagación de la bacteria *Escherichia coli*, y que esta actividad puede ser mejorada con el uso de estabilizantes. Gourdazi *et al.* [17] reportan ensayos microbiológicos efectivos del aceite esencial con timol, obtenido de *Carum copticum*. En forma más específica, se ha reportado la notoria actividad del timol en la eliminación de algunas bacterias orales humanas; Saphiro y Guggenheim [18] atribuyen el efecto del timol sobre las bacterias *Porphyromonas gingivalis*, responsable en gran medida de las condiciones periodontales humanas, *Selenomonas artemidis* y *Streptococcus sobrinus*, a la desestabilización de la membrana celular, aunque sugieren que podría deberse a la inhibición generada por el timol en las rutas de síntesis de ATP.

El efecto del timol sobre las bacterias orales no ha pasado desapercibido; la multinacional Johnson & Johnson, productora del enjuague bucal Listerine<sup>®</sup>, usa timol en su formulación [19]. En la práctica, se utilizan tres ingredientes activos en la formulación de enjuagues bucales [20], glutamato de clorhexidina (GCH), cloruro de cetil piridinio (CPC) y aceites esenciales (AE) ricos en timol, de los tres, solo los aceites esenciales no tienen efectos adversos relacionados con la salud oral, sino con el sabor u olor; al contrario, el uso continuado de CPC o GCH provoca coloración de los dientes y de la lengua e incrementa la formación de cálculos en la encías. En este trabajo, y como conclusión práctica de la extracción de un aceite esencial rico en timol, se presenta una alternativa de uso, un enjuague bucal hecho con materias primas naturales y de origen nacional.

En el presente estudio se extrajeron y caracterizaron los aceites esenciales de tres quimiotipos de *L. origanoides*, se determinó por separado el producto de la hidrodestilación de las hojas y las flores de la planta, se evaluó la capacidad antioxidante de los AE y se presenta una alternativa de uso para uno de ellos, aislado de las plantas de quimiotipo timol.

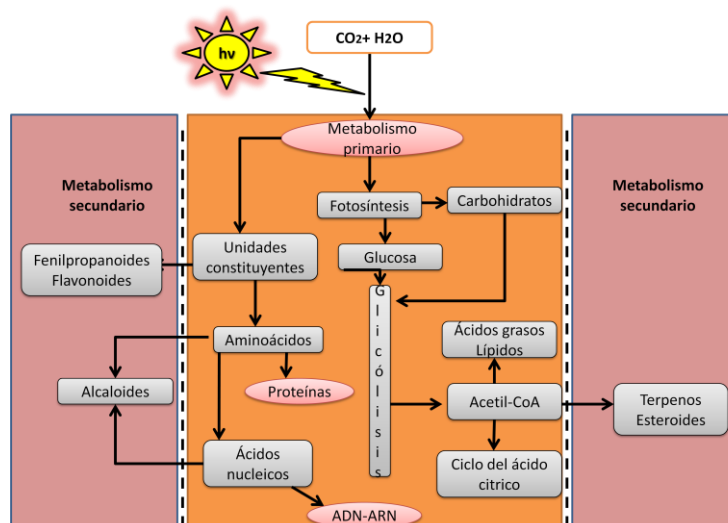
## 1. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 1.1 ESPECIES VEGETALES AROMÁTICAS Y METABOLISMO SECUNDARIO

#### 1.1.1 Metabolismo secundario

La mayor cantidad de carbono, de nitrógeno y energía asimilada por las plantas se emplea en la síntesis de moléculas fundamentales, que hacen parte del metabolismo primario; tienen como función suplir sus necesidades básicas, tales como: la fotosíntesis y síntesis de unidades constituyentes (**Figura 3**). Los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos son algunos ejemplos de estas moléculas.

Las plantas, a diferencia de otros seres vivos, destinan una cantidad significativa de nutrientes y energía para la síntesis de moléculas orgánicas que no tienen una función directa en los procesos vitales. A estas moléculas, se les denomina metabolitos secundarios [21], los cuales tienen una distribución diversa entre familias, géneros y especies en el reino vegetal. Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de insectos; algunos proporcionan el color a las flores y frutos; otros, que tienen función protectora, producen sabores amargos o incluso las hace venenosas [22].



**Figura 3.** Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas [21].

Los metabolitos secundarios se agrupan principalmente en:

- **Terpenos**
- **Compuestos fenólicos.**
- **Glicósidos.**
- **Alcaloides**

Los terpenos constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. La biosíntesis de estas moléculas da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia en la supervivencia de las plantas. Los terpenos se sintetizan a partir de los metabolitos primarios por dos rutas principales: la del ácido mevalónico y la ruta de metileritritol fosfato.

Muchas plantas producen mezclas de sustancias volátiles tales como alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenos de bajo peso molecular; estas mezclas se denominan aceites esenciales o metabolitos secundarios volátiles y son los responsables de los olores y sabores característicos de estas plantas, además de servir como repelentes de insectos o insecticidas. Los atributos que le confieren

los metabolitos secundarios volátiles a las plantas aromáticas, permiten que estas sean de especial interés en numerosos estudios para la búsqueda de compuestos con posible actividad biológica. Dentro de los campos de investigación más destacados se encuentra la búsqueda de metabolitos secundarios volátiles con actividad farmacológica, especialmente, con la propiedad de afectar los sistemas nervioso central y periférico. Otros campos de investigación son los estudios concernientes a la búsqueda de sustancias con elevada capacidad antioxidante, que eviten el estrés oxidativo en las células y, adicionalmente, reemplacen los antioxidantes sintéticos BHT (butilhidroxitolueno) y BHA (butilhidroxianisol), que se usan comúnmente en la preservación de alimentos. Diferentes estudios [23, 24] han permitido sospechar que estos antioxidantes sintéticos pueden causar diversas enfermedades, lo que ha incrementado el interés por la actividad antioxidante de sustancias de origen natural [23]. El contenido de fenoles y polifenoles en ciertas especies de diversos géneros, tales como *Origanum* [24], *Thymus* [25], *Lippia* [26], les ha conferido buena capacidad antioxidante y antirradicalaria, examinada bajo diversos métodos [27]. Otra de las evaluaciones biológicas de AE de las plantas se emplea en la búsqueda de sustancias con la capacidad antinociceptiva; la especie *Nigella sativa* (Fam. *Ranunculaceae*), fue investigada por Abdel-Fattah *et al.* en el 2000, y se demostraron sus buenas propiedades antinociceptivas [28] atribuidas principalmente a la presencia de la timoquinona que es uno de los componentes mayoritarios en su AE. Las capacidades antiviral, antibacterial y antifúngica también han sido propiedades ampliamente buscadas en los AE con el objetivo de reemplazar sustancias sintéticas que causan problemas colaterales [29].

### **1.1.2 Familia Verbenaceae**

La familia de las Verbenáceas comprende 100 géneros y unas 2000 especies, aproximadamente, en regiones tropicales, subtropicales y templadas [30], como se muestra en la **Figura 4**. Algunos de sus géneros se cultivan como ornamentales, otros, entre tanto, son utilizados en la medicina popular, sobre todo,

los que son aromáticos como es el caso de *Lippia citriodorata* Kunth y *Aloysia palau*. Morfológicamente son distinguibles por sus flores hermafroditas con forma bilabiada, poseen un tubo largo y encorvado con cuatro estambres de los cuales dos son más largos. Las hojas son generalmente opuestas, enteras o divididas, sin estípulas y en ocasiones muy reducidas, lo que se compensa con la forma de los tallos. El contenido de los metabolitos secundarios varía significativamente entre los diferentes géneros pertenecientes a esta familia, a estas sustancias se atribuyen propiedades diversas, que van desde el tratamiento contra enfermedades digestivas, como es el caso de *Callicarpa arborea* Roxb, hasta el tratamiento de la malaria (*Duranta plumieri* Jacq) [31] y virus de la fiebre amarilla, por parte de la especie *L. origanoides* [32].



**Figura 4.** Distribución geográfica de la familia Verbenaceae [30].

### 1.1.3 Género *Lippia*

Es un género botánico perteneciente a la familia de las Verbenáceas [33]. Los arbustos de este género botánico son generalmente aromáticos y miden de 0,7 a 2,0 m de altura; presentan hojas opuestas o ternadas, en algunos casos, alternas, enteras, dentadas-aserradas o lobadas; las inflorescencias están constituidas por muchas flores.

El género *Lippia* [31] está compuesto por aproximadamente unas 200 especies distribuidas por un amplio espacio geográfico que comprende, principalmente, los países de América Central y del Sur, así como en los territorios tropicales de África. El vasto espacio geográfico de distribución, ha permitido que se le asigne una gran variedad de usos tradicionales, tales como tratamientos gastrointestinales y respiratorios principalmente.

De las 200 especies solamente 46 han sido evaluadas químicamente [34]. Como consecuencia de que la mayoría de las especies son aromáticas, los estudios de este género, han estado enfocados principalmente en la composición del aceite esencial. Muy pocos estudios se han dedicado a los constituyentes no volátiles. La diferencia en la composición del aceite esencial de una misma especie de *Lippia*, está relacionada con los diferentes orígenes geográficos de la planta; lo cual la hace especialmente atractiva para numerosos estudios. Una gran cantidad de especies de este género presentan actividad biológica alta: antibacterial, antifúngica y, en algunos casos, antiviral, gracias a la diversidad de componentes presentes en los diferentes AE [35]. La composición química de muchas especies de este género ha sido investigada por medio de técnicas cromatográficas. Los componentes que aparecen con mayor frecuencia en el aceite esencial de las *Lippias* son: limoneno,  $\beta$ -cariofileno, *p*-cimeno, alcanfor, linalol,  $\alpha$ -pineno y timol [34]. Algunas especies muestran una composición variable dependiendo de las condiciones de suelo, de altitud, de exposición al sol, lluvia y posibles variaciones estacionales a las que han sido sometidas, a cada una de las variedades químicas de plantas se les denomina “quimiotipo”. Matos *et al.* en 1996 reportaron dos quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown al nordeste de Brasil, uno, con alto contenido de citral, y el otro, con una elevada cantidad de carvona [31]. Stashenko *et al.* en 2010, reportaron tres diferentes quimiotipos de *L. organoides* en Colombia, más específicamente en el cañón del río Chicamocha, uno, rico en

felandrenos, el otro, con elevado contenido de carvacrol y, finalmente, el tercero, con timol como componente predominante[32].

El hallazgo de tres quimiotipos de la especie *L. origanoides* ha generado un especial interés por esta planta, especialmente, por los quimiotipos timol y carvacrol, que han demostrado tener propiedades antibacteriales, antifúngicas e incluso antivirales, atribuibles a sus componentes principales: timol y carvacrol.

La especie *L. origanoides* crece como planta silvestre en América Central, norte de Suramérica y las Antillas, principalmente. En Colombia es conocida como “orégano de monte”. Se encuentra entre los 500 y 2500 m de altitud, principalmente, en la península de la Guajira, Santander, Cauca, Nariño, Boyacá, entre otros. En Santander se encuentra en las orillas del río Chicamocha en Jordán Sube [11]. Llega a crecer hasta 3 m, es muy ramificada. Las ramas sobredondeadas, con hojas opuestas decusadas, con tamaños dependientes del ambiente al que sea sometida la planta. Posee, además, inflorescencias axilares verticiladas, 4-6 por axila; pedúnculos que varían en longitud entre 1-6 mm. Los frutos núculos, con semillas de coloración café, con un diámetro aproximado de 0,25 mm [36]. Los usos etnofarmacológicos de esta planta dependen de la comunidad y de los conocimientos ancestrales que se han recopilado, como lo demostraron Oliveira *et al.* en 2004 [37]. Las hojas secas, molidas y mezcladas con otras especies, son usadas tradicionalmente como un condimento natural. Las infusiones de las hojas y flores se utilizan para tratar dolores de estómago, para disminuir las náuseas, para las indigestiones ocasionadas por ciertas bacterias y otros microorganismos y como un antiséptico natural [37].

#### **1.1.4 Bioactividad del timol y del carvacrol**

El timol y el carvacrol son dos monoterpenoides que pertenecen a los metabolitos secundarios vegetales del tipo fenilpropanoide. Están presentes en una amplia variedad de plantas, entre las cuales se encuentra el género *Thymus*; se destacan

dos plantas principalmente: *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis*, son importantes por su alto contenido de estos fenoles y por ser comercializadas ampliamente. También se encuentran en varias especies del género *Origanum*. Se destacan algunos quimiotipos de *Origanum vulgare*. Se han reportado cantidades significativas de estos compuestos en el género *Lippia*, e.g. *L. sidoides*, *L. graveolens*, *L. microphilla* y *L. origanoides* [38, 39].

Los dos compuestos fenólicos, timol y carvacrol, muestran un fuerte efecto inhibitorio en el crecimiento de microorganismos en general; han sido propuestos como componentes que afectan la actividad enzimática y la integridad de la membrana celular mediante reacciones con algunas de las proteínas [29]. Griffin *et al.* reportan que este efecto se atribuye al grupo hidroxilo presente en las estructuras moleculares del timol y carvacrol que interactúan con las proteínas volviéndolas más permeables al medio externo, causando de esta manera la inhibición del crecimiento de las colonias microbianas. Adicionalmente, este autor reporta la concentración mínima inhibitoria de varias familias de compuestos presentes en las plantas sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, mostró que el timol y el carvacrol son los componentes con las menores concentraciones de inhibición de estos microorganismos [40]. Didry *et al.* reportaron la concentración mínima inhibitoria de estos dos fenilpropanoides frente a bacterias orales. Los resultados mostraron concentraciones de carvacrol y timol relativamente bajas, entre 125-500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabla 1) para la inhibición de las bacterias más frecuentes en la cavidad bucal [41].

**Tabla 1.** Actividad antimicrobiana del carvacrol y del timol en términos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) [29, 40 y 41].

Microorganismo	CMI $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	Carvacrol	Timol
<i>Escherichia coli</i>	980	1000
<i>Salmonella typhimurium</i>	225	56
<i>Staphylococcus aureus</i>	980	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3990	2000
<i>Candida albicans</i>	490	500
<i>Streptococcus mutans</i>	250	250
<i>Streptococcus mitis</i>	125	125
<i>Prevotella buccae</i>	250	250

## 1.2 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES

La necesidad de la obtención de metabolitos secundarios volátiles (MSV) de las plantas, ha generado una gama amplia de posibilidades de aislamiento. La tendencia de la mayoría de estas técnicas para la obtención de MSV se basa en su conservación en la forma más natural posible, sin solvente. Otra tendencia en el diseño de estas técnicas es evitar los calentamientos excesivos que descompongan las moléculas termolábiles, con el fin de conseguir la mayor cantidad de sustancias que representen la fracción volátil de las plantas aromáticas y medicinales. Cuatro son las técnicas que se usan más comúnmente para este fin: hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), destilación-extracción simultánea con solvente (SDE), extracción con fluido supercrítico (SFE) y microextracción en fase sólida (SPME) [42]. SPME ha permitido la caracterización de los componentes más volátiles en plantas, por ejemplo, el análisis en vivo de flores [43]. Entre tanto, SFE se emplea en el aislamiento de componentes más pesados, como diterpenoides, fitoesteroles y compuestos de polaridad baja, debido a las características del  $\text{CO}_2$ , el fluido más

comúnmente utilizado [44]. SDE se usa regularmente en la extracción de monoterpenos y sesquiterpenoides, mientras que MWHD extrae el AE con un perfil similar al obtenido por destilación por arrastre con vapor, como normalmente se hace a escala industrial.

### 1.2.1 Hidrodestilación asistida por microondas

El efecto de las microondas depende de la naturaleza del solvente empleado y la matriz. Cuanto mayor sea la constante dieléctrica mayor será su “visibilidad” a las microondas y el calentamiento se efectuará más rápidamente, suministrando de esta manera una mayor energía. El agua es el solvente por naturaleza más empleado por su relativo bajo costo y su elevada constante dieléctrica [45], como se muestra en la **Tabla 2**.

MWHD es una técnica empleada para el aislamiento del AE de las plantas [26] de forma rápida, sencilla y relativamente económica. El aislamiento del AE puede llevarse a cabo en aproximadamente 45 min, en comparación con la hidrodestilación convencional que tarda entre 3 y 4 horas.

**Tabla 2.** Constantes dieléctricas de diferentes solventes [45].

<b>Solvente</b>	<b>Constante dieléctrica <i>D</i> (25°C)</b>
Acetona	20,7
Etanol	24,6
<i>N</i> -Metilpirrolidona	32,2
Metanol	32,7
<i>N,N</i> -Dimetilformamida	36,7
Acetonitrilo	37,5
Dimetilacetamida	37,8
Dimetilsulfoxido	46,7
Agua	80,1

El montaje de MWHD ha sufrido diversas modificaciones desde la patente hecha en 1992 por J. Paré [46]. En una de esas modificaciones elaboradas por Stashenko *et al.* [47], se sumerge el material vegetal en agua y se somete a la radiación de microondas; se eleva la presión de vapor del agua hasta superar la resistencia hidráulica del lecho vegetal, se genera rompimiento de las estructuras celulares, lo que permite liberar los volátiles, que son condensados, posteriormente, con el agua en una trampa tipo *Dean-Stark*.

### **1.2.2 Destilación-extracción simultánea con solvente**

Esta técnica se basa en la combinación de la hidrodestilación y la extracción líquido-líquido. El primer diseño de este montaje fue propuesto en por Lickens y Nickerson [48]; desde entonces se han presentado varias modificaciones según las diversas necesidades de los investigadores. Como es el caso de las variaciones propuestas por Godefroot *et al.* [49], quienes plantearon una reducción de dimensiones para la utilización de una menor cantidad de material. Este método permite operar con solventes de densidad mayor o menor que el agua, inmiscibles con ella. El solvente más utilizado para una configuración de mayor densidad, es el diclorometano por sus propiedades de solvatación de los diferentes componentes presentes en el AE. La técnica resulta ventajosa por el poco material vegetal que se emplea, así como el uso de cantidades bajas de solvente. Por otro lado, SDE permite realizar tres pasos importantes para el análisis de los metabolitos secundarios volátiles: (1) el aislamiento del material vegetal en la etapa de hidrodestilación, (2) la extracción con un solvente orgánico para el análisis cromatográfico y (3) una etapa final de concentración en el solvente empleado.

Otras modificaciones a la técnica incluyen la incorporación de bombas de vacío para evitar la descomposición térmica, empleadas por Pollien y Chaintreau [50], para la disminución de puntos de ebullición del agua y del solvente.

Adicionalmente, con esta modificación se hace posible una reducción considerable del tiempo de extracción.

### **1.3 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES**

Los aceites esenciales son mezclas complejas que están compuestas por una gran variedad de sustancias. Eso hace necesario la utilización de una técnica de separación para la posterior caracterización de cada uno de los componentes. La mejor opción para satisfacer esta necesidad es la cromatografía, más específicamente, la cromatografía de gases capilar. El desarrollo de esta técnica junto a los diversos detectores, a saber: de ionización de llama (FID), selectivo de masas (MSD) y el acoplamiento con espectroscopia infrarroja, permitió el avance en el análisis de la fracción volátil del AE [51]. El avance de estas técnicas de análisis ha hecho posible el descubrimiento de nuevas sustancias que presentan notable actividad biológica. Este es el caso del limoneno y el alcohol perílico que inhiben el crecimiento de tumores mamarios, induciendo la apoptosis de las células cancerosas [52]. La obtención de alcohol perílico, a partir de sus fuentes primarias (lavanda, menta, menta verde, cerezas y las semillas de apio), y el limoneno, a partir de frutos cítricos, fue posible por el desarrollo de técnicas analíticas de identificación y elucidación de la estructura química, para los posteriores ensayos de bioactividad.

#### **1.3.1 Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es una técnica de separación que se basa en el fenómeno de partición de los componentes de una mezcla entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria que se encuentra retenida en el interior de una columna. La distinta afinidad de los componentes por la fase estacionaria es la que determina el orden de salida de la columna cromatográfica. Esta columna se coloca en un horno que permite que la temperatura sea un factor decisivo en la separación de los diferentes componentes. Las columnas cromatográficas empleadas actualmente son capilares, es decir, tienen un diámetro muy pequeño,

generalmente de 0,25 mm o menor, pero son muy largas, normalmente de 25 a 60 m y algunas hasta 100 m. Para el análisis de los aceites esenciales normalmente se emplean dos tipos de fases estacionarias: poli(etilenglicol) (DB-WAX<sup>®</sup>) que es una fase estacionaria polar, y poli(dimetilsiloxano) (e.g.,DB-5MS<sup>®</sup>) una fase estacionaria apolar; la elección de la columna está sujeta a la naturaleza de la muestra que se va a analizar, la polaridad, el diámetro y la longitud de la columna son variables que afectan considerablemente la eficiencia de la separación [53]. El cromatógrafo de gases está integrado por 4 partes básicas, a saber: el inyector, la columna, el detector y el sistema de adquisición de datos [51].

### **Detector de ionización de llama**

El detector de ionización de llama es tal vez uno de los más ampliamente usados en cromatografía de gases, principalmente por la respuesta que ofrece para compuestos con cadenas carbonadas. En su funcionamiento el gas que proviene de la columna cromatográfica se mezcla con hidrógeno y posteriormente se quema en una cámara con exceso de aire, generando de esta manera iones de los compuestos eluidos. Alrededor de la llama formada, se dispone de un electrodo cilíndrico al cual se le aplica un voltaje relativamente alto. La medición de la corriente iónica que se establece entre el quemador y el electrodo cilíndrico, se realiza con un amplificador de alta impedancia y la salida alimenta a un sistema de adquisición de datos o un registrador potenciométrico [54].

### **1.3.2 Espectrometría de masas**

La identificación de una sustancia se sustenta en su patrón de fragmentación, que, por ser característico de cada sustancia, se puede utilizar como su “huella digital”, que representa directamente su estructura. La espectrometría de masas con ionización por impacto de electrones se basa en la generación de iones en fase vapor, por la interacción entre las moléculas de analito y un haz de electrones producidos a partir de un filamento de tungsteno al que se le aplica una diferencia de potencial. Esa interacción suministra la energía suficiente para la salida de un

electrón, que permite cargar la molécula inicialmente neutra, se genera así un ion molecular. El suministro de energía en exceso por parte del electrón puede dar lugar a la fragmentación para la generación de nuevos iones o moléculas neutras, que evidencian la presencia de ciertos grupos funcionales que constituyen las moléculas.

Esta técnica comprende 5 pasos vitales [51]:

1. Introducción de la muestra
2. Ionización de los analitos en fase gaseosa a presión reducida
3. Separación de los iones formados acorde con su relación masa-carga ( $m/z$ ) mediante un analizador.
4. Detección de los iones y medición de la corriente iónica
5. Procesamiento de los datos

### **1.3.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

La identificación tentativa de una molécula requiere de la capacidad de establecer la naturaleza y la estructura química, como es el caso de la espectrometría de masas [55]. El inconveniente de esta técnica es el requerimiento de la sustancia “pura” o aislada para el análisis; esto se logra con el acoplamiento de una técnica de separación como la cromatografía de gases, lo que genera un método conveniente para el análisis de mezclas complejas, que contengan sustancias de bajo peso molecular.

La confiabilidad de los datos obtenidos a través de esta técnica, para la identificación tentativa de sustancias, se incrementa con la combinación entre el espectro de masas y el índice de retención, el cual se halla a partir de los tiempos de retención de la sustancia de interés y una serie homóloga de hidrocarburos analizada bajo los mismos parámetros cromatográficos. La identificación se realiza por comparación de los espectros de masas experimentales con los reportados en

diferentes bases de datos, e.g., ADAMS, WILEY y NIST. Para la identificación confirmatoria se hace necesario el uso de patrones certificados con la respectiva verificación de las rutas de fragmentación del compuesto.

## **1.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

### **1.4.1 Mecanismo de transferencia de protón y ensayo ORAC**

Este método fue desarrollado inicialmente por Cao [56], con el propósito de medir la capacidad antioxidante de algunas sustancias aplicadas como conservantes en alimentos, farmacéutica y en la industria de los cosméticos. Inicialmente, consistía en la pérdida de la fluorescencia de  $\beta$ -ficoeritina ( $\beta$ -PE), por reacción con los radicales peroxilo formados a partir de diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) a 37°C. En el ensayo se observa el efecto protector por parte de los antioxidantes que reaccionan con los radicales peroxilo, hecho que se refleja en el área bajo la curva (ABC) del decaimiento de la fluorescencia de la muestra en comparación con un blanco. Esta metodología tenía algunas desventajas, entre ellas, la proteína empleada producía inconsistencias en los resultados de lote a lote. Por otra parte, la  $\beta$ -ficoeritina no es fotoestable y presenta algunos declines dramáticos en la fluorescencia sin la adición del radical AAPH, lo que causa variaciones en los resultados. Por lo anterior, Ou *et al.* [57] implementaron una metodología para el reemplazo de la proteína  $\beta$ -PE por fluoresceína (FL) 3',6'-dihidroxi-espiro[isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanten]-3-ona, una molécula fotoestable y no reactiva en presencia de polifenoles. Esto permitió también reducir costos en el análisis.

### **1.4.2 Mecanismo de transferencia de electrón y ensayo ABTS**

El método ABTS es utilizado ampliamente en la evaluación de la capacidad antioxidante de materiales biológicos, sustancias puras y extractos de plantas. El compuesto cromógeno ABTS presenta una coloración azul-verdosa. Esto le

permite actuar también como indicador. Este presenta alta solubilidad en agua y se le atribuye alta estabilidad química.

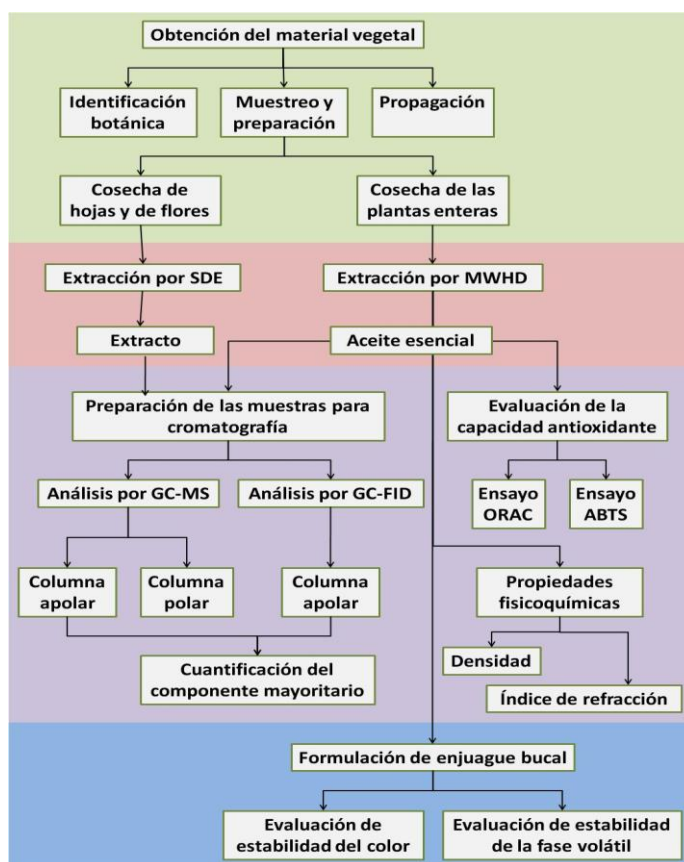
A partir de ABTS, se puede generar el radical de dos formas: enzimáticamente o químicamente. La generación enzimática se lleva a cabo por medio de la peroxidasa, que se oxida en presencia de  $H_2O_2$ . La generación química se da por la reacción con persulfato de sodio; una vez formado el radical, se reduce en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno.

El ensayo puede hacerse de dos maneras: en la primera, se añaden previamente los antioxidantes y se inhibe la formación del catión-radical; esta metodología puede mostrar resultados aparentes, producto de posibles reacciones con los reactivos y enzimas, por lo cual no es muy usada.

El segundo método, implementado por Re *et al.* [58], para medir la capacidad antioxidante, consiste en la decoloración del ABTS por acción de los antioxidantes presentes en la matriz por analizar. En este caso, se añaden los antioxidantes una vez se ha formado el radical  $ABTS^+$ . Se determina la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical.

## 2. METODOLOGÍA

En la **Figura 5** se resume esquemáticamente la metodología del trabajo. Se presentan en fondo de color diferente las cuatro etapas que se desarrollaron; en verde, se muestran los pasos correspondientes a la obtención del material vegetal y su correspondiente preparación; en rosado, la etapa de extracción; en morado, el análisis de composición química y constantes fisicoquímicas y en azul, la etapa de formulación y evaluación de estabilidad del enjuague bucal.



**Figura 5.** Resumen esquemático de la metodología del trabajo.

### 2.1 OBTENCIÓN Y PROPAGACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas con las que se trabajó se propagaron por esquejes de muestras recolectadas en el municipio de Jordán-Sube (Santander), que se encuentra en las

coordenadas 6° 44' N, 73° 6' y 425 m de altitud, tiene una temperatura media de 34-38°C y presenta una precipitación anual de 1151 mm [59]. Dichos esquejes se sembraron en las parcelas experimentales de Cenivam, que se encuentran en el interior del campus de la Universidad Industrial de Santander, en Bucaramanga, ciudad que se encuentra a 1018 m de altitud, tiene una temperatura media de 23 °C y una precipitación anual de 1018 mm [60].

Las plantas se dejaron crecer y se cosecharon durante su floración. En la **Tabla 3** se reporta la cantidad de plantas que se estudiaron por cada quimiotipo.

**Tabla 3.** Número de especímenes analizados por quimiotipo.

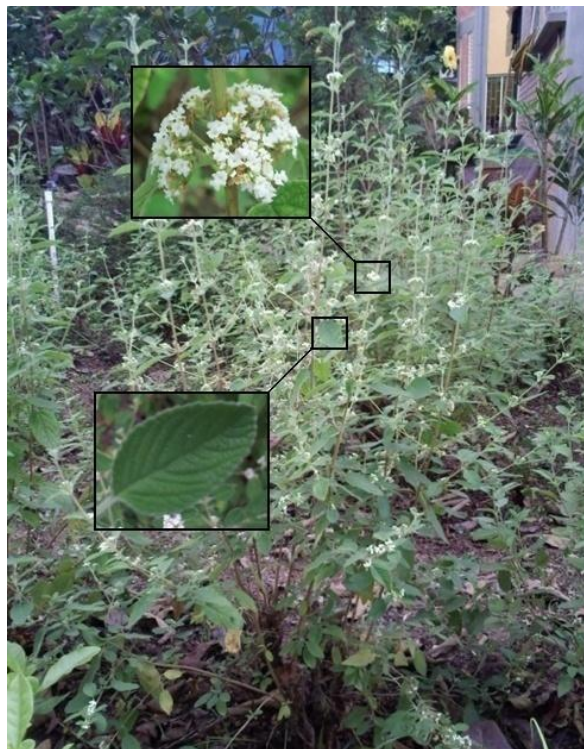
Quimiotipo	Nº de especímenes
Timol	38
Felandreno	36
Carvacrol	31

Como información complementaria, se solicitó un estudio de suelos de las parcelas experimentales que se utilizaron (**Anexo 3**).

## **2.2 MUESTREO Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

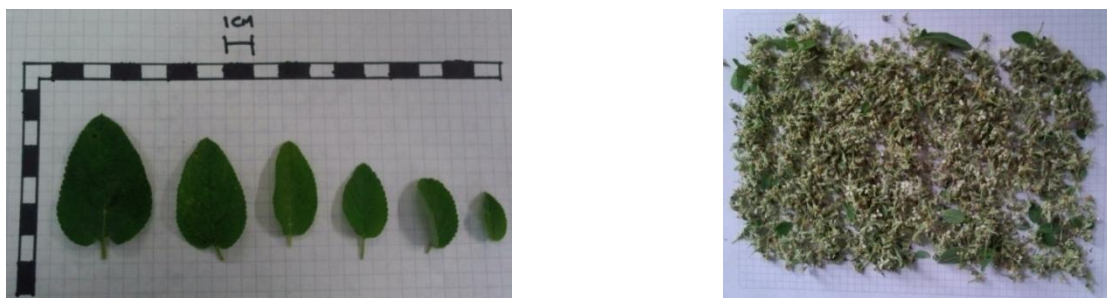
La cosecha se realizó en dos etapas, en cada una de ellas se obtuvo el material vegetal necesario para la extracción mediante destilación-extracción simultánea o hidrodestilación asistida por radiación de microondas. En la colecta para la primera técnica, se retiraron manualmente de las plantas, aproximadamente 50 g de hojas o de flores. En la colecta para la segunda técnica, se cortaron manualmente las plantas completas, realizando un corte oblicuo a 10 cm del suelo. Las dos clases de cosecha se realizaron en las primeras horas de la mañana y el material recogido se sometió a extracción durante el mismo día de corte.

En estudios realizados sobre *L. origanoides* por Ruiz y colaboradores [12] y en otro hecho por Senatore y colaboradores [13] sobre el *Thymus pulegioides*, se reporta que el rendimiento de extracción de metabolitos secundarios volátiles mediante MWHD presenta una caída considerable en el periodo intermedio entre floraciones. Por tanto, se realizó la cosecha durante la floración. En la **Figura 6** se muestra un primer plano de la planta de *L. origanoides* y un acercamiento a una de sus hojas y a uno de sus brotes florales.



**Figura 6.** Primer plano de planta de *Lippia origanoides* H.B.K. en floración.  
Fotografía tomada por los autores (Bucaramanga, 27 de octubre de 2011).

En la **Figura 7** se muestran las hojas y las flores recolectadas, que se separaron manualmente de impurezas como insectos, tallos secos y tierra.



**Figura 7.** Relación de tamaño de hojas (izquierda) y flores (derecha) recogidas.  
Fotografía tomada por los autores (Bucaramanga, 20 de octubre de 2011).

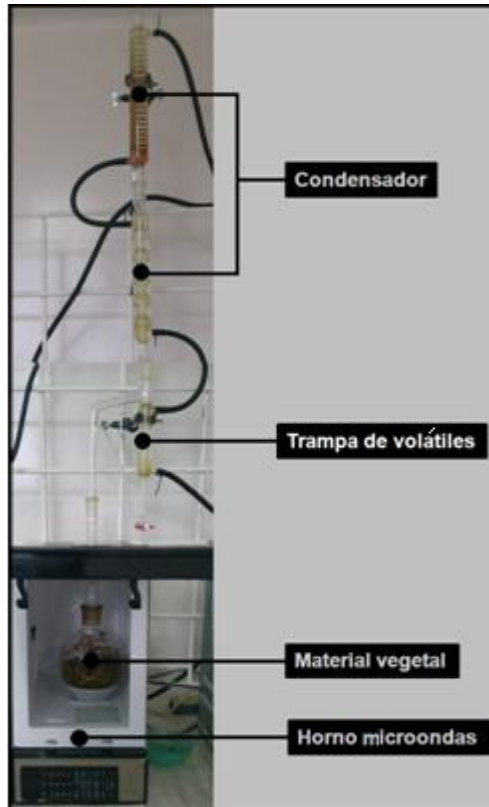
### 2.3 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS VOLÁTILES SECUNDARIOS

Se ha reportado extracción de los AE mediante destilación de arrastre con vapor [61] e hidrodestilación [62-63]; el AE solamente puede obtenerse por arrastre con agua o vapor. Con frecuencia estas técnicas requieren cantidades superiores a los 100 g de muestra, por lo tanto, en un estudio en el que se dispongan pequeñas cantidades de muestra será necesario utilizar una técnica que requiera una cantidad menor de material vegetal. Con este propósito, se han empleado algunas técnicas de espacio de cabeza, Stashenko *et al.* [26] reportan haber usado SDE, SPME, S-HS en el estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Xylopija aromatica*; Ceva-Antunes *et al.* [64] reportan haber utilizado de 6 a 9 g de material vegetal en su estudio mediante SDE y SPME. Con base en la disponibilidad de material vegetal, es decir, de la pequeña cantidad en peso de flores que se puede conseguir en cada periodo de floración, la técnica SDE se escogió para examinar la diferencia de composición química en hojas y flores, y la técnica MWHD para la extracción de los AE.

#### 2.3.1 Extracción mediante MWHD

Se utilizó la metodología descrita por Stashenko *et al.* [26,65]. Se pesó el material vegetal (200 g) en una balanza Mettler Tolero PB 1502-S (Küsnacht, Suiza), se introdujo en un balón redondo de 2L y se agregó agua destilada (300 mL). El balón se insertó en un horno LG Intelowave modelo MS-1242ZK de 1,2 kW y 2,5 GHz y se conectó al montaje mostrado en la **Figura 8**. Se utilizó un reservorio de

destilación *Dean-Stark* y dos condensadores en serie, de arriba abajo, en espiral y de bolas; conectados a un baño refrigerante a 4 °C.



**Figura 8.** Montaje de extracción de hidrodestilación asistida por radiación de microondas.  
Fotografía tomada por los autores (Bucaramanga, 27 de octubre de 2011).

La extracción se realizó en tres periodos de 15 minutos de calentamiento al 50% de potencia del horno, con un receso de 1 minuto entre ellos. Una vez terminada la tercera etapa de calentamiento, se dejó reposar durante 10 minutos la mezcla agua – aceite esencial contenido en el reservorio *Dean-Stark* y se recogió el AE en un tubo de ensayo. Posteriormente, se secó con sulfato de sodio anhidro (J.T. Baker, Phillisburg, EUA). La cantidad de AE seco se utilizó para determinar el rendimiento de la extracción, según la **Ecuación 1**:

$$R = \frac{W_{AE}}{W_{MV}} \times 100\% \quad (\text{Ec. 1})$$

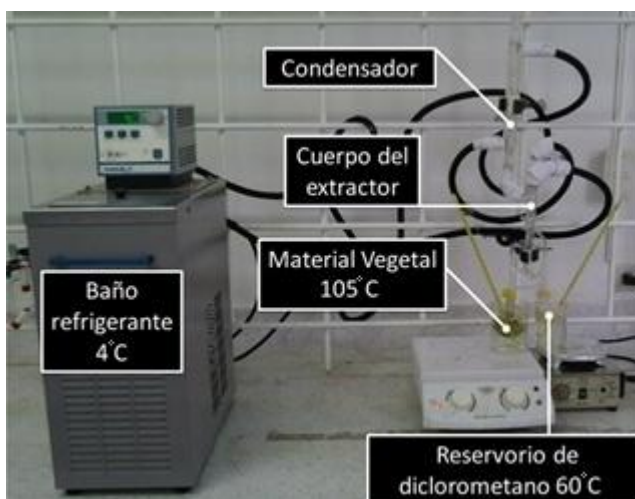
En donde:  $W_{AE}$  es el peso del aceite esencial;  
 $W_{MV}$  es el peso del material vegetal;  
 $R$  es el rendimiento de la extracción.

### 2.3.2 Extracción mediante SDE

Se utilizó un equipo similar al descrito por Godefroot *et al.* [49] y los parámetros de tiempo y temperatura reportados por Ruiz *et al.* [12].

Se necesitó de dos planchas de calentamiento, en una de ellas se puso un vaso de 600 mL con aceite mineral (250 mL), se calentó hasta 105 °C. En la otra plancha, se colocó un vaso de 100 mL con agua (60 mL) y se calentó hasta 60 °C. Se esperó hasta que las temperaturas se estabilizaran, no se agitó. Se utilizó un baño refrigerante, que se programó para sostener una temperatura de 4 °C.

Con las temperaturas estables se procedió a la incorporación de la muestra; para ello, se introdujo el material vegetal (10 g), flores u hojas en un balón redondo de 50 mL y se agregó agua destilada (30 mL); el balón se conectó al montaje como se muestra en la **Figura 9**. Luego, se agregó diclorometano (1,5 mL en la lágrima y 2 mL en el cuerpo) (Sigma-Aldrich, Bellafonte, EUA) a una lágrima de vidrio, que se conectó al cuerpo del montaje y al cuerpo del equipo de extracción.



**Figura 9.** Montaje de destilación-extracción simultánea con solvente.  
Fotografía tomada por los autores (Bucaramanga, 20 de octubre de 2011).

En contacto con los baños de calentamiento, los dos solventes, agua y diclorometano, bulleron; se esperó durante dos horas desde la aparición del burbujeo en el agua para considerar la extracción completa. Terminado ese lapso se dejó enfriar por 15 minutos y se recogió todo el diclorometano de la lágrima de vidrio.

## **2.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Para el análisis por cromatografía de gases, los AE se disolvieron en diclorometano, un solvente volátil, cuya respuesta cromatográfica no se superpone con las señales de las muestras; se eliminó el agua remanente con el sulfato de sodio anhidro

### **2.4.1 Preparación de los aceites esenciales**

El AE obtenido atravesó una pipeta Pasteur que contenía una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro, luego, se recogió en forma seca, sin trazas de agua, en un recipiente de color ámbar. Por separado, se agregó diclorometano (ca. 400  $\mu\text{L}$ ), una cantidad de AE (50  $\mu\text{L}$ ) y, como patrón interno, n-tetradecano (1  $\mu\text{L}$ ). Se aforó cuidadosamente hasta 1 mL y se agitó durante 5 minutos. Se trasvasó a un vial de vidrio con tapa perforable.

### **2.4.2 Preparación de los extractos**

La solución muestra-diclorometano obtenida del proceso de extracción con SDE se secó con sulfato de sodio y se concentró hasta un poco menos de 1 mL, luego, se agregó 1  $\mu\text{L}$  de tetradecano, se aforó a 1 mL y se agitó durante 5 minutos. Se trasvasó a un vial de vidrio con tapa perforable.

## **2.5 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Se realizaron dos ensayos a los tres AE, se determinaron la densidad relativa [66] y el índice de refracción [67] de cada uno de ellos.

### 2.5.1 Determinación de la densidad relativa

Para la medición de esta propiedad fisicoquímica se siguió la norma ISO 279 [66], para lo cual se colocó un picnómetro de 2 mL en un baño de agua a 20 °C y se esperó hasta que se estabilizara la temperatura. Hecho esto, se llenó el picnómetro con el AE. En el momento en que la temperatura se estabilizó a 20 °C, se tomó el peso. Se realizó la medida por triplicado para cada AE y para agua tipo1. Se calculó el valor de densidad relativa experimental usando la **Ecuación 2**.

$$Densidadrelativa = \frac{W_{AE} - W_{agua}}{W_{agua}} \quad (\text{Ec. 2})$$

### 2.5.2 Determinación del índice de refracción

Para la medición de esta propiedad fisicoquímica se siguió la norma ISO 280 [67]. Para lo cual se utilizó el dispositivo *Abbe* ATAGO NAR-1T (Tokio, Japón), que se conectó a un baño refrigerante programado a 20°C y se esperó hasta que se estabilizara la temperatura, se limpió con metanol y papel de arroz la superficie de lente, se midió el valor de índice de refracción por triplicado.

## 2.6 ANÁLISIS POR GC-MS

### 2.6.1 Uso de columna apolar

Se utilizó un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890N *Network GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* 5975 *Inert XL*. El puerto de inyección del cromatógrafo se dispuso en relación de *split* 30:1 y a 250 °C. El gas de arrastre fue helio (He 99,995%, Linde S.A.), a una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi y una velocidad de 1 mL/min. Se usó una columna DB5-MS (*J&W Scientific*, Folsom, EUA) de 60mx0,25mmx0,25µm, y de 5% fenil-poli(metilsiloxano).

En el método cromatográfico, la temperatura del horno comenzó en 45 °C y se mantuvo durante cinco minutos; luego, el horno se calentó a 4 °C/min hasta 150 °C y conservó esa temperatura durante 2 minutos, después, se calentó a 5 °C/min hasta 250 °C y conservó esa temperatura durante 5 minutos, finalmente, se calentó a 10°C/min hasta alcanzar 275°C y mantuvo esa temperatura durante 15 minutos.

Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por impacto de electrones con 70 eV de energía. La temperatura de la cámara de ionización fue de 230 °C y la de la línea de transferencia fue de 280 °C. Se utilizó un analizador cuadrupolar, programado en modo *full scan* en el rango de masas  $m/z$  40-350 Da.

### **2.6.2 Uso de columna polar**

Se utilizó un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890A GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975C Triple Axis Detector*. El puerto de inyección del cromatógrafo se dispuso en relación de *split* 30:1 y a 250 °C. El gas de arrastre fue helio (He 99,995%, Linde S.A.), a una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi y una velocidad de 1 mL/min. Se usó una columna DB-WAX (*J&W Scientific*, Folsom, EUA) de 60mx0,25mmx0,25µm, y con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol).

En el método cromatográfico, la temperatura del horno comenzó en 45 °C y se mantuvo durante 5 minutos; luego, el horno se calentó a 3 °C/min hasta 150 °C y se mantuvo la temperatura durante 3 minutos, finalmente, se calentó a 4 °C/min hasta los 220 °C y se mantuvo la temperatura durante 5 minutos. Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por impacto de electrones con 70 eV de energía. La temperatura de la cámara de ionización fue de 230 °C y la de la línea de transferencia fue de 250°C. Se usó un analizador cuadrupolar, programado en modo *full scan* en el rango de masas  $m/z$  40-350 Da.

## 2.7 ANÁLISIS POR GC-FID

Se utilizó un detector de ionización en llama para la cuantificación; la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas no proporciona información cuantitativa confiable, ya que la eficiencia de ionización es distinta para cada molécula, y por tanto, la señal cromatográfica varía.

Se usó un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890A Network GC System* acoplado a un detector de ionización en llama. El puerto de inyección del cromatógrafo se dispuso en relación de *split* 30:1 y a 250 °C. Se utilizó helio como gas de arrastre (He 99,995%, Linde S.A.) con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi y una velocidad de 1 mL/min. Las velocidades de flujo del aire y del hidrógeno fueron 300 y 30 mL/min, respectivamente. La columna usada fue una DB5-MS (J&W *Scientific*, Folsom, EUA) de 60mx0,25mmx0,25µm y de 5% fenil-poli(metilsiloxano). El método cromatográfico fue el mismo descrito en la sección 2.6.1.

### **Cuantificación de los componentes mayoritarios por el método de patrón externo**

Los componentes mayoritarios se cuantificaron usando el método de patrón externo. Para ello, se emplearon patrones certificados de timol, carvacrol y  $\alpha$ -felandreno. Se realizaron los cálculos para preparar la curva de calibración en el intervalo de concentración de 200-16000 ppm.

La curva se realizó de la siguiente manera: se agregaron 45 mg de patrón y se disolvieron con diclorometano hasta aforo (2 mL), se tomó el volumen correspondiente para cada punto, se agregó n-tetradecano (1 µL) y se aforó hasta 0,5 mL. El contenido se agregó en un microvial de 0,5 mL. Se utilizó el cromatógrafo y el método descrito en la sección 2.7.

Se obtuvieron los datos de la corrida cromatográfica y se graficó la relación del área del patrón de sustancia sobre el área del n-tetradecano en el eje vertical y la concentración en ppm de las soluciones patrón en el eje horizontal. Se obtuvieron los valores m y b de la **Ecuación 3** (que describe una recta) y se calculó el coeficiente de correlación, R. Se usó un mínimo de R<sup>2</sup> de 0.99 como criterio de validación de la curva de calibración.

$$\text{Concentración (ppm)} = m \frac{\text{Área sustancia}}{\text{Área tetradecano}} + b \quad (\text{Ec. 3})$$

Los AE se prepararon, en forma similar; las concentraciones de trabajo se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Concentraciones de trabajo de los AE estudiados.

<b>Aceite esencial</b>	<b>Concentración, ppm</b>
<b>Quimiotipo carvacrol</b>	25
<b>Quimiotipo felandreno</b>	50
<b>Quimiotipo timol</b>	25

Los resultados del análisis cromatográfico se incorporaron en la **Ecuación 3**, de donde se pudo obtener, a partir de la relación de áreas, la concentración (ppm) de cada una de las sustancias.

## **2.8 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Se determinó la capacidad antioxidante de los AE obtenidos, mediante la metodología implementada por Arias y colaboradores [68]. Se utilizó el lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, EUA), con placas de poli(estireno) de 96 pozos y equipado con módulos de absorbancia (UV-Vis) y fluorescencia.

Se realizaron dos diferentes ensayos para medir la capacidad antirradicalaria de los AE; el ensayo ORAC, que evalúa el mecanismo de protección mediante

transferencia de protón, y el ensayo ABTS, que valoran el mecanismo de protección mediante transferencia de electrón.

### 2.8.1 Ensayo ORAC

Se prepararon disoluciones del AE en metanol, de manera que el porcentaje de respuesta final, con respecto al inicial, fuera inferior al 5%. El valor de pH se estabilizó con solución amortiguadora de fosfato y se agitó con ultrasonido por 5 minutos. Posteriormente, se realizó la medida de fluorescencia con la longitud de onda de excitación de 490 nm y de emisión de 510-570 nm, siguiendo la metodología de Ou *et al.* [57], en la que se usa fluoresceína como indicador y como objetivo de la oxidación. La respuesta se reportó como el área bajo la curva (ABC) y se traza haciendo uso de las **Ecuaciones 4 y 5**.

$$ABC = 1 + \sum_{i=0}^n \frac{F}{F_0} \quad (\text{Ec. 4})$$

**F:** Fluorescencia en un tiempo *i*;

**F<sub>0</sub>:** Fluorescencia en el tiempo inicial.

El valor neto de ABC es la diferencia entre las dos curvas; la de la respuesta del experimento con AE y la de control (sin AE).

$$ABC_{Neta} = ABC_{Muestra} - ABC_{Blanco} \quad (\text{Ec. 5})$$

### 2.8.2 Ensayo ABTS

El principio de operación del método ABTS es la caída en la absorbividad por efecto de la disminución de la concentración del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>. Se preparó la muestra en forma similar a la descrita en la sección 2.8.1, pero con etanol como solvente y solución de acetato de sodio como amortiguadora del pH.

Se realizó la determinación de absorbancia cada dos minutos en la longitud de onda  $\lambda=750$  nm. La concentración del AE se escogió tras haber probado diferentes diluciones.

El resultado del ensayo se determinó como porcentaje de absorbancia (% Abs) del catión radical ABTS<sup>•+</sup> (**Ecuación 6**)

$$\%Abs_{\lambda 750nm} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{(Ec. 6)}$$

Donde: **A<sub>0</sub>**: Absorbancia del catión-radical ABTS<sup>•+</sup> en ausencia de la sustancia en estudio

**A**= Absorbancia del catión-radical ABTS<sup>•+</sup> determinada después de la adición de la sustancia en estudio

Los resultados de los dos diferentes ensayos se compararon con los resultados tomados bajo las mismas condiciones, pero con el uso de Trolox<sup>®</sup> como agente de protección. Los resultados se reportaron relativos a la señal del ensayo con Trolox<sup>®</sup>.

## 2.9 FORMULACIÓN DE ENJUAGUE BUCAL

Uno de los AE estudiados se usó en un producto de higiene oral: un enjuague bucal. Se elaboró una formulación que satisface los requerimientos fisicoquímicos de la norma Icontec NTC 5257 [69], que regula estos productos. Dichos requerimientos son: el pH debe estar entre 5,5 y 10,5 y el contenido de alcohol debe ser menor de 20 % (v/v).

Para formular el producto se consultaron algunas patentes. Clipper *et al.*[70] reportan una combinación estable de ingredientes, particularmente, en la sensación refrescante, hacen énfasis en la importancia del detergente para

generar una sola fase. Además, se necesita un elemento de enmascaramiento del fuerte olor del timol; en este sentido Talwar *et al.*[71] reportan que mezclas de azúcares, alcoholes de terpenos pueden cumplir este propósito. Los ingredientes y el propósito que cada uno de ellos cumple se muestran en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Propósito, en el enjuague bucal, de los ingredientes empleados en la formulación.

<b>Sustancia</b>	<b>Propósito</b>
<b>Alcohol</b>	Solvente orgánico
<b>Polisorbato 80</b>	Detergente
<b>Sorbitol</b>	Enmascarante de sabor e hidratante
<b>Propilenglicol</b>	Regulador de consistencia
<b>Salicilato de metilo</b>	Antibacterial y contribuyente al olor
<b>AE de <i>Lippia origanoides</i></b>	Antibacterial, fuente de timol
<b>AE de <i>Eucaliptus citriodora</i></b>	Antibacterial y contribuyente al olor
<b>AE de <i>Minthostachys mollis</i></b>	Principal contribuyente al olor y al sabor, antibacteriano
<b>AE de <i>Lippia alba</i></b>	Endulzante, fuente de carvona
<b>Agua destilada</b>	Solvente
<b>Benzoato de sodio</b>	Conservante
<b>Bicarbonato de sodio</b>	Regulador de pH
<b>Acido benzoico</b>	Acidulante
<b>Sacarina sódica</b>	Endulzante

### 2.9.1 Formulación

La preparación del enjuague bucal requiere la preparación paralela de una solución acuosa y una etanólica, ya que los AE no son solubles en agua, es necesario disolverlos primero en etanol. Las proporciones que se presentan suponen un volumen final de 300 mL, una cantidad usual en las presentaciones comerciales.

### **Preparación de la solución etanólica**

Se mezclan el etanol(64,3 mL), el polisorbato 80 (Tween 80) (6,43 mL), el sorbitol (32 mL), el propilenglicol (4,3 mL),el salicilato de metilo (300 µL) y el fluoruro de calcio (0,45 g), a temperatura ambiente, durante 10 minutos. A esta mezcla se agregan AE de *L. origanoides* quimiotipo timol (430 µL), AE de *Eucaliptus citriodora* (300 µL), AE de *Minthostachys mollis* (500 µL) y AE de *Lippia alba* quimiotipo carvona (800 µL). Se agita vigorosamente por diez minutos y se deja reposar.

### **Preparación de la solución acuosa**

A 30 °C, se mezclan el agua destilada (214,2 mL), el benzoato de sodio (3,2 g), el bicarbonato de sodio (2,6 g), el ácido benzoico (3,6 g), la sacarina sódica (0,21 g) y el colorante (40 mg). Se agita hasta conseguir homogeneidad en la solución y se deja enfriar.

Posteriormente, se mezclan las dos fases, se agita vigorosamente durante media hora y se deja reposar durante 6 horas. La solución resultante debe ser translúcida.

#### **2.9.2 Selección y ajuste del pH**

El ajuste de pH se hizo por aproximación, por medio de la adición de ácido benzoico hasta conseguir pH 7. La medición de acidez se realizó a temperatura ambiente y en ausencia del colorante.

#### **2.9.3 Evaluación de la estabilidad del color**

Se midió el cambio de color usando un espectrofotómetro *Perkin-Elmer Lambda Bio 10*. Se realizó la medida en modo *scan* en intervalo de  $\lambda=250-750$  nm y se determinó que la longitud de onda de mayor absortividad del enjuague bucal es  $\lambda=631.85$  nm. Se utilizó una celda plástica de 1 cm de ancho.

Alícuotas (10 mL) del enjuague bucal, tomadas del mismo lote, se sometieron a estrés térmico y por exposición a la radiación solar, con el propósito de simular las condiciones que el producto podría experimentar durante el transporte y el uso; se siguieron las recomendaciones dadas por la guía técnica colombiana correspondiente, GTC 215[72].

El aumento de temperatura se hizo en horno, la alícuota se mantuvo una temperatura de 70 °C durante 96 horas. La disminución de temperatura se hizo en un refrigerador, donde el enjuague bucal se mantuvo a 4 °C por 96 horas. La exposición a la luz se hizo en exteriores, la luz del sol irradió durante el periodo de luz de 5 días consecutivos. Una alícuota de control se almacenó a oscuras en temperatura ambiente.

Se tomó 1mL de cada muestra y se realizó por triplicado la medida de la absorbividad en  $\lambda=631,85$  nm

#### **2.9.4 Evaluación de la estabilidad de la fase volátil**

Se escogió la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) para evaluar el cambio en la fase vapor del enjuague bucal, por su robustez y facilidad de ejecución. Se tomaron 1,6 mL de cada una de las muestras sometidas a las pruebas de estrés descritas en la sección 2.9.3 y se agregaron a un vial ámbar de 15 mL con tapa con septum. Se agitó suavemente con una barra magnética y se dejó alcanzar el equilibrio térmico a 22 °C durante 10 minutos. Se probaron diferentes fibras de diferente naturaleza y, ya que los mejores resultados se obtuvieron con la fibra de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) de 100  $\mu$ m de espesor, se escogió esta. El criterio de selección de la fibra fue el área cromatográfica total observada. El tiempo de extracción fue 10 minutos y el tiempo de desorción en el puerto de inyección(250 °C) fue de 15 minutos.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Se determinó el rendimiento de la extracción de los aceites esenciales, los valores de rendimiento de los tres diferentes quimiotipos se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Rendimiento de extracción de los tres diferentes quimiotipos estudiados.

Quimiotipo	Rendimiento % $\pm$ s (n=5)	
	%	s
Carvacrol	1,2	0,1
Felandreno	0,17	0,05
Timol	0,86	0,06

Los resultados mostrados en la **Tabla 6** se compararon con los reportados por diferentes autores de Brasil y Colombia [12, 72, 73] (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Comparación con la literatura de los rendimientos de extracción de los AE.

Autores	% Rendimiento de AE de diferentes quimiotipos		
	Carvacrol	Felandreno	Timol
dos Santos <i>et al.</i> [72]	4,6	--	--
Oliveira <i>et al.</i> [73]	1,0	--	--
Ruiz [12]	--	0,47	1,6
Presente trabajo	1,2	0,17	0,86

A diferencia de como procedió el grupo de trabajo de dos Santos *et al.* [72], quienes reportan un rendimiento de extracción de aceite esencial rico en carvacrol de 4,6 %, el material vegetal se hidroddestiló fresco y por un periodo más corto de tiempo; dos Santos hidroddestiló el material vegetal seco durante 5 horas. La extracción, en este trabajo, se hizo en tres periodos de 15 minutos de calentamiento asistido por radiación de microondas.

Oliveira y colaboradores [73] reportaron rendimientos de extracción muy similares a los obtenidos en este estudio. Ellos usaron material vegetal fresco, que se hidrodestiló durante dos horas, un periodo de más del doble del utilizado en el presente trabajo. El rendimiento que reportaron fue de 1% v/p; como no se reportó el valor de la densidad del AE y el rendimiento en este estudio se reporta como peso de AE por unidad de peso de material vegetal hidrodestilado, fue difícil hacer una comparación precisa.

Ruiz y colaboradores [12] no estudiaron el quimiotipo rico en carvacrol, solo el quimiotipo timol y felandreno. Ellos reportaron valores de rendimiento de extracción superiores a los que se obtuvieron en el presente trabajo; sin embargo, hay que tener en cuenta que también se reportan variaciones en el rendimiento del AE relacionadas con el estado fenológico de las plantas.

### 3.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS

Se determinó la densidad relativa de los AE de los tres diferentes quimiotipos y el índice de refracción a 20 °C. Ambas mediciones siguieron las normas ISO correspondientes, ISO 279 [65] e ISO 280 [66], respectivamente. En la **Tabla 8** se muestran la densidad relativa y el índice de refracción de los AE.

**Tabla 8.** Resultados de la densidad y el índice de refracción de los AE de los tres quimiotipos.

Quimiotipo	Densidad g/mL		Índice de refracción 20 °C	
	20 °C		20 °C	
	$\bar{\delta}$	s	$\bar{x}$	s
<b>Carvacrol</b>	0,948	0,005	1,511	0,001
<b>Felandreno</b>	0,895	0,005	1,485	0,001
<b>Timol</b>	0,945	0,007	1,512	0,001

La densidad del timol y la del carvacrol, los dos compuestos mayoritarios de cada uno de sus quimiotipos, son de 0,96 y 0,98 g/cm<sup>3</sup>, respectivamente.

### **3.3 Análisis de la composición química de metabolitos secundarios volátiles**

#### **3.3.1 Análisis de los extractos obtenidos y diferencial de composición**

Se estudió la composición de los metabolitos secundarios volátiles de las hojas y las flores por separado, con la intención de determinar si existe diferencia composicional significativa en esas dos partes de la planta. En la **Tabla 9** se muestran los resultados del estudio mediante GC-MS, usando columnas polar y apolar. Se reportan las cantidades relativas de las sustancias con participación porcentual superior a 0,2%, con su respectiva desviación estándar; la naturaleza de la sustancia, los índices lineales de retención encontrados en cada una de las columnas y el nombre más común con el que se conoce el compuesto correspondiente. Se destacan los compuestos que mostraron una diferencia significativa entre hojas y flores.

**Tabla 9.** Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios volátiles presentes en flores y hojas de los tres quimiotipos de *L. origanoides*, aislados mediante la técnica SDE.

Compuesto	Tipo	IRL		Cantidad relativa % ± s (n=3)											
				Quimiotipo felandreno				Quimiotipo timol				Quimiotipo carvacrol			
		DB-5	DB-WAX	Flores	s	Hojas	s	Flores	s	Hojas	s	Flores	s	Hojas	s
α-Tujeno	M	928	1026	0,96	0,08	1,2	0,2	1,7	0,2	1,9	0,2	0,829	0,001	0,57	0,02
α-Pineno	M	937	1029	3,37	0,3	4,9	0,1	0,4	0,06	0,47	0,08	0,18	0,01	0,23	0,05
Canfeno	M	955	1070	0,57	0,02	0,83	0,04	tr		tr	-	tr	-	0,26	0,05
Sabineno	M	976	1126	2,44	0,2	1,09	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Octen-3-ol	M	980	1451	0,28	0,02	0,61	0,08	0,24	0,05	0,2	0,02	-	-	-	-
β-Pineno	M	982	1115	0,95	0,05	1,17	0,05	tr	-	tr	-	tr	-	-	-
β-Mirceno	M	990	1166	1,87	0,06	2,3	0,06	3,6	0,5	4,5	0,7	1,77	0,06	2,3	0,2
α-Felandreno	M	1012	1173	16	1	15	1,5	0,35	0,02	0,31	0,04	0,19	0,01	0,25	0,03
Δ <sup>2</sup> -Careno	M	1021	-	0,73	0,08			2,8	0,3	3,3	0,4	1,81	0,02	2	0,4
p-Cimeno	FP	1030	1278	8,9	0,9	9,3	0,2	9	1	10	1	8,5	0,2	8,1	0,4
Limoneno	M	1035	1205	5,9	0,9	7,9	0,4	0,5	0,07	0,61	0,08	0,21	0,01	0,26	0,09
β-Felandreno	M	1040	1217	21	1	25,3	0,6	0,36	0,05	0,6	0,08	0,62	0,03	0,65	0,05
1,8-Cineol	MO		1220	1,3	0,1	3,75	0,01	0,4	0,1	0,36	0,05			-	
γ-Terpineno	M	1063	1253	3,4	0,3	0,19	0,01	9,2	0,6	10	1	12,7	0,3	13,5	0,5
cis-Hidrato de sabineno	MO	1075	1555	tr	-	0,24	0,04	0,4	0,1	0,77	0,01	-	-	-	-
Terpinoleno	M	1090	1290	0,37	0,02	0,15	0,02	-	-	0,2	0,02	-	-	-	-
Linalol	MO	1101	1550	0,52	0,06	0,3	0,02	0,6	0,1	0,61	0,02	0,52	0,04	0,59	0,08
trans- Hidrato de sabineno	MO	1106	1473	0,2	0,1	0,26	0,03	tr	-	-	-	-	-	-	-
Borneol	MO	1181	1725	0,48	0,07	0,12	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Terpineol	MO	1188	1603	1,6	0,1	0,15	0,02	1	0,1	0,78	0,08	1,35	0,04	1,51	0,07
α-Terpineol	MO	1186	1645	1,6	0,2	1,23	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
Umbellulona	MO	1191	1656	tr	-			0,8	0,5	0,3	0,2	-	-	-	-
Metil timol éter	FP	1231	1600	tr	-			4,4	0,4	2,53	0,04	2,95	0,04	2,73	0,05
Carvacrol metil éter	FP	1238		-	-	0,4	0,01							-	

Timol	FP	1292	2191	0,2	0,1	0,12	0,06	45	2	49	4	9,4	0,4	9,7	0,7
Carvacrol	FP	1300	2221	0,9	0,1	0,21	0,08	0,26	0,02	0,24	0,01	48,1	0,8	41,8	0,9
Acetato de timilo	FP	1348	1859	tr	-	tr	-	4	1	2	0,1	0,27	0,01	0,32	0,05
Acetato de carvacrilo	FP	1359		-	-	-	-					1,3	0,3	1,15	0,3
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	S	1438	1617	9	1	4,5	0,2	3,8	0,6	2,8	0,3	2,7	0,2	2,9	0,2
<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoteno	S	1442	1597	0,22	0,03			0,55	0,05					-	
$\alpha$ -Humuleno	S	1473	1689	4,9	0,9	2,2	0,1	2,2	0,3	1,42	0,04	1,52	0,07	1,57	0,09
Germacreno D	S	1495	1724	1,2	0,3	0,34	0,04							-	
Biclogermacreno	S	1510	1748	1,2	0,2	0,42	0,03							-	
Óxido de cariofileno	S	1601	2003	0,3	0,2	0,5	0,1							-	
$\alpha$ -Eudesmol	SO	1652	2241	0,79	0,07	0,5	0,1							-	

M: Monoterpenos

MO: Monoterpenos oxigenados

S: Sesquiterpenos

SO: Sesquiterpenos oxigenados

FP: Fenilpropanoides

tr: Trazas

**Tabla 10.** Componentes mayoritarios en hojas y flores de los tres quimiotipos de *L. origanoides*.

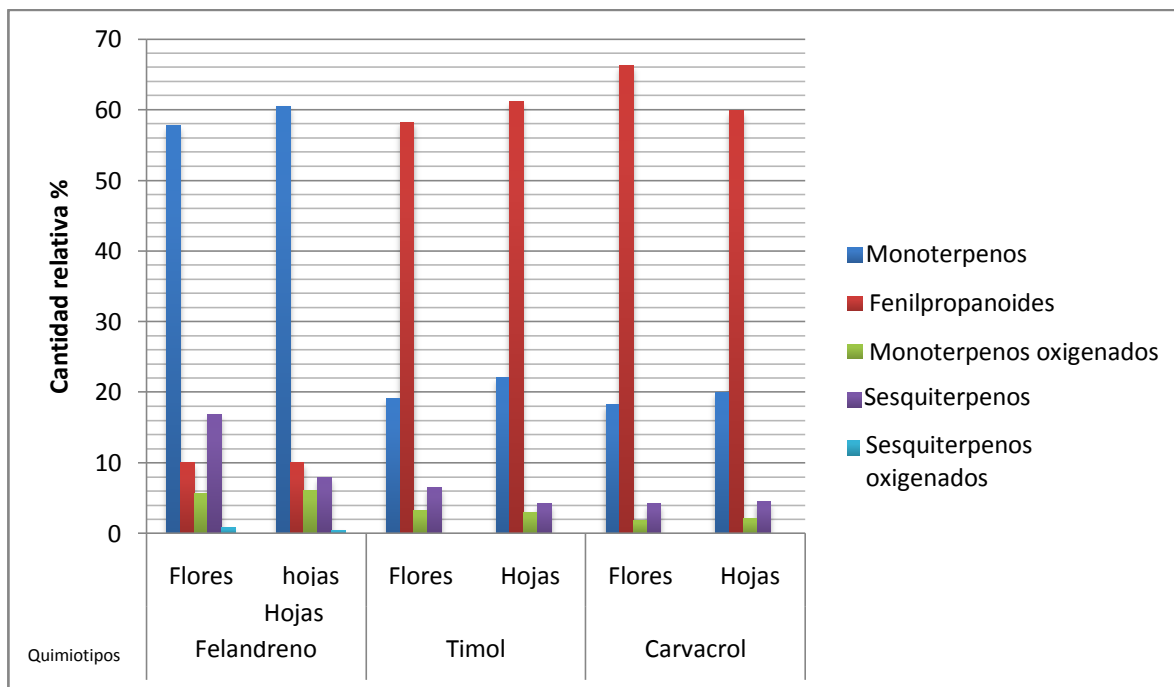
		Cantidad relativa %						
		$\alpha$ -Felandreno	<i>p</i> -Cimeno	$\beta$ -Felandreno+1,8-cineol	$\gamma$ -Terpineno	Timol	Carvacrol	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno
Quimiotipo felandreno	Flores	16	8,9	21	3,4	0,2	0,9	9
	Hojas	15	9,3	25,3	0,19	0,12	0,21	4,5
Quimiotipo timol	Flores	0,35	9	0,36	9,2	45	0,26	3,8
	Hojas	0,31	10	0,6	10	49	0,24	2,8
Quimiotipo carvacrol	Flores	0,19	8,5	0,62	12,7	9,4	48,1	2,7
	Hojas	0,25	8,1	0,65	13,5	9,7	41,8	2,9

En el quimiotipo felandreno, se encontraron diferencias significativas en el área cromatográfica relativa (%) de: sabineno (F: 2,44, H:1,09 ), 1-octen-3-ol (F: 0,28, H: 0,61 ),  $\gamma$ -terpineno (F: 3,4, H: 0,19), terpinoleno (F: 0,37, H: 0,15 ), 4-terpineol (F: 1,6, H: 0,15 ), carvacrol(F: 0,9, H: 0,21), *trans*- $\beta$ -cariofileno (F: 9, H: 4,5 ),  $\alpha$ -humuleno (F: 4,9, H: 2,2 ), germadreno D (F: 1,2, H: 0,34 ), y biciclogermacreno (F: 1,2, H: 0,42 ), donde F y H son flores y hojas respectivamente. No se encontró diferencia significativa en la cantidad relativa de las sustancias mayoritarias:  $\alpha$ -felandreno (F: 16, H: 15), *p*-cimeno (F: 8,9, H: 9,3) y  $\beta$ -felandreno + 1,8-cineol (F: 22,3, H: 29 ). En las flores y hojas del quimiotipo timol se encontró diferencia en el contenido de: umbellulona (F: 0,8, H: 0,3) y el acetato de timilo (F: 4, H: 2). No se encontró diferencia en el contenido de las sustancias mayoritarias *p*-cimeno (F: 9, H: 10),  $\gamma$ -terpineno (F: 9,2, H: 10) y timol (F: 45 H: 49).

En el quimiotipo carvacrol no se encontró diferencia significativa en el área cromatográfica relativa (%) de las sustancias mayoritarias *p*-cimeno (F: 8,5, H: 8,1),  $\gamma$ -terpineno (F: 12,7, H: 13,5), timol (F: 9,4, H: 9,7) y carvacrol (F: 48,1, H: 41,8).

Se reunieron los valores de participación porcentual por familias de compuestos (**Figura 10**) y se comparó esa distribución con respecto a cada quimiotipo y a la parte de la planta de donde se extrajeron metabolitos secundarios. La mayor diferencia se produce en el contenido de sesquiterpenoides en las plantas de quimiotipo felandreno, principalmente, por la contribución del cariofileno. Esa diferencia ya se reportó por Guillen y Manzanos [74], para una variedad de *Thymus vulgaris* rica en 1,8-cineol, quienes mostraron que el *trans*- $\beta$ -cariofileno se presentaba en una proporción de casi el doble en las flores con respecto a las hojas. Como esta sustancia se encuentra en una cantidad cercana al 10 % y se le ha demostrado bioactividad como antiinflamatorio, con un efecto comparable al observado en animales con el tratamiento de dexametasona, se puede atribuir esta propiedad a este quimiotipo de *L. origanoides*, principalmente a sus flores,

por la presencia de esta sustancia. La cantidad de esta sustancia en la fracción volátil se incrementa con la selección de una sola parte de la planta, las flores.



**Figura 10.** Relación de contenido de metabolitos secundarios volátiles por familia de compuestos.

No se encontró diferencia significativa en los componentes mayoritarios obtenidos de hojas y flores. Se concluye que si el interés del productor es la obtención de cualquiera de esas sustancias puede omitir la selección de las partes antes del proceso de extracción.

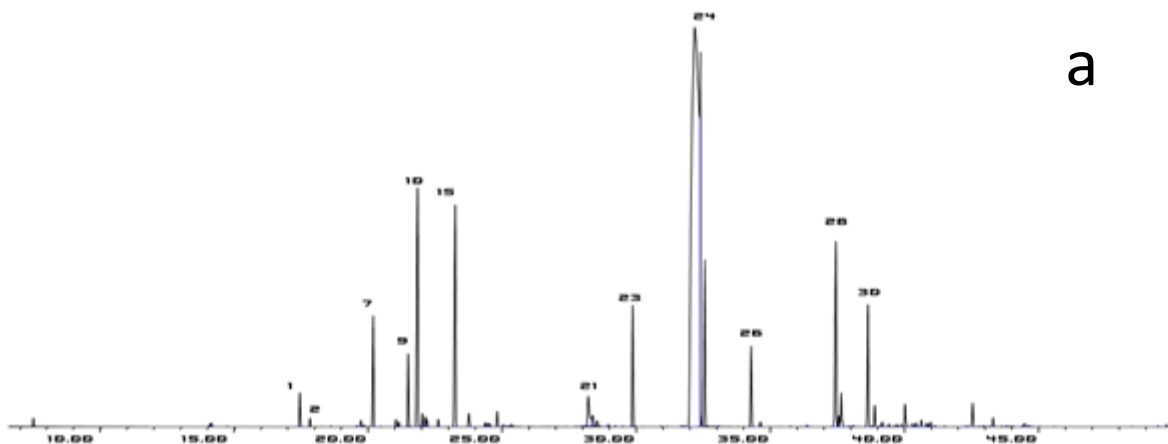
### 3.3.2 Análisis de los aceites esenciales obtenidos

En la **Tabla 11** se presentan los resultados del proceso de identificación de los componentes de los AE de los tres diferentes quimiotipos, se reporta la desviación estándar, la naturaleza de la sustancia, los índices de retención lineal en cada una de las columnas usadas y su nombre común. En la **Figura 11** se muestran los perfiles cromatográficos de los tres diferentes AE estudiados, los números en esas figuras correspondan al compuesto indicado en la **Tabla 11**.

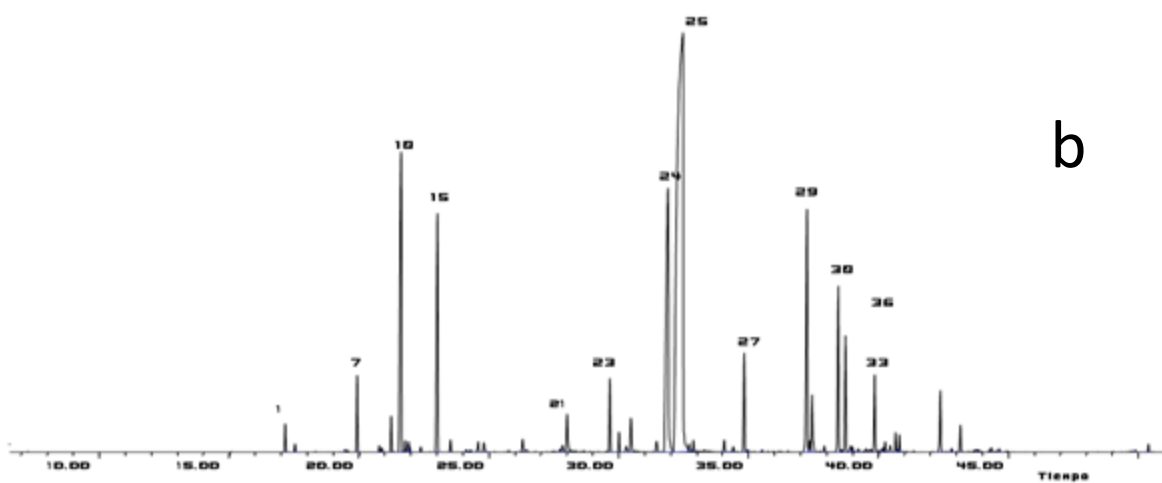
**Tabla 11.** Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios volátiles aislados  
AE de *L. organoides*, aislados por la técnica MWHD.

Nºpico	Compuesto	Tipo	IR		Cantidad relativa % ± s (n=3)					
					Quimiotipo felandreno		Quimiotipo timol		Quimiotipo carvacrol	
			DB-5	DB-WAX	%	s	%	s	%	s
1	α-Tujeno	M	928	1026	0,49%	0,07%	0,7%	0,11%	0,9%	0,4%
2	α-Pineno	M	937	1029	1,6%	0,2%	0,19%	0,03%	0,3%	0,1%
3	Canfeno	M	955	1070	0,33%	0,05%	0,02%	0,00%	0,03%	0,01%
4	Sabineno	M	976	1126	0,82%	0,09%	0,04%	0,01%	0,07%	0,01%
5	1-Octen-3-ol	M	980	1451	0,29%	0,02%	0,2%	0,05%	2,2%	0,9%
6	β-Pineno	M	982	1115	0,48%	0,05%	0,05%	0,01%		
7	β-Mirceno	M	990	1166	1,2%	0,1%	2,3%	0,3%		
8	α-Felandreno	M	1012	1173	8,6%	0,6%	0,18%	0,04%	0,19%	0,07%
9	α-Terpineno	M	1021	1185	0,43%	0,05%	1,4%	0,2%		
10	p-Cimeno	FP	1030	1278	6,4%	0,3%	6,5%	0,6%	12%	4%
11	Limoneno	M	1035	1205	3,7%	0,3%	0,29%	0,03%	0,3%	0,1%
12	β-Felandreno	M	1040	1217	10,6%	0,5%	0,25%	0,02%	0,4%	0,1%
13	1,8-Cineol	MO		1220			0,18%	0,05%		
14	trans-β-Ócimeno	M	1048	1255	0,74%	0,05%	0,15%	0,01%	0,14%	0,04%
15	γ-Terpineno	M	1063	1253	2,3%	0,2%	5,4%	0,4%	8%	2%
16	cis-Hidrato de sabineno	MO	1075	1555	0,34%	0,01%	0,43%	0,06%	0,24%	0,03%
17	Terpinoleno	M	1090	1290	0,41%	0,03%	0,09%	0,01%	0,08%	0,03%
18	Linalol	MO	1101	1550	0,86%	0,03%	0,36%	0,03%	0,25%	0,05%
19	trans-Hidrato de sabineno	MO	1106	1473	0,42%	0,01%	0,07%	0,01%	0,18%	0,04%
20	Borneol	MO	1181	1725	0,51%	0,02%	0,04%	0,00%		
21	Terpinen-4-ol	MO	1188	1603	1,13%	0,07%	0,8%	0,5%	1%	0,3%
22	Umbellulona	MO	1191	1656	0,04%	0,00%	0,6%	0,3%		
23	Timol metil éter	FP	1231	1600	0,22%	0,01%	2,5%	0,05%	1,4%	0,3%
24	Timol	FP	1292	2191	5,6%	0,6%	57%	3%	10%	2%
25	Carvacrol	FP	1300	2221	0,09%	0,01%	3,1%	0,4%	41%	4%
26	Acetato de timilo	FP	1348	1859	0,08%	0,01%	2,4%	0,6%	0,22%	0,06%
27	Acetato de carvacrilo	FP	1359						1,7%	0,4%
28	trans-β-Cariofileno	S	1438	1617	10,2%	0,1%	4,55%	0,07%	5,00%	0,8%

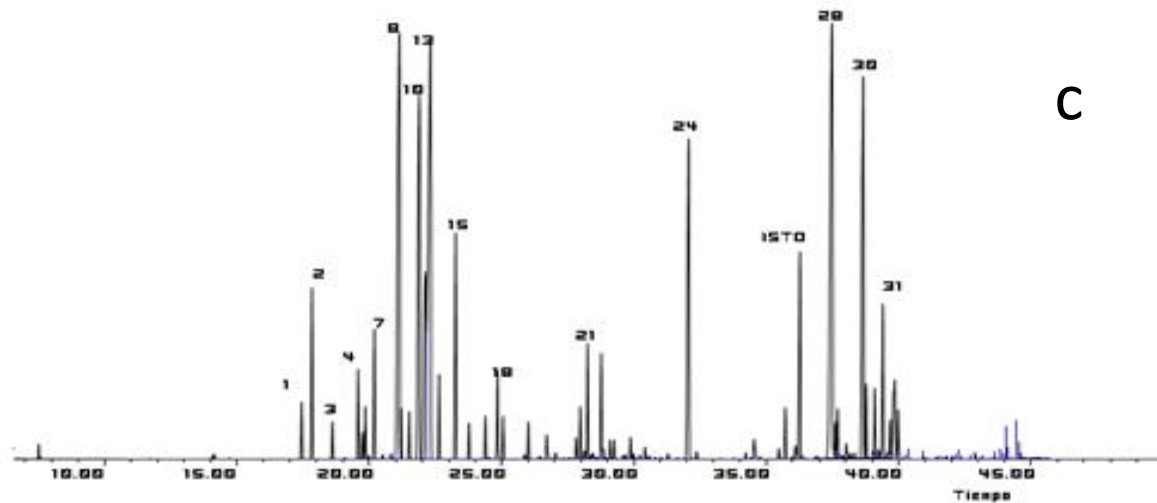
	<i>trans</i> - $\alpha$ -									
29	Bergamoteno	S	1442	1597	0,36%	0,01%	0,87%	0,06%	0,9%	0,3%
30	$\alpha$ -Humuleno	S	1473	1689	6,4%	0,04%	2,64%	0,01%	2,9%	0,5%
31	Germacreno D	S	1495	1724	1,58%	0,01%	0,07%	0,01%	0,05%	0,01%
32	Biciclogermacreno	S	1510	1748	1,5%	0,5%	0,1%	0,00%	1,2%	0,2%
33	$\beta$ -Bisaboleno	S	1515	1733	0,51%	0,00%	0,57%	0,06%		
34	$\Delta$ -Cadineno	S	1529	1768	1,46%	0,03%	0,08%	0,00%	0,14%	0,04%
35	cis-Calameneno	FP	1534	1847	0,4%	0,00%	0,04%	0,00%	0,27%	0,05%
36	Óxido de cariofileno	S	1601	2003	3,00%	0,2%	0,51%	0,02%	1,22%	0,04%



a



b



c

**Figura 11.** Perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de los tres diferentes quimiotipos: a. Timol, b. Carvacrol, c. Felandreno. Columna DB-5 (60 m), *split*1:30, MSD (EI, 70 eV).

Se encontraron cantidades similares de los componentes mayoritarios, a las reportadas por dos Santos [72], Oliveira [73] y Ruiz [12]. En la **Tabla 12** se muestran las cantidades relativas reportadas por dos Santos y Oliveira, que estudiaron las plantas cuyos aceites esenciales son ricos en carvacrol.

**Tabla 12.** La cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios, hallada en el AE del quimiotipo carvacrol comparada con la reportado en la literatura [12, 73, 72]

<b>Sustancia</b>	<b>dos Santos</b>	<b>Oliveira</b>	<b>Trabajo presente</b>
<b><math>\alpha</math>-Felandreno</b>	N D	0,2%	0,19%
<b><i>p</i>-Cimeno</b>	12,1%	10,3%	12,0%
<b><math>\beta</math>-Felandreno</b>	ND	N D	0,04%
<b>Timol</b>	6,1%	18,5%	10,0%
<b>Carvacrol</b>	37,3%	38,6%	41,0%
<b><i>trans</i>- <math>\beta</math>- Cariofileno</b>	2,4%	5,9%	5,0%

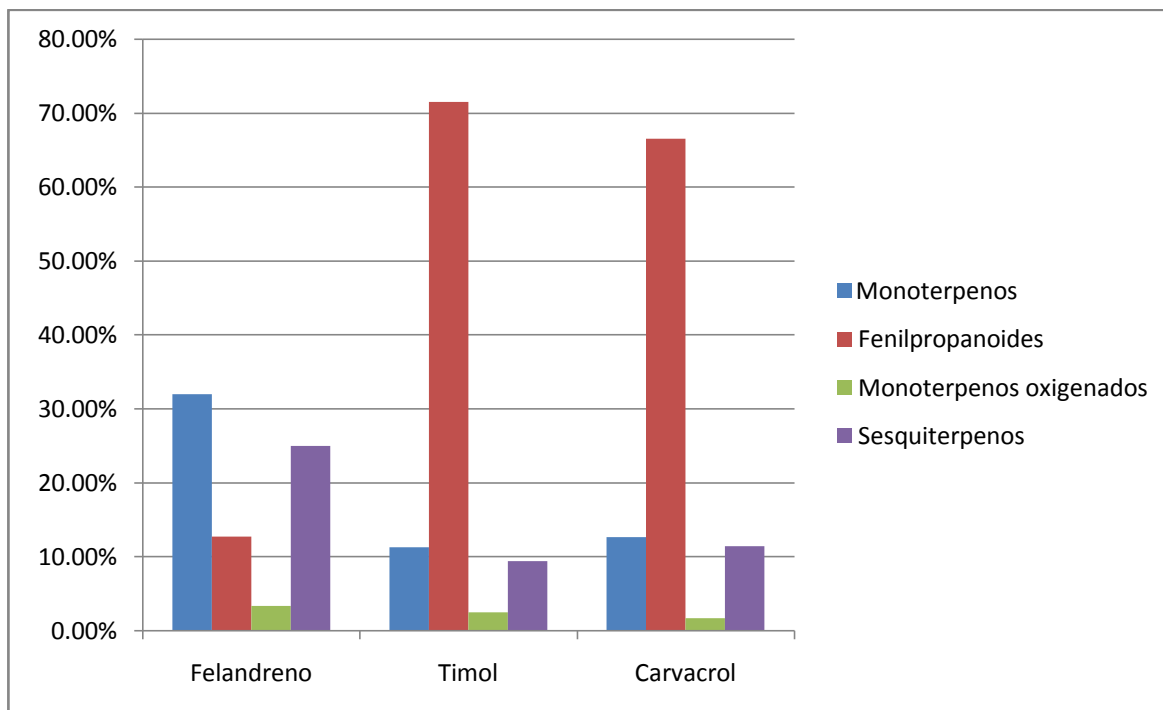
En la **Tabla 13** se muestra la comparación con los resultados reportados por Ruiz [12] con los obtenidos en este trabajo.

**Tabla 13.** Comparación de la cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios del AE, quimiotipos timol y felandreno, con lo reportado por Ruiz y colaboradores [12].

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad relativa, %</b>			
	<b>Quimiotipo timol</b>		<b>Quimiotipo felandreno</b>	
	<b>Ruiz</b>	<b>Trabajo presente</b>	<b>Ruiz</b>	<b>Trabajo presente</b>
<b><math>\alpha</math>-Felandreno</b>	0,16%	0,18%	10,3%	8,6%
<b><i>p</i>-Cimeno</b>	7,20%	6,5%	14,6%	6,35%
<b><math>\beta</math>-Felandreno</b>	0,23%	0,25%	--	10,6%
<b>Timol</b>	66,00%	57,00%	1,4%	5,6%
<b>Carvacrol</b>	1,54%	3,07%	0,25%	0,09%
<b><i>trans</i>- <math>\beta</math>-Cariofileno</b>	3,58%	4,55%	5,8%	10,2%

Se verificó el nombre del quimiotipo propuesto por Ruiz a las plantas de quimiotipo felandreno, ya que el autor sugirió el uso del nombre “*p*-cimeno”. Sin embargo, la suma de las cantidades relativas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -felandrenos (8,6 y 10,6%, respectivamente) supera a la cantidad relativa de *p*-cimeno (6,4%), por tanto, se le debe asignar el nombre de “felandreno” a ese quimiotipo, esta observación fue hecha por Stashenko *et al.* [75]. Dada la cantidad de  $\alpha$ - y  $\beta$ -felandrenos, es posible que esta especie se pueda incorporar en productos con función antiinflamatoria y antinociceptiva, actividades reportadas por Lima [76] y por Vendruscolo [77].

De forma similar a lo presentado en el análisis de los extractos, se agruparon las cantidades relativas de sustancias pertenecientes a cuatro familias; los resultados de este análisis se muestran en la **Figura 12** La relación entre monoterpenos oxigenados, monoterpenos y sesquiterpenos se mantiene en los tres quimiotipos, la diferencia aparece con el aumento de participación porcentual del timol y del carvacrol en cada uno de sus quimiotipos correspondientes, ambas sustancias pertenecen a la familia de fenilpropanoides y son los componentes mayoritarios, en cantidades cercanas al 50%; es su presencia la que explica el aumento relativo de esta familia



**Figura 12.** Relación de contenido de metabolitos secundarios volátiles por familia de compuestos.

### 3.3.3 Cuantificación de sustancias mayoritarias por el método de patrón externo

En la **Tabla 14** se muestra la participación en peso de tres de las sustancias contenidas en los AE. Se comparan las cantidades relativas obtenidos mediante GC-MS con el porcentaje en peso de las sustancias en relación con el AE calculado por cuantificación externa (**Tabla 14**). La marcada diferencia entre los dos valores se explica mediante el conocimiento de las estructuras de estas tres sustancias, ambos, el timol y el carvacrol (isómeros estructurales), son fenoles, que por efecto de la movilidad de sus electrones aromáticos, se estabilizan con relativa facilidad, por el contrario, el felandreno es un hidrocarburo, que a pesar de las insaturaciones conjugadas que presenta, se estabilizará en menor grado.

**Tabla 14.** Cantidad (mg/g) de cada una de las sustancias mayoritarias en los aceites esenciales de los quimiotipos estudiados de *L. origanoides*.

	<b>Cantidad (mg/g) de aceite esencial</b>		
	Timol	Carvacrol	$\alpha$ -felandreno
<b>AE de quimiotipo timol</b>	713,5	50,9	-
<b>AE de quimiotipo carvacrol</b>	248,0	728,3	-
<b>AE de quimiotipo felandreno</b>	52,3	-	481,4

**Tabla 15.** Comparación de resultados mediante GC-MS y cuantificación por GC-FID por el método de patrón externo.

	Timol		Carvacrol		$\alpha$ -felandreno	
	GC-MS,	GC-FID,	GC-MS,	GC-FID,	GC-MS,	GC-FID,
	%	%	%	%	%	%
<b>AE timol</b>	57,0	71,35	3,1	5,1	0,2	-
<b>AE carvacrol</b>	10,0	24,8	41,0	72,8	0,2	-
<b>AE felandreno</b>	5,6	5,3	0,09	-	8,6	48,1

Cantidades (mg/g) de timol, carvacrol y felandreno que se reportan, sugieren que los aceites esenciales de los tres quimiotipos estudiados son una muy buena fuente de timol, carvacrol y felandreno.

### 3.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Se realizó la evaluación mediante dos diferentes métodos, el ensayo ORAC, correspondiente al mecanismo de transferencia de protón y el ensayo ABTS, correspondiente al mecanismo de transferencia de electrón.

### 3.4.1 Ensayo ORAC

Se realizó el ensayo de capacidad antirradicalaria ORAC (**Tabla 16**) para determinar el efecto del aceite esencial como antioxidante en el mecanismo de transferencia de protón.

**Tabla 16.** Resultados del ensayo ORAC de los aceites esenciales de los tres quimiotipos y de la sustancia de referencia BHT.

Sustancia	$\mu\text{molTrolox}^{\circ}/\text{mg}$		
	$\bar{x}$	s	CV %
<b>AE Carvacrol</b>	3,7	0,1	2,6
<b>AE Felandreno</b>	2,09	0,09	4,31
<b>AE Timol</b>	3,24	0,08	2,47
<b>BHT</b>	0,75	0,02	2,66

Se llevó a cabo el estudio del butilhidroxitolueno (BHT), que es una sustancia ampliamente utilizada como conservante de alimentos y de cosméticos; sin embargo, sobre ella se han reportado efectos dañinos a la salud y complicación de condiciones alérgicas [79]. Por tanto, se podría proponer a los AE de quimiotipo carvacrol y timol como sustituyentes de antioxidantes sintéticos.

Sin embargo, se debe tener en consideración que estas dos sustancias, mayoritarias en el AE, tienen un olor y sabor muy intenso, característico del orégano; se recomienda su uso en pequeñas cantidades y en compañía de enmascarantes dulces, preferiblemente de origen natural. Además de su efecto antioxidante, conferido por su naturaleza fenólica [80], al timol se le han demostrado propiedades antimicrobianas [81]; por esta razón, su uso en productos orales es frecuente.

### 3.4.2 Ensayo ABTS

En la **Tabla 17**, se muestran los resultados del ensayo ABTS siguiendo la metodología de la sección 2.8.2. Los resultados son consistentes con los AE del

los quimiotipos carvacrol y timol, lo cuales tienen un alto contenido de compuestos fenólicos que aportan a la capacidad antirradicalaria, como ya se mencionó anteriormente. El quimiotipo carvacrol muestra una mayor capacidad antirradicalaria en relación con los otros dos quimiotipos, felandreno y timol.

**Tabla 17.** Resultados del ensayo ABTS de los AE de los tres quimiotipos y de las sustancias de referencia carvacrol, timol y felandreno.

Sustancia	μmol Trolox®/mg		
	$\bar{x}$	s	CV %
AE carvacrol	6,54	0,09	1,37
AE felandreno	0,161	0,004	2,48
AE timol	5,53	0,01	0,18
Timol	5,6	0,2	3,6
Carvacrol	6,02	0,09	1,49
α-Felandreno	3,6	0,1	2,77
BHT	5,2	0,2	3,8

El AE del quimiotipo carvacrol contiene un alto contenido de timol y carvacrol, como lo muestra la **Tabla 11** Este hecho le confiere una mayor capacidad antirradicalaria y un posible efecto sinérgico por razón de la acción de cada uno de estos fenilpropanoides, incluso una mayor capacidad antirradicalaria con respecto al patrón de carvacrol. El quimiotipo timol muestra una capacidad similar al del patrón analizado bajos los mismos parámetros, evidentemente, este fenómeno es inherente al contenido tan elevado de timol en este quimiotipo. Entre tanto, el quimiotipo felandreno por su contenido mayoritario de monoterpenos y sesquiterpenos, tales como *p*-cimeno, α- y β-felandrenos, *trans*-β-cariofileno y 1,8-cineol, no tienen la capacidad de reaccionar con el radical ABTS<sup>+</sup> para su decoloración; esto tiene como consecuencia que el AE del quimiotipo felandreno tenga baja capacidad antioxidante con relación a los otros dos quimiotipos que tienen una elevada cantidad de fenilpropanoides, tal como lo muestra la **Figura**

**12.** La mayor capacidad antioxidante del  $\alpha$ -felandreno frente al quimiotipo con este mismo nombre, se debe principalmente a la cantidad de este monoterpeno en el aceite esencial (481 mg/g).

En la tabla también se observa una mayor capacidad antirradicalaria para el caso de los AE de los quimiotipos timol y carvacrol en relación con el antioxidante de uso comercial BHT, por lo cual estos aceites esenciales pueden servir como posibles sustitutos de esta sustancia.

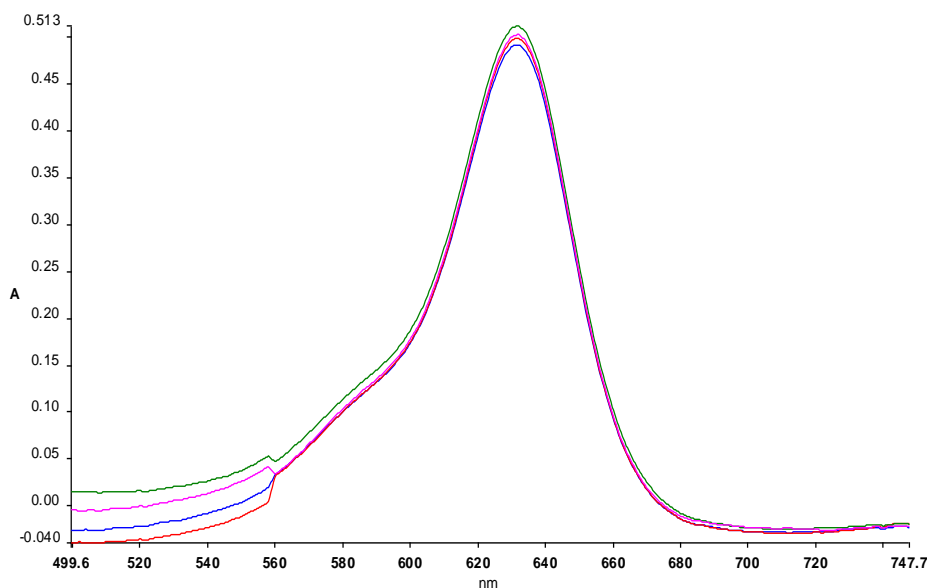
### **3.5 FORMULACIÓN DE ENJUAGUE BUCAL**

Los ensayos realizados se limitan a pruebas de estabilidad del color y del olor, los estudios microbiológicos necesarios deberán ser realizados por profesionales o estudiantes de microbiología o bacteriología. Se atendió a la norma colombiana Icontec NTC 5257 [69], cuyos requisitos son: pH entre 5,5 y 10,5 y un valor de concentración máxima de flúor de 1500 ppm; el pH se fijó en 7 y la concentración de flúor en 750 ppm.

Se realizaron las pruebas de estabilidad siguiendo las recomendaciones de la guía técnica colombiana GTC 215 [72]. Se expusieron alícuotas de un mismo lote de enjuague bucal a condiciones de alta y baja temperatura, y a radiación solar. Se compararon los resultados con una muestra de control, almacenada a temperatura ambiente y protegida de la luz. Las temperaturas utilizadas fueron 70 °C y 4 °C.

#### **3.5.1 Estabilidad del color**

Se retiraron las muestras de cada una de las condiciones de estrés seleccionadas y se dejaron en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 horas. Se hizo un barrido de  $\lambda=250$  a  $\lambda=750$  nm; los resultados se registran en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Espectro UV-Vis del enjuague ante las diferentes condiciones de estrés. **Verde:**70°C. **Rosado:** 4 °C. **Naranja:** radiación solar. **Azul:** muestra de control.

Los resultados de absorbancia en la longitud de onda ( $\lambda=631.35$  nm) del máximo de absorción se muestran en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.** Resultados de la evaluación de la respuesta del color del enjuague bucal ante las condiciones de estrés.

Condición de estrés	Absorbancia	
	$\bar{A}$	s
4 °C	0,5032	0,0005
70 °C	0,5123	0,0005
Radiación solar (60 horas)	0,4996	0,0005
Muestra de control	0,4926	0,0005

Los resultados obtenidos no sugieren que haya cambio significativo del color del enjuague bucal ante los cambios de temperatura. El producto puede distribuirse en los climas entre las temperaturas analizadas, sin el problema de que se desestabilice, se genere opacidad, la formación de otra fase, o que cambie de color.

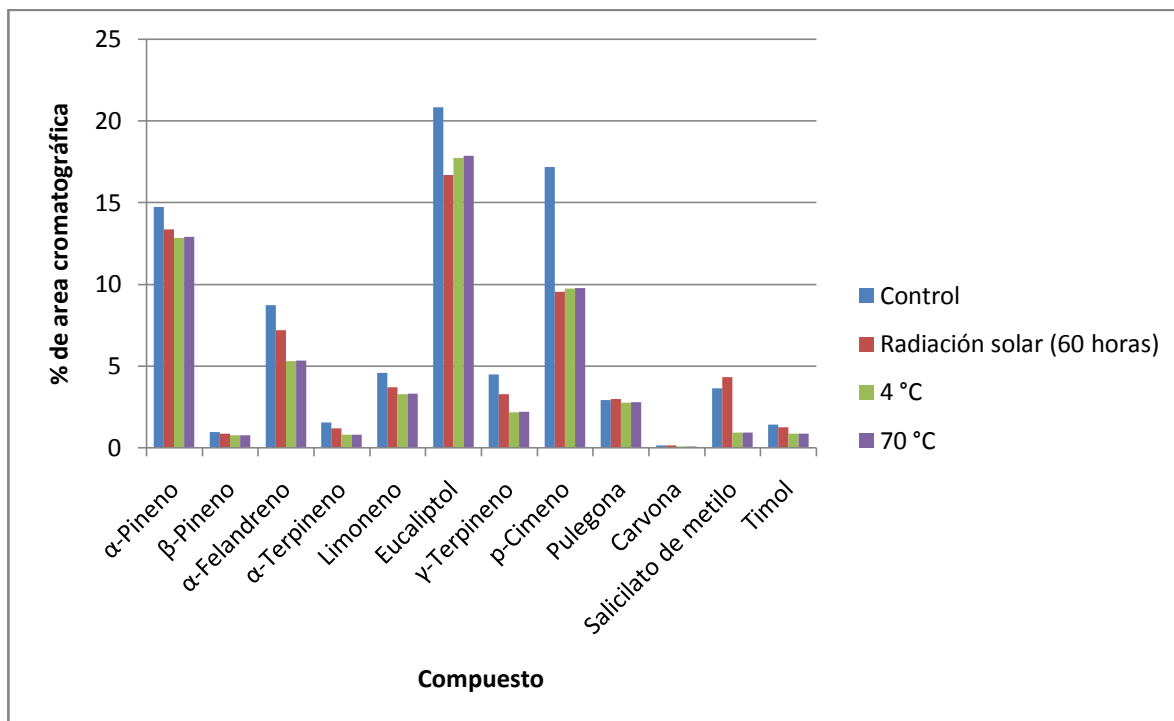
### 3.5.2 Estabilidad del olor

Se tomaron las alícuotas de cada una de las pruebas de estrés para hacer la evaluación de cambio de la fase volátil. En la misma jornada se interrumpió la condición de estrés y se midió el cambio en el olor, por la determinación del contenido de los volátiles en el espacio de cabeza del enjuague bucal. Se esperó que el contenido de la fase vapor no cambiara significativamente. Se compararon los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID y por GC-MS, para correlacionar cantidad (GC-FID) e identidad (GC-MS) y se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Tabla 19**.

**Tabla 19.** Resultados de la evaluación de la estabilidad del olor de enjuague bajo diversas condiciones de estrés.

Compuesto	Control	Radiación solar (60 horas)	Temperatura	
	% GC área	% GC área	4 °C % GC área	70 °C % GC área
$\alpha$ -Pino	14,74	13,36	12,85	12,92
$\beta$ -Pino	0,94	0,86	0,75	0,75
$\alpha$ -Felandreno	8,71	7,2	5,31	5,34
$\alpha$ -Terpino	1,54	1,17	0,77	0,77
Limoneno	4,58	3,68	3,27	3,29
Eucaliptol	20,86	16,69	17,76	17,87
$\gamma$ -Terpino	4,49	3,27	2,16	2,18
p-Cimeno	17,18	9,54	9,73	9,78
Pulegona	0,12	0,12	0,06	0,06
Carvona	3,63	4,3	0,9	0,91
Salicilato de metilo	1,39	1,25	0,85	0,86
Timol	14,74	13,36	12,85	12,92

Los resultados sugieren que la condición que tiene mayor influencia negativa sobre la estabilidad de la fase volátil es el cambio de temperatura, esta conclusión se ve con más claridad en la **Figura 14**.



**Figura 14.** Efecto de las condiciones de estrés sobre el área cromatográfica relativa (%) de los compuestos volátiles mayoritarios.

Los compuestos se presentan en la **Figura 13** de izquierda a derecha en orden de aparición en el cromatograma de gases y, por tanto, en orden descendente de volatilidad. La caída en el área cromatográfica de los volátiles se explica por escape hacia el medio. Por tanto, se recomienda que en el momento de diseñar el producto se considere que el recipiente sea hermético y que, en la medida de lo posible, el embalaje proteja al enjuague bucal de cambios bruscos de temperatura. Se recomienda también, que en la etiqueta de información al usuario, se le pida que mantenga el producto a temperatura ambiente.

#### 4. CONCLUSIONES

Bajo las mismas condiciones de suelo, clima y cosecha utilizadas, no se observó diferencia significativa en el contenido de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos mediante hidrodestilación de las hojas y las flores de los tres quimiotipos de *L. origanoides* estudiados. La diferencia aparece en el contenido de las sustancias minoritarias; se resalta que el contenido de *trans*- $\beta$ -cariofileno sí difiere: en las flores es casi dos veces mayor que en las hojas.

Los aceites esenciales aislados de las plantas de *L. origanoides* de los quimiotipos carvacrol y timol son ricos en fenilpropanoides. En contraste, los aceites obtenidos de las plantas de quimiotipo felandreno, prevalecen los monoterpenos, especialmente,  $\alpha$ - y  $\beta$ - felandrenos.

Los aceites esenciales obtenidos de las plantas de *L. origanoides* quimiotipo carvacrol y timol presentan una actividad antioxidante superior a la de la sustancia de referencia BHT, un aditivo de uso común en la industria de cosméticos y de alimentos. Por tanto, estos AE pueden considerarse como sustitutos naturales de dicha sustancia y de otras similares.

El aspecto del enjuague bucal es estable en el intervalo de temperatura de 4-70°C. Por tanto, es posible su distribución y uso en lugares cuya temperatura no esté por debajo de 4 °C. Sin embargo, la estabilidad de la fase volátil puede comprometerse; es necesario garantizar que el recipiente que lo contenga sea hermético.

## 5. RECOMENDACIONES

Se recomienda solicitar las pruebas microbiológicas requeridas por la Norma Técnica Colombiana NTC 5257; estas pruebas son la evaluación de recuento total de microorganismos aerobios viables, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeuginosa*, *Escherichia coli* y Salmonelas.

También, se recomienda realizar pruebas clínicas del enjuague bucal, para verificar su efectividad sobre las bacterias de la cavidad oral y la formación de sarro.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Atlas de radiación solar de Colombia. Disponible en [http://www.upme.gov.co/Docs/Atlas\\_Radiacion\\_Solar/1-Atlas\\_Radiacion\\_Solar.pdf](http://www.upme.gov.co/Docs/Atlas_Radiacion_Solar/1-Atlas_Radiacion_Solar.pdf). Fecha de consulta: 15 de agosto.
- [2] Instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales. Disponible en <http://institucional.ideam.gov.co/jsp/loader.jsf?lServicio=Publicaciones&lTipo=publicaciones&lFuncion=loadContenidoPublicacion&id=49>. Fecha de consulta: 15 de agosto.
- [3] WILLIAMS, W. Australia State of the Environment Report 2001 (Theme Report).2001. CSIRO, Collingwood, 7-18.
- [4] Colombia – Conservation international. Disponible en [http://www.conservation.org/where/south\\_america/colombia/Pages/overview.aspx](http://www.conservation.org/where/south_america/colombia/Pages/overview.aspx). Fecha de consulta: 15 de agosto.
- [5] Tropical Andes – Conservation international. Disponible en [http://www.conservation.org/where/priority\\_areas/hotspots/south\\_america/Tropical-Andes/Pages/default.aspx](http://www.conservation.org/where/priority_areas/hotspots/south_america/Tropical-Andes/Pages/default.aspx). Fecha de consulta: 15 de agosto.
- [6] Tumbes-Chocó-Magdalena – Conservation international. Disponible en [http://www.conservation.org/where/priority\\_areas/hotspots/south\\_america/Tumbes-Choco-Magdalena/Pages/default.aspx](http://www.conservation.org/where/priority_areas/hotspots/south_america/Tumbes-Choco-Magdalena/Pages/default.aspx). Fecha de consulta: 15 de agosto.
- [7] JARAMILLO, L. Biotrade potential for growth and sustainability. UNDP, 2010, 9-10.
- [8] Principios de la Universidad Industrial de Santander. Disponible en: <http://www.uis.edu.co/webUIS/es/acercaUis/principios.html>. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2012.
- [9] CENIVAM - Información general. Disponible en: <http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/informacion/mision.html>. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2012.
- [10] “Estudio integral de especies aromáticas y medicinales tropicales promisorias para el desarrollo competitivo y sostenible de la agroindustria de

esencias, extractos y derivados naturales en Colombia” - Informe Final CENIVAM. Disponible en: <http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/principal.php>. Fecha de consulta: 12 de abril de 2012.

[11] STASHENKO, E., RUIZ, C., MUÑOZ, A., CASTAÑEDA, M. and MARTINEZ, J. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. Nat. Prod. Comm., 2008, 3, 1-4.

[12] RUIZ, C. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K., en tres estados fenológicos, 2008. Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander.

[13] SENATORE, F. Influence of Harvesting Time on Yield and Composition of the Essential Oil of Thyme (*Thymus pulegioides* L.) Growing Wild in Campania (Southern Italy). J. Agric. Food Chem. 1996, 44, 1327-1332.

[14] BUTTERY, R. and LING, L. Bioactive Volatile Compounds from Plants. ACS Symposium Series 525. 1992, Chap. 3, 23-34.

[15] CELIKEL, N. and KAVAS, G. Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against Some Pathogenic Microorganisms. Czech J. Food Sci. 2008, 26, 174-181.

[16] BURT, S., VLIELANDER, R., HAAGSMAN, H. and VELDHUIZEN, E. Increase in Activity of Essential Oil Components Carvacrol and Thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by Addition of Food Stabilizers. J. Food Prot., 2005, 68, 919–926.

[17] GOUDARZI, R., SAHARKHIZ, M., SATTARI, M. and ZOMORODIAN, K. Antibacterial Activity and Chemical Composition of Ajowan (*Carum copticum* Benth. & Hook) Essential Oil. J. Agr. Sci. Tech. 2011, 13, 203-208.

[18] SHAPIRO, S. and GUGGENHEIM, B. The action of thymol on oral bacteria. Oral Microbiology and Immunology. 1995, 10, 241–246.

[19] STOEKEN JE, PARASKEVAS, S, van der WEIJDEN GA. The long-term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: a systematic review. J. Periodontol. 2007, 78, 1218-28.

- [20] SPOLARICH, A. The Pharmacist's guide to oral health. Disponible en: <https://secure.pharmacytimes.com/lessons/201012-01.asp>. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2012.
- [21] GARCIA, A., PÉREZ-URRIA E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2009. 2 (3). pp. 119-145.
- [22] KOUZNETSOV, V. Defensa química en la naturaleza. Ediciones UIS, Bucaramanga. 1998.
- [23] OKUBO, T., YOKOYAMA Y., KANO K., and KANO, I. Molecular Mechanism of Cell Death Induced by the Antioxidant tert-Butylhydroxyanisole in Human Monocytic Leukemia U937 Cells. Biol. Pharm. Bull. 2004, 27(3) 295—302.
- [24] ZHENG, W. and WANG S. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5165-5170
- [25] MIURA, K., KIKUZAKI, H., and NAKATANI, N. Antioxidant Activity of Chemical Components from Sage (*Salvia officinalis* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Measured by the Oil Stability Index Method. J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 1845-1851
- [26] STASHENKO, E., JARAMILLO, B., AND MARTINEZ, J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. Journal of Chromatography A. 2004, 1025, 93–103
- [27] WEI, A. and SHIBAMOTO, T. Antioxidant Activities and Volatile Constituents of Various Essential Oils. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 1737-1742.
- [28] ABDEL-FATTAH, A., Matsumoto K. and Watanabe, H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. European Journal of Pharmacology. 2000,400, 89–97.
- [29] BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of FoodMicrobiology,2004, 94, 223–253.

- [30] BONZANI, N. Particularidades epidérmicas en algunas especies de *Verbenaceae*. Anales. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, ser. Bot 1997, 68,.47-56.
- [31] PASCUAL, M., SLOWING, K., CARRETERO, E., SÁNCHEZ MATA, D., and VILLAR R. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. J. Ethnopharmacol. 2001, 76, 201-214.
- [32] STASHENKO E., MARTINEZ J., RUIZ C., ARIAS G., DURÁN, C., SALGAR, W., CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. J. Sep. Sci. 2010, 33, 93-103
- [33] KINTZIOS, S. Oregano: the genera *Origanum* and *Lippia*. 2002. London, Taylor & Francis. pp. 121-145.
- [34] CATALAN C.A., DE LAMPASONA M. E. The chemistry of the genus *Lippia* (*Verbenacea*). Ann of Clin Micro and Antimicrobials.2006,96,90.
- [35] MENESES, R. Actividad de extractos naturales sobre la replicación in vitro del virus de la fiebre amarilla, 2007.
- [36] UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. Colecciones en línea. Disponible en: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN>. Fecha de consulta: 15 de agosto.
- [37] OLIVEIRA, D. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais utilizadas pela comunidade de Oriximiná (Pará) com enfoque etnofarmacológico para o gênero *Lippia*. Dissertação. Maestría em química de productos naturales. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2004.
- [38] GÜENTER, E., The essential oils. New York: Ed. Van Nostrand, 1948, Vol 1. 1,. 427, 500-504, 744-755.
- [39] LAWRENCE, B.M., Essential Oils 1976-1978. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 1976.8, 23.
- [40] GRIFFIN, S., WYLLIE, S., MARKHAM, J. and LEACH, D. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavour Fragr. J. 1999, 14, 322–332.

- [41] DIDRY, N., DUBREUIL, L. and PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1994, 69, 25-28.
- [42] HUIE, C. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal Bioanal Chem*. 2000, 373, 23–30
- [43] BARTÁK, P., BEDNÁR, P., CÁP, L., ONDRÁKOV, L., STRÁNSKY, Z. SPME – A valuable tool for investigation of flower scent. *J. Sep. Sci*. 2003, 26, 715 – 721.
- [44] LANG, Q. and WAI C.. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. *Talanta*. 2001 53 771–782.
- [45] The Burdick and Jackson Solvent Handbook (1980). Disponible en: <http://macro.lsu.edu/HowTo/solvents/Dielectric%20Constant%20.htm>. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2012.
- [46] PARÉ, J. R. J. European Patent Application 0485668A1, 1992.
- [47] STASHENKO, E., JARAMILLO, B., and MARTÍNEZ, J. Comparison of Different Extraction Methods for the analysis of Volatile Secondary Metabolites of *Lippia alba*(Mill.) N. E. Brown, Grown in Colombia and Evaluation of its in vitro Antioxidant Activity. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1025, 93-103.
- [48] LIKENS, S., and NICKERSON, G. Detection of certain hop oil constituents in brewing products, en: SANDRA P. and BICCHI, C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. New York: Huethig Verlag, 1987. p. 89.
- [49] GODEFROOT, M., SANDRA P., and VERZELE, M. New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr*, 1981, 203, 203-325.
- [50] POLLIN, P., CHAINTREAU, A. Simultaneous Distillation - Extraction: Theoretical Model and Development of a Preparative unit. *Anal. Chem*. 1997,69, 3285 – 3292.
- [51] STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J. ¿Cuántos componentes hay en una mezcla? Respuesta cromatográfica, *Scientia Chromatographica*, 2009, 1, 23-33.

- [52] MIFIS, J., CHARI, R., BOYER, I., GOULD, M. and JIRTLE, R. Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpeneperillyl alcohol. *Cancer Research*. 1995, 55,979-983.
- [53] BANDONI, A. (Ed). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. La Plata: Red de Editoriales Universitarias, 2000, 136-158.
- [54] SHANE G. GRIFFIN, S. GRANT W., Julie L. Markham and David N. Leach 2 The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *J. Flavour Fragr*. 1999, 14, 322–332
- [55] BRAITHWAITE, A. and SMITH, F. J. *Cromatographic Methods*. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1999, 1-14.
- [56] CAO, G. ALESSIO, H. and CUTLER, R. Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free radical biol. med*. 1993, 14, 303-311.
- [57] OU B.,HAMPSCH-WOODILL M., and PRIOR R. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent. *J. Agric. Food Chem*. 2001, 49, 4619 - 4626.
- [58] RE, R. PELLEGRINI, A., PROTEGGENTE, A., NANTH, P., ANNALA, M., YANG, I. and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999, 26, 1231–1237.
- [59] Nuestro municipio > Información general - Jordán. Disponible en: <http://www.jordan-santander.gov.co/nuestromunicipio.shtml?apc=mlxx-1-&m=f>. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2012.
- [60] IDEAM - Atlas climatológico nacional. Disponible en: <http://institucional.ideam.gov.co/descargas?com=institucional&name=pubFile488&dow>. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2012.
- [61] MANZAN, A., TONIOLO, F., BREDOW, E. and POVH, N. Extraction of Essential Oil and Pigments from *Curcuma longa* by Steam Distillation and Extraction with Volatile Solvents. *J. Agric. Food Chem*. 2003, 51, 6802-6807.

- [62] WU, H. HENDRAWINATA, W., YU, Y., GAO, X., LI, Y., BARTLE, J. and GRAYLING, P. Effect of Hydrodistillation on 1,8-Cineole Extraction from Mallee Leaf and the Fuel Properties of Spent Biomass. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2011, 50, 11280–11287.
- [63] CABALLERO, K., OLIVERO, J. and STASHENKO, E. Repellent Activity of Essential Oils and Some of Their Individual Constituents against *Tribolium castaneum* Herbst. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 1690–1696.
- [64] CEVA-ANTUNES, P., BIZZO, H., ALVES, S. and ANTUNES, C. Analysis of Volatile Compounds of Tapereba (*Spondias mombin* L.) and Cajá (*Spondias mombin* L.) by Simultaneous Distillation and Extraction (SDE) and Solid Phase Microextraction (SPME). *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1387-1392.
- [65] DURAN, D.C. Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (*Verbenaceae*) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz. Tesis de Grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, 2005.
- [66] Norma ISO 279: 1998(E) Essential oils. Determinación of relative density at 20°C.
- [67] Norma ISO 280: 1998(E) Essential oils. Determination of refractive index at 20°C.
- [68] ARIAS, G. Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citriodora*, cultivadas en el municipio de sucre, Santander. Tesis de Maestría, Universidad Industrial de Santander, 2012.
- [69] Norma técnica colombiana NTC 5257. Productos de higiene oral. Enjuagues bucales, 2004.
- [70] CLIPPER, D. MEAD, B. and NORFLEET, J. United States patent. 4431631, 1984.
- [71] TALWAR, A., VALLEY, L. and CARLIN, J. United States patent. 4945087, 1990.

- [72] Guía técnica colombiana GTC 215. Guía sobre pruebas de estabilidad. Cosméticos y productos de higiene doméstica, 2004
- [73] DOS SANTOS, F., ARIMATÉIA, J., LOPEZ, D. and GRAÇAS, A. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* sH.B.K. Journal of Essential Oils. 2004 16, 504-506.
- [74] OLIVEIRA D.N., LEITAO G.G., BIZZO H.R., LOPES, D., ALVIANO, C.S., ALVIANO, D., and LEITAO, S. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. Food Chem., 2007, 101, 236-240.
- [75] GUILLÉN, M. and MANZANOS, M. Study os the composition of different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant. Food chemistry. 1998, 63, 373-383.
- [76] STASHENKO, E., MARTINEZ, J., RUIZ, C., ARIAS, G., DURAN, C., SALGAR, W. and CALA, M. *Lippia organoides* chemotype diferentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. 2010, 33, 93-103.
- [77] LIMA, D., BRANDÃO, M., MOURA, J., LEITÃO, J., CARVALHO, F., MIÚRA, L., LEITE, J., SOUSA, D. and ALMEIDA F. Antinociceptive activity of the monoterpene  $\alpha$ -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2012; 64, 283–292.
- [78] VENDRUSCOLO A., TAKAKI, I., BERSANI-AMADO, L., DANTAS, J., BERSANI-AMADO, C. and CUMAN, R. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Zingiber officinale* Roscoe essential oil in experimental animal models. Indian J. Pharmacol .2006; 38: 58-59.
- [79] GOODMAN, D., MCDONNELL J., NELSON H., VAUGHAN T. and WEBER R. Chronic urticaria exacerbated by the antioxidant food preservatives, butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). Journal of allergy and clinical immunology. 1990, 86, 570-575.
- [80] VINSON, J., SU, X., ZUBIK L. and BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods, Fruits. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2001, 49, 5315-5321.
- [81] DIDRY, N. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. Pharmaceutica Acta Helvetiae. 1994, 69, 25-28.

ANEXOS

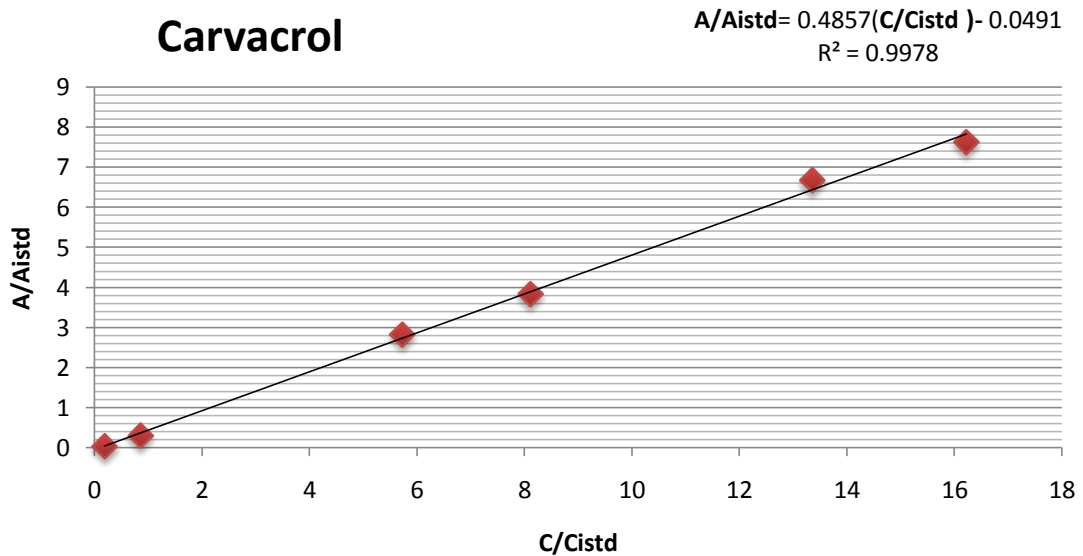
## ANEXO 1

Curvas de calibración, con patrones certificados, para la cuantificación de las tres sustancias mayoritarias en los aceites esenciales de los tres quimiotipos.

## Carvacrol

**Tabla 1.** Curva de calibración de Carvacrol en el rango de concentraciones de 190 a 16218mgL<sup>-1</sup>, obtenida por GC-FID.

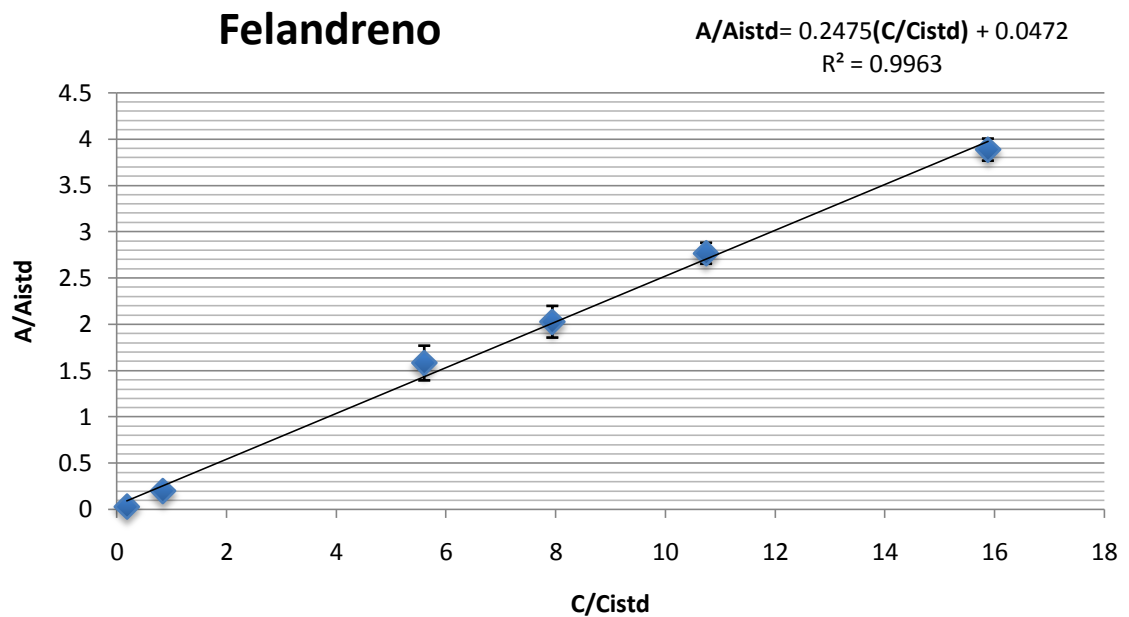
Razón concentración	Promedio	s (n=3)
0,1908	0,037	0,008
0,8586	0,29	0,01
5,724	2,8	0,1
8,109	3,8	0,3
13,356	6,6	0,1
16,218	7,6	0,1



## Felandreno

**Tabla 2.** Curva de calibración de  $\alpha$ -felandreno en el rango de concentraciones de 186 a 15878 mgL<sup>-1</sup>, obtenida por GC-FID.

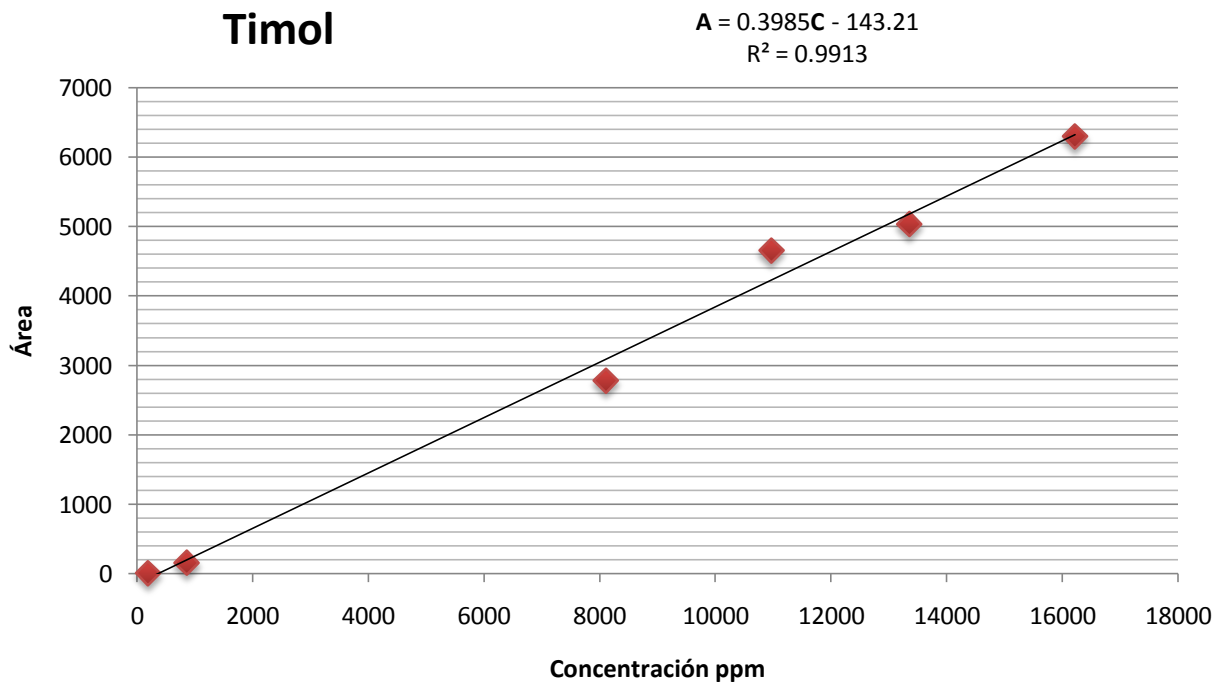
Razón de Concentración	Promedio	s (n=3)
0,1868	0,028	0,002
0,8406	0,2	0,02
5,604	1,6	0,2
7,939	2	0,2
10,741	2,8	0,1
15,878	3,9	0,1



## Timol

**Tabla 3.** Curva de calibración de timol en el rango de concentraciones de 190 a 16218 mgL<sup>-1</sup>, obtenida por GC-FID.

Concentración, ppm	Promedio	s (n=3)
190.8	9,8	0,3
858.6	160	4
8109	2780	58
10971	4700	127
13356	5040	36
16218	6300	109



## ANEXO 2.

Certificaciones de participación en el VIII congreso internacional de química e ingeniería química celebrado en La Habana, Cuba.



**QUIMICUBA'2012**  
**VIII CONGRESO INTERNACIONAL DE QUÍMICA,  
INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA**  
**8TH INTERNATIONAL CONGRESS ON CHEMISTRY,  
CHEMICAL ENGINEERING AND BIOCHEMISTRY**

LA HABANA/HAVANA, CUBA, OCTUBRE/OCTOBER, 9-12, 2012  
HOTEL MELIA HABANA

La Sociedad Cubana de Química (SCQ) y el Comité Organizador se complacen en reconocer a: Moreno G., Jaimes D., Martínez J., Stashenko E.

por su participación en el VIII Congreso Internacional de Química, Ingeniería Química y Bioquímica de la SCQ, que se efectuó del 9 al 12 de octubre del 2012 en las instalaciones del Hotel Meliá-Habana, La Habana, Cuba, con el trabajo titulado:

4-P-099 Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de Lippia origanoides H.B.K. quimiotipo felandreno, obtenidos de diferentes partes de la planta.


Presentado en la temática:

- QUÍMICA: ENSEÑANZA E HISTORIA
- QUÍMICA: ORGÁNICA
- QUÍMICA: INORGÁNICA Y ANALÍTICA
- QUÍMICA: FÍSICA Y COMPUTACIONAL
- QUÍMICA: MATERIALES Y NANOCIENCIAS
- QUÍMICA: INDUSTRIAL, INGENIERÍA Y AMBIENTAL
- QUÍMICA: PRODUCTOS NATURALES, MEDICINAL Y FARMACÉUTICA
- SIMPOSIO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

En la condición de:

Delegado  Conferencista  Presentación Oral  Póster

Participante  Acompañante

  
Secretario Científico de la Temática  
Sociedad Cubana de Química



**QUIMICUBA'2012**  
**VIII CONGRESO INTERNACIONAL DE QUÍMICA,**  
**INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA**  
**8TH INTERNATIONAL CONGRESS ON CHEMISTRY,**  
**CHEMICAL ENGINEERING AND BIOCHEMISTRY**

LA HABANA/HAVANA, CUBA, OCTUBRE/OCTOBER, 9-12, 2012  
HOTEL MELIA HABANA

La Sociedad Cubana de Química (SCQ) y el Comité Organizador se complacen en reconocer a: Jaimés D., Moreno G., Stashenko E., Martínez J.


por su participación en el VIII Congreso Internacional de Química, Ingeniería Química y Bioquímica de la SCQ, que se efectuó del 9 al 12 de octubre del 2012 en las instalaciones del Hotel Meliá-Habana, La Habana, Cuba, con el trabajo titulado:

H-P-113 Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de Lippia origanoides quimiotipo timol obtenidos de diferentes partes de la planta.  
Presentado en la temática:

- QUÍMICA: ENSEÑANZA E HISTORIA
- QUÍMICA: ORGÁNICA
- QUÍMICA: INORGÁNICA Y ANALÍTICA
- QUÍMICA: FÍSICA Y COMPUTACIONAL
- QUÍMICA: MATERIALES Y NANOCIENCIAS
- QUÍMICA: INDUSTRIAL, INGENIERÍA Y AMBIENTAL
- QUÍMICA: PRODUCTOS NATURALES, MEDICINAL Y FARMACÉUTICA
- SIMPOSIO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

En la condición de:

Delegado  Conferencista  Presentación Oral  Póster   
Participante  Acompañante

  
Secretario Científico de la Temática  
Sociedad Cubana de Química

ANEXO 3.  
Resultados del estudio de suelos.



LABORATORIO QUÍMICO DE SUELOS  
 PROGRAMA DE SUELOS  
 DIRECCIÓN: Carrera 27 Calle 9  
 Ciudad Universitaria Teléfono: 6344000 Ext. 2499  
 Bucaramanga - Santander del Sur

CONVENIO GOBERNACIÓN DE SANTANDER - UIS  
 SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL  
 ESCUELA DE QUÍMICA - UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
 Telefaxis: (7)6324861 - Correo Electrónico: laboratorioquimicodesuelos\_uis@yahoo.com

ANÁLISIS DE SUELOS: UN BEM  
 MAYOR Y PRIORITARIO PAR  
 CAMPO  
 DIA MES A  
 13 SEPTIEMBRE 2

CLIENTE:	Jesica Mejia	MUNICIPIO:	Bucaramanga	VEREDA:		Finca:	
DIRECCIÓN:	CENIVAM	TELÉFONOS:	3172242744	DEPARTAMENTO:	Santander	Cultivo:	Flor de Jamaica
TOPOGRAFÍA:		EXTENSION:		ANÁLISIS SOLICITADOS	CARACTERIZACIÓN	AZUFRE	CIC
					ELEMENTOS MENORES		

RESULTADO DEL ANÁLISIS DE SUELOS

No. Orden	No. Lab.	pH Unidad	% C	P (ppm) Bray II	meq/100g suelo					% Arena	% Limo	% Arcilla	TEXTURA	CIC meq/100g	CE mmhos/cm	S B Fe Mn Cu (ppm)				
					Ca	Mg	Na	K	Al							S	B	Fe	Mn	Cu
	10783	6.7	1.48	21.4	8.25	0.83	0.11	0.13		56	18	26	Franco - Arcillo - Arenoso			0.07	30.0	2.00	0.40	

PARAMETROS

pH: Potencial de Hidrógeno	Electrométrico:	Relación 1:1 Agua destilada	N.D. : No detectable a la mínima concentración detectada para el método
C: Carbono	Colorimétrico:	Walkley Black K2C2O7-H2SO4	Información y muestra suministrada por el cliente
P: Fósforo disponible	Colorimétrico:	Bray II, HCl 0,1 N-NH4F 0,03 N	Nota: Los resultados Almacenados en la base de datos y los enviados por fax ó e-mail se conservarán durante tres meses a partir de la entrega de los mismos.
A: Aluminio intercambiable	Valoración:	Extracción: Acetato de Amonio	Favor comunicar su sugerencia, observación o reclamo al teléfono 6324861 ó al e-mail
% Textura	Bouyouccous:	Extracción KCl	
B: Boro	Colorimétrico:	Agua destilada	
Fe, Mn, Cu, Zn	Absorción Atómica:	Extracción Fosfato Monocálcico	
S: Azufre	Turbidimétrico:	Extracción con DTPA	
CIC Capacidad Intercambio Catiónico		Extracción Fosfato Monocálcico	
CE: Conductividad Eléctrica	Electrométrico:	Extracción Acetato de Amonio	
		Agua destilada	

MÉTODO ANALÍTICO

OBSERVACIONES

Vobo  
 JAIME CAMARGO HERNAN  
 Químico  
 Mat. Prof. 0047

