

**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 SUCRE (SANTANDER)**

GINNA PAOLA ARIAS MOYANO

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

2012

**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 SUCRE (SANTANDER)**

GINNA PAOLA ARIAS MOYANO

**Trabajo de investigación como requisito para optar al título de Magíster
en Química**

Directores:

**ELENA STASHENKO, QUÍMICA, Ph. D.
JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, QUÍMICO, Ph. D.**

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

2012

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	22
1. MARCO TEÓRICO	25
1.1 ESPECIES RADICALARIAS	25
1.1.1 Definición y descripción.	25
1.1.2 Daños producidos por las especies radicalarias.	26
1.1.3 Efectos benéficos de las especies radicalarias.	27
1.2 COMPUESTOS FENÓLICOS	28
1.2.1 Determinación del contenido de fenoles.	29
1.3 ANTIOXIDANTES	31
1.3.1 Clasificación de antioxidantes de acuerdo con el origen.	31
1.3.2 Mecanismos de inhibición de las reacciones de oxidación en cadena.	32
1.4 MÉTODOS USADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA Y SU ESTANDARIZACIÓN	33
1.4.1 Mecanismos de acción <i>in vitro</i> .	34
1.4.2 Métodos <i>in vitro</i> desarrollados.	35
2. MARCO DE ANTECEDENTES	40
3. CIENCIOMETRÍA	52
3.1 ANTIOXIDANTES NATURALES Y SINTÉTICOS	52
3.2 ACEITES ESENCIALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	56
4. METODOLOGÍA	59
4.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO	59
4.2 MATERIAL VEGETAL	59
4.3 Obtención de aceites esenciales y extractos supercríticos.	62
4.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	65
4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA	66

4.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU	70
4.7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	70
4.7.1 Análisis por GC-MS	70
4.7.2 Análisis por GC-FID.	73
4.7.3 Análisis por HPLC-DAD.	74
4.7.4 Análisis de ácidos grasos (FAME).	75
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	77
5.1 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU PARA EL ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE FENOLES	77
5.2 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO DEL MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU	81
5.2.1 Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.	81
5.2.2 Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).	82
5.2.3 Evaluación de la precisión.	82
5.3 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATION-RADICAL ABTS** PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA	84
5.4 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO DEL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATION-RADICAL ABTS+	87
5.4.1 Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.	87
5.4.2 Evaluación de la precisión.	88
5.5 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ORAC PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA	89
5.6 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO DEL MÉTODO ORAC	95
5.6.1 Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.	96
5.6.2 Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).	97
5.6.3 Evaluación de la precisión.	97

5.7 RENDIMIENTOS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS AE Y EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE ESPECIES VEGETALES DE LAS FAMILIAS LAMIACEAE Y VERBENACEAE	98
5.7.1 Rendimientos de los AE y extractos obtenidos por SFE.	99
5.7.2 Caracterización química de los AE.	107
5.7.3 Cuantificación de los componentes mayoritarios en los AE.	123
5.7.4 Caracterización química de los extractos obtenidos por SFE.	123
5.7.5 Análisis del contenido de ácidos grasos (FA) en los extractos SFE.	136
5.8 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA Y EL CONTENIDO DE FENOLES DE LOS AE AISLADOS A PARTIR DE LAS PLANTAS BAJO ESTUDIO	140
5.8.1 Capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles de los AE y las sustancias de referencia analizadas.	140
5.8.2 Comparación de la capacidad anti-radialaria y el contenido de fenoles de los AE de plantas cultivadas en diferentes condiciones y usando diferentes técnicas de destilación.	149
5.9 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA Y EL CONTENIDO DE FENOLES DE LOS EXTRACTOS SFE	152
6. CONCLUSIONES	158
7. RECOMENDACIONES	160
BIBLIOGRAFÍA	161
ANEXOS	176

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno y otros radicales de importancia biológica [4].	26
Tabla 2. Principales grupos de compuestos fenólicos encontrados en las plantas [16].	29
Tabla 3. Algunos ensayos <i>in vitro</i> para medir la capacidad antioxidante [23].	36
Tabla 4. Métodos de extracción de compuestos antioxidantes de las plantas de <i>romero</i> , <i>salvia</i> y <i>tomillo</i> .	48
Tabla 5. Compuestos antioxidantes aislados de especies vegetales de a la familia <i>Labiatae</i> [58].	49
Tabla 6. Condiciones experimentales para obtener extractos SFE de <i>S. officinalis</i> y <i>T. vulgaris</i> .	64
Tabla 7. Comparación del contenido total de fenoles del Trolox [®] y el ácido ferúlico, medidos por los métodos “clásico” y el rápido, con los reportados en la literatura (Relación (%) \pm S) [90, 91].	81
Tabla 8. Linealidad y sensibilidad del método, medida para el ácido gálico (AG).	82
Tabla 9. Repetibilidad del valor de absorbancia de soluciones del ácido gálico (45 mg/L), analizadas por espectrofotometría UV-VIS.	83
Tabla 10. Reproducibilidad del valor de contenido total de fenoles para el ácido ferúlico (AF), expresada como la relación (%) entre las pendientes de las curvas de calibración.	84
Tabla 11. Valores de TEAC expresados como equivalentes Trolox [®] de antioxidantes, obtenidos en diferentes medios de reacción [31, 97-106].	86
Tabla 12. Linealidad y sensibilidad del método empleando Trolox [®] como sustancia de referencia.	88
Tabla 13. Repetibilidad del valor de porcentaje de inhibición de soluciones de Trolox [®] (300 μ M), analizadas por espectrofotometría UV-VIS.	88

Tabla 14. Reproducibilidad del valor de capacidad anti-radicalaria obtenida por el método ABTS del ácido gálico (AG) y expresada como $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\mu\text{mol AG}$.	89
Tabla 15. Parámetros de obtención del extracto aislado por SFE de salvia.	94
Tabla 16. Linealidad y sensibilidad del método ORAC empleando $\text{Trolox}^{\text{®}}$ como sustancia de referencia.	97
Tabla 17. Repetibilidad del valor de AUC de soluciones de $\text{Trolox}^{\text{®}}$ (40 μM), analizadas por fluorescencia.	98
Tabla 18. Reproducibilidad del valor de capacidad anti-radicalaria por el método ORAC del ácido ferúlico (AF) expresado como $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\mu\text{mol AF}$.	98
Tabla 19. Rendimientos (%) de los AE obtenidos por MWHD de <i>T. vulgaris</i> , <i>R. officinalis</i> y <i>S. officinalis</i> .	100
Tabla 20. Rendimientos (%) de los AE obtenidos por AV de <i>T. vulgaris</i> , <i>R. officinalis</i> y <i>L. citriodora</i> .	101
Tabla 21. Rendimientos (%) de los extractos de las especies <i>T. vulgaris</i> y <i>S. officinalis</i> obtenidos por SFE, usando diferentes parámetros de extracción.	106
Tabla 22. Composición química de los AE de <i>T. vulgaris</i> , obtenidos por MWHD.	111
Tabla 23. Composición química de los AE de <i>T. vulgaris</i> , obtenidos por MWHD.	112
Tabla 24. Composición química de los AE de <i>T. vulgaris</i> , obtenidos por MWHD y AV.	113
Tabla 25. Composición química de los AE de <i>T. vulgaris</i> , obtenidos por AV.	114
Tabla 26. Composición química de los AE de <i>R. officinalis</i> , obtenidos por MWHD.	117
Tabla 27. Composición química de los AE de <i>R. officinalis</i> , obtenidos por AV.	118
Tabla 28. Composición química de los AE de <i>S. officinalis</i> , obtenidos por MWHD.	121

Tabla 29. Composición química de los AE de <i>L. citriodora</i> , obtenido por MWHD.	122
Tabla 30. Cuantificación por GC-FID de los componentes principales en los AE aislados de las plantas bajo estudio.	124
Tabla 31. Composición química de los extractos obtenidos por SFE de <i>T. vulgaris</i> .	129
Tabla 32. Composición química de los extractos obtenidos por SFE de <i>T. vulgaris</i> .	130
Tabla 33. Composición química de los extractos obtenidos por SFE de <i>S. officinalis</i> .	131
Tabla 34. Composición química de los extractos obtenidos por SFE de <i>S. officinalis</i> .	132
Tabla 35. Áreas (mAU \pm S, n=2) y concentraciones (mg/g extracto \pm S, n=2) de los ácidos carnósico y ursólico encontrados en los extractos SFE de <i>S. officinalis</i> .	136
Tabla 36. Cantidad relativa (%) de los FA presentes en los extractos, obtenidos por SFE, de las especies <i>T. vulgaris</i> y <i>S. officinalis</i> .	139
Tabla 37. Valores de TAC (μ mol Trolox [®] /g AE) y contenido de fenoles (mg A. gálico/g AE) para los AE, obtenidos por los método ORAC, ABTS ⁺⁺ y Folin-Ciocalteu (\pm s, n=3).	141
Tabla 38. Valores de TAC (μ mol Trolox [®] /g SR) y contenido de fenoles (mg A. gálico/g SR) para las sustancias de referencia, obtenidos por los métodos ORAC, ABTS ⁺⁺ y Folin-Ciocalteu.	147
Tabla 39. Condiciones de cultivo de plantas de <i>T. vulgaris</i> , usadas para la obtención de sus AE y valores de capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles.	150
Tabla 40. Composición química del suelo de las parcelas donde se sembraron las plantas de <i>R. officinalis</i> a partir de las cuales se obtuvo por MW-HD su AE.	151
Tabla 41. Valores de TAC (μ mol Trolox [®] /g extracto) y contenido de fenoles (mg A. gálico/g extracto) para los extractos obtenidos por SFE, medidos por los método ORAC, ABTS ⁺⁺ y Folin-Ciocalteu (n=3).	153

Tabla 42. Valores de TAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto), medidos por el método ORAC (n=3) de cuatro extractos obtenidos por SFE de *S. officinalis*. 157

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de: A. β -Ficoeritrina y B. Fluorescina.	37
Figura 2. Capacidad antioxidante ORAC de una muestra medida como AUC [19].	38
Figura 3. Estructura química del catión-radical ABTS ⁺ .	39
Figura 4. <i>Salvia officinalis</i> L. cultivada en Sucre-Santander.	41
Figura 5. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. cultivada en Sucre-Santander.	42
Figura 6. <i>Thymus vulgaris</i> cultivada en Sucre-Santander.	43
Figura 7. <i>Lippia citriodora</i> cultivada en Sucre-Santander.	44
Figura 8. Estructuras de algunos compuestos bioactivos encontrados en extractos de <i>S. officinalis</i> y <i>R. officinalis</i> [66].	45
Figura 9. Estructuras químicas de los compuestos antioxidantes presentes en las especies <i>T. vulgaris</i> y <i>L. citriodora</i> [55, 69].	46
Figura 10. Publicaciones sobre antioxidantes, realizadas durante los años 2002-2011.	53
Figura 11. Distribución de los trabajos científicos sobre antioxidantes naturales, según el área de conocimiento (N>488).	54
Figura 12. Distribución de los trabajos científicos sobre antioxidantes sintéticos, según el área de conocimiento (N>266).	55
Figura 13. Principales revistas científicas donde se publica la mayor cantidad de trabajos científicos sobre antioxidantes de origen natural y sintético (N> 26).	56
Figura 14. Relación entre los años y el número de publicaciones sobre aceites esenciales y actividad antioxidante.	57
Figura 15. Relación entre las revistas y el número de publicaciones sobre aceites esenciales y actividad antioxidante (N>32).	57
Figura 16. Relación entre los autores y el número de publicaciones sobre aceites esenciales y actividad antioxidante (N>18).	58

Figura 17. Relación entre las áreas de conocimiento y el número de publicaciones sobre aceites esenciales y actividad antioxidante (N>61).	58
Figura 18. Esquema de los niveles de fertilización y densidad de siembra aplicados en las parcelas experimentales de Sucre-Santander.	61
Figura 19. Parcelas experimentales en Sucre-Santander. Foto: Archivo del Laboratorio de Cromatografía (UIS). Lugar: Sucre-Santander. Fecha: septiembre de 2010.	61
Figura 20. Montaje para hidrodestilación asistida por microondas.	63
Figura 21. Destilador industrial ubicado en el centro de acopio de Sucre-Santander.	63
Figura 22. Equipo <i>Thar SFE-2000-2-FMC50</i> , que se empleó en el proyecto para obtener los extractos de las plantas bajo estudio.	65
Figura 23. Lector de microplacas <i>Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader</i> (Sunnyvale, CA, EE.UU.), con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos y equipado con módulos de absorbancia (UV-Vis) y fluorescencia.	67
Figura 24. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Series GC System</i> , acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies 5973 Network</i> , equipado con un puerto de inyección <i>split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent 7863 Series</i> .	72
Figura 25. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890N Series GC System</i> , acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies 5975 Network</i> , equipado con un puerto de inyección <i>split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent 7863B Series</i> .	73
Figura 26. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890N Plus Series GC System</i> , acoplado a un detector de ionización en llama (FID), equipado con un puerto de inyección <i>split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent 7683B Series</i> .	74
Figura 27. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia <i>Agilent 1200 Series</i> .	75

Figura 28. Sensibilidad relativa (%) de la curva del ácido gálico (n=24) en medios de reacción con diferentes bases: A. Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃) (3% (W/V)); B. Hidróxido de sodio (NaOH) (0.175 M). La sensibilidad relativa (%) se estimó por la relación entre el valor de absorbancia en función del tiempo y el valor obtenido a los 120 min (Experimento A) y 4 min (Experimento B).	79
Figura 29. Sensibilidad relativa (%) de la curva del ácido feúlico (n=24) en medios de reacción con diferentes bases: A. Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃) (3% (W/V)); B. Hidróxido de sodio (NaOH) (0.175 M). La sensibilidad relativa (%) se estimó por la relación entre el valor de absorbancia en función del tiempo y el valor obtenido a los 120 min (Experimento A) y 4 min (Experimento B).	80
Figura 30. Mecanismo propuesto por OU y colaboradores [41] de la reacción de la fluoresceína (FL) con los radicales AAPH.	92
Figura 31. Comportamiento cinético de diferentes compuestos-patrón certificados y mezclas en el medio de reacción.	94
Figura 32. Avance de la reacción de los compuestos presentes en el extracto SFE de <i>S. officinalis</i> , para diferentes concentraciones de muestra en la microplaca.	95
Figura 33. Fotoestabilidad de la fluoresceína, en función del tiempo expresada como la relación de fluorescencia evaluada cada dos minutos sobre la fluorescencia inicial (f_x/f_0).	96
Figura 34. Rendimientos de los AE de <i>T. vulgaris</i> , obtenidos por dos técnicas de destilación.	101
Figura 35. Rendimientos de los AE de <i>R. officinalis</i> , obtenidos por dos técnicas de destilación (RO: <i>R. officinalis</i> y I-IX: Parcelas experimentales donde se cultivaron, bajo diferentes condiciones de cultivo, las plantas analizadas).	103
Figura 36. Rendimientos de los AE de <i>S. officinalis</i> , obtenidos por MWHD (RO: <i>S. officinalis</i> y I-II: Parcelas experimentales donde se cultivaron, bajo las mismas condiciones de cultivo, las plantas analizadas).	104

Figura 37. Cromatogramas típicos de los AE extraídos de: A. <i>T. vulgaris</i> (MW-HD), B. <i>T. vulgaris</i> (AV), C. <i>R. officinalis</i> (MW-HD), D. <i>R. officinalis</i> (AV), E. <i>S. officinalis</i> (MW-HD) y F. <i>L. citriodora</i> (MW-HD). Columna DB-5 (60 m). <i>Split</i> 1:30. FID. Véanse las Tablas 22-29, para la identificación de los picos.	109
Figura 38. Distribución, por familias, de compuestos de los AE de <i>T. vulgaris</i> (TV) obtenidos por dos técnicas de destilación (Véanse Tablas 19 y 20).	110
Figura 39. Distribución de las familias de compuestos presentes en los AE de <i>R. officinalis</i> (RO), <i>S. officinalis</i> (SO) y <i>L. citriodora</i> (LC), obtenidos por las técnicas de destilación MWHD y AV (Véanse Tablas 19 y 20).	116
Figura 40. Cromatogramas típicos de extractos obtenidos por SFE de: A. <i>T. vulgaris</i> y B. <i>S. officinalis</i> . Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30, FID.	126
Figura 41. Perfil cromatográfico de: A. Extracto SFE-SO-XII, B. Extracto etanólico de <i>S. officinalis</i> y C. Patrones certificados de los ácidos carnósico y ursólico, obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18; Fase móvil: metanol, 40%: Agua: Ácido o-fosfórico (0.1%), 60%; donde 1- Ácido carnósico, 2- No identificado y 3- Ácido ursólico.	134
Figura 42. Fotografía del precipitado aislado al finalizar el proceso de preparación de los extractos SFE. Foto: Archivo personal. Lugar: Laboratorio de Cromatografía (UIS). Fecha: 27 de agosto de 2011.	137
Figura 43. Perfiles cromatográficos de los FA presentes en: A. Extracto SFE-TV-XI, B. Extracto SFE-SO-XII y C. Mezcla patrón de ácidos grasos. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30, FID. Véase la Tabla 37, para la identificación de los picos.	138
Figura 44. Capacidad anti-radicalaria determinada por el método ORAC de: 1. RO-I, 2. RO-III, 3. RO-IV, 4. RO-VI, 5. Canfeno, 6. 1,8-Cineol, 7. Alcanfor, 8. Borneol y 9. <i>trans</i> - α -Cariofileno.	142
Figura 45. Correlación entre los resultados obtenidos por los métodos ABTS ⁺⁺ y Folin-Ciocalteu para los AE de <i>T. vulgaris</i> .	144
Figura 46. Correlación entre los resultados obtenidos por los métodos ABTS ⁺⁺ y Folin-Ciocalteu de los 32 AE bajo estudio.	145

Figura 47. Correlación entre los resultados obtenidos por el método Folin-Ciocalteu y el contenido de compuestos oxigenados determinados por GC-MS, para los AE de <i>T. vulgaris</i> .	145
Figura 48. Correlación entre los resultados de capacidad anti-radicalaria, medida por el método ORAC, y el contenido de compuestos oxigenados presentes en los AE de <i>T. vulgaris</i> .	146
Figura 49. Estructura química del ácido carnósico.	156

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. TABLAS DE COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS AE DE LAS ESPECIES BAJO ESTUDIO	177
ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN REALIZADAS POR GC-FID DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS EN LOS AE Y EXTRACTOS OBTENIDOS POR SFE	195
ANEXO 3. CURVAS DE CALIBRACIÓN REALIZADAS POR HPLC-DAD DE LOS ÁCIDOS CARNÓLICO Y URSÓLICO	202

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAPH	(2,2'-Azobis(2-amidinopropano)hidrocloruro)
AUC	<i>Area Under Curve</i> (Área bajo la curva)
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico).
AE	Aceite esencial o aceites esenciales
AH	<i>Antioxidant</i> (Antioxidante)
AOC	<i>Antioxidant Capacity</i> (Capacidad antioxidante)
BHA	<i>Butylated Hydroxyanisole</i> (Butilhidroxianisol)
BHT	<i>Butylated Hydroxytoluene</i> (Butilhidroxitoleno)
TV	<i>Thymus vulgaris</i>
SO	<i>Salvia officinalis</i>
RO	<i>Rosmarinus officinalis</i>
LC	<i>Lippia citriodora</i>
°C	Grado(s) Celsius
ca.	<i>Circa</i> (Aproximadamente)
d_f	Espesor de la fase estacionaria, µm.
D.I.	Diámetro interno, mm.
DPPH	<i>α-α-Diphenyl-β-Picrylhydrazyl</i> (Radical α-α-difenil-β-picrilhidracilo)
e.g.	Por ejemplo
ET	<i>Reaction and Assay Based on Electron Transfer</i> (Reacciones de transferencia de un electrón)
eV	Electrón – Voltio
EI	<i>Electro Impact</i> (Impacto de electrones)
FL	<i>Fluorescein</i> (Fluorescina)
FRAP	<i>Ferric Ion Reducing Antioxidant Power</i> (Poder antioxidante resuctos del ion férrico)
FA	<i>Fatty Acids</i> (Ácidos grasos)
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (Ésteres metílicos de ácidos grasos)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatógrafo de gases).

GC-ECD	<i>Gas Chromatography/Electron Capture Detector</i> (Cromatografía de gases acoplada a un detector de captura de electrones).
GC-FID	<i>Gas Chromatography/Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases acoplada a un detector de fotoionización en llama).
GC-MS	<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
HAT	<i>Assays Based on Hydrogen Atom Transfer</i> (Reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno)
IP	<i>Ionization Potential</i> (Potencial de ionización)
IR	Infrarrojo.
MADR	Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
min	Minuto(s).
mL	Mililitro(s).
mM	Milimolar.
m/z	Relación masa/carga.
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción del oxígeno radical)
PDMS/DVB	<i>Polidimethylsiloxane/Divinylbenzene</i> (Poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno)
β-PE	<i>β-Phycoerythrin</i> (β-Ficoeritrina)
PFPH	<i>Pentafluorophenylhydrazine</i> (Pentaflúorfenilhidracina)
RCS	<i>Reactive Chloro Species</i> (Especies reactivas de cloro)
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (Especies reactivas de nitrógeno)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies reactivas de oxígeno)
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
TEAC	<i>Trolox® Equivalent Antioxidant Capacity</i> (Capacidad antioxidante total equivalente al Trolox®)
TOSC	<i>Total Oxidant Scavenging Capacity</i> (Análisis en barrido de la capacidad antioxidante total)
UIS	Universidad Industrial de Santander

RESUMEN

TÍTULO: 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 SUCRE (SANTANDER)*

AUTOR: Ginna Paola Arias Moyano**

PALABRAS CLAVE: Antioxidantes, radicales, ORAC, ABTS+, Folin-Ciocalteu, aceites esenciales, extractos con fluido supercrítico.

DESCRIPCIÓN

Las gomas, polímeros, combustibles, lubricantes, solventes orgánicos, alimentos, cosméticos y productos de aseo personal, entre otros, se deterioran por la oxidación causada por especies reactivas de oxígeno. Los antioxidantes son compuestos o mezclas que previenen o inhiben el rápido desarrollo de estos procesos. Las plantas aromáticas y medicinales constituyen la principal fuente de aceites esenciales y extractos empleados en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos.

Es por esta razón que se implementaron tres metodologías para determinar la capacidad anti-radicalaria y el contenido de fenoles de aceites esenciales y extractos obtenidos con fluido supercrítico (SFE) aislados de hojas y tallos de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citriodora*, cultivadas en parcelas experimentales en Sucre (Santander). Los tres métodos se estandarizaron con base en figuras analíticas de mérito.

Por medio de las técnicas GC-MS, GC-FID y HPLC-DAD se estableció la composición química, la cual se relacionó con las propiedades anti-radicalarias, el contenido de fenoles y las condiciones de cultivo de las especies bajo estudio. Para los aceites esenciales se observaron algunas correlaciones entre las propiedades anti-radicalarias y el contenido de fenoles. Por extracción con fluido supercrítico se aislaron antioxidantes como los ácidos carnósico y ursólico en *S. officinalis*. En general, los aceites esenciales y extractos obtenidos por SFE presentaron contenido de fenoles y capacidades anti-radicalarias mayores que los de sus componentes individuales, vitamina E y los antioxidantes sintéticos BHA, BHT.

*Trabajo de Maestría en Química

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

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION AND THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS FROM *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citriodora*, CROPED IN THE MUNICIPIO SUCRE (SANTANDER)*

AUTHORS: Ginna Paola Arias Moyano**

KEYWORDS: Antioxidant, radical, ORAC, ABTS+•, Folin-Ciocalteu, Essentials oils, supercritical fluid extracts.

DESCRIPTION

The rubbers, polymers, fuels, lubricants, organic solvents, food, cosmetics and personal care products, among others, degraded by oxidation caused by reactive oxygen species. Antioxidants are compounds or mixtures that prevent or inhibit the rapid development of these processes. Aromatic and medicinal plants are the main source of essential oils and extracts used in the pharmaceutical, cosmetic and food.

Is for this reason that three methodologies were implemented to determine the anti-radical capacity and the phenolic content of essential oils and extracts obtained with supercritical fluid (SFE), isolated from leaves and stems of *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* and *Lippia citriodora*, which were cultivated in experimental plots in Sucre (Santander). The three methods were standardized according to analytical figures of merit.

GC-MS techniques, GC-FID and HPLC-DAD were used to determine the chemical composition, which was related to the anti-radical properties, the phenolic content and the growing conditions of the species under study. For essential oils some correlations were found between the anti-radical capacity and phenolic content. Carnosic and ursolic acids were isolated as antioxidants by supercritical fluid extraction from *S. Officinalis*. In general, essential oils and SFE extracts showed phenolic content and anti-radical capacity greater than their individual components, vitamin E and the synthetic antioxidants BHA and BHT.

*Graduation project

**Industrial University of Santander, Science Faculty, School of Chemistry.

Directors: Ph. D. Elena E. Stashenko y Ph.D. Jairo R. Martínez

INTRODUCCIÓN

La oxidación de compuestos orgánicos para obtener nuevos productos funcionalizados es uno de los métodos más eficientes en síntesis orgánica moderna y en la industria petroquímica. Por otro lado, la autoxidación de muchos compuestos, sus mezclas y productos promueven su rápido deterioro debido a la acción de especies radicalarias. Las gomas, polímeros, combustibles, lubricantes, solventes orgánicos, alimentos, cosméticos y productos de aseo personal, entre otros, se deterioran por la oxidación causada por especies reactivas de oxígeno. Los antioxidantes son compuestos o mezclas que previenen o inhiben el rápido desarrollo de estos procesos [1]. Estas sustancias han sido el objeto de intenso estudio durante los últimos 40 años, aunque su uso práctico se inició ya a finales del siglo XIX. Las primeras aplicaciones de compuestos antioxidantes en la industria estuvieron relacionadas con el desarrollo de las gomas sintéticas, debido a que éstas se oxidan fácilmente por el aire. Los primeros estudios empíricos realizados por Moureu y Dufresse [2] durante la Segunda Guerra Mundial, estuvieron enfocados en la estabilización de la acroleína por adición de hidroquinonas. En 1924 Christiansen y sus colaboradores [2] propusieron el mecanismo de las reacciones en cadena y explicaron la acción de los compuestos antioxidantes. Tres años después, Backstrom y sus colaboradores [2] comprobaron experimentalmente los mecanismos de la oxidación en cadena del benzaldehído y de terminación de la cadena con la hidroquinona.

Las plantas aromáticas y medicinales constituyen la principal fuente de aceites esenciales y extractos empleados en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos. Tradicionalmente, los aceites esenciales se han utilizado por sus propiedades como agentes aromatizantes, sin embargo, en los últimos años, ha aumentado el interés por sus propiedades anti-microbianas y antioxidantes [2]. El uso de las plantas como fuente de metabolitos secundarios goza de una

larga tradición. A pesar de que el estudio sobre las plantas era un objeto de investigación exclusivamente de la biología, varios investigadores se han interesado en estudiar su capacidad biosintética para obtener diversos productos metabólicos. Los compuestos con propiedades medicinales son de particular interés por sus aplicaciones terapéuticas, y se ha invertido mucho esfuerzo en la obtención de los mismos mediante el uso de diversas técnicas de extracción. Entre las técnicas de extracción más comunes se encuentran hidrodestilación, destilación con vapor, extracción con solventes y con fluido supercrítico. Hasta ahora, el proceso de extracción ha sido un paso previo necesario para estudio de la capacidad antioxidante.

Durante mucho tiempo se ha recurrido al empleo de antioxidantes sintéticos para prevenir el deterioro oxidativo de los alimentos. No obstante, estas sustancias cada vez están más restringidos por sus posibles efectos carcinogénicos y su hepatotoxicidad. Esto último ha motivado la constante búsqueda de antioxidantes más seguros. De ahí, que sea de particular importancia el desarrollo de métodos para la evaluación de las propiedades antioxidantes de las plantas. Estudios de capacidad antioxidante de los compuestos presentes en las plantas, evidencian la relación que existe entre la composición química de los aceites esenciales y extractos con los valores de capacidad antioxidante determinados por diferentes metodologías. Además, se han encontrado variaciones en la cantidad de los metabolitos secundarios, consecuencia de los cambios en las condiciones de cultivo y épocas de cosecha (composición del suelo, densidad de siembra, época de corte, entre otras).

La capacidad antioxidante se utiliza ampliamente como parámetro para caracterizar diferentes materiales vegetales. Esta capacidad se relaciona con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de aquellos procesos que causan excesiva oxidación involucran especies reactivas de oxígeno. Existen diversos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras biológicas. Algunos de

ellos utilizan la producción de un radical orgánico o especies reactivas del oxígeno y otros se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos. Un ensayo universal de la actividad antioxidante *in vitro* no existe, debido a que la actividad anti-radicalaria depende fundamentalmente de la naturaleza del radical y del método de generación del mismo. Con el fin de obtener resultados confiables la elección de un sistema químico para generar especies reactivas es un punto crítico en el desarrollo de cualquier ensayo antioxidante.

Este trabajo consistió en evaluar y determinar *in vitro* las propiedades antioxidantes de aceites esenciales y extractos obtenidos por SFE de *T. vulgaris*, *R. officinalis*, *S. officinalis* y *L. citriodora*, mediante métodos colorimétricos de *screening* (ensayos con el catión-radical ABTS⁺) y de fluorescencia (ORAC), implementados en un lector de microplacas. Además, se realizó la cuantificación de los compuestos fenólicos mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.

Los AE y extractos obtenidos por SFE se aislaron de plantas cultivadas en parcelas experimentales, con diferente densidad de siembra y nivel de fertilización, en las veredas El Retiro y La Granja ubicadas en el municipio de Sucre (Santander). Debido a las condiciones climáticas de excesiva lluvia dadas en la época de cosecha de las plantas analizadas, únicamente se pudo analizar el primer estadio vegetal.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ESPECIES RADICALARIAS

1.1.1 Definición y descripción. Los radicales libres (RL) son especies moleculares que en su estructura presentan uno o más electrones no apareados; éstas pueden existir de forma independiente y, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media [1]. Sin embargo, los RL no siempre se relacionan con su toxicidad porque la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado, a condiciones fisiológicas actúan como mediadores y reguladores, mientras que, a concentraciones elevadas, pueden actuar como potentes oxidantes [2].

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es un proceso natural, constante y continuo. Todas las células, independientemente de su tipo, están permanentemente produciendo estas especies radicalarias o prooxidantes [2]. Su acumulación excesiva resulta en un daño de diversos componentes celulares como: núcleo, ADN mitocondrial, membrana y proteínas citoplásmicas [3].

Entre las especies reactivas de oxígeno (Véase **Tabla 1**) se encuentra el radical superóxido, el cual se produce *in vivo* por algunas enzimas y por autooxidación de algunos productos alimenticios como flavonoides, sulfatos, hidroxihidroquinonas y otros compuestos fenólicos presentes en especies vegetales como el café. Este radical puede reaccionar para producir peróxido de hidrógeno, tal como se muestra a continuación [2]:

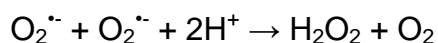


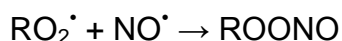
Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno y otros radicales de importancia biológica [4].

RADICALES	NO RADICALES
Especies reactivas de oxígeno (ROS):	
Superóxido, $O_2^{\cdot -a}$	Peróxido de hidrógeno, $H_2O_2^a$
Hidroxilo, $OH^{\cdot a}$	Ácido hipobromoso, HOBr
Hidroperoxilo, $HO_2^{\cdot a}$	Ozono, O_3
Peroxilo lipídico, $LO_2^{\cdot a}$	Oxígeno singulete, $(O_2^1)^a$
Alcoxilo lipídico, $LO^{\cdot a}$	Peróxidos lipídicos, LOOH ^a
	Productos de la reacción de Maillard
Especies reactivas de cloro (RCS):	
Cloro atómico, Cl^{\cdot}	Ácido hipocloroso, HOCl ^a
	Cloruro de nitrilo, NO_2Cl^b
	Cloroaminas
Especies reactivas de nitrógeno (RNS):	
Óxido nítrico, $NO^{\cdot a}$	Ácido nitroso, HNO_2^a
Dióxido de nitrógeno, $NO_2^{\cdot a}$	Catión nitrosilo, NO^+
	Anión nitroxilo, NO^-
	Tetróxido de dinitrógeno, N_2O_4
	Trióxido de dinitrógeno, N_2O_3
	Peroxinitrito, $ONOO^-$
	Ácido peroxinitroso, ONOOH
	Catión nitronio, NO_2^+
	Peroxonitrilo alquilo, ROONO
	Cloruro de nitrilo, NO_2Cl^b

^a Especies reactivas, particularmente relevantes, en la oxidación de alimentos.

^b NO_2Cl es una especie clorada y nitrada producida por la reacción de HOCl con NO_2 .

Otras especies reactivas, como los radicales peroxilo, pueden propagarse en sistemas lipídicos o acuosos, como también en proteínas, y se consideran especies reactivas que pueden interactuar con monóxido de nitrógeno, para prevenir los daños que éste pueda provocar [4]:



1.1.2 Daños producidos por las especies radicalarias. El daño que los radicales libres provoquen en los diferentes tejidos depende del balance entre

estas especies y los antioxidantes (enzimas u otros compuestos), que se encuentren en el organismo. El estrés oxidativo es la perturbación del equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, con un desplazamiento a favor de los primeros, de modo tal, que esta alteración da lugar a cambios en las biomoléculas y, de hecho, produce modificaciones funcionales en los lugares donde las mismas se encuentren en un momento dado [5].

Cuando en el organismo se encuentra un exceso de especies reactivas (RS), prácticamente cualquier estructura biológica que lo integra (ADN, ARN, proteínas, carbohidratos y lípidos) puede convertirse en diana de acción de estas especies y resultar dañada [6]. El daño causado por el ataque de ROS y RNS puede originar lesiones en el ADN, pérdida de función de enzimas y incremento de la permeabilidad celular [7]. Por esta razón, es común relacionar el daño producido por las diversas especies reactivas con la fisiopatología de varias enfermedades como el cáncer, la diabetes y enfermedades pulmonares [8, 9].

1.1.3 Efectos benéficos de las especies radicalarias. A pesar de que los RL se conocen básicamente por sus efectos dañinos sobre el organismo y productos de consumo, se debe puntualizar que la generación de RL no siempre se relaciona con su nocividad. Estas moléculas desarrollan funciones fisiológicas cruciales para el correcto funcionamiento del cuerpo humano y, aunque parezca contradictorio, las células necesitan estar rodeadas de un ambiente oxidativo para poder existir y desarrollarse. Los RL participan en diversas funciones celulares como la activación genética, el crecimiento celular, la apoptosis, la modulación de diversas reacciones químicas y el control de la homeostasis, regulando los procesos de fosforilación de las enzimas y factores de transcripción. Además, gracias a los RL es posible la relajación muscular y la dilatación de los vasos sanguíneos [10]. Los RL forman parte del mecanismo de defensa llevado a cabo por las células fagocíticas contra agentes infecciosos, participan en el metabolismo de xenobióticos a través de la acción del citocromo P450 y en el desarrollo embrionario; actúan también como

mediadores en la síntesis de otras moléculas [11].

1.2 COMPUESTOS FENÓLICOS

El término “compuestos fenólicos” engloba a todas aquellas sustancias que poseen varios grupos fenólicos unidos a estructuras aromáticas o alifáticas. Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal, siendo los principales metabolitos secundarios de la plantas (Véase **Tabla 2**). Su función biológica es proteger las plantas contra el estrés biológico y ambiental, por lo tanto, se sintetizan como respuesta al ataque de insectos, bacterias, hongos y virus, o por exposición a la luz ultravioleta (UV) [12, 13].

Lo más destacable de los compuestos fenólicos son sus propiedades antioxidantes. Por un lado, son muy susceptibles a ser oxidados y, por otro, impiden que los metales catalicen reacciones de oxidación. Así, los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico, presentan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interactúe con los electrones del anillo, lo que les confiere unas características especiales respecto al resto de alcoholes. Por otro lado, pueden actuar como quelantes (sobre todo los fenoles no flavonoides) y formar complejos con metales divalentes o trivalentes, especialmente, con el hierro y el aluminio, lo que tiene implicaciones nutricionales [14].

La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos [15]. Existen numerosos compuestos fenólicos, los cuales se clasifican de acuerdo con la estructura del anillo y el número de átomos de carbono sustituyendo y enlazando al anillo (Véase **Tabla 2**) [16].

Tabla 2. Principales grupos de compuestos fenólicos encontrados en las plantas [16].

Nº de átomos	Esqueleto básico	Clase
6	C ₆	Fenoles simples, benzoquinonas
7	C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos
8	C ₆ -C ₂	Acetofenonas, ácidos fenilacéticos
9	C ₆ -C ₃	Ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos, araquinonas
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides, isoflavonoides
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Liganos
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides

1.2.1 Determinación del contenido de fenoles. La gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, han traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación. Dentro de las más usadas para la cuantificación e identificación de compuestos fenólicos se encuentran los métodos cromatográficos y espectrofotométricos [2, 15].

- **Técnicas espectrofotométricas.** Los métodos espectrofotométricos no son nuevos en el campo de la química analítica y, hoy en día, se usan para la determinación de polifenoles. Entre los más comunes, se destacan el ensayo de la vainillina para la determinación de compuestos flavan-3-oles, dihidrochalconas y proantocianidinas y el ensayo de Folin-Ciocalteu, para determinar el contenido total de fenoles [15].
- **Método de Folin-Ciocalteu (FC).** Este método fue inicialmente propuesto en 1927 por Folin y Ciocalteu [17] y modificado en 1965 por Singleton y Rossi [18]. Se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por un reactivo de molibdeno y tungsteno en medio básico. En 1965 esta técnica fue mejorada gracias al uso del heteropolianión fosfórico de molibdeno y

tungsteno ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ y $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-14\text{WO}_3-4\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$), que oxida a los fenoles con alta especificidad. La transferencia de electrones, a pH básico, reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotungsténico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), este color es proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula [18]. A pesar de ser un método simple, preciso y sensible, es criticado porque existen diversas sustancias de naturaleza fenólica que interfieren en las determinaciones, dando lugar a concentraciones de compuestos fenólicos elevadas. Algunas de estas sustancias son proteínas, ácidos ascórbico y úrico, algunos aminoácidos y nucleótidos, azúcares, aminos aromáticas y algunas sales inorgánicas [19]. Sin embargo, el método FC se emplea con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de los alimentos, por ser un parámetro que generalmente muestra una correlación entre los métodos de medición de la capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles [20].

- **Ensayos ultravioleta.** Numerosos estudios se han realizado para desarrollar técnicas rápidas de cuantificación de compuestos fenólicos mediante ensayos ultravioleta, principalmente, porque cada grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por tener uno o varios máximos de absorbancia a distintas longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta. Por ejemplo, los fenoles simples tienen una absorbancia máxima entre 220 y 280 nm [15].
- **Técnicas cromatográficas.** Las técnicas cromatográficas han permitido la separación, aislamiento, purificación e identificación de compuestos fenólicos, así como el estudio de la interacción entre los polifenoles y otros componentes de los alimentos y las plantas. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es la técnica más empleada para la separación y cuantificación de compuestos fenólicos, ya que se puede determinar un gran número de polifenoles de interés nutricional, como fenoles simples, ácidos fenólicos y sus derivados, junto con los distintos flavonoides. Sin

embargo, esta técnica requiere una preparación de la muestra adecuada para cada uno de los compuestos a analizar [15].

1.3 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante se define como “cualquier sustancia que, presente en bajas concentraciones comparadas con las del sustrato oxidable, prevenga o inhiba la oxidación de ese sustrato” [21]. Desde el punto de vista biológico, el antioxidante se define como “aquel compuesto que protege a los sistemas vivos de los agentes que causan deterioro oxidativo” [22]. En bioquímica y medicina, los antioxidantes son enzimas o sustancias orgánicas, e.g. superóxido dismutasa, catalasa, son capaces de contrarrestar el daño causado por la oxidación en tejidos [23].

La oxidación es una reacción química donde un compuesto cede electrones, y, por lo tanto, aumenta su estado de oxidación. Las reacciones de oxidación pueden producir RL, los cuales son iniciadores de reacciones de oxidación en cadena [2]. Los antioxidantes neutralizan la acción de los RL, porque, al interactuar con ellos, ceden un electrón y se oxidan. La capacidad antioxidante de una molécula depende de sus características estructurales, de su reactividad hacia los peróxidos y otras especies reactivas, y de factores externos como concentración, temperatura, luz, tipo de sustrato, medio de reacción y la presencia de algunos componentes que puedan actuar como prooxidantes o sinérgicos [21, 23].

1.3.1 Clasificación de antioxidantes de acuerdo con el origen.

Dependiendo de su origen, los antioxidantes se clasifican como naturales o sintéticos. El término “natural” hace referencia a aquellas sustancias que se extraen de fuentes naturales como plantas, tejidos de animales, hongos o microorganismos. La mayoría de estos compuestos son derivados fenólicos, como por ejemplo, tocoferoles, flavonoides, ácidos fenólicos y gálicos y, en

algunos casos, carotenoides y terpenoides, que también han demostrado actividad antioxidante [22, 24]. Hoy en día, en diferentes ramas de la industria existe mucho interés en el uso de mezclas de antioxidantes naturales extraídas de plantas aromáticas y medicinales [2]. Algunos autores resaltan que dichas mezclas presentan efectos antioxidantes más fuertes que sus componentes individuales, ello, debido a posibles interacciones sinérgicas [2].

Los antioxidantes sintéticos se usan frecuentemente en la industria para estabilizar materiales no comestibles, e.g., plásticos, gomas y polímeros, y algunos no tóxicos como conservantes de alimentos [21]. Entre los antioxidantes disponibles comercialmente, de uso más frecuente, figuran: el butil hidroxianisol (BHA), el butil hidroxitolueno (BHT), la *ter*-butil hidroquinona y el galato de propilo (PG). La mayoría de estos compuestos son de tipo fenólico y las diferencias en sus capacidades antioxidantes están relacionadas con sus estructuras químicas [25]. Sin embargo, en los estudios sobre antioxidantes sintéticos [26] han demostrado que muchos de éstos ejercen efectos tóxicos sobre los tejidos de animales y pueden ser cancerígenos ya en bajas concentraciones, por lo que su uso en productos de consumo humano se cuestiona [27]. No obstante, algunos de estos antioxidantes también pueden poseer propiedades favorables, e.g., anti-mutagénicas y anti-tumorales [28]. El uso de antioxidantes sintéticos se regula en la legislación de la mayoría de los países, definiendo la cantidad permitida en los productos alimenticios. Por ejemplo, en la Unión Europea la cantidad de antioxidantes sintéticos se limita a un 0,01% (0,1 g/kg), si se usa un solo compuesto, y, si se emplean mezclas de antioxidantes, este límite asciende a un 0,02% [26, 27].

1.3.2 Mecanismos de inhibición de las reacciones de oxidación en cadena. Dependiendo de las condiciones de oxidación y su reactividad, el antioxidante (AH) y el catión-radical (A^{\bullet}) pueden participar en varias reacciones, que determinan el mecanismo de inhibición de la oxidación. Una correcta selección de los antioxidantes y la predicción de su tiempo de vida y efectividad, requieren conocer los mecanismos de acción y parámetros

cinéticos de oxidación. La cinética y los mecanismos de oxidación de hidrocarburos (RH) han sido estudiados detalladamente [2].

Las sustancias, que inhiben la oxidación de compuestos orgánicos en fase líquida, se dividen en cuatro grupos, dependiendo de su mecanismo de inhibición [29]: **1.** Inhibidores, como fenoles, aminas aromáticas, diaminas y aminofenoles, que terminan las reacciones en cadena con los radicales peroxilo; **2.** Inhibidores, incluyendo radicales estables, quinonas, hidrocarburos aromáticos y nitrocompuestos, que terminan las reacciones en cadena con los radicales alquilo; **3.** Agentes, como sulfatos, disulfatos, fosfatos, tiofosfatos y carbamatos, que descomponen los peróxidos sin generar otras especies radicalarias; y **4.** Agentes complejos, que desactivan metales pesados capaces de catalizar la descomposición de hidroperóxidos en radicales y, por ende, promover la oxidación.

1.4 MÉTODOS USADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA Y SU ESTANDARIZACIÓN

Debido a la complejidad de los extractos de plantas y alimentos, el aislamiento de cada antioxidante en su estudio individual resulta en un proceso muy costoso y a menudo ineficiente. Se han desarrollado varios métodos para cuantificar la actividad de los antioxidantes presentes en extractos (mezclas complejas). Sin embargo, no existe un método estándar, único, para esta determinación. Varios artículos de revisión se dedican a este tema, pero, con opiniones que varían mucho debido probablemente a la complejidad del asunto. En su estudio, Frankel y Meyer [30] señalaron, que es problemático el uso de métodos “unidimensionales” para evaluar antioxidantes en matrices complejas.

Los antioxidantes individuales pueden, en algunos casos, actuar por múltiples mecanismos o por uno solo, dependiendo del sistema de reacción. Además, la

respuesta de los antioxidantes es diferente a la de las distintas fuentes radicalarias u oxidantes. Múltiples características de las reacciones y mecanismos, así como las diferentes matrices en las cuales se encuentran los antioxidantes, hacen que ningún análisis o determinación refleje exactamente la actividad medida. Es decir, no existe un método “universal”, por el cual la capacidad antioxidante se mida con exactitud y cuantitativamente, para todo tipo de muestras [19, 31].

La estandarización de los métodos, para determinar la capacidad antioxidante, sirve para dar su uso apropiado, realizar comparaciones significativas de alimentos o productos comerciales, tener un control de las variables en las mediciones y cumplir con los estándares de calidad en los resultados obtenidos. Las características principales, que deben ser consideradas en la estandarización de una metodología, incluyen, entre otras, rango lineal, recuperación, repetibilidad, reproducibilidad y reconocimiento de interferencias [32-34].

1.4.1 Mecanismos de acción in vitro. Los antioxidantes pueden desactivar los radicales por dos mecanismos generales, clasificados en las siguientes categorías: **1.** Reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (**HAT**) y **2.** Reacciones de transferencia de un electrón (**ET**) (Véase **Tabla 3**). El resultado final de estos dos procesos es el mismo, pero la cinética y las reacciones secundarias que ocurren son diferentes.

La transferencia de electrones y las reacciones HAT pueden ocurrir en paralelo. El mecanismo dominante será determinado por la estructura y las propiedades del antioxidante individual o en mezcla, la solubilidad, el coeficiente de partición y el solvente del sistema. La energía de disociación de enlace (BDE) y el potencial de ionización (IP) son dos factores que generan el mecanismo y eficiencia de los antioxidantes [35].

1.4.2 Métodos *in vitro* desarrollados. Se han desarrollado métodos de evaluación de la capacidad antioxidante, basados en la evaluación de la capacidad de captura de los RL o en la evaluación de su capacidad reductora. Estos métodos permiten obtener correlaciones entre la capacidad antioxidante y la vida media de los productos, sin embargo, sólo permiten ligeras aproximaciones a sus efectos protectores de la salud. La capacidad antioxidante de extractos de plantas no sólo depende de su composición química, sino también de las condiciones de medición empleadas, por ello, fue necesario desarrollar varias metodologías [23, 36].

El ensayo de la capacidad de absorción del oxígeno radical (**ORAC**) tiene un mayor rango de aplicabilidad en el análisis de muestras botánicas y biológicas [23]. Rice-Evans y colaboradores [31] desarrollaron el ensayo antioxidante equivalente a la capacidad del Trolox[®] (**TEAC**), el cual ha sido ampliamente aplicado para el análisis de alimentos. En el trabajo realizado por Sánchez-Moreno y colaboradores [32] se demostró, que el ensayo con el 2,2-di-(4-*tert*-octilfenil)-1-picrilhidrazilo (**DPPH**) fue un método de análisis sencillo y exacto para medir la capacidad antioxidante de jugos y extractos de frutas y vegetales.

- **ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).** Es uno de los métodos HAT, el cual se basa sobre los trabajos previos de Glazer, en 1990 [37], y Ghiselli y colaboradores, en 1995 [38]. Cao y colaboradores [39] mejoraron luego el procedimiento. Las mediciones obtenidas por el método ORAC, de la inhibición de radicales peroxilo inducidos por reacciones de oxidación, es un ejemplo del rompimiento de reacciones en cadena por transferencia de un átomo de hidrógeno proveniente de un compuesto antioxidante. En este ensayo, los radicales peroxilo reaccionan con un compuesto fluorescente y forman un producto sin fluorescencia. La capacidad antioxidante se determina por la disminución de la fluorescencia y la cantidad de producto formado en función del tiempo [19].

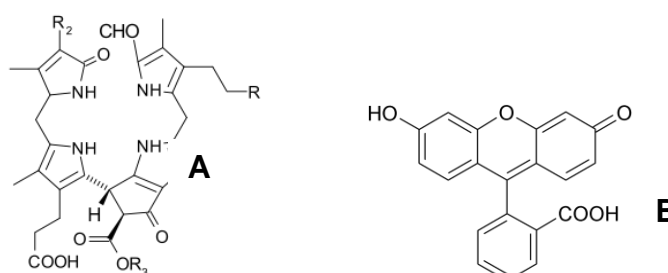
Tabla 3. Algunos ensayos *in vitro* para medir la capacidad antioxidante [23].

CATEGORÍA	ENSAYO
Reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT). $ROO^{\bullet} + AH \rightarrow ROOH + A^{\bullet}$ $ROO^{\bullet} + LH \rightarrow ROOH + L^{\bullet}$	Capacidad de absorción de oxígeno radical (ORAC) Parámetro antioxidante total de la captura de radicales(TRAP) Ensayo de decoloración de Crocina Inhibición de la absorción de oxígeno (IOU) Inhibición de la oxidación del ácido linoléico Inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad
Reacciones de transferencia de un electrón (ET). $M(n) - e(\text{de } AH) \rightarrow AH^{n+} + M(n-1)$	Capacidad antioxidante equivalente a la del Trolox® (TEAC) Parámetro antioxidante del ion férrico (FRAP) Difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) Capacidad reductora del cobre (II) Ensayo total de fenoles
Otros ensayos	Análisis en barrido de la capacidad antioxidante total (TOSC) Inhibición de la oscilación en la reacción de Briggs-Rauscher Quimioluminiscencia Electroquimioluminiscencia

La β -ficoeritrina (β -PE) (Véase **Figura 1**) es una proteína aislada de la microalga *Porphyridium cruentum*, se usó como sustancia fluorescente en los primeros estudios por el método ORAC [19]. Sin embargo, debido a la variabilidad entre mediciones e inconsistencias en los resultados, por la fotoestabilidad de la proteína y a las interacciones no específicas con ciertos compuestos, fue necesario reemplazarla por otras moléculas más fotoestables. Las sustancias fluorescentes que actualmente se utilizan son la fluorescina (FL) (Véase **Figura 1**), 3',6'-dihidroxi-spiro[isobenzofurano-1[3H],9'[9H]-xanteno]-3-ona) o diclorofluoresceína (H₂DCF-dA; 2',7'-

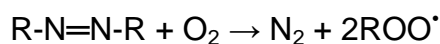
diclorodihidrofluoresceína diacetato) [19]. Los productos de la oxidación de la FL inducida por radicales peroxilo han sido identificados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) [25]. Se ha determinado que el proceso se lleva a cabo por medio del mecanismo de acción HAT [23].

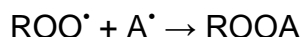
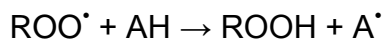
Figura 1. Estructuras químicas de: A. β -Ficoeritrina y B. Fluorescina.



Este ensayo proporciona una fuente controlable de radicales peroxilo durante las reacciones de los antioxidantes con lípidos en alimentos y sistemas fisiológicos. La metodología puede ser adaptada para la detección de ambas clases de antioxidantes, tanto hidrofílicos, como hidrofóbicos. Debido a la sensibilidad del método, por los cambios de temperatura [40], es necesario controlarla durante la medición. El medio de reacción debe ser incubado a 37°C, antes de adicionar la fuente radicalaria, AAPH [2,2'-Azobis(2-amidinopropano)hidrocloruro], para disminuir la variabilidad en las mediciones.

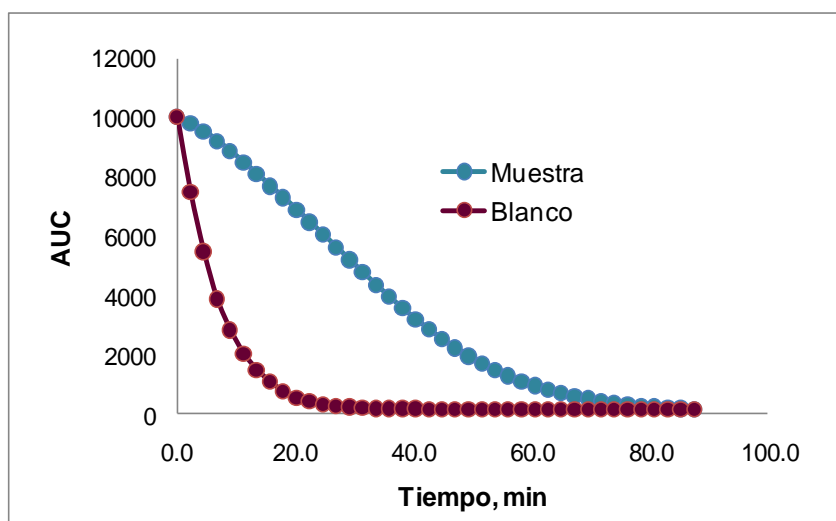
El mecanismo de reacción se basa en la transferencia al RL de un átomo de hidrógeno del antioxidante. Para ello, se emplea un iniciador para generar el radical peroxilo (ROO^\bullet). En presencia de un compuesto antioxidante (AH), el radical forma un enlace con un átomo de hidrógeno del AH y se originan un hidroperóxido (ROOH) y un radical antioxidante estable (A^\bullet).





La protección del antioxidante se mide a partir del área bajo la curva (AUC) de la muestra y el blanco de reacción (Véase **Figura 2**). La diferencia entre estos valores se extrapola en la curva de calibración del Trolox[®] [41].

Figura 2. Capacidad antioxidante ORAC de una muestra medida como AUC [19].

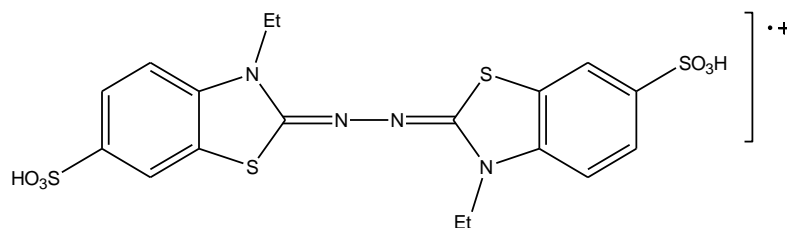


- **Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} o TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).** El ensayo TEAC o ensayo ABTS^{•+} [2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico)] se basa en la inhibición, por los antioxidantes, del catión-radical de coloración verde-azulada, ABTS^{•+}, que presenta máximos de absorción a 415, 645, 734 y 815 nm. De todas ellas longitudes de onda se emplean frecuentemente 415 y 734 nm [19]. La cuantificación se hace con base en la curva de calibración con Trolox[®], un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E. En este método se pueden usar dos estrategias: inhibición y decoloración. En la primera, los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical ABTS^{•+}, y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-

azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden, una vez el catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ se ha formado, y se determina la disminución en la absorbancia o pérdida de la coloración debida a la reducción del radical [32]. La muestra a analizar se adiciona antes de la formación del radical, por lo que se trata de un ensayo de inhibición [42].

En 1999 Re y colaboradores [31] modificaron el procedimiento, mediante la producción directa del cromóforo verde-azulado $ABTS^{+\bullet}$ (Véase **Figura 3**), por la reacción entre ABTS y peroxodisulfato de potasio. La adición de los compuestos antioxidantes al catión-radical conduce a su decoloración. El grado de decoloración puede ser medido a diferentes longitudes de onda y el porcentaje de inhibición se evalúa como la capacidad de reducción del antioxidante. Este porcentaje determina la capacidad antioxidante en comparación con la reactividad relativa del Trolox[®] [32].

Figura 3. Estructura química del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$.



2. MARCO DE ANTECEDENTES

Según consta en diversos testimonios históricos, el hombre desde su origen, ha utilizado las plantas aromáticas y medicinales, así como la extracción y utilización de sus esencias. Entre las especies vegetales más estudiadas se encuentran las plantas de origen mediterráneo de la familia *Labiatae* (e.g., *salvia*, *romero*, *tomillo*, *orégano*, etc.), las cuales presentan propiedades antioxidantes que superan las de muchos antioxidantes naturales y sintéticos utilizados comúnmente [43, 44].

La importancia de los fenómenos oxidativos explica el gran número de trabajos desarrollados con el objeto de comprobar el efecto protector de diferentes géneros y especies vegetales frente a esos procesos. Entre la gran variedad de plantas aromáticas y medicinales se encuentran las cuatro plantas bajo estudio, de las cuales, a continuación, se presenta una breve descripción:

- ***Salvia officinalis* L.** Esta especie es de origen mediterráneo, donde crece de forma espontánea y se cultiva principalmente sobre suelos calcáreos. Es un arbusto perenne cuyas hojas, de tamaño variable según sea su posición en el tallo, son lanceoladas, pubescentes, de color gris verdoso y con la superficie rugosa. Las flores, agrupadas en verticilos, son de color azul-violáceo [45].

Numerosas actividades biológicas con base en los conocimientos de la medicina tradicional, se le han atribuido a esta planta, sin embargo, sólo algunas han sido validadas científicamente. Como resultado de la validación de algunas propiedades biológicas de *S. officinalis*, se encontró que diferentes partes de la planta presentan actividad antibacterial [46], antimicrobial [47], antioxidante y antiviral [48].

Figura 4. *Salvia officinalis* L. cultivada en Sucre-Santander.

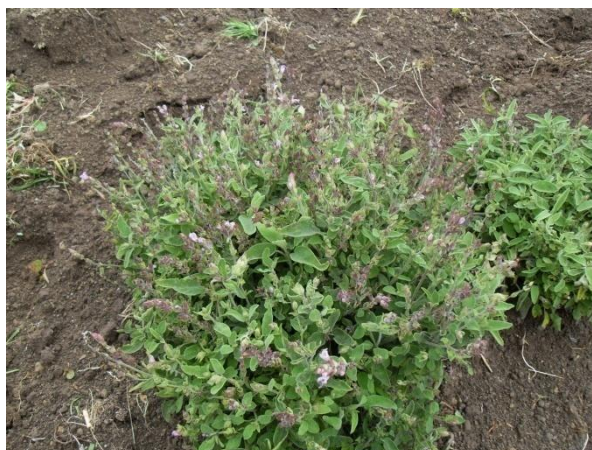


Foto: Archivo del Laboratorio de Cromatografía. Lugar: Zona rural (Veredas La Granja y El Retiro). Fecha: Septiembre 5 de 2009.

- ***Rosmarinus officinalis*.** El *romero* es una planta aromática conocida y utilizada desde la antigüedad como condimento y con fines medicinales. Se asegura, que los faraones egipcios hacían poner sobre su tumba un ramillete de *romero* para perfumar su viaje al país de los muertos. Pertenece a la familia *Labiatae* y es originaria de las costas del Mediterráneo. Es un arbusto perenne, muy ramificado, que puede crecer hasta 2 m; presenta hojas pequeñas y opuestas, y flores de color azul-violáceo. La planta posee un aroma alcanforado y un sabor amargo y astringente [49].

Se emplea como antiséptico, antidepresivo, digestivo, abortivo, insecticida y estimulante. Su AE se usa en pomadas para el tratamiento de úlceras y heridas, y en tónicos capilares para el cuidado del cabello, la alopecia y la caspa [45, 49, 50]. Además, se ha comprobado su actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*, los cuales son dos especies de hongos comunes en alimentos como cereales y granos [51].

Figura 5. *Rosmarinus officinalis* L. cultivada en Sucre-Santander.



Foto: Archivo del Laboratorio de Cromatografía. Lugar: Zona rural (Veredas La Granja y El Retiro). Fecha: Octubre 6 de 2009.

- ***Thymus vulgaris*.** La especie vegetal, conocida como *tomillo*, es una planta nativa de la región mediterránea (España, Italia, Francia, Grecia, etc.). Es un arbusto muy aromático, posee tallos rígidos y leñosos, cubiertos de pelos blancos. Las hojas son estrechas y diminutas, de margen recurvado y envés afieltrado. Las flores pueden ser de blancas a púrpuras, bilabiadas, con tubo petalino recto y estambres salientes, y se agrupan en espiguillas o racimos terminales, muy densos. Tomillo crece en terrenos rocosos, sobre calizas y a pleno sol, desde el Norte de África (Argelia, Túnez), hasta Asia Menor y en la zona meridional de Europa; es muy abundante en la Península Ibérica. Se trata de una planta con gran tradición en la herboristería. Se utiliza para aliviar la tos, los trastornos digestivos (flatulencia, digestiones pesadas) y para combatir la inapetencia, tomando una infusión de flores y hojas antes de las comidas. Es un remedio eficaz contra la diarrea leve y se ha utilizado tradicionalmente para combatir los parásitos intestinales. Por vía externa, es un buen desinfectante. Enjuagarse la boca con una infusión de tomillo combate el mal aliento. Sus componentes activos son ácidos fenólicos, aceite esencial, flavonoides, saponinas y taninos [45].

Entre los compuestos antioxidantes identificados en diferentes quimiotipos de la especie *Thymus vulgaris* se encuentran el

4-terpineol, anetol, apigenina, ácidos *p*-cumárico y caféico, carvacrol, timol, α -terpineno, ácido siríngico, mirceno, entre otros [52, 53]. Los extractos metanólicos y etanólicos, al igual que los AE, presentan propiedades antifúngica, insecticida, antimicrobial y antioxidante [54].

Figura 6. *Thymus vulgaris* cultivada en Sucre-Santander.



Foto: Archivo del Laboratorio de Cromatografía. Lugar: Zona rural (Veredas La Granja y El Retiro). Fecha: Junio 23 de 2010.

- ***Lippia citriodora*.** Esta especie pertenece a la familia *Verbenaceae* y se conoce con sinónimos botánicos *Aloysia triphylla* L'(Her) Britton, *Lippia triphylla* Kuntze y *Aloysia citriodora* Ortega; en Colombia, como "Cidrón", en Argentina, como "Cedrón" y "Hierba Luisa" y, en España, como "Hierba de la princesa". Es apreciada como planta ornamental en jardines y solares, debido al intenso y agradable olor a cítrico que desprenden sus hojas. Es un arbusto perenne, que puede medir más de 1,50 m de altura. Su nombre "*triphylla*" se debe a que sus hojas simples, rugosas e insertadas en cada nudo, están reunidas en vértices de tres; sus flores son blancas por fuera y violáceas por dentro [45]. Es una hierba astringente y aromática, que posee propiedades antiespasmódicas, carminativa, antioxidantes, antisépticas y es ligeramente sedante [49].

Figura 7. *Lippia citriodora* cultivada en Sucre-Santander.



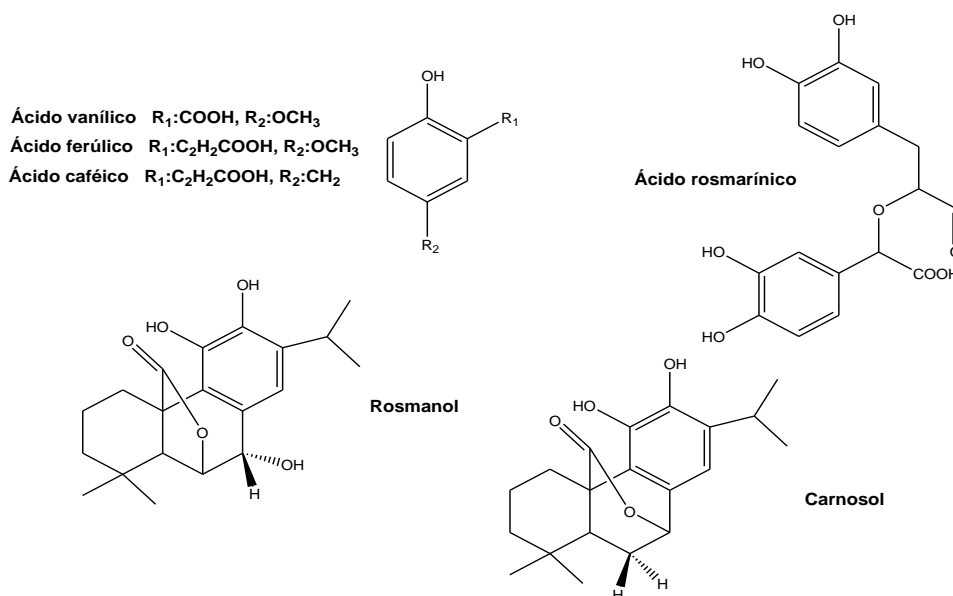
Foto: Archivo del Laboratorio de Cromatografía. Lugar: Zona rural (Veredas La Granja y El Retiro). Fecha: Julio 12 de 2010.

Los valores de capacidad antioxidante de aceites esenciales (AE) y extractos de plantas dependen del método de su extracción, el origen geográfico de la planta, las condiciones climáticas, la época de cosecha y el almacenamiento del material vegetal [55-57]. Dependiendo de la aplicación, actualmente, aceites esenciales y extractos aislados con solventes o con fluidos supercríticos (e.g., CO₂) se emplean como base para la producción de diferentes productos de consumo diario. El proceso de extracción viene determinado por el tipo de compuestos que se desean obtener. Así, los procesos de hidrodestilación o destilación por arrastre con vapor están encaminados a la obtención de AE con características organolépticas particulares. Si lo que se desea es obtener fracciones desodorizadas que conserven sus propiedades antioxidantes, se deben realizar extracciones con solventes (etanol, metanol, acetona, hexano, etc.), donde la polaridad del solvente determina el tipo y la proporción de los compuestos que conforman el extracto [58]. Sin embargo, también es necesario tener en cuenta que las condiciones de extracción pueden modificar los compuestos antioxidantes de interés, e.g., disminuir sus valores de capacidad antioxidante, por aumento de la temperatura durante el secado del material vegetal [59]. Por tal motivo, han surgido diversas técnicas de extracción, por ejemplo, la extracción con fluido supercrítico, la destilación molecular y el uso de ultrasonido, que disminuyen el

deterioro de los antioxidantes y minimizan los residuos contaminantes [60-62].

La actividad antioxidante de las plantas generalmente se asocia con la presencia de compuestos fenólicos, por lo que es necesario realizar su caracterización química, tanto de los AE, como extractos, empleando cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD) o de masas (MS). Los resultados sobre composición química, reportados en la literatura, muestran la presencia de terpenos oxigenados, flavonas y flavonoides [63]. En el caso de los aceites esenciales de romero y salvia, por ejemplo, Papageorgiou, Gachkav y colaboradores, reportaron los siguientes compuestos mayoritarios: 1,8-cineol, linalol, borneol, α -terpineol y piperitona [64, 65]. También, se han identificado compuestos fenólicos de peso molecular más alto, entre ellos, los ácidos rosmarínico y caféico (Véase **Figura 8**) [66], y se ha determinado, que su presencia en el romero es la causa de la capacidad antioxidante alta, confirmada por diferentes métodos [44].

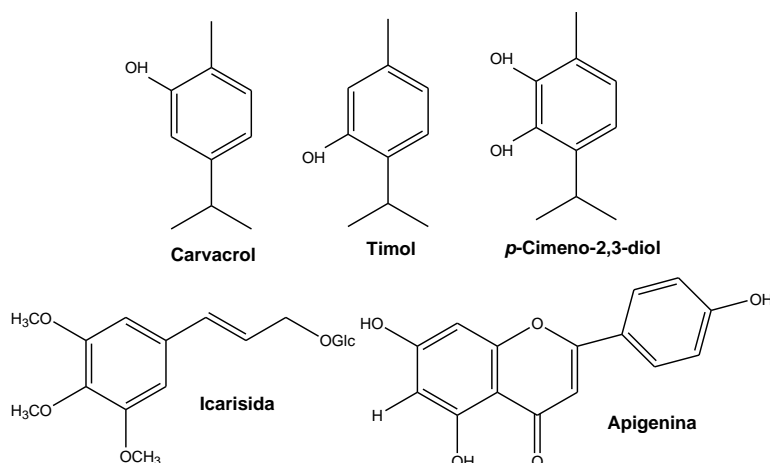
Figura 8. Estructuras de algunos compuestos bioactivos encontrados en extractos de *S. officinalis* y *R. officinalis* [66].



Las propiedades antioxidantes de la especie *T. vulgaris* han sido estudiadas en varios sistemas modelo. El compuesto fenólico, *p*-cimeno-2,3-diol, aislado del extracto en hexano de tomillo, mostró la antioxidante medida por el método de *Rancimant* y el ensayo de *Schaal* [67] mayor que el de los α -tocoferol y butil hidroxianisol. Además, el extracto de tomillo en acetona ha sido evaluado en aceite de girasol puro y en emulsión al 20%; se determinó que el extracto inhibe la generación de hexanal y pentanal [68].

El aceite esencial de esta especie contiene compuestos de tipo fenólico, e.g., carvacrol, timol y *p*-cimeno-2,3-ol (Véase **Figura 9**), responsables de las propiedades antioxidantes de sus extractos y AE, según resultados obtenidos por varios investigadores [68].

Figura 9. Estructuras químicas de los compuestos antioxidantes presentes en las especies *T. vulgaris* y *L. citriodora* [55, 69].



Entre las plantas bajo estudio, *L. citriodora* ha sido investigada mucho menos. En cuanto a su AOC y composición química, la información encontrada hace referencia a ciertos compuestos como apigenina, icarisida (Véase **Figura 9**), flavonoides y algunos glucósidos que presentan valores de actividad antioxidante altos [55, 56]. En los trabajos recientes [56], se determinó el efecto antioxidante de los componentes de las hojas en infusión sobre las especies reactivas de oxígeno, i.e., radicales superóxido e hidroxilo y ácido hipocloroso. La revisión bibliográfica realizada en las bases de datos consultadas [(*Elsevier*

(*Scopus*), *ACS publications* y *Web of Science*, período de observación: marzo de 2009 a diciembre de 2010)], demuestra que el número de artículos relacionados con la determinación de la capacidad antioxidante de las 4 plantas bajo estudio, por los tres métodos de análisis a utilizar, es muy bajo, comparado con los reportes en la literatura sobre productos naturales en general. A pesar de esto, algunos autores como LEAL *et al.* [70], quienes estudiaron las propiedades antioxidantes de extractos SFE de salvia, romero y tomillo, reportan resultados interesantes sobre la relación que existe entre la variación de la composición química y variables de extracción, con los valores de capacidad antioxidante, medida por el método de peroxidación lipídica [71].

La variedad de compuestos aislados de estas plantas cambia significativamente dependiendo del método de extracción. Entre los métodos más usados se encuentra la extracción con agua y con solventes, *e.g.*, metanol. En la **Tabla 4**, se presentan algunos métodos de extracción de metabolitos secundarios de especies vegetales bajo estudio.

La **Tabla 5** resume información sobre los antioxidantes aislados, identificados y cuantificados en diferentes partes de las plantas de *romero*, *salvia* y *tomillo* [58]. Como se observa, la mayoría de compuestos son de tipo fenólico. Se encuentran tanto fenoles simples, *e.g.*, carvacrol, así como ácidos fenólicos, entre ellos, rosmarínico, caféico y ursólico.

Tabla 4. Métodos de extracción de compuestos antioxidantes de las plantas de *romero*, *salvia* y *tomillo*.

ESPECIE	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	REF.
	Extracción con ácido tricloroacético y metano	[72]
Romero y	Extractos etanólicos y en acetona	[73]
Salvia	Extractos metanólicos	[74]
	Extracción <i>Soxhlet</i> con metanol	[75]
Romero	Extracción con fluido supercrítico (CO ₂)	[76]
	Extracto metanólico (80% metanol y 20% agua)	[58]
Salvia	Extracción <i>Soxhlet</i> con acetato de etilo	[58]
	Agua caliente presurizada y etanol al 70%	[58]
Salvia y	Homogeneización con <i>buffer</i> fosfato (pH 7.0)	[63]
tomillo	Extracción con fluido supercrítico	[58]
Tomillo	Extracción líquido-líquido continua, seguida de destilación a presión reducida.	[69]

Tabla 5. Compuestos antioxidantes aislados de especies vegetales de a la familia *Labiatae* [58].

Compuesto	Cantidad, ppm								
	Planta entera			Hojas			Raíces		
	Romero	Salvia	Tomillo	Romero	Salvia	Tomillo	Romero	Salvia	Tomillo
Apigenina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ácido ascórbico	612-673	—		✓	320-350	✓	✓	—	
β-Caroteno	19-21	—	24-25	✓	35-38	✓	✓	—	✓
β-Sitosterol	✓	20-1006	—	✓	✓	—	✓	✓	—
Ácido caféico	✓	—	—	✓	—	—	✓	—	—
Canfeno	23-2350	—	15-375	0-23	20-592	✓	355-2280	—	✓
Ácido carnósico	✓	—	—	✓	✓	—	✓	—	—
Carnosol	✓	✓	—	530-9803	✓	—	✓	✓	—
Carvacrol	✓	—	8-18720	0-6	—	✓	✓	—	✓
Ácido clorogénico	✓	—	✓	—	—	—	✓	✓	✓
γ-Terpineno	4-400	—	36-5460	✓	15-140	✓	25-300	—	✓
Hesperidina	—	—	—	✓	—	—	—	—	—
Hispidulina	—	—	—	✓	✓	—	—	—	—
Ácido labiático	✓	—	—	✓	—	—	✓	—	—
Luteolina	✓	—	—	✓	—	—	✓	—	—

Tabla 5. Continuación.

Compuesto	Cantidad, ppm								
	Planta entera			Hojas			Raíces		
	Romero	Salvia	Tomillo	Romero	Salvia	Tomillo	Romero	Salvia	Tomillo
Mirceno	25-5605	0-336	36-676	0-215	✓	✓	50-100	✓	✓
Ácido oleanólico	0-10500	0-400	0-6300	✓	140-786	✓	0-20	✓	✓
Rosmadial	—	—	—	0-30	—	—	—	—	—
Rosmanol	—	✓	—	0-92	✓	—	—	✓	—
Rosmaridifenol	✓	—	—	✓	—	—	✓	—	—
Ácido rosmarínico	0-25000	0-30000	0-26000	0-3500	✓	✓	0-13500	2000-5800	5000-13500
Rosmariquinona	✓	—	—	✓	—	—	✓	—	—
Escualeno	✓	—	—	✓	—	—	✓	—	—
Terpinen-4-ol	✓	—	73-8320	✓	10-1120	✓	55-110	—	✓
Timol	✓	—	15-24100	✓	—	✓	✓	—	✓
Ácido ursólico	28000-41000	—	15000-18800	✓	1255-1300	✓	0-20	—	✓
Alanina	—	✓	✓	—	✓	✓	—	✓	✓
Ácido caféico	—	—	—	—	—	0-16900	—	✓	—
Ácido carnosólico	—	—	—	—	0-2100	—	—	—	—
Catequina	—	✓	—	—	✓	—	—	✓	—
Ácido ferúlico	—	✓	✓	—	✓	✓	—	✓	✓
Ácido fumárico	—	✓	—	—	✓	—	—	✓	—

Tabla 5. Continuación.

Compuesto	Cantidad, ppm								
	Planta entera			Hojas			Raíces		
	Romero	Salvia	Tomillo	Romero	Salvia	Tomillo	Romero	Salvia	Tomillo
Ácido gálico	—	✓	✓	—	✓	✓	—	✓	✓
Ácido labiático	—	—	—	—	✓	✓	—	—	—
Acetato de linalilo	—	0-6048	—	—	✓	—	—	✓	—
Ácido- <i>p</i> -cumárico	—	✓	—	—	✓	0-420	—	✓	—
Eugenol	—	—	✓	—	—	✓	—	—	✓
Isoeugenol	—	—	✓	—	—	✓	—	—	✓
Isotimonina	—	—	✓	—	—	✓	—	—	✓
Kaempferol	—	—	✓	—	—	✓	—	—	✓
Ácido láurico	—	—	2300-2484	—	—	✓	—	—	✓
Acetato de linalilo	—	—	15-4680	—	—	✓	—	—	✓
Luteolina	—	—	✓	—	—	✓	—	—	✓
Metionina	—	—	1370-1980	—	—	✓	—	—	✓
Ácido mirístico	—	—	1500-1620	—	—	✓	—	—	✓
Naringenina	—	—	✓	—	—	✓	—	—	✓
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	—	—	✓	—	—	✓	—	—	✓
Ácido palmítico	—	—	17200-18576	—	—	✓	—	—	✓
Ácido vanílico	—	—	✓	—	—	✓	—	—	✓

3. CIENCIOMETRÍA

La vigilancia tecnológica es un proceso sistemático, que logra analizar y comparar la información, usando diferentes herramientas, entre ellas, bases de datos, patentes y buscadores de *internet*, que permiten organizar la información, objetivo principal de la cienciometría.

La cienciometría es una herramienta que permite situar a un país, una institución, un área temática o un individuo en el contexto mundial de la productividad científica. Esta herramienta analítica ayuda a determinar cuáles son las instituciones, qué están produciendo, si son nacionales o extranjeras, cómo lo están haciendo, en qué revistas están publicando, cuáles son los autores más citados, qué patrones de coautoría existen, cuáles son los principales países con los que se colabora, qué tipo de documentos se están publicando y cuáles son las producciones totales y sus impactos, entre otros aspectos.

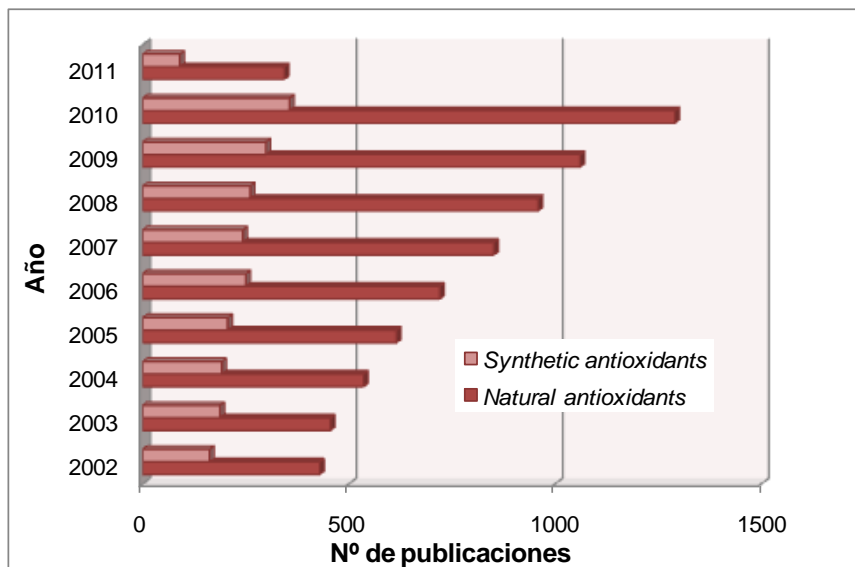
3.1 ANTIOXIDANTES NATURALES Y SINTÉTICOS

En el presente trabajo, la metodología de la cienciometría se aplicó al estudio de antioxidantes naturales y sintéticos y la actividad antioxidante de los aceites esenciales, usando la base de datos *Elsevier (Scopus)* [77] disponible en la Universidad Industrial de Santander, para su uso académico.

Inicialmente, se realizó una búsqueda general sobre los antioxidantes naturales y sintéticos, con el fin de observar la tendencia de publicaciones realizadas en los últimos 10 años, según los artículos publicados en las revistas indexadas en la base de datos *Elsevier (Scopus)*. Los resultados se presentan en la **Figura 10**, donde se observa un aumento de las publicaciones sobre antioxidantes

naturales y sintéticos entre los años 2002 a 2010.

Figura 10. Publicaciones sobre antioxidantes, realizadas durante los años 2002-2011.



Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*; Consultado 6 de abril de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH. (*Natural antioxidants* y *Synthetic antioxidants*). Número de publicaciones: 9502. Período de observación: 2002-2011.

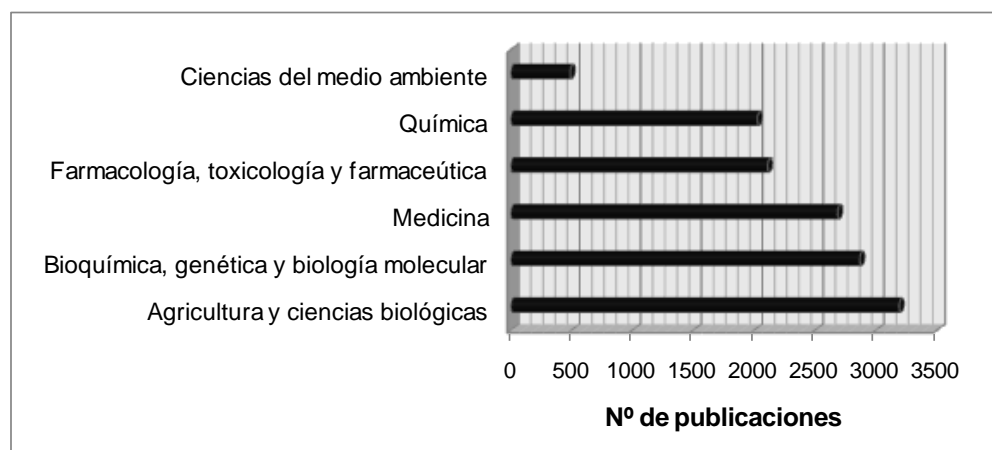
Actualmente, se observa una tendencia hacia la aplicación y desarrollo de productos de origen natural y no uso de sustancias sintéticas. Los compuestos antioxidantes incorporados en la mayoría de alimentos, cremas, jabones, aceites para masajes, ambientadores, etc., son de origen sintético entre ellos figuran el BHA, el BHT y la vitamina E sintética, que presentan valores de capacidad antioxidante altos, determinada por diferentes métodos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que, a pesar de ser excelentes antioxidantes, estos compuestos pueden presentar efectos tóxicos y cancerígenos, a determinadas concentraciones, y poseer características acumulativas debido a que algunas presentan un carácter lipofílico.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en el Programa Internacional de la Seguridad Química (INCHEM) [78], establece los límites máximos de antioxidantes sintéticos permitidos para una amplia gama de alimentos sólidos y bebidas. Los antioxidantes BHA y BHT, tienen valores ADI (*Acceptable Daily*

Intake) entre 0-0.5 y 0-0.3 mg/kg de peso corporal, respectivamente. BHA y BHT son aditivos alimenticios que se utilizan como antioxidantes en grasas o aceites, y productos que los contienen, pueden ser usados en conjunto con otras sustancias sintéticas como galato de propilo y *tert*-butil hidroquinona [79, 80].

En la búsqueda de sustancias puras o mezclas complejas de origen natural, que puedan reemplazar las sustancias sintéticas, se ha encontrado que algunas plantas de origen mediterráneo, *e.g.*, salvia, romero y tomillo, biosintetizan compuestos que poseen valores de capacidad antioxidante altos. Esto se refleja en las principales áreas de su aplicación, encontradas con las dos ecuaciones de búsqueda (Véase **Figuras 11 y 12**).

Figura 11. Distribución de los trabajos científicos sobre antioxidantes naturales, según el área de conocimiento (N>488).

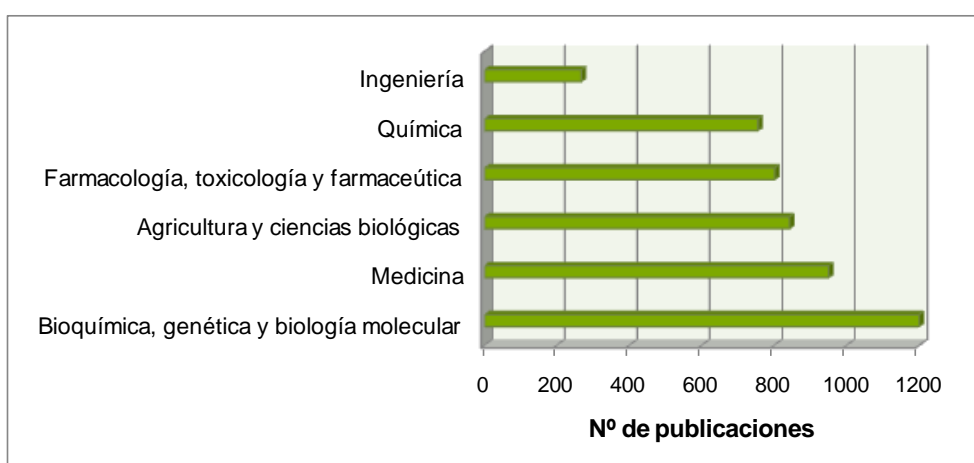


Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta 6 de abril de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (*Natural antioxidants*). Número de publicaciones: 13360. Período de observación: 2002-2011.

Las actividades de investigación sobre antioxidantes naturales, en las áreas de ciencias del medio ambiente, química, farmacología, toxicología y farmaceútica, reflejan potencial biológico y farmacológico alto. La distribución de las áreas de conocimiento, consultada en la base de datos *Elsevier (Scopus)*, se presenta en la **Figura 11**, se observa que el rango de aplicabilidad de estos compuestos y sus mezclas va desde principios activos de preparados farmacológicos y

perfumes hasta conservantes de alimentos, entre otros. Este comportamiento también se observa en la **Figura 12**, donde se muestra la distribución de las áreas de conocimiento, según la ecuación de búsqueda empleada: *Synthetic antioixdants*. Sin embargo, el número de publicaciones varía significativamente de 13360 a 4809, al usar las palabras clave *Natural antioxidants* y *Synthetic antioxidants*, respectivamente.

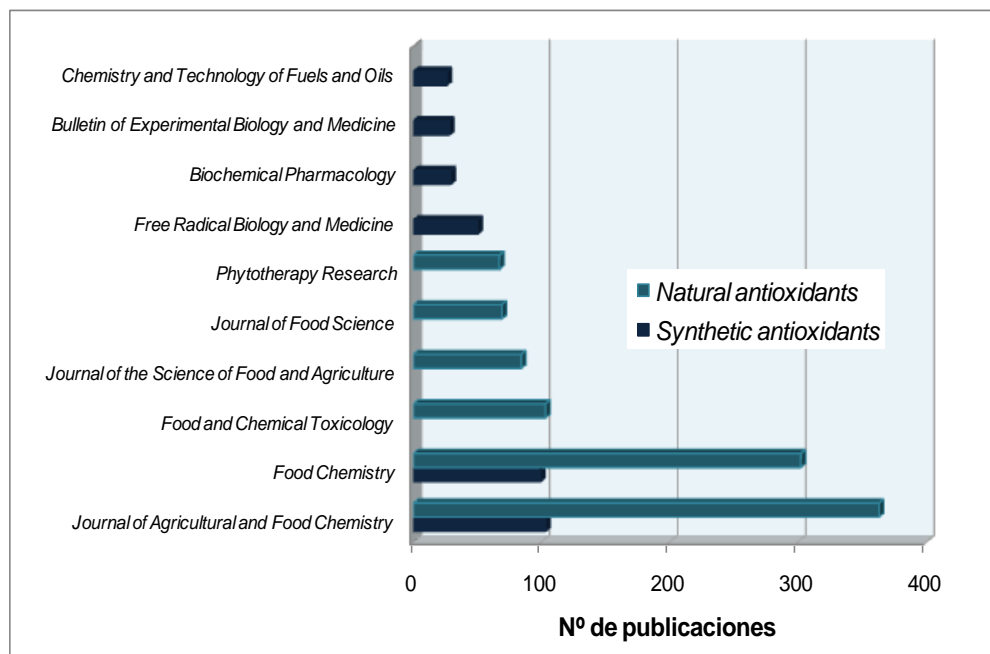
Figura 12. Distribución de los trabajos científicos sobre antioxidantes sintéticos, según el área de conocimiento (N>266).



Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta 6 de abril de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (*Synthetic antioxidants*). Número de publicaciones: 4809. Período de observación: 2002-2011.

Las siguientes son revistas científicas, que más publican sobre los estudios relacionados con antioxidantes de origen natural o sintético: *Journal of Agricultural Food Chemistry*, con 363 publicaciones relacionadas con los antioxidantes naturales y 302 con los sintéticos, y *Food Chemistry*, con 103 y 99 publicaciones sobre antioxidantes naturales y sintéticos, respectivamente. Las demás revistas encontradas, usando las dos búsquedas realizadas, presentan diferentes áreas de investigación e.g., alimentos y agricultura. Entre ellas, que publican trabajos sobre antioxidantes naturales, figuran *Food and Chemical Toxicology* (103 publicaciones), *Journal of the Science of Food and Agriculture* (84 publicaciones) y *Journal of Food Science* (69 publicaciones).

Figura 13. Principales revistas científicas donde se publica la mayor cantidad de trabajos científicos sobre antioxidantes de origen natural y sintético (N> 26).

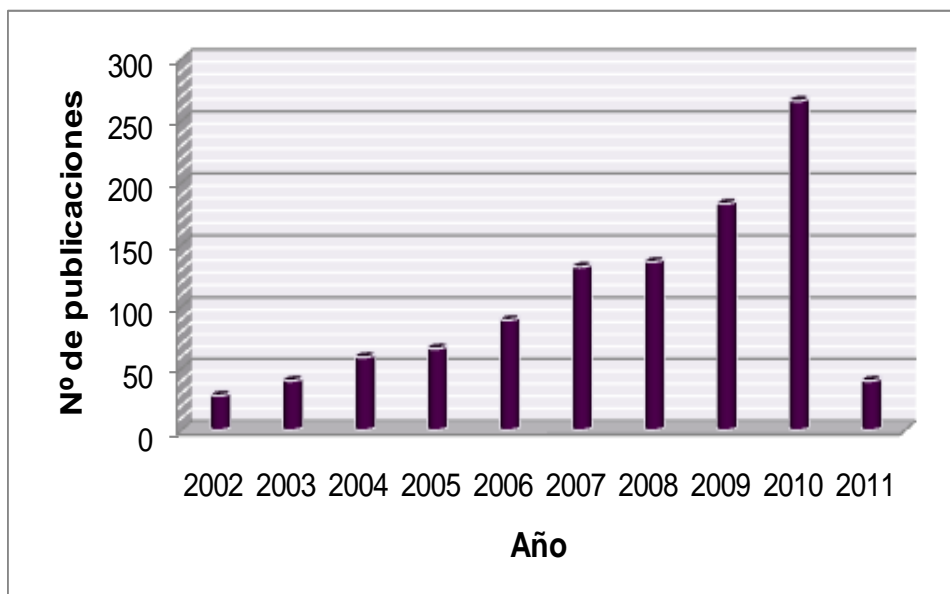


Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta 6 de abril de 2011. Ecuaciones de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (*Synthetic antioxidants*) y TITLE-ABS-KEY-AUTH (*Natural antioxidants*). Número de publicaciones: 1323. Período de observación: 2002-2011.

3.2 ACEITES ESENCIALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

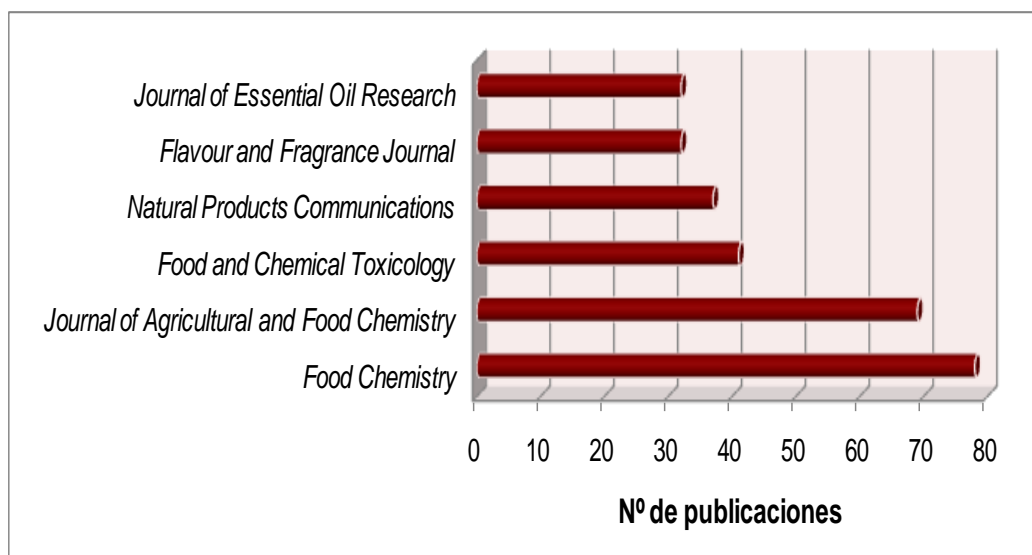
Las **Figuras 14-17** indican la relación de los artículos registrados en la base de datos *Elsevier (Scopus)* [77], sobre aceites esenciales y su actividad antioxidante. En el año 2010 se publicó más sobre el tema y la revista *Food Chemistry* tuvo mayor número de publicaciones. Los autores con mayor número de publicaciones son Sokmen, A. de Turquía, con 24, seguido de Polissiou, M. de Grecia, con 23. Agricultura, ciencias biológicas, farmacología, toxicología y química son las áreas más desarrolladas en el estudio de la actividad antioxidante de los aceites esenciales.

Figura 14. Relación entre los años y el número de publicaciones sobre aceites esenciales y actividad antioxidante.



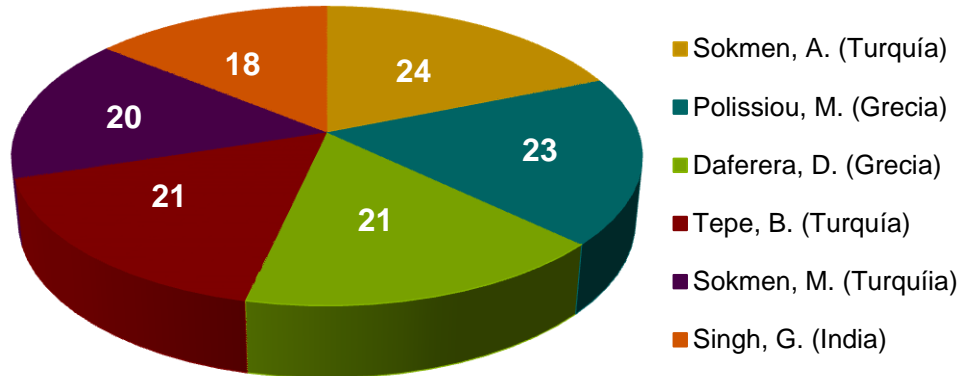
Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta 20 de marzo de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (*Essential oils and Antioxidant activity*). Número de publicaciones: 1039. Período de observación: 2002-2011.

Figura 15. Relación entre las revistas y el número de publicaciones sobre aceites esenciales y actividad antioxidante (N>32).



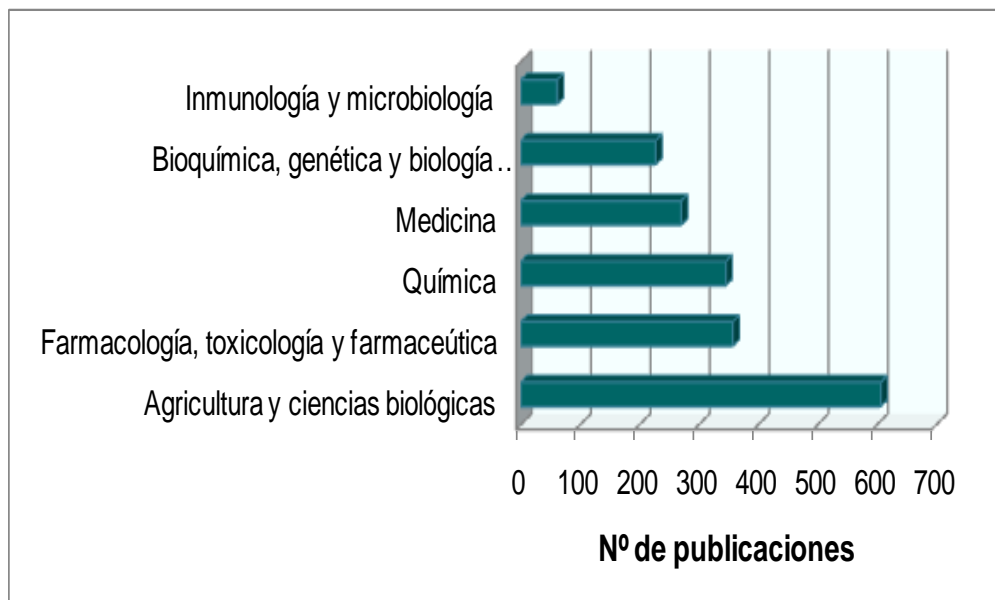
Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta 30 de marzo de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (*Essential oils and Antioxidant activity*). Número de publicaciones: 289. Período de observación: 2002-2011.

Figura 16. Relación entre los autores y el número de publicaciones sobre aceites esenciales y actividad antioxidante (N>18).



Fuente: Base de datos Elsevier (Scopus). Fecha de consulta 25 de marzo de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (Essential oils and Antioxidant activity). Número de publicaciones: 127. Período de observación: 2002-2011.

Figura 17. Relación entre las áreas de conocimiento y el número de publicaciones sobre aceites esenciales y actividad antioxidante (N>61).



Fuente: Base de datos Elsevier (Scopus). Fecha de consulta 25 de marzo de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (Essential oils and Antioxidant activity). Número de publicaciones: 1866. Período de observación: 2002-2011.

4. METODOLOGÍA

4.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO

Los siguientes reactivos y patrones utilizados en el trabajo se adquirieron en *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EE.UU.): Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; 97%), α -tocoferol (97%), butilhidroxianisol (BHA, 99%), butilhidroxitolueno (BHT, 99%), timol (99%), carvacrol (98%), ácido ferúlico (99%), ácido *p*-cumárico (98%), ácido gálico (99%), ácido caféico (98%), ácido rosmarínico (97%), ácido carnósico (98%), 1,8-cineol (99%), citral (95%), γ -terpineno (97%), *trans*- β -cariofileno (98.5%), canfeno (95%), alcanfor (95%), borneol (97%), limoneno (96%), α -humuleno (98.0%), ABTS (sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-*bis*-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico; 98%), fluorescina (FL), AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano)hidrocloruro) y β -metil-ciclodextrina (98%). El cloruro de potasio (99%), carbonato de sodio (99%), persulfato de potasio (PDS, 97%), hidróxido de sodio (NaOH), sulfato de sodio (Na₂SO₄), se compraron a Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los solventes (metanol, etanol) fueron de grado analítico de Mallinckrodt Baker Inc. (J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.), al igual que β -metil-ciclodextrina y reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N), KH₂PO₄ (99%). Se utilizó agua tipo I obtenida en un equipo Millipore (Millipore S.A., Molsheim, Francia).

4.2 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal de las especies bajo estudio salvia (*Salvia officinalis*), romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cidrón (*Lippia citriodora*) sé colectó en lotes de propagación en las veredas el Retiro, La Granja y La Pradera (Sucre-Santander). El análisis de suelo de estas parcelas

se llevó a cabo previamente, tanto en lotes experimentales, con diferente nivel de fertilización, como en lotes con diferente densidad de siembra.

De las parcelas de propagación, se tomaron muestras homogéneas de suelo siguiendo un muestreo en forma de **X**, tomando las muestras en los extremos y en el centro, a la misma profundidad (50 cm) y procurando que cada muestra de suelo tuviera una cantidad similar. Todas las muestras se mezclaron para homogeneizarlas y la muestra final de cada parcela se almacenó, etiquetó y se llevó al Laboratorio Químico de Suelos de la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de Santander (UIS, Bucaramanga), donde se realizaron los análisis y la cuantificación de elementos mayores y menores, se determinaron la acidez y la textura del suelo.

A partir de las plantas cultivadas en las parcelas experimentales, se realizó la propagación del material vegetal mediante la reproducción por esquejes de ca. 15 cm de longitud cada uno. Una vez cumplido el tiempo de propagación, los esquejes de las 4 especies aromáticas de climas templado y frío, se plantaron en parcelas experimentales de 0.2 ha en el municipio de Sucre (Santander), con diferentes niveles de fertilización (75, 150 y 200 g de mezcla orgánica/planta) y densidad de siembra (31250, 38461 y 45400 planta/ha) (Véanse, **Figuras 18 y 19**). Los insumos que se utilizaron para la fertilización, fueron de origen orgánico (compostaje, lombrinaza, roca fosfórica, etc.), y los demás fertilizantes (secundarios y terciarios), se adquirieron en el comercio, teniendo en cuenta que fueran de producción orgánica y biológica.

Figura 18. Esquema de los niveles de fertilización y densidad de siembra aplicados en las parcelas experimentales de Sucre-Santander.

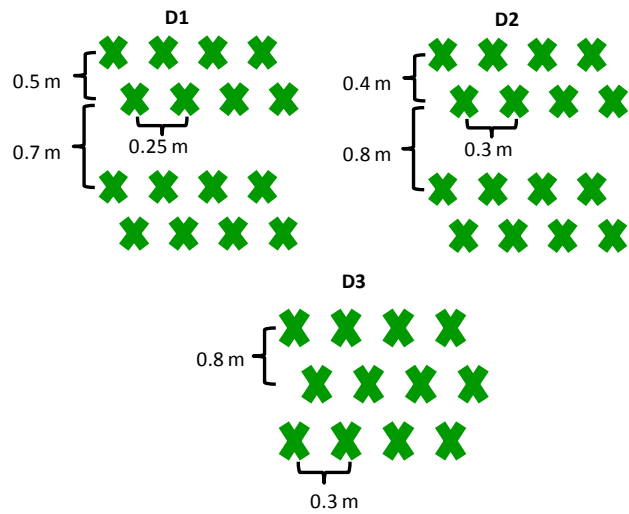


Figura 19. Parcelas experimentales en Sucre-Santander. Foto: Archivo del Laboratorio de Cromatografía (UIS). Lugar: Sucre-Santander. Fecha: septiembre de 2010.



4.3 OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS.

Los aceites esenciales de algunas de las plantas estudiadas se obtuvieron por hidrodestilación, en un equipo tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* adaptado a un sistema de calentamiento por radiación de microondas (Véase **Figura 20**), usando un horno convencional *Samsung*, modelo AMW 8113ST (Malasia), con potencia de salida de 1000 W y frecuencia de radiación de 2.5 GHz. Al balón de destilación (2 L) se adicionó agua destilada (300 mL). El tiempo total de extracción fue de 45 min, dividido en 3 turnos (3×15 min), a intervalos entre ellos de 1 min. La potencia del horno (720 W) se fijó en 50% de la potencia total del equipo [81].

Otros aceites esenciales se aislaron por arrastre con vapor, en un destilador industrial con capacidad de 300 kg construido por el Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM. El destilador se encuentra instalado y opera en el centro de acopio de la Comunidad Campesina de la Vereda El Retiro de Sucre-Santander. Fue diseñado según lo propuesto en el macro-proyecto titulado “Fortalecimiento y aumento de la competitividad de la cadena productiva nacional de aceites esenciales y productos derivados” (Código: 2008V3781), financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) (Véase, **Figura 21**).

Figura 20. Montaje para hidrodestilación asistida por microondas.



Foto: Archivo personal. Lugar: Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM-UIS (Bucaramanga). Fecha: 23 de marzo de 2011.

Figura 21. Destilador industrial ubicado en el centro de acopio de Sucre-Santander.



Foto: Archivo del Laboratorio de Cromatografía (UIS). Lugar: Centro de acopio de la Comunidad Campesina de la Vereda El Retiro de Sucre-Santander. Fecha: 2 de marzo de 2009.

Los AE obtenidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro (J.T. Baker, Phillisburg, NJ, EE.UU.), para evitar su daño por humedad, y se pesaron en una balanza METTLER TOLEDO PB 1502-S (Küsnacht, Suiza). Las extracciones se realizaron por triplicado, los pesos de los AE se promediaron y los rendimientos de aceites se calcularon con base en el peso de material vegetal seco (MV) inicial, colectado en las diferentes parcelas de las 4 especies bajo estudio.

Los extractos SFE se obtuvieron a partir del material vegetal, y sometido previamente a secado a temperatura ambiente, por varios días. El equipo para obtención de los extractos fue un *Thar SFE-2000-2-FMC50* (Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.), equipado con un portamuestra en acero inoxidable con capacidad para $2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$; un sistema de separación y colección de los extractos tipo ciclón, con capacidad para $5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$; regulador automático de presión; bombas de alta presión *P-200A* (Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.), para el CO₂ y *P-50* (Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.), para el modificador; y un medidor de flujo *Sitrans F C Massflo* tipo *MASS 6000* (Siemens AG, Berlín, Alemania) (Véase **Figura 22**).

En la **Tabla 6**, se presentan las condiciones de extracción con CO₂ supercrítico utilizadas para las especies *S. officinalis* y *T. vulgaris*. Los extractos obtenidos en cada experimento, se almacenaron en ausencia de luz (tapados y en frascos ambar), a una temperatura de -16°C.

Tabla 6. Condiciones experimentales para obtener extractos SFE de *S. officinalis* y *T. vulgaris*.

Parámetros	Dominio	
	-	+
Presión	30 MPa	50 MPa
Temperatura	313 K	353 K
Flujo	20 g/min	60 g/min
Tiempo dinámico	30 min	120 min
Tiempo estático	0 min	20 min

Figura 22. Equipo *Thar SFE-2000-2-FMC50*, que se empleó en el proyecto para obtener los extractos de las plantas bajo estudio.

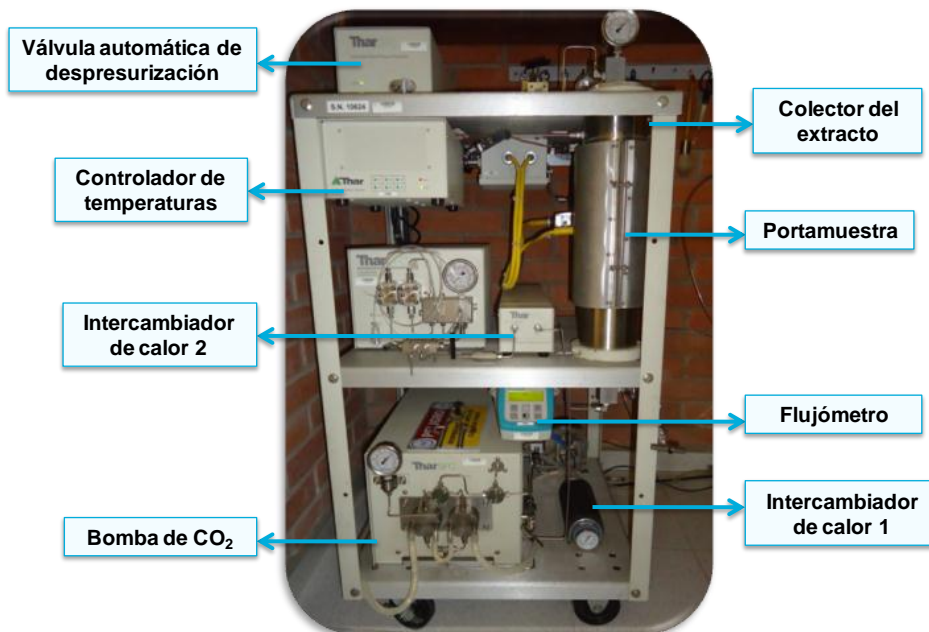


Foto: Archivo personal. Lugar: Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM-UIS (Bucaramanga). Fecha: 23 de marzo de 2011.

4.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los AE deshidratados con Na₂SO₄ y almacenados a -16°C y en ausencia de luz. Luego se pesaron en una balanza *Metler Toledo AL204* (Küsnacht, Suiza) y, luego, se disolvieron directamente en diferentes disolventes, *i.e.*, etanol, metanol y diclorometano, dependiendo del método de análisis instrumental (GC-MS, GC-FID y los métodos Folin-Ciocalteu, TEAC y ORAC).

Los extractos SFE se pesaron en una balanza *Metler Toledo AL204* (Küsnacht, Suiza). Se adicionó luego etanol o metanol (dependiendo del método de análisis, GC-MS, GC-FID, HPLC-DAD y los métodos Folin-Ciocalteu, TEAC y ORAC) y la mezcla se sometió a sonicación (frecuencia de 35 kHz) durante 30 min en un equipo *Elmasonic E30 H* (Singen, Alemania). Seguidamente se sometió a agitación orbital (2500 rpm) durante 1 min en un *MS2 Minishker, IKA* (Wilmington, NC, EE.UU.), y, finalmente, se centrifugó (3600 rpm) durante 15

min, en una centrifuga *Clay Adams Compact II* (Sparks, MD, EE.UU.). Del líquido sobrenadante se tomaron alícuotas para los respectivos análisis. En los precipitados de dos extractos de las especies bajo estudio se determinó el contenido de ácidos grasos (FA).

4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA

La determinación de la capacidad anti-radicalaria de compuestos fenólicos de alta pureza, AE y extractos obtenidos por SFE se efectuó en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, CA, EE.UU.), con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos y equipado con módulos de absorbancia (UV-Vis) y fluorescencia (Véase **Figura 23**). Las mediciones se realizaron siguiendo dos metodologías, *i.e.*, medición de la capacidad de absorción del oxígeno radical (**ORAC**) y la capacidad antioxidante total equivalente al Trolox® (**TEAC**). Todas las mediciones se hicieron por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar.

Las sustancias de referencia, a saber: ácidos caféico, *p*-cumárico, rosmarínico, ursólico, carnósico, ferúlico y gálico, quercetina, BHA, BHT, vitamina E, *p*-cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol, *trans*- β -cariofileno, canfeno, 1,8-cineol, alcanfor, borneol, α -humuleno, limoneno, citral, reactivos NaOH y ABTS, AE de salvia, romero, tomillo y cidrón, y extractos obtenidos por SFE de salvia y tomillo, se pesaron en una balanza METTLER TOLEDO AL204 (Küsnacht, Suiza). El llenado de las microplacas se realizó con una *Transferpette® -8/-12 Electronic* (Brand, Alemania). Antes de las mediciones, las soluciones de los reactivos NaOH, AAPH, ABTS, PDS, entre otros, y las muestras (AE y extractos SFE) se almacenaron en la nevera, a 4°C, en ausencia de luz.

Figura 23. Lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, CA, EE.UU.), con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos y equipado con módulos de absorbancia (UV-Vis) y fluorescencia.



Foto: Archivo personal. Lugar: Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM-UIS (Bucaramanga). Fecha: 23 de marzo de 2011.

Para todos los métodos implementados, se determinaron las figuras analíticas de mérito, tales como linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación y precisión (repetibilidad y reproducibilidad).

- **ORAC.** Para la determinación de las condiciones de análisis como tiempo y concentración de la muestras, se realizaron pruebas experimentales que permitieran establecer el tiempo, con el cual se obtuvo el 5% del valor de fluorescencia inicial, y los rangos de concentraciones, que dieran una respuesta del detector lineal. Con base en los resultados obtenidos, se establecieron las condiciones de análisis. Las mediciones se realizaron en el lector de microplacas empleando el módulo de fluorescencia con filtros que manejan longitudes de onda de 490 nm de excitación y 510-570 nm de emisión [8282]. Para este propósito, se usó fluorescina (FL) como indicador molecular y blanco de ataque de los radicales peroxilo generados por AAPH [83]. La capacidad anti-radicalaria de las muestras fue medida con base en la disminución de la fluorescencia.

Una vez finalizada cada medición, los datos de fluorescencia, en función del tiempo, se normalizaron con respecto al blanco de reacción, multiplicando por el siguiente factor [8484]:

$$\text{Fluorescencia inicial}_{\text{Blanco}} / \text{Fluorescencia inicial}_{\text{Muestra}}$$

Al normalizar los datos, se calculó el valor de AUC, aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{AUC} = 1 + \sum F_i / F_0$$

Donde:

F_i : Fluorescencia en el tiempo i

F_0 : Fluorescencia inicial (0 min)

El valor neto de AUC se obtuvo restando el AUC del blanco de reacción al AUC de cada una de las muestras analizadas, así:

$$\text{AUC neta} = \text{AUC}_{\text{Muestra}} - \text{AUC}_{\text{Blanco}}$$

Trolox[®] se usó como estándar de control en las mediciones. Los valores netos de AUC calculados se extrapolaron en la curva de calibración realizada con este estándar, para expresar los resultados en $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra.

- **TEAC o ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺**. La determinación de la capacidad antioxidante (AH) de los AE y extractos SFE, de las sustancias control (BHA, BHT, Vitamina E) y patrones de fenoles se realizó con base en el procedimiento reportado por Re y colaboradores [31] en 1999, se empleó espectroscopía VIS a 750 nm, en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., ModulusTM II Microplate Multimode Reader*, con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos. Se preparó una solución de catión-radical ABTS⁺, mezclando una solución de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM); la mezcla se

homogeneizó en ultrasonido por 30 min y se dejó reaccionar 24 h a 4°C, en ausencia de luz. A partir de esta solución, diariamente, se preparaban soluciones de trabajo de absorbancia 0.710 ± 0.003 .

Las muestras de AE y extractos, obtenidos por SFE, se diluían con etanol hasta que su adición a un volumen de la solución de ABTS^{•+} (Absorbancia: 0.71 ± 0.03), resultara en una inhibición entre el 10 y 80% del blanco de la absorbancia. Para las sustancias control y los patrones de fenoles evaluados se prepararon soluciones *stock* de 1 mM, las cuales también se diluyeron hasta que se produjeran inhibiciones entre el 10 y 80%.

La respuesta-concentración de las sustancias, AE y extractos obtenidos por SFE, como porcentaje de la absorbancia del catión-radical ABTS^{•+} sin inhibir (blanco de reacción), se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de } A_{\lambda: 750} (\%) = (1 - A_f / A_0) \times 100$$

Donde:

A_f: Es la absorbancia medida 30 min después de la adición del posible antioxidante.

A₀: Es la absorbancia del blanco de reacción (catión-radical sin inhibir).

La capacidad antioxidante se determinó mediante la disminución en la coloración azul-verdosa del catión-radical ABTS^{•+}, que, al reaccionar con el posible antioxidante (AH), produce el ABTS neutro, que es incoloro, así:



Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se establecieron los valores de capacidad antioxidante equivalente al Trolox[®] (TEAC – $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mmol antioxidante evaluado}$), para las sustancias de referencia,

y capacidad antioxidante total (TAC – μmol de Trolox[®] / g de muestra), para los AE y extractos SFE.

4.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

La determinación del contenido total de fenoles se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Magalhaes y colaboradores [¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.], aplicando algunas modificaciones. En la microplaca se adicionó la muestra a evaluar, el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR) y hidróxido de sodio (NaOH) como base y se procedió a medir la absorbancia de la mezcla a 750 nm en el lector de microplacas.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para la cuantificación de los fenoles totales se empleó ácido gálico como estándar y se construyeron curvas de calibración tanto del posible antioxidante como del estándar. Los resultados se expresaron como “Sensibilidad” (%) (Relación entre las pendientes de las gráficas de absorbancia *versus* concentración del antioxidante evaluado y el ácido gálico), para las sustancias de referencia, y como mg de ácido gálico / kg de sustancia evaluada para los AE y extractos SFE. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

4.7.1 Análisis por GC-MS. La separación e identificación de los metabolitos secundarios de los AE y extractos SFE se realizó en un equipo GC *Agilent Technologies 6890 Series* (Véase **Figura 24**) (*Agilent*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*. La separación de los compuestos se llevó a cabo en dos columnas capilares, una con la fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-

poli(metilsiloxano) (DB-5MS, J & W *Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f , y la otra, con f.e. polar de poli(etilenglicol) (DB-WAX, J & W *Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.), de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f . Se empleó helio (99.995%, gas AP, Linde, Colombia) como gas de arrastre en el análisis cromatográfico, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y una velocidad volumétrica de flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector fue de 250°C, modo de inyección *split* (30:1) y un volumen de inyección de 2 μL . La temperatura del horno durante la corrida cromatográfica se programó de 45 a 150°C, a una velocidad de 4°C/min, luego, de calentó hasta 250°C a 5°C/min, donde se mantuvo 5 min; finalmente, la temperatura se subió hasta 275°C, a una velocidad de 10°C/min. La velocidad lineal media del gas fue de 26 cm/s. La temperatura de la fuente de ionización (*MS source*) se mantuvo a 230°C, mientras que la del cuadrupolo (*MS cuadrupole*), a 150°C. Los iones-fragmento en los espectros de masas se obtuvieron por impacto con electrones de energía (EI) de 70 eV, en un rango de masas entre 45 y 450 uma, con una velocidad de barrido de radiofrecuencia de 3.58 *scan/s*.

La identificación de los componentes presentes en los AE se realizó en un GC *Agilent Technologies 6890N Network GC System* (Véase **Figura 25**) (*Agilent*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975*. La separación de los componentes de los AE y extractos se llevó cabo en una columna de sílice fundida DB-WAX (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.), con fase estacionaria entrecruzada e inmobilizada de poli(etilenglicol) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f , usando las mismas condiciones operacionales mencionadas anteriormente.

Figura 24. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Series GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863 Series*.



Foto: Archivo personal. Lugar: Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (UIS-Bucaramanga). Fecha: 23 de marzo de 2011.

Para la identificación de los compuestos, se emplearon los índices de retención lineales, que se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de patrones de *n*-parafinas C₁₀-C₂₅, analizados bajo las mismas condiciones operacionales que las muestras, según la ecuación que aparece a continuación [8585]:

$$I_k = 100 \times n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right]$$

Donde:

I_k: Índice de retención lineal del compuesto de interés;

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

t_{Rx}: Tiempo de retención del compuesto de interés;

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

Figura 25. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Series GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863B Series*.



Foto: Archivo personal. Lugar: Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (UIS-Bucaramanga). Fecha: 23 de marzo de 2011.

También se compararon los espectros de masas experimentales con los de las bases de datos disponibles (Adams, NIST y Wiley), empleando los *software MSChemSatation* de *Agilent Technologies G1701DA*.

4.7.2 Análisis por GC-FID. La cuantificación de los compuestos presentes en los AE se llevó a cabo por el método de calibración externa. Se realizaron curvas de calibración con material de referencia certificado de los componentes mayoritarios de los AE en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N* (*Agilent*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector de ionización en llama (FID) (Véase **Figura 26**). La separación de los compuestos se efectuó en una columna capilar con f.e. apolar 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f. Se empleó helio (99.995%, gas AP, Linde, Colombia) como gas de arrastre en el análisis cromatográfico, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y una velocidad volumétrica de flujo de 1 mL/min.

La temperatura del inyector fue de 250°C, modo de inyección *split* (30:1) y un volumen de inyección de 1 μL . La temperatura del horno del cromatográfico

durante la corrida se cambió de 45 a 275°C, siguiendo la misma programación usada para el análisis por GC-MS. La temperatura del detector fue de 280°C. Los flujos de gases fueron mantenidos así: aire, 300 ml/min (99.005%, zero AP, Linde, Colombia), de hidrógeno, 30 ml/min (99.995%, gas AP, Linde, Colombia) y de nitrógeno, 30 ml/min (99.995%, gas AP, Linde, Colombia).

Figura 26. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Plus Series GC System*, acoplado a un detector de ionización en llama (FID), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7683B Series*.



Foto: Archivo personal. Lugar: Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (UIS-Bucaramanga). Fecha: 23 de marzo de 2011.

4.7.3 Análisis por HPLC-DAD. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo *Agilent Technologies 1200*, equipado con una bomba cuaternaria *Agilent Technologies G1354A*, un inyector manual *Agilent Technologies Series 1200 G1328B* y un detector UV-Vis de arreglo de diodos *G1315B*, y una columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm) (Véase, **Figura 27**). El procesamiento de los datos se realizó a través del *software Agilent Technologies Chemstation B.01.03 SR1*.

La identificación de algunos antioxidantes en los extractos obtenidos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención (t_R) y los espectros UV-Vis, con los de sustancias de referencia certificadas, e.g., ácidos carnósico y ursólico. La cuantificación se realizó por el método del estándar externo, por medio de

curvas de calibración (Áreas Vs. Concentración). Con base en la curva, se calcularon las concentraciones de los metabolitos secundarios en el extracto, obtenido por SFE, de las especies bajo estudio.

Figura 27. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent 1200 Series*.



Foto: Archivo personal. Lugar: Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (UIS-Bucaramanga). Fecha: 23 de marzo de 2011.

4.7.4 Análisis de ácidos grasos (FAME). El análisis de los ácidos grasos (FA) de los precipitados obtenidos después de la preparación de los extractos SFE (Véase **Numeral 5.3.2.**), se llevó a cabo mediante la obtención de sus ésteres metílicos, según la Norma ISO 5509 (*Animal and Vegetable Fats and Oils – Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids*), de la siguiente manera:

- Aproximadamente 100 mg del precipitado, obtenido después de la centrifugación, se colocaron en un tubo de ensayo con tapa rosca (16 × 150 mm); seguidamente, se adicionaron 5 mL del complejo de trifluoro de boro al 14% en metanol. La mezcla, con agitación, se sumergió en un baño de aceite a 85-90 °C durante 45 min, tiempo, que fue establecido previamente en el Laboratorio de Cromatografía. Posteriormente, la muestra se retiró del baño de aceite y se dejó reposar durante 5 min. Finalmente, se realizó la

extracción de los FA con 3×1 mL de *n*-hexano. Del extracto orgánico se tomaron 0.5 mL, se adicionaron 0.5 μ L de *n*-tetradecano, la mezcla se aforó a 1 mL con el mismo solvente y 2 μ L de la solución se inyectaron al cromatógrafo de gases, para su respectivo análisis.

- La identificación de los FA en las muestras se realizó por comparación de los t_R de sus ésteres metílicos, con los de una mezcla certificada de FAME GLC10, GLC50, GLC70, GLC80 y GLC100, adquirida de Matreya, Inc. (Pennsylvania, EE.UU.). Los patrones se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras. La identificación de los FA se confirmó con base en sus espectros de masas.
- La cuantificación relativa (%) promedio de los FA, en forma de su FAME, se realizó empleando el método de normalización interna, según la norma ISO 5508 (*“Animal and Vegetable Fats and Oil – Analysis by GC of Methyl Esters of Fatty Acids”*), mediante la determinación del porcentaje que representa el área de su pico cromatográfico en relación con la suma de todos los picos.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU PARA EL ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE FENOLES

El reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC) contiene complejos de ácidosfosfomolibdico/fosfotúngstico que reaccionan en medio básico, formando complejos azules que pueden ser detectados espectrofotométricamente a longitudes de onda entre 750 y 765 nm [87]. Generalmente, se emplea ácido gálico como compuesto estándar y los resultados se expresan en mg/L del ácido. Sin embargo, el reactivo de Folin-Ciocalteu no es específico para compuestos fenólicos, por lo que también puede reducir otra clase de compuestos, por ejemplo, aminas aromáticas, ácido ascórbico, Cu(I), Fe(II), entre otros [87].

Se han encontrado excelentes correlaciones entre los resultados obtenidos con el método Folin-Ciocalteu (FC) y algunos ensayos antioxidantes de transferencia de electrones, *e.g.*, TEAC y DPPH [88]. Magalhaes y colaboradores [89] realizaron un estudio comparativo entre los resultados obtenidos con el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} y el método de Folin-Ciocalteu de 72 bebidas como vino tinto, jugos, infusiones de plantas aromáticas y cervezas, y encontraron coeficientes de correlación mayores de 0.918. Algunos autores han determinado que aquellos compuestos antioxidantes, que no reaccionen mediante un mecanismo de transferencia de electrones, *e.g.*, β -caroteno, ácidos cinámico y cítrico, tampoco reaccionan con RFC [90].

Prior y colaboradores [19] encontraron un factor de correlación de 0.82 entre los resultados de contenido de fenoles, medidos por el método FC, y la capacidad antioxidante evaluada por el método ORAC, de bebidas y algunas

especies vegetales, a pesar de las diferencias en el mecanismo de reacción. El ensayo de FC es relativamente simple, reproducible, puede ser estandarizado y la absorción del producto de reacción ocurre a altas longitudes de onda (750-765 nm), lo cual minimiza las interferencias de la matriz [87]. Sin embargo, el tiempo de análisis largo (2 h) es una desventaja, porque dificulta la implementación del método como análisis de rutina en el laboratorio. Además, pueden ocurrir reacciones secundarias de polimerización, con regeneración de los fenoles, ya oxidados, lo que causa error en la medición.

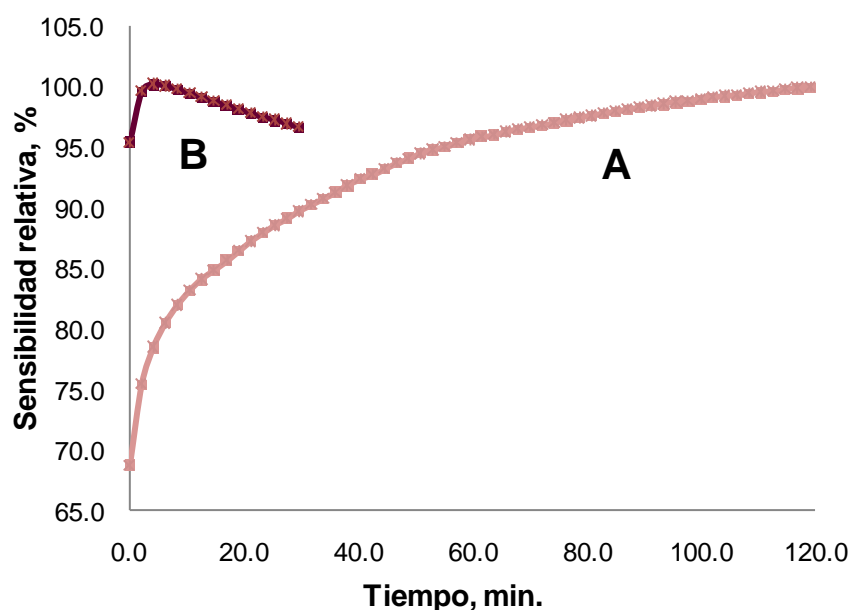
La oxidación de los compuestos fenólicos, cuando se emplea RFC, aumenta con la alcalinidad del medio y cuando los grupos hidroxilo de la molécula no se encuentran protonados [85]. Durante la reacción de oxidación, el ion fenolato puede ser regenerado por polimerización de los fenoles, ya oxidados, por lo que la reacción puede repetirse y el fenol regenerado suele ser oxidado más fácilmente que el inicial. Por esta razón, la reacción debe ocurrir a pH básico y debe alcanzar el punto final de medida lo más rápido posible [85].

En el método “clásico” se utiliza como base carbonato de sodio (pH≈11) y el tiempo final de reacción llega a 2 horas. Durante este tiempo, se puede promover la regeneración del ion fenolato, que causa una mayor coloración (azul) del medio. Además, cuando se usa carbonato de sodio (Na_2CO_3), se producen burbujas de CO_2 , que generan interferencias y errores en las mediciones. Con el fin de lograr una rápida reducción de RFC, varios autores [¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.] desarrollaron un método rápido, modificando la concentración de RFC y el tipo de base (NaOH (pH≈14)).

En el presente trabajo, se realizaron algunas pruebas preliminares modificando el tipo de base, con el fin de comprobar, que con el uso de NaOH, es posible disminuir el tiempo de reacción sin que la respuesta varíe significativamente. Los valores de absorbancia obtenidos para el ácido gálico, a una concentración de 55 mg/L, fueron monitoreados a 750 nm durante 120 y 30 min, con el método “clásico” y el rápido, respectivamente. En la **Figura 28**, se observa que

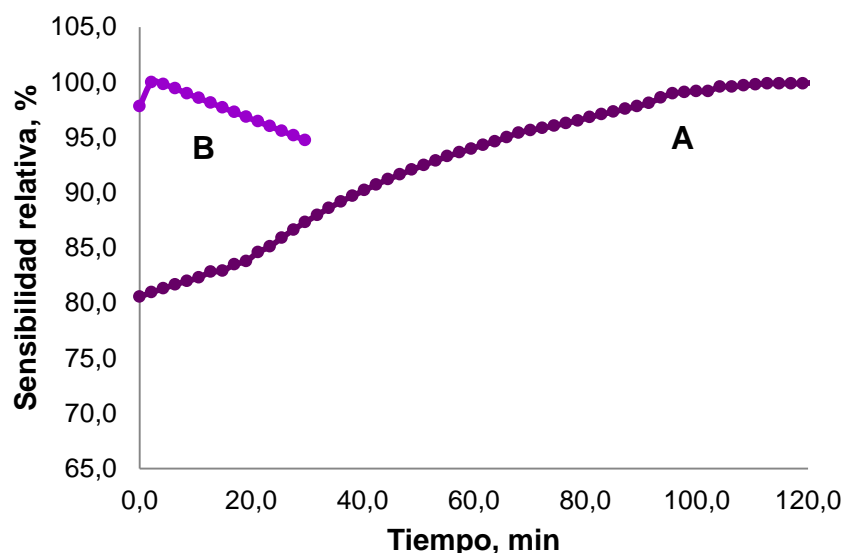
con carbonato de sodio (**A**), la sensibilidad (%) incrementa a lo largo del tiempo de reacción hasta alcanzar un valor máximo entre los 100 y 120 min. Con hidróxido de sodio (**B**), la mayor sensibilidad se obtuvo a los 4 min, mientras que a los 30 min fue del 97%.

Figura 28. Sensibilidad relativa (%) de la curva del ácido gálico (n=24) en medios de reacción con diferentes bases: **A.** Carbonato de sodio (Na_2CO_3) (3% (W/V)); **B.** Hidróxido de sodio (NaOH) (0.175 M). La sensibilidad relativa (%) se estimó por la relación entre el valor de absorbancia en función del tiempo y el valor obtenido a los 120 min (Experimento **A**) y 4 min (Experimento **B**).



Adicionalmente, el contenido de fenoles de una solución del ácido ferúlico (58 mg/L), se midió por ambos procedimientos. En los dos medios de reacción se encontraron perfiles similares a los del ácido gálico en los dos medios de reacción. En la **Figura 29**, se presentan los resultados alcanzados con el uso de soluciones básicas de carbonato de sodio (**A**) e hidróxido de sodio (**B**). Se comprobó, que con carbonato de sodio (**A**), la sensibilidad (%) aumentó hasta alcanzar un equilibrio, entre los 100 y 120 min, y con hidróxido de sodio (**B**), a los 4 min de reacción, se logró la máxima de sensibilidad (%), que decae con el tiempo.

Figura 29. Sensibilidad relativa (%) de la curva del ácido féulico (n=24) en medios de reacción con diferentes bases: **A.** Carbonato de sodio (Na₂CO₃) (3% (W/V)); **B.** Hidróxido de sodio (NaOH) (0.175 M). La sensibilidad relativa (%) se estimó por la relación entre el valor de absorbancia en función del tiempo y el valor obtenido a los 120 min (Experimento **A**) y 4 min (Experimento **B**).



Para fines comparativos se analizó el contenido de fenoles de los compuestos Trolox[®] y ácido ferúlico, su valor se presenta en la **Tabla 7**. Los resultados se expresan como la relación (%) ± la desviación estándar, entre las pendientes de las curvas de calibración de cada compuesto y la del ácido gálico (para todas las curvas de calibración el valor R² fue mayor de 0.993, n=32). Se puede observar, que no existen diferencias, estadísticamente significativas, entre los valores obtenidos por los métodos “clásico” y el rápido, para los dos compuestos evaluados. Además, los resultados concuerdan con lo reportado por Magalhaes y colaboradores [90]. Sin embargo, para el Trolox[®] los valores obtenidos por los métodos “clásico” y el rápido difieren de los encontrados por Stratil y sus colaboradores [91]. Las diferencias en el contenido de fenoles de las sustancias reportadas en la **Tabla 7** no resultaron estadísticamente significativas, por lo cual, se decidió validar el método rápido.

Tabla 7. Comparación del contenido total de fenoles del Trolox[®] y el ácido ferúlico, medidos por los métodos “clásico” y el rápido, con los reportados en la literatura (Relación (%) ± S) [90, 91].

Compuesto fenólico	Clásico	Rápido	[90]	[91]
Trolox [®]	38.9 ± 0.3	39 ± 1	40 ± 1	33
Ácido ferúlico	82 ± 1	83 ± 1	82 ± 3	82

Para la validación del método, se determinaron las siguientes figuras analíticas de mérito, a saber: linealidad y sensibilidad, límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) y la precisión expresada como repetibilidad y reproducibilidad, ello, según lo recomendado por la AOAC *Internacional* [92].

5.2 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO DEL MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU

El método se validó empleando los ácidos gálico, caféico y ferúlico como compuestos de referencia.

5.2.1 Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método. Para evaluar la linealidad y sensibilidad, se realizaron curvas de calibración para el ácido gálico. La linealidad se determinó evaluando el rango de concentraciones en que la respuesta del detector fue lineal. La sensibilidad se halló como la constante de proporcionalidad entre la señal y la concentración. En el rango de concentraciones evaluado (5-70 mg/L), se observó linealidad alta (coeficiente de determinación $R^2=0.994-0.999$) (Véase **Tabla 8**). Las pendientes de la curva de calibración ($a=0.013-0.014$) muestran una sensibilidad del método alta y, sus desviaciones estándar ($<S_a>=0.004$), la precisión alta de las curvas de calibración. Por consiguiente, se puede inferir que el método fue perfectamente aplicable dentro del rango de concentraciones evaluadas.

La sensibilidad se reportó como el coeficiente angular o la pendiente de la curva de calibración a un límite de confianza del 95%, de acuerdo con la

expresión $a \pm tS_a$ (t de *Student* para un nivel del 95%), por lo que la sensibilidad promedio para este método fue $0.014 \pm 8.8 \times 10^{-3}$.

Tabla 8. Linealidad y sensibilidad del método, medida para el ácido gálico (AG).

CORRIDA	R ²	PENDIENTE (a)	INTERCEPTO (b)	S _a
1	0.999	0.014	0.055	0.005
2	0.999	0.013	0.083	0.004
3	0.998	0.013	0.081	0.004
4	0.997	0.014	0.066	0.004
5	0.994	0.013	0.109	0.004
6	0.999	0.014	0.076	0.004
Promedio	0.998	0.014	0.078	0.004
Ecuación: Y (mg/L) = aX(Abs) + b				

5.2.2 Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de la curva de calibración (5-70 mg/L del ácido gálico, n=72), como la concentración de analito que proporcionó una relación de $3S_{Y/X}$, para el LOD, y de $10S_{Y/X}$, para el LOQ. Los valores de LOD y LOQ fueron 1.94 ± 0.02 mg/L y 4.83 ± 0.07 mg/L, respectivamente.

5.2.3 Evaluación de la precisión. La precisión, según la norma ISO 3534, es el grado de concordancia de los ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas. Estas condiciones dependen de los factores que se varíen en cada uno de los ensayos. Entre los factores que se pueden variar se encuentran el laboratorio (temperatura, humedad, luminosidad, corriente eléctrica), el analísta, el equipo, los reactivos y el día en que se hace el ensayo. Dependiendo de los factores, que se modifiquen, se pueden obtener dos tipos de precisión: la repetibilidad y la reproducibilidad [92]. La repetibilidad proporciona la menor variabilidad que puede haber en los resultados, ya que estos se obtienen en intervalos cortos de tiempo sin variar ningún factor (el mismo analísta, el mismo equipo, el mismo día, el mismo lote de reactivos, etc.). Por otro lado, la reproducibilidad proporciona la mayor variabilidad de los

resultados, ya que se obtiene cuando se varía uno o todos los posibles factores, que puedan afectar el resultado final [92].

La repetibilidad se calculó mediante la medición de una solución del ácido gálico (45 mg/L), por triplicado, durante 5 días. En la **Tabla 9**, se observa que entre las mediciones diarias (n=24), los valores de absorbancia no presentaron una desviación considerable, por lo que se puede concluir, que el método implementado fue preciso. Los coeficientes de variación (CV,%) de las mediciones realizadas durante el mismo día estuvieron entre 0.86 y 1.13%, lo que indica que el método sí fue repetible. El valor de absorbancia promedio entre días fue de 0.724 ± 0.002 , con un coeficiente de variación de 0.330%.

Tabla 9. Repetibilidad del valor de absorbancia de soluciones del ácido gálico (45 mg/L), analizadas por espectrofotometría UV-VIS.

Parámetro	Absorbancia (n=24)					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Entre días
<X>	0.766	0.73	0.70	0.72	0.71	0.724
S	0.002	0.01	0.01	0.01	0.01	0.002
CV, %	0.235	0.94	0.77	1.13	0.86	0.330

Para determinar la reproducibilidad del método implementado, se midió el contenido de fenoles del ácido ferúlico, por triplicado, modificando las siguientes variables: el analista y el día de análisis. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 10**, donde se observan coeficientes de variación de 0.4-1%, aceptables por las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) y, por consiguiente, el método sí fue reproducible. Los resultados obtenidos confirman que, independientemente del analista y el día, las mediciones realizadas presentaron coeficientes de variación muy bajos (0.4-1%).

Tabla 10. Reproducibilidad del valor de contenido total de fenoles para el ácido ferúlico (AF), expresada como la relación (%) entre las pendientes de las curvas de calibración.

Analista	AF1	AF2	AF3	<X> n=3	S	CV, %
A - día 1	81	82	83	82	1	1
B - día 2	82.8	82.6	83.3	82.9	0.4	0.4

5.3 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATIÓN-RADICAL ABTS^{•+} PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA

El ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} fue desarrollado en 1993 por Miller y colaboradores [42] y, posteriormente, se modificó por Re y colaboradores [31]. Este ensayo colorimétrico de *screening* se basa en la inhibición de la absorbancia exhibida por el catión-radical ABTS^{•+} en presencia de compuestos antioxidantes; mide la habilidad de un compuesto para reducir el ABTS^{•+} en medio acuoso y la compara con la de la sustancia de referencia, Trolox[®].

La metodología implementada se basó en el ensayo convencional de decoloración de los radicales ABTS^{•+} preformados por oxidación de ABTS con persulfato de potasio (PDS) [31], y se desarrolló en un lector de microplacas de 96 pozos (*Turner Biosystems Inc., ModulusTM II Microplate Multimode Reader*, California, EE.UU.). La solución *stock* del radical se preparó mezclando ABTS (7 mM) con PDS (2.45 mM), que se dejó reaccionar durante 24 h a 4°C, en ausencia de luz; a partir de esta solución, se preparó otra, de trabajo, que se ajustó a una absorbancia de 0.710 ± 0.003 . En este ensayo, el antioxidante se adicionó a una solución pre-formada del catión-radical ABTS^{•+}. El catión-radical residual se cuantificó espectrofotométricamente en un período de tiempo dado, siendo la disminución en la concentración, producida por la oxidación del antioxidante a una concentración dada, una función del tiempo. La decoloración del catión-radical ABTS^{•+} se calculó con respecto a la reactividad del Trolox[®], lo

que permitió obtener el valor TEAC (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox[®]) [31].

Originalmente, se han usado metmioglobina y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para generar ferrimioglobina, que reaccionaba con el ABTS formándose el catión-radical ABTS^{•+} [42]. De esta manera, la muestra se añadía antes de la formación del radical, lo cual fue bastante criticado porque conducía a la sobreestimación de la capacidad antioxidante [19]. Actualmente, la muestra se adiciona la catión-radical pre-formado con el fin de minimizar interferencias. Varios investigadores han realizado otras modificaciones en función de la generación del catión-radical, las longitudes de onda usadas para monitorear la reacción y los métodos de cuantificación, lo que ha dado lugar a varias metodologías.

Cano y colaboradores [93] mostraron que la reacción entre el ABTS^{•+} y el antioxidante puede ser estudiada en un amplio rango de pH, pero el mecanismo de reacción puede cambiar. Por ejemplo, la transferencia de un electrón se facilita a pH más bajos, según lo reportado por Lemanska, y sus colaboradores [94]. Gráficamente, la disminución en la absorbancia con respecto a la concentración del antioxidante, genera una correlación lineal que permite suponer que esta disminución refleja únicamente la reacción entre el catión-radical ABTS^{•+} y el antioxidante. Estas variaciones han sido adaptadas para medir selectivamente antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos empleando diferentes medios de reacción, entre ellos solución *buffer* y solventes orgánicos [19].

Los valores de TEAC reportados en la literatura son variables debido a que dependen, en gran medida, de las condiciones de análisis [95]. La razón más importante para esta variación se debe a que la reacción de un antioxidante con el ABTS^{•+} es incompleta, lo cual conduce a la subestimación del valor de TEAC para estos compuestos, ya que se observan diferencias en los valores reportados. Por ejemplo, los valores TEAC de antioxidantes como BHT, BHA y

los ácidos caféico, ferúlico, ascórbico y gálico, varían en intervalos, así se modifique o no el medio de reacción (Véase **Tabla 11**).

Como se puede observar en la **Tabla 11**, las variaciones en los datos no pueden atribuirse al método, puesto que, realizando el mismo procedimiento para algunos compuestos antioxidantes, el valor de TEAC varía. Esto demuestra, que es necesario ajustar el método para tener en cuenta todos los productos de la reacción, por ejemplo, acoplado el sistema con cromatografía líquida de alta eficiencia [96]. Por estas variaciones, el ensayo ABTS⁺ se considera un método de *screening* (tamizaje), para estimar la reactividad hacia los radicales de compuestos con propiedades antioxidantes en forma pura o en mezcla.

Tabla 11. Valores de TEAC expresados como equivalentes Trolox[®] de antioxidantes, obtenidos en diferentes medios de reacción [31, 97-106].

ANTIOXIDANTE	MEDIO	VALOR TEAC
BHT	<i>Buffer acetato</i>	0.1 - 0.4
	Etanol	2.93 - 3.35
BHA	<i>Buffer acetato</i>	1.0 - 1.5
Ácido ascórbico	<i>Buffer fosfato</i>	5.73
	<i>Buffer acetato</i>	1.0 - 1.6
Ácido caféico	<i>Buffer fosfato</i>	1.76
	<i>Buffer acetato</i>	1.5 - 2.3
	<i>Buffer glicina</i>	1.01
Ácido gálico	<i>Buffer fosfato</i>	2.6 - 4.2
	<i>Buffer acetato</i>	3.4 - 4.2
	<i>Buffer glicina</i>	1.98
Ácido ferúlico	<i>Buffer fosfato</i>	1.0 - 1.56
	<i>Buffer acetato</i>	1.0 - 1.5
	<i>Buffer glicina</i>	0.23
	Etanol	3.51

En el presente trabajo, se implementó el ensayo ABTS⁺ siguiendo la metodología reportada por Rice-Evans y colaboradores [107], pero se realizaron algunas modificaciones. La solución de trabajo de ABTS⁺ (A₇₅₀ 0.71) a pH 4.5 fue estable durante 2 h, presentó una disminución en el valor de

absorbancia de solo 0.05%. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Cano y colaboradores [93], quienes demostraron que el ABTS^{•+} es estable en un rango de pH 3.0 a 6.5.

Usando condiciones establecidas para generaran un catión-radical estable y alcanzar el equilibrio de reacción, tanto con las mezclas de antioxidantes como con las sustancias puras, el método se validó de acuerdo con lo descrito en el **Numeral 5.2**.

5.4 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO DEL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATIÓN-RADICAL ABTS^{•+}

El ensayo se validó utilizando patrones certificados de Trolox[®] y el ácido gálico.

5.4.1 Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método. En la **Tabla 12**, se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método ABTS^{•+}. La linealidad se evaluó en el rango de concentraciones de 50-560 μM Trolox[®]; se observó una respuesta lineal con coeficientes de determinación (R^2) que variaron entre 0.997 y 0.998. Las pendientes de las curvas de calibración ($\langle a \rangle = 0.13$) muestran la sensibilidad del método alta y sus desviaciones estándares ($\langle S_a \rangle = 0.04$), la precisión alta. La sensibilidad se reporta como el coeficiente angular de la curva de calibración promedio, a un nivel de confianza del 95%, mediante la expresión 0.13 ± 0.09 , que permite concluir que el método resultó muy sensible a los cambios de concentración pequeños.

Tabla 12. Linealidad y sensibilidad del método empleando Trolox® como sustancia de referencia.

CORRIDA	R ²	PENDIENTE	INTERCEPTO	S _a
		(a)	(b)	
1	0.997	0.13	4.52	0.04
2	0.997	0.13	4.35	0.04
3	0.998	0.13	4.35	0.04
4	0.998	0.13	4.53	0.04
5	0.997	0.13	4.42	0.04
6	0.997	0.13	4.38	0.04
Promedio	0.997	0.13	4.42	0.04
Ecuación: Y (%) = aX(μM Trolox®) + b				

5.4.2 Evaluación de la precisión. La precisión del método, expresada en términos de la repetibilidad, se determinó mediante la medición de una solución de Trolox® (300 μM), por triplicado, durante 5 días. En la **Tabla 13**, se observa que, entre las mediciones diarias (n=24), los valores no presentaron desviaciones considerables, lo que reflejaron los coeficientes de variación (CV,%) que variaron entre el 3 y 5%. Se demuestra con ello que el método implementado fue repetible.

El porcentaje de inhibición promedio para la solución de Trolox®, analizada entre días, fue de 42.1 ± 0.5%, con un coeficiente de variación de 1.1%.

Tabla 13. Repetibilidad del valor de porcentaje de inhibición de soluciones de Trolox® (300 μM), analizadas por espectrofotometría UV-VIS.

Parámetro	Porcentaje de inhibición (n=24)					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Entre días
<X>	42	42	42	42	43	42.1
S	1	1	2	1	1	0.5
CV, %	3	3	5	3	3	1.1

Para determinar la reproducibilidad del método, se efectuaron tres mediciones de capacidad anti-radicalaria del ácido gálico, con diferentes analistas y en diferentes días, mientras que se mantuvieron constantes los demás factores, tales como reactivos, equipo, material de vidrio, microplacas, etc. En la **Tabla**

14, se presentan los coeficientes de variación de 0.36 y 1.72%, lo que demuestra que el método implementado sí fue altamente reproducible.

Tabla 14. Reproducibilidad del valor de capacidad anti-radicalaria obtenida por el método ABTS del ácido gálico (AG) y expresada como $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\mu\text{mol AG}$.

Analista	AG1	AG2	AG3	$\frac{\langle X \rangle}{n=3}$	S	CV, %
A - día 1	3.22	3.12	3.22	3.19	0.05	1.72
B - día 2	3.26	3.24	3.26	3.25	0.01	0.36

5.5 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ORAC PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA

Actualmente, en las industrias alimenticia y farmacéutica existe la necesidad de conocer los valores de capacidad antioxidante de fluidos fisiológicos, alimentos, bebidas y productos naturales. Esta necesidad se deriva de la evidencia recolectada a lo largo de los años sobre la capacidad de los antioxidantes de reaccionar con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), que están involucradas en el origen de varias enfermedades. Para conocer las propiedades antioxidantes de los componentes individuales o mezclas, se han desarrollado diversas metodologías *in vitro*, entre ellos, el método ORAC. La primera versión de este método fue desarrollada por Cao y colaboradores [39], en un espectrofotómetro de fluorescencia, con cubetas de 10 mm y un volumen final de solución de 2 mL. Sin embargo, las condiciones usadas en este método requerían tiempos de medición largos, con procedimientos muy tediosos, sobre todo, cuando se requería el análisis de un gran número de muestras. Por esta razón, Cao y colaboradores [108] realizaron la semiautomatización del método en un analizador COBAS FARA II (posteriormente discontinuado por el fabricante). Con la semiautomatización se pudo realizar el análisis de nueve muestras, de igual concentración, en una sola corrida. Sin embargo, este método no permitió el análisis simultáneo en un rango amplio de concentraciones, ya que era necesario realizar varias mediciones de la misma

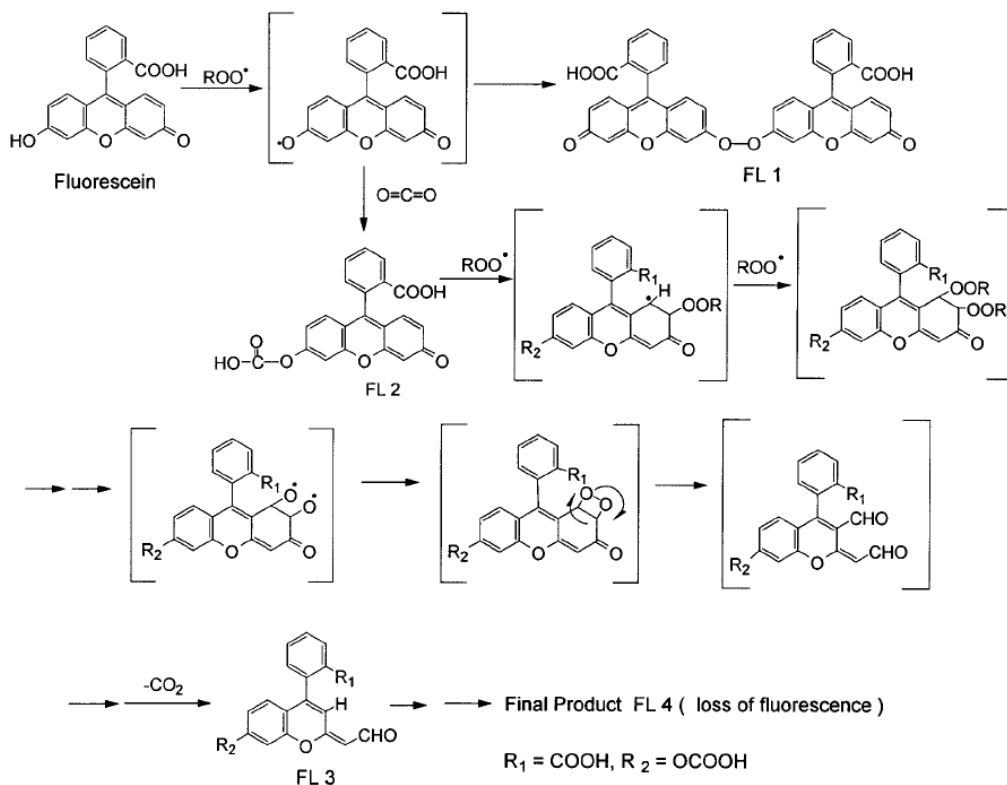
muestra, a diferentes concentraciones, ello aumentaba mucho el tiempo de análisis. Posteriormente, Ou, Huang y colaboradores [41, 109] efectuaron otras modificaciones a la metodología, usando fluoresceína (FL), como molécula fluorescente, y β -metil-ciclodextrina, para el análisis de muestras lipofílicas utilizando el equipo COBAS FARA II. Sin embargo, la falta del equipo comercialmente asequible limitaba el acceso al método por parte de otros investigadores, disminuyendo así la productividad científica, por lo cual fue necesario adaptar la metodología en equipos disponibles en el mercado, por ejemplo, lectores de microplacas acoplados a sistemas de inyección multicanal [34].

La fluoresceína (FL) es un compuesto fotoestable, termoestable, presenta homogeneidad entre lotes de su síntesis, no reacciona con los compuestos antioxidantes presentes en el medio de reacción. Su uso permite disminuir el costo del análisis comparado con el de la β -ficoeritina, que se empleó inicialmente como indicador molecular (Véase **Numeral 2.4.2**). Cabe resaltar, que las ficobiliproteínas como la β -ficoeritina, son moléculas con significado biológico importante, superior al de una sustancia fluorescente sintética como la FL [41]. La intensidad de la fluorescencia de la FL depende sensiblemente del pH, ya que cuando el pH es menor de 7, su intensidad disminuye notoriamente. Debido a la sensibilidad de la FL alta, las muestras deben ser diluidas considerablemente, antes de su análisis.

La naturaleza química del radical, que interviene en el ensayo, es importante, por ello, no se deben hacer comparaciones directas entre procedimientos que involucran diferentes radicales. Entre otros, se pueden usar radicales peroxilo (ROO^\bullet), que son las ROS más importantes a nivel biológico, por su abundancia e implicación en el daño oxidativo. AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), se utiliza como especie generadora de radicales peroxilo, porque AAPH produce los radicales tras sufrir una descomposición térmica [110].

ORAC es un método cinético que mide la reacción entre la especie reactiva (radicales peróxido, AAPH) y el sustrato oxidable (FL). La cuantificación se lleva a cabo mediante la medición del área bajo la curva (*Area Under the Curve* – AUC) de la disminución de la fluorescencia de la FL, que refleja el grado de inhibición del radical con el tiempo de reacción. En la **Figura 30**, se presenta el mecanismo de reacción de la FL con los radicales peróxido propuesto por Ou y colaboradores [41]. Se puede observar cómo, inicialmente, un radical peróxido sustrae un átomo de hidrógeno de la molécula de FL; se genera un radical fenóxido estable (FLO[•]), que fácilmente puede sufrir dimerización con formación de FL1 (*m/z* 661). Adicionalmente, el radical fenóxido FLO[•] puede reaccionar con trazas de CO₂ presentes en la solución *buffer*, generando el compuesto FL2 (*m/z* 375). Pero, además de sustraer un átomo de hidrógeno, los radicales peróxido se pueden unir a los dobles enlaces C-C presentes en la molécula, lo que conduce a un radical estabilizado por la deslocalización de la carga, que puede reaccionar con otro radical peróxido, formando un intermediario endoperóxido, el cual se descompone en el compuesto FL3 (*m/z* 349). Finalmente, se evidencia el producto mayoritario de la oxidación de la FL, FL4 (*m/z* 221.3), que no presenta fluorescencia y aparentemente se deriva de FL3, aunque los autores no lo confirman [41]. Este mecanismo, elucidado por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, permitió confirmar que la reacción entre la FL y los radicales presentes en el medio se realiza a través de una transferencia de un átomo de hidrógeno.

Figura 30. Mecanismo propuesto por OU y colaboradores [41] de la reacción de la fluoresceína (FL) con los radicales AAPH.



Huang y colaboradores [34] automatizaron el método mediante el uso de un lector de microplacas de 96 pozos acoplado a un sistema automático de inyección multicanal, lo cual permitió disminuir el tiempo de análisis y aumentar la eficiencia del método.

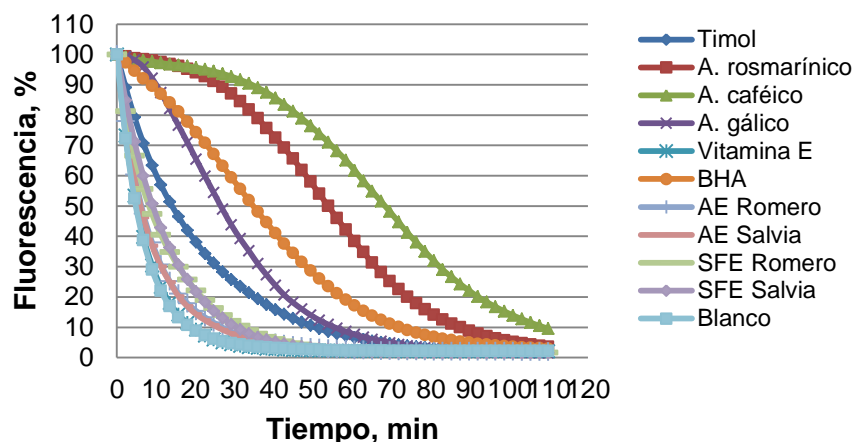
Dávalos y sus colaboradores [84], adaptaron el ensayo ORAC-FL a un lector de microplacas de fluorescencia convencional, con un sistema de inyección manual, para la determinación de la capacidad antioxidantes de vinos y suplementos alimenticios, que contienen antocianidinas, catequinas, favonoles, vitaminas, carotenoides y flavonoides. Price y sus colaboradores [111] evaluaron la capacidad antioxidante por el método ORAC de 12 algas relacionadas filogenéticamente, en un lector de microplacas de 96 pozos con detector de fluorescencia y un sistema de inyección manual, empleando una pipeta multicanal. Los resultados obtenidos por estos investigadores demostraron que no fue necesario el uso de un sistema de inyección

automático para el desarrollo de esta metodología, ya que con la inyección manual se obtuvieron coeficientes de variación del 4% y de determinación (R^2), entre 0.94 y 0.99, de las curvas realizadas con la sustancia de referencia Trolox[®] [111].

En el presente trabajo, se realizó la implementación del método ORAC en un lector de microplacas de 96 pozos (*Turner Biosystems Inc., ModulusTM II Microplate Multimode Reader*, CA, EE.UU.) con el uso de una micropipeta de 8 canales. La metodología implementada se basó en los resultados obtenidos por Huang y sus colaboradores [34], pero se realizaron algunas modificaciones. Inicialmente, se llevaron a cabo pruebas preliminares con sustancias de referencia, AE y extractos obtenidos por SFE, para determinar el tiempo en el cual el valor de fluorescencia final fuese $\leq 5\%$ del valor inicial. Obteniendo el valor menor del 5%, fue posible asegurar que la reacción entre los antioxidantes, la FL y los radicales AAPH había llegado al final. Se trabajó con los compuestos-patrón certificados de los ácidos rosmarínico, caféico, gálico, la vitamina E y el BHA; al igual, que los AE y extractos de romero y salvia obtenidos por SFE, a una concentración en la microplaca de 4 ppm.

En la **Figura 31**, se presenta el gráfico de fluorescencia (%) *versus* tiempo (min) de los compuestos y mezclas mencionados anteriormente, en la cual se observa que a los 87 min de reacción, se obtuvieron porcentajes de fluorescencia menores del 5%, para todas las sustancias puras y en mezcla, con excepción de los ácidos rosmarínico y caféico. Teniendo en cuenta estos resultados, se concluyó que un tiempo de 87 min (40 lecturas cada 2 min), fue suficiente para determinar el valor de capacidad anti-radicalaria de los compuestos y las mezclas de interés. Sin embargo, para el caso de los ácidos rosmarínico y caféico, que en este tiempo, alcanzaron porcentajes del 10 y 24%, respectivamente, fue necesario emplear otro factor de dilución, con el fin de alcanzar porcentajes de fluorescencia menores del 5%.

Figura 31. Comportamiento cinético de diferentes compuestos-patrón certificados y mezclas en el medio de reacción.

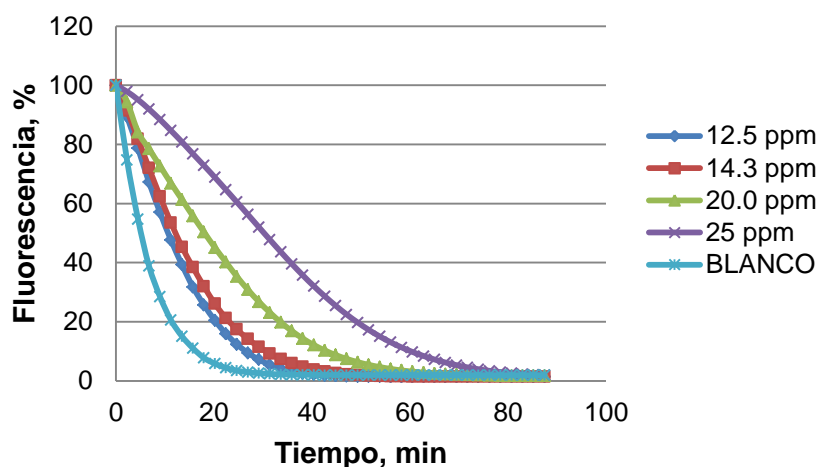


Lo anterior demuestra que es necesario tener en cuenta las pruebas preliminares para establecer el rango de concentraciones para todas las muestras, a las cuales se les desee determinar el valor de su capacidad anti-radicalaria, según la metodología implementada en esta investigación. Por ejemplo, para un extracto de la especie *S. officinalis*, aislado bajo las condiciones de extracción por SFE, que se muestran en la **Tabla 15**, medido a diferentes concentraciones se evidenciaron diferencias en las AUC, al variar la cantidad de muestra utilizada (Véase **Figura 32**). Además, se observó que a los 87 min de reacción, se alcanzaron valores de fluorescencia menores del 2% del valor inicial.

Tabla 15. Parámetros de obtención del extracto aislado por SFE de salvia.

Parámetros	Valores
Presión	30 MPa
Temperatura	313 K
Flujo	60 g/min
Tiempo dinámico	30 min
Tiempo estático	0 min
Presión de separación	0.1 MPa
Temperatura de separación	301 K

Figura 32. Avance de la reacción de los compuestos presentes en el extracto SFE de *S. officinalis*, para diferentes concentraciones de muestra en la microplaca.



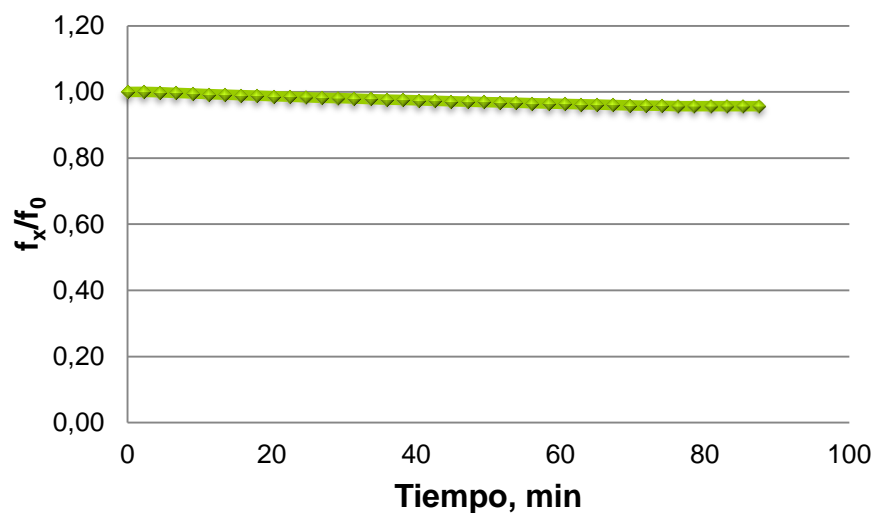
Para determinar la fotoestabilidad de la fluoresceína usada como indicador molecular, se adicionaron 200 μL de una solución $8.16 \cdot 10^{-5}$ mM de FL en la microplaca, en ausencia de AAPH durante un período de 87 min. En la **Figura 33**, se observa que no hubo cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia en el tiempo medido, ya que la fluorescencia, a los 87 min, disminuyó sólo un 4.3% de su valor inicial. Teniendo en cuenta estos resultados, se pudo concluir que la fluoresceína, a una concentración de $8.16 \cdot 10^{-5}$ mM, sí es fotoestable.

Una vez establecido el tiempo de análisis, los rangos de concentración y la fotoestabilidad de la FL, se prosiguió a validar el método determinando las figuras analíticas de mérito.

5.6 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO DEL MÉTODO ORAC

El método se validó empleando como sustancias de referencia Trolox[®] y el ácido ferúlico.

Figura 33. Fotoestabilidad de la fluoresceína, en función del tiempo expresada como la relación de fluorescencia evaluada cada dos minutos sobre la fluorescencia inicial (f_x/f_0).



5.6.1 Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método. En la **Tabla 16** se muestran los resultados obtenidos para evaluar la linealidad y la sensibilidad del método, con base en las curvas de calibración. Se observó una linealidad muy buena y una sensibilidad del método alta, en el rango de concentraciones evaluado (8-160 μM Trolox[®]). La desviación estándar de la pendiente ($\langle Sa \rangle = 0.09$), demuestra la precisión alta de la curva de calibración, así mismo, el cuadrado del coeficiente de correlación obtenido ($\langle R^2 \rangle = 0.999$) es aceptado por la guía de validación de métodos analíticos [112]. Ello permite concluir, que el método es aplicable dentro del intervalo de concentraciones evaluado.

La sensibilidad se reporta como la pendiente de la curva de calibración a un límite de confianza del 95%, de acuerdo con la expresión 0.23 ± 0.02 , la cual se determinó de acuerdo con lo descrito en el **Numeral 6.1.1**.

Tabla 16. Linealidad y sensibilidad del método ORAC empleando Trolox® como sustancia de referencia.

CORRIDA	R ²	PENDIENTE (a)	INTERCEPTO (b)	Sa
1	0.999	0.23	0.60	0.09
2	0.999	0.23	0.63	0.09
3	0.999	0.23	0.64	0.09
4	0.999	0.23	0.50	0.09
5	0.999	0.23	0.62	0.09
6	0.999	0.23	0.52	0.09
Promedio	0.999	0.23	0.58	0.09
Ecuación: Y (AUC) = aX(μM) + b				

5.6.2 Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). Los criterios utilizados para la determinación de los límites de detección y cuantificación se describen en el **Numeral 6.1.1.**; se emplearon las curvas de calibración realizadas para determinar la linealidad y la sensibilidad. Los valores de LOD y LOQ fueron 5.7 ± 0.1 y 7.9 ± 0.5 μM Trolox®, respectivamente.

5.6.3 Evaluación de la precisión. Los resultados obtenidos para la evaluación de la repetibilidad del método en AUC neta, se detallan en la **Tabla 17**. Tal como se observa, se obtuvo una repetibilidad menor del 1% para el AUC neta, lo que demuestra la precisión alta del método según las Buenas Prácticas del Laboratorio [112], que establecen un valor máximo permisible del 10% para estos parámetros.

En la **Tabla 18**, se presentan los valores de AUC neta obtenidos por dos analistas, en días diferentes. Se obtuvieron coeficientes de variación menores del 3%, para cada uno de ellos. De acuerdo con las guías de validación de métodos analíticos estos valores son aceptables, según establecen diferentes criterios, sin embargo, la reproducibilidad no debe superar el 3% [112].

Tabla 17. Repetibilidad del valor de AUC de soluciones de Trolox® (40 µM), analizadas por fluorescencia.

RÉPLICAS	AUC neta					
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	Entre días
<X>	10.80	10.56	10.46	10.69	10.78	10.658
S	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	0.003
CV, %	0.73	0.77	0.8	0.7	0.75	0.028

Tabla 18. Reproducibilidad del valor de capacidad anti-radicalaria por el método ORAC del ácido ferúlico (AF) expresado como µmol Trolox®/µmol AF.

Analista	AF1	AF2	AF3	<X> n=3	S	CV, %
A - día 1	3.5	3.6	3.6	3.6	0.1	2.9
B - día 2	3.5	3.6	3.6	3.6	0.1	2.8

5.7 RENDIMIENTOS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS AE Y EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE ESPECIES VEGETALES DE LAS FAMILIAS LAMIACEAE Y VERBENACEAE

Los AE de las especies vegetales bajo estudio se obtuvieron por hidrodestilación asistida por la radiación de un microondas (MWHD), en un equipo a escala de laboratorio, y por arrastre con vapor (AV), en un equipo industrial con capacidad de 1 m³. Para el aislamiento de los AE de todas las especies estudiadas se usaron plantas enteras secas. La identificación taxonómica de las plantas se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). Los pliegos testigo de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá) y en el Herbario del CENIVAM (UIS, Bucaramanga), así:

- *Thymus vulgaris* L., Fam. Lamiaceae, N° COL 555843. Clasificada por el doctor J. L. Fernández.
- *Rosmarinus officinalis* L., Fam. Lamiaceae, N° COL 555842. Clasificada por el doctor J. L. Fernández.

- *Salvia officinalis* L., Fam. Lamiaceae, N° COL 555844. Clasificada por el doctor J. L. Fernández.
- *Alloysia triphylla* Royle, Fam. Verbenaceae, N° COL 555845. Clasificada por el doctor J. L. Fernández. (Sinónimo: *Lippia citriodora*)

5.7.1 Rendimientos de los AE y extractos obtenidos por SFE. El rendimiento de los AE se halló dividiendo el peso del AE obtenido sobre el peso del material vegetal (seco, planta entera) introducido al balón o al alambique, según la técnica de destilación usada. En las **Tablas 19** y **20**, se presentan los rendimientos (R) de los AE aislados por MWHD y por AV, respectivamente. Los valores calculados para la técnica MWHD fueron el promedio de 3 mediciones. Por el contrario, las destilaciones realizadas por AV, en un destilador industrial, requirieron cantidades de material vegetal de ca. 23-195 kg, por lo cual no fue posible realizar sus réplicas.

En las **Tablas 19** y **20** se observan diferencias en los rendimientos de los AE obtenidos de la misma especie. Las diferencias que se presentaron se deben tanto a la técnica de extracción y variaciones en las condiciones ecofisiológicas como a las diferencias en la composición del suelo, temperatura, humedad, nivel de fertilización, cantidad de lluvia y época de cosecha, entre otras [113].

En la **Figura 34**, se observa la relación entre el rendimiento de esencia de *T. vulgaris* y la técnica de extracción: los AE TV-I a TV-XI se obtuvieron por MWHD y los TV-XII a TV-XX, por AV. En la gráfica, se resalta que, empleando la técnica MWHD, se alcanzan rendimientos de esencia más altos que por AV. Sin embargo, los rendimientos de los AE destilados por MWHD fueron menores del 1%, siendo $0.65 \pm 0.02\%$ (TV-III) el valor obtenido más alto, seguido de los rendimientos logrados para TV-XI ($0.64 \pm 0.01\%$), TV-X ($0.586 \pm 0.008\%$), TV-V ($0.574 \pm 0.006\%$) y TV-II ($0.474 \pm 0.009\%$).

Tabla 19. Rendimientos (%) de los AE obtenidos por MWHD de *T. vulgaris*, *R. officinalis* y *S. officinalis*.

CÓDIGO AE	R, %
TV-I	0.278 ± 0.004
TV-II	0.474 ± 0.009
TV-III	0.65 ± 0.02
TV-IV	0.32 ± 0.02
TV-V	0.574 ± 0.006
TV-VI	0.17 ± 0.01
TV-VII	0.38 ± 0.01
TV-VIII	0.330 ± 0.009
TV-IX	0.313 ± 0.008
TV-X	0.586 ± 0.008
TV-XI	0.64 ± 0.01
RO-I	0.77 ± 0.02
RO-II	0.460 ± 0.006
RO-III	0.38 ± 0.01
RO-IV	0.86 ± 0.02
RO-V	0.57 ± 0.01
SO-I	0.360 ± 0.008
SO-II	0.356 ± 0.008

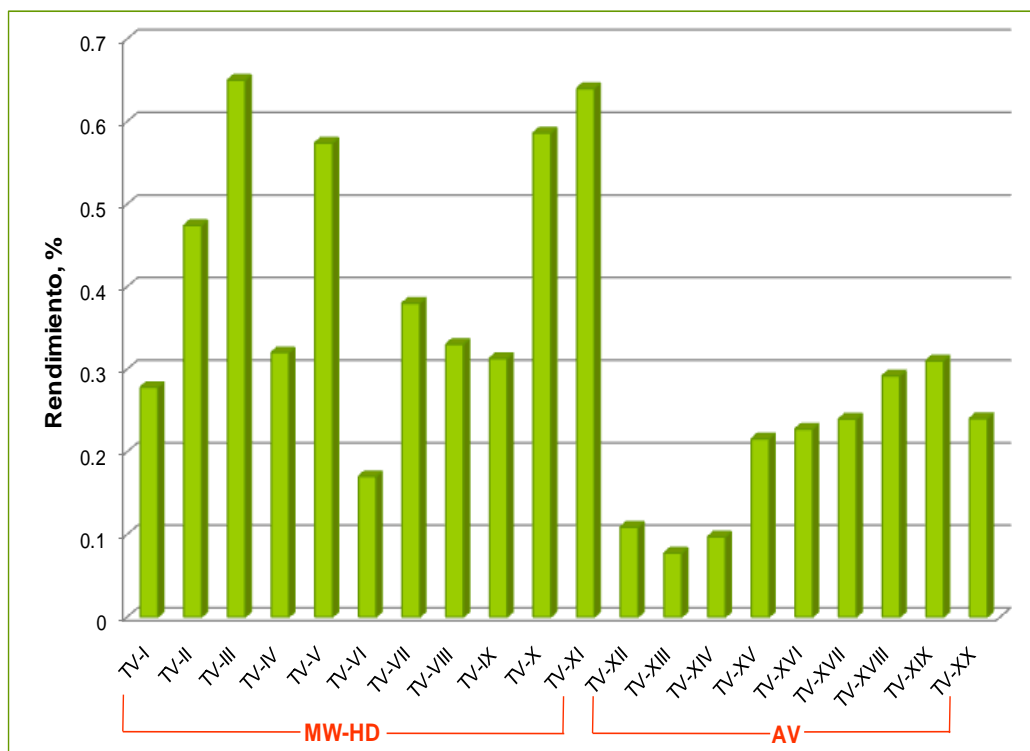
TV: *T. vulgaris*, RO: *R. officinalis*, SO: *S. officinalis*. Las siglas I-XI son códigos empleados para las parcelas experimentales usadas en esta investigación.

Tabla 20. Rendimientos (%) de los AE obtenidos por AV de *T. vulgaris*, *R. officinalis* y *L. citriodora*.

CÓDIGO AE	R, %
TV-XII	0.1
TV-XIII	0.1
TV-XIV	0.1
TV-XV	0.2
TV-XVI	0.2
TV-XVII	0.2
TV-XVIII	0.3
TV-XIX	0.3
TV-XX	0.2
RO-VI	0.6
RO-VII	1.0
RO-VIII	1.0
RO-IX	0.8
LC-I	0.03

TV: *T. vulgaris*, RO: *R. officinalis*, LC: *L. citriodora*. Las siglas I-XX son códigos empleados para las parcelas experimentales usadas en esta investigación.

Figura 34. Rendimientos de los AE de *T. vulgaris*, obtenidos por dos técnicas de destilación.



Los rendimientos de los AE TV-XIX (0.3%), TV-XVIII (0.3%) y TV-XX (0.2%) aislados por el método AV, presentaron los rendimientos más altos, que los obtenidos por MWHD, tal como se observa en la **Figura 34**.

Los rendimientos de los AE, reportados en las **Tablas 19 y 20**, para la especie *T. vulgaris* difieren de los obtenidos por Bozin y sus colaboradores [114], quienes reportan un rendimiento de esencia de 1.8%, con 47.9% de timol, mientras que Lee y sus colaboradores [115] extrajeron el AE de las hojas tomillo, con un rendimiento de $1.1 \pm 0.1\%$. Hudaib y sus colaboradores [116] analizaron la composición química y el rendimiento de esencia de plantas jóvenes y viejas de tomillo y encontraron valores de 0.5-1.2 y 0.15%, respectivamente. Con los resultados obtenidos, llegaron a la conclusión que las plantas jóvenes proporcionan una mayor cantidad de AE y, además, es importante seleccionar correctamente la época de cosecha que proporcionara la mejor calidad y cantidad más alta de esencia.

En la literatura, se reporta que cuando la especie *T. vulgaris* se siembra bajo pleno sol y en suelos secos, presenta una mayor cantidad de AE y de los compuestos timol y β -mirceno [113]. Sin embargo, las condiciones climáticas en las veredas El Retiro y La Granja (Sucre, Santander) donde se encuentran los cultivos de las plantas bajo estudio, no fueron constantes durante las épocas de corte debido a la temporada invernal que sufrió el país durante el primer semestre del 2011.

Las diferencias en los rendimientos de esencia para *R. officinalis* no presentaron variaciones significativas. Los porcentajes estuvieron en un rango de 0.5 a 1.0%, siendo el valor más alto el del AE RO-VIII. Algunos rendimientos de los AE estudiados, concuerdan con lo reportado por Flamini y sus colaboradores [117], quienes analizaron plantas propagadas a partir de especies silvestres y de cultivos establecidos 10 años atrás, que alcanzaron rendimientos de aceites de 0.2-0.7 y 0.4-0.8%, respectivamente.

Papageorgiou y sus colaboradores [118] destilaron hojas de romero en un equipo tipo *Clevenger* y se obtuvieron rendimientos entre 1.8 y 3.3%, que dependían de la época de cosecha de la planta. Estos valores fueron más altos que los de los AE de RO-IV, RO-VII y RO-VIII presentados en la **Tabla 20**. Posiblemente, las diferencias observadas se deban a la época de cosecha de las plantas, ya que para esta investigación se usó solamente el material vegetal colectado durante el primer corte (entre los 3 y 4 meses de crecimiento) de las plantas, después de su propagación a partir de los esquejes.

En la **Figura 35**, se presentan los rendimientos obtenidos para los AE de *R. officinalis* aislados por MW-HD y AV. Se evidencia que con la técnica AV se obtuvieron rendimientos del 1% para RO-VII y RO-VIII. No obstante, por MW-HD el AE RO-IV presentó el rendimiento más alto por esta técnica, con un valor de $0.86 \pm 0.02\%$.

En la **Tabla 19** y la **Figura 36** se reportan los rendimientos (%) de los AE de las plantas de *S. officinalis* estudiadas en esta investigación, que no descubren diferencias significativas, debido a que el material vegetal empleado para las dos destilaciones se cultivó bajo las mismas condiciones de densidad de siembra y nivel de fertilización, en suelos con igual composición química.

Figura 35. Rendimientos de los AE de *R. officinalis*, obtenidos por dos técnicas de destilación (RO: *R. officinalis* y I-IX: Parcelas experimentales donde se cultivaron, bajo diferentes condiciones de cultivo, las plantas analizadas).

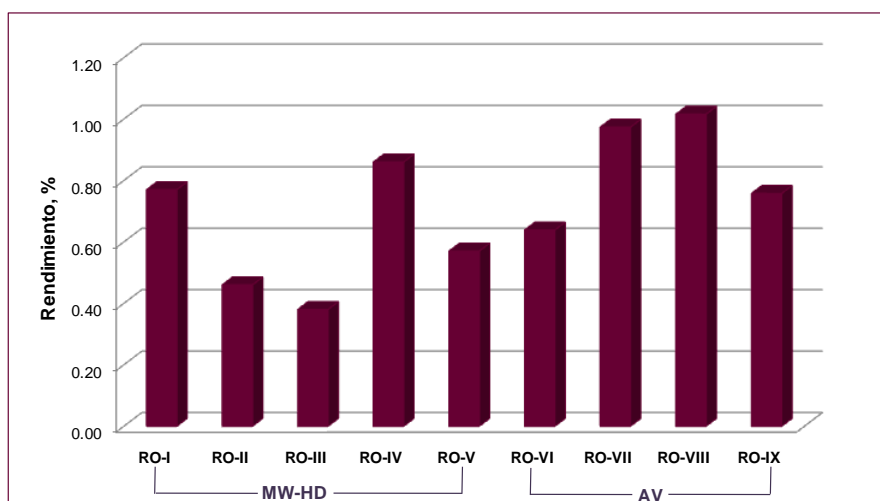
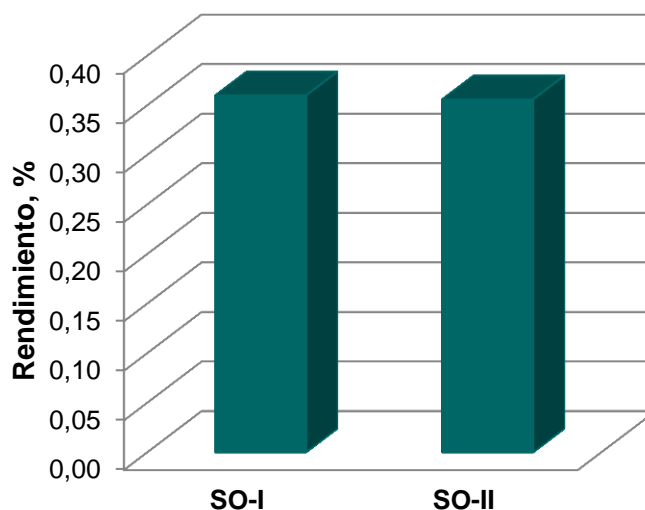


Figura 36. Rendimientos de los AE de *S. officinalis*, obtenidos por MWHD (RO: *S. officinalis* y I-II: Parcelas experimentales donde se cultivaron, bajo las mismas condiciones de cultivo, las plantas analizadas).



Taarit y sus colaboradores [119] analizaron el crecimiento de *S. officinalis* cultivada en suelos con diferente concentración de NaCl, para observar el efecto de la sal sobre su crecimiento, y encontraron rendimientos entre 0.21 y 0.62%. Farhat y sus colaboradores [120] estudiaron la variación de la composición química del AE de *S. officinalis* cosechada en diferentes zonas de Túnez y encontraron rendimientos entre 1.1 y 1.2%, que fueron significativamente más altos que los logrados con las plantas estudiadas en este trabajo.

En la **Tabla 20**, se presenta el rendimiento del AE de *L. citriodora*, que alcanzó 0.03%. En la presente investigación se analizó el AE de cidrón de una sola cosecha, debido al muy bajo rendimiento de su aceite (0.03%) y al poco material vegetal disponible. No obstante, por lo que en la literatura no hay muchas publicaciones sobre esta especie se decidió continuar trabajando con su AE. En el trabajo realizado por Stashenko y sus colaboradores [121], se analizó la composición química del AE de cidrón y extractos aislados por diferentes técnicas; se halló, que las partes aéreas de la planta contienen entre 0.2-1% de AE.

Los extractos aislados de *T. vulgaris* y *S. officinalis* se obtuvieron bajo diferentes condiciones de SFE, tal como se reporta en la **Tabla 21**, donde también aparecen rendimientos (R) obtenidos en cada extracción. Los extractos SFE de tomillo y salvia fueron suministrados por Carlos Ruiz, estudiante de Maestría en Química, quien ha optimizado el proceso SFE, aplicando un diseño experimental fraccionado 2^{7-2} , seguido del análisis por el método *Simplex*, para establecer las condiciones óptimas de extracción. Con el diseño fraccionado, se aislaron 32 muestras para cada planta, de las cuales se seleccionaron 11, de *T. vulgaris*, y 12, de *S. officinalis*. Ello, con el fin relacionar algunos parámetros de extracción con la composición química, el contenido de fenoles y la capacidad anti-radicalaria.

Los rendimientos obtenidos de *T.vulgaris* estuvieron en un rango de 0.2-1.8%, mientras que para *S. officinalis*, entre 0.7-3.8%. Los rendimientos (%) más altos con valores de 1.8% (SFE-TV-XI) y 3.8% (SFE-SO-XII), para las dos especies se alcanzaron cuando se emplearon los parámetros de extracción en los niveles más altos (Véase **Tabla 6**).

Al variar la presión de extracción (P) y manteniendo los demás parámetros constantes, se observaron diferencias en los rendimientos para ambas especies (Véase **Tabla 21**). Para *T. vulgaris*, al aumentar la presión de 30 a 50 MPa, se alcanzó un aumento del 0.4% en el rendimiento de extracto (SFE-TV-X y SFE-TV-XI), mientras que para *S. officinalis*, este aumento fue del 1.1% (SFE-SO-XI y SFE-SO-XII).

Tabla 21. Rendimientos (%) de los extractos de las especies *T. vulgaris* y *S. officinalis* obtenidos por SFE, usando diferentes parámetros de extracción.

CÓDIGO EXTRACTO	P	T	F	D	E	RENDIMIENTO, %
SFE-TV-I	30	313	20	30	0	0.2
SFE-TV-II	30	353	20	120	0	1.6
SFE-TV-III	50	313	20	30	20	0.2
SFE-TV-IV	30	353	20	30	20	0.3
SFE-TV-V	50	353	20	30	20	1.3
SFE-TV-VI	30	353	60	30	20	1.3
SFE-TV-VII	50	353	60	30	20	1.1
SFE-TV-VIII	30	353	20	120	20	1.2
SFE-TV-IX	50	353	20	120	20	1.1
SFE-TV-X	30	353	60	120	20	1.4
SFE-TV-XI	50	353	60	120	20	1.8
SFE-SO-I	30	353	20	30	0	1.0
SFE-SO-II	50	353	20	120	0	1.8
SFE-SO-III	30	353	20	30	20	0.7
SFE-SO-IV	50	353	20	30	20	1.2
SFE-SO-V	30	313	60	30	20	1.1
SFE-SO-VI	30	353	60	30	20	1.4
SFE-SO-VII	50	353	60	30	20	2.4
SFE-SO-VIII	30	353	20	120	20	2.5
SFE-SO-IX	50	353	20	120	20	2.2
SFE-SO-X	30	313	60	120	20	1.3
SFE-SO-XI	30	353	60	120	20	2.7
SFE-SO-XII	50	353	60	120	20	3.8

TV: *T. vulgaris*, SO: *S. officinalis*, P: Presión (MPa), T: Temperatura (K), F: Flujo (g/min), D: Tiempo dinámico (min), E: Tiempo estático (min).

Los rendimientos de los extractos dependen de la combinación de varios parámetros de extracción, tal como se puede observar en la **Tabla 21**. Se encontró un parámetro único, que tenga mayor efecto sobre el rendimiento. En este trabajo particular no se buscaba encontrar las condiciones de extracción con las que se obtuviera el mayor rendimiento del extracto, su objetivo se centraba en realizar una comparación entre la composición química y las propiedades antioxidantes de algunos extractos obtenidos por SFE.

5.7.2 Caracterización química de los AE. En la **Figura 37** se presentan algunos perfiles cromatográficos típicos de los metabolitos secundarios volátiles aislados por MW-HD y AV de las plantas bajo estudio. En las **Tablas 1.1-1.8** del **Anexo 1**, se registran los compuestos identificados y sus cantidades relativas (% , n=3). Se detectaron entre 48 y 75 sustancias en concentraciones relativas >0.02%, de los cuales se identificaron positivamente ca. 92-99%.

La identificación se realizó con base en los índices de retención lineales, espectros de masas (EI, 70 eV) y sustancias de referencia certificadas. Los índices de retención lineales (IR) son parámetros confiables (e.g., en la columna DB-5: timol –IR_{experimental}:1298, IR_{literatura}:1289, y 1,8-cineol – IR_{experimental}:1038, IR_{literatura}:1026), reproducibles (variaciones de ± 15 unidades), dependen de la fase estacionaria y permiten expresar en una escala uniforme la retención de los compuestos de interés [85]. Para aumentar el grado de confianza en las asignaciones de las sustancias a los picos cromatográficos identificados, se usaron dos columnas de fases estacionarias apolar y polar. Los espectros de masas, obtenidos a 70 eV, se compararon con los de las bases de datos *Adams*, *Nist* y *Wiley*, lo que permitió realizar un reconocimiento estructural inicial (identificar tentativamente) de las posibles sustancias presentes en los AE. También, se emplearon sustancias de referencia certificadas de los compuestos mayoritarios, con el fin de realizar la identificación confirmatoria con base en los t_R y los espectros de masas.

En las **Tablas 22-29** se presentan los componentes mayoritarios (>0.1%) de los AE aislados de las plantas bajo estudio. En el **Anexo 1 (Tablas 1.1-1.8)** se presentan las tablas completas de composición química.

El timol (13-54%) fue el componente mayoritario en todos los AE de *T. vulgaris*, seguido de *p*-cimeno (13-40%), *trans*-β-cariofileno (1.5-4%) y carvacrol (0.6-2.3%) (Véase **Tablas 22-25**). Los datos obtenidos ilustran las diferencias en la

composición química las cuales dependen de las condiciones de cultivo y la técnica de destilación.

En el AE TV-XVII se encontró la cantidad más alta de timol ($54.06 \pm 0.01\%$) y la menor de *p*-cimeno ($12.75 \pm 0.05\%$), seguido de TV-XVI ($53.09 \pm 0.05\%$ de timol y $13.64 \pm 0.02\%$ de *p*-cimeno) y TV-XIII ($52.95 \pm 0.09\%$ de timol y $15.93 \pm 0.09\%$ de *p*-cimeno).

En todos los AE se encontraron hidrocarburos monoterpénicos (HM) como α -tujeno, β -mirceno, α - y γ -terpinenos; monoterpenos oxigenados (MO) como 1,8-cineol, *cis*-hidrato de sabineno, linalol, alcanfor, borneol, timol y carvacrol, e hidrocarburos sesquiterpénicos, entre ellos, *trans*- β -cariofileno.

En la **Figura 38** se presenta una clasificación, por familias, de compuestos presentes en los AE de *T. vulgaris*, donde se observan diferencias en la composición química de los AE analizados. El AE de tomillo fue rico en hidrocarburos monoterpénicos (30.1-69.0%), monoterpenos oxigenados (41-66.1%), y contiene bajas proporciones de compuestos de mayor peso molecular como sesquiterpenos oxigenados (0.05-0.8%) (Véanse **Tablas 22-25**).

Los resultados alcanzados muestran que la especie *T. vulgaris* cultivada en Colombia, presenta alto contenido del timol. Sin embargo, en los AE TV-XVIII y TV-XIX *p*-cimeno fue el componente mayoritario, con valores de $38.2 \pm 0.1\%$ y $39.62 \pm 0.05\%$, respectivamente.

Figura 37. Cromatogramas típicos de los AE extraídos de: **A.** *T. vulgaris* (MW-HD), **B.** *T. vulgaris* (AV), **C.** *R. officinalis* (MW-HD), **D.** *R. officinalis* (AV), **E.** *S. officinalis* (MW-HD) y **F.** *L. citriodora* (MW-HD). Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. FID. Véanse las **Tablas 22-29**, para la identificación de los picos.

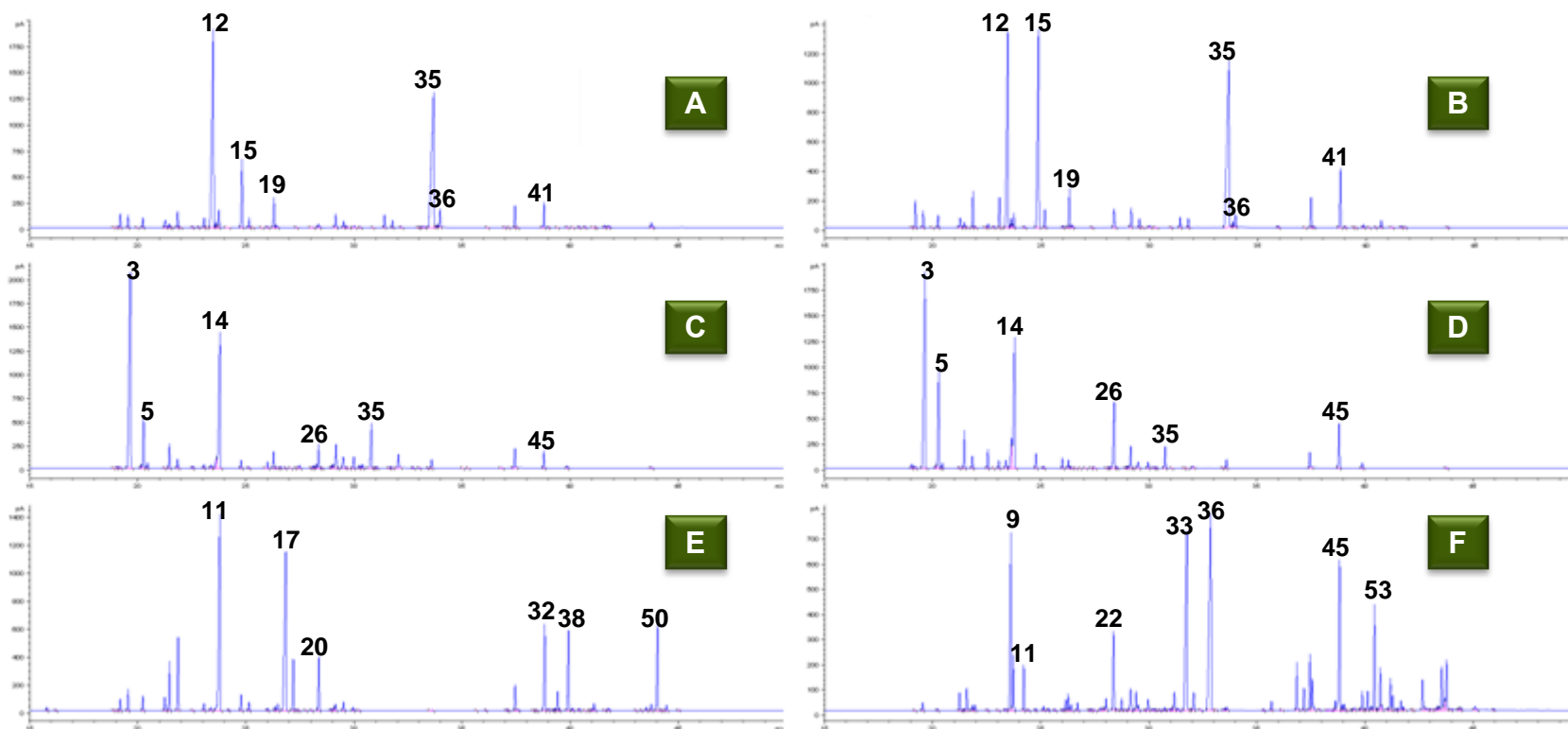


Figura 38. Distribución, por familias, de compuestos de los AE de *T. vulgaris* (TV) obtenidos por dos técnicas de destilación (Véanse **Tablas 19 y 20**).

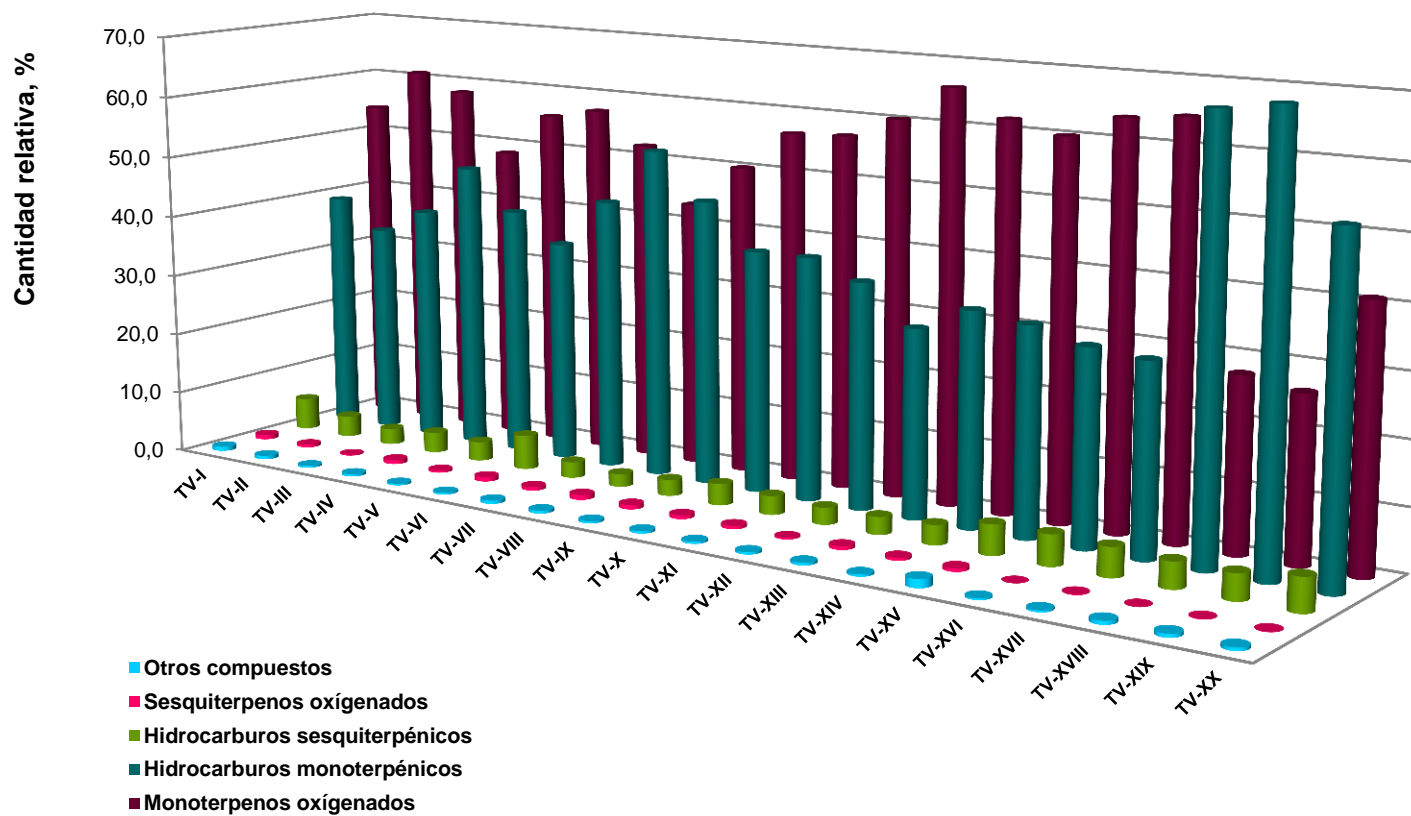


Tabla 22. Composición química de los AE de *T. vulgaris*, obtenidos por MWHD.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-I	TV-II	TV-III	TV-IV	TV-V
1	α -Tujeno	HM	933	1026	1.280 \pm 0.005	1.17 \pm 0.05	1.177 \pm 0.001	1.205 \pm 0.002	1.46 \pm 0.03
7	β -Mirceno	HM	993	1163	1.059 \pm 0.003	1.18 \pm 0.05	1.465 \pm 0.001	1.395 \pm 0.002	1.47 \pm 0.03
11	α -Terpineno	HM	1023	1176	1.326 \pm 0.004	1.1 \pm 0.1	1.465 \pm 0.001	0.976 \pm 0.001	1.11 \pm 0.02
12	<i>p</i>-Cimeno*	HM	1034	1268	26.36 \pm 0.05	21.5 \pm 0.2	20.32 \pm 0.02	35.27 \pm 0.04	26.4 \pm 0.6
14	1,8-Cineol*	MO	1040	1203	0.994 \pm 0.001	1.08 \pm 0.02	0.633 \pm 0.001	1.420 \pm 0.001	0.53 \pm 0.03
15	γ-Terpineno*	HM	1067	1244	6.27 \pm 0.01	6.4 \pm 0.6	10.94 \pm 0.01	7.147 \pm 0.008	7.19 \pm 0.05
16	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	MO	1075	1546	1.573 \pm 0.001	1.06 \pm 0.02	0.989 \pm 0.001	0.894 \pm 0.004	1.35 \pm 0.07
19	Linalol*	MO	1101	1541	2.908 \pm 0.001	2.68 \pm 0.01	2.826 \pm 0.003	2.905 \pm 0.001	2.17 \pm 0.07
21	Alcanfor*	MO	1157	1513	0.44 \pm 0.01	0.28 \pm 0.05	0.529 \pm 0.006	0.553 \pm 0.006	0.142 \pm 0.004
22	Borneol*	MO	1178	1697	1.441 \pm 0.001	1.26 \pm 0.03	1.105 \pm 0.003	1.576 \pm 0.001	1.26 \pm 0.03
35	Timol*	MO	1298	2172	41.75 \pm 0.03	49.5 \pm 0.8	47.76 \pm 0.04	35.50 \pm 0.03	45.9 \pm 0.1
36	Carvacrol*	MO	1306	2199	1.888 \pm 0.001	2.34 \pm 0.05	2.144 \pm 0.002	1.884 \pm 0.007	2.01 \pm 0.02
41	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1444	1598	3.336 \pm 0.002	2.58 \pm 0.04	1.89 \pm 0.01	2.319 \pm 0.004	2.20 \pm 0.08

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas.

IR-Índice de retención lineal.

HM: Hidrocarburo monoterénico.

MO: Monoterpeno oxigenado.

HS: Hidrocarburo sesquiterpénico.

SO: Sesquiterpeno oxigenado.

Tabla 23. Composición química de los AE de *T. vulgaris*, obtenidos por MWHD.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-VI	TV-VII	TV-VIII	TV-IX	TV-X
1	α -Tujeno	HM	933	1026	1.198 \pm 0.002	1.177 \pm 0.001	0.993 \pm 0.004	1.011 \pm 0.003	0.971 \pm 0.002
7	β -Mirceno	HM	993	1163	1.311 \pm 0.001	1.160 \pm 0.001	1.19 \pm 0.01	1.241 \pm 0.001	1.19 \pm 0.02
11	α -Terpineno	HM	1023	1176	1.554 \pm 0.001	1.167 \pm 0.001	1.024 \pm 0.004	1.045 \pm 0.001	1.49 \pm 0.02
12	<i>p</i>-Cimeno*	HM	1034	1268	18.29 \pm 0.02	29.64 \pm 0.02	38.6 \pm 0.8	30.0 \pm 0.1	22.4 \pm 0.5
14	1,8-Cineol*	MO	1040	1203	0.493 \pm 0.003	2.212 \pm 0.002	2.06 \pm 0.02	1.551 \pm 0.005	1.05 \pm 0.03
15	γ-Terpineno*	HM	1067	1244	10.54 \pm 0.004	7.136 \pm 0.004	6.74 \pm 0.07	8.81 \pm 0.08	9.4 \pm 0.1
16	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	MO	1075	1546	1.657 \pm 0.001	1.152 \pm 0.001	0.561 \pm 0.008	0.814 \pm 0.001	1.04 \pm 0.02
19	Linalol*	MO	1101	1541	2.651 \pm 0.001	3.236 \pm 0.003	3.66 \pm 0.04	3.83 \pm 0.02	3.22 \pm 0.05
21	Alcanfor*	MO	1157	1513	0.58 \pm 0.02	0.542 \pm 0.001	0.74 \pm 0.01	2.25 \pm 0.07	0.47 \pm 0.01
22	Borneol*	MO	1178	1697	2.086 \pm 0.001	1.699 \pm 0.005	2.03 \pm 0.02	0.983 \pm 0.002	1.53 \pm 0.03
35	Timol*	MO	1298	2172	44.47 \pm 0.02	37.37 \pm 0.04	29.0 \pm 0.6	35.49 \pm 0.06	43.9 \pm 0.2
36	Carvacrol*	MO	1306	2199	1.693 \pm 0.003	1.75 \pm 0.01	1.74 \pm 0.02	1.814 \pm 0.001	2.27 \pm 0.04
41	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1444	1598	4.053 \pm 0.002	1.777 \pm 0.001	1.46 \pm 0.01	1.882 \pm 0.006	2.51 \pm 0.04

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas.

IR-Índice de retención lineal.

HM: Hidrocarburo monoterénico.

MO: Monoterpeno oxigenado.

HS: Hidrocarburo sesquiterpénico.

SO: Sesquiterpeno oxigenado.

Tabla 24. Composición química de los AE de *T. vulgaris*, obtenidos por MWHD y AV.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-XI ^a	TV-XII ^b	TV-XIII ^b	TV-XIV ^b	TV-XV ^b
1	α -Tujeno	HM	933	1026	1.03 \pm 0.01	0.74 \pm 0.01	0.475 \pm 0.003	0.754 \pm 0.002	0.777 \pm 0.002
7	β -Mirceno	HM	993	1163	1.39 \pm 0.02	1.31 \pm 0.01	1.032 \pm 0.003	1.268 \pm 0.003	1.312 \pm 0.003
11	α -Terpineno	HM	1023	1176	1.68 \pm 0.03	1.26 \pm 0.01	0.821 \pm 0.004	1.192 \pm 0.002	1.192 \pm 0.002
12	<i>p</i>-Cimeno*	HM	1034	1268	19.6 \pm 0.3	17.9 \pm 0.1	15.93 \pm 0.09	16.88 \pm 0.03	15.58 \pm 0.06
14	1,8-Cineol*	MO	1040	1203	1.16 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	1.110 \pm 0.002	0.955 \pm 0.001	0.866 \pm 0.002
15	γ-Terpineno*	HM	1067	1244	11.9 \pm 0.1	12.53 \pm 0.09	9.28 \pm 0.02	12.07 \pm 0.02	11.73 \pm 0.03
16	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	MO	1075	1546	1.11 \pm 0.01	1.56 \pm 0.01	1.69 \pm 0.01	1.591 \pm 0.002	1.397 \pm 0.002
19	Linalol*	MO	1101	1541	3.10 \pm 0.04	3.04 \pm 0.02	3.60 \pm 0.01	3.093 \pm 0.004	3.022 \pm 0.007
21	Alcanfor*	MO	1157	1513	0.203 \pm 0.002	0.65 \pm 0.01	0.234 \pm 0.001	0.620 \pm 0.001	0.462 \pm 0.001
22	Borneol*	MO	1178	1697	1.61 \pm 0.02	1.55 \pm 0.01	1.72 \pm 0.01	1.420 \pm 0.002	1.281 \pm 0.004
35	Timol*	MO	1298	2172	44.6 \pm 0.6	48.2 \pm 0.3	52.95 \pm 0.09	49.02 \pm 0.07	49.62 \pm 0.08
36	Carvacrol*	MO	1306	2199	2.20 \pm 0.03	2.10 \pm 0.02	2.28 \pm 0.01	1.956 \pm 0.004	1.980 \pm 0.003
41	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1444	1598	2.18 \pm 0.03	1.97 \pm 0.01	2.21 \pm 0.01	2.310 \pm 0.003	3.469 \pm 0.007

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas.

^aObtenidos por MWHD.

^bObtenidos por AV.

IR-Índice de retención lineal.

HM: Hidrocarburo monoterénico.

MO: Monoterpeno oxigenado.

HS: Hidrocarburo sesquiterpénico.

SO: Sesquiterpeno oxigenado.

Tabla 25. Composición química de los AE de *T. vulgaris*, obtenidos por AV.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-XVI ^b	TV-XVII ^b	TV-XVIII ^b	TV-XIX ^b	TV-XX ^b
1	α -Tujeno	HM	933	1026	0.702 \pm 0.001	0.639 \pm 0.003	2.154 \pm 0.005	2.00 \pm 0.01	1.764 \pm 0.001
7	β -Miraceno	HM	993	1163	1.311 \pm 0.001	1.251 \pm 0.001	2.452 \pm 0.004	2.27 \pm 0.01	2.408 \pm 0.001
11	α -Terpineno	HM	1023	1176	1.204 \pm 0.002	1.186 \pm 0.002	0.178 \pm 0.002	2.18 \pm 0.01	2.096 \pm 0.002
12	<i>p</i>-Cimeno*	HM	1034	1268	13.64 \pm 0.02	12.75 \pm 0.05	38.2 \pm 0.1	39.62 \pm 0.05	20.994 \pm 0.002
14	1,8-Cineol*	MO	1040	1203	0.639 \pm 0.001	0.657 \pm 0.001	1.442 \pm 0.001	1.578 \pm 0.003	0.896 \pm 0.001
15	γ-Terpineno*	HM	1067	1244	11.82 \pm 0.02	12.24 \pm 0.01	18.57 \pm 0.05	19.92 \pm 0.05	21.213 \pm 0.003
16	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	MO	1075	1546	1.329 \pm 0.003	1.346 \pm 0.001	1.556 \pm 0.003	1.16 \pm 0.01	1.139 \pm 0.001
19	Linalol*	MO	1101	1541	2.874 \pm 0.006	2.946 \pm 0.001	4.18 \pm 0.01	3.99 \pm 0.01	2.807 \pm 0.001
21	Alcanfor*	MO	1157	1513	0.411 \pm 0.001	0.133 \pm 0.003	0.628 \pm 0.002	0.635 \pm 0.002	1.742 \pm 0.001
22	Borneol*	MO	1178	1697	1.296 \pm 0.002	1.285 \pm 0.004	1.588 \pm 0.004	1.588 \pm 0.003	1.517 \pm 0.001
35	Timol*	MO	1298	2172	53.09 \pm 0.05	54.06 \pm 0.01	14.29 \pm 0.03	13.53 \pm 0.03	28.966 \pm 0.003
36	Carvacrol*	MO	1306	2199	2.043 \pm 0.001	2.063 \pm 0.003	0.642 \pm 0.001	0.607 \pm 0.002	1.029 \pm 0.001
41	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1444	1598	3.584 \pm 0.003	3.532 \pm 0.002	3.387 \pm 0.007	3.29 \pm 0.02	4.459 \pm 0.002

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas.

^bObtenidos por AV.

IR-Índice de retención lineal.

HM: Hidrocarburo monoterénico.

MO: Monoterpeno oxigenado.

HS: Hidrocarburo sesquiterpénico.

SO: Sesquiterpeno oxigenado.

En la literatura se encuentran publicaciones [114, 116, 122, 123] sobre la composición química del AE de *T. vulgaris*, que varía en función de las condiciones de cultivo, la época de cosecha y la edad de las plantas. Por ejemplo, Reddy y colaboradores [122] analizaron la composición química de plantas cultivadas en Italia y reproducidas a partir de dos clones (Laval 1 y Laval 2) y encontraron componentes mayoritarios *p*-cimeno (Laval 1: 16.3% y Laval 2: 20.8%) y timol (Laval 1: 9.5% y Laval 2: 18.1%). Los porcentajes de timol, reportados para ambos clones, fueron menores que los de la mayoría de los AE analizados en esta investigación, con excepción de los aceites TV-XVIII y TV-XIX.

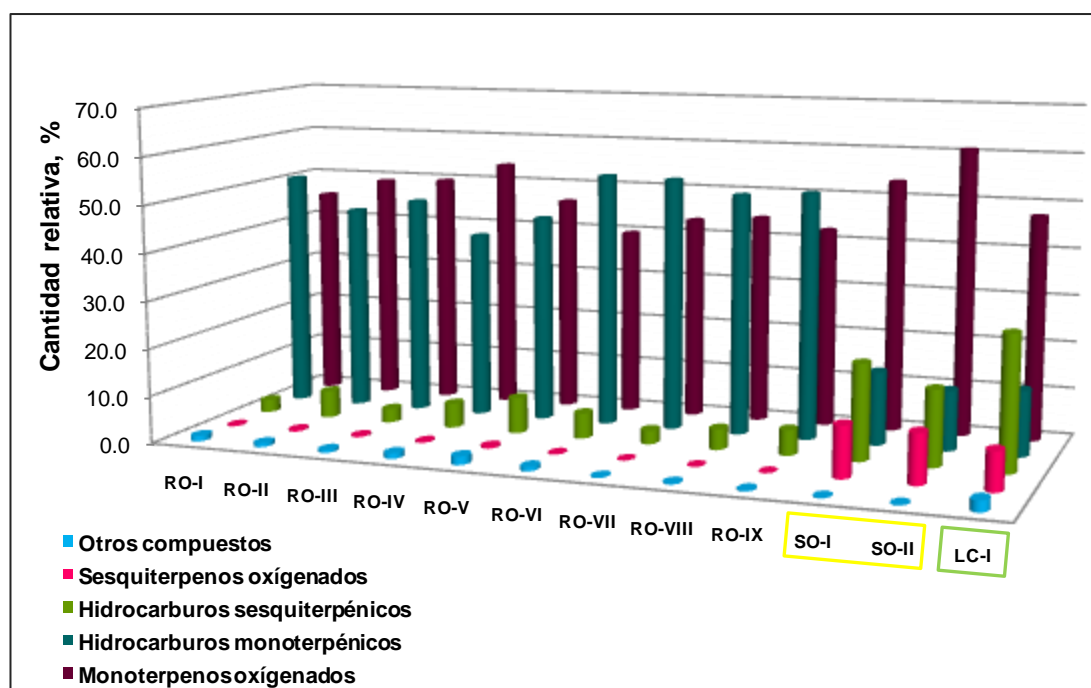
Bozin y colaboradores [114] encontraron que el AE de *T. vulgaris*, cultivada en Serbia, contenía 47.5% de timol, valor similar al determinado para el AE TV-III (Véase **Tabla 22**). Baranauskiené y colaboradores [123] determinaron que, dependiendo de la humedad del material vegetal, las proporciones de *p*-cimeno varían entre 9.7-13.7%, para material fresco, y 12.2-15.6%, para el seco. En cuanto al timol, los autores encontraron que las diferencias en su contenido cuando se usó el material fresco o seco no fueron significativas, *i.e.*, 49.1-56.1% y 49.0-58.1%, respectivamente. Estos valores fueron similares a los encontrados en esta investigación. Hudaib y colaboradores [116] concluyeron que la composición química de los AE varía en función del estado vegetativo y la edad de las plantas y encontraron el contenido de timol más alto al inicio del ciclo vegetativo, para las plantas jóvenes (2 años) de 51.17% y para plantas viejas (5 años) de 54.10%.

En las **Tablas 26 y 27** se presentan las cantidades relativas (%) de los nueve componentes mayoritarios de los AE de *R. officinalis*. Los componentes mayoritario α -pineno (19-36%), seguido de 1,8-cineol (21-29%), canfeno (5-13%) y alcanfor (3-17%). Flamini y colaboradores [117] analizaron la composición química de hojas, flores y tallos, de romero por separado, reportando α -pineno como compuesto mayoritario con porcentajes de $30.3 \pm 0.4\%$, $21.8 \pm 0.9\%$ y $20.7 \pm 0.7\%$, respectivamente. Papageorgiou y

colaboradores [118] reportaron el 1,8-cineol como compuesto mayoritario (1-6%), seguido de α -pineno (3.2-4%), α -terpineol (3-4.5%), alcanfor (2-6%) y *trans*- β -cariofileno (2-5%).

En la **Figura 39** se observa la clasificación, por familias, de compuestos de los componentes identificados en los AE de *R. officinalis*, donde el contenido de hidrocarburos monoterpénicos (39.7-54.0%) y monoterpenos oxigenados (39.7-53.7%) fue similar, por la presencia de α -pineno (HM) y 1,8 cineol (MO), en proporciones mayores de 39.7%. Además, se evidencia el bajo contenido de hidrocarburos sesquiterpénicos (2.9-7.6%) y sesquiterpenos oxigenados (0-0.4%).

Figura 39. Distribución de las familias de compuestos presentes en los AE de *R. officinalis* (RO), *S. officinalis* (SO) y *L. citriodora* (LC), obtenidos por las técnicas de destilación MWHD y AV (Véanse **Tablas 19 y 20**).



El AE de *R. officinalis*, cultivado en Colombia puede ser usado en las industrias cosmética y alimenticia, por la presencia de 1,8-cineol, canfeno y *trans*- β -cariofileno usados como fragancias e intermediarios en la síntesis de nuevos compuestos.

Tabla 26. Composición química de los AE de *R. officinalis*, obtenidos por MWHD.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	RO-I	RO-II	RO-III	RO-IV	RO-V
3	α -Pino* [*]	HM	944	1023	36.138 \pm 0.001	19.184 \pm 0.001	21.982 \pm 0.002	18.672 \pm 0.001	19.765 \pm 0.002
5	Canfeno* [*]	HM	958	1064	5.232 \pm 0.001	12.894 \pm 0.001	13.061 \pm 0.002	8.600 \pm 0.001	11.495 \pm 0.001
8	β -Pino	HM	985	1101	2.539 \pm 0.002	3.807 \pm 0.002	2.881 \pm 0.003	4.560 \pm 0.001	4.321 \pm 0.003
11	α -Felandreno	HM	1009	1200	0.253 \pm 0.001	2.401 \pm 0.001	2.336 \pm 0.003	2.357 \pm 0.004	2.448 \pm 0.001
14	1,8-Cineol* [*]	MO	1038	1206	23.213 \pm 0.001	21.795 \pm 0.001	22.985 \pm 0.002	24.487 \pm 0.002	21.216 \pm 0.002
26	Alcanfor* [*]	MO	1157	1513	2.688 \pm 0.002	17.257 \pm 0.001	17.540 \pm 0.004	17.512 \pm 0.001	15.530 \pm 0.002
30	Borneol* [*]	MO	1178	1697	3.331 \pm 0.001	4.099 \pm 0.002	3.855 \pm 0.003	4.787 \pm 0.002	4.406 \pm 0.001
35	Verbenona	MO	1221	1706	6.848 \pm 0.003	1.995 \pm 0.001	1.801 \pm 0.001	3.241 \pm 0.001	1.815 \pm 0.001
45	<i>trans</i> - β -Cariofileno* [*]	HS	1443	1598	2.206 \pm 0.003	5.751 \pm 0.001	2.600 \pm 0.002	4.621 \pm 0.003	6.611 \pm 0.004

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas.

IR-Índice de retención lineales.

HM: Hidrocarburo monoterénico.

MO: Monoterpeno oxigenado.

HS: Hidrocarburo sesquiterpénico.

SO: Sesquiterpeno oxigenado.

Tabla 27. Composición química de los AE de *R. officinalis*, obtenidos por AV.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)			
			DB-5	DB-WAX	RO-VI	RO-VII	RO-VIII	RO-IX
3	α -Pino* [*]	HM	944	1023	30.36 \pm 0.02	27.41 \pm 0.02	24.609 \pm 0.001	25.489 \pm 0.001
5	Canfeno* [*]	HM	958	1064	10.749 \pm 0.007	12.266 \pm 0.006	12.996 \pm 0.006	13.195 \pm 0.003
8	β -Pino	HM	985	1101	3.584 \pm 0.002	3.387 \pm 0.001	3.355 \pm 0.001	3.419 \pm 0.001
11	α -Felandreno	HM	1009	1200	1.801 \pm 0.001	2.946 \pm 0.001	2.743 \pm 0.001	2.602 \pm 0.003
14	1,8-Cineol* [*]	MO	1038	1206	23.314 \pm 0.006	28.968 \pm 0.009	26.864 \pm 0.002	24.871 \pm 0.007
26	Alcanfor* [*]	MO	1157	1513	8.454 \pm 0.007	9.746 \pm 0.004	12.837 \pm 0.001	13.122 \pm 0.001
30	Borneol* [*]	MO	1178	1697	2.405 \pm 0.003	1.404 \pm 0.001	2.133 \pm 0.001	1.901 \pm 0.001
35	Verbenona	MO	1221	1706	2.212 \pm 0.002	0.603 \pm 0.002	0.885 \pm 0.001	0.825 \pm 0.001
45	<i>trans</i> - β -Cariofileno* [*]	HS	1443	1598	4.793 \pm 0.003	2.631 \pm 0.007	3.975 \pm 0.001	4.890 \pm 0.005

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas.

IR-Índice de retención lineales.

HM: Hidrocarburo monoterénico.

MO: Monoterpeno oxigenado.

HS: Hidrocarburo sesquiterpénico.

SO: Sesquiterpeno oxigenado.

La composición química de los dos AE de la especie *S. officinalis*, aislados por MWHD, se presenta en la **Tabla 28**. El 1,8-cineol fue el compuesto mayoritario ($22.778 \pm 0.001\%$ y $26.623 \pm 0.003\%$), seguido de α -tujona ($19.220 \pm 0.003\%$ y $18.303 \pm 0.002\%$), *trans*- β -cariofileno ($9.783 \pm 0.003\%$ y $7.287 \pm 0.004\%$), viridiflorol ($7.553 \pm 0.003\%$ y $8.036 \pm 0.005\%$) y α -humuleno ($7.686 \pm 0.002\%$ y $5.452 \pm 0.003\%$).

La composición química de los AE analizados en este trabajo, fue diferente a la reportada por Taarit y colaboradores [119], quienes aislaron el AE por hidrodestilación a partir de plantas cultivadas en Túnez, y encontraron como compuestos mayoritarios viridiflorol ($17.1 \pm 0.1\%$), 1,8-cineol ($11.39 \pm 0.03\%$), α -tujona ($11.13 \pm 0.04\%$), alcanfor ($5.5 \pm 0.1\%$), borneol ($5.02 \pm 0.02\%$) y *trans*- β -cariofileno ($5.00 \pm 0.05\%$). No obstante, se han desarrollado diversas investigaciones sobre la especie *S. officinalis*, que evidencian variaciones en la composición química de su AE, en función del medio donde se cultiva la planta. Farhat y colaboradores [120] compararon la composición química de cuatro AE aislados de especies cosechadas en diferentes zonas de Túnez (Kélibia (OK), Soliman (OS), Bou Arada (OB) y Sers (OR)). En tres de los AE se identificó α -tujona (OS: $16 \pm 3\%$; OB: $18.08 \pm 0.02\%$; OR: $19.2 \pm 0.2\%$) como componente mayoritario, seguido de 1,8-cineol (OS: $13 \pm 3\%$; OB: $14.6 \pm 0.2\%$; OR: $15.60 \pm 0.08\%$) y viridiflorol (OS: $15 \pm 4\%$; OB: $11.13 \pm 0.05\%$; OR: $9.94 \pm 0.05\%$). Sin embargo, en el AE de la especie cultivada en Kélibia se identificó como compuesto mayoritario viridiflorol (OK: 19 ± 2), seguido de manol (OK: 13.1 ± 0.6) y α -tujona (OK: 11.6 ± 0.6).

En la **Figura 39** se presenta una clasificación, por familias, de compuestos de los AE SO-I y SO-II, donde se observa un contenido de monoterpenos oxigenados de 53.5 y 60.8%, respectivamente. Además, se encontraron hidrocarburos monoterpénidos en cantidades relativamente bajas (15.5 y 12.7%), hidrocarburos sesquiterpénicos (20.2 y 16.6%) y sesquiterpenos oxigenados (10.8 y 10.5%).

En la **Tabla 29** se identifican geranial ($18.588 \pm 0.004\%$) y neral ($13.971 \pm 0.003\%$) como compuestos mayoritarios en el AE de *L. citriodora*, seguido de limoneno ($10.000 \pm 0.001\%$), *trans*- β -cariofileno ($8.318 \pm 0.001\%$), óxido de cariofileno ($2.437 \pm 0.001\%$) y β -cubebeno ($2.386 \pm 0.001\%$).

En el AE aislado de plantas de *L. citriodora*, en diferentes estados fenológicos, se identificaron geranial (27 y 39%), neral (22 y 24%) y limoneno (6 y 18%) como compuestos mayoritarios [124]. El AE de plantas recolectadas en jardines de la ciudad de Bucaramanga (Colombia) presentó como componentes mayoritarios geranial (38.30%), neral (20%), geraniol (5.6%) y nerol (4.1%) [121]. Resultados similares a los de Grecia se obtuvieron con plantas cultivadas en Chile, donde también se identificaron geraniol (45.59%), neral (31.33%) y limoneno (1.34%) como componentes principales del aceite [125].

La clasificación del AE de *L. citriodora*, por familias, de compuestos (Véase **Figura 39**) mostró contenidos altos de monoterpenos oxigenados (47.7%) e hidrocarburos sesquiterpénicos (28.3%). Además, aldehídos monoterpénicos geranial y neral constituyeron un 20.9% del total del aceite de cidrón.

Tabla 28. Composición química de los AE de *S. officinalis*, obtenidos por MWHD.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)	
			DB-5	DB-WAX	SO-I	SO-II
2	α -Pino* [*]	HM	942	1020	1.444 \pm 0.001	2.152 \pm 0.001
3	Canfeno* [*]	HM	957	1064	1.064 \pm 0.001	1.383 \pm 0.001
4	Sabineno	HM	980	1117	1.040 \pm 0.001	0.447 \pm 0.001
5	β -Pino	HM	985	1101	3.509 \pm 0.001	3.859 \pm 0.001
6	β -Mirceno	HM	993	1163	5.332 \pm 0.001	2.395 \pm 0.001
11	1,8-Cineol*[*]	MO	1041	1206	22.778 \pm 0.001	26.623 \pm 0.003
13	γ -Terpino* [*]	HM	1065	1243	1.057 \pm 0.004	0.774 \pm 0.002
17	α-Tujona	MO	1116	1400	19.220 \pm 0.003	18.303 \pm 0.002
20	Alcanfor* [*]	MO	1157	1513	4.398 \pm 0.001	6.030 \pm 0.003
32	<i>trans</i>-β-Cariofileno*[*]	HS	1444	1600	8.783 \pm 0.003	7.287 \pm 0.004
38	α-Humuleno*[*]	HS	1478	1673	7.686 \pm 0.002	5.452 \pm 0.003
50	Viridiflorol	SO	1622	2010	7.553 \pm 0.003	8.036 \pm 0.005
54	Manol	SO	2094	2048	1.621 \pm 0.001	1.262 \pm 0.001

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas.

IR-Índice de retención lineal.

HM: Hidrocarburo monoterénico.

MO: Monoterpeno oxigenado.

HS: Hidrocarburo sesquiterpénico.

SO: Sesquiterpeno oxigenado.

Tabla 29. Composición química de los AE de *L. citriodora*, obtenido por MWHD.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	LC-I
4	6-Metil-5-hepten-2-ona	OC	987	1332	1.055 \pm 0.001
9	Limoneno*	HM	1037	1194	10.000 \pm 0.001
10	1,8-Cineol*	MO	1040	1204	2.359 \pm 0.001
11	<i>trans</i> - β -Ocimeno	HM	1052	1232	1.848 \pm 0.002
22	Alcanfor*	MO	1157	1513	4.444 \pm 0.002
24	Epóxido de rosefurano	MO	1178	1595	1.463 \pm 0.002
31	Nerol	MO	1231	1792	1.077 \pm 0.004
33	Neral*	MO	1247	1679	13.971 \pm 0.003
36	Geranial*	MO	1276	1727	18.588 \pm 0.004
42	β -Cubebeno	HS	1400	1540	2.386 \pm 0.001
45	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1444	1600	8.318 \pm 0.001
53	<i>ar</i>-Curcumeno	HS	1494	1769	4.959 \pm 0.003
55	α -Zingibereno	HS	1502	1719	1.978 \pm 0.001
64	<i>trans</i> -Nerolidol	SO	1571	2034	1.677 \pm 0.001
70	Óxido de cariofileno	SO	1611	1985	2.437 \pm 0.001

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas.

IR-Índice de retención lineal.

HM: Hidrocarburo monoterénico.

MO: Monoterpeno oxigenado.

OC: Otros compuestos.

HS: Hidrocarburo sesquiterpénico.

SO: Sesquiterpeno oxigenado.

5.7.3 Cuantificación de los componentes mayoritarios en los AE. Para la cuantificación de los componentes mayoritarios de los AE se construyeron curvas de calibración para cada uno de estos compuestos (Véase **Anexo 2**). Se prepararon soluciones de diferente concentración y se procedió a analizarlas bajo los mismos parámetros cromatográficos, empleados para el análisis de los AE. Con los datos obtenidos, se construyeron las curvas de calibración (Áreas vs. Concentración) para cada uno de los metabolitos secundarios de interés. Las curvas se ajustaron por regresión lineal teniendo en cuenta que la respuesta del detector en el rango de concentraciones preparadas fuera lineal. Finalmente, se calcularon las concentraciones de los metabolitos presentes en los AE con base en las curvas de calibración de las sustancias de referencia certificadas. Estas concentraciones se expresaron en miligramos (mg) de compuesto por mililitro (mL) de AE (Véase **Tabla 30**).

Entre los componentes cuantificados en las 4 especies bajo estudio se encuentran el α -pineno, canfeno, γ -terpineno, 1,8-cineol, linalol, *p*-cimeno, limoneno, alcanfor, borneol, citral, timol, carvacrol, *trans*- β -cariofileno y α -humuleno.

5.7.4 Caracterización química de los extractos obtenidos por SFE. El análisis de composición química de la fracción volátil de los extractos SFE se realizó por GC-FID. En la **Figura 40** se presentan algunos perfiles cromatográficos típicos de los metabolitos secundarios aislados por SFE de las especies *T. vulgaris* y *S. officinalis*. En las **Tablas 31-34** se registran los compuestos identificados y sus cantidades relativas (%; n=3). Se detectaron entre 8 y 25 sustancias en concentraciones relativas >0.2%, de las cuales se identificaron positivamente el 71-96%. La identificación se realizó teniendo en cuenta los mismos criterios cromatográficos y espectroscópicos que se usaron para el análisis de los AE (Véase **Numeral 5.7.2**).

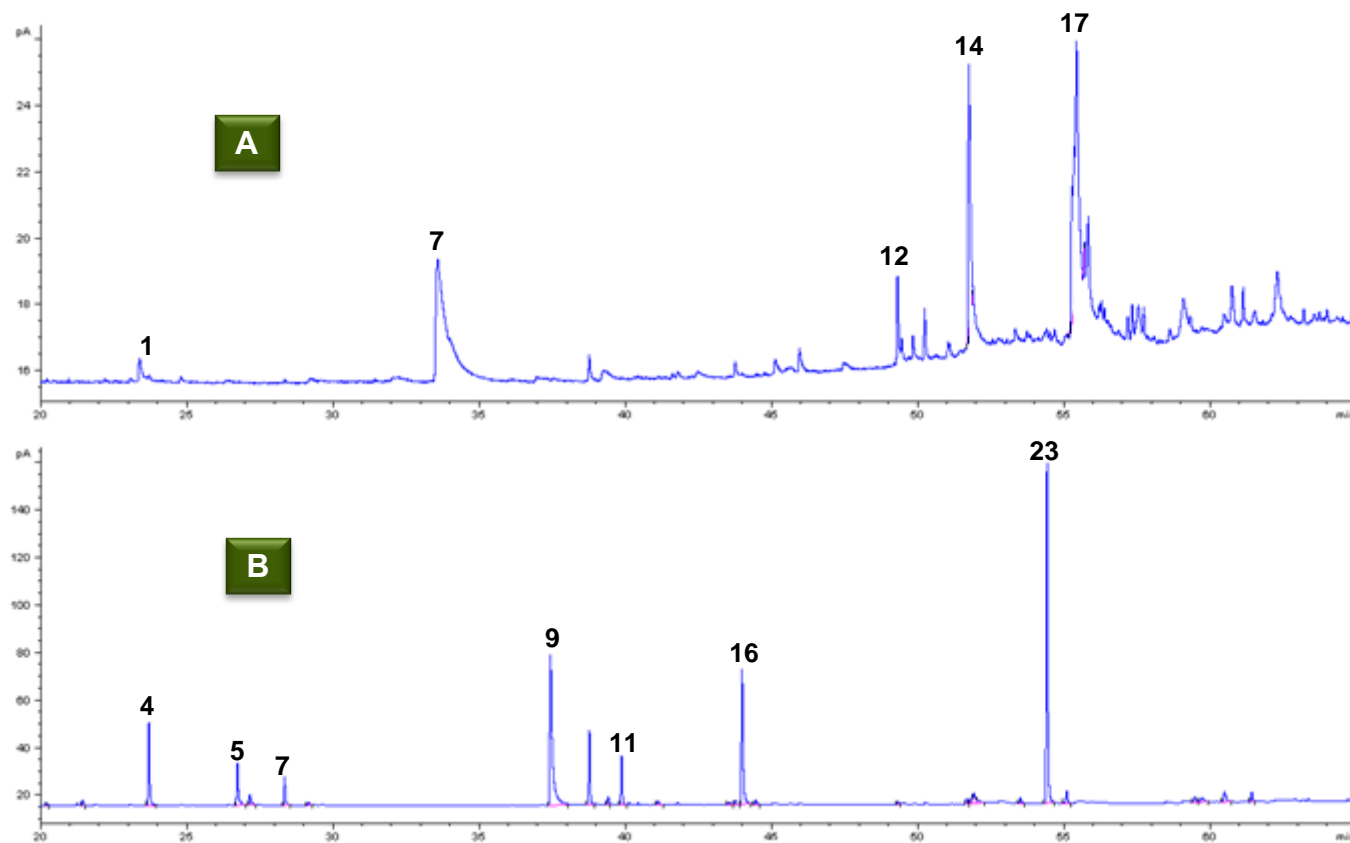
Tabla 30. Cuantificación por GC-FID de los componentes principales en los AE aislados de las plantas bajo estudio.

ESPECIE	CÓDIGO AE	mg sustancia/mL AE (\pm s, n=3)					
		<i>p</i> -Cimeno	γ -Terpineno	Linalol	Timol	Carvacrol	<i>trans</i> - β -Cariofileno
<i>T. vulgaris</i>	TV-I	233.4 \pm 0.9	68.2 \pm 0.3	32.5 \pm 0.2	465 \pm 3	27.5 \pm 0.1	49.1 \pm 0.3
	TV-II	156 \pm 3	167 \pm 4	24.6 \pm 0.5	449 \pm 2	27.5 \pm 0.1	31.9 \pm 0.2
	TV-III	149.6 \pm 0.3	179.1 \pm 0.4	26.22 \pm 0.05	440 \pm 2	26.2 \pm 0.1	24.4 \pm 0.1
	TV-IV	264 \pm 3	65.8 \pm 0.7	27.6 \pm 0.3	309 \pm 2	24.2 \pm 0.2	30.0 \pm 0.2
	TV-V	201 \pm 7	67 \pm 1	21.1 \pm 0.3	439 \pm 7	25.6 \pm 0.3	28.9 \pm 0.7
	TV-VI	113 \pm 2	79 \pm 1	20.8 \pm 0.3	344 \pm 6	19.3 \pm 0.2	41.6 \pm 0.7
	TV-VII	212 \pm 1	68.2 \pm 0.3	29.3 \pm 0.2	338 \pm 2	22.12 \pm 0.02	22.7 \pm 0.1
	TV-VIII	271 \pm 8	58.4 \pm 0.2	32.5 \pm 0.1	259 \pm 5	21.69 \pm 0.01	18.80 \pm 0.03
	TV-IX	201.3 \pm 0.6	72.3 \pm 0.6	32.4 \pm 0.1	301 \pm 1	21.60 \pm 0.01	22.52 \pm 0.06
	TV-X	156 \pm 5	79.5 \pm 0.2	28.27 \pm 0.01	384 \pm 6	26.27 \pm 0.01	30.02 \pm 0.02
	TV-XI	136.4 \pm 0.9	99.7 \pm 0.5	27.07 \pm 0.04	388 \pm 10	25.5 \pm 0.5	26.35 \pm 0.02
	TV-XII	132.0 \pm 0.1	110.92 \pm 0.07	28.1 \pm 0.4	443 \pm 5	25.7 \pm 0.3	25.60 \pm 0.01
	TV-XIII	111.9 \pm 0.6	78.6 \pm 0.4	31.50 \pm 0.08	461 \pm 2	26.34 \pm 0.01	26.79 \pm 0.01
	TV-XIV	117.65 \pm 0.01	101.00 \pm 0.01	26.99 \pm 0.01	425 \pm 1	23.29 \pm 0.01	27.67 \pm 0.02
	TV-XV	115.2 \pm 0.6	104.04 \pm 0.07	27.94 \pm 0.01	456 \pm 1	24.58 \pm 0.01	42.47 \pm 0.01
	TV-XVI	93.7 \pm 0.2	96.9 \pm 0.2	24.64 \pm 0.07	450.3 \pm 0.1	23.69 \pm 0.01	40.64 \pm 0.01
	TV-XVII	91.57 \pm 0.06	104.54 \pm 0.01	26.30 \pm 0.01	478.2 \pm 0.3	24.65 \pm 0.01	41.71 \pm 0.02
	TV-XVIII	274 \pm 1	161.2 \pm 0.4	37.72 \pm 0.02	133.5 \pm 0.1	11.78 \pm 0.01	40.95 \pm 0.01
	TV-XIX	293.6 \pm 0.9	151.9 \pm 0.3	37.22 \pm 0.01	130.7 \pm 0.1	11.64 \pm 0.01	41.0 \pm 0.3
	TV-XX	148.54 \pm 0.01	179.67 \pm 0.01	25.07 \pm 0.01	258.5 \pm 0.1	15.17 \pm 0.01	51.88 \pm 0.01

Tabla 30. Continuación.

ESPECIE	CÓDIGO AE	mg sustancia/mL AE (\pm s, n=3)					
		α -Pinoeno	Canfeno	1,8-Cineol	Alcanfor	Borneol	<i>trans</i> - β -Cariofileno
<i>R. officinalis</i>	RO-I	290.39 \pm 0.01	42.13 \pm 0.01	219.83 \pm 0.01	23.82 \pm 0.01	31.95 \pm 0.01	27.25 \pm 0.02
	RO-II	156.05 \pm 0.01	104.92 \pm 0.01	208.88 \pm 0.02	160.44 \pm 0.01	39.39 \pm 0.02	67.44 \pm 0.01
	RO-III	177.77 \pm 0.01	105.66 \pm 0.01	218.91 \pm 0.02	162.07 \pm 0.02	36.91 \pm 0.01	31.80 \pm 0.01
	RO-IV	152.95 \pm 0.01	70.50 \pm 0.02	236.32 \pm 0.01	163.97 \pm 0.01	46.03 \pm 0.01	55.08 \pm 0.01
	RO-V	165.00 \pm 0.01	96.00 \pm 0.01	208.67 \pm 0.01	148.10 \pm 0.01	43.27 \pm 0.02	79.07 \pm 0.02
	RO-VI	252.2 \pm 0.2	89.36 \pm 0.07	228.2 \pm 0.4	79.8 \pm 0.1	24.25 \pm 0.05	57.8 \pm 0.1
	RO-VII	239.9 \pm 0.4	107.4 \pm 0.2	298.8 \pm 0.6	97.1 \pm 0.2	15.55 \pm 0.03	34.08 \pm 0.04
	RO-VIII	198.06 \pm 0.01	104.64 \pm 0.05	254.77 \pm 0.01	117.83 \pm 0.01	21.07 \pm 0.01	46.98 \pm 0.01
	RO-IX	220.19 \pm 0.01	114.03 \pm 0.01	253.18 \pm 0.01	129.38 \pm 0.01	20.23 \pm 0.01	61.17 \pm 0.01
ESPECIE	CÓDIGO AE	mg sustancia/mL AE (\pm s, n=3)					
		α -Pinoeno	Canfeno	1,8-Cineol	Alcanfor	<i>trans</i> - β -Cariofileno	α -Humuleno
<i>S. officinalis</i>	SO-I	11.63 \pm 0.01	8.60 \pm 0.01	214.46 \pm 0.02	39.40 \pm 0.01	99.82 \pm 0.03	58.40 \pm 0.01
	SO-II	16.42 \pm 0.01	10.59 \pm 0.01	238.05 \pm 0.01	51.61 \pm 0.02	79.23 \pm 0.01	38.86 \pm 0.01
ESPECIE	CÓDIGO AE	mg sustancia/mL AE (\pm s, n=3)					
		α -Pinoeno	Limoneno	Linalol	Alcanfor	Citral	<i>trans</i> - β -Cariofileno
<i>L. citriodora</i>	LC-I	2.57 \pm 0.01	74.22 \pm 0.01	6.51 \pm 0.01	36.00 \pm 0.02	283.03 \pm 0.02	86.08 \pm 0.01

Figura 40. Cromatogramas típicos de extractos obtenidos por SFE de: **A.** *T. vulgaris* y **B.** *S. officinalis*. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, FID. Véanse las **Tablas 30-33**, donde aparece la identificación de los picos.



En los extractos SFE de *T. vulgaris*, analizados por GC-FID se identificaron timol (18.2-31-4%), ácido *n*-hexadecanoico (6-7-22-2%) y *cis,cis*-9,12-ácido octadecanoico(14.4-27-4%), como componentes mayoritarios. Los extractos SFE-TV-V y SFE-TV-VI presentaron mayor proporción de compuestos volátiles como canfeno, linalol, terpinen-4-ol, éter metílico de timol y timoquinona. Además, se identificaron compuestos de mayor peso molecular más alto como olean-12-en-3-ona- β -amirenona (1.6-5%), 14-serrateno-3,21-diol (1.9-5-1%) y 4-stigmasten-3-ona (3.3-9-7%) (Véanse **Tablas 31** y **32**).

El extracto SFE-TV-V obtuvo el mayor contenido de compuestos volátiles (20.3 %), como *p*-cimeno, canfeno, linalol, terpinen-4-ol, éter metílico de timol y timoquinona. Este extracto se aisló empleando los parámetros presión (50 MPa), temperatura (353 K) y tiempo estático (20 min) en sus niveles más altos, y el flujo (20 g/min) y tiempo dinámico (30 min) fueron en los niveles más bajos. Cuando se aumenta el flujo a 60 g/min (SFE-TV-VII), no se detectan estos compuestos volátiles, pero si se incrementa la proporción de componentes de mayor peso molecular como los ácidos *n*-hexadecanoico y *cis-cis*-9,12-octadecanoico.

A diferencia de los AE, en los extractos SFE de *T. vulgaris* se detectaron compuestos de mayor peso molecular, entre ellos los ácidos *n*-hexadecanoico y *cis-cis*-9,12-octadecanoico, y el fitoesterol 4-stigmasten-3-ona, que ha sido identificada en otras especies vegetales, por ejemplo, *Ornithogalum cuspidatum* Bertol [126].

La composición de los extractos SFE de *S. officinalis* fue similar a la de los AE analizados (Véase **Numeral 5.7.4**), pero los componentes se encontraron en diferente proporción que en los aceites. Manol (32.9-47.6%), viridiflorol (16.0-22-1%), 1,8-cineol (3.7-11.1%), α -tujona (0-6.7%) y *trans*- β -cariofileno (3.1-9-1%) (Véase **Tablas 33** y **34**), se identificaron como componentes mayoritarios. El viridiflorol y el manol constituyen entre 48.9 y 69.0% de la porción volatilizable del extracto obtenido por SFE y analizado por GC-FID. El manol es un

diterpeno oxigenado que ha sido encontrado en cantidades entre el 0.1 y 14.7% en el AE de *S. officinalis*. Este diterpeno es similar al esclareol (encontrado en la especie *S. sclarea*), y es importante precursor químico del ambrox, un compuesto sintético con propiedades similares a las del ámbar gris [127]. El ámbar gris es una secreción biliar de los intestinos del cachalote, usado en la elaboración de perfumes y para fines medicinales y saborizantes. Debido a que es difícil lograr un suministro constante de ámbar gris de alta calidad, la industria perfumística ha buscado sustituirlo por sustancias derivadas del manol y esclareol, ya que la demanda del ámbar gris es constante, alta y su precio es elevado.

Tabla 31. Composición química de los extractos obtenidos por SFE de *T. vulgaris*.

Nº Pico	Compuesto	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)					
		DB-5	SFE-TV-I	SFE-TV-II	SFE-TV-III	SFE-TV-IV	SFE-TV-V	SFE-TV-VI	
1	<i>p</i>-Cimeno	1031	N.D.	8.55 \pm 0.03	N.D.	N.D.	13.72 \pm 0.05	9.25 \pm 0.03	
2	Canfeno	1066	N.D.	0.90 \pm 0.01	N.D.	N.D.	1.19 \pm 0.02	0.814 \pm 0.009	
3	Linalol	1101	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.79 \pm 0.01	0.87 \pm 0.02	
4	Terpinen-4-ol	1187	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.721 \pm 0.002	N.D.	
5	Éter metílico de timol	1238	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.550 \pm 0.01	N.D.	
6	Timoquinona	1256	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.31 \pm 0.01	N.D.	
7	Timol	1293	20.15 \pm 0.02	29.45 \pm 0.06	4.90 \pm 0.03	19.07 \pm 0.06	21.9 \pm 0.1	25.98 \pm 0.07	
8	Carvacrol	1304	N.D.	7.72 \pm 0.05	N.D.	3.58 \pm 0.04	5.99 \pm 0.02	5.636 \pm 0.004	
9	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1443	N.D.	1.27 \pm 0.03	N.D.	N.D.	2.305 \pm 0.004	1.19 \pm 0.01	
10	β -Copaeno	1456	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.683 \pm 0.005	N.D.	
11	Óxido de cariofileno	1610	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.38 \pm 0.02	N.D.	
12	Neofitadieno	1843	2.61 \pm 0.01	2.36 \pm 0.04	2.21 \pm 0.01	1.88 \pm 0.02	1.07 \pm 0.01	1.07 \pm 0.01	
13	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	1886	1.48 \pm 0.03	1.43 \pm 0.02	1.15 \pm 0.02	0.99 \pm 0.01	0.55 \pm 0.01	N.D.	
14	Ácido <i>n</i>-hexadecanoico	1960	15.80 \pm 0.07	16.37 \pm 0.05	22.20 \pm 0.02	20.76 \pm 0.08	6.66 \pm 0.09	12.05 \pm 0.01	
15	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	2135	4.42 \pm 0.02	3.00 \pm 0.02	8.33 \pm 0.03	5.27 \pm 0.03	2.44 \pm 0.03	3.56 \pm 0.01	
16	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	2139	6.11 \pm 0.02	3.72 \pm 0.06	7.05 \pm 0.02	5.23 \pm 0.02	2.59 \pm 0.05	3.30 \pm 0.03	
17	<i>cis,cis</i>-9,12-Ácido octadecanoico	2143	21.96 \pm 0.03	16.67 \pm 0.06	27.44 \pm 0.04	21.1 \pm 0.1	11.92 \pm 0.06	14.4 \pm 0.2	
18	C ₁₈ H ₃₄ O ₂ .	2161	9.69 \pm 0.01	6.33 \pm 0.04	8.89 \pm 0.02	7.77 \pm 0.03	5.17 \pm 0.02	5.74 \pm 0.07	
19	Olean-12-en-3-ona- β -amirenona	2236	2.88 \pm 0.02	N.D.	4.98 \pm 0.04	3.71 \pm 0.06	2.62 \pm 0.01	2.58 \pm 0.01	
20	14-Serrateno-3,21-diol	2380	3.04 \pm 0.01	2.24 \pm 0.02	3.15 \pm 0.01	3.16 \pm 0.05	1.89 \pm 0.01	2.26 \pm 0.04	
21	C ₂₁ H ₂₀ O ₆ .	2456	5.29 \pm 0.07	N.D.	4.05 \pm 0.01	4.16 \pm 0.03	2.59 \pm 0.03	6.99 \pm 0.03	
22	4-Stigmasten-3-ona	3237	6.56 \pm 0.05	N.D.	5.64 \pm 0.03	3.27 \pm 0.03	N.D.	4.31 \pm 0.04	

N.I.: No identificado, N.D.: No detectado.

Tabla 32. Composición química de los extractos obtenidos por SFE de *T. vulgaris*.

Nº Pico	Compuesto	Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)					
		IR	DB-5	SFE-TV-VII	SFE-TV-VIII	SFE-TV-IX	SFE-TV-X
1	<i>p</i>-Cimeno	1031	N.D.	9.61 \pm 0.03	1.78 \pm 0.03	4.73 \pm 0.01	1.36 \pm 0.01
2	Canfeno	1066	N.D.	0.87 \pm 0.02	N.D.	N.D.	N.D.
3	Linalol	1101	N.D.	N.D.	N.D.	5.03 \pm 0.01	N.D.
4	Terpinen-4-ol	1187	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	Éter metílico de timol	1238	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	Timoquinona	1256	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7	Timol	1293	19.91 \pm 0.06	26.39 \pm 0.01	31.44 \pm 0.02	26.22 \pm 0.01	18.21 \pm 0.02
8	Carvacrol	1304	4.61 \pm 0.03	6.62 \pm 0.02	8.55 \pm 0.02	5.37 \pm 0.02	4.44 \pm 0.03
9	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1443	N.D.	1.190 \pm 0.008	1.78 \pm 0.01	1.32 \pm 0.03	N.D.
10	β -Copaeno	1456	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	Óxido de cariofileno	1610	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12	Neofitadieno	1843	1.78 \pm 0.03	1.96 \pm 0.02	2.24 \pm 0.04	1.28 \pm 0.02	2.45 \pm 0.01
13	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	1886	0.86 \pm 0.02	1.06 \pm 0.01	1.17 \pm 0.03	0.63 \pm 0.02	N.D.
14	Ácido <i>n</i>-hexadecanoico	1960	18.38 \pm 0.05	13.31 \pm 0.02	13.58 \pm 0.04	14.47 \pm 0.02	13.81 \pm 0.01
15	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	2135	4.59 \pm 0.04	3.093 \pm 0.006	2.45 \pm 0.01	3.85 \pm 0.01	3.71 \pm 0.03
16	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	2139	4.83 \pm 0.08	3.94 \pm 0.01	4.47 \pm 0.02	3.71 \pm 0.03	3.64 \pm 0.01
17	<i>cis,cis</i>-9,12-Ácido octadecanoico	2143	20.25 \pm 0.02	19.09 \pm 0.04	16.45 \pm 0.02	14.83 \pm 0.06	17.41 \pm 0.01
18	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	2161	7.56 \pm 0.07	6.17 \pm 0.01	7.56 \pm 0.02	6.01 \pm 0.01	6.78 \pm 0.02
19	Olean-12-en-3-ona- β -amirenona	2236	3.62 \pm 0.09	1.65 \pm 0.02	N.D.	2.71 \pm 0.01	3.68 \pm 0.01
20	14-Serrateno-3,21-diol	2380	2.65 \pm 0.07	2.06 \pm 0.02	3.30 \pm 0.02	2.55 \pm 0.01	5.05 \pm 0.02
21	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	2456	4.71 \pm 0.05	3.00 \pm 0.01	5.24 \pm 0.01	3.71 \pm 0.05	9.81 \pm 0.05
22	4-Stigmasten-3-ona	3237	6.3 \pm 0.1	N.D.	N.D.	3.59 \pm 0.01	9.66 \pm 0.02

N.I.: No identificado, N.D.: No detectado.

Tabla 33. Composición química de los extractos obtenidos por SFE de *S. officinalis*.

Nº Pico	Compuesto	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)					
		DB-5	SFE-SO-I	SFE-SO-II	SFE-SO-III	SFE-SO-IV	SFE-SO-V	SFE-SO-VI	
1	α -Pino	942	0.383 \pm 0.004	N.D.	0.415 \pm 0.005	0.38 \pm 0.01	0.74 \pm 0.01	0.563 \pm 0.005	
2	Canfeno	958	0.236 \pm 0.004	N.D.	0.301 \pm 0.005	N.D.	0.466 \pm 0.005	0.387 \pm 0.005	
3	β -Pino	984	0.574 \pm 0.002	0.60 \pm 0.01	0.51 \pm 0.01	N.D.	0.943 \pm 0.003	0.66 \pm 0.01	
4	1,8-Cineol	1039	8.54 \pm 0.01	10.95 \pm 0.02	8.316 \pm 0.004	6.502 \pm 0.003	10.26 \pm 0.02	8.92 \pm 0.06	
5	α-Tujona	1113	5.49 \pm 0.01	6.68 \pm 0.01	4.91 \pm 0.01	3.90 \pm 0.01	5.478 \pm 0.004	4.64 \pm 0.04	
6	β -Tujona	1125	1.55 \pm 0.02	1.98 \pm 0.02	1.76 \pm 0.01	0.93 \pm 0.01	1.654 \pm 0.006	1.44 \pm 0.01	
7	Alcanfor	1157	3.242 \pm 0.005	3.92 \pm 0.04	3.728 \pm 0.005	3.03 \pm 0.01	3.11 \pm 0.01	3.42 \pm 0.03	
8	Borneol	1178	0.495 \pm 0.004	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
9	<i>trans</i>-β-Cariofileno	1442	7.55 \pm 0.01	9.136 \pm 0.006	7.90 \pm 0.01	7.984 \pm 0.008	7.805 \pm 0.007	7.03 \pm 0.05	
10	<i>cis</i> -Eudesma-6,11-dieno	1462	0.830 \pm 0.005	1.42 \pm 0.02	1.001 \pm 0.005	1.05 \pm 0.01	1.26 \pm 0.02	0.960 \pm 0.001	
11	α -Humuleno	1476	5.05 \pm 0.01	6.51 \pm 0.02	5.67 \pm 0.01	5.758 \pm 0.007	5.375 \pm 0.006	5.16 \pm 0.04	
12	δ -Cadineno	1516	0.631 \pm 0.004	0.981 \pm 0.008	0.97 \pm 0.01	0.97 \pm 0.01	0.798 \pm 0.003	0.90 \pm 0.01	
13	C ₁₅ H ₂₄ O	1541	0.375 \pm 0.004	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
14	Espatuleno	1601	0.405 \pm 0.004	N.D.	N.D.	N.D.	0.449 \pm 0.005	N.D.	
15	Óxido de cariofileno	1610	0.60 \pm 0.01	N.D.	0.621 \pm 0.006	0.636 \pm 0.004	0.516 \pm 0.004	0.604 \pm 0.005	
16	Viridiflorol	1620	17.92 \pm 0.02	16.02 \pm 0.01	17.96 \pm 0.01	18.96 \pm 0.01	17.39 \pm 0.01	17.1 \pm 0.1	
17	Epóxido de humuleno II	1638	0.651 \pm 0.004	N.D.	0.754 \pm 0.005	0.750 \pm 0.006	0.563 \pm 0.005	0.70 \pm 0.01	
18	6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	1844	0.438 \pm 0.004	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
19	Esclareno	1957	0.50 \pm 0.01	N.D.	0.488 \pm 0.005	0.51 \pm 0.01	0.466 \pm 0.003	0.473 \pm 0.003	
20	<i>n</i> -Ácido hexadecanoico	1964	0.733 \pm 0.005	2.69 \pm 0.01	1.58 \pm 0.01	3.189 \pm 0.005	2.106 \pm 0.003	2.53 \pm 0.02	
21	Hexadecanoato de etilo	1968	2.17 \pm 0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
22	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1975	1.42 \pm 0.01	N.D.	0.833 \pm 0.005	1.10 \pm 0.01	1.035 \pm 0.002	1.333 \pm 0.003	
23	Manol	2094	36.59 \pm 0.02	32.93 \pm 0.03	37.32 \pm 0.01	38.79 \pm 0.02	35.68 \pm 0.01	36.3 \pm 0.3	
24	<i>trans</i> -Ferruginol	2368	2.165 \pm 0.003	2.09 \pm 0.03	3.436 \pm 0.004	3.71 \pm 0.01	2.229 \pm 0.004	4.10 \pm 0.03	
25	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	2413	1.457 \pm 0.004	3.47 \pm 0.01	1.536 \pm 0.006	1.922 \pm 0.006	1.67 \pm 0.01	2.73 \pm 0.01	

N.D.: No detectado.

Tabla 34. Composición química de los extractos obtenidos por SFE de *S. officinalis*.

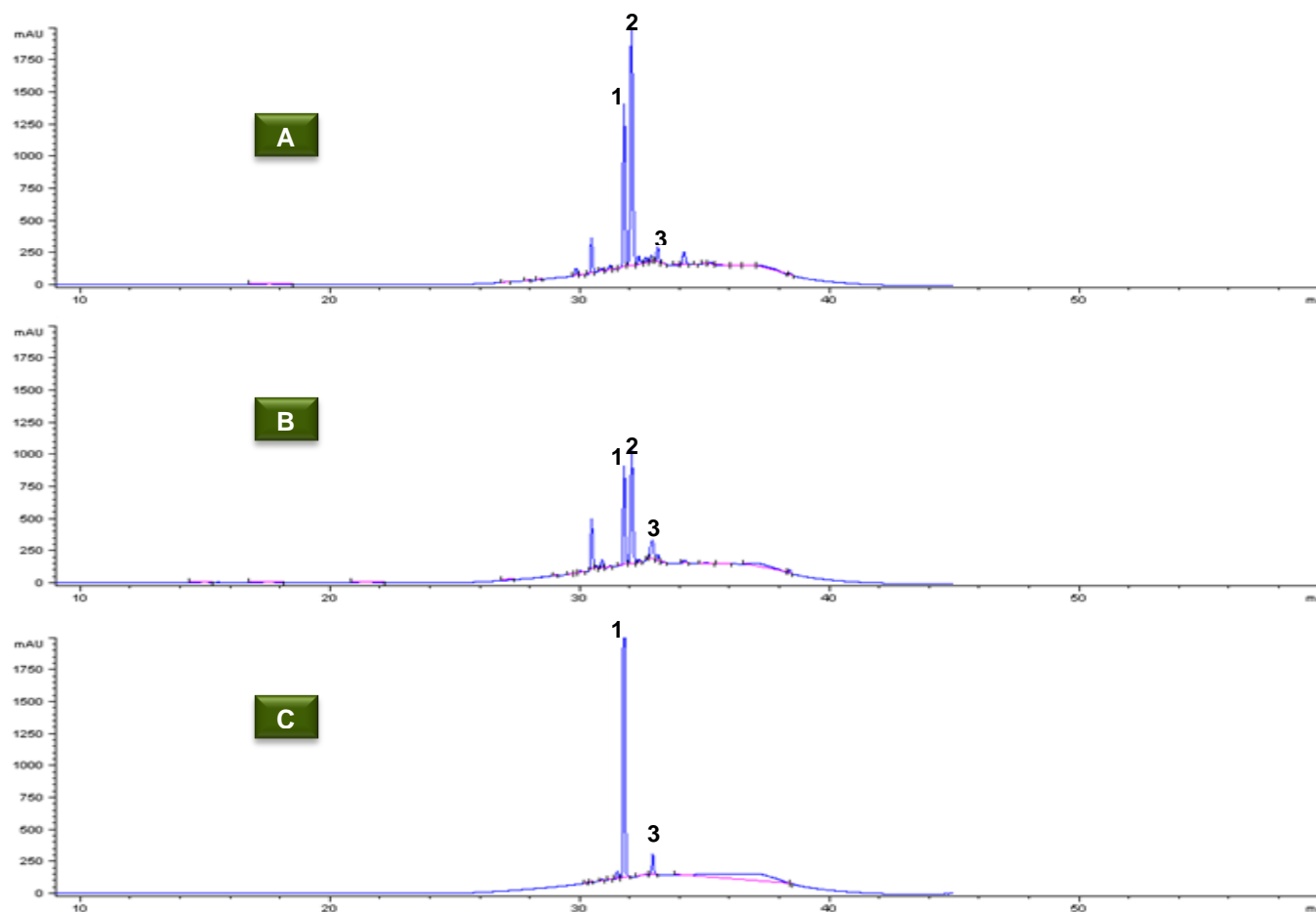
Nº Pico	Compuesto	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)					
		DB-5	SFE-SO-VII	SFE-SO-VIII	SFE-SO-IX	SFE-SO-X	SFE-SO-XI	SFE-SO-XII	
1	α -Pinoeno	942	N.D.	0.466 \pm 0.008	0.49 \pm 0.01	N.D.	0.630 \pm 0.008	0.79 \pm 0.01	
2	Canfeno	958	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
3	β -Pinoeno	984	N.D.	0.614 \pm 0.008	0.70 \pm 0.01	N.D.	0.763 \pm 0.005	0.93 \pm 0.01	
4	1,8-Cineol	1039	6.17 \pm 0.01	8.35 \pm 0.01	9.56 \pm 0.02	3.74 \pm 0.05	9.86 \pm 0.01	11.11 \pm 0.02	
5	α-Tujona	1113	2.81 \pm 0.01	3.749 \pm 0.007	5.14 \pm 0.04	N.D.	4.76 \pm 0.02	4.65 \pm 0.02	
6	β -Tujona	1125	N.D.	0.981 \pm 0.008	1.289 \pm 0.008	N.D.	1.201 \pm 0.009	N.D.	
7	Alcanfor	1157	2.01 \pm 0.01	2.79 \pm 0.01	3.49 \pm 0.02	N.D.	3.20 \pm 0.03	3.23 \pm 0.01	
8	Borneol	1178	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
9	<i>trans</i>-β-Cariofileno	1442	5.39 \pm 0.02	6.62 \pm 0.02	7.99 \pm 0.02	3.07 \pm 0.02	7.95 \pm 0.01	8.11 \pm 0.03	
10	<i>cis</i> -Eudesma-6,11-dieno	1462	1.15 \pm 0.01	1.048 \pm 0.004	1.21 \pm 0.01	N.D.	1.231 \pm 0.008	1.48 \pm 0.01	
11	α -Humuleno	1476	3.79 \pm 0.02	4.63 \pm 0.01	5.63 \pm 0.01	2.08 \pm 0.02	5.705 \pm 0.006	5.730 \pm 0.009	
12	δ -Cadineno	1516	N.D.	0.979 \pm 0.007	N.D.	N.D.	1.04 \pm 0.01	N.D.	
13	C ₁₅ H ₂₄ O	1541	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
14	Espatulenol	1601	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
15	Óxido de cariofileno	1610	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
16	Viridiflorol	1620	22.06 \pm 0.02	18.12 \pm 0.02	18.073 \pm 0.002	21.46 \pm 0.04	17.33 \pm 0.02	17.15 \pm 0.03	
17	Epóxido de humuleno II	1638	N.D.	0.522 \pm 0.003	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
18	6,10,14-trimetil-2-Pentadecanona	1844	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
19	Esclareno	1957	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.527 \pm 0.009	N.D.	
20	<i>n</i> -Ácido hexadecanoico	1964	6.05 \pm 0.01	3.39 \pm 0.01	4.098 \pm 0.007	8.42 \pm 0.04	3.908 \pm 0.007	4.01 \pm 0.02	
21	Hexadecanoato de etilo	1968	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
22	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1975	N.D.	2.43 \pm 0.01	N.D.	8.19 \pm 0.02	1.319 \pm 0.008	N.D.	
23	Manol	2094	45.86 \pm 0.02	38.61 \pm 0.02	38.76 \pm 0.03	47.56 \pm 0.06	38.983 \pm 0.001	35.59 \pm 0.03	
24	<i>trans</i> -Ferruginol	2368	N.D.	3.94 \pm 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	2.72 \pm 0.02	
25	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	2413	4.71 \pm 0.01	2.849 \pm 0.007	3.588 \pm 0.009	5.48 \pm 0.02	3.59 \pm 0.02	4.51 \pm 0.01	

N.D.: No detectado.

Además de la caracterización química de los extractos SFE obtenidos por GC-MS y GC-FID, se realizó su análisis por cromatografía líquida (LC) acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD), se monitorearon 11 compuestos fenólicos, a saber: apigenina, luteolina, quercetina, naringenina, kaempferol, pinocembrina y los ácidos carnósico, rosmarínico, *p*-cumárico, caféico y ursólico. Este análisis se realizó empleando la metodología desarrollada por Mónica Cala, quien implementó dos métodos para el análisis de compuestos fenólicos en plantas aromáticas del género *Lippia*. Para los extractos SFE de *T. vulgaris* no se identificó ninguno de los componentes mencionados anteriormente. Sin embargo, en los extractos de *S. officinalis* se detectaron (Véase **Figura 41**) y cuantificaron los ácidos carnósico y ursólico.

Teniendo en cuenta los resultados publicados por Santos-Gomes y colaboradores [128] sobre la composición química de extractos obtenidos con solvente (acetona), se puede suponer que el pico cromatográfico **2** (No identificado) que aparece después del ácido carnósico, posiblemente es el carnosato de metilo (Veáse **Figura 41**). En el análisis por LC de extractos SFE de salvia, realizado por Ivanović y colaboradores [129], se observa que el carnosato de metilo se detecta 1.2 min después del ácido carnósico, tal como aparece en los cromatogramas de los extractos analizados en esta investigación. Sin embargo, es necesario realizar la confirmación con el patrón certificado de carnosato de metilo analizado bajo las mismas condiciones cromatográficas que los extractos o emplear la técnica LC-MS.

Figura 41. Perfil cromatográfico de: **A.** Extracto SFE-SO-XII, **B.** Extracto etanólico de *S. officinalis* y **C.** Patrones certificados de los ácidos carnósico y ursólico, obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18; Fase móvil: metanol, 40%: Agua: Ácido o-fosfórico (0.1%), 60%; donde **1-** Ácido carnósico, **2-** No identificado y **3-** Ácido ursólico.



En la **Tabla 35** se presentan las concentraciones (mg sustancia/g extracto) de los ácidos carnósico y ursólico identificados y cuantificados en los extractos SFE y etanólico de *S. officinalis*. El extracto etanólico se obtuvo disolviendo 50 g de material vegetal seco en 850 mL (\times 3 porciones) de etanol absoluto (99.9%), seguido de sonicación durante 1 h. Para los dos analitos identificados, la longitud de onda de máxima absorción fue de 210 nm, por lo tanto, a esta longitud de onda se obtuvo el registro de las áreas cromatográficas. No obstante, a esta longitud de onda, el ácido ursólico presenta menor respuesta ante el detector comparada con la del ácido carnósico, por lo cual, para la cuantificación, se usaron concentraciones de ácido ursólico entre 40 y 500 ppm, que generaron respuestas en el detector entre 123 y 1193 mAU, y para el ácido carnósico se emplearon concentraciones entre 25 y 200 ppm y respuestas entre 1559 y 14025 mAU (Véanse **Anexo 3, Figuras 3.1 y 3.2**). Por esta razón, a pesar de las diferencias en las áreas de los picos cromatográficos, las concentraciones en mg sustancia/g extracto para el ácido ursólico algunas veces fueron mayores que las del ácido carnósico.

La concentración de ácido carnósico más alta se obtuvo para el extracto SFE-SO-XII, con 53 ± 1 mg de sustancia/g extracto, mientras que para el ácido ursólico, en el extracto etanólico se encontró mayor cantidad (297 ± 8 mg de sustancia/g extracto).

En el extracto SFE-SO-X, aislado a 30 MPa y 313 K, se cuantificaron 47 ± 1 mg ácido carnósico/g extracto, seguido del extracto SFE-SO-II, con 46.0 ± 0.6 mg/g de extracto. Mientras que el contenido del ácido ursólico para estos extractos no presentó diferencias significativas, tal como se muestra en la **Tabla 35**. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Ivanovic y colaboradores [129], quienes analizaron el extracto SFE de *S. officinalis*, obtenido a 30 MPa y 313 K y, encontraron ácido carnósico y carnosato de metilo como componentes principales del extracto.

Tabla 35. Áreas (mAU± S, n=2) y concentraciones (mg/g extracto± S, n=2) de los ácidos carnósico y ursólico encontrados en los extractos SFE de *S. officinalis*.

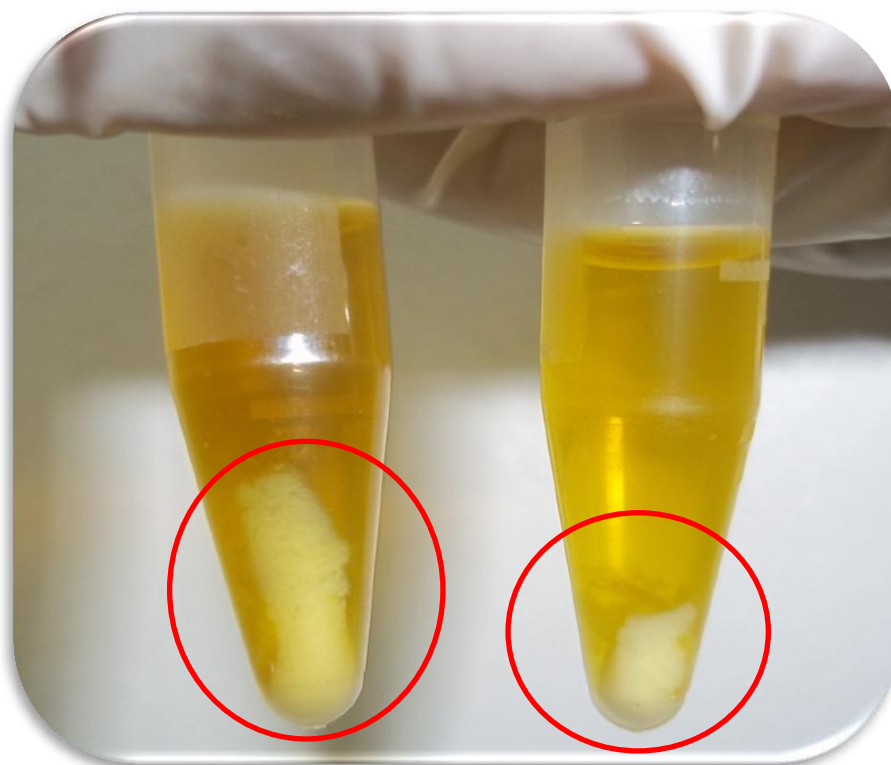
CÓDIGO EXTRACTO	ÁCIDO CARNÓSICO		ÁCIDO URSÓLICO	
	mAU	mg/g extracto	mAU	mg/g extracto
SFE-SO-I	19477 ± 37	16.4 ± 0.3	125 ± 3	46.0 ± 0.6
SFE-SO-II	6204 ± 86	46.0 ± 0.6	176 ± 5	57 ± 1
SFE-SO-III	2513 ± 96	20.4 ± 0.7	206 ± 8	64 ± 2
SFE-SO-IV	3648 ± 63	31 ± 1	171 ± 4	56 ± 1
SFE-SO-V	2318 ± 21	18.9 ± 0.1	163 ± 2	54.1 ± 0.5
SFE-SO-VI	2321 ± 63	19.0 ± 0.4	144 ± 6	50 ± 1
SFE-SO-VII	3900 ± 61	30.1 ± 0.4	190 ± 2	60.4 ± 0.4
SFE-SO-VIII	2257 ± 67	18.6 ± 0.5	143 ± 8	50 ± 2
SFE-SO-IX	4620 ± 52	35.1 ± 0.4	153 ± 4	52 ± 1
SFE-SO-X	6348 ± 101	47 ± 1	175 ± 1	56.9 ± 0.2
SFE-SO-XI	4392 ± 32	33.6 ± 0.2	196 ± 1	61.7 ± 0.2
SFE-SO-XII	7120 ± 90	53 ± 1	244 ± 4	72 ± 1
Extracto en ETOH	4407 ± 81	33 ± 1	1278 ± 36	297 ± 8

Con los parámetros de extracción usados para aislar el extracto SFE-SO-XII, se obtuvieron concentraciones de ácido carnósico mayores que con la con la extracción convencional con solvente. Sin embargo, la cantidad de ácido ursólico fue menor.

5.7.5 Análisis del contenido de ácidos grasos (FA) en los extractos SFE.

Al finalizar el proceso de preparación de los extractos, obtenidos por SFE, que se describe en el **Numeral 4.4**, se obtuvo un precipitado no soluble (Véase **Figura 42**), que se analizó para determinar qué ácidos grasos estaban presentes. Para ello, se utilizaron los extractos obtenidos con los parámetros de extracción SFE en sus niveles más altos, a saber: SFE-TV-XI y SFE-SO-XII.

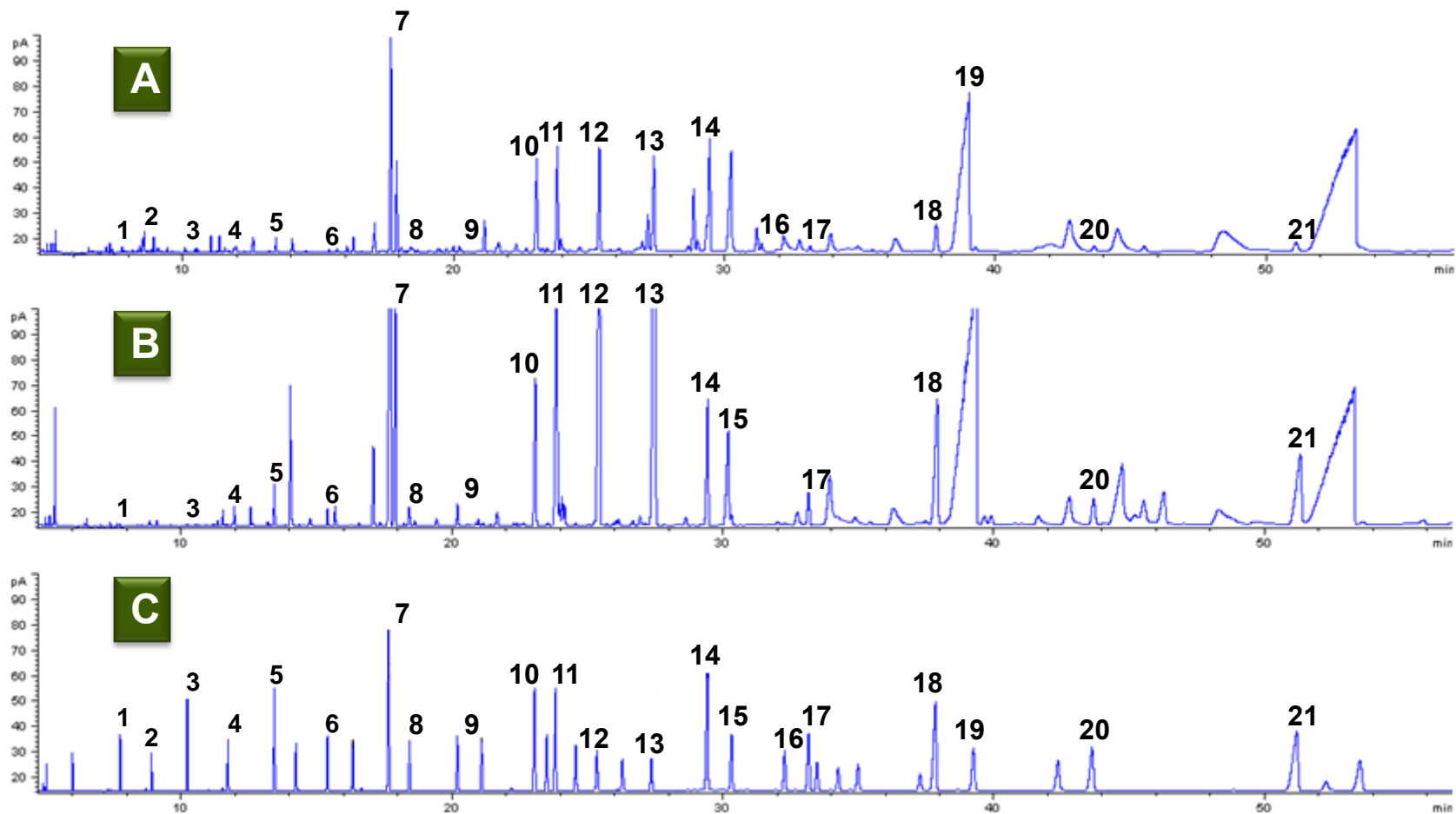
Figura 42. Fotografía del precipitado aislado al finalizar el proceso de preparación de los extractos SFE. Foto: Archivo personal. Lugar: Laboratorio de Cromatografía (UIS). Fecha: 27 de agosto de 2011.



La determinación de los FA se llevó a cabo a través de una extracción con solvente, seguida de su derivatización (Véase **Numeral 4.7.4**). En la **Figura 43** se comparan los perfiles cromatográficos obtenidos para los extractos y la mezcla patrón de los FA.

En la **Tabla 36**, se muestran las cantidades relativas (%) de los FA presentes en los extractos SFE-TV-XI (*T. vulgaris*) y SFE-SO-XII (*S. officinalis*). El ácido palmítico (C16:0; 3.39%) fue el principal ácido graso en el extracto SFE de *T. vulgaris*, seguido de los ácidos linolénico (C18:3n3; 2.30%), linoléico (C18:2n6c; 2.08%), esteárico (C18:0; 2.08%) y oleico (C18:1n9c; 2.05%). En el extracto SFE de *S. officinalis* se encontraron los ácidos linolénico (C18:3n3; 10.12%), palmítico (C16:0; 6.58%), linoléico (C18:2n6c; 6.27%), oleico (C18:1n9c; 3.98%) y lignocérico (C24:1; 2.65%), como compuestos mayoritarios.

Figura 43. Perfiles cromatográficos de los FA presentes en: **A.** Extracto SFE-TV-XI, **B.** Extracto SFE-SO-XII y **C.** Mezcla patrón de ácidos grasos. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, FID. Véase la **Tabla 37**, para la identificación de los picos.



En general, se encontraron los mismos FA, pero en diferentes proporciones, en ambos extractos SFE. El precipitado del extracto de *S. officinalis* contiene un 37.76% de los FA, mientras que el de *T. vulgaris*, un 17.15%, por lo que se puede concluir, que bajo los mismos parámetros de extracción (Véase **Tabla 21, SFE-TV-XI y SFE-SO-XII**), para *S. officinalis* se obtuvo una cantidad más alta de FA.

Tabla 36. Cantidad relativa (%) de los FA presentes en los extractos, obtenidos por SFE, de las especies *T. vulgaris* y *S. officinalis*.

Nº Pico	Compuesto	Cantidad relativa, %	
		<i>T. vulgaris</i>	<i>S. officinalis</i>
1	Ácido cáprico	0.07	0.01
2	Ácido undecanoico	0.15	N.D.
3	Ácido laúrico	0.01	0.01
4	Ácido tridecanoico	0.02	0.01
5	Ácido mirístico	0.17	0.26
6	Ácido pentadecanoico	0.04	0.12
7	Ácido palmítico	3.39	6.58
8	Ácido palmitoleico	0.12	0.20
9	Ácido heptadecanoico	0.13	0.20
10	Ácido esteárico	2.08	1.70
11	Ácido oleico	2.05	3.98
12	Ácido linoléico	2.08	6.27
13	Ácido linolénico	2.30	10.12
14	Ácido araquídico	2.62	1.54
15	Ácido eicosenoico	N.D.	0.13
16	Ácido eicosadienoico	N.D.	0.03
17	Ácido heneicosanoico	0.15	0.48
18	Ácido behénico	0.93	2.85
19	Ácido erúcico	0.18	N.D.
20	Ácido tricosanoico	0.19	0.60
21	Ácido lignocérico	0.46	2.65

N.D.: No detectado.

5.8 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA Y EL CONTENIDO DE FENOLES DE LOS AE AISLADOS A PARTIR DE LAS PLANTAS BAJO ESTUDIO

5.8.1 Capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles de los AE y las sustancias de referencia analizadas. La capacidad anti-radicalaria, expresada en equivalentes Trolox[®], medida por los métodos ORAC y TEAC, se determinó para los AE, aislados de las especies *T. vulgaris*, *R. officinalis*, *S. officinalis* y *L. citriodora*, cosechadas en parcelas experimentales en Sucre-Santander. Se evaluó el contenido de fenoles por medio de las técnicas: colorimétrica Folin-Ciocalteu y cromatográficas, cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) y cromatografía de gases con un detector de ionización en llama (FID). Se emplearon patrones de los componentes mayoritarios y compuestos antioxidantes de referencia como BHA, BHT, vitamina E, quercetina y algunos ácidos fenólicos, con fines comparativos. En la **Tabla 37** se reportan los valores de TAC (*Total Antioxidant Capacity*) y el contenido de fenoles, obtenidos para los AE analizados.

En la **Tabla 37**, se observan diferencias en los valores obtenidos de capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles, como consecuencia en las diferentes proporciones de los compuestos presentes en los AE (Véase **Numeral 5.7.2**). El aceite TV-XX de *T. vulgaris* mostró el mayor valor ORAC, seguido de TV-XVII, TV-XVI, TV-XIV y TV-XV, lo cual difiere de lo encontrado por los métodos ABTS⁺⁺ y Folin-Ciocalteu. Por estos métodos, se determinó que los AE con mayor valor de capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles fueron TV-XV, TV-XIII, TV-XVII, TV-XVI y TV-V.

Con base en los valores en mg del timol/mL de AE de *T. vulgaris*, reportados en la **Tabla 30**, se puede observar que, en general, los AE con mayor capacidad anti-radicalaria, medida por los métodos ORAC y ABTS⁺⁺ fueron aquellos que contenían la cantidad de timol más alta. Sin embargo, a pesar que la esencia TV-XX presentó mayor capacidad anti-radicalaria, pero su contenido

de timol, 259 mg/mL AE, no fue de los más altos. Esto permite concluir, que las propiedades antioxidantes de los AE no pueden atribuirse a un solo componente individual, sino que hay que considerar la composición de la mezcla completa.

Entre los AE de *R. officinalis* no se observó tendencia alguna, debido a que los valores más altos, obtenidos por los tres métodos, corresponden a tres esencias diferentes (Véase **Tabla 38**). Por el método ORAC, el AE que presentó mayor capacidad anti-radicalaria fue RO-I, con el ensayo ABTS⁺, RO-III, y con Folin-Ciocalteu, el AE RO-IX. No obstante, los AE destilados por MWHD (RO-I a RO-V) presentaron valores más altos que los aislados por arrastre con vapor.

Tabla 37. Valores de TAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\circledR}/\text{g AE}$) y contenido de fenoles (mg A. gálico/g AE) para los AE, obtenidos por los métodos ORAC, ABTS⁺ y Folin-Ciocalteu ($\pm s$, n=3).

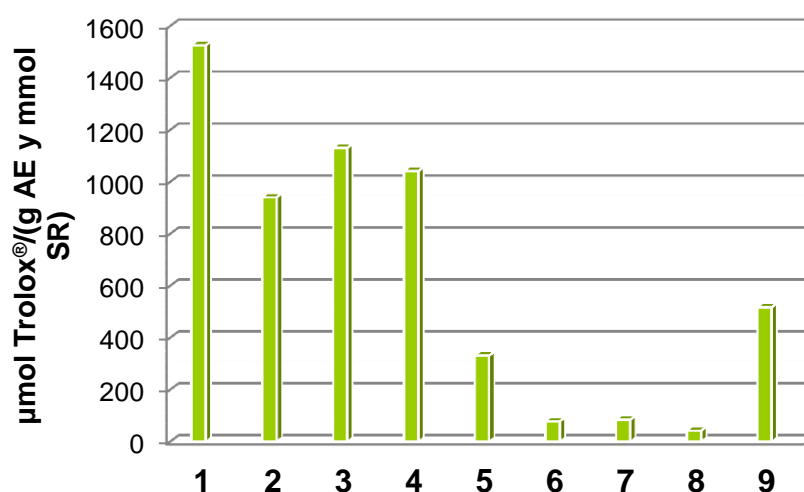
ESPECIE	CÓDIGO	ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\circledR}/\text{g AE}$)	ABTS ⁺ ($\mu\text{mol Trolox}^{\circledR}/\text{g AE}$)	Folin-Ciocalteu (mg A. gálico/g AE)
<i>T. vulgaris</i>	TV-I	2649 \pm 20	2442 \pm 23	181.7 \pm 0.77
	TV-II	2591 \pm 26	2598 \pm 47	203.4 \pm 0.8
	TV-III	2715 \pm 73	2281 \pm 45	209.5 \pm 0.2
	TV-IV	2507 \pm 42	1940 \pm 42	146.3 \pm 0.7
	TV-V	2213 \pm 34	2658 \pm 35	207.6 \pm 0.8
	TV-VI	2363 \pm 64	2273 \pm 33	197.4 \pm 0.6
	TV-VII	2370 \pm 53	2355 \pm 21	199.0 \pm 0.6
	TV-VIII	1549 \pm 61	1554 \pm 19	140 \pm 1
	TV-IX	1950 \pm 43	1402 \pm 31	142 \pm 1
	TV-X	2454 \pm 53	2278 \pm 28	171 \pm 19
	TV-XI	2613 \pm 73	2161 \pm 17	188 \pm 1
	TV-XII	2899 \pm 31	2238 \pm 8	196.3 \pm 0.3
	TV-XIII	3243 \pm 23	2767 \pm 46	215.8 \pm 0.2
	TV-XIV	3314 \pm 48	2625 \pm 17	201.7 \pm 0.6
	TV-XV	3249 \pm 11	2856 \pm 11	210.2 \pm 0.8
	TV-XVI	3630 \pm 72	2688 \pm 13	224.5 \pm 0.3
	TV-XVII	3643 \pm 40	2705 \pm 12	234.0 \pm 0.8
	TV-XVIII	2907 \pm 70	838 \pm 15	66.3 \pm 0.1
	TV-XIX	2958 \pm 76	750 \pm 10	62.0 \pm 0.7
	TV-XX	3656 \pm 65	1477 \pm 52	133.2 \pm 0.6

Tabla 37. Continuación.

ESPECIE	CÓDIGO	ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g AE)	ABTS+• ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g AE)	Folin-Ciocalteu (mg A. gálico/g AE)
<i>R. officinalis</i>	RO-I	1525 \pm 17	15 \pm 1	5.7 \pm 0.2
	RO-II	869 \pm 4	6.9 \pm 0.2	2.47 \pm 0.07
	RO-III	940 \pm 16	18.2 \pm 0.1	3.31 \pm 0.04
	RO-IV	1131 \pm 13	9.7 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1
	RO-V	749 \pm 7	7.6 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1
	RO-VI	1041 \pm 2	3.4 \pm 0.1	2.95 \pm 0.06
	RO-VII	682 \pm 5	2.8 \pm 0.1	2.7 \pm 0.1
	RO-VIII	708 \pm 9	7.3 \pm 0.2	3.68 \pm 0.08
	RO-IX	744 \pm 2	4.42 \pm 0.04	6.2 \pm 0.2
<i>S. officinalis</i>	SO-I	2374 \pm 77	13.8 \pm 0.5	14.2 \pm 0.3
	SO-II	2166 \pm 55	9.2 \pm 0.3	8.36 \pm 0.06
<i>L. citriodora</i>	LC-I	3108 \pm 12	21.0 \pm 0.7	10.30 \pm 0.06

Los AE de *R. officinalis* contiene compuestos no fenólicos como α -pineno, canfeno, 1,8-cineol y alcanfor, en cantidades mayores de 23 mg sustancia/mL AE (Véase **Tabla 30**). En la **Figura 44**, se presenta la capacidad anti-radicalaria de algunos AE de romero y sus compuestos mayoritarios. Allí se observa que los AE tienen mayor capacidad anti-radicalaria que sus componentes individuales, a pesar de que ninguno de ellos contiene grupos hidroxilo en su estructura.

Figura 44. Capacidad anti-radicalaria determinada por el método ORAC de: 1. RO-I, 2. RO-III, 3. RO-IV, 4. RO-VI, 5. Canfeno, 6. 1,8-Cineol, 7. Alcanfor, 8. Borneol y 9. *trans*- β -Cariofileno.



En el caso de los AE de *S. officinalis* obtenidos, se encontraron capacidades anti-radicalarias y contenido de fenoles mayores para el aceite SO-I. Nos obstante, estas diferencias no se pueden atribuir al aumento o disminución de uno o más compuestos de tipo fenólico en los AE, por lo que pueden existir o no efectos aditivos o sinérgicos. Para comprobar esto, es necesario realizar un estudio del efecto de cada componente sobre su actividad antioxidante.

El valor ORAC para el AE de *L. citriodora* fue comparable con el de los AE de *T. vulgaris*, que es una especie que demostró tener propiedades antioxidantes. En cuanto al contenido de fenoles, el valor determinado fue 10.30 ± 0.06 mg A. gálico/ g AE, debido a que el 20.9% del AE de cidrón está constituido por cetonas y aldehídos como 6-metil-5-hepten-2-ona, carvona y geranial, que no reaccionan ni con el reactivo de Folin-Ciocalteu, ni forman iones fenolato en medio básico.

Teniendo en cuenta que los ensayos realizados difieren en términos de sustratos oxidables, métodos de cuantificación, condiciones y mecanismo de reacción es atrevido hacer una comparación directa de los resultados obtenidos en diferentes ensayos. Con base en las reacciones químicas involucradas, los ensayos usados para determinar la capacidad antioxidante se dividen en dos categorías: (1) ensayos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno (**HAT**) y (2) ensayos basados en la transferencia de un electrón (**ET**). Según lo reportado por Ou y colaboradores [41], en el ensayo ORAC los antioxidantes y la fluoresceína reaccionan con los radicales AAPH a través de una transferencia de un átomo de hidrógeno (**HAT**). En los métodos ABTS⁺ y Folin-Ciocalteu los antioxidantes reaccionan a través de una transferencia de un electrón, generando una disminución y un aumento en la coloración, respectivamente.

Se han realizado numerosas publicaciones sobre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles en mezclas de antioxidantes naturales por medio de ensayos que involucren un mecanismo de transferencia de un electrón como

ABTS⁺, FRAP, Folin-Ciocalteu, etc., y se han encontrado excelentes correlaciones lineales. En la **Figura 45** se presenta un gráfico de correlación entre los resultados de capacidad anti-radicalaria por el método ABTS⁺ y el contenido de fenoles empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu de los AE de *T. vulgaris*, donde se observa una correlación de 0.922 entre ambos ensayos.

En general, se observó una buena correlación entre los valores determinados en los ensayos ABTS⁺ y Folin-Ciocalteu para todos los AE bajo estudio (Véase **Figura 46**). Estos resultados indican una relación que existe entre la concentración de los compuestos fenólicos en los AE estudiados y la capacidad anti-radicalaria determinada por el ensayo ABTS⁺. Se puede concluir, que la presencia de compuestos fenólicos en los AE contribuye significativamente a su potencial antioxidante. Algunos compuestos fenólicos comprenden estructuras aromáticas unidas a uno o más grupos hidroxilo, los cuales reaccionan con los radicales libres mediante la formación de radicales fenoxilo estabilizados por resonancia [14]. Dudonné y colaboradores [57] encontraron excelentes correlaciones entre los ensayos DPPH, ABTS, FRAP y Folin-Ciocalteu, después de analizar 30 extractos de plantas.

Figura 45. Correlación entre los resultados obtenidos por los métodos ABTS⁺ y Folin-Ciocalteu para los AE de *T. vulgaris*.

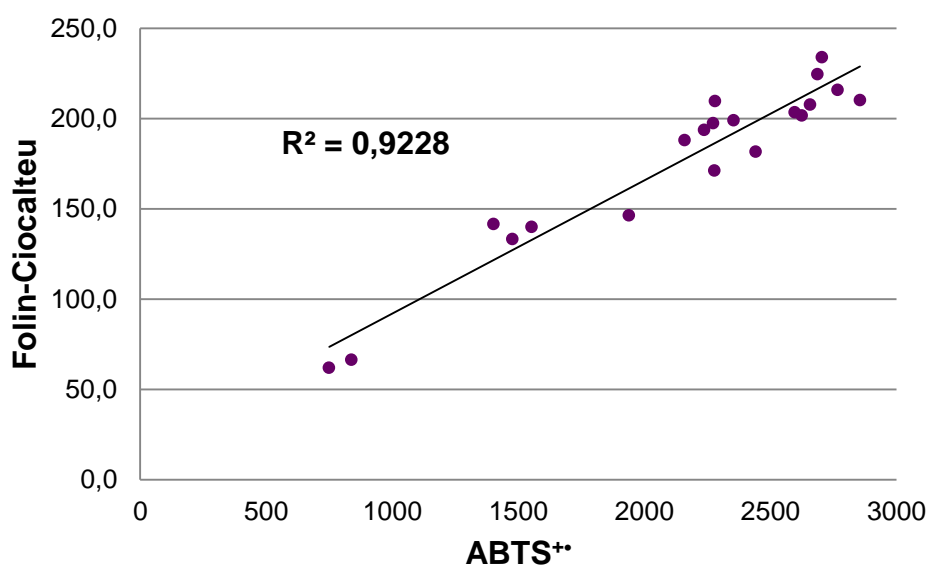
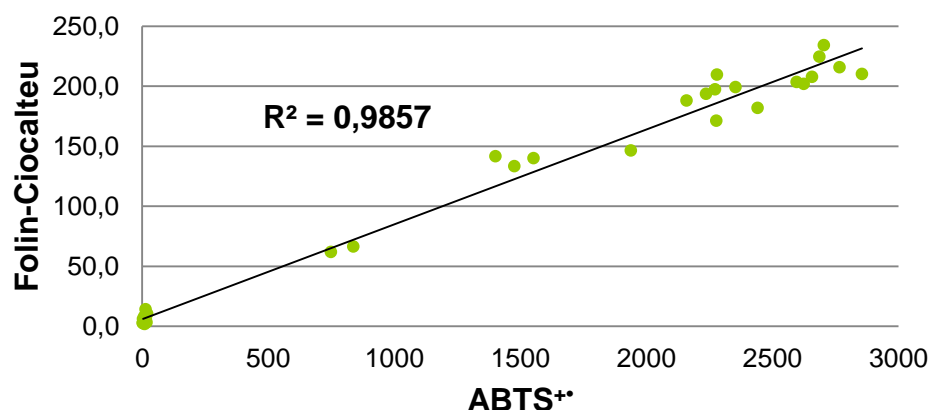


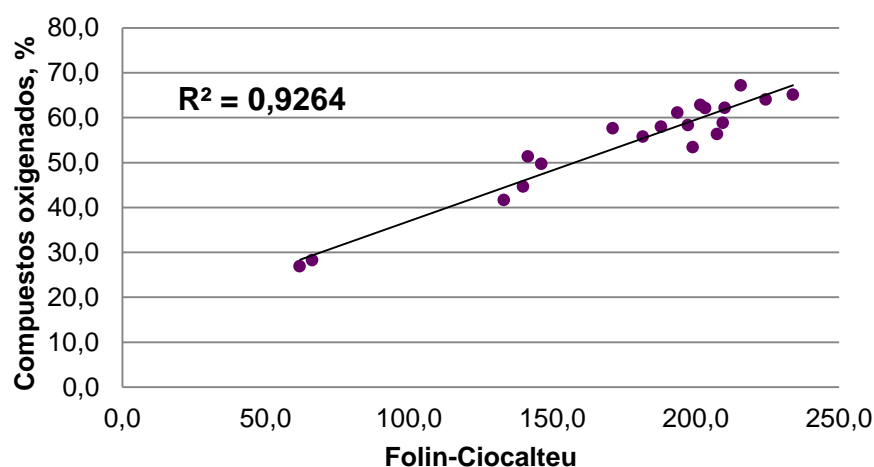
Figura 46. Correlación entre los resultados obtenidos por los métodos ABTS^{•+} y Folin-Ciocalteu de los 32 AE bajo estudio.



Entre el método ORAC y los otros métodos, no obstante, no se observaron correlaciones buenas, ya que se alcanzaron coeficientes de 0.511 con ABTS^{•+} y 0.519, con Folin-Ciocalteu. A diferencia de los otros ensayos, el método ORAC tiene en cuenta la cinética de los antioxidantes, lo que podría explicar las diferencias en los resultados obtenidos.

Al comparar el contenido de fenoles determinado por espectrofotometría, con el método de Folin-Ciocalteu, y por cromatografía, caracterizando químicamente los AE, se descubrieron correlaciones entre los resultados obtenidos con ambas técnicas, para la especie *T. vulgaris*, tal como lo muestra la **Figura 47**.

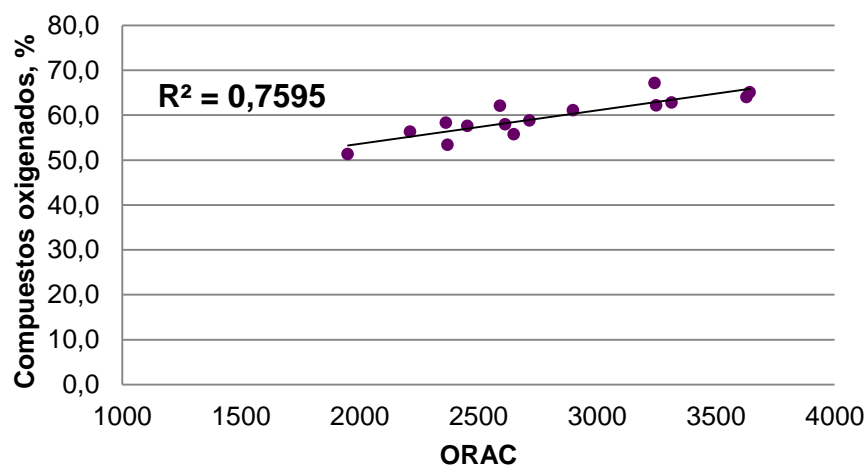
Figura 47. Correlación entre los resultados obtenidos por el método Folin-Ciocalteu y el contenido de compuestos oxigenados determinados por GC-MS, para los AE de *T. vulgaris*.



La capacidad anti-radicalaria de los AE de *T. vulgaris* medida por el ensayo ABTS^{•+} y el contenido de compuestos oxigenados (%) presentaron una buena correlación, con un coeficiente R² de 0.795. En la **Figura 48**, se observa una correlación entre las propiedades antioxidantes de los AE, medidas por el método ORAC, y su caracterización química por GC-FID, sin tener en cuenta los AE que contienen menos del 50% de compuestos oxigenados, como las esencias TV-IV, -VIII, -XVIII, -XIX y -XX.

Se realizaron las mediciones por los tres métodos implementados de 12 terpenos y 11 compuestos fenólicos con el fin de establecer si los AE analizados tuvieron capacidades anti-radicalarias mayores, menores o comparables con las de algunas sustancias de referencia,. Entre los compuestos fenólicos medidos figuraban los antioxidantes sintéticos BHA, BHT y vitamina E, los que se usan ampliamente en plásticos, gomas, polímeros y alimentos [2]. En la **Tabla 38** se reportan los valores de capacidad antioxidante equivalente al Trolox[®] y contenido de fenoles, obtenidos para las 23 sustancias de referencia. Se presentan las abreviaturas “N.D.” y “N.C.” que hacen referencia a una respuesta negativa en función de la decoloración del catión-radical ABTS^{•+} y la generación de la coloración azul en el método Folin-Ciocalteu, respectivamente.

Figura 48. Correlación entre los resultados de capacidad anti-radicalaria, medida por el método ORAC, y el contenido de compuestos oxigenados presentes en los AE de *T. vulgaris*.



Los AE de *T. vulgaris* presentaron mayor capacidad anti-radicalaria que los antioxidantes BHA, BHT y vitamina E, medida por los métodos ORAC y ABTS⁺. Además, los valores ORAC de los AE fueron más altos que los de sus componentes principales individuales, tales como *p*-cimeno, 1,8-cineol, γ -terpineno, alcanfor, borneol, timol, carvacrol y *trans*- β -cariofileno. No obstante, por el método ABTS⁺ compuestos como *p*-cimeno, 1,8-cineol, γ -terpineno y *trans*- β -cariofileno no reaccionaron con el catión-radical, por lo cual no se observó una disminución en la coloración del medio de reacción (Véanse **Tablas 37 y 38**). Con el método Folin-Ciocalteu, se evidenció que los compuestos que no presenten en su estructura grupos hidroxilo, no generaran respuesta positiva, la cual se evidencia con la aparición de una coloración azul. Los compuestos mayoritarios de los AE de *T. vulgaris*, que no cumplen con esta característica estructural, son canfeno, *p*-cimeno, 1,8-cineol, γ -terpineno, limoneno, citral, alcanfor, borneol, *trans*- β -cariofileno y α -humuleno (Véase, **Tabla 38**). Además, en el análisis de las sustancias de referencia se observó como los resultados varían de acuerdo con el tipo de ensayo utilizado.

Tabla 38. Valores de TAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g SR) y contenido de fenoles (mg A. gálico/g SR) para las sustancias de referencia, obtenidos por los métodos ORAC, ABTS⁺ y Folin-Ciocalteu.

SUSTANCIA DE REFERENCIA	MÉTODOS DE MEDICIÓN (\pm s, n=3)		
	ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g SR)	ABTS ⁺ ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g SR)	Folin-Ciocalteu (mg A. gálico/g SR)
Canfeno	331 \pm 5	N.D.	N.C.
<i>p</i> -Cimeno	92 \pm 1	N.D.	N.C.
1,8-Cineol	78 \pm 2	N.D.	N.C.
γ -Terpineno	51 \pm 1	N.D.	N.C.
Limoneno	544 \pm 1	13 \pm 1	N.C.
Citral	190.1 \pm 0.4	N.D.	N.C.
Alcanfor	84.2 \pm 0.4	32 \pm 2	N.C.
Borneol	41.7 \pm 0.5	38 \pm 2	N.C.
Timol	238.8 \pm 0.2	643 \pm 3	55.83 \pm 0.02
Carvacrol	388 \pm 2	535 \pm 4	40.3 \pm 0.1
<i>trans</i> - β -Cariofileno	517 \pm 2	N.D.	N.C.
α -Humuleno	67 \pm 2	75 \pm 9	N.C.

Tabla 38. Continuación.

SUSTANCIA DE REFERENCIA	MÉTODOS DE MEDICIÓN (\pm s, n=3)		
	ORAC (μ mol Trolox [®] /g SR)	ABTS ^{**} (μ mol Trolox [®] /g SR)	Folin-Ciocalteu (mg A. gálico/g SR)
Ácido caféico	3393 \pm 10	693 \pm 6	162.7 \pm 0.5
Ácido <i>p</i> -cumárico	2809 \pm 34	846 \pm 8	95 \pm 1
Ácido rosmarínico	6767 \pm 69	1885 \pm 14	314 \pm 2
Ácido ursólico	189 \pm 1	29 \pm 1	21.58 \pm 0.05
Ácido carnósico	5106 \pm 45	506 \pm 11	118.5 \pm 0.2
Ácido ferúlico	2688 \pm 24	548 \pm 10	167.3 \pm 0.1
Ácido gálico	2888 \pm 5	3163 \pm 16	160.7 \pm 0.1
Quercetina	6233 \pm 12	3535 \pm 90	410 \pm 1
BHA	1180 \pm 40	611 \pm 19	102.12 \pm 0.04
BHT	678 \pm 10	769 \pm 4	56.8 \pm 0.1
Vitamina E	536 \pm 8	100 \pm 2	49.5 \pm 0.1

N.D.: No se observó disminución en la coloración (Véase **Numeral 4.5**)

N.C.: No presentó coloración azul (Véase **Numeral 4.7.3**).

SR: Sustancia de referencia.

Según la determinación realizada por GC-MS, el contenido de compuestos fenólicos en los AE de la especie *R. officinalis* fue bajo, lo cual se confirma con los valores de contenido de fenoles medidos por el método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Véase **Tabla 38**). Entre los compuestos mayoritarios identificados, que contienen grupos hidroxilo, se encuentran linalol, *cis*-hidrato de sabineno, *trans*-hidrato de pineno, *cis*-pinocarveol, *trans*-pinocarveol y borneol, los cuales constituyen entre el 17 y 29% del AE.

La mezcla de compuestos en los AE de *R. officinalis* exhiben mayor capacidad anti-radicalaria por el método ORAC que el BHT y la vitamina E, pero menor que el BHA. Todos los AE presentan menor capacidad anti-radicalaria medida por el método ABTS^{**} que las sustancias de referencia.

En las **Tablas 37 y 38** se reportan los valores de capacidad anti-radicalaria de los AE de *S. officinalis* y *L. citriodora*, junto con los de los antioxidantes de

referencia BHA y BHT. Los AE, que constituyen una mezcla de componentes de origen natural, presentan mayores valores de tal actividad secuestradora de radicales medidos por ORAC y ABTS^{•+} que las sustancias sintéticas. El contenido de fenoles de estos AE es bajo, debido a que sus componentes principales como 1,8-cineol, alcanfor, α -humuleno y citral, no reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, como se evidencia en la **Tabla 38**.

En la **Tabla 38** también se presentan los valores de capacidad anti-radicalaria de algunos ácidos como caféico, rosmarínico, ursólico y carnósico, compuestos que no se extraen por destilación, pero sí con el fluido supercrítico, como será discutido más adelante.

5.8.2 Comparación de la capacidad anti-radicalaria y el contenido de fenoles de los AE de plantas cultivadas en diferentes condiciones y usando diferentes técnicas de destilación. Los AE de *T. vulgaris* se destilaron de plantas sembradas en parcelas con diferente nivel de fertilización y densidad de siembra. Algunos AE provienen de cultivos con las mismas condiciones de fertilización y densidad, pero diferente composición química del suelo. Las plantas se colectaron en varias parcelas de las veredas El Retiro y La Granja ubicadas en el municipio de Sucre (Santander). En la **Tabla 39** se presentan las condiciones de cultivo usadas para las plantas de *T. vulgaris*, de las cuales se obtuvieron los AE bajo estudio. Si se comparan los resultados de composición química (Véase **Numeral 5.7.2**), capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles (Véase **Numeral 5.8.1**), se puede evidenciar, que las plantas cultivadas con 150 g de materia orgánica y una densidad de siembra de 55556 plantas/ha, presentan los valores más altos de capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles (Véase **Tabla 39**).

Tabla 39. Condiciones de cultivo de plantas de *T. vulgaris*, usadas para la obtención de sus AE y valores de capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles.

CÓDIGO AE	Nivel de fertilización (g/planta)	Plantas/ha	MÉTODOS DE MEDICIÓN		
			ORAC	ABTS**	Folin-Ciocalteu
TV-I ^b	200	31250	2649 ± 20	2442 ± 23	181.7 ± 0.77
TV-IV ^b			2507 ± 42	1940 ± 42	146.3 ± 0.7
TV-VII ^b			2370 ± 53	2355 ± 21	199.0 ± 0.6
TV-X ^b			2454 ± 53	2278 ± 28	171 ± 19
TV-II ^b	75	66667	2591 ± 26	2598 ± 47	203.4 ± 0.8
TV-XI ^b			2613 ± 73	2161 ± 17	188 ± 1
TV-III ^b	150	66667	2715 ± 73	2281 ± 45	209.0 ± 0.2
TV-XII ^a			2899 ± 31	2238 ± 8	196.3 ± 0.3
TV-XIII ^a			3243 ± 23	2767 ± 46	215.8 ± 0.2
TV-XIV ^a			3314 ± 48	2625 ± 17	201.7 ± 0.6
TV-V ^b	150	55556	2213 ± 34	2658 ± 35	207.6 ± 0.8
TV-XV ^a			3249 ± 11	2856 ± 11	210.2 ± 0.8
TV-XVI ^a			3630 ± 72	2688 ± 13	224.5 ± 0.3
TV-XVII ^a			3643 ± 40	2705 ± 12	234.0 ± 0.8
TV-XVIII ^a	200	41667	2907 ± 70	838 ± 15	66.3 ± 0.1
TV-XIX ^a			2958 ± 76	750 ± 10	62.0 ± 0.7
TV-XX ^a			3656 ± 65	1477 ± 52	133.2 ± 0.6
TV-VI	75	55556	2363 ± 64	2273 ± 33	197.4 ± 0.6
TV-VIII	150	41667	1549 ± 61	1554 ± 19	140 ± 1
TV-IX	75	41667	3656 ± 65	1402 ± 31	142 ± 1

^aAE destilados por AV a partir de plantas cultivadas en diferentes parcelas pero con igual nivel de fertilización y densidad de siembra.

^bAE destilados por MW-HD a partir de material vegetal cosechado en parcelas con composición química del suelo conocida.

La composición química de los AE aislados de las plantas, sembrados con 150 g de materia orgánica y una densidad de 55556 plantas/ha (aceites TV-V, TV-XV, TV-XVI y TV-XVII) revela la presencia de compuestos de tipo fenólico en cantidades entre 56 y 65%.

Además, se observa que los AE destilados por arrastre con vapor presentaron mayor capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles que los obtenidos por MWHD, con excepción del aceite TV-V. Los AE aislados por MWHD presentaron capacidad antioxidante más alta cuando se extraen de plantas cultivadas con 200 g de materia orgánica y con una menor densidad de siembra *i.e.*, 31250 plantas /ha (Véase **Tabla 39**). No obstante, hay que tener

en cuenta que las plantas analizadas se cosecharon entre los 3 y 4 meses después de su siembra.

Las plantas de *R. officinalis* se sembraron bajo las mismas condiciones de cultivo (200 g de materia orgánica y 31250 plantas/ha). No obstante, el material vegetal usado para las destilaciones por MWHD se plantó en parcelas experimentales con diferente composición química del suelo, tal como se observa en la **Tabla 40**. Los mayores rendimientos de esencia se obtuvieron para los AE RO-I ($0.77 \pm 0.02\%$) y RO-IV ($0.86 \pm 0.02\%$), estos aceites se aislaron a partir de plantas cultivadas en suelos con concentraciones de hierro (Fe) de 150 y 142 ppm, respectivamente. Además, estos AE presentaron los valores más altos de capacidad anti-radicalaria medida por el método ORAC, y, el aceite RO-I el mayor valor de contenido de fenoles determinado por Folin-Ciocalteu (Véase **Tabla 37**). Sin embargo, al aumentar la concentración de Fe (e.g. AE RO-II y RO-V) se observó una disminución de la capacidad anti-radicalaria de aceites, determinada por lo dos métodos mencionados.

Estudios relacionados con la biosíntesis de los metabolitos secundarios han demostrado que su cantidad y tipo de sustancias no se controlan solamente genéticamente [130], sino que existen factores ambientales que influyen en la producción de AE [131]. Por ejemplo, se ha demostrado que el Fe tiene funciones importantes en el metabolismo de las plantas como en la fotorespiración, y su déficit puede causar la desactivación de algunas enzimas generando cambios en el proceso metabólico [132].

Tabla 40. Composición química del suelo de las parcelas donde se sembraron las plantas de *R. officinalis* a partir de las cuales se obtuvo por MW-HD su AE.

CÓDIGO AE	Elementos mayores							Elementos menores				
	%C	P (ppm)	Meq/100 gramos de suelo					ppm				
			Ca	Mg	Na	K	Al	B	Fe	Mn	Cu	Zn
RO-I	5.2	5.3	1.0	0.2	0.1	0.05	3.4	N.D	150	3.8	0.2	0.5
RO-II	1.7	6.2	2.2	0.3	0.1	0.04	1.2	0.05	192	4.9	0.08	1.7
RO-III	4.7	2.4	1.2	0.3	0.2	0.1	3.6	0.1	389	2.4	0.1	0.8
RO-IV	3.4	3.5	2.7	0.3	0.2	0.1	0.4	0.09	142	1.1	0.2	0.3
RO-V	5	3.5	1.4	0.2	0.2	0.1	2.0	0.2	270	2.8	0.1	0.6

La composición química del suelo, donde se cultivaron las plantas de las cuales se destiló el AE RO-IV, favorece la producción de monoterpenos oxigenados (53.7%), seguido de hidrocarburos monoterpénicos (39.7%), mientras que el contenido de compuestos de mayor peso molecular fue bajo (5.4%) (Véase **Figura 39**).

Las plantas de *S. officinalis* se sembraron bajo las mismas condiciones de cultivo (nivel de fertilización: 200 g de materia orgánica y densidad de siembra: 31250 plantas/ha). Los AE se destilaron empleando la misma técnica (MWHD). Los rendimientos (%) de aceites y su composición química, capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles no variaron significativamente. Esto permite establecer que es posible cultivar esta planta en pequeñas parcelas ubicadas en la misma zona geográfica sin que se afecte el rendimiento, composición y propiedades antioxidantes.

5.9 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA Y EL CONTENIDO DE FENOLES DE LOS EXTRACTOS SFE

La capacidad anti-radicalaria, determinada por los métodos ORAC y TEAC, se midió para los extractos obtenidos por SFE de las especies *T. vulgaris* y *S. officinalis*, cosechadas en parcelas experimentales en Sucre-Santander. Adicionalmente, se evaluó el contenido de fenoles por medio de las técnicas: colorimétrica, Folin-Ciocalteu y cromatográfica GC-FID. En la **Tabla 41**, se reportan los valores de TAC (*Total Antioxidant Capacity*) y el contenido de fenoles obtenidos para los extractos SFE analizados.

Tabla 41. Valores de TAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto) y contenido de fenoles ($\text{mg A. gálico}/\text{g}$ extracto) para los extractos obtenidos por SFE, medidos por los métodos ORAC, ABTS^{**} y Folin-Ciocalteu ($n=3$).

ESPECIE	CÓDIGO	ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g E}^*$)	ABTS ^{**} ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g E}^*$)	Folin-Ciocalteu ($\text{mg A. gálico}/\text{g E}^*$)
<i>T. vulgaris</i>	SFE-TV-I	964 ± 20	242 ± 3	62 ± 1
	SFE-TV-II	1522 ± 24	488 ± 15	69 ± 1
	SFE-TV-III	540 ± 9	193 ± 6	28 ± 1
	SFE-TV-IV	780 ± 20	356 ± 10	58 ± 2
	SFE-TV-V	1140 ± 22	509 ± 1	65.0 ± 0.9
	SFE-TV-VI	886 ± 8	368 ± 5	36.7 ± 0.3
	SFE-TV-VII	1441 ± 25	405 ± 11	52.8 ± 0.3
	SFE-TV-VIII	1355 ± 25	559 ± 16	65.9 ± 0.8
	SFE-TV-IX	1788 ± 18	324 ± 10	66 ± 1
	SFE-TV-X	1253 ± 11	385 ± 3	57.8 ± 0.8
	SFE-TV-XI	1930 ± 14	436 ± 4	67.2 ± 0.3
Extracto en ETOH	1984 ± 23	561 ± 12	57.0 ± 0.6	
<i>S. officinalis</i>	SFE-SO-I	793 ± 7	278 ± 9	49.5 ± 0.9
	SFE-SO-II	1792 ± 18	447 ± 2	66 ± 1
	SFE-SO-III	906 ± 6	353 ± 3	35 ± 1
	SFE-SO-IV	1087 ± 15	446 ± 2	46 ± 2
	SFE-SO-V	1080 ± 12	328 ± 5	33 ± 1
	SFE-SO-VI	1181 ± 17	371 ± 7	54.7 ± 0.6
	SFE-SO-VII	881 ± 4	461 ± 3	59.8 ± 0.7
	SFE-SO-VIII	828 ± 8	343 ± 7	43.4 ± 0.8
	SFE-SO-IX	1029 ± 9	483 ± 5	53.4 ± 0.6
	SFE-SO-X	1606 ± 24	749 ± 1	78 ± 1
	SFE-SO-XI	1035 ± 5	443 ± 1	67 ± 1
	SFE-SO-XII	1710 ± 8	527 ± 9	62 ± 1
Extracto en ETOH	1446 ± 50	546 ± 5	65.2 ± 0.5	

*(E): Extracto

Los extractos SFE se obtuvieron bajo diferentes parámetros de extracción, los cuales se reportan en la **Tabla 21**. Los parámetros de extracción usados no fueron óptimos, es decir, permiten obtener el mayor valor de capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles. Esta investigación se enfocó en demostrar que los métodos implementados (ORAC, ABTS^{**} y Folin-Ciocalteu) pueden ser usados para determinar las propiedades antioxidantes de extractos obtenidos

por SFE bajo diferentes condiciones, y son suficientemente sensibles para generar diferencias en las respuestas como consecuencia de los cambios en la composición química, que depende de los parámetros de extracción.

El extracto SFE-TV-XI obtenido bajo los parámetros de extracción en sus niveles más altos (presión: 50 MPa, temperatura: 353 K, flujo: 60 g/min, tiempo dinámico: 120 min y tiempo estático: 20 min) mostró una mayor capacidad anti-radicalaria, medida por el método ORAC. Además, con los resultados alcanzados se evidencia que, en general, a mayor presión de SFE, los extractos poseen mayor valor ORAC, e.g., SFE-TV-VII, SFE-TV-IX, SFE-TV-X y SFE-TV-XI. No obstante, el extracto SFE-TV-III también se aisló a 50 MPa de presión, pero a un flujo de CO₂ de 20 g/min, temperatura de 313 K y con un tiempo dinámico o tiempo de extracción de 30 min, presentó una capacidad anti-radicalaria más baja.

Los resultados reportados en la **Tabla 41**, junto con los parámetros presentados en la **Tabla 21**, demuestran que en la extracción con fluido supercrítico existe una combinación de variables que afectan la composición química del extracto, y por ende, sus propiedades antioxidantes. Por esta razón, para establecer las condiciones óptimas de extracción es necesario realizar un estudio completo del efecto de todos los parámetros y sus interacciones, empleando análisis estadísticos. El objetivo de la presente investigación fue comparar las propiedades antioxidantes de los extractos obtenidos con los antioxidantes de referencia BHA, BHT y vitamina E, y demostrar que existe relación entre la composición química y las propiedades antioxidantes.

Todos los extractos SFE de *T. vulgaris*, analizados por el método ORAC, presentaron mayor capacidad anti-radicalaria que la de los antioxidantes BHA, BHT y vitamina E, los cuales exhibieron valores de 1180 ± 40 , 678 ± 10 y 536 ± 8 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mmol sustancia}$, respectivamente. Con el método ABTS^{**} se determinó que la diferencia entre la capacidad antioxidante del extracto SFE-

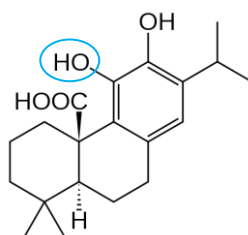
TV-VIII ($559 \pm 16 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto}$) y el extracto etanólico ($561 \pm 12 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto}$) no fue estadísticamente significativa. Adicionalmente, medidos por este ensayo todos los extractos de *T. vulgaris* tuvieron un valor de capacidad anti-radicalaria mayor que el de la vitamina E ($100 \pm 2 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mmol sustancia}$), pero ninguno superó el valor del BHA o BHT. En cuanto al contenido de fenoles, determinado por el método Folin-Ciocalteu, se pudo establecer que los valores de los extractos estuvieron cercanos al de timol ($55.83 \pm 0.02 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mmol sustancia}$), con excepción de los extractos SFE-TV-III y SFE-TV-VI, que presentaron valores más bajos. Es posible establecer que la capacidad antioxidante de los extractos se atribuye a los compuestos activos presentes en ellos; es decir, que se debe no solamente a los componentes principales, sino además a la presencia de aquellos componentes en pequeñas cantidades o a la sinergia entre ellos [133].

Al comparar los resultados de capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles de los extractos SFE de *T. vulgaris* con los obtenidos para algunos compuestos fenólicos considerados antioxidantes, tales como los ácidos caféico, *p*-cumárico, rosmarínico, ursólico, carnósico, ferúlico y gálico, al igual que el flavonol quercetina (Véase **Tabla 38**), se estableció que todos los extractos exhibieron mayor capacidad anti-radicalaria y contenido de fenoles que el ácido ursólico, pero menor que los demás compuestos analizados.

La mayor capacidad anti-radicalaria de los extractos SFE de *S. officinalis*, medida por el método ORAC, se obtuvo para el extracto SFE-SO-II, con un valor de $1792 \pm 18 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto}$, seguido de SFE-SO-XII ($1710 \pm 8 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto}$) y SFE-SO-X ($1606 \pm 24 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto}$), que presentaron mayores capacidades antioxidantes que el extracto etanólico ($1446 \pm 50 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto}$). Adicionalmente, estos extractos contienen ácido carnósico en mayor proporción (Véase **Tabla 35**), el cual es un ácido fenólico con propiedades antioxidantes y se encuentra en plantas aromáticas, entre ellas figuran el romero y la salvia.

En general, se observó que los extractos presentaron mayor capacidad anti-radicalaria, medida por el método ORAC, cuyo mecanismo de reacción se basa en una transferencia de un átomo de hidrógeno. Ello se puede relacionar con la composición química, determinada por HPLC-DAD, de la fracción no volátil de los extractos, discutida en el **Numeral 6.4.3**. En esta fracción, se identificó y cuantificó el ácido carnósico como uno de los componentes mayoritarios (Véase **Tabla 35**), seguido del ácido ursólico. Masuda y colaboradores [134] reportaron el mecanismo de reacción del ácido carnósico con radicales peroxilo y demostraron que el radical peroxilo reacciona a través de una transferencia de un átomo de hidrógeno. El ácido carnósico contiene dos grupos hidroxilo unidos al anillo aromático; de los cuales Inatani y colaboradores [135] establecieron que el hidroxilo que se encuentra más cerca del grupo carboxilo (Véase **Figura 49**) tiene mayor efecto en las propiedades antioxidantes de la molécula con base en la relación estructura-actividad. Entonces según el mecanismo propuesto por Masuda y colaboradores, se considera que este grupo hidroxilo será el primero en donar el átomo de hidrógeno a un radical peroxilo, para producir el radical carnosato [134].

Figura 49. Estructura química del ácido carnósico.



Con base en el mecanismo de reacción del ácido carnósico, se podría concluir que el método ORAC fue más adecuado que ABTS⁺, para determinar las propiedades antioxidantes de los extractos SFE de *S. officinalis*, ricos estos compuestos. Teniendo en cuenta la cuantificación del ácido carnósico en los extractos SFE estudiados, se puede establecer que a más alto contenido del ácido carnósico y de fenoles, se observará mayor capacidad anti-radicalaria, tal como se reporta en las **Tablas 38** y **41**, para los extractos SFE-SO-II, SFE-SO-

X y SFE-SO-XII. No obstante, ningún extracto presentó el valor ORAC más alto que el determinado para el patrón certificado del ácido carnósico, que tuvo un valor de $5106 \pm 45 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mmol sustancia}$.

Con el método ABTS⁺, se estableció nuevamente que el extracto SFE-SO-XII presentó la mejor capacidad contra radicales peroxilo, lo cual se relaciona con su contenido de compuestos de tipo fenólico. No obstante, al comparar estos resultados con los obtenidos para los antioxidantes sintéticos de referencia, se observó que este extracto únicamente superó a la vitamina E.

Las propiedades antioxidantes y el contenido de fenoles en los extractos SFE analizados en el presente trabajo no se determinaron el mismo día, que se realizó la extracción; durante su almacenamiento se estaban implementando los métodos en el lector de microplacas. Sin embargo, para establecer si durante el período de almacenamiento, en ausencia de luz y a -16°C , las propiedades antioxidantes variaban de los extractos, por degradación de sus compuestos, se realizó una comparación entre los valores de capacidad anti-radicalaria, por el método ORAC, con otros extractos obtenidos por SFE de *S. officinalis* que se analizaron el mismo día de la extracción, como 4 meses después de su obtención (Véase **Tabla 42**).

Tabla 42. Valores de TAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto}$), medidos por el método ORAC ($n=3$) de cuatro extractos obtenidos por SFE de *S. officinalis*.

Tiempo de almacenamiento (meses)	ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g E}$)			
	SO1	SO2	SO3	SO4
0	1445 ± 34	1020 ± 15	2399 ± 29	2176 ± 32
4	1442 ± 66	1011 ± 18	2367 ± 11	2185 ± 25

Los valores reportados en la **Tabla 42** muestran que, después de 4 meses de almacenamiento, la capacidad anti-radicalaria medida por el método ORAC, no presentó diferencias estadísticamente significativas, con lo cual se confirma que los extractos conservan sus propiedades tiempo largo después de haber sido obtenidos.

6. CONCLUSIONES

- La implementación de los métodos para determinar la capacidad anti-radicalaria y establecer el contenido de fenoles en un lector de microplacas, permitió disminuir considerablemente las cantidades de muestra (10 mg), de disolventes y reactivos (200 μ L), con un error de lectura menor del 3% (CV) y realizar un análisis simultáneo de 11 muestras con 8 réplicas en tiempos de análisis entre 30 y 87 min (dependiendo del método).
- Por hidrodestilación asistida por la radicación de microondas (MWHd), arrastre con vapor (AV) y usando fluido supercrítico (SFE, CO₂), se aislaron, respectivamente, los aceites esenciales y los extractos de las plantas aromáticas, cultivadas en parcelas experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM (UIS) y en el campo (municipios de Socorro y Sucre del Departamento de Santander), *i.e.*, tomillo (*Thymus vulgaris*), romero (*Rosmarinus officinalis*), salvia (*Salvia officinalis*) y cidrón (*Lippia citriodora*).
- La composición química de los aceites esenciales y extractos, obtenidos de *T. vulgaris*, *R. officinalis*, *S. officinalis* y *L. citriodora*, se determinó por cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y espectrometría de masas (MS, ionización electrónica, EI); se usaron criterios cromatográficos (tiempos de retención, índices de retención lineales y sustancias-patrón) y espectroscópicos (espectros de masas, EI, patrones de fragmentación, bases de datos y material de referencia certificado). Dependiendo del aceite o del extracto, se identificaron positivamente de 70 al 96% de sus componentes presentes en cantidad relativa mayor de 0.01%.

- Se implementó el ensayo *screening* en un lector de micro-placas para determinar la capacidad anti-radicalaria por los métodos ORAC, ABTS⁺⁺ de los aceites esenciales y los extractos obtenidos por MW-HD, AV y SFE (CO₂), respectivamente. Los resultados de la capacidad anti-radicalaria de los aceites esenciales, presentaron diferencias en función de las condiciones de cultivo de las plantas estudiadas. La especie. *T. vulgaris* sembrada con 150 g de materia orgánica por planta y una densidad de siembra ca. 55556 plantas/ha presentó propiedades antioxidantes superiores (ORAC: 3249 – 3643 μmol Trolox[®]/g AE, ABTS⁺⁺: 2705 – 2856 μmol Trolox[®]/g AE), a las de los antioxidantes sintéticos de referencia BHA (ORAC: 1180 ± 40 μmol Trolox[®]/g SR, ABTS⁺⁺: 611 ± 19 μmol Trolox[®]/g SR) y BHT (ORAC: 678 ± 10 μmol Trolox[®]/g SR, ABTS⁺⁺: 769 ± 4 μmol Trolox[®]/g SR).
- La correlación entre los valores determinados en los ensayos ABTS⁺⁺ y obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu, para todos los aceites esenciales bajo estudio, fue alta ($R^2 = 0.985$). Estos resultados indican la estrecha relación entre la concentración de los compuestos fenólicos en los aceites esenciales y su capacidad antioxidante, determinada por el ensayo ABTS⁺⁺. Para los AE de *T. vulgaris* se observó, que con el aumento del contenido de fenoles presentes, la capacidad anti-radicalaria se incrementaba, e.g., el aceite TV-XVII presentó el valor más alto de con el método Folin-Ciocalteu (234.0 ± 0.8 mg de ácido gálico/g AE), al igual que una alta capacidad anti-radicalaria (2705 ± 12 μmol Trolox[®]/g AE).
- Se demostró, que los métodos implementados ORAC, ABTS⁺⁺ y Folin-Ciocalteu, se pueden usar confiablemente para determinar las propiedades antioxidantes de extractos obtenidos con fluido supercrítico (CO₂), ya que estas técnicas resultaron ser muy sensibles a las diferencias composicionales de aceite y extractos obtenidos bajo diferentes métodos y con distintos parámetros de extracción SFE.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda analizar la composición química, la capacidad anti-radicalaria y el contenido de fenoles de las plantas estudiadas en sus diferentes estados fenológicos, con el fin de establecer la época de cosecha que favorezca la producción de compuestos con propiedades antioxidantes.
- Se recomienda implementar las condiciones de análisis de muestras lipofílicas por el método ORAC.

BIBLIOGRAFÍA

1. BOOTS, A. W., HAENEN, G. R. M. M., and BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eu. J. Pharmacol.*, **2008**, 585, p.p. 325-337.
2. DENISOV, E. T., and AFANAS'EV, I. B. (Editores). Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. **2005**, Ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU. p.p. 465-488, 599-603, 675-695.
3. SIES, H. Oxidative stress and inflammatory mechanism in obesity, diabetes and the metabolic síndrome. **2005**, Ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU., p.p. 235-243.
4. CADENAS, E., and PACKER, L. Handbook of antioxidants. **2002**, Ed. Marcel Dekker, New York, EE.UU. Capítulos 1 y 3.
5. HALIWELL, B., and GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Meth. Enzymol.*, **1990**, 186, p.p. 1-85.
6. DIPLOCK, A. T., CHARLEUX, J. L., CROZIER-WILLI, G., KOK, J., RICE-EVANS, C., ROBERFROID, M., STAHL, W., and VINA-RIBES, J. Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.*, **1998**, 80 (Suppl. 1), p.p. S77-S112.
7. KIM, R., EMI, M., TANABE, K., MURAKAMI, S., UCHIDA, Y., and ARIHIRO, K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J. Pathol.*, **2006**, 208, p.p. 319-326.
8. MACNEE, W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.*, **2001**, 429, p.p. 195-207.
9. KOHEN, R., and NYSKA, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.*, **2002**, 30 (6), p.p. 620-650.
10. WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2000**, 20, p.p. 1430-1442.

11. SEN, C. K. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top. Cell. Regul.*, **2000**, 36, p.p. 1-30.
12. JOHNSON, I. T. Propiedades antitumorales de los antioxidants. En: "Antioxidantes de los alimentos aplicaciones prácticas". Pokorny J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. (Eds.), **2001**, p. 97. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. España.
13. KIM, H., CHEN, F., WANG, X., and RAJAPKSE, N. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, p.p. 3696-3701.
14. RICE-EVANS, C., MILLER, N., and PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, **1997**, 2 (4), p.p. 152-159.
15. MARTÍNEZ-VALVERDE, I., PERIAGO, M. J., and ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **2000**, 50 (1), p.p. 5-18.
16. WATTEN, D. A., GHAEDIAN, R., and KALIAS, S. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 14 (2), p.p. 120-130.
17. FOLIN, O., and CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, **1927**, LXXIII (2), p.p. 627-650.
18. SINGLETON, V. L., and ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1965**, 16 (3), p.p. 144-158.
19. PRIOR, R. L., WU, X., and SCHAICH, K. Standardization methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, p.p. 4290-4302.
20. SCHLESIER, K., HARWAT, M., BÖHM, V., and BITSCH, R. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radic. Res.*, **2002**, 36 (2), p.p. 177-187.
21. ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P. D., PATSALIDES, E., M_CDONALD, S., and ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.*, **2002**, 127, p.p. 183-198.

- 22.** TAFURT, G. G. Estudios teórico y experimental para la evaluar la relación actividad antioxidante-estructura de anilinas sintéticas y la alquilación intramolecular de Friedel-Craft de *orto*-alil-N-benzilanilinas. Tesis Doctoral, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, **2008**, p.p. 10-13.
- 23.** HUANG, D., OU, B., and PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53 (6), p.p. 1841-1856.
- 24.** SHAHIDI, F. Natural antioxidants chemistry, health effects and applications. **1997**, Ed. American Oil Chemists Society, Boca Ratón, FL, EE.UU., p.p. 414.
- 25.** JADHAV, S. J., NIMBALKAR, S. S., KULKARNI, A. D., and MADHAVI, D. L. En: Food Antioxidants: Technological, *Toxicological and Health Perspectives*, MADHAVI, D., L., DESHPANDE, S. S., and SALUNKHE, D. K. (Eds.), Ed. Marcel Dekker, New York, EE.UU., **1996**, p.p. 5–64.
- 26.** 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), p.p. 295-302.
- 27.** DELGADO-ZAMARREÑO, M. M., GONZÁLES-MAZA, I., SÁNCHEZ-PÉREZ, R., and MARTÍNEZ, C. Analysis of synthetic phenolic antioxidants in edible oils by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chem.*, **2007**, 100, p.p. 1722-1727.
- 28.** IVERSON, F. *In vitro* studies on butylated hydroxyanisole. *Food Chem. Tox.*, **1999**, 37 (9-10), p.p. 993-997.
- 29.** DENISOV, E. T., and KHUDYAKOV, I. V. Mechanism of action and reactivities of the free radicals of inhibitor. *Chem. Rev.*, **1987**, 87, p.p. 1313-1357.
- 30.** FRANKEL, E. D., and MEYER, A. S. Review: The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, 80, p.p. 1925-1941.

31. RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 26 (9-10), p.p. 1231-1237.
32. SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.*, **2002**, 8 (3), p.p. 121-137.
33. FRANKEL, E. N., and FINLEY, J. W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56 (13), p.p. 4901-4908.
34. HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J. A., and PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50 (16), p.p. 4437-4444.
35. GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E., and FERRO-LUZZI, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biol. Med.*, **1995**, 18, p.p. 29-36.
36. PRIOR, R. I., and CAO, G. *In vitro* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biol. Med.*, **1999**, 27 (11), p.p.1173-1181.
37. GLAZER, A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Meth. Enzymol.*, **1990**, 186, p.p. 161-168.
38. GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E., and FERRO-LUZZI, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biol. Med.*, **1995**, 18, p. 29-36.
39. CAO, G., ALESSIO, H. M., and CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med.*, **1993**, 14, p.p. 303-311.
40. FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci. Technol.*, **1993**, 4, p.p. 220-225.

41. OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., and PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49 (10), p.p. 4619-4626.
42. MILLER, N. J., RICE-EVANS, C., DAVIES, M. J., GOPINATHAN, V., and MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, **1993**, 84 (4), p.p. 407-412.
43. BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SAMOJLIK, I., and JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, p.p. 7879-7885.
44. ERKAN, N., AYRANCI, G., and AYRANCI, E. Antioxidant activities of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.*, **2008**, 110, p.p. 76-82.
45. FONT QUER, P. Plantas medicinales, El Dioscórides renovado. Ed. Labor S.A., Madrid, **1993**. p.p. 398-412.
46. MITIC-CULAFIC, D., VOKOVIC-GACIC, B., KNEZEVIC-VUKCEVIC, J., STANKOVIC, S., and SIMIC, D. Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). *Arch. Biol. Sci.*, **2005**, 57 (3), p.p. 173-178.
47. HORIUCHI, K., SHIOTA, S., KURODA, T., HATANO, T., YOSHIDA, T., and TSUCHIYA, T. Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by Carnosol from *Salvia officinalis*. *Biol. Pharm. Bull.*, **2007**, 30 (2), p.p. 287-290.
48. ROMEILAH, R. M., FAYED, S. A., and MAHMOUD, G. I. Chemical composition, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. *J. Appl. Sci. Res.*, **2010**, 6 (1), p.p. 50-62.
49. BANDONI, A. (Editor). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica; su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. **2000**, Ed. de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina. p. 124.

50. MAHMOUD, A. A., AL-SHIHRY., and SON, B. W. Diterpenoid quinines from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Phytochemistry*, **2005**, 66, p.p. 1685-1690.
51. CENTENO, S., CALVO, M. A., ADELANTADO, C., and FIGUEROA, S. Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. *Pak. J. Biol. Sci.*, **2010**, 13 (9), p.p. 452-455.
52. THOMPSON, J. D., CHALCHAT, J., MICHET, A., LINHART, Y. B., and EHLERS, B. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J. Chem. Ecol.*, **2003**, 29 (4), p.p. 859-880.
53. PROESTOS, C., CHORIANOPOULOS, N., NYCHAS, G. J. E., and KOMAITIS, M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, p.p. 1190-1195.
54. REDDY, M. V. B., ANGERS, P., GOSSELIN, A., and ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, **1998**, 47 (8), p.p. 1515-1520.
55. ALARCÓN, E., CAMPOS, A. M., EDWARDS, A. M., LISSI, E., and LÓPEZ-ALARCÓN, C. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chem.*, **2008** 107, p.p. 1114-1119.
56. ONO, M., ODA, E., TANAKA, T., LIDA, Y., YAMASAKI, T., MASUOKA, C., IKEDA, T., and NOHARA, T. DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. *J. Nat. Med.*, **2008**, 62, p.p. 101-106.
57. DUDONNÉ, S., VITRAC, X., COUTIÉRE, P., WOILLEZ, M., and MÉRILLON, J. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57, p.p.1768-1774.

58. SUHAJ, M. Spice antioxidant isolation and their antiradical activity: a review. *J. Food Comp. Anal.*, **2006**, 19, p.p. 531-537.
59. IBÁÑEZ, E., OCA, A., MURGA, G., LÓPEZ-SEBASTIÁN, S., TABERA, J., and REGLERO, G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed Rosemary plants. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, p.p. 1400-1404.
60. NAKATANI, N., INATANI, R., and KONISHI, T. Antioxidative compound, method of extracting same from Rosemary, and use of same. *EE.UU. Pat.*, **1984**, N°: 4,450,097.
61. DÍAZ-REINOSO, B., MOURE, A., DOMÍNGUEZ, H., and PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, p.p. 2441-2469.
62. ALBU, S., JOYCE, E., PANIWNKY, L., LORIMER, J., and MASON, T. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.*, **2004**, 11, p.p. 261-265.
63. ZHENG, W., and WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, p.p. 5165-5170.
64. PAPAGEORGIOU, V., GARDELI, C., MALLOUCHOS, A., PAPAIOANNOU, M., and KOMAITIS, M. Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, p.p. 7254-7264.
65. GACHKAR, L., YADEGARI, D., REZAEI, M., TAGHIZADEH, M., ASTANEH, S. A., and RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, **2007**, 102, p.p. 898-904.
66. CUVELIER, M. E., RICHARD, H., and BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot plant and commercial extracts of Sage and Rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1996**, 73, p.p. 645-652.
67. SCHWARZ, K., ERNST, H., and TERNES, W. Evaluation of antioxidative constituents from thyme. *J. Sci. Food Agric.*, **1996**, 70, p.p. 217-223.

- 68.** ADBALLA, A. E., and ROOZEN, J. P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chem.*, **1999**, 64, p.p. 323-329.
- 69.** LEE, K., and SHIBAMOTO, T. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, p.p. 4947-4952.
- 70.** LEAL, P.F., BRAGA, M. E. M., SATO, D. N., CARVALHO, J. E., MARQUES, M. O. M., and MEIRELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, p.p. 2520-2525.
- 71.** LU, Y., and FOO, Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.*, **2001**, 75, p.p. 197-202.
- 72.** CALUCCI, L., PINZINO, C., ZANDOMENEGHI, M., CAPOCCHI, A., GHIRINGHELLI, S., SAVIOZZI, F., TOZZI, S., and GALLESCHI, L. Effects of g-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, p.p. 927-934.
- 73.** EXARCHOU, V., NENADIS, N., TSIMIDOU, M., GEROTHANASSIS, I. P., TROGANIS, A., and BOSKOU, D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and summer savory. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, p.p. 5294-5299.
- 74.** PIZZALE, L., BORTOLOMEAZZI, R., VICHI, S., and CONTE, L. S. Antioxidant activity of sage and oregano extracts related to their phenolic compound content. *J. Sci. Food Agric.*, **2002**, 82, p.p. 1645-1651.
- 75.** AYAR, A., OCZAN, M., AKGUL, A., and AKIN, N. Butter stability as affected by extracts of Sage, Rosemary and Oregano. *J. Lipids*, **2001**, 8, p.p. 15-25.
- 76.** LÓPEZ-SEBASTIÁN, S., RAMOS, L., IBÁÑEZ, E., BUENO, J., BALLESTER, L., TABERA, J., and REGLERO, G. Dearomatization of antioxidant Rosemary extracts by treatment with supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, p.p. 13-19.

77. Base de datos *Elsevier (Scopus)*, [On line]: <http://www.scopus.com/home.url>, [Fecha de consulta: 15 de marzo a 6 de abril de 2011].
78. www.inchem.org. IPCS International Programme on Chemical Safety. Fecha de consulta: 15 de abril de 2011.
79. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je23.htm>. Evaluation of national assessment of intake of butylated hydroxyanisole (BHA). Fecha de consulta: 15 de abril de 2011.
80. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je24.htm>. Evaluation of national assessment of intake of butylated hydroxytoluene (BHT). Fecha de consulta: 15 de abril de 2011.
81. TSARKOVA, T. Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de las plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas. Tesis de grado (Químico), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, **1997**, p.p. 13-16, 17, 36.
82. LUCAS-ABELLÁN, C., MERCADER.ROS, M. T., ZAFRILLA, M. P., FORTEA, M. I., GABALDÓN, J. A., and NÚÑEZ-DELICADO. ORAC-Fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, p.p. 2254-2259.
83. KINNUNEN, S., HYYPPÄ, S., LEHMUSKERO, A., OKSALA, N., MÄENPÄÄ, P., HÄNNINEN, O., and ATALAY, M. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **2005**, 95, p.p. 550-556.
84. DÁVALOS, A., GÓMEZ-CORDOVÉS, C., and BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, p.p. 48-54.
85. MAGALHAES, L. M., SANTOS, F., SEGUNDO, M. A., REIS, S., and LIMA, J. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, **2010**, 83 (2), p.p. 441-447.

- 86.** ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream: Ed. *Allured Publishing Corporation*, Illinois: **2004**, p.p. 100-450.
- 87.** MAGALHAES, L. M., SEGUNDO, M. A., REIS, S., and LIMA, J. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 613, p.p. 1-19.
- 88.** ROGINSKY, V., and LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, **2005**, 92, p.p. 235-254.
- 89.** MAGALHAES, L.M., SEGUNDO, M.A., REIS, S., LIMA, J., TÓTH, I., and RANGEL, A. Automatic flow system for sequential determination of ABTS•+ scavenging capacity and Folin-Ciocalteu index: A comparative study in food products. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 592, p.p. 193-201.
- 90.** MAGALHAES, L. SEGUNDO, M. A., REIS, S., LIMA, J., and RANGEL, A. Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, p.p. 5241-5246.
- 91.** STRATIL, P., KLEJDUS, B., and KUBÁN, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-Evaluation of spectrophotometric methods. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, p.p. 607-616.
- 92.** www.aoac.org. The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence. Fecha de consulta: Marzo de 2011.
- 93.** CANO, A., HERNÁNDEZ-RUIZ, J., GARCÍA-CÁNOVAS, F., ACOSTA, M., and ARNAO, M.B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.*, **1998**, 9, p.p. 196-202.
- 94.** LEMANSKA, K., SZYMUSIAK, H., TYRAKOWSKA, B., ZIELINSKI, R., SOFFERS, A. E. M., and RIETJENS, I. M. C. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Rad. Biol. Med.*, **2001**, 31 (7), p.p. 869-881.
- 95.** ARTS, M., J.T., DALLINGA, S., VOSS, H., HAENEN, G. R. M., and BAST, A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.*, **2004**, 88, p.p. 567-570.

- 96.** KOLEVA, I., NIEDERLÄNDER, A., and VAN BEEK, A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. *Anal. Chem.*, **2001**, 73 (14), p.p. 3373-3381.
- 97.** OZGEN, M., REESE, R. N., TULIO, A. Z., SCHEERENS, J. C., and MILLER, R. Modified 2,2-azinobis-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, p.p. 1151-1157.
- 98.** VAN DEN BERG, R., HAENEN, G., VAN DEN BERG, H., and BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.*, **1999**, 66, p.p. 511-517.
- 99.** ARTS, M., DALLINGA, S., VOSS, H., HAENEN, G., and BAST, A. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chem.*, **2003**, 80, p.p. 409-414.
- 100.** ARTS, M., DALLINGA, S., VOSS, H., HAENEN, G., and BAST, A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.*, **2004**, 88, p.p. 567-570.
- 101.** TACHAKITTIRUNGROD, S., OKONOJI, S., and CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chem.*, **2007**, 103, p.p. 381-388.
- 102.** LABRINEA, E., and GEORGIU, C. A. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 56, p.p. 63-68.
- 103.** FURIGA, A. LONVAUD-FUNEL, A., and BADET, C. In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. *Food Chem.*, **2009**, 113, p.p. 1037-1040.
- 104.** WALKER, R., and EVERETTE, J. D. Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57, p.p. 1156-1161.

- 105.** NILSSON, J., PILLAI, D., ONNING, G., PERSSON, C., NILSSON, A., and AKESSON, B. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2005**, 49, p.p. 239-246.
- 106.** VILLAÑO, D., FERNÁNDEZ-PACHÓN, S., TRONCOSO, A., and GARCÍA-PARRILLA, C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites *in vitro*. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 528, p.p. 391-398.
- 107.** RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., and PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, **1996**, 20 (7), p.p. 933-956.
- 108.** CAO, G. H., VERDON, C., WU, A., WANG, H., and PRIOR, R. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clin. Chem.*, **1995**, 41, p.p. 1738-1744.
- 109.** HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J. A., and DEEMER, E. K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, p.p. 1815-1821.
- 110.** FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S., VILLANO, D., TRONCOSO, A. M., and GARCÍA-PARRILLA, M. C. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Crit. Rev. Food Sci.*, **2008**, 48, p.p. 649-671.
- 111.** PRICE, J. A., SANNY, C. G., and SHEVLIN, D. Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high throughput assay of "total" antioxidant activity of drugs and natural products. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, **2006**, 54, p.p. 56-61.
- 112.** www.netsalud.sa.cr/ms/drc/pciudadano/guia_01.doc. Guía de validación de métodos analíticos. Fecha de consulta: Marzo de 2011.
- 113.** SANGWAN, N., FAROOQI, A., SHABIH, F., and SANGWAN, R. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.*, **2001**, 34, p.p. 3-21.

114. BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SIMIN, N., and ANACKOV, G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, p.p. 1822-1828.
115. LEE, S., UMANO, K., SHIBAMOTO, T., and LEE, K. Identification of the volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.*, **2005**, 91, p.p. 131-137.
116. HUDAIB, M., SPERONI, E., DI PIETRA, A., and CAVRINI, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 29, p.p. 691-700.
117. FLAMINI, G., CIONI, P., MORELLI, I., MACCHIA, M., and CECCARINI, L. Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, p.p. 3512-3517.
118. PAPAGEORGIOU, V., GARDELI, C., MALLOUCHOS, A., PAPAIOANNOU, M., and KOMAITIS, M. Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller Grown in Greece. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, p.p. 7254-7264.
119. TAARIT, M., MSAADA, K., HOSNI, K., HAMMAMI, M., KCHOUK, M., and MARZOUK, B. Plant growth, essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) fruits cultivated under salt stress conditions. *Ind. Crop Prod.*, **2009**, 30, p.p. 333-337.
120. FARHAT, M., JORDÁN, M., CHAOUECH-HAMADA, R., LANDOULSI, A., and SOTOMAYOR, J. Variations in essential oil, phenolic components, and antioxidant activity of Tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57, p.p. 10349-10356.
121. STASHENKO, E., JARAMILLO, B., and MARTÍNEZ, J. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, **2003**, XXVII (105), p.p. 579-598.

- 122.** REDDY, M., ANGERS, P., GOSSELIN, A., and ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, **1998**, 47 (8), p.p. 1515-1520.
- 123.** BARANAUSKIENÉ, R., VENSKUTONIS, P., VISKELIS, P., and DAMBRAUSKIENE, E. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of Thyme (*Thymus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, p.p. 7751-7758.
- 124.** ARGYROPOULOU, C., DAFERERA, D., TARANTILIS, P., FASSEAS, C., and POLISSIOU, M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two development stages. *Biochem.Syst.Ecol.*, **2007**, 35, p.p. 831-837.
- 125.** CARNAT, A., CARNAT, A. P., FRAISSE, D., and LAMAISON, J. L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia*, **1999**, 70, p.p. 44-49.
- 126.** DELAZAR, A., NAZIFI, E., MOVAFEGHI, A., NAZEMIYEH, H., HEMMATI, S., NAHAR, L., and SARKER, S. Analyses of phytosterols and free radical scavengers in the bulbs of *Ornithogalum cuspidatum* Bertol. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas*, **2009**, 9 (2), p.p. 87-92.
- 127.** DUDAI, N., LEWINSOHN, E., LARKOV, O., KATZIR, I., RAVID, U., CHAIMOVITSH, D., SA'ADI, D., and PUTIEVSKY, E. Dynamics of yield components and essential oil production in a commercial hybrid sage (*Salvia officinalis* × *Salvia fruticosa* cv. Newe Ya'ar N° 4). *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, p.p. 4341-4345.
- 128.** SANTOS-GOMES, P., SEABRA, R., ANDRADE, P., and FERNANDES-FERREIRA, M. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*S. officinalis* L.). *Plant Sci.*, **2002**, 162, p.p. 981-987.
- 129.** IVANOVÍČ, J., DILAS, S., JADRANIN, M., VAJS, V., BABOVÍČ, N., PETROVÍČ, S., and ZIZOVÍČ, I. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Serb. Chem. Soc.*, **2009**, 74 (7), p.p. 717-732.

- 130.** EL-SAWI, S. A., and MOHAMED, M. A. Cumin herb as a new source of essential oils and its response to foliar spray with some micro-elements. *J. Food Chem.*, **2002**, 77, p.p. 75-80.
- 131.** BADI, H. N., YAZDANI, D., MOHAMMAD, S., and NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Ind. Crop Prod.*, **2004**, 19, p.p. 231-236.
- 132.** SAID-AL AHL, H. A. H., and MAHMOUD, A. A. Effect of Zinc and/or iron foliar application on growth and essential oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) under salt stress. *Ocean J. Appl. Sci.*, **2010**, 3 (1), p.p. 97-111.
- 133.** POLITEO, O., JUKIC, M., and MILOS, M. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spices plants. *Croat. Chem. Acta*, **2006**, 79, p.p. 545-552.
- 134.** MASUDA, T., INABA, Y., and TAKEDA, Y. Antioxidant mechanism of carnosic acid: structural identification of two oxidation products. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, p.p. 5060-5565.
- 135.** INATANI, R., NAKATANI, N., and FUWA, H. Antioxidative effect of constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, **1983**, 47, p.p. 521-528.

ANEXOS

**ANEXO 1. TABLAS DE COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS AE DE LAS
ESPECIES BAJO ESTUDIO**

Tabla 1.1. Composición química de los AE de *T. vulgaris*, obtenidos por MW-HD.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-I	TV-II	TV-III	TV-IV	TV-V
1	α-Tujeno	HM	933	1026	1.280 \pm 0.005	1.17 \pm 0.05	1.177 \pm 0.001	1.205 \pm 0.002	1.46 \pm 0.03
2	α -Pino* [*]	HM	942	1020	0.872 \pm 0.004	0.80 \pm 0.03	0.810 \pm 0.001	1.070 \pm 0.002	0.83 \pm 0.07
3	Canfeno* [*]	HM	958	1064	0.617 \pm 0.002	0.52 \pm 0.02	0.609 \pm 0.002	0.93 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02
4	Sabineno	HM	980	1117	0.717 \pm 0.004	0.63 \pm 0.01	0.817 \pm 0.001	0.833 \pm 0.001	0.66 \pm 0.06
5	3-Octenol	OC	985	1445	0.299 \pm 0.001	0.282 \pm 0.006	0.258 \pm 0.002	0.350 \pm 0.003	0.252 \pm 0.009
6	3-Octanona	OC	987	1252	0.061 \pm 0.003	0.038 \pm 0.004	0.053 \pm 0.002	0.059 \pm 0.003	0.040 \pm 0.002
7	β-Mirceno	HM	993	1163	1.059 \pm 0.003	1.18 \pm 0.05	1.465 \pm 0.001	1.395 \pm 0.002	1.47 \pm 0.03
8	Monoterpeno, C ₁₀ H ₁₆	HM	995	—	0.114 \pm 0.002	0.098 \pm 0.005	0.091 \pm 0.002	0.106 \pm 0.003	0.078 \pm 0.002
9	α -Felandreno	HM	1010	1200	0.142 \pm 0.003	0.134 \pm 0.005	0.166 \pm 0.001	0.118 \pm 0.002	0.132 \pm 0.002
10	Δ^3 -Careno	HM	1017	1146	0.106 \pm 0.002	0.097 \pm 0.003	0.101 \pm 0.001	0.105 \pm 0.004	0.102 \pm 0.004
11	α-Terpineno	HM	1023	1176	1.326 \pm 0.004	1.1 \pm 0.1	1.465 \pm 0.001	0.976 \pm 0.001	1.11 \pm 0.02
12	<i>p</i>-Cimeno*	HM	1034	1268	26.36 \pm 0.05	21.5 \pm 0.2	20.32 \pm 0.02	35.27 \pm 0.04	26.4 \pm 0.6
13	Limoneno	HM	1037	1193	0.573 \pm 0.002	0.55 \pm 0.01	0.548 \pm 0.004	0.669 \pm 0.005	0.56 \pm 0.02
14	1,8-Cineol*	MO	1040	1203	0.994 \pm 0.001	1.08 \pm 0.02	0.633 \pm 0.001	1.420 \pm 0.001	0.53 \pm 0.03
15	γ-Terpineno*	HM	1067	1244	6.27 \pm 0.01	6.4 \pm 0.6	10.94 \pm 0.01	7.147 \pm 0.008	7.19 \pm 0.05
16	<i>cis</i>-Hidrato de sabineno	MO	1075	1546	1.573 \pm 0.001	1.06 \pm 0.02	0.989 \pm 0.001	0.894 \pm 0.004	1.35 \pm 0.07
17	Terpinoleno	HM	1088	1279	0.047 \pm 0.001	0.065 \pm 0.003	0.036 \pm 0.003	0.027 \pm 0.001	0.028 \pm 0.001
18	<i>p</i> -Cimeno	HM	1094	1430	0.094 \pm 0.002	0.110 \pm 0.002	0.099 \pm 0.002	0.164 \pm 0.002	0.077 \pm 0.001
19	Linalol*	MO	1101	1541	2.908 \pm 0.001	2.68 \pm 0.01	2.826 \pm 0.003	2.905 \pm 0.001	2.17 \pm 0.07
20	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	MO	1104	1463	0.439 \pm 0.005	0.40 \pm 0.06	0.327 \pm 0.002	0.392 \pm 0.005	0.333 \pm 0.009
21	Alcanfor*	MO	1157	1513	0.44 \pm 0.01	0.28 \pm 0.05	0.529 \pm 0.006	0.553 \pm 0.006	0.142 \pm 0.004
22	Borneol*	MO	1178	1697	1.441 \pm 0.001	1.26 \pm 0.03	1.105 \pm 0.003	1.576 \pm 0.001	1.26 \pm 0.03
23	Terpinen-4-ol	MO	1187	1624	0.466 \pm 0.002	0.60 \pm 0.02	0.535 \pm 0.004	0.670 \pm 0.001	0.37 \pm 0.02
24	<i>p</i> -Cimeno-8-ol	MO	1193	1843	0.094 \pm 0.003	0.089 \pm 0.006	0.062 \pm 0.001	0.139 \pm 0.005	0.064 \pm 0.005
25	α -Terpineol	MO	1201	1729	0.177 \pm 0.009	0.203 \pm 0.005	0.134 \pm 0.001	0.256 \pm 0.002	0.130 \pm 0.002
26	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₆ O	MO	1208	—	0.104 \pm 0.007	0.099 \pm 0.006	0.062 \pm 0.002	0.115 \pm 0.001	0.069 \pm 0.003
27	Nerol	MO	1223	1792	0.10 \pm 0.01	0.085 \pm 0.001	0.037 \pm 0.003	0.049 \pm 0.002	0.041 \pm 0.001

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas. N.D: No identificado.

Tabla 1.1. Continuación.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-I	TV-II	TV-III	TV-IV	TV-V
28	Éter metílico de timol	MO	1238	1586	0.807 \pm 0.003	0.55 \pm 0.03	0.478 \pm 0.001	1.107 \pm 0.002	0.508 \pm 0.008
29	Éter metílico de carvacrol	MO	1248	1598	0.689 \pm 0.002	0.45 \pm 0.01	0.306 \pm 0.002	0.649 \pm 0.002	0.476 \pm 0.003
30	Neral	MO	1250	1675	0.037 \pm 0.001	0.041 \pm 0.002	0.033 \pm 0.003	N.D.	N.D.
31	Timoquinona	MO	1258	1226	0.208 \pm 0.005	0.09 \pm 0.02	0.043 \pm 0.003	0.162 \pm 0.003	0.088 \pm 0.002
32	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1260	—	0.119 \pm 0.001	0.078 \pm 0.002	0.075 \pm 0.001	N.D.	N.D.
33	Geraniol	MO	1281	1841	0.048 \pm 0.002	0.057 \pm 0.001	0.157 \pm 0.004	0.204 \pm 0.003	0.137 \pm 0.002
34	Acetato de bornilo	OC	1284	1579	0.350 \pm 0.002	0.27 \pm 0.01	N.D.	N.D.	N.D.
35	Timol*	MO	1298	2172	41.75 \pm 0.03	49.5 \pm 0.8	47.76 \pm 0.04	35.50 \pm 0.03	45.9 \pm 0.1
36	Carvacrol*	MO	1306	2199	1.888 \pm 0.001	2.34 \pm 0.05	2.144 \pm 0.002	1.884 \pm 0.007	2.01 \pm 0.02
37	Acetato de timilo	OC	1360	1347	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
38	Eugenol	MO	1366	2188	0.056 \pm 0.005	0.050 \pm 0.005	0.042 \pm 0.001	0.053 \pm 0.002	0.033 \pm 0.002
39	α -Copaeno	HS	1388	1493	0.039 \pm 0.003	0.034 \pm 0.001	0.028 \pm 0.002	0.072 \pm 0.003	0.023 \pm 0.001
40	β -Bourboneno	HS	1393	1520	0.026 \pm 0.001	0.024 \pm 0.001	0.016 \pm 0.002	0.036 \pm 0.005	N.D.
41	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1444	1598	3.336 \pm 0.002	2.58 \pm 0.04	1.89 \pm 0.01	2.319 \pm 0.004	2.20 \pm 0.08
42	β -Copaeno	HS	1451	1593	0.062 \pm 0.005	0.046 \pm 0.004	0.029 \pm 0.001	0.058 \pm 0.001	0.051 \pm 0.001
43	α -Humuleno	HS	1477	1814	0.142 \pm 0.001	0.110 \pm 0.005	0.078 \pm 0.001	0.100 \pm 0.001	0.086 \pm 0.002
44	γ -Muuroleno	HS	1484	1689	0.045 \pm 0.006	0.081 \pm 0.004	0.055 \pm 0.001	0.031 \pm 0.003	0.048 \pm 0.002
45	Germacreno D	HS	1502	1709	0.399 \pm 0.003	0.15 \pm 0.01	0.104 \pm 0.002	0.110 \pm 0.001	0.237 \pm 0.002
46	γ -Amorfeno	HS	1515	1722	0.064 \pm 0.005	N.D.	N.D.	0.093 \pm 0.001	N.D.
47	Biciclogermacreno	HS	1517	1732	0.069 \pm 0.002	0.081 \pm 0.004	0.041 \pm 0.001	0.086 \pm 0.002	0.061 \pm 0.001
48	β -Bisaboleno	HS	1520	1722	0.078 \pm 0.001	0.035 \pm 0.002	0.129 \pm 0.004	0.068 \pm 0.001	0.110 \pm 0.003
49	γ -Cadineno	HS	1534	1758	0.225 \pm 0.001	0.12 \pm 0.01	0.103 \pm 0.001	0.206 \pm 0.001	0.22 \pm 0.01
50	δ -Cadineno	HS	1541	1754	0.186 \pm 0.001	0.187 \pm 0.001	0.122 \pm 0.003	0.161 \pm 0.001	0.105 \pm 0.002
51	Butanoato de geraniol	SO	1543	1541	0.040 \pm 0.001	N.D.	N.D.	0.058 \pm 0.002	0.057 \pm 0.002
52	Germacreno D-4-ol	SO	1564	2048	0.06 \pm 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
53	Óxido de cariofileno	SO	1610	1984	0.473 \pm 0.008	0.35 \pm 0.01	0.172 \pm 0.001	0.580 \pm 0.001	0.207 \pm 0.005
54	1,10- <i>epi</i> -Cubenol	SO	1639	2057	0.038 \pm 0.001	0.057 \pm 0.002	N.D.	N.D.	N.D.
55	10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	SO	1649	2103	0.101 \pm 0.005	0.077 \pm 0.004	N.D.	N.D.	N.D.
56	<i>epi</i> - α -Cadinol	SO	1664	2225	N.D.	N.D.	N.D.	0.075 \pm 0.002	0.108 \pm 0.001

Tabla 1.2. Composición química de los AE de *T. vulgaris*, obtenidos por MW-HD.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-VI	TV-VII	TV-VIII	TV-IX	TV-X
1	α-Tujeno	HM	933	1026	1.198 \pm 0.002	1.177 \pm 0.001	0.993 \pm 0.004	1.011 \pm 0.003	0.971 \pm 0.002
2	α -Pino* [*]	HM	942	1020	0.828 \pm 0.001	1.001 \pm 0.001	1.24 \pm 0.02	0.907 \pm 0.003	0.81 \pm 0.01
3	Canfeno* [*]	HM	958	1064	0.750 \pm 0.001	0.737 \pm 0.001	1.13 \pm 0.01	0.936 \pm 0.007	0.628 \pm 0.008
4	Sabineno	HM	980	1117	0.602 \pm 0.001	0.844 \pm 0.001	1.002 \pm 0.006	0.959 \pm 0.003	0.92 \pm 0.01
5	3-Octenol	OC	985	1445	0.253 \pm 0.001	0.333 \pm 0.001	0.351 \pm 0.003	0.304 \pm 0.001	0.280 \pm 0.005
6	3-Octanona	OC	987	1252	0.045 \pm 0.001	0.083 \pm 0.001	0.089 \pm 0.001	0.064 \pm 0.001	0.055 \pm 0.001
7	β-Mirceno	HM	993	1163	1.311 \pm 0.001	1.160 \pm 0.001	1.19 \pm 0.01	1.241 \pm 0.001	1.19 \pm 0.02
8	Monoterpeno, C ₁₀ H ₁₆	HM	995	—	0.096 \pm 0.002	0.126 \pm 0.005	0.138 \pm 0.001	0.143 \pm 0.002	0.118 \pm 0.002
9	α -Felandreno	HM	1010	1200	0.175 \pm 0.002	0.150 \pm 0.002	0.135 \pm 0.002	0.118 \pm 0.001	0.150 \pm 0.003
10	Δ^3 -Careno	HM	1017	1146	0.100 \pm 0.001	0.099 \pm 0.001	0.098 \pm 0.002	0.100 \pm 0.001	0.099 \pm 0.002
11	α-Terpineno	HM	1023	1176	1.554 \pm 0.001	1.167 \pm 0.001	1.024 \pm 0.004	1.045 \pm 0.001	1.49 \pm 0.02
12	<i>p</i>-Cimeno*	HM	1034	1268	18.29 \pm 0.02	29.64 \pm 0.02	38.6 \pm 0.8	30.0 \pm 0.1	22.4 \pm 0.5
13	Limoneno	HM	1037	1193	0.541 \pm 0.001	0.622 \pm 0.001	0.776 \pm 0.007	0.635 \pm 0.001	0.597 \pm 0.009
14	1,8-Cineol*	MO	1040	1203	0.493 \pm 0.003	2.212 \pm 0.002	2.06 \pm 0.02	1.551 \pm 0.005	1.05 \pm 0.03
15	γ-Terpineno*	HM	1067	1244	10.54 \pm 0.004	7.136 \pm 0.004	6.74 \pm 0.07	8.81 \pm 0.08	9.4 \pm 0.1
16	<i>cis</i>-Hidrato de sabineno	MO	1075	1546	1.657 \pm 0.001	1.152 \pm 0.001	0.561 \pm 0.008	0.814 \pm 0.001	1.04 \pm 0.02
17	Terpinoleno	HM	1088	1279	0.027 \pm 0.001	0.088 \pm 0.001	0.039 \pm 0.001	N.D.	0.039 \pm 0.001
18	<i>p</i> -Cimeno	HM	1094	1430	0.095 \pm 0.002	0.130 \pm 0.002	0.209 \pm 0.002	0.176 \pm 0.001	0.135 \pm 0.002
19	Linalol*	MO	1101	1541	2.651 \pm 0.001	3.236 \pm 0.003	3.66 \pm 0.04	3.83 \pm 0.02	3.22 \pm 0.05
20	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	MO	1104	1463	0.450 \pm 0.003	0.435 \pm 0.001	0.285 \pm 0.006	0.361 \pm 0.001	0.368 \pm 0.005
21	Alcanfor*	MO	1157	1513	0.58 \pm 0.02	0.542 \pm 0.001	0.74 \pm 0.01	2.25 \pm 0.07	0.47 \pm 0.01
22	Borneol*	MO	1178	1697	2.086 \pm 0.001	1.699 \pm 0.005	2.03 \pm 0.02	0.983 \pm 0.002	1.53 \pm 0.03
23	Terpinen-4-ol	MO	1187	1624	0.381 \pm 0.003	0.757 \pm 0.001	1.05 \pm 0.01	0.140 \pm 0.001	0.66 \pm 0.01
24	<i>p</i> -Cimen-8-ol	MO	1193	1843	0.079 \pm 0.002	0.113 \pm 0.001	0.124 \pm 0.003	0.264 \pm 0.001	0.089 \pm 0.002
25	α -Terpineol	MO	1201	1729	0.178 \pm 0.002	0.404 \pm 0.003	0.46 \pm 0.01	0.143 \pm 0.001	0.225 \pm 0.004
26	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₆ O	MO	1208	—	0.100 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.	0.102 \pm 0.002
27	Nerol	MO	1223	1792	0.155 \pm 0.004	0.071 \pm 0.001	0.040 \pm 0.002	0.053 \pm 0.001	0.051 \pm 0.001

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas. N.D: No identificado.

Tabla 1.2. Continuación.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-VI	TV-VII	TV-VIII	TV-IX	TV-X
28	Éter metílico de timol	MO	1238	1586	0.875 \pm 0.004	1.357 \pm 0.001	0.596 \pm 0.008	1.437 \pm 0.001	0.74 \pm 0.01
29	Éter metílico de carvacrol	MO	1248	1598	0.707 \pm 0.001	0.750 \pm 0.003	0.618 \pm 0.006	0.821 \pm 0.009	0.585 \pm 0.009
30	Neral	MO	1250	1675	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
31	Timoquinona	MO	1258	1226	0.229 \pm 0.003	0.175 \pm 0.001	0.116 \pm 0.005	0.124 \pm 0.002	0.114 \pm 0.003
32	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1260	—	0.057 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
33	Geraniol	MO	1281	1841	0.373 \pm 0.003	0.137 \pm 0.003	0.163 \pm 0.002	0.142 \pm 0.003	0.128 \pm 0.002
34	Acetato de bornilo	OC	1284	1579	N.D.	0.126 \pm 0.004	N.D.	N.D.	N.D.
35	Timol*	MO	1298	2172	44.47 \pm 0.02	37.37 \pm 0.04	29.0 \pm 0.6	35.49 \pm 0.06	43.9 \pm 0.2
36	Carvacrol*	MO	1306	2199	1.693 \pm 0.003	1.75 \pm 0.01	1.74 \pm 0.02	1.814 \pm 0.001	2.27 \pm 0.04
37	Acetato de timilo	OC	1360	1347	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
38	Eugenol	MO	1366	2188	0.053 \pm 0.001	0.039 \pm 0.001	0.035 \pm 0.001	N.D.	0.041 \pm 0.001
39	α -Copaeno	HS	1388	1493	0.044 \pm 0.001	0.049 \pm 0.002	0.072 \pm 0.001	0.067 \pm 0.001	0.047 \pm 0.001
40	β -Bourboneno	HS	1393	1520	0.025 \pm 0.001	N.D.	0.035 \pm 0.001	0.029 \pm 0.001	0.034 \pm 0.001
41	trans-β-Cariofileno*	HS	1444	1598	4.053 \pm 0.002	1.777 \pm 0.001	1.46 \pm 0.01	1.882 \pm 0.006	2.51 \pm 0.04
42	β -Copaeno	HS	1451	1593	0.067 \pm 0.001	0.079 \pm 0.001	0.036 \pm 0.001	0.050 \pm 0.001	0.041 \pm 0.001
43	α -Humuleno	HS	1477	1814	0.162 \pm 0.002	0.072 \pm 0.001	0.068 \pm 0.001	0.089 \pm 0.001	0.126 \pm 0.002
44	γ -Muuroleno	HS	1484	1689	0.067 \pm 0.001	0.034 \pm 0.001	N.D.	0.074 \pm 0.001	0.036 \pm 0.001
45	Germacreno D	HS	1502	1709	0.649 \pm 0.002	0.064 \pm 0.002	0.074 \pm 0.001	0.054 \pm 0.001	0.093 \pm 0.002
46	γ -Amorfenol	HS	1515	1722	0.043 \pm 0.001	0.135 \pm 0.004	N.D.	N.D.	0.055 \pm 0.001
47	Biciclogermacreno	HS	1517	1732	0.061 \pm 0.001	0.072 \pm 0.001	0.054 \pm 0.001	0.052 \pm 0.001	0.065 \pm 0.001
48	β -Bisaboleno	HS	1520	1722	0.057 \pm 0.001	0.065 \pm 0.001	0.053 \pm 0.001	0.051 \pm 0.001	0.047 \pm 0.002
49	γ -Cadineno	HS	1534	1758	0.204 \pm 0.005	0.126 \pm 0.004	0.135 \pm 0.002	0.151 \pm 0.001	0.188 \pm 0.002
50	δ -Cadineno	HS	1541	1754	0.180 \pm 0.001	0.129 \pm 0.001	0.110 \pm 0.001	0.125 \pm 0.001	0.206 \pm 0.004
51	Butanoato de geraniol	SO	1543	1541	N.D.	N.D.	0.052 \pm 0.001	0.045 \pm 0.001	N.D.
52	Germacreno D-4-ol	SO	1564	2048	0.066 \pm 0.002	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
53	Óxido de cariofileno	SO	1610	1984	0.376 \pm 0.002	0.470 \pm 0.004	0.687 \pm 0.008	0.552 \pm 0.002	0.424 \pm 0.006
54	1,10- <i>epi</i> -Cubenol	SO	1639	2057	N.D.	N.D.	N.D.	0.075 \pm 0.001	0.035 \pm 0.001
55	10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	SO	1649	2103	0.119 \pm 0.001	0.047 \pm 0.002	N.D.	0.045 \pm 0.001	0.035 \pm 0.001
56	<i>epi</i> - α -Cadinol	SO	1664	2225	0.180 \pm 0.004	0.074 \pm 0.002	0.071 \pm 0.001	N.D.	0.107 \pm 0.001

Tabla 1.3. Composición química de los AE de *T. vulgaris*, obtenidos por MW-HD y AV.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-XI ^a	TV-XII ^b	TV-XIII ^b	TV-XIV ^b	TV-XV ^b
1	α-Tujeno	HM	933	1026	1.03 \pm 0.01	0.74 \pm 0.01	0.475 \pm 0.003	0.754 \pm 0.002	0.777 \pm 0.002
2	α -Pino* [*]	HM	942	1020	0.80 \pm 0.01	0.422 \pm 0.002	0.286 \pm 0.001	0.436 \pm 0.001	0.496 \pm 0.001
3	Canfeno*	HM	958	1064	0.634 \pm 0.007	0.388 \pm 0.003	0.282 \pm 0.003	0.349 \pm 0.001	0.382 \pm 0.001
4	Sabineno	HM	980	1117	0.93 \pm 0.01	0.88 \pm 0.01	0.820 \pm 0.004	0.835 \pm 0.001	0.759 \pm 0.002
5	3-Octenol	OC	985	1445	0.280 \pm 0.004	0.186 \pm 0.001	0.146 \pm 0.002	0.184 \pm 0.001	0.192 \pm 0.001
6	3-Octanona	OC	987	1252	0.061 \pm 0.001	0.063 \pm 0.001	0.075 \pm 0.001	0.063 \pm 0.001	0.061 \pm 0.001
7	β-Mirceno	HM	993	1163	1.39 \pm 0.02	1.31 \pm 0.01	1.032 \pm 0.003	1.268 \pm 0.003	1.312 \pm 0.003
8	Monoterpeno, C ₁₀ H ₁₆	HM	995	—	0.101 \pm 0.001	0.119 \pm 0.001	0.129 \pm 0.001	0.107 \pm 0.002	0.102 \pm 0.001
9	α -Felandreno	HM	1010	1200	0.170 \pm 0.002	0.146 \pm 0.001	0.103 \pm 0.001	N.D.	0.139 \pm 0.001
10	Δ^3 -Careno	HM	1017	1146	0.094 \pm 0.001	0.086 \pm 0.001	0.070 \pm 0.002	0.139 \pm 0.002	0.087 \pm 0.002
11	α-Terpineno	HM	1023	1176	1.68 \pm 0.03	1.26 \pm 0.01	0.821 \pm 0.004	1.192 \pm 0.002	1.192 \pm 0.002
12	<i>p</i>-Cimeno*	HM	1034	1268	19.6 \pm 0.3	17.9 \pm 0.1	15.93 \pm 0.09	16.88 \pm 0.03	15.58 \pm 0.06
13	Limoneno	HM	1037	1193	0.59 \pm 0.01	0.518 \pm 0.002	0.410 \pm 0.001	0.480 \pm 0.001	0.481 \pm 0.002
14	1,8-Cineol*	MO	1040	1203	1.16 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	1.110 \pm 0.002	0.955 \pm 0.001	0.866 \pm 0.002
15	γ-Terpineno*	HM	1067	1244	11.9 \pm 0.1	12.53 \pm 0.09	9.28 \pm 0.02	12.07 \pm 0.02	11.73 \pm 0.03
16	<i>cis</i>-Hidrato de sabineno	MO	1075	1546	1.11 \pm 0.01	1.56 \pm 0.01	1.69 \pm 0.01	1.591 \pm 0.002	1.397 \pm 0.002
17	Terpinoleno	HM	1088	1279	0.041 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	<i>p</i> -Cimeno	HM	1094	1430	0.133 \pm 0.002	0.091 \pm 0.001	0.081 \pm 0.001	0.091 \pm 0.001	0.089 \pm 0.001
19	Linalol*	MO	1101	1541	3.10 \pm 0.04	3.04 \pm 0.02	3.60 \pm 0.01	3.093 \pm 0.004	3.022 \pm 0.007
20	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	MO	1104	1463	0.290 \pm 0.004	0.228 \pm 0.002	0.230 \pm 0.002	0.239 \pm 0.002	0.214 \pm 0.002
21	Alcanfor*	MO	1157	1513	0.203 \pm 0.002	0.65 \pm 0.01	0.234 \pm 0.001	0.620 \pm 0.001	0.462 \pm 0.001
22	Borneol*	MO	1178	1697	1.61 \pm 0.02	1.55 \pm 0.01	1.72 \pm 0.01	1.420 \pm 0.002	1.281 \pm 0.004
23	Terpinen-4-ol	MO	1187	1624	0.77 \pm 0.01	0.499 \pm 0.003	0.483 \pm 0.002	0.493 \pm 0.001	0.438 \pm 0.001
24	<i>p</i> -Cimeno-8-ol	MO	1193	1843	0.087 \pm 0.001	0.048 \pm 0.001	0.041 \pm 0.001	0.048 \pm 0.001	0.047 \pm 0.001
25	α -Terpineol	MO	1201	1729	0.195 \pm 0.002	0.179 \pm 0.001	0.183 \pm 0.001	0.189 \pm 0.002	0.185 \pm 0.001
26	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₆ O	MO	1208	—	N.D.	0.111 \pm 0.001	N.D.	0.111 \pm 0.001	0.100 \pm 0.002
27	Nerol	MO	1223	1792	0.042 \pm 0.001	0.032 \pm 0.001	0.040 \pm 0.001	0.038 \pm 0.001	0.032 \pm 0.001

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas. N.D: No identificado. ^aObtenido por MWHD. ^bObtenido por AV.

Tabla 1.3. Continuación.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-XI ^a	TV-XII ^b	TV-XIII ^b	TV-XIV ^b	TV-XV ^b
28	Éter metílico de timol	MO	1238	1586	0.736 \pm 0.009	0.452 \pm 0.002	0.691 \pm 0.002	0.704 \pm 0.001	0.707 \pm 0.002
29	Éter metílico de carvacrol	MO	1248	1598	0.577 \pm 0.008	0.438 \pm 0.002	0.680 \pm 0.003	0.693 \pm 0.001	0.628 \pm 0.002
30	Neral	MO	1250	1675	N.D.	0.058 \pm 0.001	0.066 \pm 0.001	N.D.	0.058 \pm 0.001
31	Timoquinona	MO	1258	1226	0.096 \pm 0.001	0.109 \pm 0.001	0.096 \pm 0.001	0.104 \pm 0.001	0.075 \pm 0.001
32	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1260	—	0.079 \pm 0.001	N.D.	N.D.	0.080 \pm 0.001	0.073 \pm 0.001
33	Geraniol	MO	1281	1841	0.120 \pm 0.001	0.082 \pm 0.002	0.081 \pm 0.002	0.091 \pm 0.002	0.109 \pm 0.002
34	Acetato de bornilo	OC	1284	1579	N.D.	N.D.	0.093 \pm 0.001	N.D.	N.D.
35	Timol*	MO	1298	2172	44.6 \pm 0.6	48.2 \pm 0.3	52.95 \pm 0.09	49.02 \pm 0.07	49.62 \pm 0.08
36	Carvacrol*	MO	1306	2199	2.20 \pm 0.03	2.10 \pm 0.02	2.28 \pm 0.01	1.956 \pm 0.004	1.980 \pm 0.003
37	Acetato de timilo	OC	1360	1347	N.D.	0.125 \pm 0.002	0.114 \pm 0.003	0.105 \pm 0.001	1.134 \pm 0.004
38	Eugenol	MO	1366	2188	0.041 \pm 0.001	0.087 \pm 0.001	N.D.	N.D.	0.035 \pm 0.001
39	α -Copaeno	HS	1388	1493	0.045 \pm 0.001	0.027 \pm 0.001	0.041 \pm 0.001	0.035 \pm 0.001	0.032 \pm 0.001
40	β -Bourboneno	HS	1393	1520	0.035 \pm 0.001	0.020 \pm 0.001	N.D.	N.D.	0.020 \pm 0.001
41	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1444	1598	2.18 \pm 0.03	1.97 \pm 0.01	2.21 \pm 0.01	2.310 \pm 0.003	3.469 \pm 0.007
42	β -Copaeno	HS	1451	1593	0.037 \pm 0.001	0.035 \pm 0.001	0.049 \pm 0.001	0.045 \pm 0.001	0.062 \pm 0.001
43	α -Humuleno	HS	1477	1814	0.111 \pm 0.003	0.087 \pm 0.001	0.119 \pm 0.001	0.112 \pm 0.002	0.158 \pm 0.001
44	γ -Muuroleno	HS	1484	1689	0.031 \pm 0.001	0.028 \pm 0.001	0.028 \pm 0.001	0.031 \pm 0.001	0.045 \pm 0.002
45	Germacreno D	HS	1502	1709	0.079 \pm 0.001	0.042 \pm 0.002	0.046 \pm 0.001	0.036 \pm 0.001	0.060 \pm 0.002
46	γ -Amorfeno	HS	1515	1722	0.080 \pm 0.002	0.215 \pm 0.001	N.D.	N.D.	0.472 \pm 0.002
47	Biciclogermacreno	HS	1517	1732	0.050 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001	0.051 \pm 0.001	0.285 \pm 0.001	N.D.
48	β -Bisaboleno	HS	1520	1722	0.055 \pm 0.001	0.050 \pm 0.002	0.059 \pm 0.001	0.115 \pm 0.002	0.215 \pm 0.001
49	γ -Cadineno	HS	1534	1758	0.165 \pm 0.002	0.108 \pm 0.001	0.118 \pm 0.001	0.115 \pm 0.001	0.165 \pm 0.004
50	δ -Cadineno	HS	1541	1754	0.175 \pm 0.002	0.102 \pm 0.001	0.115 \pm 0.001	0.093 \pm 0.001	0.15 \pm 0.01
51	Butanoato de geraniol	SO	1543	1541	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
52	Germacreno D-4-ol	SO	1564	2048	N.D.	0.035 \pm 0.001	0.054 \pm 0.001	0.054 \pm 0.001	N.D.
53	Óxido de cariofileno	SO	1610	1984	0.401 \pm 0.004	0.205 \pm 0.002	0.381 \pm 0.002	0.281 \pm 0.001	0.235 \pm 0.001
54	1,10- <i>epi</i> -Cubenol	SO	1639	2057	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
55	10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	SO	1649	2103	0.035 \pm 0.001	N.D.	0.047 \pm 0.001	0.035 \pm 0.001	0.035 \pm 0.001
56	<i>epi</i> - α -Cadinol	SO	1664	2225	0.100 \pm 0.001	N.D.	0.10 \pm 0.01	0.083 \pm 0.001	0.063 \pm 0.001

Tabla 1.4. Composición química de los AE de *T. vulgaris*, obtenidos por AV.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-XVI	TV-XVII	TV-XVIII	TV-XIX	TV-XX
1	α-Tujeno	HM	933	1026	0.702 \pm 0.001	0.639 \pm 0.003	2.154 \pm 0.005	2.00 \pm 0.01	1.764 \pm 0.001
2	α -Pino* [*]	HM	942	1020	0.455 \pm 0.001	0.408 \pm 0.001	1.686 \pm 0.003	1.70 \pm 0.01	1.118 \pm 0.002
3	Canfeno* [*]	HM	958	1064	0.356 \pm 0.001	0.301 \pm 0.004	1.468 \pm 0.004	1.41 \pm 0.01	0.859 \pm 0.004
4	Sabineno	HM	980	1117	0.663 \pm 0.001	0.632 \pm 0.001	1.231 \pm 0.002	1.14 \pm 0.01	0.942 \pm 0.001
5	3-Octenol	OC	985	1445	0.177 \pm 0.004	0.162 \pm 0.001	0.473 \pm 0.001	0.470 \pm 0.002	0.342 \pm 0.001
6	3-Octanona	OC	987	1252	0.050 \pm 0.001	0.050 \pm 0.001	0.073 \pm 0.001	0.079 \pm 0.001	0.050 \pm 0.001
7	β-Mirceno	HM	993	1163	1.311 \pm 0.001	1.251 \pm 0.001	2.452 \pm 0.004	2.27 \pm 0.01	2.408 \pm 0.001
8	Monoterpeno, C ₁₀ H ₁₆	HM	995	—	0.088 \pm 0.001	0.092 \pm 0.001	0.158 \pm 0.001	0.154 \pm 0.001	0.107 \pm 0.001
9	α -Felandreno	HM	1010	1200	0.151 \pm 0.002	0.144 \pm 0.001	0.019 \pm 0.001	0.260 \pm 0.001	0.260 \pm 0.001
10	Δ^3 -Careno	HM	1017	1146	0.085 \pm 0.001	0.080 \pm 0.001	0.276 \pm 0.001	0.169 \pm 0.001	0.152 \pm 0.001
11	α-Terpineno	HM	1023	1176	1.204 \pm 0.002	1.186 \pm 0.002	0.178 \pm 0.002	2.18 \pm 0.01	2.096 \pm 0.002
12	<i>p</i>-Cimeno*	HM	1034	1268	13.64 \pm 0.02	12.75 \pm 0.05	38.2 \pm 0.1	39.62 \pm 0.05	20.994 \pm 0.002
13	Limoneno	HM	1037	1193	0.471 \pm 0.001	0.446 \pm 0.002	1.008 \pm 0.002	0.983 \pm 0.004	0.783 \pm 0.001
14	1,8-Cineol*	MO	1040	1203	0.639 \pm 0.001	0.657 \pm 0.001	1.442 \pm 0.001	1.578 \pm 0.003	0.896 \pm 0.001
15	γ-Terpineno*	HM	1067	1244	11.82 \pm 0.02	12.24 \pm 0.01	18.57 \pm 0.05	19.92 \pm 0.05	21.213 \pm 0.003
16	<i>cis</i>-Hidrato de sabineno	MO	1075	1546	1.329 \pm 0.003	1.346 \pm 0.001	1.556 \pm 0.003	1.16 \pm 0.01	1.139 \pm 0.001
17	Terpinoleno	HM	1088	1279	0.088 \pm 0.001	0.088 \pm 0.001	0.020 \pm 0.001	N.D.	0.020 \pm 0.001
18	<i>p</i> -Cimeno	HM	1094	1430	N.D.	N.D.	0.199 \pm 0.002	0.215 \pm 0.001	0.134 \pm 0.003
19	Linalol*	MO	1101	1541	2.874 \pm 0.006	2.946 \pm 0.001	4.18 \pm 0.01	3.99 \pm 0.01	2.807 \pm 0.001
20	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	MO	1104	1463	0.197 \pm 0.001	0.188 \pm 0.001	0.406 \pm 0.001	0.365 \pm 0.002	0.282 \pm 0.004
21	Alcanfor*	MO	1157	1513	0.411 \pm 0.001	0.133 \pm 0.003	0.628 \pm 0.002	0.635 \pm 0.002	1.742 \pm 0.001
22	Borneol*	MO	1178	1697	1.296 \pm 0.002	1.285 \pm 0.004	1.588 \pm 0.004	1.588 \pm 0.003	1.517 \pm 0.001
23	Terpinen-4-ol	MO	1187	1624	0.437 \pm 0.001	0.445 \pm 0.001	0.608 \pm 0.003	0.686 \pm 0.002	0.678 \pm 0.001
24	<i>p</i> -Cimen-8-ol	MO	1193	1843	0.049 \pm 0.003	N.D.	0.050 \pm 0.001	0.057 \pm 0.001	0.034 \pm 0.001
25	α -Terpineol	MO	1201	1729	0.147 \pm 0.004	0.161 \pm 0.002	0.162 \pm 0.001	0.169 \pm 0.001	0.216 \pm 0.001
26	Monoterpeno oxigenado, C ₁₁ H ₁₆ O	MO	1208	—	0.069 \pm 0.001	0.073 \pm 0.001	0.132 \pm 0.002	N.D.	0.103 \pm 0.001
27	Nerol	MO	1223	1792	0.029 \pm 0.001	0.033 \pm 0.001	0.020 \pm 0.001	0.021 \pm 0.001	0.051 \pm 0.001

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas. N.D.: No identificado.

Tabla 1.4. Continuación.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	TV-XVI	TV-XVII	TV-XVIII	TV-XIX	TV-XX
28	Éter metílico de timol	MO	1238	1586	0.429 \pm 0.001	0.451 \pm 0.001	0.900 \pm 0.003	0.88 \pm 0.01	0.674 \pm 0.001
29	Éter metílico de carvacrol	MO	1248	1598	0.486 \pm 0.002	0.481 \pm 0.003	0.863 \pm 0.001	0.796 \pm 0.001	0.667 \pm 0.001
30	Neral	MO	1250	1675	0.042 \pm 0.001	0.052 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.
31	Timoquinona	MO	1258	1226	0.061 \pm 0.001	0.067 \pm 0.001	0.031 \pm 0.001	0.044 \pm 0.001	0.031 \pm 0.001
32	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1260	—	0.091 \pm 0.001	0.063 \pm 0.002	0.036 \pm 0.001	0.037 \pm 0.001	0.027 \pm 0.001
33	Geraniol	MO	1281	1841	N.D.	0.092 \pm 0.001	N.D.	N.D.	0.037 \pm 0.001
34	Acetato de bornilo	OC	1284	1579	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
35	Timol*	MO	1298	2172	53.09 \pm 0.05	54.06 \pm 0.01	14.29 \pm 0.03	13.53 \pm 0.03	28.966 \pm 0.003
36	Carvacrol*	MO	1306	2199	2.043 \pm 0.001	2.063 \pm 0.003	0.642 \pm 0.001	0.607 \pm 0.002	1.029 \pm 0.001
37	Acetato de timilo	OC	1360	1347	N.D.	0.095 \pm 0.001	0.045 \pm 0.001	0.048 \pm 0.002	0.113 \pm 0.001
38	Eugenol	MO	1366	2188	N.D.	0.025 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.
39	α -Copaeno	HS	1388	1493	0.028 \pm 0.001	0.031 \pm 0.001	0.060 \pm 0.001	0.065 \pm 0.001	0.025 \pm 0.001
40	β -Bourboneno	HS	1393	1520	0.021 \pm 0.001	0.027 \pm 0.001	0.046 \pm 0.001	0.049 \pm 0.001	0.029 \pm 0.001
41	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1444	1598	3.584 \pm 0.003	3.532 \pm 0.002	3.387 \pm 0.007	3.29 \pm 0.02	4.459 \pm 0.002
42	β -Copaeno	HS	1451	1593	0.060 \pm 0.001	0.054 \pm 0.002	0.068 \pm 0.001	0.067 \pm 0.002	0.072 \pm 0.001
43	α -Humuleno	HS	1477	1814	0.132 \pm 0.001	0.134 \pm 0.004	0.086 \pm 0.001	0.097 \pm 0.002	0.196 \pm 0.001
44	γ -Muuroleno	HS	1484	1689	0.044 \pm 0.001	0.039 \pm 0.001	0.032 \pm 0.001	0.036 \pm 0.001	0.045 \pm 0.001
45	Germacreno D	HS	1502	1709	0.057 \pm 0.001	0.053 \pm 0.001	0.101 \pm 0.001	0.113 \pm 0.001	0.048 \pm 0.001
46	γ -Amorfeno	HS	1515	1722	0.480 \pm 0.004	0.473 \pm 0.001	0.121 \pm 0.002	0.084 \pm 0.001	N.D.
47	Biciclogermacreno	HS	1517	1732	0.161 \pm 0.001	0.129 \pm 0.001	0.038 \pm 0.001	0.046 \pm 0.001	0.087 \pm 0.001
48	β -Bisaboleno	HS	1520	1722	0.136 \pm 0.001	N.D.	0.037 \pm 0.001	0.039 \pm 0.001	0.037 \pm 0.001
49	γ -Cadineno	HS	1534	1758	0.132 \pm 0.001	0.116 \pm 0.001	0.112 \pm 0.001	0.137 \pm 0.001	0.120 \pm 0.001
50	δ -Cadineno	HS	1541	1754	0.129 \pm 0.001	0.119 \pm 0.001	0.123 \pm 0.002	0.149 \pm 0.001	0.092 \pm 0.001
51	Butanoato de geraniol	SO	1543	1541	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
52	Germacreno D-4-ol	SO	1564	2048	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
53	Óxido de cariofileno	SO	1610	1984	N.D.	0.120 \pm 0.001	0.047 \pm 0.001	0.075 \pm 0.001	0.065 \pm 0.001
54	1,10- <i>epi</i> -Cubenol	SO	1639	2057	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
55	10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	SO	1649	2103	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
56	<i>epi</i> - α -Cadinol	SO	1664	2225	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Tabla 1.5. Composición química de los AE de *R. officinalis*, obtenidos por MW-HD.

Nº Pico	Compuesto	TIP O	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	RO-I	RO-II	RO-III	RO-IV	RO-V
1	Tricileno	HM	930	1004	0.232 \pm 0.002	0.468 \pm 0.001	0.480 \pm 0.001	0.299 \pm 0.001	0.412 \pm 0.005
2	α -Tujeno	HM	933	1026	0.136 \pm 0.001	0.232 \pm 0.001	0.149 \pm 0.001	0.224 \pm 0.001	0.230 \pm 0.001
3	α-Pino*	HM	944	1023	36.138 \pm 0.001	19.184 \pm 0.001	21.982 \pm 0.002	18.672 \pm 0.001	19.765 \pm 0.002
4	α -Fencheno	HM	956	1056	0.422 \pm 0.001	0.277 \pm 0.002	0.289 \pm 0.003	N.D.	0.205 \pm 0.001
5	Canfeno*	HM	958	1064	5.232 \pm 0.001	0.001	12.894 \pm 0.002	13.061 \pm 0.002	8.600 \pm 0.001
6	Tuja-2,4(10)-dieno	HM	962	1120	0.545 \pm 0.001	0.240 \pm 0.001	0.248 \pm 0.003	0.196 \pm 0.003	0.203 \pm 0.001
7	Sabineno	HM	980	1117	0.068 \pm 0.001	0.083 \pm 0.001	0.053 \pm 0.001	0.095 \pm 0.001	0.097 \pm 0.001
8	β-Pino	HM	985	1101	2.539 \pm 0.002	3.807 \pm 0.002	2.881 \pm 0.003	4.560 \pm 0.001	4.321 \pm 0.003
9	β -Mirceno	HM	993	1163	0.954 \pm 0.002	0.777 \pm 0.003	0.754 \pm 0.001	0.974 \pm 0.001	0.812 \pm 0.001
10	<i>p</i> -Menta-1(7),8-dieno	HM	996	1166	0.028 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001	N.D.
11	α-Felandreno	HM	1009	1200	0.253 \pm 0.001	2.401 \pm 0.001	2.336 \pm 0.003	2.357 \pm 0.004	2.448 \pm 0.001
12	α -Terpineno	HM	1023	1176	0.407 \pm 0.003	0.045 \pm 0.001	0.809 \pm 0.001	0.740 \pm 0.001	0.757 \pm 0.002
13	<i>p</i> -Cimeno	HM	1031	1265	0.469 \pm 0.001	1.290 \pm 0.001	1.619 \pm 0.001	0.501 \pm 0.001	1.197 \pm 0.001
14	1,8-Cineol*	MO	1038	1206	23.213 \pm 0.001	21.795 \pm 0.001	22.985 \pm 0.002	24.487 \pm 0.002	21.216 \pm 0.002
15	γ -Terpineno*	HM	1065	1242	0.796 \pm 0.001	1.191 \pm 0.001	1.048 \pm 0.003	1.375 \pm 0.001	1.284 \pm 0.001
16	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	MO	1074	1462	0.165 \pm 0.002	0.208 \pm 0.005	0.108 \pm 0.001	0.108 \pm 0.001	0.244 \pm 0.001
17	Terpinoleno	HM	1094	1279	0.734 \pm 0.001	0.819 \pm 0.003	0.741 \pm 0.001	0.741 \pm 0.005	0.743 \pm 0.003
18	<i>p</i> -Cimeno	HM	1101	1430	1.780 \pm 0.001	0.140 \pm 0.002	0.145 \pm 0.001	0.258 \pm 0.001	0.197 \pm 0.005
19	Linalol*	MO	1104	1540	0.174 \pm 0.001	0.147 \pm 0.001	0.098 \pm 0.001	0.261 \pm 0.001	0.158 \pm 0.001
20	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	MO	1109	1546	0.168 \pm 0.002	0.025 \pm 0.001	0.028 \pm 0.001	N.D.	0.028 \pm 0.001
	Monoterpeno oxigenado,								
21	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1116	—	0.082 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001	0.058 \pm 0.001	N.D.	0.033 \pm 0.001
22	Crisanterona	MO	1133	1502	0.414 \pm 0.001	0.134 \pm 0.002	0.155 \pm 0.001	0.103 \pm 0.001	0.120 \pm 0.001
23	<i>trans</i> -Hidrato de pino	MO	1148	—	0.048 \pm 0.001	0.093 \pm 0.001	0.091 \pm 0.001	N.D.	0.087 \pm 0.001
24	<i>cis</i> -Pinocarveol	MO	1151	1117	0.298 \pm 0.002	0.091 \pm 0.001	0.112 \pm 0.001	0.070 \pm 0.001	N.D.

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas. N.D: No identificado.

Tabla 1.5. Continuación.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	RO-I	RO-II	RO-III	RO-IV	RO-V
25	<i>trans</i> -Verbenol	MO	1154	1675	0.379 \pm 0.001	N.D.	0.069 \pm 0.001	0.096 \pm 0.001	0.079 \pm 0.001
26	Alcanfor*	MO	1157	1513	2.688 \pm 0.002	17.257 \pm 0.001	17.540 \pm 0.004	17.512 \pm 0.001	15.530 \pm 0.002
27	Hidrato de canfeno	MO	1161	1593	0.092 \pm 0.001	0.212 \pm 0.001	0.244 \pm 0.001	0.042 \pm 0.001	0.150 \pm 0.005
28	<i>trans</i> -Pinocanfenona	MO	1172	1544	0.135 \pm 0.001	N.D.	0.035 \pm 0.001	0.160 \pm 0.001	N.D.
29	Pinocarvona	MO	1173	1566	0.432 \pm 0.001	0.123 \pm 0.004	0.111 \pm 0.001	0.141 \pm 0.001	0.100 \pm 0.001
30	Borneol*	MO	1178	1697	3.331 \pm 0.001	4.099 \pm 0.002	3.855 \pm 0.003	4.787 \pm 0.002	4.406 \pm 0.001
31	Terpinen-4-ol	MO	1186	1624	1.920 \pm 0.001	1.066 \pm 0.001	1.092 \pm 0.002	0.983 \pm 0.001	0.965 \pm 0.003
32	α -Terpineol	MO	1198	1692	1.346 \pm 0.001	0.862 \pm 0.001	0.945 \pm 0.001	1.287 \pm 0.002	0.952 \pm 0.001
33	Mirtenol	MO	1206	1786	0.395 \pm 0.001	0.155 \pm 0.001	0.152 \pm 0.001	0.169 \pm 0.003	0.127 \pm 0.002
34	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1210	—	0.418 \pm 0.001	0.063 \pm 0.001	0.065 \pm 0.001	0.073 \pm 0.001	0.060 \pm 0.001
35	Verbenona	MO	1221	1706	6.848 \pm 0.003	1.995 \pm 0.001	1.801 \pm 0.001	3.241 \pm 0.001	1.815 \pm 0.001
36	Citronelol	MO	1228	1755	0.215 \pm 0.005	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
37	Neral	MO	1244	1680	0.300 \pm 0.001	0.033 \pm 0.001	0.039 \pm 0.001	0.036 \pm 0.001	0.033 \pm 0.001
38	Geraniol	MO	1255	1841	1.938 \pm 0.001	0.033 \pm 0.001	0.038 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001	0.034 \pm 0.001
39	Geranial	MO	1272	1723	0.151 \pm 0.002	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
40	<i>cis</i> -Acetato de verbenilo	OC	1280	1610	0.142 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
41	Acetato de bornilo	OC	1295	1579	1.010 \pm 0.001	0.845 \pm 0.002	0.642 \pm 0.002	1.189 \pm 0.001	1.769 \pm 0.001
42	Acetato de geranilo	OC	1382	1747	0.025 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
43	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄	HS	1384	—	0.085 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
44	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄	HS	1406	—	0.085 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
45	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1443	1598	2.206 \pm 0.003	5.751 \pm 0.001	2.600 \pm 0.002	4.621 \pm 0.003	6.611 \pm 0.004
46	α -Humuleno*	HS	1476	1671	0.322 \pm 0.001	0.023 \pm 0.001	0.358 \pm 0.003	0.589 \pm 0.001	0.940 \pm 0.004
47	Óxido de cariofileno	SO	1610	1984	0.197 \pm 0.001	0.372 \pm 0.001	0.225 \pm 0.002	0.244 \pm 0.001	0.366 \pm 0.001
48	Epóxido de humuleno II	SO	1638	2041	0.031 \pm 0.001	0.037 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001	N.D.	0.040 \pm 0.001

Tabla 1.6. Composición química de los AE de *R. officinalis*, obtenidos por AV.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)				
			DB-5	DB-WAX	RO-VI	RO-VII	RO-VIII	RO-IX	
1	Tricileno	HM	930	1004	0.429 \pm 0.003	0.457 \pm 0.001	0.496 \pm 0.001	0.520 \pm 0.001	
2	α -Tujeno	HM	933	1026	0.239 \pm 0.001	0.180 \pm 0.003	0.187 \pm 0.001	0.193 \pm 0.001	
3	α-Pino*	HM	944	1023	30.36 \pm 0.02	27.41 \pm 0.02	24.609 \pm 0.001	25.489 \pm 0.001	
4	α -Fencheno	HM	956	1056	0.276 \pm 0.002	0.127 \pm 0.001	0.210 \pm 0.001	0.241 \pm 0.005	
5	Canfeno*	HM	958	1064	10.749 \pm 0.007	12.266 \pm 0.006	12.996 \pm 0.006	13.195 \pm 0.003	
6	Tuja-2,4(10)-dieno	HM	962	1120	0.463 \pm 0.004	0.341 \pm 0.002	0.344 \pm 0.005	0.414 \pm 0.001	
7	Sabineno	HM	980	1117	0.092 \pm 0.001	0.073 \pm 0.001	0.084 \pm 0.001	0.084 \pm 0.001	
8	β-Pino	HM	985	1101	3.584 \pm 0.002	3.387 \pm 0.001	3.355 \pm 0.001	3.419 \pm 0.001	
9	β -Mirceno	HM	993	1163	1.075 \pm 0.001	1.297 \pm 0.002	1.103 \pm 0.004	0.942 \pm 0.001	
10	<i>p</i> -Menta-1(7),8-dieno	HM	996	1166	N.D.	N.D.	0.039 \pm 0.001	0.029 \pm 0.001	
11	α-Felandreno	HM	1009	1200	1.801 \pm 0.001	2.946 \pm 0.001	2.743 \pm 0.001	2.602 \pm 0.003	
12	α -Terpineno	HM	1023	1176	0.772 \pm 0.002	1.148 \pm 0.003	0.984 \pm 0.001	0.942 \pm 0.001	
13	<i>p</i> -Cimeno*	HM	1031	1265	1.048 \pm 0.002	1.514 \pm 0.002	1.502 \pm 0.002	1.416 \pm 0.001	
14	1,8-Cineol*	MO	1038	1206	23.314 \pm 0.006	28.968 \pm 0.009	26.864 \pm 0.002	24.871 \pm 0.007	
15	γ -Terpineno*	HM	1065	1242	1.306 \pm 0.004	1.516 \pm 0.001	1.375 \pm 0.001	1.368 \pm 0.001	
16	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	MO	1074	1462	0.160 \pm 0.001	0.071 \pm 0.001	0.126 \pm 0.003	0.104 \pm 0.001	
17	Terpinoleno	HM	1094	1279	1.002 \pm 0.002	0.867 \pm 0.003	0.932 \pm 0.001	0.954 \pm 0.005	
18	<i>p</i> -Cimeno	HM	1101	1430	0.787 \pm 0.004	0.138 \pm 0.001	0.132 \pm 0.002	0.245 \pm 0.001	
19	Linalol*	MO	1104	1540	0.123 \pm 0.003	0.061 \pm 0.001	0.095 \pm 0.001	0.085 \pm 0.001	
20	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	MO	1109	1546	0.059 \pm 0.001	0.031 \pm 0.001	0.033 \pm 0.001	0.037 \pm 0.001	
21	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1116	—	0.030 \pm 0.001	N.D.	N.D.	0.038 \pm 0.001	
22	Crisanterona	MO	1133	1502	0.165 \pm 0.001	0.056 \pm 0.001	0.069 \pm 0.001	0.087 \pm 0.001	
23	<i>trans</i> -Hidrato de pino	MO	1148	—	0.037 \pm 0.001	0.029 \pm 0.001	0.034 \pm 0.001	0.037 \pm 0.001	
24	<i>cis</i> -Pinocarveol	MO	1151	1117	N.D.	0.024 \pm 0.001	0.029 \pm 0.001	0.039 \pm 0.001	

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas. N.D: No identificado.

Tabla 1.6. Continuación.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)			
			DB-5	DB-WAX	RO-VI	RO-VII	RO-VIII	RO-IX
25	<i>trans</i> -Verbenol	MO	1154	1675	0.118 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.
26	Alcanfor*	MO	1157	1513	8.454 \pm 0.007	9.746 \pm 0.004	12.837 \pm 0.001	13.122 \pm 0.001
27	Hidrato de canfeno	MO	1161	1593	0.107 \pm 0.001	0.058 \pm 0.001	0.101 \pm 0.002	0.113 \pm 0.001
28	<i>trans</i> -Pinocanfenona	MO	1172	1544	0.056 \pm 0.001	0.027 \pm 0.001	0.023 \pm 0.001	0.032 \pm 0.001
29	Pinocarvona	MO	1173	1566	0.197 \pm 0.001	0.075 \pm 0.001	0.094 \pm 0.001	0.103 \pm 0.001
30	Borneol*	MO	1178	1697	2.405 \pm 0.003	1.404 \pm 0.001	2.133 \pm 0.001	1.901 \pm 0.001
31	Terpinen-4-ol	MO	1186	1624	0.919 \pm 0.001	0.408 \pm 0.002	0.572 \pm 0.001	0.616 \pm 0.001
32	α -Terpineol	MO	1198	1692	0.625 \pm 0.003	0.263 \pm 0.001	0.447 \pm 0.001	0.341 \pm 0.001
33	Mirtenol	MO	1206	1786	0.146 \pm 0.003	0.029 \pm 0.001	0.039 \pm 0.001	0.060 \pm 0.001
34	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1210	—	0.114 \pm 0.002	N.D.	N.D.	0.024 \pm 0.001
35	Verbenona	MO	1221	1706	2.212 \pm 0.002	0.603 \pm 0.002	0.885 \pm 0.001	0.825 \pm 0.001
36	Citronelol	MO	1228	1755	0.039 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.
37	Neral	MO	1244	1680	0.040 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.
38	Geraniol	MO	1255	1841	0.293 \pm 0.005	N.D.	N.D.	N.D.
39	Geranial	MO	1272	1723	0.040 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.
40	<i>cis</i> -Acetato de verbenilo	OC	1280	1610	0.051 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.
41	Acetato de bornilo	OC	1295	1579	0.874 \pm 0.001	0.116 \pm 0.001	0.183 \pm 0.003	0.162 \pm 0.002
42	Acetato de geranilo	OC	1382	1747	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
43	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄	HS	1384	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
44	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄	HS	1406	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
45	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1443	1598	4.793 \pm 0.003	2.631 \pm 0.007	3.975 \pm 0.001	4.890 \pm 0.005
46	α -Humuleno*	HS	1476	1671	0.571 \pm 0.005	0.242 \pm 0.001	0.376 \pm 0.002	0.472 \pm 0.002
47	Óxido de cariofileno	SO	1610	1984	0.101 \pm 0.001	N.D.	N.D.	N.D.
48	Epóxido de humuleno II	SO	1638	2041	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Tabla 1.7. Composición química de los AE de *S. officinalis*, obtenidos por MW-HD.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	I _R		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)	
			DB-5	DB-WAX	SO-I	SO-II
1	α -Tujeno	HM	933	1026	0.814 \pm 0.001	0.490 \pm 0.002
2	α -Pino* ^a	HM	942	1020	1.444 \pm 0.001	2.152 \pm 0.001
3	Canfeno* ^a	HM	957	1064	1.064 \pm 0.001	1.383 \pm 0.001
4	Sabineno	HM	980	1117	1.040 \pm 0.001	0.447 \pm 0.001
5	β -Pino	HM	985	1101	3.509 \pm 0.001	3.859 \pm 0.001
6	β -Mirceno	HM	993	1163	5.332 \pm 0.001	2.395 \pm 0.001
7	Monoterpeno, C ₁₀ H ₁₆	HM	996	—	0.053 \pm 0.001	0.050 \pm 0.001
8	α -Felandreno	HM	1009	1200	0.066 \pm 0.001	0.064 \pm 0.001
9	α -Terpineno	HM	1023	1040	0.551 \pm 0.001	0.431 \pm 0.002
10	<i>p</i> -Cimeno*	HM	1031	1265	0.282 \pm 0.002	0.435 \pm 0.001
11	1,8-Cineol* ^a	MO	1041	1206	22.778 \pm 0.001	26.623 \pm 0.003
12	<i>trans</i> - β -Ocimeno	HM	1052	1232	0.082 \pm 0.002	0.041 \pm 0.001
13	γ -Terpineno* ^a	HM	1065	1243	1.057 \pm 0.004	0.774 \pm 0.002
14	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	MO	1074	1462	0.635 \pm 0.001	0.541 \pm 0.001
15	Terpinoleno	HM	1094	1279	0.199 \pm 0.001	0.154 \pm 0.001
16	Linalol	MO	1103	1540	0.906 \pm 0.002	0.758 \pm 0.001
17	α -Tujona	MO	1116	1400	19.220 \pm 0.003	18.303 \pm 0.002
18	β -Tujona	MO	1126	1420	3.604 \pm 0.002	6.517 \pm 0.002
19	<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol	MO	1130	1560	0.062 \pm 0.001	0.049 \pm 0.001
20	Alcanfor* ^a	MO	1157	1513	4.398 \pm 0.001	6.030 \pm 0.003
21	Umbellulona	MO	1172	1151	0.185 \pm 0.001	0.137 \pm 0.002
22	δ -Terpineol	MO	1176	1668	0.220 \pm 0.001	0.213 \pm 0.001
23	Borneol* ^a	MO	1177	1720	0.476 \pm 0.001	0.720 \pm 0.001
24	Terpinen-4-ol	MO	1187	1625	0.670 \pm 0.002	0.606 \pm 0.001
25	α -Terpineol	MO	1198	1691	0.261 \pm 0.001	0.242 \pm 0.001
26	Mirtenol	MO	1205	1176	0.068 \pm 0.001	0.068 \pm 0.001
27	Acetato de bornilo	OC	1294	1578	0.096 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas. N.D: No identificado.

Tabla 1.7. Continuación.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)	
			DB-5	DB-WAX	SO-I	SO-II
28	β -Cubebeno	HS	1352	1459	0.023 \pm 0.001	0.068 \pm 0.001
29	α -Copaeno	HS	1390	1493	0.102 \pm 0.001	0.046 \pm 0.001
30	β -Bourboneno	HS	1393	1520	0.074 \pm 0.002	0.121 \pm 0.001
31	α -Gurjuneno	HS	1431	1532	0.091 \pm 0.001	0.050 \pm 0.001
32	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1444	1600	8.783 \pm 0.003	7.287 \pm 0.004
33	β -Gurjuneno	HS	1450	1603	N.D.	0.166 \pm 0.001
34	Aromadendreno	HS	1457	1610	0.100 \pm 0.001	0.057 \pm 0.001
35	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄	HS	1459	—	0.148 \pm 0.001	0.092 \pm 0.001
36	<i>cis</i> -Eudesma-6,11-dieno	HS	1463	1617	1.469 \pm 0.002	0.832 \pm 0.001
37	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄	HS	1465	—	0.143 \pm 0.001	0.096 \pm 0.001
38	α-Humuleno*	HS	1478	1673	7.686 \pm 0.002	5.452 \pm 0.003
39	9- <i>epi-trans</i> -Cariofileno	HS	1484	1649	0.133 \pm 0.004	0.173 \pm 0.004
40	γ -Muroloeno	HS	1484	1689	0.206 \pm 0.002	0.281 \pm 0.002
41	Germacreno D	HS	1493	1709	0.219 \pm 0.001	N.D.
42	δ -Selineno	HS	1497	1724	0.029 \pm 0.001	0.022 \pm 0.001
43	Viridifloreno	HS	1501	1697	0.040 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001
44	Biciclogermacreno	HS	1509	1732	0.059 \pm 0.001	0.411 \pm 0.001
45	γ -Cadineno	HS	1512	1757	0.115 \pm 0.001	0.442 \pm 0.001
46	δ -Cadineno	HS	1516	1754	0.742 \pm 0.001	0.268 \pm 0.001
47	Sesquiterpeno oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1540	—	0.202 \pm 0.001	0.040 \pm 0.001
48	Espatuleno	SO	1601	1572	0.328 \pm 0.001	0.238 \pm 0.001
49	Óxido de cariofileno	SO	1610	1984	0.516 \pm 0.001	0.406 \pm 0.001
50	Viridiflorol	SO	1622	2010	7.553 \pm 0.003	8.036 \pm 0.005
51	Sesquiterpeno oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1626	—	0.154 \pm 0.001	0.151 \pm 0.001
52	Epóxido de humuleno II	SO	1638	2040	0.417 \pm 0.002	0.366 \pm 0.002
53	Esclareno	HS	1957	1940	0.130 \pm 0.001	0.081 \pm 0.001
54	Manol	SO	2094	2048	1.621 \pm 0.001	1.262 \pm 0.001

Tabla 1.8. Composición química de los AE de *L. citriodora*, obtenidos por MW-HD.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	LC-I
1	α -Pino* [*]	HM	942	1020	0.342 \pm 0.001
2	Sabineno	HM	980	1117	0.869 \pm 0.001
3	3-Octenol	OC	984	1445	0.066 \pm 0.001
4	6-Metil-5-hepten-2-ona	OC	987	1332	1.055 \pm 0.001
5	β -Mirceno	HM	993	1162	0.239 \pm 0.001
6	Monoterpeno, C ₁₀ H ₁₆	HM	995	—	0.262 \pm 0.001
7	α -Felandreno	HM	1009	1201	0.055 \pm 0.001
8	<i>p</i> -Cimeno*	HM	1031	1265	0.115 \pm 0.002
9	Limoneno*	HM	1037	1194	10.000 \pm 0.001
10	1,8-Cineol*	MO	1040	1204	2.359 \pm 0.001
11	<i>trans</i>-β-Ocimeno	HM	1052	1232	1.848 \pm 0.002
12	γ -Terpineno*	HM	1065	1242	0.085 \pm 0.001
13	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	MO	1074	1549	0.200 \pm 0.002
14	Terpinoleno	MO	1086	1278	0.067 \pm 0.001
15	Linalol	MO	1100	1540	0.716 \pm 0.001
16	<i>n</i> -Nonanal	MO	1104	1087	0.322 \pm 0.001
17	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1112	—	0.357 \pm 0.002
18	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1130	—	0.095 \pm 0.001
19	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	MO	1142	1443	0.215 \pm 0.002
20	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1146	—	0.120 \pm 0.001
21	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	MO	1148	1455	0.540 \pm 0.002
22	Alcanfor*	MO	1157	1513	4.444 \pm 0.002
23	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1167	—	0.514 \pm 0.001
24	Epóxido de rosefurano	MO	1178	1595	1.463 \pm 0.002
25	<i>cis</i> -Pinocanfona	MO	1184	1544	0.895 \pm 0.003
26	Terpinen-4-ol	MO	1187	1626	0.311 \pm 0.002

*Identificados con base en las sustancias patrón certificadas. N.D: No identificado.

Tabla 1.8. Continuación.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	LC-I
27	α -Terpineol	MO	1198	1691	0.555 \pm 0.001
28	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1204	—	0.113 \pm 0.001
29	Verbenona	MO	1219	1705	0.142 \pm 0.002
30	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1226	—	0.116 \pm 0.001
31	Nerol	MO	1231	1792	1.077 \pm 0.004
32	Monoterpeno oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂	MO	1236	—	0.182 \pm 0.002
33	Neral*	MO	1247	1679	13.971 \pm 0.003
34	Carvona	OC	1256	1713	1.063 \pm 0.002
35	Geraniol	MO	1260	1841	0.061 \pm 0.001
36	Geranial*	MO	1276	1727	18.588 \pm 0.004
37	Acetato de bornilo	OC	1292	1579	0.120 \pm 0.001
38	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄	HS	1295	—	0.158 \pm 0.002
39	α -Cubebeno	HS	1353	1356	0.391 \pm 0.001
40	α -Copaeno	HS	1384	1493	2.071 \pm 0.003
41	β -Bourboneno	HS	1393	1521	0.994 \pm 0.002
42	β-Cubebeno	HS	1400	1540	2.386 \pm 0.001
43	Sesquitujona	HS	1407	1716	0.098 \pm 0.001
44	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄	HS	1438	—	0.441 \pm 0.002
45	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	HS	1444	1600	8.318 \pm 0.001
46	β -Copaeno	HS	1448	1594	0.303 \pm 0.003
47	<i>trans</i> - β -Farneseno	HS	1451	1662	0.277 \pm 0.002
48	α -Humuleno*	HS	1466	1672	0.158 \pm 0.001
49	<i>allo</i> -Aromadendreno	HS	1477	1650	0.994 \pm 0.001
50	γ -Curcumeno	HS	1480	1685	0.098 \pm 0.001
51	γ -Muroloeno	HS	1484	1689	0.854 \pm 0.003
52	γ -Amorfeno	HS	1489	1727	0.257 \pm 0.001
53	<i>ar</i>-Curcumeno	HS	1494	1769	4.959 \pm 0.003

Tabla 1.8. Continuación.

Nº Pico	Compuesto	TIPO	IR		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	LC-I
54	Germacreno D	HS	1497	1711	0.079 \pm 0.001
55	α-Zingibereno	HS	1502	1719	1.978 \pm 0.001
56	Biciclogermacreno	HS	1505	1736	0.250 \pm 0.001
57	β -Curcumeno	HS	1515	1754	0.151 \pm 0.001
58	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄	HS	1519	—	1.500 \pm 0.005
59	γ -Cadineno	HS	1523	1758	0.631 \pm 0.002
60	δ -Amorfeno	HS	1529	1754	0.121 \pm 0.002
61	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄	HS	1536	—	0.564 \pm 0.001
62	<i>cis</i> -Calamaneno	HS	1541	1852	0.223 \pm 0.002
63	Butanoato de geranilo	OC	1557	1889	0.042 \pm 0.001
64	<i>trans</i>-Nerolidol	SO	1571	2034	1.677 \pm 0.001
65	Sesquiterpeno oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1577	—	0.168 \pm 0.004
66	<i>ar</i> -Tumerol	SO	1584	2199	0.097 \pm 0.001
67	Sesquiterpeno oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1596	—	0.223 \pm 0.001
68	Espatuleno	SO	1602	1571	0.215 \pm 0.002
69	Sesquiterpeno oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1607	—	0.646 \pm 0.001
70	Óxido de cariofileno	SO	1611	1985	2.437 \pm 0.001
71	Epóxido de humuleno II	SO	1635	2040	0.129 \pm 0.001
72	Sesquiterpeno oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1637	—	0.132 \pm 0.001
73	Sesquiterpeno oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1663	—	0.292 \pm 0.001
74	Sesquiterpeno oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1667	—	0.067 \pm 0.001
75	Sesquiterpeno oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1682	—	0.095 \pm 0.001

ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN REALIZADAS POR GC-FID DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS EN LOS AE Y EXTRACTOS OBTENIDOS POR SFE

Figura 2.1. Curva de calibración en el rango de 340 a 15900 mg/L de canfeno, obtenida por GC-FID.

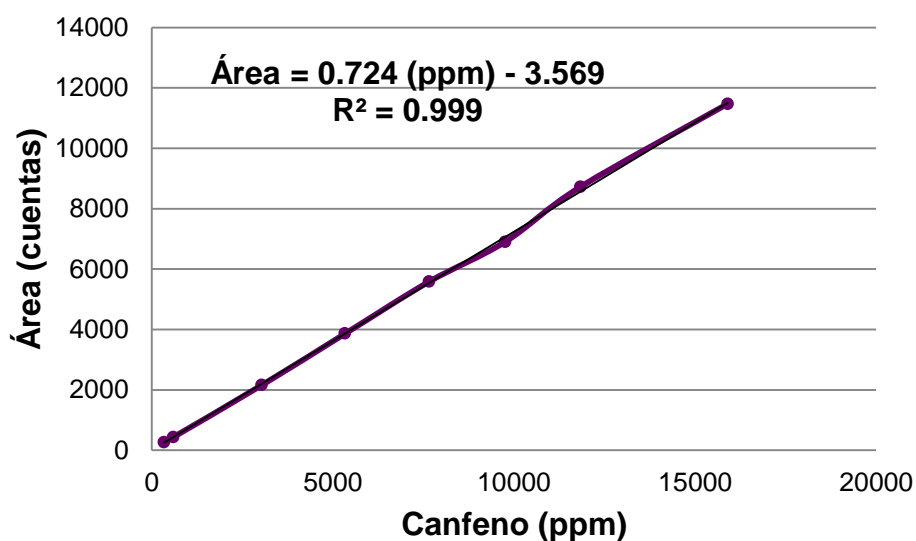


Figura 2.2. Curva de calibración en el rango de 220 a 15040 mg/L de 1,8-cineol, obtenida por GC-FID.

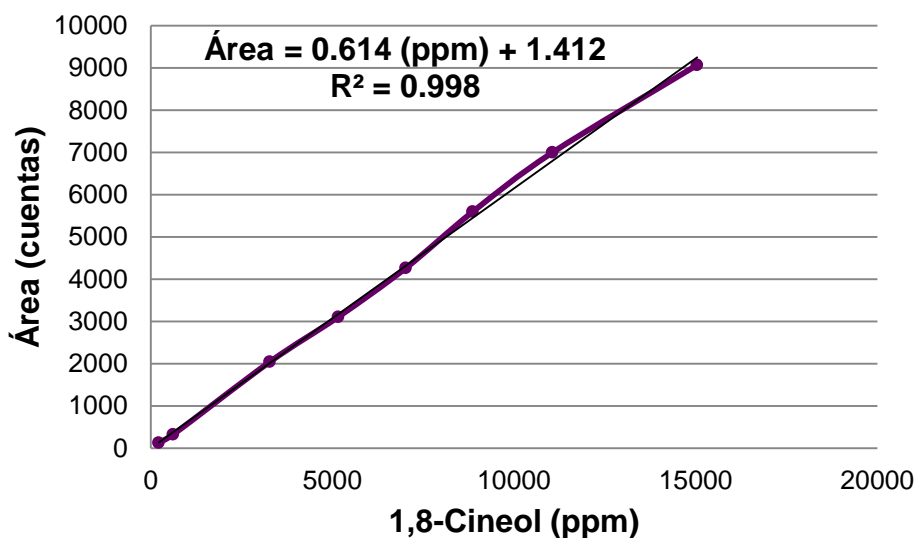


Figura 2.3. Curva de calibración en el rango de 260 a 14040 mg/L de alcanfor, obtenida por GC-FID.

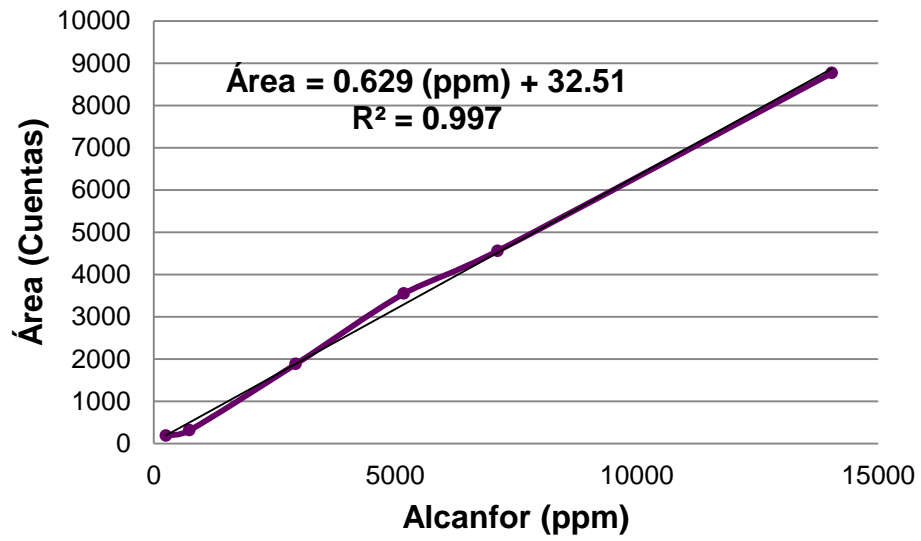


Figura 2.4. Curva de calibración en el rango de 180 a 15540 mg/L de borneol, obtenida por GC-FID.

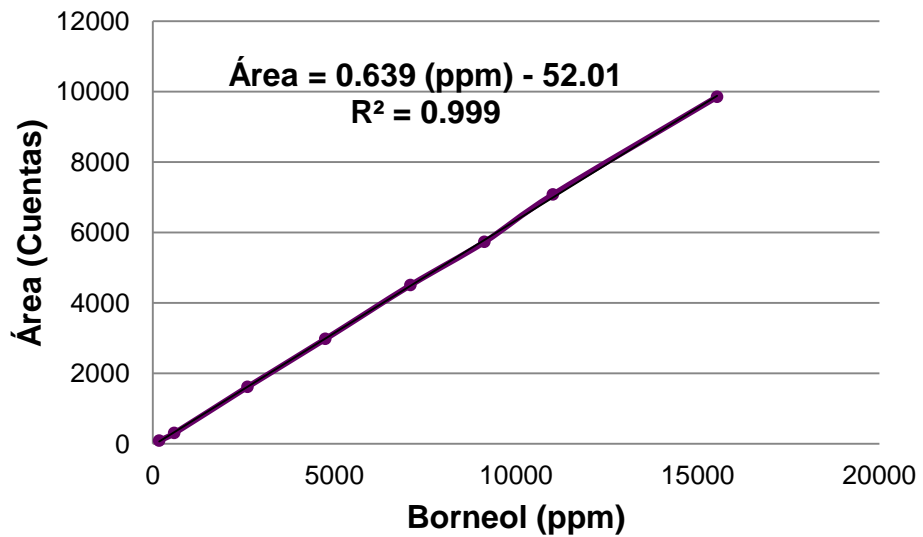


Figura 2.5. Curva de calibración en el rango de 1067 a 33368 mg/L de linalol, obtenida por GC-FID.

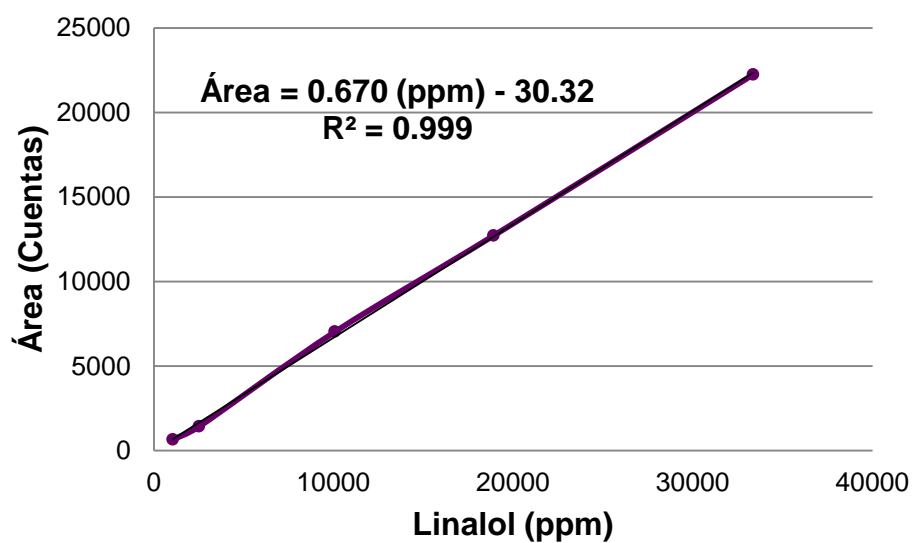


Figura 2.6. Curva de calibración en el rango de 380 a 14980 mg/L de *p*-cimeno, obtenida por GC-FID.

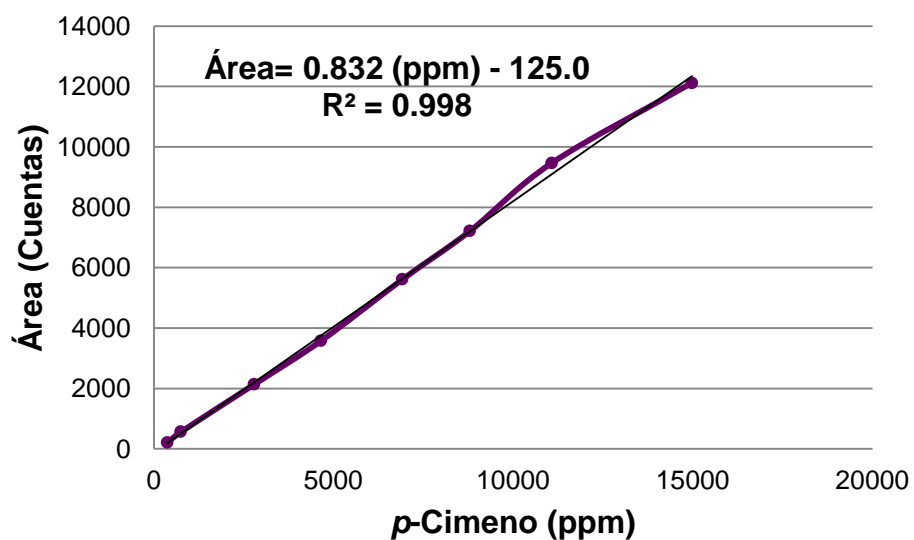


Figura 2.7. Curva de calibración en el rango de 320 a 14080 mg/L de γ -terpineno, obtenida por GC-FID.

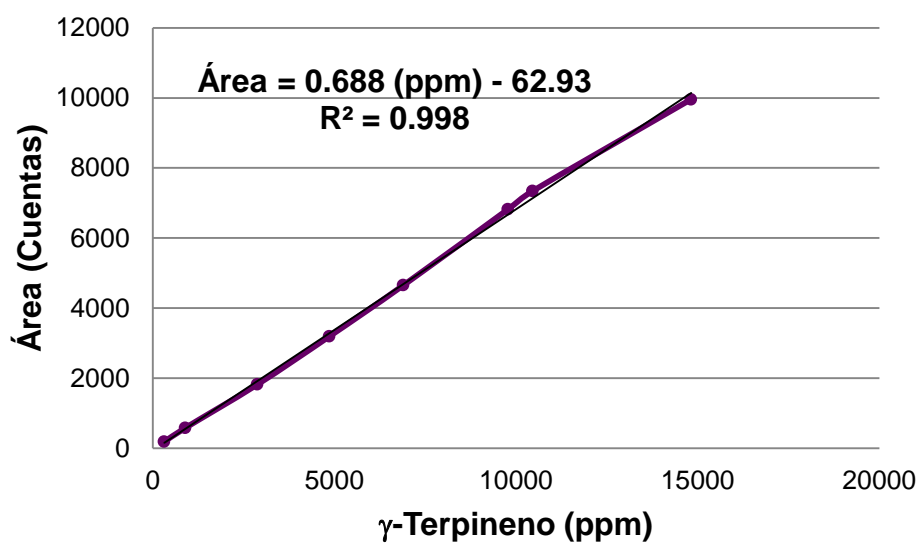


Figura 2.8. Curva de calibración en el rango de 240 a 14860 mg/L de timol, obtenida por GC-FID.

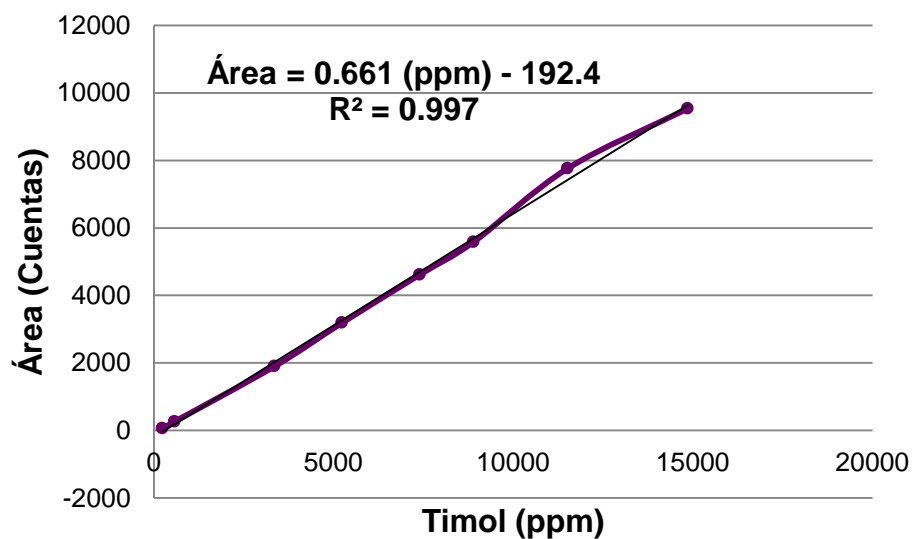


Figura 2.9. Curva de calibración en el rango de 180 a 14920 mg/L de carvacrol, obtenida por GC-FID.

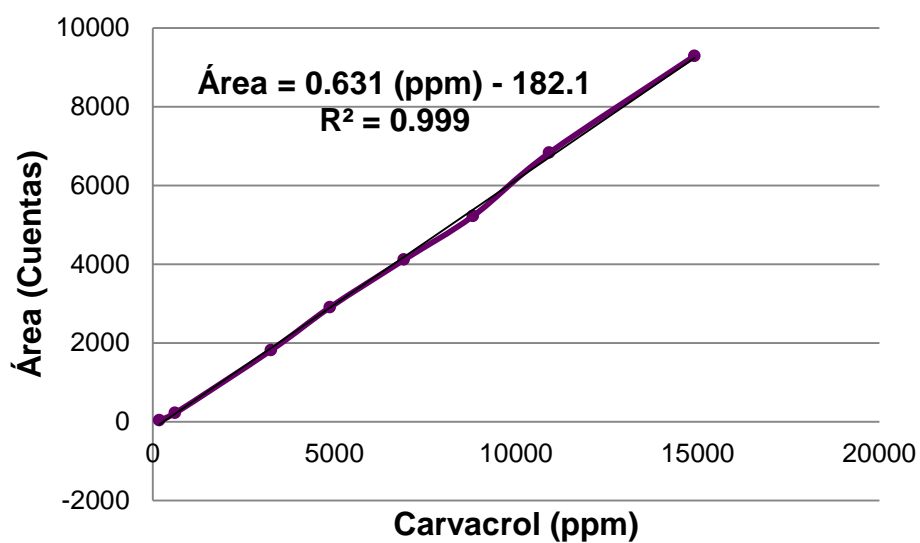


Figura 2.10. Curva de calibración en el rango de 500 a 14120 mg/L de *trans*- β -cariofileno, obtenida por GC-FID.

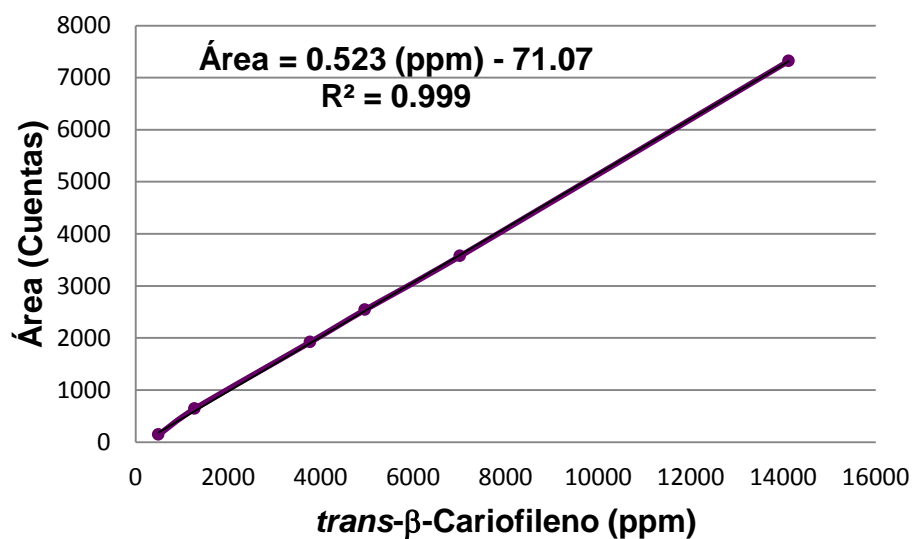


Figura 2.11. Curva de calibración en el rango de 260 a 15320 mg/L de limoneno, obtenida por GC-FID.

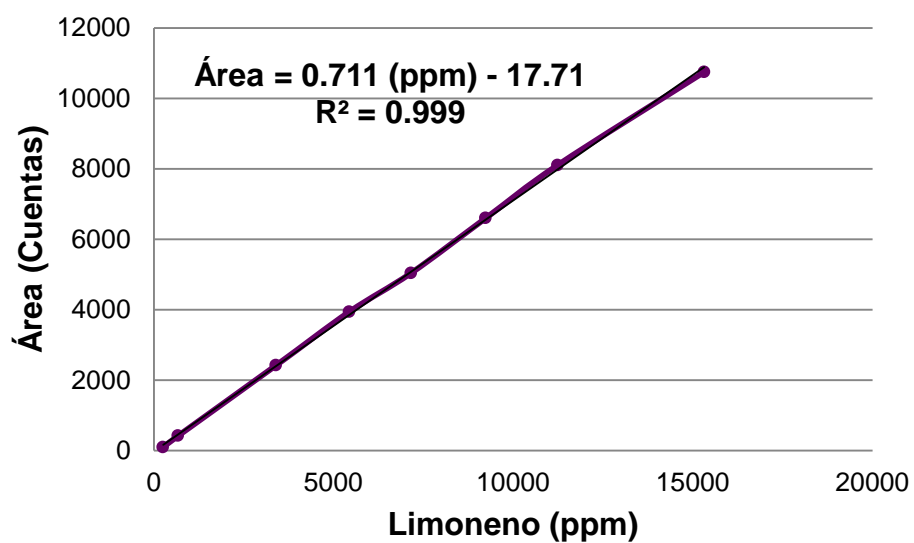


Figura 2.12. Curva de calibración en el rango de 300 a 15760 mg/L de citral, obtenida por GC-FID.

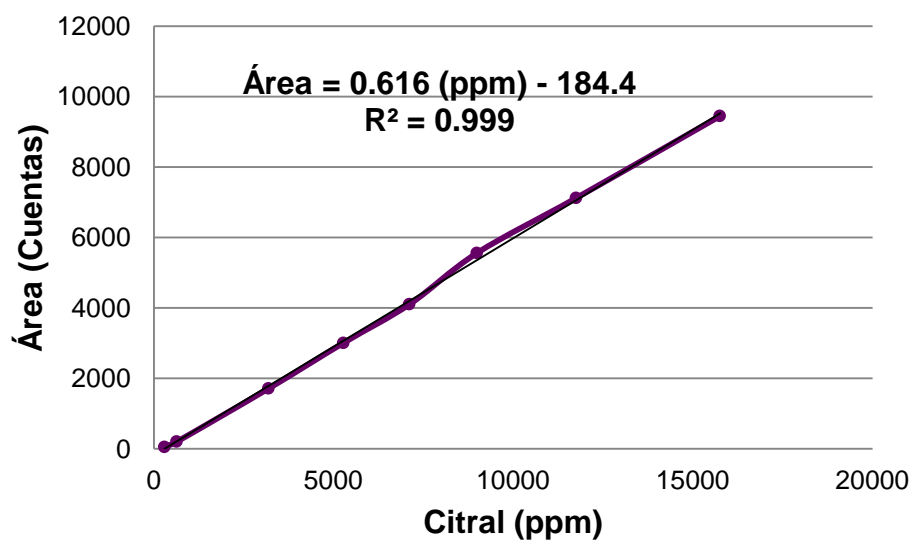


Figura 2.13. Curva de calibración en el rango de 320 a 15340 mg/L de α -humuleno, obtenida por GC-FID.

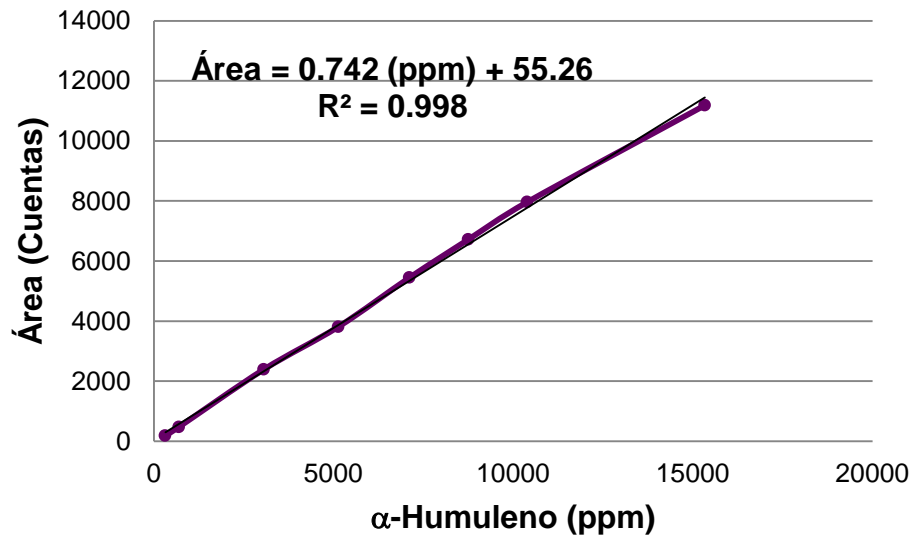
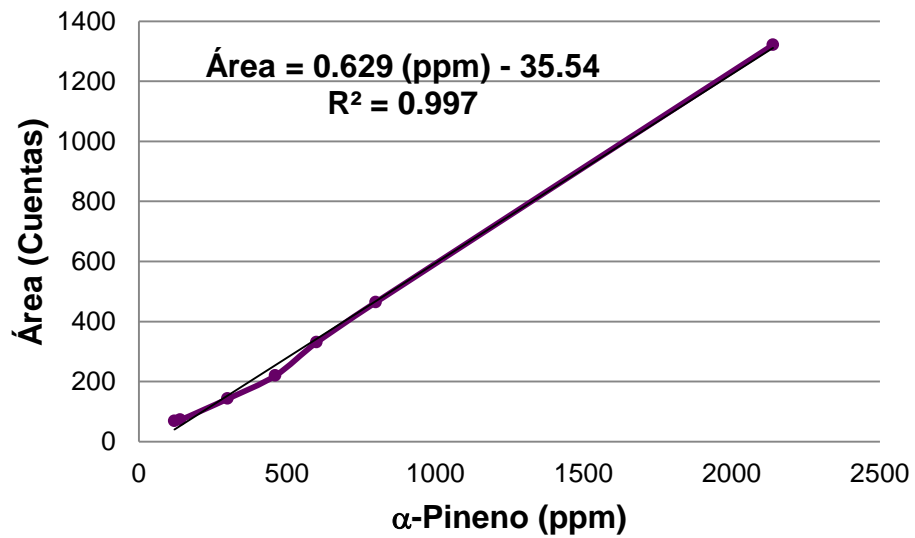


Figura 2.14. Curva de calibración en el rango de 120 a 2140 mg/L de α -pineno, obtenida por GC-FID.



ANEXO 3. CURVAS DE CALIBRACIÓN REALIZADAS POR HPLC-DAD DE LOS ÁCIDOS CARNÓSIKO Y URSÓLICO

Figura 3.1. Curva de calibración en el rango de 25 a 200 mg/L de ácido carnósico, obtenida por HPLC.

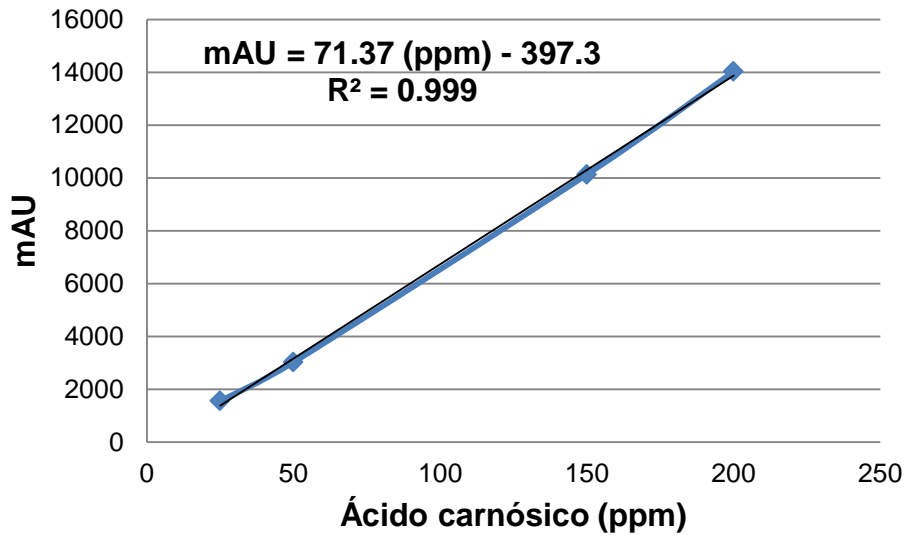


Figura 3.2. Curva de calibración en el rango de 40 a 400 mg/L de ácido ursósico, obtenida por HPLC.

