

**DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES FENÓLICOS EN PLANTAS  
AROMÁTICAS DEL GÉNERO *LIPPIA* sp. (FAMILIA VERBENACEAE)  
EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICIENCIA**

**MÓNICA PATRICIA CALA MOLINA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
POSTGRADO EN QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2011**

**DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES FENÓLICOS EN PLANTAS  
AROMÁTICAS DEL GÉNERO *LIPPIA* sp. (FAMILIA VERBENACEAE)  
EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICIENCIA**

**MÓNICA PATRICIA CALA MOLINA**

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

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

**Co-director: JAIRO R. MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
POSTGRADO EN QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2011**

## AGRADECIMIENTOS

- A los Doctores, Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez, por todas sus enseñanzas y recomendaciones en el desarrollo de esta investigación.
- A mis padres, quienes me han brindado todo lo necesario para alcanzar las metas propuestas. Por sus inmenso amor, sus orientaciones y por depositar su confianza en mí.
- A mi hermano Carlos Iván, que aunque físicamente ya no me acompaña, fue la fuerza y la motivación para culminar esta meta. Gracias por enseñarme con su ejemplo, la tenacidad con que se deben asumir todos los objetivos en la vida.
- A Alejandro, por su amor, compañía y apoyo incondicional.
- A mis amigos, por los gratos momentos compartidos. Agradezco especialmente a Felipe por sus orientaciones académicas, a Mónica y a Nestor, por todo su apoyo.
- Al Laboratorio de Cromatografía y el Centro de Excelencia CENIVAM, por brindar todos los recursos necesarios para realizar este trabajo de grado.
- A COLCIENCIAS y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (Código MADR 2008V3781), por su apoyo económico para la realización de esta investigación y por la beca de sostenimiento.
- A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en el desarrollo de este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	26
<b>1. ESTADO DEL ARTE</b>	29
<b>1.1 COMPUESTOS FENÓLICOS</b>	29
1.1.1 Generalidades	29
1.1.2 Actividad biológica	33
<b>1.2 GÉNERO <i>LIPPIA</i></b>	37
1.2.1 <i>Lippia alba</i>	38
1.2.2 <i>Lippia origanoides</i>	41
1.2.3 <i>Lippia citriodora</i>	42
1.2.4 <i>Lippia micromera</i>	44
1.2.5 <i>Lippia graveolens</i>	45
1.2.6 <i>Lippia americana</i>	47
<b>1.3 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS</b>	48
1.3.1 Extracción con solvente	48
1.3.2 Extracción con fluido supercrítico	48
<b>1.4 ANÁLISIS POR HPLC DE COMPUESTOS FENÓLICOS</b>	51
<b>1.5 ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR GC</b>	56
1.5.1 Derivatización	56
<b>2. CIENCIOMETRÍA</b>	61
<b>2.1 COMPUESTOS FENÓLICOS EN LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>LIPPIA</i>.</b>	61
<b>2.2 ANÁLISIS POR HPLC Y GC-MS DE COMPUESTOS FENÓLICOS.</b>	63
<b>3. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	67
<b>3.1 MATERIALES Y REACTIVOS</b>	67
3.1.1 Reactivos, materiales y equipos	67

3.1.2	Material de referencia certificado	68
3.2	<b>MATERIAL VEGETAL</b>	69
3.3	<b>IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR HPLC DE COMPUESTOS FENÓLICOS.</b>	70
3.3.1	Selección de las condiciones de análisis cromatográfico por HPLC	71
3.3.2	Determinación de parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica por HPLC	72
3.3.3	Determinación de las figuras analíticas de mérito para HPLC	73
3.4	<b>IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR GC DE COMPUESTOS FENÓLICOS.</b>	75
3.4.1	Estandarización de la técnica de derivatización	75
3.4.2	Caracterización de los derivados de compuestos fenólicos	76
3.4.3	Selección de las condiciones de análisis cromatográfico por GC	77
3.4.4	Determinación de parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica para GC	78
3.4.5	Determinación de las figuras analíticas de mérito para GC	78
3.5	<b>EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE MATRICES VEGETALES</b>	79
3.5.1	Extracción con solvente	80
3.5.2	Extracción con fluido supercrítico	80
3.6	<b>DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS</b>	82
3.6.1	Cuantificación con cromatografía líquida de alta eficiencia	82
3.6.2	Cuantificación por cromatografía de gases	82
3.7	<b>COMPARACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS EXTRACTOS POR LAS TÉCNICAS GC y HPLC</b>	83
4.	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	84
4.1	<b>METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS</b>	84

	<b>FENÓLICOS POR HPLC.</b>	
4.1.1	Implementación de la metodología de análisis cromatográfico por HPLC	84
4.1.2	Parámetros de eficiencia de la separación de compuestos fenólicos por HPLC	90
4.1.3	Figuras analíticas de mérito para HPLC	92
4.2	<b>METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR GC</b>	99
4.2.1	Estandarización de la técnica de derivatización	99
4.2.1.1	Metilación de la quercetina	100
4.2.1.2	Metilación del ácido rosmarínico	102
4.2.1.3	Metilación del ácido <i>p</i> -cumárico	107
4.2.1.4	Metilación del ácido caféico	109
4.2.1.5	Metilación del ácido ursólico	111
4.2.1.6	Metilación del ácido carnósico	112
4.2.1.7	Metilación del kaempferol	114
4.2.1.8	Metilación de la apigenina	115
4.2.1.9	Metilación de la luteolina	117
4.2.1.10	Metilación de la naringenina	118
4.2.1.11	Metilación de la pinocembrina	120
4.2.2	Caracterización de los derivados de compuestos fenólicos	123
4.2.2.1	Espectroscopía de infrarrojo	123
4.2.2.2	Espectroscopía de masas	125
4.2.3	Selección de las condiciones de análisis cromatográfico por GC	136
4.2.4	Parámetros de eficiencia de la separación por GC-FID de los derivados de compuestos fenólicos	141
4.2.5	Figuras analíticas de mérito para GC-FID	143
4.3	<b>EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS</b>	150
4.4	<b>CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS</b>	152
4.4.1	Cuantificación de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD	152

4.4.2	Cuantificación de los compuestos fenólicos por GC-FID	159
4.5	<b>ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC Y GC</b>	167
4.5.1	Figuras analíticas de mérito	167
4.5.2	Tiempo de análisis	171
4.5.3	Costo de análisis	171
5.	<b>CONCLUSIONES</b>	174
6.	<b>RECOMENDACIONES</b>	177
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	178
	<b>ANEXOS</b>	193

## LISTADO DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Especie de <i>Lippia alba</i> .	39
<b>Figura 2.</b> Especie de <i>Lippia origanoides</i> .	42
<b>Figura 3.</b> Especie de <i>Lippia citriodora</i> .	43
<b>Figura 4.</b> Especie de <i>Lippia micromera</i> .	45
<b>Figura 5.</b> Especie de <i>Lippia graveolens</i> .	46
<b>Figura 6.</b> Especie de <i>Lippia americana</i> .	47
<b>Figura 7.</b> Relación año – número de publicaciones sobre análisis de compuestos fenólicos en plantas del género <i>Lippia</i> (Fam. Verbenaceae).	63
<b>Figura 8.</b> Relación año – número de publicaciones sobre análisis por HPLC y GC-MS de compuestos fenólicos en plantas.	63
<b>Figura 9.</b> Cromatógrafo líquido de alta eficiencia <i>Agilent 1200 Series</i> .	71
<b>Figura 10.</b> Cromatógrafo de gases <i>Agilent GC 6890 Series GC System</i> acoplado a un detector selectivo de masas ( <i>Agilent MSD 5973</i> ).	77
<b>Figura 11.</b> Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 7890 A</i>	79
<b>Figura 12.</b> Equipo de extracción con fluido supercrítico <i>Thar SFE-2000-2-FMC50</i> .	81
<b>Figura 13.</b> Perfil cromatográfico típico, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis de la mezcla de los compuestos fenólicos patrón.	90
<b>Figura 14.</b> Cromatografía en capa fina del control de la reacción de metilación de la quercetina (Tiempo de reacción: 2 horas).	101
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación de la quercetina extraída con diclorometano.	102

<b>Figura 16.</b>	Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación del ácido rosmarínico (Tiempo de reacción: 2 horas).	103
<b>Figura 17.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de la masa de reacción de metilación del ácido rosmarínico extraída con diclorometano.	104
<b>Figura 18.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de la masa de reacción de metilación del ácido rosmarínico extraída con diclorometano.	106
<b>Figura 19.</b>	Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación del ácido <i>p</i> -cumárico (Tiempo de reacción: 2 horas).	108
<b>Figura 20.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación del ácido <i>p</i> -cumárico extraída con diclorometano.	108
<b>Figura 21.</b>	Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación del ácido caféico.	110
<b>Figura 22.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación del ácido caféico extraída en diclorometano.	110
<b>Figura 23.</b>	Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación del ácido ursólico (2 horas de reacción).	111
<b>Figura 24.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación del ácido ursólico extraída con diclorometano.	112
<b>Figura 25.</b>	Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación del ácido carnósico (2 horas de reacción).	113
<b>Figura 26.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación del ácido carnósico extraída con diclorometano.	113
<b>Figura 27.</b>	Cromatografía en capa fina del control de reacción de	114

	metilación del kaempferol (2 horas de reacción).	
<b>Figura 28.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación del kaempferol extraída con diclorometano.	115
<b>Figura 29.</b>	Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación de la apigenina (2 horas de reacción).	116
<b>Figura 30.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación de la apigenina extraída con diclorometano.	116
<b>Figura 31.</b>	Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación de la luteolina (2 horas de reacción).	117
<b>Figura 32.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación de la luteolina extraída con diclorometano.	118
<b>Figura 33.</b>	Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación de la naringenina (2 horas de reacción).	119
<b>Figura 34.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación de la naringenina extraída con diclorometano.	119
<b>Figura 35.</b>	Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación de la pinocembrina (2 horas de reacción).	120
<b>Figura 36.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de la masa de reacción de metilación de la pinocembrina extraída con diclorometano.	121
<b>Figura 37.</b>	Variación del tiempo de la reacción de metilación de la naringenina.	122
<b>Figura 38.</b>	Variación de la relación molar de naringenina, sulfato de dimetilo y carbonato de dimetilo, en la reacción de metilación de la naringenina.	122
<b>Figura 39.</b>	Comparación de espectros IR <b>(A)</b> del material de referencia certificado de quercetina y <b>(B)</b> del producto de	124

	reacción de la quercetina.	
<b>Figura 40.</b>	Comparación de espectros IR <b>(A)</b> del material de referencia certificado de ácido rosmarínico y <b>(B)</b> del producto de reacción de metilación del ácido rosmarínico.	125
<b>Figura 41.</b>	Perfil cromatográfico típico obtenido por GC-FID de la mezcla de los derivados de los compuestos fenólicos patrón.	137
<b>Figura 42.</b>	Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-FID de la mezcla de los derivados de los compuestos fenólicos.	141

## LISTADO DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1.</b>	Clasificación de los compuestos fenólicos según el número y la disposición de sus átomos de carbono.	29
<b>Tabla 2.</b>	Principales ácidos fenólicos.	30
<b>Tabla 3.</b>	Clasificación de los flavonoides.	31
<b>Tabla 4.</b>	Algunos compuestos fenólicos estudiados en alimentos y plantas.	32
<b>Tabla 5.</b>	Compuestos fenólicos estudiados en especies del género <i>Lippia</i> .	38
<b>Tabla 6.</b>	Extracción de compuestos fenólicos con diferentes solventes.	49
<b>Tabla 7.</b>	Extracción de compuestos fenólicos por SFE.	50
<b>Tabla 8.</b>	Métodos de análisis de compuestos fenólicos por HPLC-DAD-MS.	52
<b>Tabla 9.</b>	Reacciones de alquilación de compuestos fenólicos.	59
<b>Tabla 10.</b>	Resumen comparativo de los resultados del estudio cuantitativo sobre análisis de compuestos fenólicos en plantas del género <i>Lippia</i> .	62
<b>Tabla 11.</b>	Resumen comparativo de los resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre análisis de compuestos fenólicos por HPLC y GC-MS.	65
<b>Tabla 12.</b>	Reactivos, materiales y equipos empleados en la presente investigación.	67
<b>Tabla 13.</b>	Especificaciones de las sustancias de referencia certificadas.	69
<b>Tabla 14.</b>	Identificación taxonómica y número de <i>voucher</i> de las especies bajo estudio.	70
<b>Tabla 15.</b>	Condiciones experimentales para la extracción con fluido	81

	supercrítico.	
<b>Tabla 16.</b>	Selección de la longitud de onda de máxima absorbancia de compuestos fenólicos.	84
<b>Tabla 17.</b>	Parámetros cromatográficos seleccionados para el análisis por HPLC de compuestos fenólicos.	88
<b>Tabla 18.</b>	Tiempos de retención de los compuestos fenólicos bajo estudio, analizados por HPLC.	89
<b>Tabla 19.</b>	Parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica por HPLC.	91
<b>Tabla 20.</b>	Repetibilidad de los $t_R$ de los compuestos fenólicos, analizados por HPLC.	93
<b>Tabla 21.</b>	Repetibilidad de áreas de picos cromatográficos de los compuestos fenólicos, analizados por HPLC.	94
<b>Tabla 22.</b>	Porcentaje de recuperación de los compuestos fenólicos en el procedimiento de limpieza de la muestra.	95
<b>Tabla 23.</b>	Linealidad y sensibilidad del método por HPLC.	96
<b>Tabla 24.</b>	Límites de detección y cuantificación obtenidos por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos estudiados.	97
<b>Tabla 25.</b>	Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de compuestos fenólicos analizados por HPLC-DAD.	98
<b>Tabla 26.</b>	Reproducibilidad de los $t_R$ de compuestos fenólicos obtenidos por HPLC-DAD.	98
<b>Tabla 27.</b>	Sistemas de elución y de revelado de compuestos fenólicos por cromatografía en capa fina.	99
<b>Tabla 28.</b>	Condiciones de reacción de metilación de compuestos fenólicos.	102
<b>Tabla 29.</b>	iones característicos y sus intensidades relativas (%) en los espectros de masas de los derivados metilados de la serie de flavonoides.	128
<b>Tabla 30.</b>	iones característicos y sus intensidades relativas (%) en los espectros de masas de los derivados metilados de los	129

	ácidos fenólicos de bajo peso molecular.	
<b>Tabla 31.</b>	Parámetros cromatográficos seleccionados para el análisis por GC-FID de los derivados de los compuestos fenólicos.	139
<b>Tabla 32.</b>	Tiempos de retención de los derivados de compuestos fenólicos bajo estudio, analizados por GC-FID.	140
<b>Tabla 33.</b>	Parámetros de eficiencia de la separación de los derivados de los compuestos fenólicos por GC.	142
<b>Tabla 34.</b>	Repetibilidad de los $t_R$ de los derivados metilados de los compuestos fenólicos, analizados por GC-FID.	144
<b>Tabla 35.</b>	Repetibilidad de áreas de picos cromatográficos de los derivados metilados de los compuestos fenólicos, analizados GC-FID.	145
<b>Tabla 36.</b>	Linealidad y sensibilidad del método por GC-FID.	147
<b>Tabla 37.</b>	Límites de detección y cuantificación obtenidos por GC-FID de los derivados metilados de los compuestos fenólicos estudiados.	148
<b>Tabla 38.</b>	Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de los derivados metilados de los compuestos fenólicos analizados por GC-FID.	149
<b>Tabla 39.</b>	Reproducibilidad de los $t_R$ de los derivados metilados de los compuestos fenólicos obtenidos por GC-FID.	150
<b>Tabla 40.</b>	Rendimientos de los extractos obtenidos por SFE de las especies <i>Lippia spp.</i> bajo estudio.	151
<b>Tabla 41.</b>	Cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos bajo estudio en los extractos obtenidos con solvente, sin la hidrólisis, de especies <i>L. alba</i> , quimiotipo “carvona”, <i>L. alba</i> , quimiotipo “citral”, <i>L. origanoides</i> , quimiotipo “felandreno”, <i>L. origanoides</i> , quimiotipo “carvacrol”, <i>L. origanoides</i> , quimiotipo “timol”, <i>L. graveolens</i> , <i>L. citriodora</i> y <i>L. americana</i> .	153
<b>Tabla 42.</b>	Cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos	156

bajo estudio en los extractos obtenidos por extracción con solvente seguida de hidrólisis, en especies vegetales de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*.

- Tabla 43.** Cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos bajo estudio en los extractos obtenidos con fluido supercrítico, sin posterior hidrólisis, de especies de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*. 157
- Tabla 44.** Cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos bajo estudio en los extractos obtenidos con fluido supercrítico, seguida de hidrólisis, en las especies de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*. 158
- Tabla 45.** Cuantificación por GC-FID de los compuestos fenólicos bajo estudio en los extractos obtenidos por extracción con solvente seguida de hidrólisis, en especies vegetales de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*. 160
- Tabla 46.** Cuantificación por GC-FID de los compuestos fenólicos bajo estudio en los extractos obtenidos con fluido supercrítico, seguida de hidrólisis, en las especies de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L.* 161

*origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*.

<b>Tabla 47.</b>	Comparación de los compuestos fenólicos determinados por HPLC-DAD y GC-FID en los diferentes extractos obtenidos de las especies del género <i>Lippia</i> bajo estudio.	163
<b>Tabla 48.</b>	Comparación de los compuestos fenólicos determinados en especies de diferentes familias de plantas aromáticas.	165
<b>Tabla 49.</b>	Límites de detección y cuantificación de HPLC y GC de los compuestos fenólicos analizados.	168
<b>Tabla 50.</b>	Linealidad y sensibilidad de los métodos HPLC y GC.	169
<b>Tabla 51.</b>	Comparación de las repetibilidades de los métodos de GC y HPLC para el análisis de compuestos fenólicos.	170
<b>Tabla 52.</b>	Reproducibilidad de los métodos de GC y HPLC para el análisis de compuestos fenólicos.	171
<b>Tabla 53.</b>	Valores de análisis por muestra empleando las metodologías de análisis implementadas en este estudio.	173

## LISTADO DE ESQUEMAS

	<b>Pág.</b>
<b>Esquema 1.</b> Esquema general del macroproyecto “Fortalecimiento y aumento de la competitividad de la cadena productiva nacional de aceites esenciales y productos derivados”.	28
<b>Esquema 2.</b> Metilación de la quercetina.	101
<b>Esquema 3.</b> Metilación del ácido rosmarínico.	103
<b>Esquema 4.</b> Metilación del ácido <i>p</i> -cumárico.	107
<b>Esquema 5.</b> Metilación del ácido caféico.	109
<b>Esquema 6.</b> Metilación del ácido ursólico.	111
<b>Esquema 7.</b> Metilación del ácido carnósico.	112
<b>Esquema 8.</b> Metilación del ácido kaempferol.	114
<b>Esquema 9.</b> Metilación de la apigenina.	115
<b>Esquema 10.</b> Metilación de la luteolina.	117
<b>Esquema 11.</b> Metilación de la naringenina.	118
<b>Esquema 12.</b> Metilación de la pinocembrina.	120
<b>Esquema 13.</b> Posibles rutas de fragmentación de los iones moleculares de los derivados metilados de la serie de flavonoides.	127
<b>Esquema 14.</b> Posibles rutas de fragmentación de los iones moleculares de los derivados metilados de los ácidos fenólicos de bajo peso molecular.	130
<b>Esquema 15.</b> Posibles rutas de fragmentación del ion molecular del derivado metilado del ácido rosmarínico.	131
<b>Esquema 16.</b> Posibles rutas de fragmentación del ion molecular del derivado metilado del ácido ursólico.	132
<b>Esquema 17.</b> Posibles rutas de fragmentación del ion molecular del compuesto dimetilado (I) del ácido carnósico.	134

**Esquema 18.** Posibles rutas de fragmentación del ion molecular del compuesto dimetilado (II) del ácido carnósico. 135

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>A</b>	Apigenina.
<b>ACF</b>	Ácido caféico.
<b>ACR</b>	Ácido carnósico.
<b>APC</b>	Ácido <i>p</i> -cumárico.
<b>APCI</b>	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> (Ionización química a presión atmosférica).
<b>AR</b>	Ácido rosmarínico.
<b>AU</b>	Ácido ursólico.
<b>BSTFA</b>	<i>N,O-bis</i> -(Trimetilsilil)-trifluoroacetamida.
<b>C18</b>	<i>Octadecylsilane</i> (Octadecilsilano).
<b>ca.</b>	<i>Circa</i> (Aproximadamente).
<b>c-TMACF</b>	<i>cis</i> -Trimetil-ácido caféico.
<b>c-DMAPC</b>	<i>cis</i> -Dimetil-ácido <i>p</i> -cumárico.
<b>CNS</b>	<i>Central Nervous System</i> (Sistema nervioso central).
<b>c-PMAR</b>	<i>cis</i> -Pentametil-ácido rosmarínico.
<b>CV</b>	Coeficiente de variación.
<b>DAD</b>	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos).
<b>DMA</b>	Dimetil-apigenina.
<b>DMACRI</b>	Dimetil-ácido carnósico I.
<b>DMACRII</b>	Dimetil-ácido carnósico II.
<b>DMN</b>	Dimetil-naringenina.
<b>DMP</b>	Dimetil-pinocembrina.
<b>ESI</b>	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electrospray).
<b>et al.</b>	<i>Et alii</i> (y otros).
<b>FID</b>	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama).
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases).

<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
<b>i.d.</b>	Diámetro interno ( $\mu\text{m}$ ).
<b>i.e.</b>	<i>Id ets</i> (Es decir, o sea)
<b>K</b>	Kaempferol.
<b>L</b>	Luteolina.
<b><i>L. alba</i></b>	<i>Lippia alba</i> .
<b><i>L. americana</i></b>	<i>Lippia americana</i> .
<b><i>L. citriodora</i></b>	<i>Lippia citriodora</i> .
<b><i>L. graveolens</i></b>	<i>Lippia graveolens</i> .
<b><i>L. origanoides</i></b>	<i>Lippia origanoides</i> .
<b>LDL</b>	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteínas de baja densidad).
<b>LOD</b>	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección).
<b>LOQ</b>	<i>Limit of Quantitation</i> (Límite de cuantificación).
<b>MMAU</b>	Monometil-ácido ursólico.
<b>MMP</b>	Monometil-pinocebrina.
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas).
<b>N</b>	Naringenina.
<b>NP-HPLC</b>	<i>Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase normal).
<b>P</b>	Pinocebrina.
<b>PVDF</b>	<i>Polyvinylidene Fluoride</i> (Fluoruro de Polivinilideno).
<b>Q</b>	Quercetina.
<b>RNS</b>	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (Especies reactivas de nitrógeno).
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies reactivas de oxígeno).
<b>RP</b>	<i>Reverse-Phase</i> (Fase reversa).
<b>RP-HPLC</b>	<i>Reverse Phase High Performance Liquid</i>

	<i>Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa).
<b>SE</b>	<i>Solvent Extraction</i> (Extracción con disolvente).
<b>SFE</b>	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico).
<b>TBDMS</b>	<i>N-(tert-Butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida</i>
<b><i>t</i>-TMACF</b>	<i>trans</i> -Trimetil-ácido caféico.
<b><i>t</i>-DMAPC</b>	<i>trans</i> -Dimetil-ácido <i>p</i> -cumárico.
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético.
<b>TML</b>	Tetrametil-luteolina.
<b>TMQ</b>	Tetrametil-quercetina.
<b>TMS</b>	Trimetilsilil éter
<b>TOF</b>	<i>Time- of-Flight</i> ( <i>Tiempo de vuelo</i> ).
<b><i>t</i>-PMAR</b>	<i>trans</i> -Pentametil-ácido rosmarínico.
<b><i>t</i><sub>R</sub></b>	Tiempo de retención, <i>min</i> .
<b>TRMA</b>	Trimetil-apigenina.
<b>TRMK</b>	Trimetil-kaempferol.
<b>TRML</b>	Trimetil-luteolina.
<b>TRMN</b>	Trimetil-naringenina.
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta –Visible.

## RESUMEN

**TÍTULO: DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES FENÓLICOS EN PLANTAS AROMÁTICAS DEL GÉNERO *LIPPIA* sp. (FAMILIA VERBENACEAE) EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA\***

**Autores:** Mónica Patricia Cala Molina\*\*

**Palabras clave:** Antioxidantes, GC, HPLC, *Lippia*, extracción con fluido supercrítico, extracción con solvente.

En la presente investigación, se implementaron dos metodologías de análisis cromatográfico por HPLC-DAD y GC-FID/MS para la determinación simultánea de un grupo de compuestos fenólicos, *i.e.*, ácidos carnósico, ursólico, caféico, *p*-cumárico, rosmarínico y apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, naringenina y pinocembrina, presentes en las plantas del género *Lippia* (*L. alba*, *L. origanoides*, *L. micromera*, *L. americana*, *L. graveolens*, *L. citriodora*). A continuación, se procedió a realizar un estudio comparativo de ambas técnicas empleando como criterios, las figuras de merito analítica, el tiempo y los costos de análisis.

Se comparó la extracción con fluido supercrítico (SFE) con la extracción con solventes (agua-metanol) en el aislamiento de flavonoides a partir de tallos y hojas de 9 especies *Lippia* (familia Verbenacea) diferentes. El material vegetal de 3 quimiotipos de *L. origanoides* (quimiotipos ricos en carvacrol, timol y felandreno), de 2 quimiotipos de *L. alba* (quimiotipos ricos en carvona y citral), *L. citriodora*, *L. americana*, *L. graveolens* y *L. micromera*, se obtuvo de cultivos experimentales. Se obtuvieron extractos con y sin hidrólisis previa con el fin de detectar la existencia potencial de formas glicosídicas de los flavonoides extraídos. SFE aisló únicamente pinocembrin y naringenina de los 3 quimiotipos de *L. origanoides*, con rendimientos que variaron cerca del 20% como resultado de la hidrólisis. Los extractos con solvente tuvieron una composición más variada que incluyó adicionalmente, apigenina, quercetina y luteolina. La extracción con solventes tuvo rendimientos mayores que los de SFE para todas las especies.

\* 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: DETERMINATION OF ANTIOXIDANTS OBTAINED FROM *Lippia* AROMATIC PLANTS BY GAS CHROMATOGRAPHY AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY\***

**Authors:** Mónica Patricia Cala Molina

**Keywords:** Antioxidants, GC, HPLC, *Lippia*, Supercritical fluid (CO<sub>2</sub>) extraction, Solvent extraction.

Analytical methodologies based on gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the separation and quantification of carnosic acid, ursolic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, rosmarinic acid, apigenin, luteolin, quercetin, kaempferol, naringenin and pinocembrin in *Lippia* aromatic plants (*L. alba*, *L. organoides*, *L. micromera*, *L. americana*, *L. graveolens*, *L. citriodora*). Analytical figures of merit, execution time and cost of analysis, were used to compare both analytical methods.

Supercritical fluid (CO<sub>2</sub>) extraction (SFE) was compared with solvent (water-methanol) extraction for the isolation of flavonoids from stems and leaves of 9 different *Lippia* (Verbenaceae family) aromatic species. Vegetal material from three *Lippia organoides* chemotypes (carvacrol-, thymol-, and phellandrene-rich chemotypes), two *Lippia alba* chemotypes (carvone- and citral-rich chemotypes), *Lippia citriodora*, *Lippia americana*, *Lippia graveolens*, and *Lippia micromera*, were obtained from an experimental garden. SFE isolated solely pinocembrin and naringenin from the three *L. organoides* chemotypes, with yields that varied around 20% with the hydrolysis step. Solvent extracts had a more varied composition which additionally included apigenin, quercetin and luteolin. Solvent extraction afforded higher overall flavonoid yields from all species than SFE.

To conduct this study, we selected the eleven most reported phenolic compounds in aromatic and medicinal plants, namely, ursolic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, rosmarinic acid, carnosic acid, apigenin, luteolin, quercetin, kaempferol, naringenin and pinocembrin. As a first step, we implemented the methods of analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography with flame ionization and mass spectrometric (GC-FID / MS).

\* Graduation project.

\*\* Industrial University of Santander, Science Faculty, School of Chemistry. Directors, Elena E. Stashenko and Jairo René Martínez.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas sintetizan numerosos metabolitos secundarios que emplean para su defensa contra múltiples agentes externos, tanto benéficos como dañinos. Entre los compuestos provenientes de las plantas más ampliamente estudiados se encuentran los compuestos fenólicos, que gracias a la presencia en su estructura de numerosos grupos hidroxilo, actúan como eficientes agentes reductores. De todos ellos, los que tienen mayor interés farmacológico son los ácidos fenólicos, las flavonas, los flavonoles y las flavanonas. Estos compuestos son importantes pues, además de ser responsables de las coloraciones de muchas flores, frutos y hojas y, por ello, intervienen en la polinización atrayendo a los insectos, participan en la vida del vegetal ejerciendo importantes funciones como, por ejemplo, protegerle de los efectos nocivos de la radiación UV y ejercer una eficaz actividad antioxidante [1].

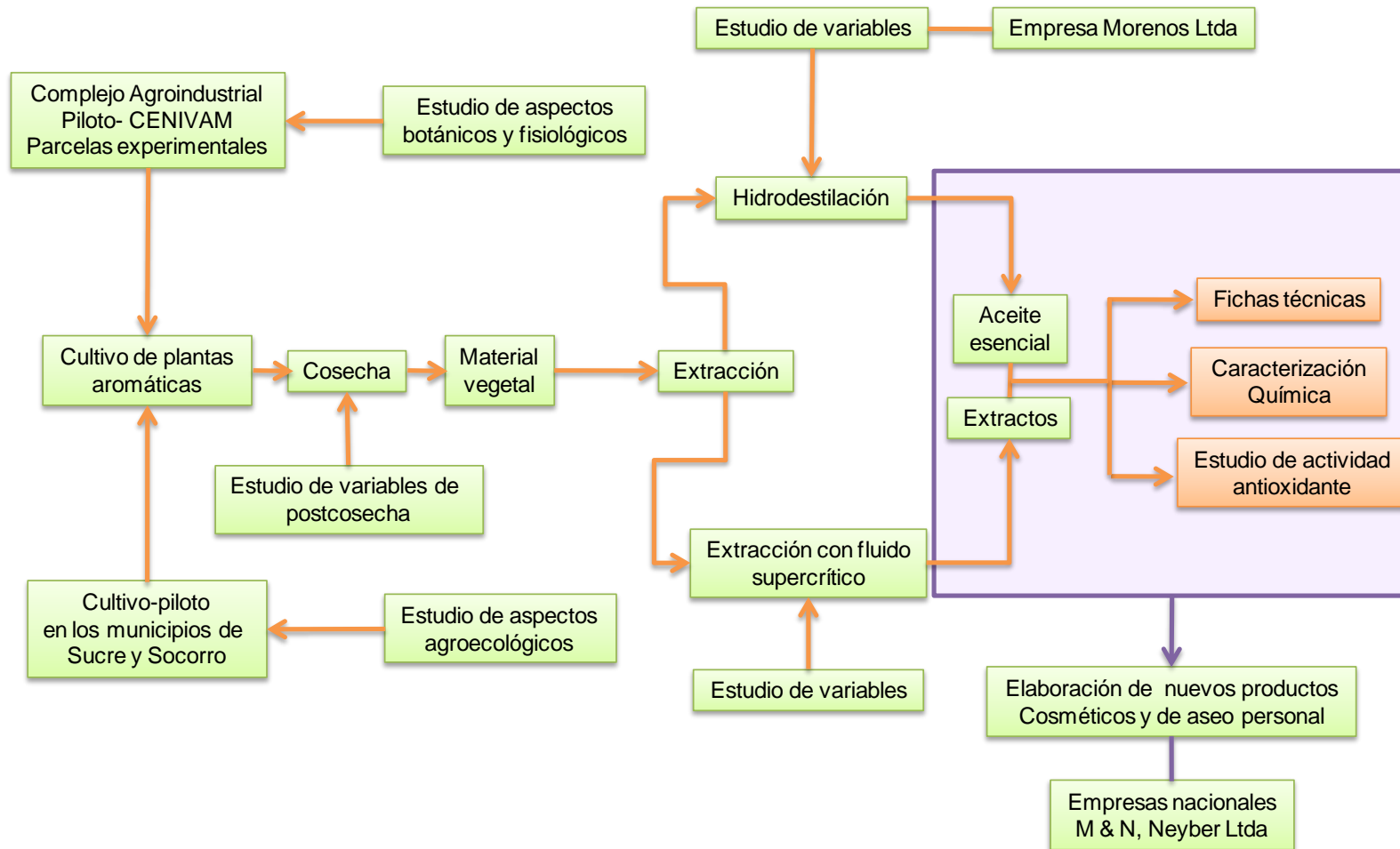
El presente trabajo hace parte del Macroproyecto “Fortalecimiento y aumento de la competitividad de la cadena productiva nacional de aceites esenciales y productos derivados” (código MADR 2008V3781), realizado en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales-CENIVAM, financiado por Conciencias y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (**Esquema 1**). En esta investigación se estudiaron plantas nativas o naturalizadas cuyos extractos contenían compuestos fenólicos con potencial uso en la industria cosmética, farmacéutica o en la industria de alimentos, como antioxidantes. Además, se establecieron métodos analíticos, empleando cromatografía líquida de alta eficiencia y cromatografía de gases, que permitieron la determinación y cuantificación simultánea de compuestos fenólicos en plantas aromáticas.

Para llevar a cabo el presente estudio, se seleccionaron los once compuestos fenólicos más reportados en plantas aromáticas y medicinales, a saber: ácido ursólico, ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, ácido carnósico, apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, naringenina y pinocembrina. Como primer paso, se implementaron las metodologías de análisis de los compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta eficiencia con detectores de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y cromatografía de gases con detectores de ionización en llama, y espectrométrico de masas (GC-FID/MS).

Luego, se realizó la extracción, la determinación y la cuantificación de los analitos bajo estudio de las nueve especies de la familia Verbenaceae, *i.e.*, *L. alba*, quimiotipos carvona y citral, *L. origanoides*, quimiotipos felandreno, carvacrol y timol, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*. Finalmente, se realizó un estudio comparativo de las metodologías de análisis de antioxidantes fenólicos por HPLC-DAD y GC-FID, en términos de tiempos, costos de análisis y el estudio de las figuras analíticas de mérito.

Esta investigación, presenta un marco teórico sobre los compuestos fenólicos, las especies vegetales bajo estudio y las técnicas de análisis (HPLC y GC). Se describe la metodología empleada, se discuten los resultados obtenidos y, por último, se hacen las conclusiones y recomendaciones pertinentes. Con los resultados del presente trabajo de investigación, se espera disponer de dos metodologías de análisis de compuestos fenólicos validadas y de la información cualitativa y cuantitativa sobre los compuestos fenólicos presentes en las especies del género *Lippia* bajo estudio. Esta información es fundamental para establecer cuáles de estas especies pueden ser promisorias como fuente de antioxidantes naturales.

**Esquema 1.** Esquema general del macroproyecto “Fortalecimiento y aumento de la competitividad de la cadena productiva nacional de aceites esenciales y productos derivados”.



## 1. ESTADO DEL ARTE

### 1.1 COMPUESTOS FENÓLICOS

**1.1.1 Generalidades.** El término “compuestos fenólicos” engloba a todas aquellas sustancias que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a uno o más anillos aromáticos [1]. En los últimos años se han reportado más de 8000 estructuras fenólicas distribuidas en el reino vegetal, las cuales van desde fenoles simples, flavonoides de mediano peso molecular, hasta taninos complejos y derivados polifenólicos [2]. Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados de diferentes formas, una de ellas, es según el número y la disposición de sus átomos de carbono (**Tabla 1**).

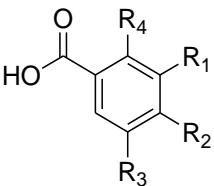
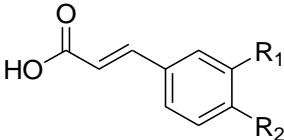
**Tabla 1.** Clasificación de los compuestos fenólicos según el número y la disposición de sus átomos de carbono.

Número de carbonos	Esqueleto	Clasificación
7	$C_6 - C_1$	Ácidos fenólicos
9	$C_6 - C_3$	Cumarinas
10	$C_6 - C_4$	Naftoquinonas
13	$C_6 - C_1 - C_6$	Xantonas
14	$C_6 - C_2 - C_6$	Estilbenos
15	$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides

Según la clasificación más empleada, los compuestos fenólicos se dividen en dos grupos grandes, a saber: no-flavonoides y flavonoides.

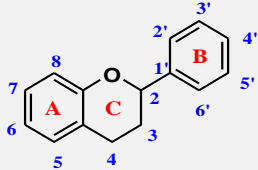
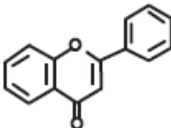
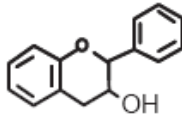
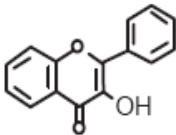
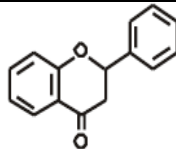
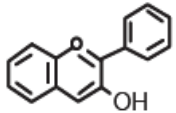
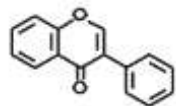
- ✓ **No-flavonoides.** En este grupo se encuentran los ácidos fenólicos y estilbenos. Entre los ácidos fenólicos se destacan los ácidos hidroxibencénicos y hidroxicinámicos, derivados del ácido benzoico y cinámico, respectivamente (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Principales ácidos fenólicos.

DERIVADOS DEL ÁCIDO BENZOICO					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
	OH	OH	OH	H	Ácido gálico
	H	H	OH	OH	Ácido gentísico
	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	Ácido vainílico
	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	Ácido siríngico
DERIVADOS DEL ÁCIDO CINÁMICO					
	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		
	OH		OH		Ácido caféico
	OCH <sub>3</sub>		OH		Ácido ferúlico
	H		OH		Ácido <i>p</i> -cumárico

- ✓ **Flavonoides.** Son compuestos polifenólicos que presentan un esqueleto carbonado C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, es decir, dos anillos aromáticos enlazados por un heterociclo oxigenado que tiene tres átomos de carbono. Los flavonoides son sustancias sólidas de color blanco o amarillento, son solubles en agua caliente, alcohol y disolventes orgánicos polares. Los flavonoides se clasifican a partir de sus variaciones estructurales. Dentro del grupo de los flavonoides, los más destacados, por su interés farmacológico, son las flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianidinas, catequinas y sus correspondientes glucósidos (**Tabla 3**) [1, 2].

**Tabla 3.** Clasificación de los flavonoides [3].

Estructura general de los flavonoides			
Nombre	Descripción	Estructura	Ejemplos
<b>Flavonas</b>	Grupo carbonilo en posición 4 del anillo C. Doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C.		Diosmetina, apigenina, luteolina.
<b>Flavanos</b>	Grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C.		Catequina, epicatequina.
<b>Flavonoles</b>	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C		Quercetina, kaempferol.
<b>Flavononas</b>	Grupo carbonilo en posición 4 del anillo C		Naringenina, pinocembrina.
<b>Antocianidinas</b>	Grupo hidroxilo en posición 3. Doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.		Antocianidina
<b>Isoflavonoides</b>	El anillo bencénico cambia de la posición 2 a la posición 3 del anillo C.		Genisteína, daidzeína.

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Figuran entre los principales metabolitos secundarios de las plantas; la presencia de estos compuestos en el reino animal se debe a su ingestión [1, 2]. Se encuentran distribuidos en todas las partes de la planta, hojas, tallos, flores y

frutos, ya sea como moléculas libres o como O-glucósidos. Entre las principales fuentes de compuestos fenólicos conocidas hasta el momento se encuentran: frutas, verduras, vinos, chocolates y plantas, entre otras [3] (Tabla 4).

**Tabla 4.** Algunos compuestos fenólicos estudiados en alimentos y plantas.

<b>Matriz</b>	<b>Compuestos fenólicos</b>
<b>Frutas</b>	
Fresa	Antocianidinas [4].
Naranja	Naringina, hesperidina y narirutina [5].
Manzana	(+)-Catequina, (-)-epicatequina, ácido clorogénico, florizina y procianidinas [6].
Arándanos	Delfinidina, cianidina, petunidina y malvidina [7].
Cidra	Ácidos gálico, caféico, <i>p</i> -cumárico, felúrico, hiperina, (+)-catequina y quercetina [8].
Pera	Quercetina y kaempferol [9].
<b>Bebidas</b>	
Té verde	Catequinas [10-12].
Vino	Ácidos gálico, vanílico, <i>p</i> -cumárico, caféico, (-)-epicatequina, quercetina, kaempferol, luteolina, apigenina y naringenina [13, 14].
<b>Plantas</b>	
<i>Jasminum officinalis</i>	Ácidos gálico y <i>p</i> -cumárico [15].
<i>Origanum dictamnus</i>	Ácidos gálico, caféico y <i>p</i> -cumárico [15].
<i>Ruta graveolens</i>	Ácidos gentísico, caféico y felúrico [15].
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Ácido carnósico, rosmarol, carnosol, cirsimaritina y rosmadial [16, 17].

**Tabla 4.** Continuación.

---

<i>Salvia officinalis</i> L.	Ácidos salvianólicos, carnósico, rosmarol, carnosol, glucósidos de luteolina y apeginina [18].
<i>Oreganum vulgare</i> L.	Ácidos caféico, protocatequico, apigenina, dihidroquercetina, dihidrokaempferol [18]. Luteolina, hispidulina, apigenina, diosmetina, quercetina y naringenina [19- 21].
<i>Satureja hortensis</i>	Ácido rosmarinico y carnosol [18].
<i>Lippia spp.</i>	Salvigenina, hispidulina, luteolina, apigenina, diosmetina, ácidos fenólicos [22].

---

**1.1.2 Actividad biológica.** Los compuestos fenólicos se han caracterizado por poseer múltiples actividades biológicas, incluyendo, antioxidante, anticarcinogénica, antiinflamatoria, antimutagénica, antitrombótica, antimicrobiana, vasodilatadora y efecto protector contra enfermedades neurodegenerativas, entre otras [23]. Las propiedades biológicas más ampliamente estudiadas y de mayor interés son las siguientes:

✓ **Actividad antioxidante.** La actividad antioxidante es probablemente la propiedad más ampliamente estudiada de los compuestos fenólicos. Los mecanismos, a través de los cuales los compuestos fenólicos ejercen su acción antioxidante, resultan de una combinación de sus propiedades quelantes de metales de transición, secuestradoras de radicales libres y regeneradoras de antioxidantes, como el  $\alpha$ -tocoferol, así como de la inhibición de oxidasas y acción sobre otras enzimas [3].

Los aspectos estructurales relacionados con la actividad antioxidante de los flavonoides son muy importantes. Los estudios sobre la actividad secuestradora de radicales libres, reportan un grupo catecol, junto con el

grupo carbonilo en posición 4 y el doble enlace entre los carbonos 2 y 3, como elementos estructurales fundamentales para atrapar radicales [23].

Si bien una dieta rica en flavonoides puede ser beneficiosa para la salud, su consumo elevado puede tener efectos nocivos, puesto que, estos compuestos, según su concentración, pueden actuar como agentes prooxidantes. Algunos de los mecanismos, a través de los cuales los flavonoides ejercen sus acciones prooxidantes, incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la generación de especies reactivas del oxígeno, así como la alteración de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante: glutatión y glutatión-S transferasa [24].

✓ **Prevención de enfermedades cardiovasculares.** La evidencia epidemiológica sugiere que los flavonoides podrían ejercer efectos protectores contra las enfermedades cardiovasculares como la enfermedad cardíaca o el infarto, mediante mecanismos antiaterogénicos, antioxidantes (inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad), antiagregantes, vasodilatadores y antihipertensivos [3, 25, 26].

La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es uno de los factores clave en la patogénesis de la aterosclerosis. Los flavonoides pueden impedir la generación de radicales libres o neutralizar al anión superóxido, los radicales hidroxilo y lipoperóxido [26]. Estas propiedades antioxidantes previenen la oxidación de las LDL, lo que podría explicar los efectos protectores de los flavonoides contra las enfermedades cardiovasculares. Existe evidencia experimental que ciertos antioxidantes (como los flavonoles del té, chocolate y vino) inhiben la formación de las células espumosas y lentifican el avance de la aterosclerosis [27].

Un mecanismo de acción implicado en la prevención cardiovascular es la modulación de la función endotelial. Duffy *et. al.* [28], analizaron la reversión de la disfunción endotelial en un estudio cruzado con 66 pacientes con enfermedad cardiovascular, quienes consumieron té negro o agua como placebo. Los resultados indicaron que el consumo de té negro a corto plazo (2 h después de ingerir 2 tazas de té o de agua) y a largo plazo (4 semanas después de ingerir las 4 tazas diariamente) mejoraba la función endotelial y, por tanto, la dilatación y contracción de los vasos sanguíneos, lo que ayuda a reducir el riesgo de ataques cardíacos.

Los flavonoides también tienen efecto positivo sobre la tensión arterial. Se han realizado estudios sobre los efectos antihipertensivos de uno de los flavonoides más abundante en la dieta, la quercetina [3]. Hodgson, *et. al.* [29], comprobaron en un estudio realizado en 218 mujeres de edad avanzada, que la presión arterial sistólica disminuía 2,2 mm Hg, y la diastólica 0,9 mm Hg, tras el consumo de una taza de té. Estos resultados indican que un consumo regular a largo plazo podría tener efectos favorables sobre la presión arterial.

✓ **Prevención de enfermedades neurodegenerativas.** Los mecanismos patológicos de la neurodegeneración y el proceso de envejecimiento son cada vez más asociados con el estrés oxidativo mediado por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS / RNS, por sus siglas en inglés) [3, 30-32]. El sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés) y, en concreto, el cerebro, tiene un alto requerimiento metabólico de oxígeno y una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, lo que le convierte en un lugar propenso a la peroxidación lipídica. Se ha demostrado que el estrés oxidativo contribuye a los procesos neuropatológicos de una serie de trastornos neurodegenerativos [1], incluyendo la enfermedad de Alzheimer [33], Parkinson [34] y Huntington [35], así como su implicación en la pérdida

neuronal asociada con la edad, disminución cognitiva [31], isquemia cerebral, convulsiones y neuroinflamación [36].

Estudios epidemiológicos y de intervención dietética en humanos y animales sugieren que los flavonoides pueden desempeñar un papel útil en la protección contra el estrés oxidativo y, por ende, en la prevención de enfermedades neurodegenerativas. Los estudios en seres humanos, con el empleo de extractos de plantas que contienen flavonoides, tales como *Ginkgo biloba*, demostraron efectos positivos sobre la función cognitiva y el rendimiento de la memoria en personas sanas [37, 38], así como en pacientes con edad avanzada o con la enfermedad de Alzheimer [39]. Watanabe *et al.* [40], determinaron que los suplementos de *Ginkgo biloba* en los ratones tuvieron efectos neuromoduladores.

✓ **Actividades anticancerígena y antimutagénica.** Los inhibidores tumorales pueden obstaculizar en cualquiera de los pasos de este proceso o en varios de ellos. En particular, los flavonoides pueden emplear diferentes mecanismos para interferir en las cuatro etapas de la carcinogénesis [3]. Algunos flavonoides inhiben el paso del agente precursor a mutágeno, mientras que otros simplemente dificultan la absorción del promotor tumoral en el tubo digestivo. Sin embargo, muchos de los efectos anticancerígenos de los flavonoides podrían ser el resultado de la modulación de las enzimas metabólicas hepáticas [30]. Además de inhibir la activación de procarcinógenos, algunos flavonoides también pueden actuar capturando el mutágeno o interponiéndose entre éste y su diana de actuación. La quercetina y la genisteína son dos flavonoides más estudiados *in vivo*. La quercetina ha sido investigada a fondo por sus efectos antiproliferativos [41, 42] y por inducir la muerte, principalmente, por un mecanismo de apoptosis en líneas celulares de cáncer. Los estudios sugieren a la quercetina como

un candidato prometedor para la quimioterapia *in vivo*. Otros flavonoides también han demostrado ser eficaces en matar las células cancerígenas. La apigenina es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis [43].

**1.2 GÉNERO LIPPIA.** El género *Lippia* pertenece a la familia Verbenaceae, que incluye cerca de 70 géneros y 2000 especies con distribución en casi todas las regiones del planeta. Esta familia es más abundante en las regiones tropicales y subtropicales [22].

El género *Lippia* está constituido por cerca de 200 especies, entre ellas hierbas y arbustos, que se encuentran distribuidas principalmente en América Central, América del Sur y África tropical. Son especies de interés económico, por sus diversos usos, como fuente de aceites y extractos con propiedades antimicrobiana, larvicida, insecticida, antibacterial, antifúngica y antioxidante, entre otras [22].

La mayoría de las investigaciones de las especies del género *Lippia* se han enfocado en el estudio de la composición química y actividad biológica de sus aceites esenciales. Sin embargo, en la última década el análisis de compuestos fenólicos en extractos vegetales ha tomado gran interés gracias a sus propiedades biológicas. Entre las posibles fuentes de compuestos fenólicos se encuentran las especies de la familia Verbenaceae [44-50].

En la **Tabla 5**, se resumen los compuestos fenólicos estudiados en especies del género *Lippia*.

**Tabla 5.** Compuestos fenólicos estudiados en especies del género *Lippia*.

Especies	Compuestos fenólicos
<i>L. graveolens</i> Kunth	<p>Ácido rosmarínico y naringenina [44].</p> <hr/> <p>Luteolina-7-O-glucósido, apigenina-7-O-glucósido, floridcina, taxifolina, eriodictiol, luteolina, quercetina, naringenina, pinocembrina, galangina, 6-hidroxi-luteolin y 6-hidroxi-luteolin 7-O-glucósidos [45].</p> <hr/> <p>Naringenina y pinocembrina [22].</p>
<i>L. turbinata</i>	<p>Ácido lantanílico, ácido camárico y ácido lantanólico [46].</p>
<i>L. citriodora</i>	<p>Ácido caféico, ácido felúrico y apigenina [51].</p> <hr/> <p>Apigenina, hispidulina, jaceosidina, circsilineol, ácido ursólico y ácido betulínico [47].</p> <hr/> <p>Luteolina, salvigenina, hispidulina, cismaritina, diosmetina y apigenina [22, 48].</p>
<i>L. nodiflora</i>	<p>Hispidulina, nepetina, luteolina, nodiflorina A y B, nodifloridina A y B [22].</p>
<i>L. alba</i>	<p>Flavonoides 4-sulfatados, apigenina y luteolina-7-glucurónido [49].</p>
<i>L. origanoides</i>	<p>Pinocembrina [50].</p>

**1.2.1 *Lippia alba*.** Se conoce en Colombia como “Pronto alivio”, “Curatodo” y “Orégano de Cerro”. La planta es originaria del bosque seco tropical y subtropical americano, que se encuentra ampliamente distribuida en toda América, desde México hasta Argentina. *Lippia alba* es un arbusto ramificado, con ramas largas que caen al suelo. La altura varía de acuerdo con la región, hasta un máximo de 1.5 m. Tiene hojas pequeñas, aromáticas,

de color verde por encima y gris por debajo. Las flores se presentan en grupo, en forma de cabeza, pequeñas y rosadas (**Figura 1**) [52-54].



**Figura 1.** Especie de *Lippia alba*.

Fuente: Fotografía tomada por el autor en CENIVAM el 10 de julio del 2009.

En general, el uso tradicional de *L. alba* en América está referido principalmente a la infusión de sus hojas y las flores. La planta se emplea para trastornos gastrointestinales y respiratorios, como antiespasmódico, expectorante, analgésico, antiinflamatorio, antipirético [22, 49]. En el caso de la caracterización estructural de compuestos no volátiles presentes en *Lippia alba*, la mayoría de los investigadores han estudiado extractos aislados de las hojas. En el 2006 Hennebelle *et al.* [55], reportaron la presencia de iridoides (ácido geniposídico) y flavonoides glicosidados, *e.g.*, apigenina-7-glucurónido, luteolina-7-glucurónido, luteolina-7-diglucurónido.

En el 2002, Bassani *et al.* [56] estudiaron la actividad sobre el sistema nervioso central (CNS) de extractos de la fracción no volátil de las hojas

*Lippia alba*. Tres extractos de *Lippia alba* se prepararon por percolación empleando etanol al 40, 60 y 80% (v/v). La actividad de los extractos sobre el CNS se ensayó en ratones, para evaluar sus efectos sedantes y anticonvulsivos, para ello, los ratones se sometieron a la prueba del sueño inducido por barbitúricos y a convulsiones provocadas por pentilenetetrazol. Los autores demostraron que la fracción no volátil de los extractos en etanol al 80 % (v/v) de las hojas *Lippia alba* tiene efectos sedantes y es un relajante muscular, lo cual podría estar relacionado con el contenido alto de flavonoides en estos extractos.

En el 2002 Guerrero *et al.* [57], evaluaron los efectos antihipertensivo y vasodilatador de extractos etanólicos de plantas medicinales colombianas. El extracto de *Lippia alba* provocó una reducción del ritmo cardíaco, por efectos antihipertensivos; las infusiones de varias de estas especies poseen efectos antiulcerosos y sedativos, los cuales posiblemente están relacionados con la presencia de flavonoides [55].

Stashenko y colaboradores [58] y Ramos *et al.* [59] en el 2003, describen los procedimientos y resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial y el extracto etanólico de *Lippia alba*, respectivamente. Ramos reporta ensayos de atrapamiento de radicales, peroxidación lipídica y pruebas de antimutagénesis en *Escherichia coli*. Para este caso, el extracto inhibió en un 25 % la mutagénesis del microorganismo, y presentó un grado de toxicidad ligero [59]. En el 2004, se realizó una investigación para evaluar las acciones de los extractos acuosos de las hojas de *Lippia alba*, *Melissa officinalis* y *Cymbopogon citratus* en la fuerza contráctil y la frecuencia cardíaca [60]. Para esto, se emplearon los corazones de 21 ratas machos adultos. Se observó que los extractos acuosos provocaban la reducción significativa de la frecuencia cardíaca sin

alterar la fuerza contráctil. Estas actividades fueron atribuidas a la presencia de alcaloides, taninos y flavonoides en los extractos de las tres plantas, según los resultados de las pruebas fitoquímicas [60].

**1.2.2 *Lippia origanoides*.** Es un arbusto de 1 a 3,5 m de altura muy ramificado, con hojas ovaladas y flores pequeñas, muy aromáticas (**Figura 2**). *Lippia origanoides* se conoce en Colombia como “Orégano de monte” y “Orégano cimarrón”, se encuentra distribuida en Colombia (e.g., región del Cañón del Río Chicamocha, Santander), Venezuela y Brasil. La planta se emplea contra afecciones bronquiales, pulmonares, asma, tos, como estomático, antiespasmódico y emenagogo [54].

Las investigaciones que se encuentran sobre *Lippia origanoides* son pocas, en comparación con el número de publicaciones para otras especies del género *Lippia*. Gran parte de estas investigaciones han estudiado la composición y propiedades del aceite esencial de *Lippia origanoides*. En el 2001, Rodríguez y Sanabria [61], estudiaron el efecto del extracto etanólico sobre dos hongos que provocan la rizoctoniosis del maíz. Este extracto etanólico en bajas concentraciones causó la inhibición total de *Rhizoctonia solana* y *Bipolaris maydis*.

Stashenko *et al.* [50] y Ruíz [62] en el 2008, identificaron pinocembrina (3,65 %) como compuesto mayoritario en los extractos aislados con fluido supercrítico de *L. origanoides* (quimiotipo felandreno). La pinocembrina presente en *L. origanoides*, es un compuesto de tipo flavonoide, que se encuentra en especies vegetales como *Pinus cembra* (Pinaceae), *Glycyrriza spp.* (Leguminoseae), *Prunas ssp.* (Rosaceae) y *Helichrysum spp.* (Compositae), además, inhibe el crecimiento de *Bacillus sp.* en concentraciones de 3 µg/mL, y es efectivo contra *Candida albicans*,

*Saccharomyces cerevisiae* y *Cryptococcus neoformans*, en concentraciones de 0,1 - 3 mg/mL [63].



**Figura 2.** Especie de *Lippia origanoides*.

Fuente: Fotografía tomada por el autor en CENIVAM el 10 de julio del 2009.

**1.2.3 *Lippia citriodora* (*L. triphylla*, *Aloysia*, *Lemon verbena*).** Es un arbusto perenne que puede medir más de 1,5 m de altura con hojas muy aromáticas y flores pequeñas, blancas por fuera y violáceas por dentro (**Figura 3**). La planta se encuentra distribuida en el Norte de Carolina, California, América Central y del Sur, España, India y China. En Colombia, se le conoce popularmente como “Cidrón”. Tradicionalmente, la planta ha sido empleada en infusiones como analgésica, antiinflamatoria, antipirética, sedativa, diurética, antiespasmódica, antirrábica y se usa también para desordenes gastrointestinales [54, 64].



**Figura 3.** Especie de *Lippia citriodora*.

Fuente: Fotografía tomada por el autor en CENIVAM el 10 de julio del 2009.

En 1998, Skaltsa y Shammas [65] aislaron 13 flavonoides de las hojas de *L. citriodora*, a saber: salvigenina, eupatorina, eupafolina, 6-hidroxi-luteolina, luteolina, cirsimaritina, luteolina-7-O- $\beta$ -glucósido, hispidulina, diosmetina, crisoeriol, pectolinarigenina, apigenina y cirsilol. Estos flavonoides se identificaron empleando técnicas cromatográficas y bases espectrales, *e.g.*, ultravioleta visible (UV-Vis), resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$ -RMN) y espectrometría de masas (MS).

Carna, *et al.* en 1999 [48], estudiaron la composición química de tisanas de cidrón. Los resultados mostraron que la tisana contiene una gran cantidad de compuestos polifenólicos (675 mg/L), de los cuales aproximadamente 165 mg/L corresponden a compuestos tipo flavonoide y 510 mg/L, a derivados hidroxicinámicos. Por lo tanto, una ingesta diaria de una tasa de tisana (200 mL) contiene aproximadamente 135 mg de compuestos polifenólicos. Con

base en estos resultados, los autores propusieron que los flavonoides y los compuestos hidroxicinámicos presentes en la tisana de cidrón son responsables por las actividades antiespasmódica y digestiva.

En el 2002, Valentao *et al.* [66] examinaron la capacidad de atrapamiento de radicales hidroxilo y superóxido de la infusión de *L. citriodora*. Los resultados demostraron que esta infusión tiene una potente actividad para atrapar radicales superóxido y la actividad moderada, para radicales hidroxilo. Con el fin de estimar una correlación entre el efecto antioxidante y la composición de la infusión de *L. citriodora*, se analizó por HPLC-DAD la infusión *L. citriodora* liofilizada y se encontraron compuestos fenólicos, entre estos, verbascósido, luteolina y derivados de luteolina.

En 2008, Bilia *et al.* [67], investigaron extractos acuosos de cidrón empleando cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos y espectrometría de masas. Los principales compuestos en esta plantas son fenilpropanoides (16 a 120 mg/g de extracto seco), siendo el verbascósido el más abundante en todos. También se reportó la presencia de iridoides (hastatósido y verbenalina) y flavonoides (derivados de luteolina y apigenina).

**1.2.4 *Lippia micromera*.** Es un arbusto hasta de 2,5 m de alto, muy ramificado, con olor similar a orégano, tomillo y salvia (**Figura 4**). Popularmente, se conoce como “Orégano” u “Orégano de Castilla”. *Lippia micromera* se emplea como diurético y en desordenes gastrointestinales y respiratorios [54].



**Figura 4.** Especie de *Lippia micromera*.

Fuente: Fotografía tomada por el autor en CENIVAM el 10 de julio del 2009.

En las investigaciones realizadas sobre *L. micromera* se estudian la composición química y la actividad biológica del aceite esencial [68]. En la literatura no se encuentran reportes sobre compuestos fenólicos presentes en extractos de *Lippia micromera*.

**1.2.5 *Lippia graveolens*.** Conocida como “Orégano mexicano” u “Orégano de monte”, *L. graveolens* (**Figura 5**) es una planta medicinal muy aromática utilizada en los países tropicales de América Central y del Sur para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y respiratorias, y como analgésico, antiinflamatorio, antipirético, antiespasmódico.

En 1989, Domínguez *et al.* [69] encontraron en la parte aérea y las raíces de *L. graveolens*, pinocembrina (267 y 95 mg, respectivamente), naringenina

(172 y 85 mg) y lapachenolo (102 y 210 mg). Estas sustancias fueron identificadas con base en sus espectros UV,  $^1\text{H}$ -RMN y MS y por comparación de sus espectros con los espectros de las sustancias de referencia. Rastrelli *et al.* (1998) [70], reportaron la presencia de 10 iridoides en el extracto metanólico de *L. graveolens*.



**Figura 5.** Especie de *Lippia graveolens*.

Fuente: Fotografía tomada por el autor en CENIVAM el 10 de julio del 2009.

En el 2008 Lin *et al.* [71] publicaron el primer estudio de extractos de *L. graveolens* por HPLC-DAD-MS y reportaron más de 20 flavonoides. La identificación de luteolina-7-O-glucósido, apigenina 7-O-glucósido, floridzina, taxifolina, eriodictiol, escutellareina, luteolina, quercetina, naringenina, pinocembrina y galangina, se confirmó por comparación directa con sus estándares de referencia. La identificación de 6-hidroxi-luteolina, dos 6-hidroxi-luteolina 7-O-glucósidos, tres penta-hidroxi-flavanonas y tres flavonas, se llevó a cabo con base en el análisis de sus espectros ultravioleta y de masas.

Martínez *et al.* [72] estudiaron la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en extractos metanólicos de *L. graveolens*. Los extractos mostraron contenido alto de compuestos fenólicos. El ácido rosmarínico se encontró presente en concentraciones comparables con los valores reportados para el orégano europeo (*Origanum vulgare*). Los extractos presentaron capacidad antioxidante alta y actividad antimutagénica para las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*. Estos resultados sugieren a *L. graveolens* como una fuente de compuestos polares bioactivos, que se pueden usar en la industria alimenticia.

**1.2.6 *Lippia americana*.** Es un arbusto que se encuentra distribuido en América Central y del Sur. *Lippia americana* se conoce como “Oregano macho” y se emplea para afecciones digestivas y respiratorias [22].



**Figura 6.** Especie de *Lippia americana*.

Fuente: Fotografía tomada por el autor en CENIVAM el 10 de julio del 2009.

En la literatura no se encuentran reportes sobre la presencia de compuestos fenólicos, ni sobre la actividad biológica de extractos de *Lippia americana*.

**1.3 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.** La extracción de compuestos antioxidantes fenólicos de matrices vegetales se realiza por técnicas de extracción convencionales, tales como extracción sólido-líquido, con metanol, etanol y acetona, entre otros disolventes [73]. Recientemente se ha incrementado, el uso de la extracción con fluido supercrítico (SFE, por sus siglas en inglés) con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como solvente. Este proceso aprovecha las propiedades de los gases, por encima de sus puntos críticos, para extraer selectivamente, de una matriz vegetal, compuestos solubles en el fluido supercrítico [73-75].

**1.3.1 Extracción con solvente.** Como su nombre lo indica, la extracción con disolvente (SE, por sus siglas en inglés) es técnica de extracción que emplea una fase líquida para aislar los analitos de la matriz. En la SE los compuestos de interés se recuperan de la muestra, mientras el disolvente puede removerse del extracto sin afectar su composición de la muestra. La eficiencia de extracción depende fundamentalmente de tres factores, a saber: (1) solubilidad, (2) transferencia de masa y (3) efecto de matriz [76]. Aunque la extracción con disolvente se utiliza ampliamente, la técnica presenta desventajas, entre ellas figuran el consumo de solventes alto y el tiempo de extracción prolongado, así como la producción de residuos no deseados y la co-extracción de interferencias [76; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**].

Para la extracción de compuestos fenólicos se han empleados diferentes mezclas de solventes polares, entre estos, agua, metanol, etanol y acetona. En la **Tabla 6** se resumen algunos procedimientos de extracción de compuesto fenólicos con diferentes solventes [45, 77-81].

**1.3.2 Extracción con fluido supercrítico.** La SFE se basa en el uso de un fluido en condiciones supercríticas, es una técnica de extracción para una

gran variedad de compuestos, particularmente aquellos, que tienen volatilidad baja y son susceptibles a la degradación térmica.

**Tabla 6.** Extracción de compuestos fenólicos con diferentes solventes.

<b>Matriz</b>	<b>Condiciones de extracción</b>
<i>Flos gossypii</i> (Medicamento)	100% metanol con sonicación (30 min) a temperatura ambiente [77].
Plantas, frutas y verduras	62% metanol en agua con sonicación (5 min) a temperatura ambiente [78].
Especies de <i>Dracocephalum</i>	50% metanol en acetona con sonicación (5 min) a temperatura ambiente [79].
Trébol rojo	Reflujo con etanol al 70% durante 1h [80].
Plantas	62% metanol en agua con sonicación (5 min) temperatura ambiente [81].
<i>Lippia graveolens</i>	70% metanol en agua con sonicación (60 min) a temperatura ambiente [45].

En comparación con la extracción con solventes, los fluidos supercríticos tienen difusividad alta y densidad, viscosidad y tensión superficial bajas. Además, los fluidos supercríticos varían sus propiedades de acuerdo con el cambio de las condiciones operacionales [82,83]. El CO<sub>2</sub> es el solvente más frecuentemente usado en la SFE, puesto que tiene grandes ventajas, a saber: no es tóxico, ni inflamable, es ambientalmente seguro, tiene costo bajo, se puede fácilmente recuperar después de la extracción [82, 84].

La SFE envuelve los siguientes pasos fundamentales: (1) transporte de CO<sub>2</sub> a la superficie de la partícula; (2) penetración y difusión de CO<sub>2</sub> en la matriz sólida; (3) solubilización de los componentes; (4) transporte del soluto a

través de la matriz sólida; y (5) transporte del soluto de la superficie externa de la matriz [82].

Para la extracción por SFE de compuestos fenólicos, se necesita emplear co-solventes (modificadores), para aumentar la solubilidad de moléculas polares en CO<sub>2</sub> o emplear presiones más altas, para modificar la densidad del fluido supercrítico [84]. Los alcoholes se usan ampliamente como modificadores, entre éstos, el etanol es el más empleado, por consideraciones toxicológicas y ambientales [¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.]. Al variar la presión, se puede modificar poder disolvente del CO<sub>2</sub>, por ejemplo, operando a 90 bar y 50°C, su densidad es 0.29 g/cm<sup>3</sup>, que permite extraer compuestos más solubles en el CO<sub>2</sub> (e.g., aceite esencial), a presión de 300 bar y a 50°C, la densidad del CO<sub>2</sub> se incrementa a 0.87 g/cm<sup>3</sup>, lo que permite aislar compuestos menos solubles en CO<sub>2</sub> (e.g., antioxidantes) [85]. En la **Tabla 7** se resumen algunas condiciones operacionales para la extracción de compuestos fenólicos por SFE [16, 73, 86-91].

**Tabla 7.** Extracción de compuestos fenólicos por SFE.

Matriz	Condiciones de extracción			Ref.
	T (K)	P (MPa)	Co-solvente (%)	
Guayaba ( <i>Psidium guajava</i> L.)	323	10	10	[86]
Cilantro ( <i>Coriandrum sativum</i> )	331	28	-	[87]
Algas ( <i>Spirulina platensis</i> )	343	22-32	2	[88]
Jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> )	308	20	-	[89]
Romero ( <i>Rosmarinus officinales</i> )	313	30	2	[16]
	313	30	-	[90]
Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	323	25	4	[73]
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	333	40	-	[91]

**1.4 ANÁLISIS POR HPLC DE COMPUESTOS FENÓLICOS.** La cromatografía líquida es la técnica más usada para el análisis de compuestos fenólicos en diferentes matrices. En general, para el análisis de flavonoides se ha empleado casi que exclusivamente la cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), con columnas de sílice modificada con octilsilano (C8) u octadecilsilano (C18), largas, entre 100-300 mm, y con diámetro interno usualmente de 4.6 mm [92].

Los análisis se realizan con elución en gradiente con flujos de fase móvil que varían entre 1,0 y 1,5 mL/min. Los gradientes de elución son realizados con sistemas binarios de solventes, a saber: soluciones acuosas acidificadas con ácido acético, trifluoroacético, perclórico, *o*-fosfórico y fórmico o con *buffers* acetato o formiato en agua (solvente A) y metanol o acetonitrilo como modificadores orgánicos (solvente B) [92, 93].

En cuanto a los sistemas de detección, los más empleados son UV-Vis, DAD y MS. Todos los compuestos fenólicos contienen, por lo menos, un anillo aromático, en consecuencia, absorben luz ultravioleta [92]. Para el caso de los flavonoides, el primer máximo se encuentra entre 240-285 nm, debido al anillo A y, el segundo máximo, se presenta en el rango de 300-550 nm debido al anillo C (**Tabla 3**). Para el análisis por HPLC-MS de compuestos fenólicos, las interfases más empleadas son ionización química a presión atmosférica (APCI) e ionización por *electrospray* (ESI), tanto de iones positivos como de iones negativos [92-94].

En la **Tabla 8** se resumen algunos métodos de análisis de compuestos fenólicos por HPLC-DAD/MS.

**Tabla 8.** Métodos de análisis de compuestos fenólicos por HPLC-DAD-MS.

MATRIZ	CONDICIONES DE ANÁLISIS	Ref.
Maní	<p><b>RP-HPLC</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fase móvil: A (Ácido fórmico en agua, 0,1 % v/v); B (Ácido fórmico en acetonitrilo, 0,1 % v/v).</li> <li>• Gradiente de elución: 0-7 min: 5-7% B, 7-75 min: 17-45% B, 110-117 min: 45-100% B, 117-124 min: 100-5% B.</li> <li>• Columna: C18 (4.6x 250 mm, 5 µm).</li> <li>• Temperatura: Ambiente.</li> <li>• Flujo: 1.5 mL/min.</li> <li>• Detección: DAD (250, 280, 306, 320 y 370 nm).</li> </ul>	[95]
Cidra	<p><b>RP-HPLC</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fase móvil: A (2 % de ácido acético en agua); B (Metanol).</li> <li>• Gradiente de elución: 0-55 min: 0-45% B; 55-70 min: 45% B.</li> <li>• Columna: Nucleosil 120 C18 (250 x 4,6 mm, 3 µm).</li> <li>• Temperatura: 25 °C.</li> <li>• Flujo: 0,8 mL/min.</li> <li>• Detección: DAD (280, 313 y 355 nm).</li> </ul>	[8]
Vino y té	<p><b>RP-HPLC</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fase móvil: A (0,1 % de ácido fórmico en agua); B (Metanol).</li> <li>• Gradiente de elución: 0-16 min: 15-50% B.</li> <li>• Columna: Zorbax SB C18 (50 x 4.6 mm, 1.8 µm).</li> <li>• Temperatura: 25 °C</li> <li>• Flujo: 1 mL/min.</li> <li>• Detección: DAD (280 nm).</li> </ul>	[96]

**Tabla 8.** Continuación.

<b>Manzanas</b>	<b>RP-HPLC</b>	[6]
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Fase móvil: A (0,1 M de <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> en metanol); B (Agua).</li><li>• Gradiente de elución: 0-15 min: 90-60% B.</li><li>• Columna: C18 (300X3.9 mm).</li><li>• Temperatura: 25 °C.</li><li>• Flujo: 2 mL/min.</li><li>• Detección: DAD (280 nm).</li></ul>	
	<b>NP-HPLC</b>	
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Fase móvil: A (Tetrahidrofurano); B (Hexano); C (Ácido acético); D (Ácido fórmico); E (Isopropanol).</li><li>• Gradiente de elución: 0-2 min: (32:60:4:2:2); 2-12 min: (64.5:27.5:4:2:2).</li><li>• Columna: Zorbax CN (250X4,6 mm).</li><li>• Temperatura: 25 °C.</li><li>• Flujo: 2 mL/min.</li><li>• Detección: DAD (280 nm).</li></ul>	
<b>Propóleo</b>	<b>RP-HPLC</b>	[97]
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Fase móvil: A (0,25 % de ácido acético en agua); B (Metanol).</li><li>• Gradiente de elución: 0-60 min: 50-100% B.</li><li>• Columna: Fusion-RP (C18) (150 x 4,6 mm, 4 <math>\mu\text{m}</math>).</li><li>• Temperatura: 25 °C.</li><li>• Flujo: 0.5 mL/min.</li><li>• Detección: ESI/MS.</li></ul>	

**Tabla 8.** Continuación.

<b>Plantas aromáticas</b>	<b>RP-HPLC</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fase móvil: A (1% de ácido acético en agua); B (6 % de ácido acético en agua); C (5 % de ácido acético en agua:acetonitrilo 65:30 v/v) .</li><li>• Gradiente de elución: 0-10 min: 100% A; 10-30 min: 100% B; 30-50 min: 90% B/10% A; 50-60 min: 80% B/20% C; 60-70 min: 70% B/30% C; 70-105 min: 100% C; 105-110 min: 100% A.</li><li>• Columna: Waters Spherisorb ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 µm).</li><li>• Temperatura:25 °C.</li><li>• Flujo: 0.5 mL/min.</li><li>• Detección: DAD (280 nm).</li></ul>	[51]
<b>Plantas medicinales tibetanas</b>	<b>RP-HPLC</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fase móvil: A (Acetonitrilo:tetrahidrofurano 80:20), B (2 % de ácido acético en agua),</li><li>• Gradiente elución: 0-9 min: 31-60% A; 9-20 min: 60% A.</li><li>• Columna: Kromasil C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm).</li><li>• Temperatura: 25 °C.</li><li>• Flujo: 0.8 mL/min.</li><li>• Detección: DAD (350 nm).</li></ul>	[98]
<b>Flores de <i>Paulownia tomentosa</i></b>	<b>RP-HPLC</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fase móvil: A (1 % de ácido acético en agua), B (Metanol).</li><li>• Gradiente de elución: 0-5 min: 70% A; 5-10 min: 70-80% A; 10-35 min: 80% A.</li><li>• Columna: Kromasil C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm).</li><li>• Temperatura: 25 °C.</li><li>• Flujo: 0.8 mL/min.</li><li>• Detección: DAD (267 y 290 nm).</li></ul>	[99]

**Tabla 8.** Continuación.

<b>Vegetales, frutas, té y vino</b>	<b>RP-HPLC</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fase móvil: A (50 mM de ácido fosfórico, pH 2.5); B (Acetonitrilo).</li><li>• Gradiente de elución: 0-5 min: 95% A; 5-55 min: 95-50%; 50-65 min: 50% A; 65-67 min: 95% A.</li><li>• Columna: ODS-3 (150 x 4 mm, 3 µm).</li><li>• Temperatura: 35 °C.</li><li>• Flujo: 0.7 mL/min.</li><li>• Detección: DAD (280, 330 y 370 nm).</li></ul>	[100]
<b>Especies de <i>Sorbus</i> sp.</b>	<b>RP-HPLC</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fase móvil: A (0.5 % de ácido fosfórico en agua); B (Metanol).</li><li>• Gradiente de elución: 0-10 min: 40-60% B; 10-20 min: 60% B; 21-23 min: 60-40% B; 23-26 min: 40% B; 26-30 min: 40% B.</li><li>• Columna: Lichrosphere C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm).</li><li>• Temperatura: Ambiente.</li><li>• Flujo: 1 mL/min.</li><li>• Detección: DAD (280 nm).</li></ul>	[101]
<b>Alimentos</b>	<b>RP-HPLC</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fase móvil: A (0.05 % de ácido trifluoroacético en agua); B (0.05 % de ácido trifluoroacético en metanol); C (0.05 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo).</li><li>• Gradiente de elución (A/B/C): 0-5 min: 90/6/4- 85/9/6; 30 min: 71/17.4/11.6; 60 min: 0/85/15; 61 min: 90/6/4; 61-61 min: 90/6/4.</li><li>• Columna: Zorbax Eclipse C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm).</li><li>• Temperatura: 30 °C.</li><li>• Flujo: 1 mL/min.</li><li>• Detección: DAD (210, 269, 278, 370 y 520 nm).</li></ul>	[7]

**1.5 ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR GC.** La cromatografía de gases se ha utilizado para el análisis flavonoides desde 1960. Después de la introducción de la HPLC, el análisis de flavonoides por GC se hizo menos importante, pero recientemente ha tomado gran atención posiblemente por la evolución de la GC de alta temperatura y la introducción de procedimientos de derivatización mejorados [94].

Los métodos GC proporcionan alta resolución y bajos límites de detección, pero requieren procedimientos de derivatización para aumentar la volatilidad de los flavonoides y mejorar su estabilidad térmica. Típicamente en GC, los flavonoides son hidrolizados y convertidos en sus éteres trimetilsilílicos (TMS), derivados de acetilo, metilo o etilo, inyectados en columnas apolares, DB-5 o DB-1, en modo *split* o *splitless* y separados con gradientes lineales de temperatura hasta 300 °C [93, 94].

**1.5.1 Derivatización.** La derivatización se refiere a la reacción química que se produce entre el analito y un reactivo, ya sea dentro o fuera del equipo cromatográfico. En GC, se emplea la derivatización generalmente para aumentar la volatilidad y la estabilidad de los analitos, mejorar la detección y obtener picos más simétricos [101]. La naturaleza de los compuestos a analizar y sus propiedades químicas, más que cualquier otro factor, rigen la elección de los derivados y de los métodos que se van a utilizar para su análisis [102]. Para el análisis de compuestos fenólicos, las técnicas de derivatización más empleados son la acilación, sililación y metilación.

- **Acilación.** Es uno de los procedimientos de derivatización más empleados en cromatografía para reducir la polaridad de grupos amino, hidroxilo y tiol [103, 104]. En general, las reacciones de acilación consisten en la reacción del agente acilante (comúnmente anhídrido del ácido correspondiente) en piridina o un disolvente capaz de atrapar el ácido

producido. La temperatura y el tiempo de reacción dependen de las propiedades del sustrato y la reactividad del agente usado [103, 105-106].

En lo concerniente a la acilación de compuestos fenólicos, específicamente, ácidos fenólicos y flavonoides, las publicaciones que se encuentran son pocas. Aft en 1961 [107], preparó los derivados de acetatos de dihidroquercetina, eriodictiol, astilbina y sakuranetina. Para el caso de la dihidroquercetina, se obtuvo pentaacetado dihidroquercetina, empleando anhídrido acético y acetato de sodio en calentamiento durante 3 horas y tetraacetato dihidroquercetina usando anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente durante 2 horas.

- **Sililación.** Es una de las técnicas más funcionales para la derivatización de moléculas con grupos próticos. La introducción de grupos sililo imparte alta estabilidad, mejora las características de separación, aumenta la sensibilidad cuando se usan detectores selectivos y proporciona espectros de masas con gran información estructural [106]. Los agentes derivatizantes más empleados son los trimetilsililados (TMS), a saber: hexametildisiloxano (HMDS), *N,O-bis*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA), *bis*-sililacetamida (BSA) [94]. Los solventes más utilizados son piridina, dimetilformamida, dimetilsulfoxido, tetrahidrofurano y acetonitrilo [103].

En el caso de ácidos fenólicos y flavonoides, la sililación ha sido la técnica de derivatización más empleada para compuestos polifuncionales de mediano peso molecular hasta ca. 300 g/mol; usando como agentes derivatizantes BSTFA, TMCS, HMDS y la cromatografía de gases de alta temperatura [51, 108-111]. Aunque la sililación es un método de derivatización muy empleado, tiene limitaciones para compuestos polifuncionales de alto peso molecular (*e.g.*, algunos ácidos fenólicos y flavonoides), puesto que se requieren altas temperaturas para la elución de los derivados en la

cromatografía, lo que hace necesario el uso de fases estacionarias especiales que soporten alta temperatura [103].

- **Alquilación.** En los procedimientos de derivatización, el término “alquilación” se refiere a una reacción, a pequeña escala, de sustancias que contengan hidrógenos reactivos, *e.g.*, R-COOH, R-OH, R-SH, R-NH<sub>2</sub>, con un agente alquilante. En cromatografía de gases, una de las aplicaciones más importantes de la alquilación, es la derivatización de compuestos polifuncionales, *e.g.*, carbohidratos y polifenoles [103]. Los agentes alquilantes comúnmente empleados son el diazometano, el yoduro de metilo y el sulfato de dimetilo [112-115].

El número de publicaciones que se encuentran empleando a la alquilación como procedimiento de derivatización de ácidos fenólicos y flavonoides es menor que el de la sililación. Sin embargo, en la derivatización de compuestos polifuncionales de mediano peso molecular, la alquilación tiene ventajas en cuanto al peso molecular de los derivados, ya que por cada grupo funcional derivatizado, sólo se incrementa en 14 unidades el peso molecular del derivado y, por ende, no se requiere el uso de columnas especiales para cromatografía de alta temperatura.

En la **Tabla 9**, se resumen algunas de las reacciones de alquilación de compuestos fenólicos, concretamente, de flavonoides.

**Tabla 9.** Reacciones de alquilación de compuestos fenólicos.

Compuesto fenólico	Derivado Alquilado	Condiciones de reacción	Ref.
Quercetina	3,7,3',4,-Tetrametilquercetina	AQ: Diazometano. S: Dioxano.	[112]
Tetrametilquercetina	Pentametilquercetina	AQ: Sulfato de dimetilo; B: KOH	
Dihidroquercetina	3',4',7-Trimetilquercetina	AQ: Sulfato de dimetilo; S: Metanol; B: KOH.	[113]
	3',4',5,7-Tetrametilquercetina	AQ: Sulfato de dimetilo; S: Acetona; B: Carbonato de potasio	
Quercetina	3,3',4',7-Tetrametilquercetina	AQ: Sulfato de dimetilo, S: Metanol; B:KOH.	
Leucocianidina	Leucocianidina metilada y 3',4',5,7-Tetrametilepicatequina	AQ: Sulfato de dimetilo, S: Acetona, B: Carbonato de potasio.	[114]
	Leucocianidina metilada	AQ: Diazometano; S: Metanol.	
Quercetina	Pentametilquercetina	AQ: Yoduro de metilo; S: Acetona; B: Carbonato de potasio.	
Herbacetina	Tetrametilherbacetina	AQ: Yoduro de metilo; S: Acetona; B: Carbonato de potasio.	[115]
Gosipetina	Pentametilgosipetina	AQ: Yoduro de metilo; S: Acetona; B: Carbonato de potasio.	
		AQ: Diazometano; S: Metanol.	

AQ: Agente alquilante; S: Solvente; B: base.

En los últimos años, las publicaciones que conciernen a la metilación de compuestos fenólicos, se encuentran desarrolladas en el marco de la química sostenible. Estas publicaciones se enfocan en el reemplazo de los agentes alquilantes tradicionales, que son altamente tóxicos, *e.g.*, sulfato de dimetilo [116, 117], por el uso de reactivos inocuos, *e.g.* carbonato de dimetilo (DMC) [118-120]. El carbonato de dimetilo, es un compuesto funcional que representa una alternativa ambientalmente amigable a los agentes de alquilación tradicionales. La principal ventaja del DMC, es que el producto de la reacción es  $\text{CO}_2$ , un compuesto ambientalmente benigno, que no genera emisiones de compuestos orgánicos volátiles nocivos a la atmósfera [118-121].

## 2. CIENCIOMETRÍA.

La cienciometría es un instrumento que permite analizar, comparar y cuantificar la actividad científica (publicaciones, patentes) en función de tiempo. Los análisis cienciométricos examinan la ciencia como una disciplina o actividad económica, comparan las políticas de investigación desarrolladas por distintos países y sus resultados desde una perspectiva económica y social [122, 123]. Con el objetivo de analizar el estado actual de las investigaciones sobre los compuestos fenólicos en plantas y sobre las técnicas de su análisis, se realizó un estudio cienciométrico de la producción científica existente utilizando tres bases de datos, a saber: *Elsevier (Scopus)*, *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0)* y *SciFinder Scholar*.

**2.1 COMPUESTOS FENÓLICOS EN LAS ESPECIES DEL GÉNERO LIPPIA.** Según el análisis cienciométrico, los estudios sobre compuestos fenólicos en plantas del género *Lippia*, han sido desarrollados principalmente en Japón, Francia, México y Brasil. Las investigaciones se encuentran publicadas en las áreas de química de alimentos, química medicinal, farmacología y agricultura, en revistas especializadas como *Journal of Ethnopharmacology*, *Journal of Natural Products*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, entre otras. Estos estudios se enfocan en la determinación y cuantificación de compuestos fenólicos en diferentes especies del género *Lippia*. Dentro de las especies que han sido estudiadas se encuentran: *L. alba*, *L. citriodora*, *L. graveolens*, *L. multiflora*, *L. nodiflora*, *L. turbinata* y *L. triphylla* [55-61]. En la **Tabla 10**, se presenta un resumen comparativo de los resultados obtenidos del estudio cienciométrico sobre análisis de compuestos fenólicos en plantas del género *Lippia*.

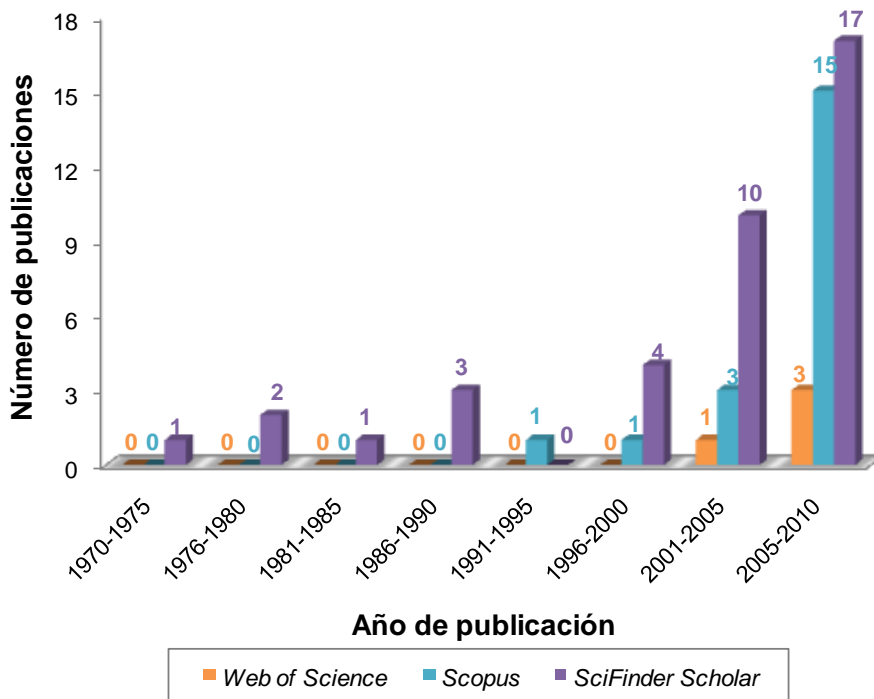
**Tabla 10.** Resumen comparativo de los resultados del estudio cuantitativo sobre análisis de compuestos fenólicos en plantas del género *Lippia*.

OBSERVABLE	BASES DE DATOS					
	Scopus		Web of Science		SciFinder	
<b>Número total de publicaciones</b>	20		4		38	
<b>Áreas de publicación</b>	Farmacología	17	Química medicinal	6	Bioquímica	10
	Química	8	Alimentos	4	Farmacología	4
	Agricultura	6	Farmacología	4	Alimentos	3
<b>Revistas</b>	<i>J. Ethnopharm.</i>	6	<i>Nat. Prod. Commun</i>	2	<i>J. Ethnopharmacol</i>	9
	<i>Biol. Pharm. Bull</i>	2	<i>Chem. Pharm. Bull.</i>	1	<i>Biol. Pharm. Bull</i>	2
	<i>J. Nat. Prod.</i>	1	<i>J. Ethnopharmacol</i>	1	<i>Chem. Pharm. Bull.</i>	2
<b>Países</b>	Japón	2	Japón	2	Japón	2
	Francia	2	Brasil	2	Francia	2
	México	1	Francia	2	España	1

La **Figura 7** muestra el progreso de publicaciones científicas sobre compuestos fenólicos en especies del género *Lippia*, desde la década de los setenta. La mayoría de las investigaciones sobre las especies del género *Lippia* se relacionan con el estudio de los metabolitos secundarios volátiles, razón por la cual, en la **Figura 7** se observa poca producción científica entre la década de los setenta e inicios de los noventa. Sin embargo, el aumento considerable del número de estudios sobre compuestos fenólicos en plantas del género *Lippia* se dio a finales de la década de los noventa. Esto se puede interpretar como una consecuencia del creciente interés por compuestos con propiedades antioxidantes de origen natural. En este contexto los compuestos fenólicos, y entre éstos, los flavonoides, ocupan un lugar destacado.

Un número grande de los artículos científicos aborda aspectos clínicos y nutricionales lo que ha puesto de manifiesto la importancia del empleo de antioxidantes en la dieta, teniendo en cuenta que a menudo las

combinaciones vitamínicas, comúnmente recomendadas en el mundo entero, no ejercen los efectos esperados o, por el contrario, resultan dañinos.



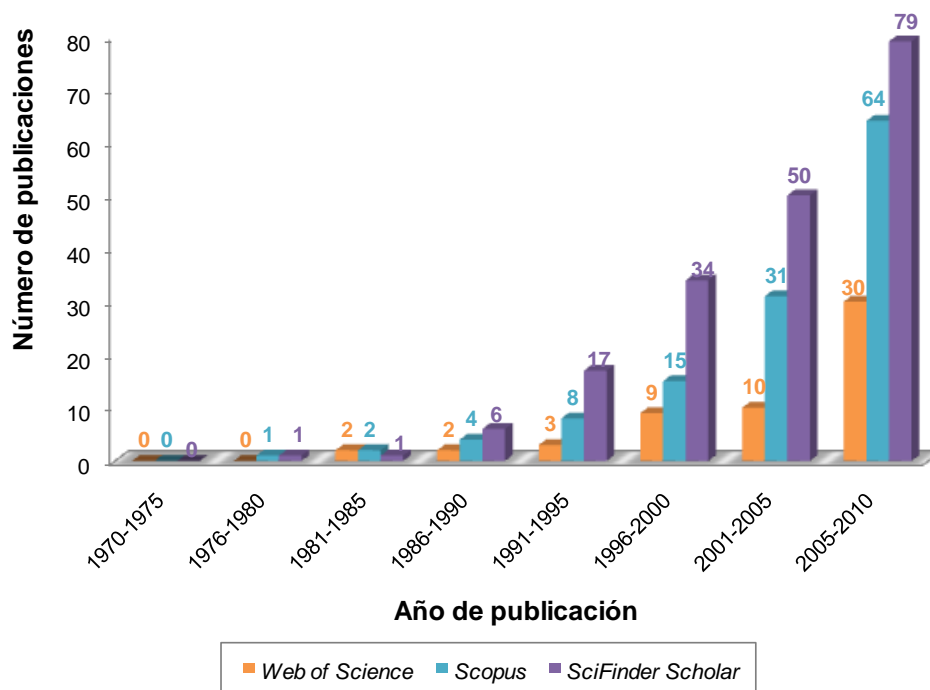
Fuente: *Scopus*, *Web of Science* y *SciFinder Scholar*. Periodo de observación: 1970-2009. Fecha de consulta: 27 de octubre de 2010. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(Lippia)AND TITLE-ABS-KEY(phenolic compounds)).

**Figura 7.** Relación año – número de publicaciones sobre análisis de compuestos fenólicos en plantas del género *Lippia* (Fam. Verbenaceae).

## 2.2 ANÁLISIS POR HPLC Y GC-MS DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

De acuerdo con el estudio cuantitativo sobre la determinación por HPLC y GC-MS de compuestos fenólicos, se observa un número de publicaciones relativamente alto, que emplean estas técnicas como herramienta para analizar compuestos fenólicos. La **Figura 8** representa la dinámica en la investigación sobre el análisis de compuestos fenólicos por HPLC y GC-MS,

desde la década de los setenta hasta nuestros días. La **Figura 8** muestra cómo estas técnicas toman mayor relevancia desde la década de los noventa, como herramientas de análisis de compuestos fenólicos, gracias a sus múltiples ventajas.



Fuente: *Scopus, Web of Science y SciFinder Scholar*. Periodo de observación: 1970 - 2009. Fecha de consulta: 27 de octubre de 2010. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(phenolic compounds)AND TITLE-ABS-KEY(HPLC) AND TITLE-ABS-KEY(GC-MS)).

**Figura 8.** Relación año – número de publicaciones sobre análisis por HPLC y GC-MS de compuestos fenólicos en plantas.

En la **Tabla 11** se muestra un resumen de los resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre compuestos fenólicos analizados por HPLC y GC-MS. Respecto a las áreas en las cuales se han desarrollado estos estudios, se destacan, principalmente, química analítica, agricultura, análisis farmacéutico y química de alimentos. Las investigaciones acerca del análisis

de compuestos fenólicos por HPLC y GC-MS, se encuentran publicados en revistas reconocidas a nivel mundial, a saber: *Food Chemistry*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* y *Journal of Chromatography A*. La mayoría de las investigaciones realizadas, se encaminan en realizar estudios comparativos sobre estas dos técnicas aplicadas a compuestos fenólicos, con el objetivo fundamental de establecer bajo qué condiciones éstas resultan ser ventajosas. Entre los países que presentan mayor número de publicaciones empleando cromatografía líquida y cromatografía de gases, para analizar compuestos fenólicos se encuentran Alemania, Brasil, China, EE.UU. y Grecia.

**Tabla 11.** Resumen comparativo de los resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre análisis de compuestos fenólicos por HPLC y GC-MS.

OBSERVABLE	BASES DE DATOS					
	Scopus		Web of Science		SciFinder	
<b>Número total de publicaciones</b>	125		56		188	
<b>Áreas de publicación</b>	Agricultura	30	Alimentos	64	Alimentos	20
	Química	19	Química analítica	64	Bioquímica	8
	Bioquímica	14	Química aplicada	14	Farmacéutica	5
<b>Revistas</b>	<i>J. Agric. Food Chem.</i>	7	<i>Food Chem.</i>	8	<i>J. Agric. Food Chem.</i>	15
	<i>Phytochemistry</i>	3	<i>J. Agric. Food Chem.</i>	6	<i>Food Chem.</i>	4
	<i>Food Chem.</i>	3	<i>J. Chromatog. A</i>	3	<i>Mol. Nutr. Food Res.</i>	4
<b>Países</b>	Alemania	8	Alemania	7	Alemania	11
	Brasil	4	Grecia	6	EE.UU.	8
	Grecia	4	China	6	Brasil	7

Hasta el momento, se sabe, que los compuestos fenólicos son unos de los antioxidantes más potentes encontrados en las plantas [1]. Sin embargo, aunque se han explorado diferentes especies del reino vegetal [18, 51], los estudios cuantitativos no muestran mucha investigación al respecto. Entre las pocas referencias encontradas en literatura científica [16, 18, 19, 51], que reportan la presencia de compuestos fenólicos en plantas aromáticas nativas, se pueden destacar las especies de los géneros *Lippia* y *Salvia*, que llaman la atención por su amplia y abundante distribución en el territorio nacional. Entre los temas, abordados, se destacan el estudio de especies en cuanto a su contenido de compuestos fenólicos y, estrechamente relacionado, la metodología por medio de la cual se va a establecer la clase y cantidad de estos compuestos. De ahí, los estudios que permitan establecer, de manera rápida y confiable, el contenido de compuestos fenólicos en diferentes especies de plantas, revisten una relevancia científica importante.

Por tanto en este trabajo, se plantea como objetivo general de la investigación determinar por HPLC-DAD y GC-FID/MS compuestos fenólicos tipo ácido, flavona, flavonol y flavanona, en nueve especies del género *Lippia* (Fam. Verbenaceae), que poseen diversa actividad biológica.

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

**3.1.1 Reactivos, materiales y equipos.** Los reactivos, materiales y equipos, empleados en este trabajo, se describen a continuación en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Reactivos, materiales y equipos empleados en la presente investigación.

PRODUCTO	ESPECIFICACIONES
<b>Reactivos y solventes</b>	
Acetato de etilo	Grado HPLC; <i>J.T. Baker</i> (México, D.F., México). Pureza: 99,8%; Grado ACS; <i>Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich</i> (Buchs, Suiza).
Acetona	Pureza: 99,9%; Grado PESTANAL; <i>Sigma-Aldrich</i> (Seetze, Alemania).
Acetonitrilo	Grado HPLC; <i>J.T. Baker</i> (México, D.F., México).
Acido acético	Pureza: 98%; Grado ACS; <i>Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich</i> (Buchs, Suiza).
Acido clorhídrico	Pureza: 37%; Grado ACS; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).
Ácido o-fosfórico	Pureza: 85%; Grado ACS; <i>Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich</i> (Milwaukee, EE.UU.).
Acido trifluoroacético	Pureza: 99%; Grado Síntesis; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).
Carbonato de sodio	Pureza: 99,9%; Grado ACS; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).
Diclorometano	Pureza: 99,9%; Grado ACS; <i>Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich</i> (Milwaukee, EE.UU.).
Etanol	Pureza: 99,8%; Grado ACS; <i>J.T. Baker</i> (Phillipsburg, NJ, EE.UU.).
Metanol	Pureza: 99,8%; Grado ACS; <i>J.T. Baker</i> (Phillipsburg, NJ, EE.UU.).
Sulfato de dimetilo	Pureza: 99%; Grado: Síntesis; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).

**Tabla 12.** Continuación.

Sulfato de sodio	Pureza: 99,1%; Grado ACS; <i>Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich</i> (Buchs, Suiza).
<b>Material de laboratorio</b>	
Tubos cónicos	Tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL de Brand (Wertheim, Alemania).
Pipetas volumétricas	2, 5, 10 mL; Scott (Texas, EE.UU).
Balones aforados	2, 10, 25 mL; Scott (Texas, EE.UU).
Vaso de precipitado	100, 150, 600 mL; Scott (Texas, EE.UU).
Micropipetas	2-20, 25-250, 100-1000 $\mu$ L; Brand (Wertheim, Alemania).
Filtros de membrana	Filtros de membrana PVDF de 0.45 $\mu$ m de Millipore (Sao Pablo, Brasil).
<b>Equipos de laboratorio</b>	
Balanzas analítica	<i>Mettler Toledo</i> AL204, (Nänicon, Suiza).
pH.metro	MPC227 de Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suiza).
Baño ultrasónico	<i>Elmasonic</i> E30H (Elma, Alemania).
<i>Shaker</i>	<i>Minishaker, IKA JKMS</i> (Hofheim, Alemania).
Centrífuga	<i>Compac II Centrifuge, Clay Adams</i> (Sparks, M.D. EE.UU.)
Horno de secado	<i>Indumegas</i> (Bucaramanga, Colombia).
Manta de agitación y calentamiento	<i>Magnetic stirrer</i> MSH300 (Boeco, Alemania).
Baño refrigerante circulatorio	<i>Digital polystat temperatura controller, Cole-Parmer</i> (Illinois, EE.UU.).

**3.1.2 Material de referencia certificado.** En la **Tabla 13** se reportan las especificaciones comerciales de las sustancias de referencia certificadas, que se emplearon en este estudio.

**Tabla 13.** Especificaciones de las sustancias de referencia certificadas.

Sustancia	Pureza, %	Número de lote*
Ácido cafeico	98	128K0994
Ácido carnósico	91	050M1387V
Ácido <i>p</i> -cumárico	98	078K1386
Ácido rosmarínico	97	03202HJ
Ácido ursólico	90	038K1544
Apigenina	95	117K1420
Kaempferol	90	098K1181
Luteolina	98	118K4113
Naringenina	95	038K1039
Pinocembrina	95	028K1606
Quercetina	98	059K1644

\*Proveedor: *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EE.UU.)

### 3.2 MATERIAL VEGETAL

Las especies estudiadas, *L. alba*, quimiotipo carvona, *L. alba*, quimiotipo citral, *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, *L. origanoides*, quimiotipo carvacrol, *L. origanoides*, quimiotipo timol, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*, fueron colectadas en las zonas de cultivo experimental del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromaticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM, en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander. Todas las plantas fueron debidamente identificadas en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales, en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (Tabla 14).

**Tabla 14.** Identificación taxonómica y número de *voucher* de las especies bajo estudio.

<b>Especie</b>	<b>Nº COL*</b>
<i>L. alba</i> , quimiotipo carvona	512078
<i>L. alba</i> , quimiotipo citral	512077
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo felandreno	519798
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo timol	519799
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo carvacrol	512075
<i>L. citriodora</i>	517189
<i>L. micromera</i>	516924
<i>L. americana</i>	516287
<i>L. graveolens</i>	555839

\* La identificación taxonómica fue realizada por el Dr. José Luis Fernández (UN, Bogotá).

### **3.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR HPLC DE COMPUESTOS FENÓLICOS.**

El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo líquido *Agilent Technologies* 1200, que consta de una bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, un inyector manual *Agilent Technologies Series* 1200 G1328B y un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) G1315B, en una columna apolar *Agilent Technologies* ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm). El procesamiento de los datos se realizó a través del sistema de datos *Agilent ChemStation LC*, Versión B.04.01 (**Figura 9**).



**Figura 9.** Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent 1200 Series*.

Fuente: Fotografía tomada por el autor en CENIVAM el 20 de noviembre del 2010.

**3.3.1 Selección de las condiciones de análisis cromatográfico por HPLC.** Para la implementación de la metodología de análisis simultáneo de los compuestos fenólicos, *i.e.*, ácido carnósico (ACR), ursólico (AU), caféico (ACF), *p*-cumárico (APC), rosmarínico (AR) y apigenina (A), luteolina (L), quercetina (Q), kaempferol (K), naringenina (N) y pinocembrina (P), se probaron diferentes condiciones; entre los parámetros ensayados figuran longitud de onda, composición de la fase móvil, gradiente de elución y temperatura.

- **Selección de la longitud de onda.** La longitud de onda ( $\lambda$ ) de trabajo se seleccionó teniendo en cuenta la de máxima absorbancia; para ello, se tomaron los espectros ultravioleta-visible de cada uno de los analitos, realizando un barrido de  $\lambda$  en la región de 190 a 900 nm.
- **Selección de la composición de la fase móvil.** Se emplearon mezclas binarias de solventes compuestas por un solvente A

(agua:modificador ácido) y un solvente B (modificador orgánico). Los modificadores ácidos evaluados fueron los ácidos acético, trifluoroacético y o-fosfórico, y los modificadores orgánicos fueron metanol y acetonitrilo. Para cada una de las mezclas ensayadas se evaluaron diferentes gradientes de elución.

- **Selección de la temperatura de análisis.** Se evaluaron diferentes temperaturas de trabajo, *i.e.*, 25, 35 y 45°C, con el fin de observar su efecto sobre la viscosidad de la fase móvil, la separación de los analitos y el tiempo de su elución.

**3.3.2 Determinación de parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica por HPLC.** Una vez establecidas las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de los compuestos fenólicos bajo estudio, se calcularon los parámetros de eficiencia a saber: factor de retención ( $k'$ ), factor de selectividad ( $\alpha$ ), número de platos teóricos ( $N$ ) y resolución ( $R_s$ ) (**Ecuaciones 1-4**).

$$k' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{0,5b}} \right)^2 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$\alpha = \frac{(t_{Rb} - t_M)}{(t_{Ra} - t_M)} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

$$R_s = \frac{1,18 (t_{RB} - t_{RA})}{W_{0,5A} + W_{0,5B}} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

$t_R$  = Tiempo de retención del compuesto fenólico de interés (min);

$t_M$  = Tiempo muerto (min);

$W_{0,5}$  = Ancho del pico a la mitad de su altura máxima (min).

\* Los subíndices A y B indican los picos correspondientes a dos compuestos fenólicos que eluyen seguidamente.

**3.3.3 Determinación de las figuras analíticas de mérito para HPLC.** Se determinaron las figuras de mérito, tales como precisión (expresada como repetibilidad), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LQO), linealidad y sensibilidad, según lo recomendado por la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requerimientos Técnicos para Registro de Fármacos para uso Humano (ICH) [124]. Para la determinación de estos parámetros, se realizó una curva de calibración por el método de estándar externo.

**Solución stock:** Se preparó 1 mL de solución *stock* de 250 ppm de ACR, AU, ACF, APC, AR, A, L, Q, K, N y P, en una mezcla de agua:metanol (1:1).

**Soluciones de trabajo:** Se aforó a 0,5 mL un volumen determinado de solución *stock*, necesario para preparar soluciones con concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80, y 160 ppm de cada uno de los compuestos fenólicos.

- **Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención ( $t_R$ ) y áreas.** La repetibilidad del método se evaluó en términos del coeficiente de variación (CV) del  $t_R$  y del área, para el punto de la curva de calibración de 20 ppm (**Ecuación 5**).

$$CV, \% = \frac{\bar{X}}{S} * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 \dots X_n}{n} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde,

$\bar{X}$  = Promedio de los datos;

$X_i$  = Datos

n = Número de datos

S = Desviación estándar de los datos.

- **Determinación del porcentaje de recuperación.** Se determinó el porcentaje de recuperación para los compuestos fenólicos bajo estudio, en el procedimiento de limpieza de la muestra con acetato de etilo para su posterior análisis por GC-MS. Los ensayos se realizaron enriqueciendo blancos de matriz. Estos blancos se obtuvieron tomando una alícuota de extracto y diluyéndola hasta lograr que en el extracto acuoso, las cantidades de los compuestos fenólicos estuvieran por debajo del NMD del método. Se realizaron 3 réplicas por cada experimento.

- **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** La linealidad y sensibilidad del método se evaluaron empleando una curva de calibración. La linealidad se determinó evaluando el rango de concentraciones (5-160 ppm) en que la respuesta del detector es lineal, y se reportó como el cuadrado del coeficiente de determinación. La sensibilidad se reportó como la pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%.

- **Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y de cuantificación (NMC).** Con la mínima señal analítica distinguible,  $y_L$ , que pueda ser medida y que no corresponda a una fluctuación estadística de la señal del blanco, se determinó el NMD, así:

$$y_L = \overline{y_B} + kS_B \quad \text{Ecuación 8.}$$

Donde,

$\overline{y_B}$  = Promedio de las medidas del blanco;

$S_B$  = Desviación estándar del blanco;

$k$  = Valor que se obtiene de acuerdo con el nivel de confianza que se escoja, generalmente 3.

El NMD se determinó así:

$$NMD = \frac{(y_L - \bar{y}_B)}{m} \quad \text{Ecuación 9.}$$

Donde m es la pendiente de la recta. Sustituyendo la Ecuación (8) en la (9), se obtiene que:

$$NMD = \frac{kS_B}{m} \quad \text{Ecuación 10.}$$

Por lo tanto, el límite de detección se encontró dividiendo  $kS_B$  por la pendiente obtenida por regresión lineal de la curva de calibración. El nivel mínimo de cuantificación (NMC) se definió para un valor de  $k=10$  (Ecuación 11) [125].

$$NMC = \frac{kS_B}{m} \quad \text{Ecuación 11.}$$

### 3.4 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR GC DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

El análisis de compuestos fenólicos, e.g., ácidos fenólicos y flavonoides, requiere un paso previo de su derivatización para aumentar la volatilidad y mejorar su estabilidad térmica. Por tal razón, la implementación de la metodología de análisis de compuestos fenólicos por GC se dividió en tres etapas, a saber: (1) estandarización de la técnica de derivatización, (2) caracterización de los derivados de compuestos fenólicos y (3) selección de las condiciones de análisis cromatográficas.

**3.4.1 Estandarización de la técnica de derivatización.** La metilación fue la técnica empleada de derivatización de compuestos fenólicos. El primer paso en la estandarización de la técnica de derivatización fue la selección de

los sistemas de elución y de revelado para cada uno de los compuestos fenólicos bajo estudio, por cromatografía en capa fina sobre placas de gel de sílice 60 F<sub>245</sub>.

Posteriormente, se procedió a evaluar las condiciones de reacción, empleando como productos de partida sustancias de referencia certificadas (los compuestos fenólicos bajo estudio). Para ello, se empleó una modificación de la metodología descrita por Hergert *et al.* [113] y Forsyth *et al.* [114], la cual emplea sulfato de dimetilo como agente alquilante y acetona como disolvente, en medio básico. El avance de las reacciones se controló por cromatografía en capa fina sobre placas de sílica gel 60 F<sub>245</sub>.

Inicialmente, los experimentos se realizaron con dos de los once compuestos fenólicos, un flavonoide (quercetina) y un ácido fenólico (ácido rosmarínico), por su disponibilidad y costo. Una vez establecidas las condiciones de reacción para la quercetina y el ácido rosmarínico, el procedimiento se aplicó a los demás compuestos fenólicos bajo estudio.

**3.4.2 Caracterización de los derivados de compuestos fenólicos.** Los derivados de ácidos fenólicos y flavonoides, se caracterizaron por las siguientes técnicas espectroscópicas.

- **Espectroscopía de infrarrojo.** Se empleó un espectrofotómetro NICOLET AVATAR 360 FTIR, en pastillas de KBr, para muestras sólidas y en ventanas de KBr, para muestras líquidas; los espectros de infrarrojo de los derivados se utilizaron para determinar la presencia de los grupos funcionales de los derivados.
- **Espectrometría de masas.** Como una técnica confirmatoria de los derivados de los compuestos fenólicos, se utilizó un cromatógrafo de gases

*Agilent 6890 Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas (*Agilent MSD 5973*) (**Figura 10**), operado en modo *full scan*, dotado con un inyector automático *7893 Series Injector*, una columna capilar de sílice fundida, DB5-MS de 60 m x 0.25 mm, D.I., con la fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano de 0.25  $\mu\text{m}$  de grosor ( $d_f$ )). El gas de arrastre fue helio (99,9995 %, Aga Fano, S.A., Bucaramanga, Colombia) con una presión de entrada a la columna de 16,47 psi y velocidad de lineal de flujo de 26 cm/s. Las temperaturas del inyector y de la línea de transferencia permanecieron a 265 y 285  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. La programación de temperatura en el horno fue de 100  $^{\circ}\text{C}$  (5 min) hasta 300  $^{\circ}\text{C}$  (10 min) @ 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . La relación *split* fue de 1:10. La temperatura de la cámara de ionización fue de 265  $^{\circ}\text{C}$  y la energía de los electrones bombardeantes de 70 eV, el analizador cuadrupolar operó a 150  $^{\circ}\text{C}$ , con barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*), @ 4,5 scan  $\text{s}^{-1}$ , en el rango de masas de  $m/z$  45-500.



**Figura 10.** Cromatógrafo de gases *Agilent GC 6890 Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas (*Agilent MSD 5973*).

Fuente: Fotografía tomada por el autor en CENIVAM el 20 de noviembre del 2010.

### **3.4.3 Selección de las condiciones de análisis cromatográfico por GC.**

Para la implementación de la metodología de análisis simultáneo de los

compuestos fenólicos, ácidos carnósico (ACR), ursólico (AU), caféico (ACF), *p*-cumárico (APC), rosmarínico (AR) y apigenina (A), luteolina (L), quercetina (Q), kaempferol (K), naringenina (N) y pinocembrina (P), se empleó un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 7890 A. (**Figura 11**), equipado con un inyector *split/splitless* (250 °C) (relación *split* 1:10) y un detector de ionización en llama (FID) (290 °C). El gas de arrastre fue helio (99,9995 %, Aga Fano, S.A., Bucaramanga, Colombia) con una presión de entrada a la columna de 16,47 psi y velocidad de lineal de flujo de 26 cm/s. Las velocidades de flujo de gases de combustión del FID, el aire y el hidrógeno, se mantuvieron a 300 y 30 mLmin<sup>-1</sup>, respectivamente.

Para la separación de los analitos bajo estudio se evaluaron diferentes programaciones de temperatura del horno empleando una columna capilar de sílice fundida, DB5-MS de 60 m x 0.25 mm, D.I., con la fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano de 0.25 µm de grosor (d<sub>i</sub>).

**3.4.4 Determinación de parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica para GC.** La determinación de los parámetros de eficiencia cromatográfica se realizaron de la misma manera, que para HPLC (**Sección 3.3.2**).

**3.4.5 Determinación de las figuras analíticas de mérito para GC.** La determinación las figuras analíticas de mérito para cromatografía de gases se realizaron de la misma manera, que para HPLC (**Sección 3.3.3**).



**Figura 11.** Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890 A*.

Fuente: Fotografía tomada por el autor en CENIVAM el 20 de noviembre del 2010.

### **3.5 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE MATRICES VEGETALES.**

Para el análisis de compuestos fenólicos fue necesario realizar un paso de hidrólisis posterior a la extracción, con el fin de analizar los compuestos fenólicos en su forma libre y no como glucósidos. La extracción de los ácidos fenólicos y flavonoides se realizó por dos métodos, a saber: extracción con solvente y extracción con fluido supercrítico, antes de iniciar la extracción, para los dos procedimientos, el material vegetal fue secado a temperatura ambiente, picado y nuevamente secado durante 3 h a 50 °C en una estufa marca *Indumegas* (Bucaramanga, Colombia).

**3.5.1 Extracción con solvente.** Para la extracción e hidrólisis de los compuestos fenólicos se siguió el procedimiento descrito por Hertog *et al.* [126]. Al material vegetal previamente picado y seco (0,5 g), se le adicionó solución acuosa de metanol al 62,5 % (40 mL) con ácido *p*-hidroxibenzoico (1g/L) y ácido clorhídrico 6M (10 mL). Posteriormente, la mezcla de extracción se colocó en ultrasonido (15 min) y se llevó a reflujo en un baño de agua a 90 °C durante 2 h. Luego, el extracto obtenido se sometió a los siguientes procesos: a). Filtrado con filtro de membrana de PVDF de 0,45 µm e inyectado al HPLC; b). Extracción con acetato de etilo (30 mL, 3 x 10 mL). La fase orgánica fue reducida a 10 mL, por rotoevaporación a 37 °C, y se adicionó sulfato de sodio, para retirar la humedad. Posteriormente, el extracto se filtró y se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Finalmente, se llevó a cabo el procedimiento de derivatización para el posterior análisis por cromatografía de gases.

**3.5.2 Extracción con fluido supercrítico.** La extracción de los compuestos fenólicos se realizó en un equipo *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 de automático de presión; bombas de alta presión *P-200A*, para el CO<sub>2</sub> 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) (**Figura 12**).

La extracción con fluido supercrítico de los compuestos fenólicos del material vegetal, se realizó bajo las condiciones de trabajo presentadas en la **Tabla 15**.



**Figura 12.** Equipo de extracción con fluido supercrítico *Thar SFE-2000-2-FMC50*.

Fuente: Fotografía tomada por el autor en CENIVAM el 4 de marzo del 2011.

**Tabla 15.** Condiciones experimentales para la extracción con fluido supercrítico.

<b>Condiciones de extracción</b>	
Material vegetal	200 g
Presión	50 MPa
Temperatura	333 K
Flujo	40 g/min
Tiempo total de extracción	2 h
• Tiempo estático	20 min
• Tiempo dinámico	100 min

### **3.6 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.**

La cuantificación por HPLC y GC, de los compuestos fenolicos, presentes en los extractos de las especies del género *Lippia* bajo estudio, se realizó con el método de estándar externo.

#### **3.6.1 Cuantificación con cromatografía líquida de alta eficiencia.**

- **Determinación.** Se compararon los tiempos de retención y los espectros ultravioleta de los picos cromatográficos correspondientes a cada uno de los compuestos fenólicos de referencia con los de los picos presentes en los cromatogramas de los extractos de las especies en estudio.
- **Cuantificación.** La cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos de las especies del género *Lippia*, se realizó empleando el método de estándar externo. Para ello, se construyeron curvas de calibración para cada compuesto fenólico de referencia (**Sección 3.3.3**) y se extrapolaron las concentraciones de los compuestos fenólicos bajo estudio, presentes en las muestras analizadas.

**3.6.2 Cuantificación por cromatografía de gases.** La cuantificación por cromatografía de gases de los compuestos fenólicos presentes en los extractos vegetales se realizó de igual forma que en HPLC (**Sección 3.6.1**), por el método de estándar externo.

### **3.7 COMPARACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS EXTRACTOS POR LAS TÉCNICAS GC y HPLC.**

El estudio comparativo de las metodologías implementadas para el análisis de compuestos fenólicos, utilizando HPLC y GC, se realizó teniendo en cuenta las figuras analíticas de mérito (**Sección 3.3.3**), el tiempo y el costo de análisis. El tiempo de análisis se determinó como el tiempo transcurrido desde la preparación de la muestra (extracto) para el análisis cromatográfico y hasta la obtención y análisis del reporte cromatográfico. El costo de análisis se calculó teniendo en cuenta los reactivos requeridos, el uso de los equipos y la mano de obra calificada para realizar el análisis.

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC.

**4.1.1 Implementación de la metodología de análisis cromatográfico por HPLC.** El primer paso para implementar la metodología de análisis por HPLC de todos los compuestos fenólicos bajo estudio, en una sola corrida cromatográfica, fue la selección de su longitud de onda de máxima absorbancia. Para ello, se tomaron los espectros ultravioleta-visible de cada uno de los analitos, realizando un barrido en la región de  $\lambda=190$  a 900 nm (**Anexo 1**). Se fijaron cuatro longitudes de onda para el análisis simultáneo de compuestos fenólicos bajo estudio (**Tabla 16**).

**Tabla 16.** Selección de la longitud de onda de máxima absorbancia de compuestos fenólicos.

Compuesto fenólico	$\lambda$ , nm	
	Máxima absorción	Seleccionada
ACR	210	
AU	210	
N	225	210
P	280	
ACF	335	280
AR	330	
APC	325	325
A	360	

**Tabla 16.** Continuación.

L	350	
K	365	370
Q	375	

**ACF:** ácido caféico; **ACR:** ácido carnósico; **AU:** ácido ursólico; **APC:** ácido *p*-cumárico; **AR:** ácido rosmarínico; **Q:** quercetina; **N:** naringenina; **L:** luteolina; **K:** kaempferol; **A:** apigenina; **P:** pinocebrina.

Una vez determinadas las longitudes de onda de análisis, se seleccionó la fase móvil. Se realizaron diferentes pruebas tomando como criterio de selección la resolución de los compuestos fenólicos bajo estudio. El grado de separación se midió calculando la resolución,  $R_s$ , que tenía que superar a 1,5 para la separación sobre la línea base [127].

Según lo reportado en la literatura [6-8, 92, 93, 95-101], la fase móvil empleada para el análisis de compuestos fenólicos está compuesta generalmente de sistemas binarios de solventes, a saber: soluciones acuosas acidificadas con ácidos acético, trifluoroacético, *o*-fosfórico o fórmico en agua (solvente A) y metanol o acetonitrilo como modificadores orgánicos (solvente B). Para la selección de la composición de la fase móvil, las pruebas se realizaron evaluando los modificadores ácidos de menor a mayor fuerza y los modificadores orgánicos de menor a mayor fuerza de elución.

Inicialmente, se evaluó el ácido acético al 0,1 % (pH 3,6) empleando metanol como modificador orgánico. En la **Figura 2-1 (Anexo 2)**, se presentan los perfiles cromatográficos de los compuestos fenólicos patrón obtenidos a diferentes gradientes de elución. Aunque se observa que la mayoría de analitos se separan, los valores de resolución para las señales 4-5, 5-6 y 7-8 son menores que 1,5 (**Anexo 3, Tabla 3-1**). Los mejores valores de resolución se obtuvieron bajo las condiciones de análisis que se registran en la **Figura 2-1 III (Anexo 2)**. Usando estas condiciones, se procedió a aumentar el porcentaje a ácido acético en la fase móvil a 0,2 % (pH 3,2)

(**Figura 2-2, Anexo 2**). En este experimento, el tiempo de análisis disminuyó en 5 minutos, pero los valores de resolución no incrementaron (**Anexo 3, Tabla 3-1**). Por tal razón, se decidió evaluar un modificador con mayor fuerza ácida, *i.e.*, el ácido trifluoroacético (TFA).

Al emplear en la fase móvil TFA al 0,1 % (**Figura 2-3, Anexo 2**), la  $R_s$  de los picos cromatográficos 4-5, 5-6 y 7-8 no se afectó, pero se incrementó el tiempo de análisis (**Anexo 3, Tabla 3-1**). Entonces, con el fin de disminuir el tiempo de análisis y modificar la resolución cromatográfica, se cambió el modificador orgánico, es decir, el metanol se reemplazó por acetonitrilo. Se probaron diferentes gradientes de elución (**Figura 2-4, Anexo 2**), pero la resolución disminuyó considerablemente con respecto a la obtenida con metanol como modificador orgánico (**Anexo 3, Tabla 3-1**).

En la **Figura 2-5 (Anexo 2)**, se presentan los mejores resultados obtenidos empleando TFA al 0,1 % con metanol y acetonitrilo como modificadores orgánicos. Al emplear acetonitrilo como modificador orgánico, el tiempo de análisis se disminuyó en 10 min, pero se observó la mayor coelución en las señales críticas de separación (picos cromatográficos 4-8, **Anexo 3, Tabla 3-1**); esto, posiblemente, debido al aumento de la fuerza de elución del modificador orgánico. Por tanto, se descartó el uso de acetonitrilo como modificador orgánico.

Con el propósito de mejorar la separación de los picos cromatográficos 4-8, se evaluó otro modificador ácido, *i.e.*, el ácido *o*-fosfórico (**Figura 2-6, Anexo 2**). Cuando se empleó ácido *o*-fosfórico al 0,1 %, se observaron señales más simétricas, la resolución de las señales 4-5, 5-6 y 7-8 se mejoró, pero no de manera aceptable, es decir,  $R_s$  no fue superior a 1,5 (**Anexo 3, Tabla 3-1**).

Una de las variables de análisis cromatográfico, que se puede modificar para mejorar la resolución, es el flujo de la fase móvil. Se realizó un gradiente de flujo de la fase móvil durante el análisis, para aumentar la resolución de las señales críticas (picos cromatográficos 4-8), esto, sin alargar considerablemente el tiempo de análisis (**Figura 2-7, Anexo 2**).

Al variar el flujo de la fase móvil, se observó un ensanchamiento de las señales cromatográficas críticas, mientras que la resolución no aumentó, por tanto, se decidió continuar trabajando a flujo constante (**Anexo 3, Tabla 3-1**). Otra de las variables de análisis cromatográfico, que se recomienda a modificar para mejorar la resolución [7, 51, 127, 128], consiste en adicionar ácido en el modificador orgánico (**Figura 2-8, Anexo 2**). Al hacer esto, no se observó ninguna mejora en la resolución de los picos cromatográficos (**Anexo 3, Tabla 3-1**). Por tanto, la adición de ácido *o*-fosfórico en el modificador ácido se descartó.

En vista de no mejorar la resolución de las señales críticas (señales 4-6 y 7-8), se evaluaron diferentes gradientes de elución (**Figura 2-9, Anexo 2**), puesto que la variación de la fuerza de elución de la fase móvil es una de las variables que más afecta la separación [127, 128]. Se observó, que con el gradiente empleado en el experimento III (**Figura 2-9, Anexo 2**), se resolvieron los picos cromatográficos 5-6, con una  $R_s$  de 1,83 (**Anexo 3, Tabla 3-1**). No obstante, el valor de resolución para las señales 4-5 ( $R_s = 0,1 - 0,6$ ) y 7-8 ( $R_s = 0,9 - 1,3$ ) aún no fue aceptable.

La temperatura, es la variable que frecuentemente se mantiene constante en HPLC. El aumento de la temperatura se emplea para disminuir los tiempos de análisis. La mayoría de los análisis por HPLC de compuestos fenólicos se realizan a temperatura ambiente ca. 25 °C [6, 8, 51, 96-99]. No obstante, algunos autores reportan análisis a temperaturas de análisis entre 30 y 40°C, con el fin de disminuir los tiempos de análisis [7, 100,128]. Por consiguiente,

se procedió a evaluar diferentes temperaturas de columna, empleando el gradiente de elución usado en el experimento III de la **Figura 2-9 (Anexo 2)**.

Se evaluaron tres temperaturas de análisis, 25, 35 y 45 °C (**Figura 2-10, Anexo 2**). Se observó que al realizar el análisis a 35 °C, los 11 compuestos fenólicos bajo estudio sí se resolvían completamente (**Anexo 3, Tabla 3-1**).

Con base en los resultados de los experimentos realizados para el análisis por HPLC de los compuestos fenólicos bajo estudio, las condiciones con las cuales se obtiene su mejor separación se muestran en la **Tabla 17**.

Una vez determinadas las condiciones de análisis por HPLC, se inyectó cada uno de los compuestos fenólicos bajo estudio, para determinar sus tiempos de retención y su reproducibilidad (**Tabla 18**).

**Tabla 17.** Parámetros cromatográficos seleccionados para el análisis por HPLC de compuestos fenólicos.

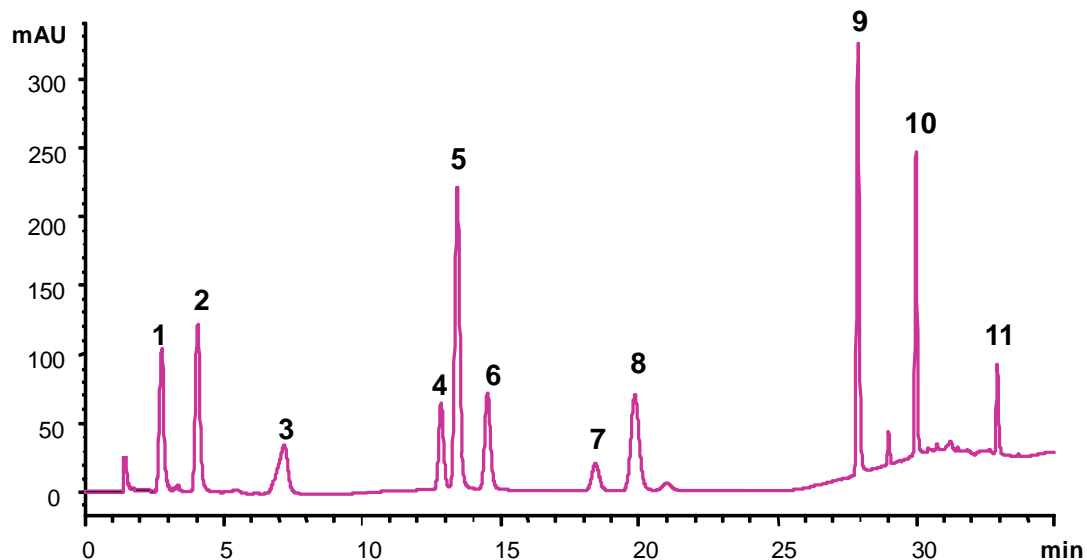
Parámetro	Especificaciones
Fase móvil	A: Ácido o-fosfórico en agua (0,1%) B: metanol.
Gradiente de elución	0-6 min: 40% B, 10 min: 48% B, 10-23 min: 48% B, 30 min: 100% B, 30-40 min 100% B.
Temperatura	35 °C
Flujo	1 mL/min
Longitudes de onda, nm	210, 280, 325 y 370
Volumen de inyección de muestra, µL	20

**Tabla 18.** Tiempos de retención de los compuestos fenólicos bajo estudio, analizados por HPLC.

Compuesto fenólico	$t_R$ , min $\pm$ S (n = 3)
<b>ACF</b>	2,75 $\pm$ 0,01
<b>APC</b>	4,06 $\pm$ 0,02
<b>AR</b>	7,01 $\pm$ 0,01
<b>Q</b>	12,77 $\pm$ 0,02
<b>N</b>	13,34 $\pm$ 0,02
<b>L</b>	14,43 $\pm$ 0,02
<b>K</b>	18,25 $\pm$ 0,05
<b>A</b>	19,5 $\pm$ 0,2
<b>P</b>	27,83 $\pm$ 0,03
<b>ACR</b>	29,9 $\pm$ 0,1
<b>AU</b>	32,96 $\pm$ 0,01

**ACF:** ácido caféico; **ACR:** ácido carnósico; **AU:** ácido ursólico; **APC:** ácido *p*-cumárico; **AR:** ácido rosmarínico; **Q:** quercetina; **N:** naringenina; **L:** luteolina; **K:** kaempferol; **A:** apigenina; **P:** pinocembrina

En la **Figura 13** se muestra un perfil cromatográfico típico de la mezcla del material de referencia de ACR, AU, ACF, APC, AR, A, L, Q, K, N y P, obtenido bajo las condiciones del análisis HPLC especificadas en la **Tabla 17**.



Cromatograma típico de compuestos fenólicos patrón, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Longitud de onda: 210 nm. 1. Ácido caféico (ACF), 2. Ácido *p*-cumárico (APC), 3. Ácido rosmarínico (AR), 4. Quercetina (Q), 5. Naringenina (N), 6. Luteolina (L), 7. Kaempferol (K), 8. Apigenina (A), 9. Pinocembrina (P), 10. Ácido carnósico (ACR), 11. Ácido ursólico (AU).

**Figura 13.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis de la mezcla de los compuestos fenólicos patrón.

#### 4.1.2 Parámetros de eficiencia de la separación de compuestos fenólicos por HPLC.

Se determinaron los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de los once compuestos fenólicos bajo estudio (**Sección 3.3.2**), a saber: resolución, número de platos teóricos, factores de selectividad, retención y simetría (**Tabla 19**) [127].

**Tabla 19.** Parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica por HPLC.

Nº de Pico	Analito	Resolución, $R_s$		Factor de retención, $k'$	Factor de selectividad, $\alpha$		Número de platos teóricos, $N$	Factor de simetría
1	ACF	-	-	0,57	-	-	2742	1,10
2	APC	$R_{s2-1}$	4,78	0,64	$\alpha_{2-1}$	2,01	3293	0,90
3	AR	$R_{s3-2}$	6,61	0,79	$\alpha_{3-2}$	2,14	2875	1,24
4	Q	$R_{s4-3}$	10,49	0,89	$\alpha_{4-3}$	2,03	28382	0,85
5	N	$R_{s5-4}$	1,85	0,89	$\alpha_{5-4}$	1,25	28254	0,88
6	L	$R_{s6-5}$	3,25	0,9	$\alpha_{6-5}$	1,49	26955	0,87
7	K	$R_{s7-6}$	5,29	0,92	$\alpha_{7-6}$	1,30	23533	0,93
8	A	$R_{s8-7}$	2,8	0,93	$\alpha_{8-7}$	1,18	22262	0,93
9	P	$R_{s9-8}$	9,52	0,95	$\alpha_{9-8}$	1,45	428831	0,87
10	ACR	$R_{s10-9}$	12,26	0,95	$\alpha_{10-9}$	1,28	811958	0,86
11	AU	$R_{s11-10}$	5,84	0,96	$\alpha_{11-10}$	1,31	894146	0,75

**ACF:** ácido caféico; **ACR:** ácido carnósico; **AU:** ácido ursólico; **APC:** ácido *p*-cumárico; **AR:** ácido rosmarínico; **Q:** quercetina; **N:** naringenina; **L:** luteolina; **K:** kaempferol; **A:** apigenina; **P:** pinocembrina

Todos los compuestos fenólicos bajo estudio se lograron separar con  $R_s > 1,5$ . En cromatografía líquida, para una  $R_s > 1,5$  se requieren más de 2000 platos teóricos,  $N$  [128, 129]. En este caso, para todos los compuestos fenólicos el  $N$  fue superior a 2742. En cuanto al factor de retención, es importante tener en cuenta que la resolución no varía linealmente con el  $k'$  sino con  $k'/(k'+1)$ , de tal modo, que un aumento desmedido de  $k'$  no se reflejará en la resolución, aunque sí en un tiempo de análisis más largo, y una disminución de  $k'$  conduce a la resolución más baja. De acuerdo con lo mencionado anteriormente, se han indicado rangos apropiados de  $k'$  entre 0,5 y 20 [127]. En el presente trabajo, el factor de retención para los compuestos fenólicos bajo estudio estuvo entre 0,57 y 0,96.

El factor de selectividad es otro parámetro de separación cromatográfica. Si  $\alpha$  es igual a 1, las señales cromatográficas no se diferencian (co-elución completa de analitos), con el aumento del valor de  $\alpha$ , la selectividad se incrementa. Para todos los analitos, el valor de  $\alpha$  fue mayor de 1. Finalmente, se observó que el factor de simetría de los compuestos fenólicos fue cercano a uno (0,85-1,10), lo cual indica que las señales cromatográficas no presentaban *tailing* o *fronting* excesivos, es decir, que los picos cromatográficos no se alejaban considerablemente de su debida forma gaussiana [128].

#### 4.1.3 Figuras analíticas de mérito para HPLC.

- **Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención ( $t_R$ ) y área cromatográfica.** Al inyectar seis veces 20  $\mu$ L de una solución de compuestos fenólicos (punto de la curva de calibración, 40 ppm), se estimó la repetibilidad del método. Los resultados para la evaluación del método, en cuanto a los  $t_R$  y áreas de picos cromatográficos, se observan en las **Tablas 20 y 21**, respectivamente.

Los coeficientes de variación de los tiempos de retención estuvieron entre 0,04 y 1,1 % y, para las áreas cromatográficas, entre 1,8 y 4,3 %. En ambos casos, los CV no superaron los valores recomendados por las Buenas Prácticas de Laboratorio (2 y 10 % para tiempos de retención y áreas cromatográficas, respectivamente), indicando que el método cumplió con la norma y fue repetible.

**Tabla 20.** Repetibilidad de los  $t_R$  de los compuestos fenólicos, analizados por HPLC.

Compuesto fenólico	Tiempo de retención, min			$\bar{t}_R$ (n = 6)	S	CV, %
<b>ACF</b>	2,751	2,759	2,757	2,75	0,01	0,38
	2,768	2,739	2,745			
<b>APC</b>	4,050	4,064	4,065	4,06	0,02	0,53
	4,054	4,089	4,023			
<b>AR</b>	7,000	7,030	7,034	7,01	0,01	0,21
	7,002	7,011	7,005			
<b>Q</b>	12,739	12,762	12,778	12,77	0,02	0,16
	12,783	12,754	12,792			
<b>N</b>	13,308	13,333	13,353	13,34	0,02	0,17
	13,367	13,342	13,312			
<b>L</b>	14,393	14,418	14,442	14,43	0,02	0,17
	14,403	14,445	14,452			
<b>K</b>	18,219	18,248	18,295	18,25	0,04	0,19
	18,276	18,229	18,203			
<b>A</b>	19,619	19,651	19,071	19,5	0,2	1,1
	19,567	19,623	19,528			
<b>P</b>	27,811	27,882	27,841	27,83	0,03	0,10
	27,834	27,811	27,821			
<b>ACR</b>	29,972	29,976	29,798	29,9	0,1	0,2
	29,906	29,931	29,998			
<b>AU</b>	32,958	32,943	32,950	32,96	0,01	0,04
	32,967	32,976	32,939			

**ACF:** ácido caféico; **ACR:** ácido carnósico; **AU:** ácido ursólico; **APC:** ácido *p*-cumárico; **AR:** ácido rosmarínico; **Q:** quercetina; **N:** naringenina; **L:** luteolina; **K:** kaempferol; **A:** apigenina; **P:** pinocembrina.

**Tabla 21.** Repetibilidad de áreas de picos cromatográficos de los compuestos fenólicos, analizados por HPLC.

Compuesto fenólico	Área, mAU*s			A ( n = 6)	S	CV, %
<b>ACF</b>	1004,75	1033,78	1063,13	1040	25	2,4
	1042,56	1076,23	1035,12			
<b>APC</b>	1394,77	1423,39	1477,94	1430	35	2,5
	1399,45	1412,87	1467,23			
<b>AR</b>	846,05	860,99	896,90	860	26	3,0
	823,84	876,42	880,12			
<b>Q</b>	749,50	757,67	784,35	770	19	2,5
	755,12	771,23	799,64			
<b>N</b>	2774,35	2828,42	2941,86	2860	60	2,1
	2843,34	2866,12	2911,01			
<b>L</b>	983,45	997,04	1036,99	1000	19	1,9
	993,12	998,23	993,01			
<b>K</b>	371,39	372,61	388,07	380	7	1,8
	381,03	379,98	370,38			
<b>A</b>	1416,34	1435,68	1489,39	1450	32	2,2
	1454,67	1427,34	1489,65			
<b>P</b>	2066,73	2117,30	2203,19	2150	64	3,0
	2087,98	2201,68	2205,89			
<b>ACR</b>	1138,30	1161,30	1219,16	1200	51	4,3
	1284,34	1177,32	1199,03			
<b>AU</b>	331,09	308,46	314,46	320	10	3,2
	335,40	325,78	319,98			

**ACF:** ácido caféico; **ACR:** ácido carnósico; **AU:** ácido ursólico; **APC:** ácido *p*-cumárico; **AR:** ácido rosmarínico; **Q:** quercetina; **N:** naringenina; **L:** luteolina; **K:** kaempferol; **A:** apigenina; **P:** pinocembrina.

- **Determinación del porcentaje de recuperación.** Se evaluó el porcentaje de recuperación de los compuestos fenólicos en las etapas de extracción líquido-líquido, con acetato de etilo, para eliminar interferencias. El porcentaje de recuperación de cada uno de los compuestos fenólicos estudiados estuvo entre 62 y 114 % (**Tabla 22**), rango aceptado por las Buenas Prácticas de Laboratorio.

**Tabla 22.** Porcentaje de recuperación de los compuestos fenólicos en el procedimiento de limpieza de la muestra.

Compuesto fenólico	Recuperación , % (n=3)
<b>ACF</b>	97 ± 5
<b>APC</b>	106 ± 5
<b>AR</b>	72 ± 4
<b>Q</b>	110 ± 5
<b>N</b>	114 ± 3
<b>L</b>	112± 5
<b>K</b>	111 ± 4
<b>A</b>	112 ± 5
<b>P</b>	110 ± 2
<b>ACR</b>	92 ± 3
<b>AU</b>	62 ± 2

**ACF:** ácido caféico; **ACR:** ácido carnósico; **AU:** ácido ursólico; **APC:** ácido *p*-cumárico; **AR:** ácido rosmarínico; **Q:** quercetina; **N:** naringenina; **L:** luteolina; **K:** kaempferol; **A:** apigenina; **P:** pinocembrina.

- **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** Mediante la curva de calibración para cada uno de los compuestos fenólicos (**Anexo 3**), se evaluaron la linealidad y la sensibilidad del método. Los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 23**.

**Tabla 23.** Linealidad y sensibilidad del método por HPLC.

Compuesto fenólico	$\lambda$ , nm	Ecuación	$R^2$	b	Sb	$b \pm Sb$
ACF	325	$y=51,56 x$	0,9991	51,6	0,3	$51,5 \pm 0,7$
APC	325	$y=41,01 x$	0,9988	41,0	0,2	$41,0 \pm 0,6$
AR	325	$y=24,48 x$	0,9991	24,5	0,1	$24,5 \pm 0,3$
Q	370	$y=66,15 x$	0,9987	66,2	0,3	$66,2 \pm 0,9$
N	210	$y=61,31 x$	0,9986	61,3	0,3	$61,3 \pm 0,8$
L	370	$y=116,45 x$	0,9982	116,5	0,6	$117 \pm 2$
K	370	$y=32,50 x$	0,9991	32,5	0,3	$32,5 \pm 0,9$
A	210	$y=68,65 x$	0,9996	68,7	0,2	$68,7 \pm 0,4$
P	280	$y=37,15 x$	0,9998	37,2	0,2	$37,2 \pm 0,5$
ACR	210	$y=60,54 x$	0,9992	60,5	0,3	$60,5 \pm 0,8$
AU	210	$y=8,32 x$	0,9992	8,3	0,3	$8,3 \pm 0,8$

ACF: ácido caféico; ACR: ácido carnósico; AU: ácido ursólico; APC: ácido *p*-cumárico; AR: ácido rosmarínico; Q: quercetina; N: naringenina; L: luteolina; K: kaempferol; A: apigenina; P: pinocembrina.

En el rango de 5-160 ppm de concentraciones evaluadas, se observó una buena linealidad (coeficiente de determinación  $R^2=0,9982-0,9998$ ). Las pendientes de la curva de calibración muestran una sensibilidad del método alta para los compuestos fenólicos ( $b= 24,5 - 116,5$ ), excepto para el ácido ursólico, con pendiente de 8,3. La desviación estándar de la pendiente de la curva de calibración de los compuestos fenólicos estuvo en el intervalo de 0,1-0,6, lo cual muestra la precisión de las curvas de calibración. Por consiguiente, se puede inferir que el método fue aplicable para el rango de las concentraciones de compuestos fenólicos examinadas (5-160 ppm).

- **Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LQO).** Para la determinación de LOD y LQO, se siguieron

los criterios descritos en la **Sección 3.3.3**. En la **Tabla 24**, se observan los LOD y LQO para cada uno de los compuestos fenólicos estudiados.

**Tabla 24.** Límites de detección y cuantificación obtenidos por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos estudiados.

Compuesto fenólico	$\lambda$ , nm	LOD, ppm	LOQ, ppm
<b>ACF</b>	325	0,28	0,97
<b>APC</b>	325	0,48	1,59
<b>AR</b>	325	1,37	4,58
<b>Q</b>	370	0,73	2,46
<b>N</b>	210	0,66	2,20
<b>L</b>	370	0,80	2,60
<b>K</b>	370	1,69	5,62
<b>A</b>	210	1,13	3,78
<b>P</b>	280	0,36	1,21
<b>ACR</b>	210	0,24	0,79
<b>AU</b>	210	2,36	7,88

**ACF:** ácido caféico; **ACR:** ácido carnósico; **AU:** ácido ursólico; **APC:** ácido *p*-cumárico; **AR:** ácido rosmarínico; **Q:** quercetina; **N:** naringenina; **L:** luteolina; **K:** kaempferol; **A:** apigenina; **P:** pinocebrina

- **Determinación de la reproducibilidad de  $t_R$  y áreas cromatográficas.** Para evaluar la reproducibilidad del método, se inyectó durante tres días consecutivos una solución de compuestos fenólicos de 40 ppm. Los resultados obtenidos para áreas cromatográficas y  $t_R$  se muestran en las **Tablas 25 y 26**. Los coeficientes de variación para el caso de las áreas cromatográficas estuvieron en el intervalo de 0,5-5,7 % y para los  $t_R$  no superaron el 1%. Estos valores son aceptados por las Buenas Prácticas de Laboratorio y, por consiguiente, muestran que el método fue altamente reproducible.

**Tabla 25.** Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de compuestos fenólicos analizados por HPLC-DAD.

Analito	Área, mAU*s			A (n = 3)	S	CV, %
	Día 1	Día 2	Día 3			
<b>ACF</b>	1045,98	1025,84	1093,56	1060	35	3,3
<b>APC</b>	1337,95	1402,37	1418,23	1390	43	3,1
<b>AR</b>	859,23	804,83	866,92	840	34	4,0
<b>Q</b>	793,67	749,35	756,23	770	24	3,1
<b>N</b>	2834,77	2849,51	2912,64	2870	41	1,4
<b>L</b>	995,34	989,23	998,44	990	5	0,5
<b>K</b>	399,79	377,25	366,84	380	17	4,4
<b>A</b>	1494,83	1411,56	1478,25	1460	44	3,0
<b>P</b>	2214,34	2256,22	2276,72	2250	32	1,4
<b>ACR</b>	1239,03	1194,27	1173,98	1200	33	2,8
<b>AU</b>	317,02	355,38	340,22	340	19	5,7

**ACF:** ácido caféico; **ACR:** ácido carnósico; **AU:** ácido ursólico; **APC:** ácido *p*-cumárico; **AR:** ácido rosmarínico; **Q:** quercetina; **N:** naringenina; **L:** luteolina; **K:** kaempferol; **A:** apigenina; **P:** pinocembrina

**Tabla 26.** Reproducibilidad de los  $t_R$  de compuestos fenólicos obtenidos por HPLC-DAD.

Analito	Tiempo de retención, min			<X> (n = 3)	S	CV, %
	Día 1	Día 2	Día 3			
<b>ACF</b>	2,691	2,709	2,707	2,702	0,008	0,298
<b>APC</b>	4,045	4,104	4,087	4,08	0,02	0,61
<b>AR</b>	7,120	7,034	7,092	7,08	0,04	0,51
<b>Q</b>	12,723	12,799	12,801	12,77	0,04	0,28
<b>N</b>	13,346	13,316	13,382	13,35	0,03	0,20
<b>L</b>	14,313	14,476	14,495	14,43	0,08	0,57
<b>K</b>	18,299	18,306	18,292	18,30	0,01	0,03
<b>A</b>	19,638	19,581	19,612	19,61	0,02	0,12
<b>P</b>	27,835	27,894	27,811	27,85	0,03	0,13
<b>ACR</b>	29,989	29,923	30,003	29,97	0,03	0,12
<b>AU</b>	32,934	32,921	33,012	32,96	0,04	0,12

**ACF:** ácido caféico; **ACR:** ácido carnósico; **AU:** ácido ursólico; **APC:** ácido *p*-cumárico; **AR:** ácido rosmarínico; **Q:** quercetina; **N:** naringenina; **L:** luteolina; **K:** kaempferol; **A:** apigenina; **P:** pinocembrina

## 4.2 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR GC.

**4.2.1 Estandarización de la técnica de derivatización.** El primer paso para estandarizar la técnica de derivatización de compuestos fenólicos fue la selección de los sistemas de elución y de revelado, para cada uno de los compuestos fenólicos bajo estudio, por cromatografía en capa fina sobre placas de gel de sílice 60 F<sub>245</sub>. Se evaluaron diferentes mezclas de metanol:acetato de etilo, hexano:acetato de etilo y cloroformo:acetato de etilo, con el objetivo de seleccionar un sistema de elución con el cual se obtuviera un factor de retención ( $R_f$ ) entre 0,1 - 0,7. En la **Tabla 27**, se muestran los sistemas de elución seleccionados para los compuestos fenólicos.

**Tabla 27.** Sistemas de elución y de revelado de compuestos fenólicos por cromatografía en capa fina.

Analito	Sistema de elución	Revelador	$R_f$
ACF	Hexano:acetato de etilo (80:20)	Luz ultravioleta ( $\lambda=254$ nm), Yodo	0,15
APC	Hexano:acetato de etilo (50:50)	Luz ultravioleta ( $\lambda=254$ nm), Yodo	0,20
AR	Acetato de etilo (100%)	Luz ultravioleta ( $\lambda=254$ nm), Yodo	0,10
Q	Acetato de etilo (100%)	Luz ultravioleta ( $\lambda=254$ nm), Yodo	0,63
N	Hexano:acetato de etilo (70:30)	Luz ultravioleta ( $\lambda=254$ nm), Yodo	0,14
L	Hexano:acetato de etilo (30:70)	Luz ultravioleta ( $\lambda=254$ nm), Yodo	0,43

**Tabla 27.** Continuación.

<b>K</b>	Hexano:acetato de etilo (50:50)	Luz ultravioleta ( $\lambda=254$ nm), Yodo	0,57
<b>A</b>	Hexano:acetato de etilo (50:50)	Luz ultravioleta ( $\lambda=254$ nm), Yodo	0,20
<b>P</b>	Hexano:acetato de etilo (70:30)	Luz ultravioleta ( $\lambda=254$ nm), Yodo	0,31
<b>ACR</b>	Hexano:acetato de etilo (20:80)	Revelador inorgánico <sup>a</sup>	0,62
<b>AU</b>	Cloroformo:acetato de etilo (90:10)	Revelador inorgánico	0,28

<sup>a</sup>Revelador inorgánico: Sulfato de cerio, ácido fosfomolibdico y ácido sulfúrico en agua.

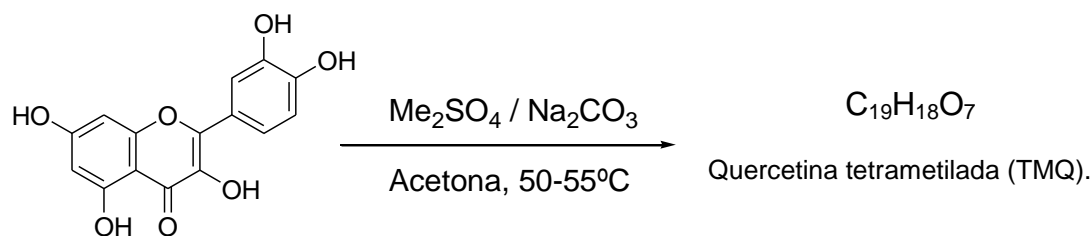
**ACF:** Ácido caféico, **APC:** Ácido *p*-cumárico, **AR:** Ácido rosmarínico, **Q:** Quercetina, **N:** Naringenina, **L:** Luteolina, **K:** Kaempferol, **A:** Apigenina, **P:** Pinocebrina, **ACR:** Ácido carnósico, **AU:** Ácido ursólico.

Una vez seleccionados los sistemas de elución, se procedió a evaluar las condiciones de reacción. Para ello, se empleó una modificación de la metodología descrita por HERGERT *et al.* [113] y FORSYTH *et al.* [114].

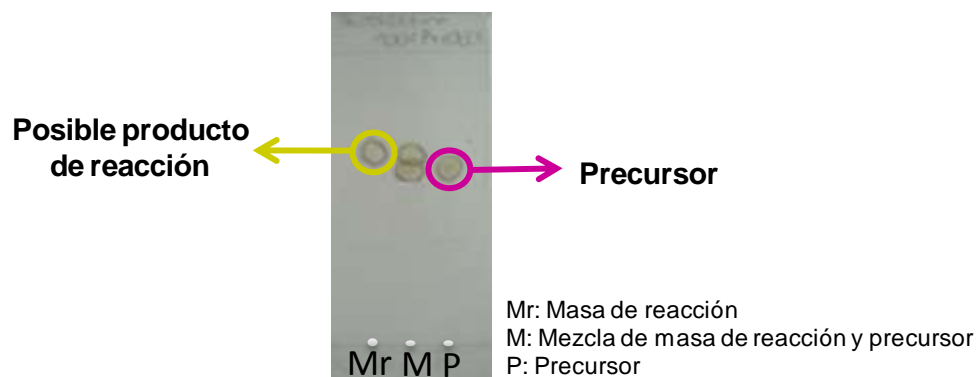
#### 4.2.1.1 Metilación de la quercetina.

En un balón de 5 mL de capacidad, se depositaron 0,003 mmol de quercetina (1 mg), 0,08 mmol de carbonato de sodio (8,7 mg) y 300  $\mu$ L de acetona anhidra. La solución se agitó vigorosamente durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 0,006 mmol de sulfato de dimetilo (6,3  $\mu$ L) y la reacción, en agitación vigorosa, se calentó a 50-55°C, hasta su finalización (**Esquema 2**).

## Esquema 2. Metilación de la quercetina.



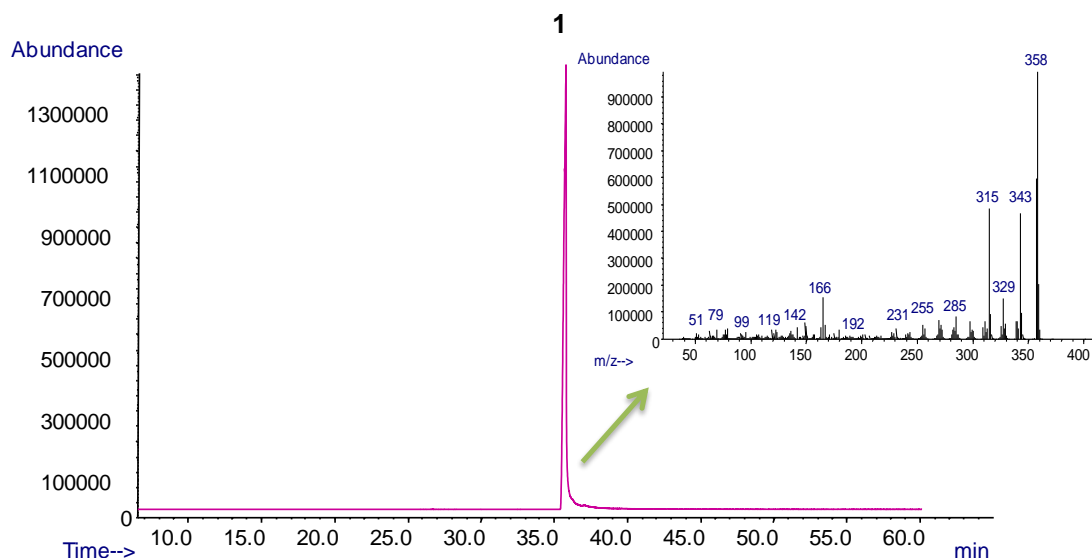
El tiempo de reacción se determinó haciendo controles por cromatografía en capa fina y se observó, que dos horas después de adicionar el agente alquilante (sulfato de dimetilo), el precursor se consumió por completo (**Figura 14**).



**Figura 14.** Cromatografía en capa fina del control de la reacción de metilación de la quercetina (Tiempo de reacción: 2 horas).

Finalmente, a la masa de reacción se le adicionó agua (1 mL), para eliminar el exceso de sulfato de dimetilo, se extrajo con diclorometano (3 x 2 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró a un volumen de 100  $\mu\text{L}$  y se inyectó al cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas.

En la **Figura 15**, se presenta el perfil cromatográfico de la masa de reacción de metilación de la quercetina extraída con diclorometano. La estructura del producto de reacción (quercetina tetrametilada) se corroboró por espectroscopia de infrarrojo y espectrometría de masas (**Sección 4.2.2**).

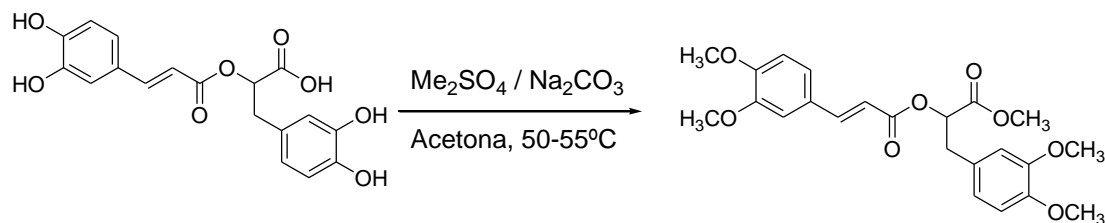


**Figura 15.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación de la quercetina extraída con diclorometano.  
1. Quercetina tetrametilada (TMQ).

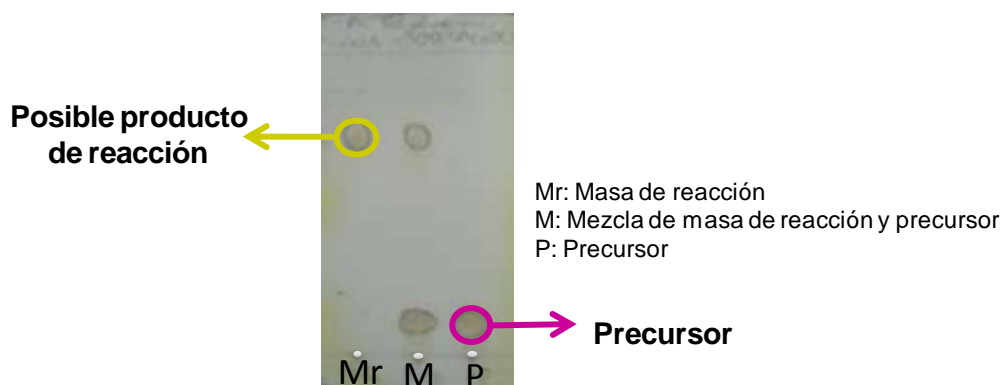
#### 4.2.1.2 Metilación del ácido rosmarínico.

En un balón de 5 mL de capacidad, se depositaron 0,0027 mmol del ácido rosmarínico (1 mg), 0,067 mmol de carbonato de sodio (7,04 mg) y 300  $\mu$ L de acetona anhidra. La solución se agitó vigorosamente durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 0,0054 mmol de sulfato de dimetilo (5,2  $\mu$ L) y la reacción, en agitación vigorosa, se calentó a 50-55°C hasta su finalización (**Esquema 3**).

### Esquema 3. Metilación del ácido rosmarínico.

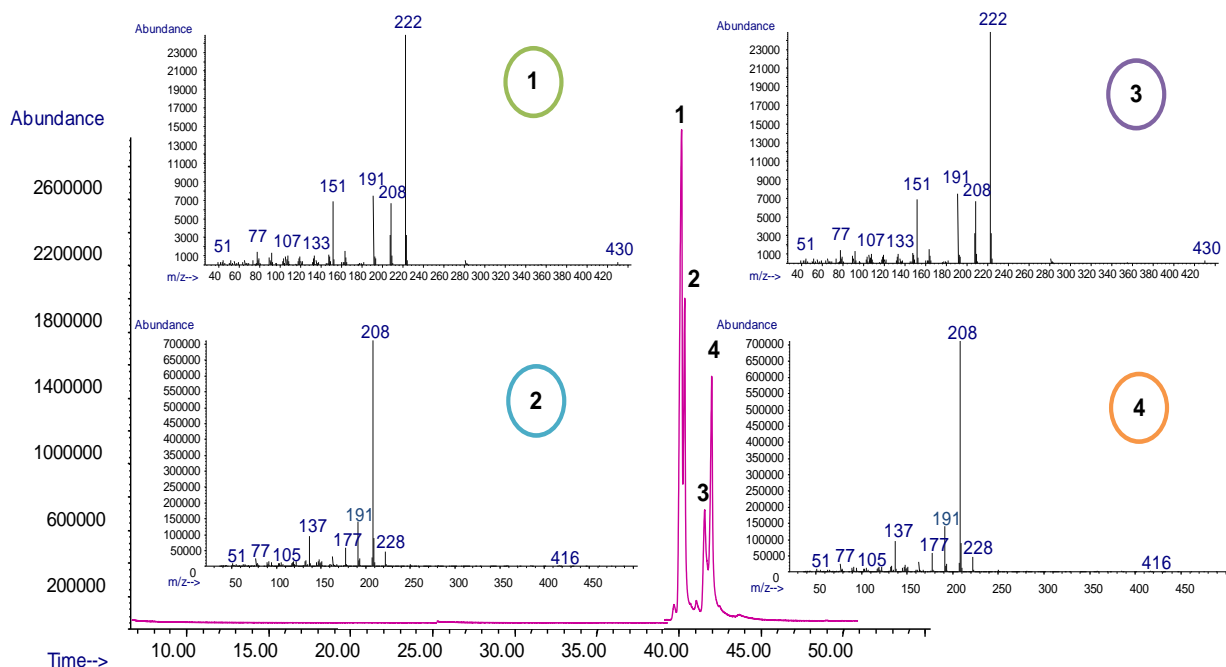


De igual forma que en la metilación de la quercetina, el tiempo de reacción fue de dos horas después de adicionar el agente alquilante (**Figura 16**).



**Figura 16.** Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación del ácido rosmarínico (Tiempo de reacción: 2 horas).

Posteriormente, a la masa de reacción se le adicionó agua (1 mL), para eliminar el exceso de sulfato de dimetilo, se extrajo con diclorometano (3 x 2 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró a un volumen de 100  $\mu\text{L}$  y se inyectó al cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas. En la **Figura 17**, se presenta el perfil cromatográfico de la masa de reacción de metilación del ácido rosmarínico extraída con diclorometano.



**Figura 17.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación del ácido rosmarínico extraída en diclorometano. **1.** *cis*-Ácido rosmarínico tetrametilado; **2.** *cis*-Ácido rosmarínico pentametilado; **3.** *trans*-Ácido rosmarínico tetrametilado; **4.** *trans*-Ácido rosmarínico pentametilado.

La formación de los productos de reacción **1-4** se confirmó con base en sus espectros de masas, en estos, se registran las señales de los iones moleculares, que corresponden a sus fórmulas condensadas.

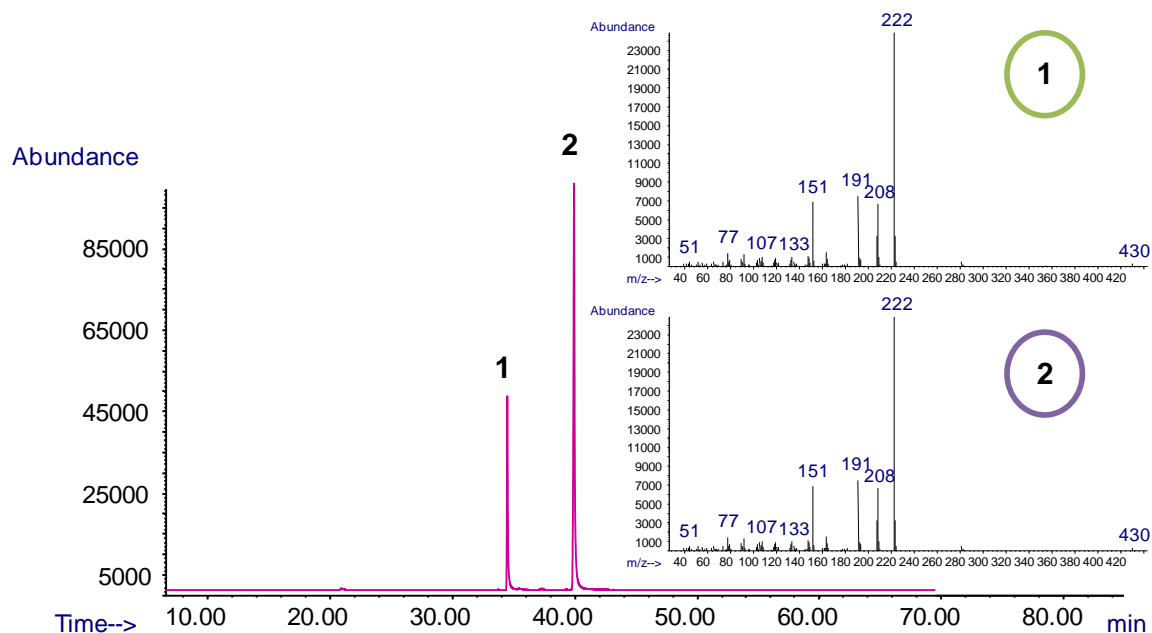
El precursor de la reacción, es decir, el material de referencia certificado de ácido rosmarínico, corresponde a una mezcla de sus isómeros *cis*- y *trans*-, razón por la cual se esperaba la formación de dos productos, los isómeros *cis*- y *trans*- del producto de reacción correspondiente. Sin embargo, en el perfil cromatográfico (**Figura 17**) se observó la formación de cuatro productos de reacción, a saber: los isómeros tetrametilados *cis*- y *trans*- del precursor

correspondiente y los isómeros pentametilados *cis*- y *trans*- del respectivo precursor. La formación de los isómeros tetrametilados, no previstos inicialmente, ocurrió posiblemente al adicionar agua al medio de reacción para eliminar el exceso de sulfato de dimetilo, éste se hidrolizó a metanol y ácido sulfúrico y, así el último, facilitó la hidrólisis ácida de una porción los isómeros del producto de reacción pentametilado hasta los isómeros del producto tetrametilado.

Inicialmente, para la reacción de metilación se empleó una relación molar de compuesto fenólico, sulfato de dimetilo y carbonato de sodio (1:20:20); con el fin de evitar la hidrólisis de los isómeros del producto de reacción pentametilado, se decidió aumentar tres veces la relación molar de carbonato de sodio con respecto al sulfato de dimetilo. De esta manera, las nuevas condiciones de metilación del ácido rosmarínico correspondieron a una relación molar de 1:20:60 de compuesto fenólico, sulfato de dimetilo y carbonato de sodio.

Como se muestra en la **Figura 18**, las nuevas condiciones establecidas condujeron a la formación exclusiva de los isómeros *cis*- y *trans*- del producto pentametilado. La formación de los productos de reacción **1** y **2** se corroboró por espectroscopia de infrarrojo y espectrometría de masas (**Sección 4.2.2**).

Los resultados de los experimentos realizados para la reacción de metilación de los compuestos fenólicos, quercetina y ácido rosmarínico, establecieron las mejores condiciones para la reacción de metilación de los compuestos fenólicos bajo estudio (**Tabla 28**).



**Figura 18.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de la masa de reacción de metilación del ácido rosmarínico extraída con diclorometano. **1.** *cis*-Ácido rosmarínico pentametilado (*c*-PMAR), **2.** *trans*-Ácido rosmarínico pentametilado (*t*-PMAR).

Una vez establecidas las condiciones de reacción para la quercetina y el ácido rosmarínico, el procedimiento se aplicó a los demás compuestos fenólicos bajo estudio. Para todos los compuestos fenólicos se realizó un control de capa fina después de las dos horas de reacción, luego de adicionar el agente alquilante, con el fin de verificar que el tiempo de reacción fuera el mismo para todos los compuestos fenólicos.

**Tabla 28.** Condiciones de reacción de metilación de compuestos fenólicos.

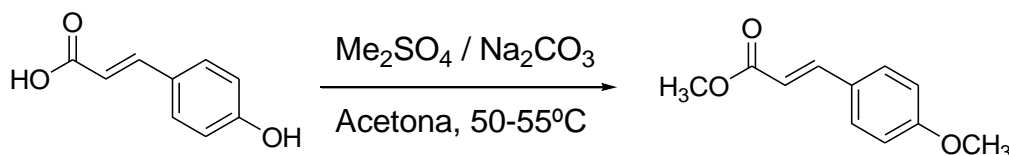
Condiciones de reacción*	
Relación de compuesto fenólico:sulfato de dimetilo:carbonato de sodio.	1:20:60
Disolvente	Acetona
Temperatura	55-60 °C
Tiempo	2 h

\*La reacción siempre se llevó a cabo con agitación.

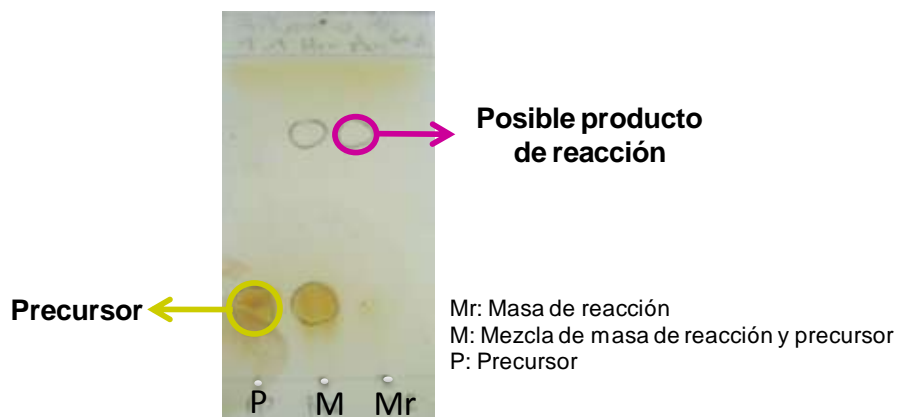
#### 4.2.1.3 Metilación del ácido *p*-cumárico.

Empleando las condiciones de reacción mencionadas en la **Tabla 28**, se realizó la metilación del ácido *p*-cumárico (**Esquema 4**). Al igual que la reacción de metilación de la quercetina y del ácido rosmarínico, la reacción finalizó dos horas después de adicionar el agente alquilante (**Figura 19**). En la **Figura 20**, se presenta el perfil cromatográfico de la masa de reacción de metilación del ácido *p*-cumárico extraída con diclorometano.

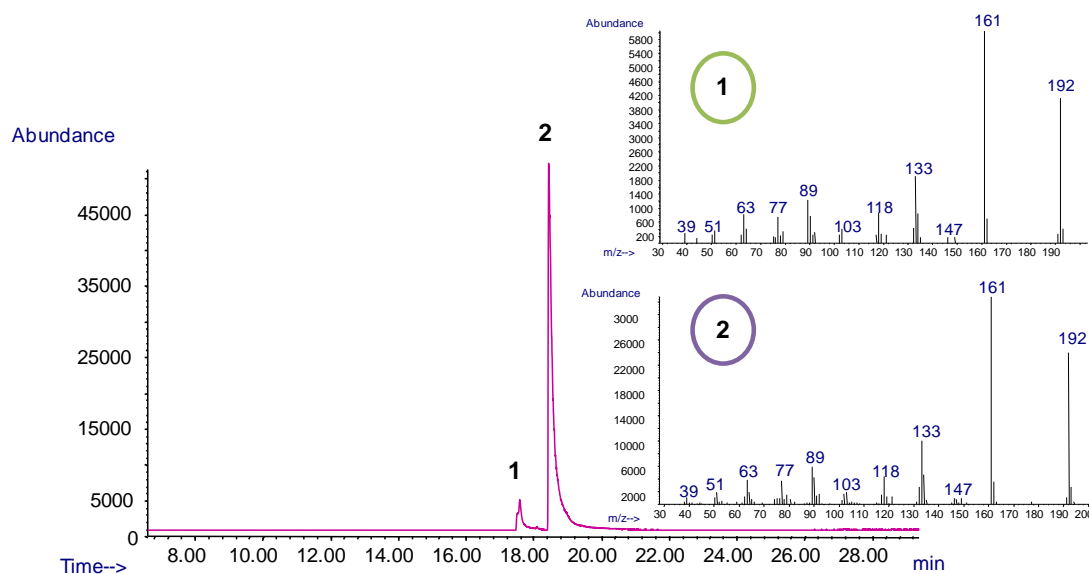
#### Esquema 4. Metilación del ácido *p*-cumárico.



La formación de los productos de reacción de metilación del ácido *p*-cumárico, quedó confirmada con base en sus espectros de masas (**Sección 4.2.2**).



**Figura 19.** Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación del ácido *p*-cumárico (Tiempo de reacción: 2 horas).

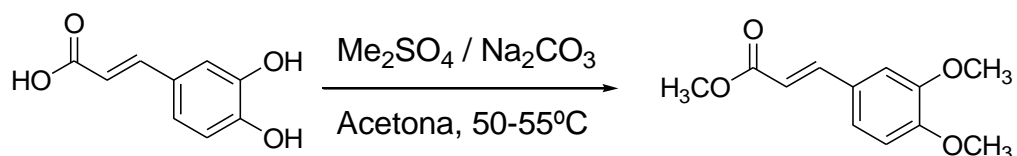


**Figura 20.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación del ácido *p*-cumárico extraída con diclorometano. **1.** *cis*-Ácido *p*-cumárico dimetilado (*c*-DMAPC), **2.** *trans*-Ácido *p*-cumárico dimetilado (*t*-DMAPC).

#### 4.2.1.4 Metilación del ácido caféico.

Se realizó la metilación del ácido caféico (**Esquema 5**), empleando las condiciones de reacción mencionadas en la **Tabla 28**.

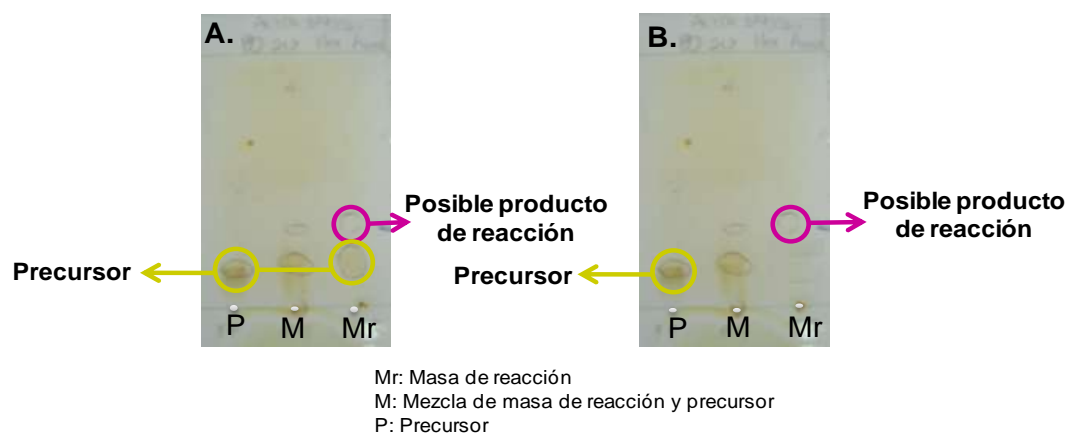
**Esquema 5.** Metilación del ácido caféico.



El tiempo de reacción se controló por cromatografía de capa fina. Al realizar el control de reacción a las dos horas, después de adicionar el agente alquilante, se observó que todavía había precursor (ácido caféico) en la masa de reacción. La reacción continuó hasta que se observó que el precursor se consumió totalmente, es decir, un tiempo total de reacción fue de 5 h (**Figura 21**).

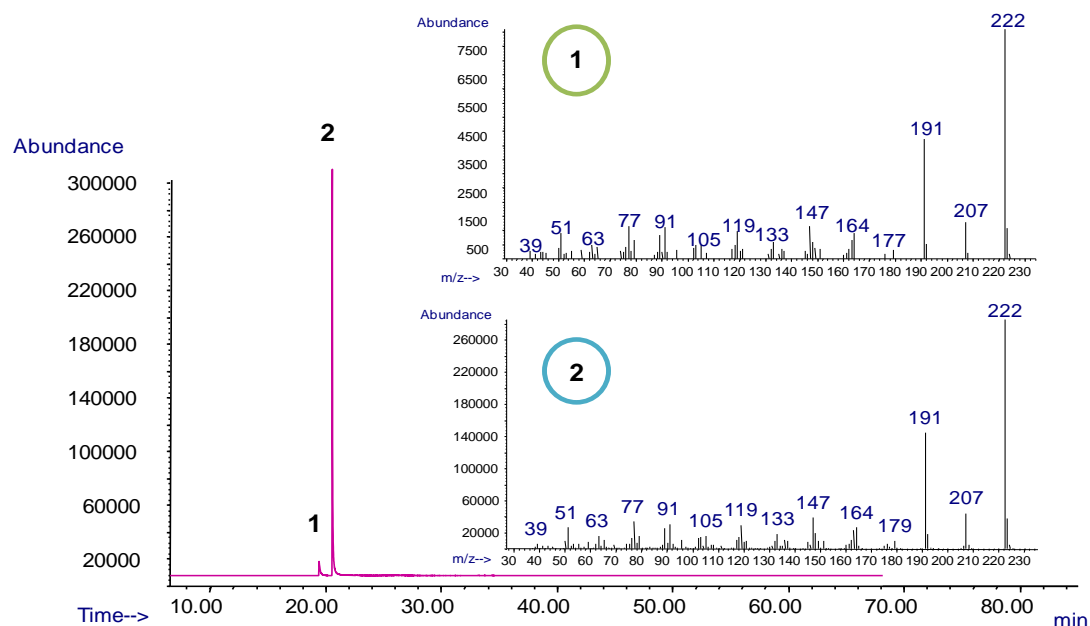
A la luz de estos resultados, y con el firme propósito de fijar el tiempo igual de reacción para todos los compuestos fenólicos bajo estudio, se analizó por GC-FID la masa de reacción extraída con diclorometano a las dos y cinco horas de reacción. Se determinó cromatográficamente que a las 2 horas la reacción finalizaba casi por completo ( $87 \pm 2$  %,  $n=2$ ). Por tanto, se consideró aceptable un tiempo de reacción para el ácido caféico de dos horas.

La formación de los productos de reacción de metilación del ácido caféico, quedaron confirmados con los espectros de masas (**Sección 4.2.2**).



**Figura 21.** Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación del ácido caféico. **A.** Dos horas de reacción; **B.** Cinco horas de reacción.

En la **Figura 22**, se presenta el perfil cromatográfico de la masa de reacción de metilación del ácido caféico extraída en diclorometano.

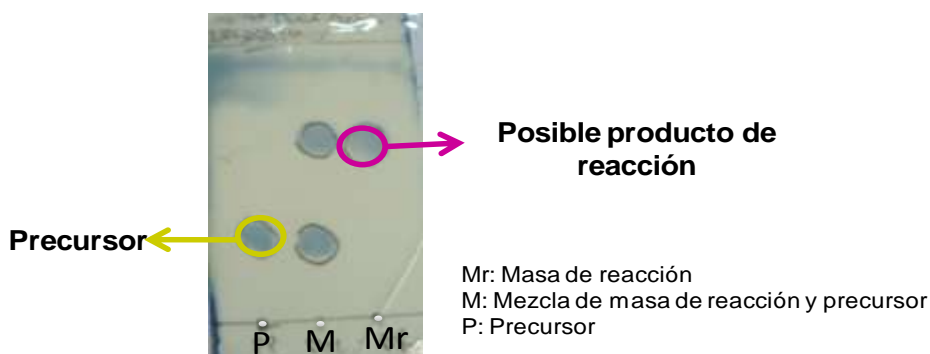
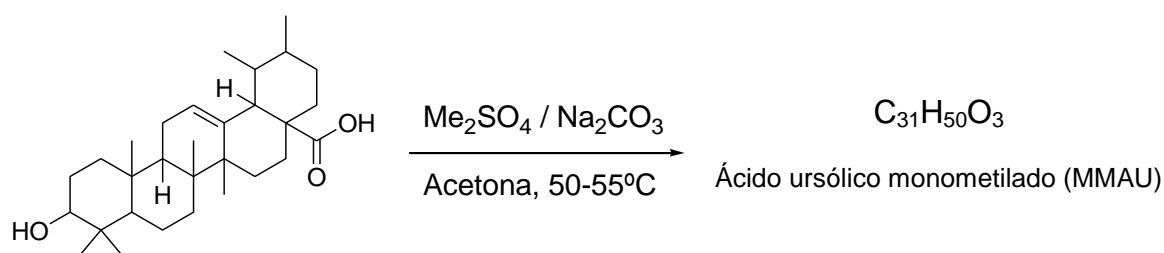


**Figura 22.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación del ácido caféico extraída en diclorometano. **1.** *cis*-Ácido caféico trimetilado (*c*-TRMACF), **2.** *trans*-Ácido caféico trimetilado (*t*-TRMACF).

#### 4.2.1.5 Metilación del ácido ursólico.

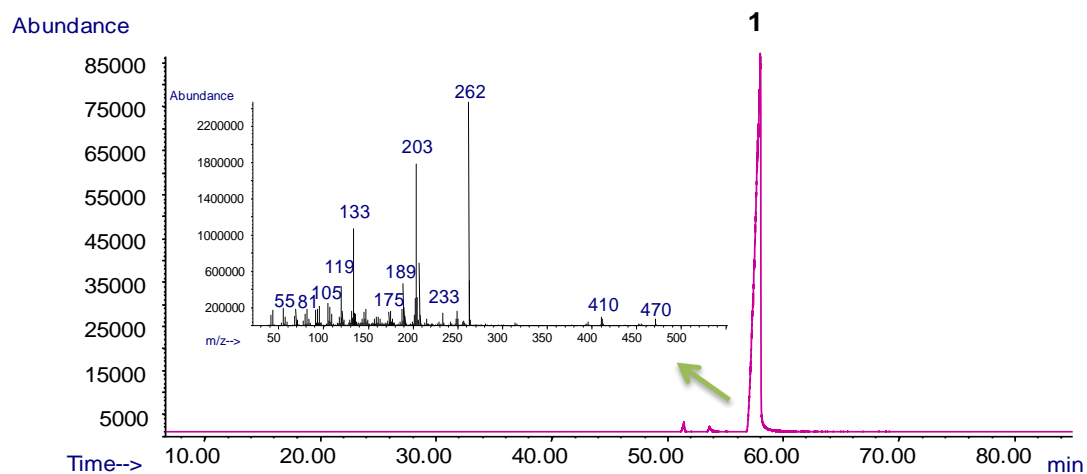
Empleando las condiciones de reacción mencionadas en la **Tabla 28**, se realizó la metilación del ácido ursólico (**Esquema 6**). El tiempo de reacción se controló por cromatografía de capa fina. Al realizar el control de reacción a las dos horas, después de adicionar el agente alquilante, se observó que el precursor se consumió totalmente (**Figura 23**).

**Esquema 6.** Metilación del ácido ursólico.



**Figura 23.** Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación del ácido ursólico (2 horas de reacción).

En la **Figura 24**, se presenta el perfil cromatográfico de la masa de reacción de metilación del ácido ursólico extraída con diclorometano. La formación del producto de reacción de metilación del ácido ursólico, quedó confirmada con base en su espectro de masas (**Sección 4.2.2**).

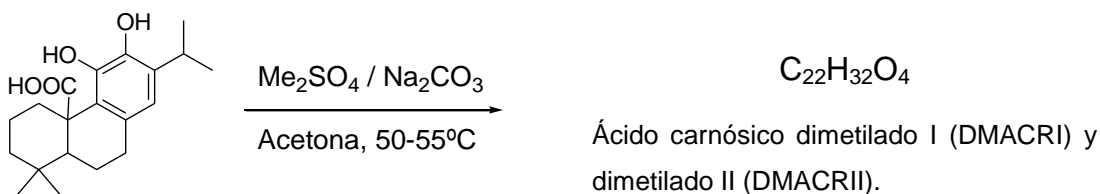


**Figura 24.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación del ácido ursólico extraída con diclorometano.  
1. Ácido ursólico monometilado (MMAU).

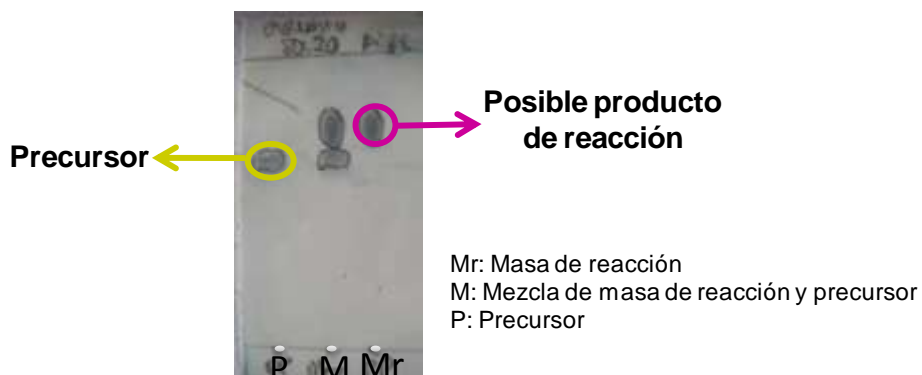
#### 4.2.1.6 Metilación del ácido carnósico.

Empleando las condiciones de reacción mencionadas en la **Tabla 28**, se realizó la metilación del ácido carnósico (**Esquema 7**).

#### **Esquema 7.** Metilación del ácido carnósico.

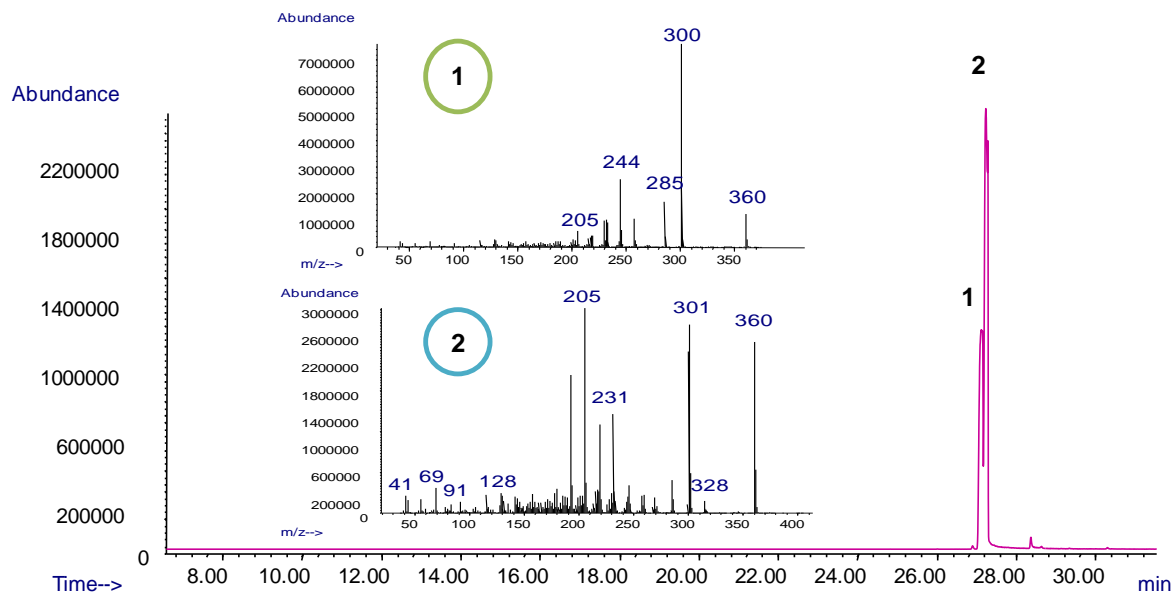


Al igual que la reacción de metilación de los demás compuestos fenólicos, la reacción finalizó dos horas después de adicionar el agente alquilante (**Figura 25**).



**Figura 25.** Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación del ácido carnósico (2 horas de reacción).

En la **Figura 26**, se presenta el perfil cromatográfico de la masa de reacción de metilación del ácido carnósico extraída en diclorometano.



**Figura 26.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación del ácido carnósico extraída con diclorometano. **1.** Ácido carnósico dimetilado I (DMACRI), **2.** Ácido carnósico dimetilado II (DMACRII).

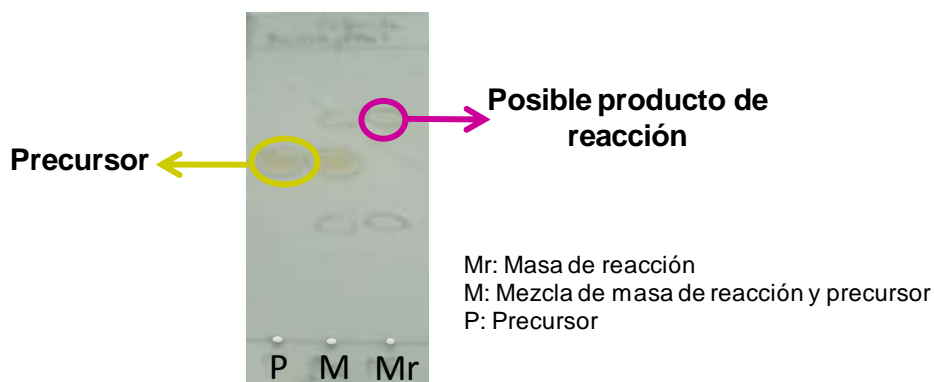
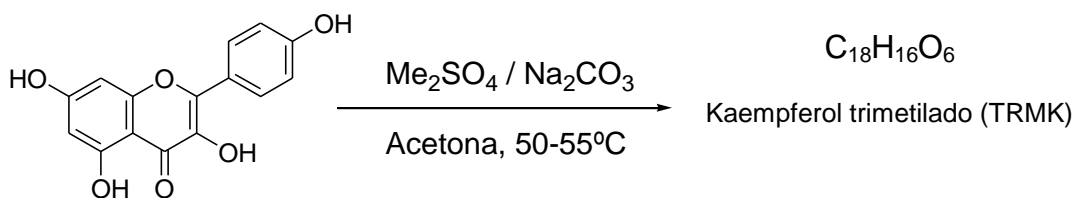
La formación de los productos de reacción de metilación del ácido carnósico, quedó confirmada con base en sus espectros de masas (**Sección 4.2.2**).

#### 4.2.1.7 Metilación del kaempferol.

Se realizó la metilación del kaempferol (**Esquema 8**), empleando las condiciones de reacción mencionadas en la **Tabla 28**.

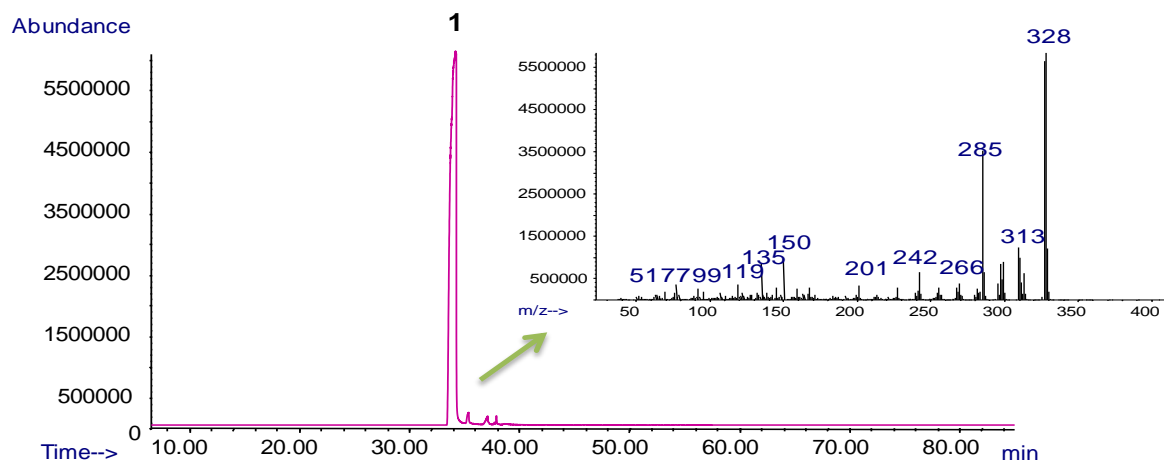
Al realizar el control de reacción a las dos horas después de adicionar el agente alquilante, se observó que el precursor se consumió totalmente (**Figura 27**). El perfil cromatográfico de la masa de reacción de metilación del kaempferol extraída con diclorometano se presenta en la **Figura 28**.

**Esquema 8.** Metilación del ácido kaempferol.



**Figura 27.** Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación del kaempferol (2 horas de reacción).

La formación del producto de reacción de metilación del kaempferol, se confirmó con base en su espectro de masas (**Sección 4.2.2**).

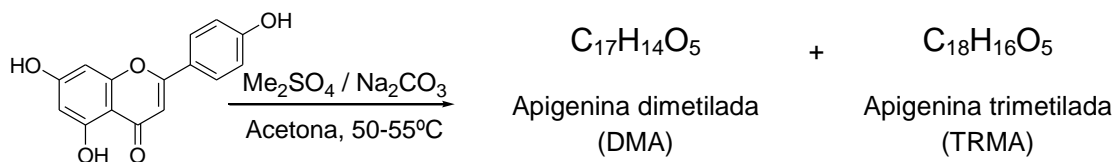


**Figura 28.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación del kaempferol extraída con diclorometano. **1.** Kaempferol trimetilado (TRMK).

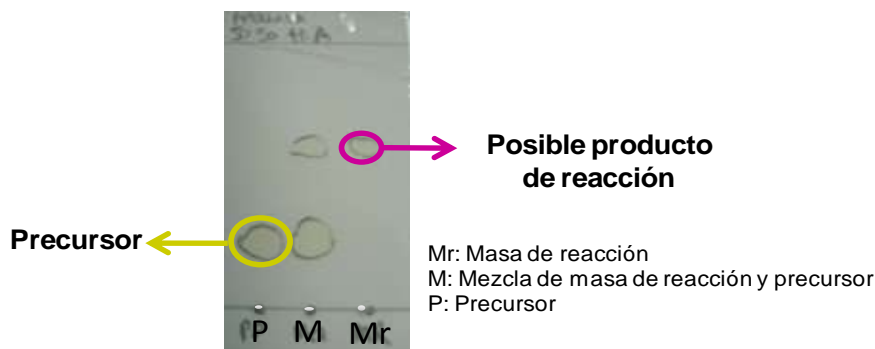
#### 4.2.1.8 Metilación de la apigenina.

La metilación de la apigenina (**Esquema 9**), se realizó empleando las condiciones de reacción mencionadas en la **Tabla 28**.

#### **Esquema 8.** Metilación de la apigenina.

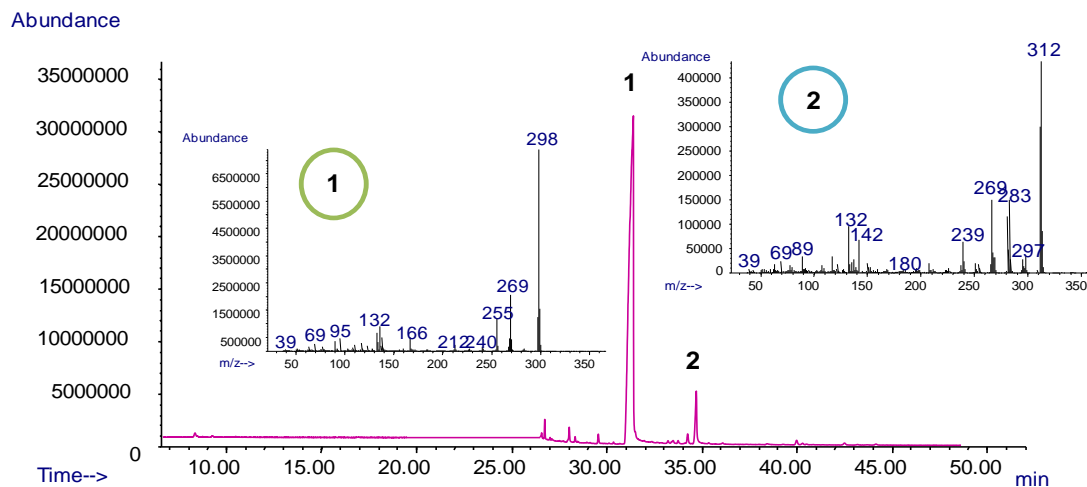


Al realizar el control de reacción a las dos horas, después de adicionar el agente alquilante, se observó que el precursor se consumió totalmente (**Figura 29**).



**Figura 29.** Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación de la apigenina (2 horas de reacción).

En la **Figura 30**, se presenta el perfil cromatográfico de la masa de reacción de metilación de la apigenina extraída con diclorometano.



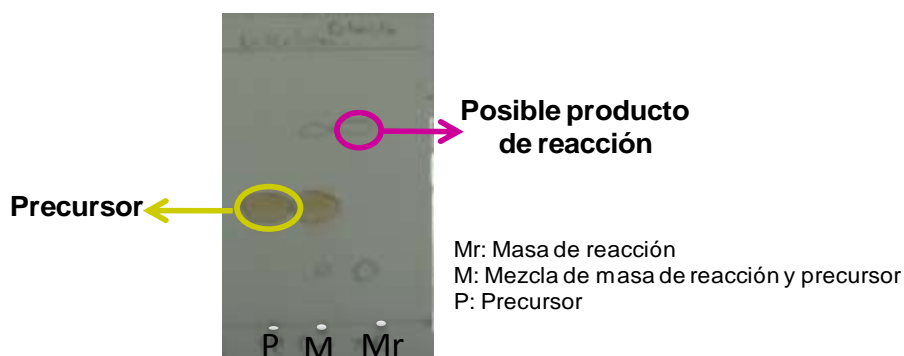
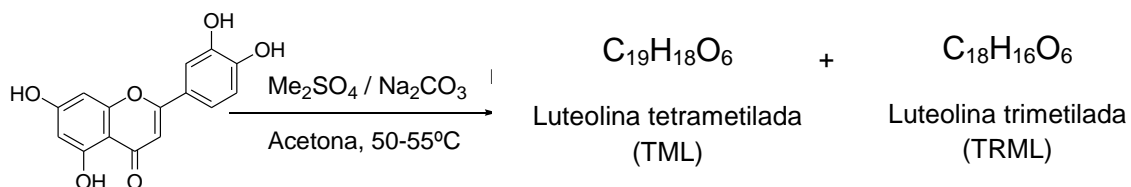
**Figura 30.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación de la apigenina extraída con diclorometano. **1.** Apigenina dimetilada (DMA); **2.** Apigenina trimetilada (TRMA).

La formación de los productos de reacción de metilación de la apigenina, quedó confirmada con base en sus espectros de masas (**Sección 4.2.2**).

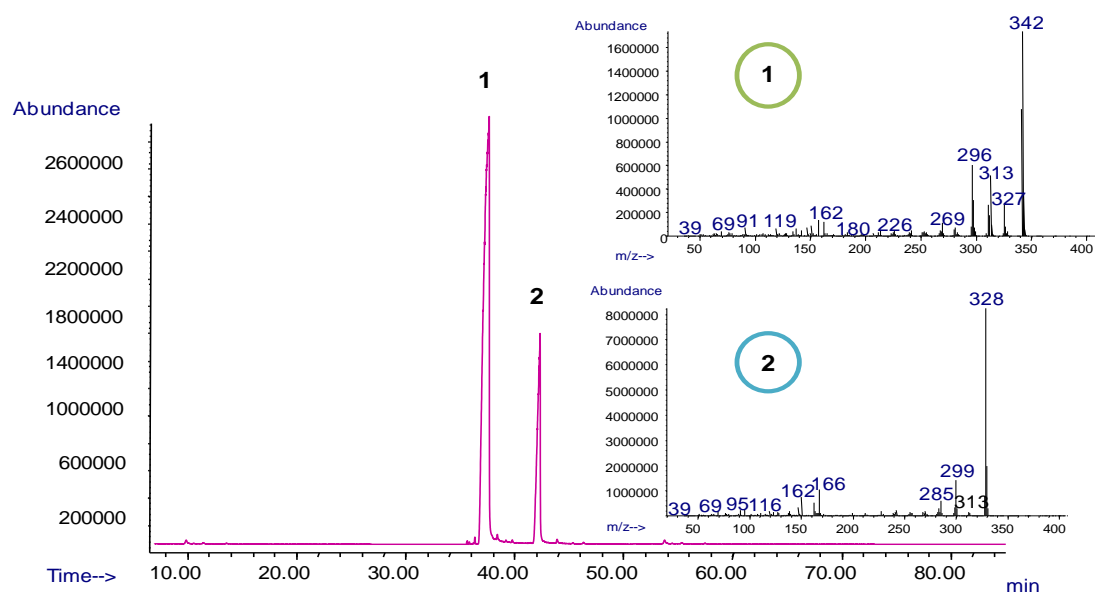
#### 4.2.1.9 Metilación de la luteolina.

Se realizó la metilación de la luteolina (**Esquema 10**) empleando las condiciones de reacción mencionadas en la **Tabla 28**. Al realizar el control de reacción a las dos horas, después de adicionar el agente alquilante, se observó que el precursor se consumió totalmente (**Figura 31**). El perfil cromatográfico de la masa de reacción de metilación de la luteolina extraída con diclorometano se presenta en la **Figura 32**. La formación de los productos de reacción de metilación de la luteolina, quedaron confirmados con los espectros de masas (**Sección 4.2.2**).

#### Esquema 10. Metilación de la luteolina.



**Figura 31.** Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación de la luteolina (2 horas de reacción).

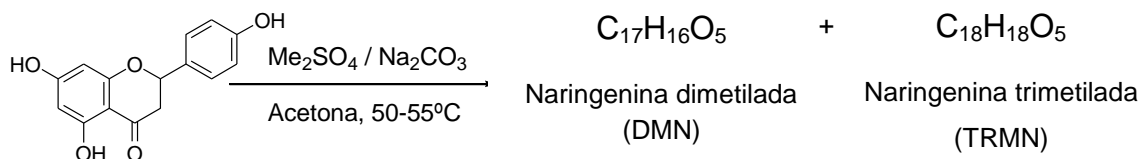


**Figura 32.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación de la luteolina extraída con diclorometano. **1.** Luteolina tetrametilada (TML), **2.** Luteolina trimetilada (TRML).

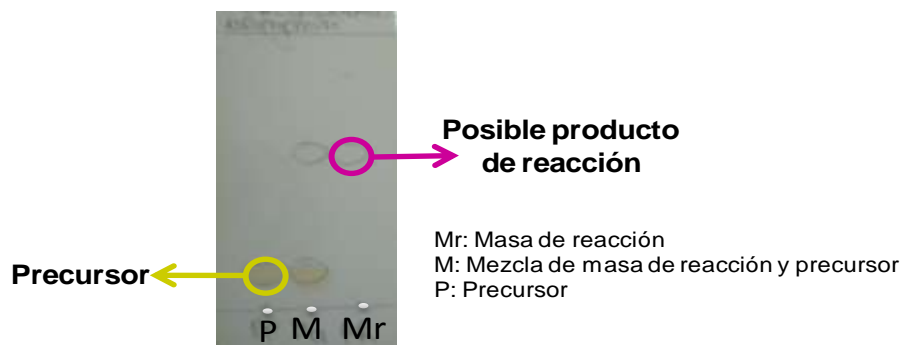
#### 4.2.1.10 Metilación de la naringenina.

Se realizó la metilación de la naringenina (**Esquema 11**), empleando las condiciones de reacción mencionadas en la **Tabla 28**.

**Esquema 11.** Metilación de la naringenina.

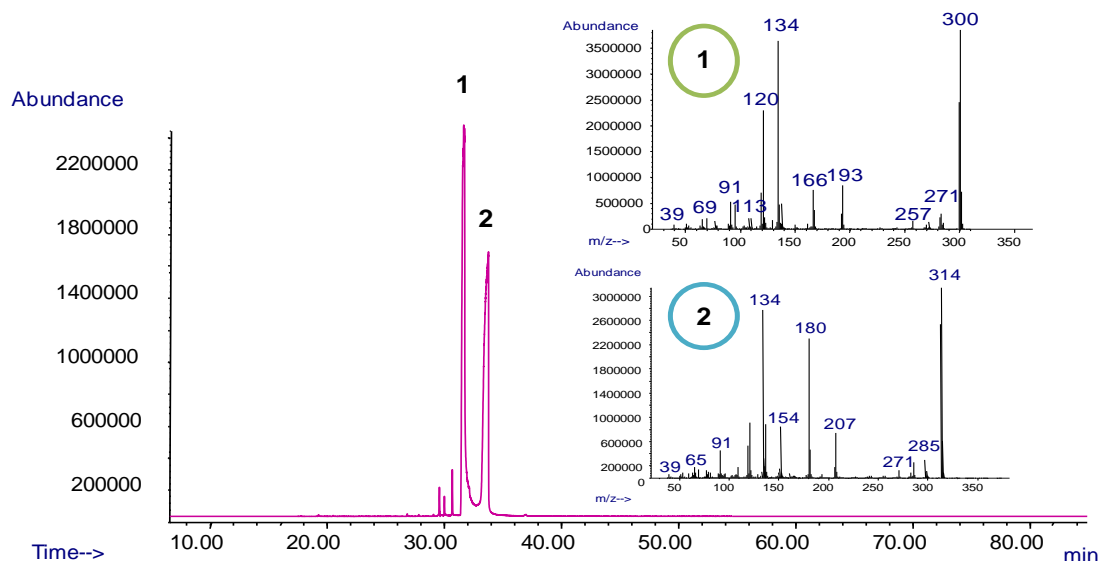


Al realizar el control de reacción a las dos horas después de adicionar el agente alquilante, se observó que el precursor se consumió totalmente (**Figura 33**).



**Figura 33.** Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación de la naringenina (2 horas de reacción).

El perfil cromatográfico de la masa de reacción de metilación de la naringenina extraída con diclorometano se presenta en la **Figura 34**. La formación de los productos de reacción de metilación de la naringenina, se confirmó con base en sus espectros de masas (**Sección 4.2.2**).

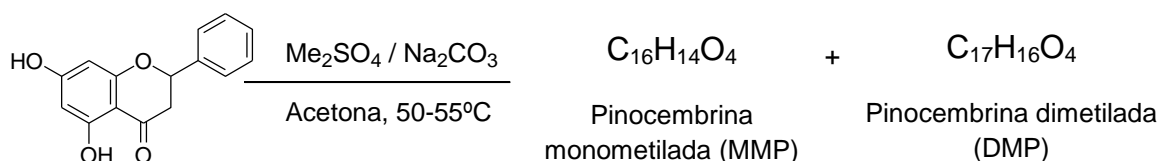


**Figura 34.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS de la masa de reacción de metilación de la naringenina extraída con diclorometano. **1.** Naringenina dimetilada (DMN), **2.** Naringenina trimetilada (TRMN).

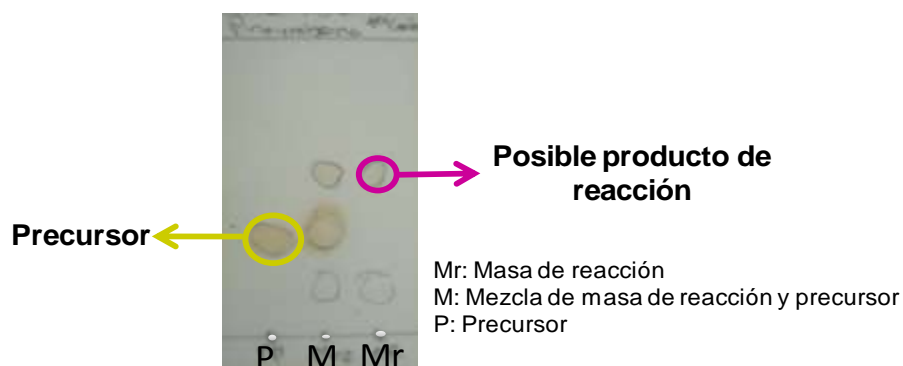
#### 4.2.1.11 Metilación de la pinocembrina.

La metilación de la pinocembrina (**Esquema 12**) se realizó empleando las condiciones de reacción mencionadas en la **Tabla 28**.

**Esquema 12.** Metilación de la pinocembrina.

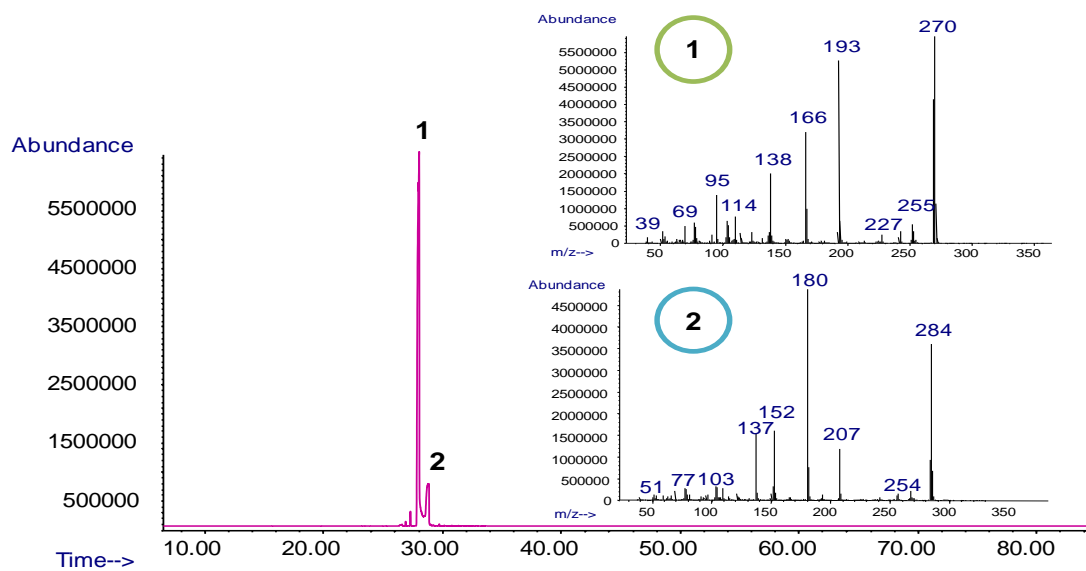


Al realizar el control de reacción a las dos horas después de adicionar el agente alquilante, se observó que el precursor se consumió totalmente (**Figura 35**).



**Figura 35.** Cromatografía en capa fina del control de reacción de metilación de la pinocembrina (2 horas de reacción).

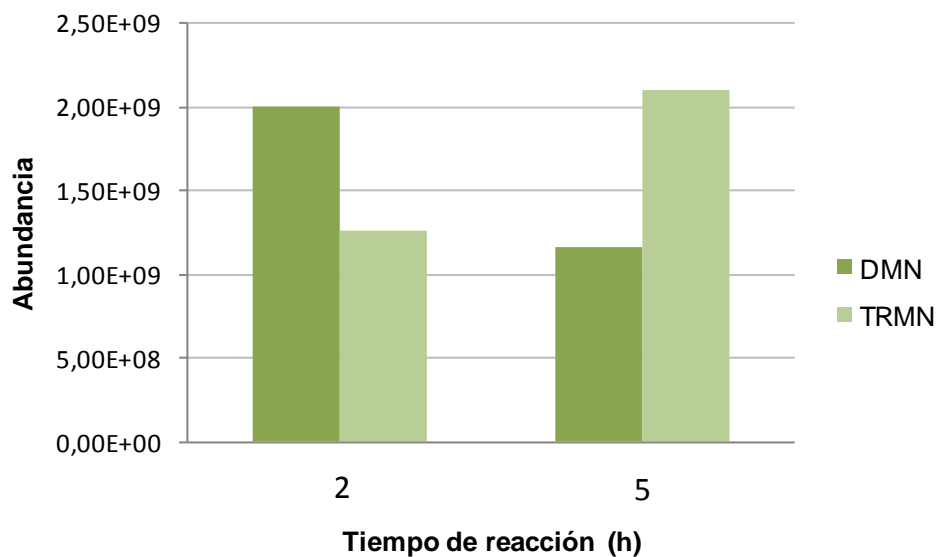
En la **Figura 36**, se presenta el perfil cromatográfico de la masa de reacción de metilación de la pinocembrina extraída con diclorometano. La formación de los productos de reacción de metilación de la pinocembrina, se confirmó con base en sus espectros de masas (**Sección 4.2.2**).



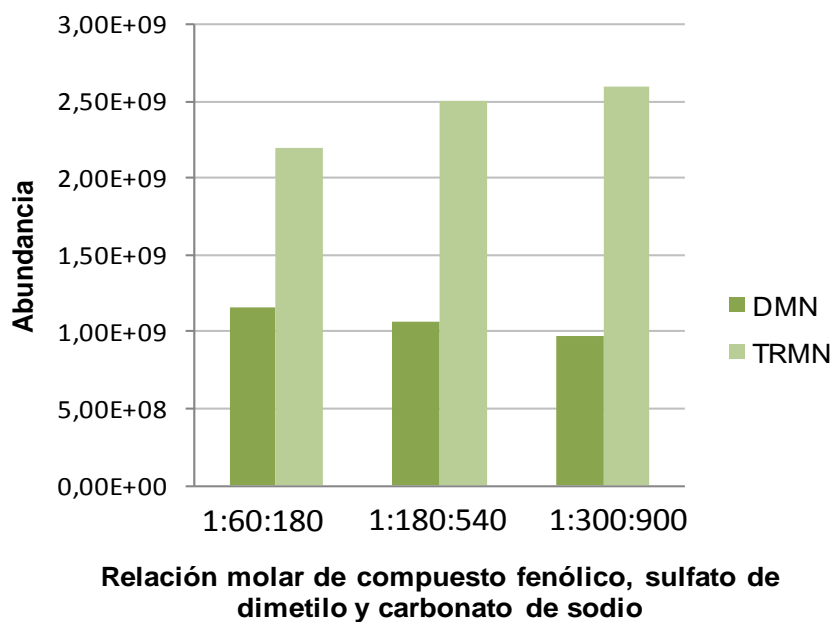
**Figura 36.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS, de la masa de reacción de metilación de la pinocembrina extraída con diclorometano. **1.** Pinocembrina monometilada (MMP); **2.** Pinocembrina dimetilada (DMP).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el uso de las condiciones de reacción establecidas para la metilación de los compuestos fenólicos bajo estudio, mostró que en el caso de la naringenina, luteolina, pinocembrina y apigenina, se observó, además de la formación del producto completamente metilado, los derivados no esperados, a saber: mono- (para pinocembrina), di- (para apigenina y naringenina) y tri-metilado (para luteolina). En consecuencia, empleando la naringenina (por su disponibilidad y costo), se modificaron los tiempos de reacción y la cantidad de agente alquilante. Así entonces, se observó que al aumentar el tiempo de reacción de dos a cinco horas, se formó en mayor proporción la naringenina trimetilada (TRMN) (**Figura 37**). Fijado el tiempo de reacción en 5 horas, se realizó la metilación, esta vez, aumentando la relación molar del compuesto fenólico, sulfato de dimetilo y carbonato de sodio, respectivamente (**Figura 38**). Los resultados mostraron que el aumento considerable de la cantidad del agente alquilante (1:300), no causó los efectos esperados. La formación única del producto

completamente metilado, entonces, no fue observada.



**Figura 37.** Variación del tiempo de la reacción de metilación de la naringenina.



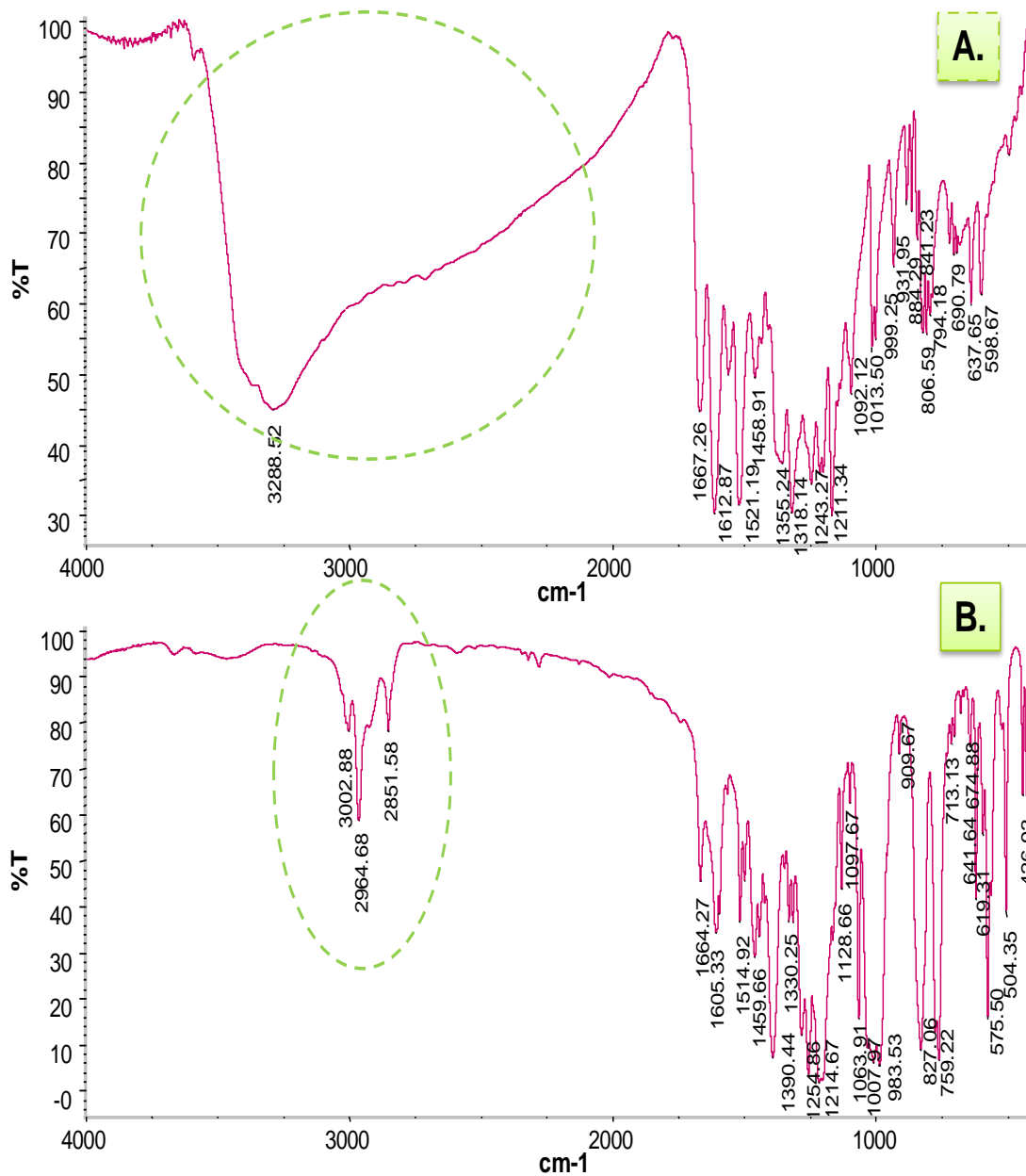
**Figura 38.** Variación de la relación molar de naringenina, sulfato de dimetilo y carbonato de dimetilo, en la reacción de metilación de la naringenina.

A la luz de estos resultados, y teniendo en cuenta que para el propósito de esta investigación, las condiciones de derivatización de los compuestos fenólicos deben ser las mismas, se decidió no modificar las condiciones de reacción previamente establecidas (**Tabla 28**), y realizar el análisis cromatográfico como la sumatoria de las áreas de los productos de reacción obtenidas para cada analito.

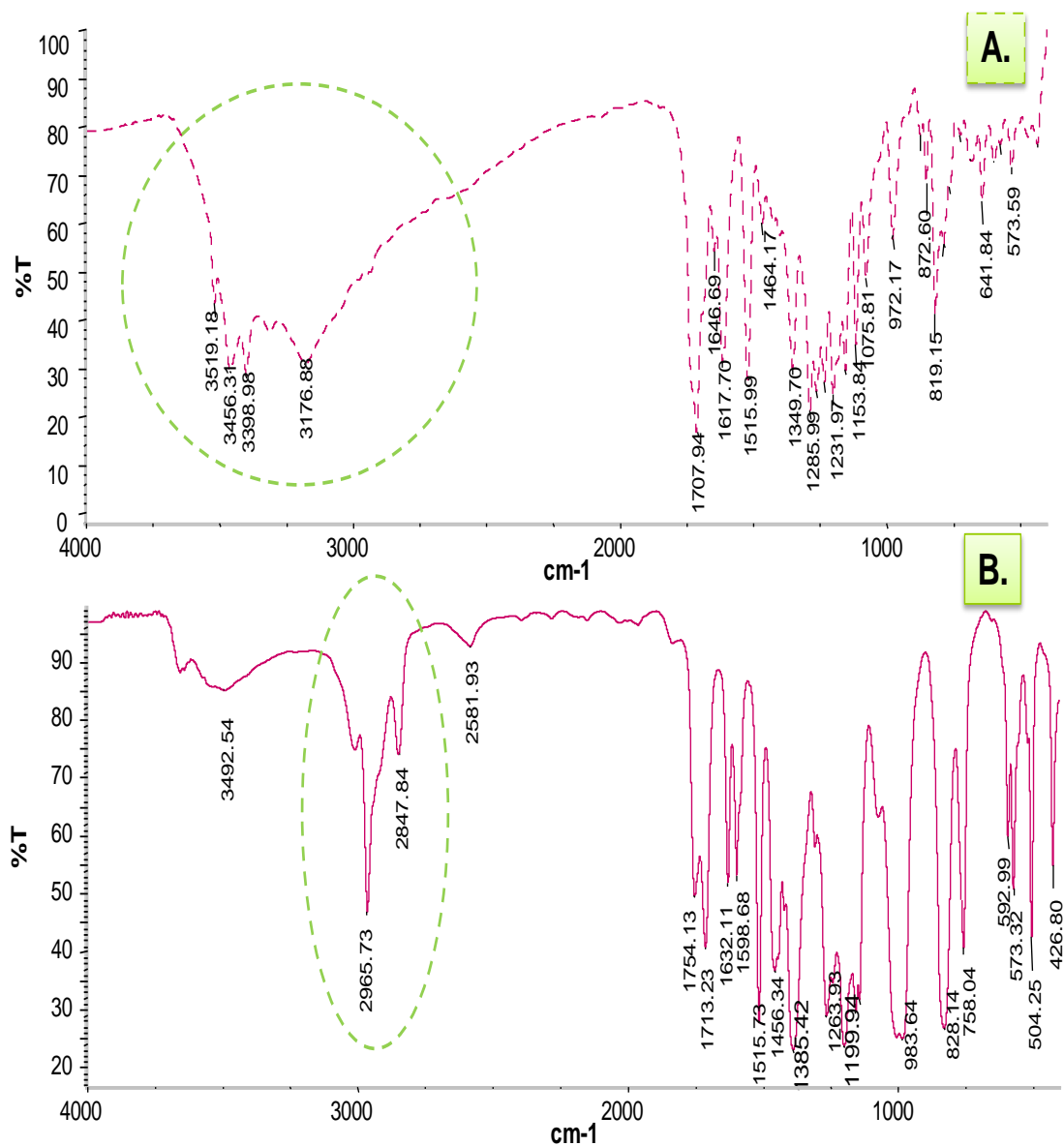
**4.2.2 Caracterización de los derivados de compuestos fenólicos.** Los derivados de los ácidos fenólicos y flavonoides se caracterizaron por espectroscopía de infrarrojo y espectroscopía de masas.

**4.2.2.1 Espectroscopía de infrarrojo.** El espectro de infrarrojo se tomó para los derivados de las sustancias patrón, con las cuales se seleccionaron las condiciones de derivatización, es decir, quercetina y ácido rosmarínico.

La primera evidencia espectroscópica de la formación de los derivados metílicos, se encontró en los espectros de infrarrojo de las mezclas de reacción, después de retirar el diclorometano de extracción. En éstos, se observa la completa desaparición de la banda ancha correspondiente a la vibración de tensión de los hidroxilos del precursor y las bandas propias de los grupos metilo entre  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración de tensión del enlace C-H, lo que indica su metilación (**Figuras 39 y 40**).



**Figura 39.** Comparación de espectros IR **(A)** del material de referencia certificado de quercetina y **(B)** del producto de reacción de la quercetina.



**Figura 40.** Comparación de espectros IR (A) del material de referencia certificado de ácido rosmarínico y (B) del producto de reacción de metilación del ácido rosmarínico.

**4.2.2.2 Espectroscopía de masas.** La formación de los derivados metilados de los compuestos fenólicos quedó confirmada también por sus espectros de masas (**Anexo 5**). Para interpretar los espectros de masas de los derivados metilados de los compuestos fenólicos bajo estudio, éstos, se dividieron en

tres grupos, a saber: (1) la serie de los flavonoides (apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, naringenina y pinocembrina), (2) la serie de los ácidos fenólicos de bajo peso molecular (ácidos *p*-cumárico y cafeico) y la (3) serie de los ácidos fenólicos de alto peso molecular (ácidos rosmarínico, carnósico y ursólico).

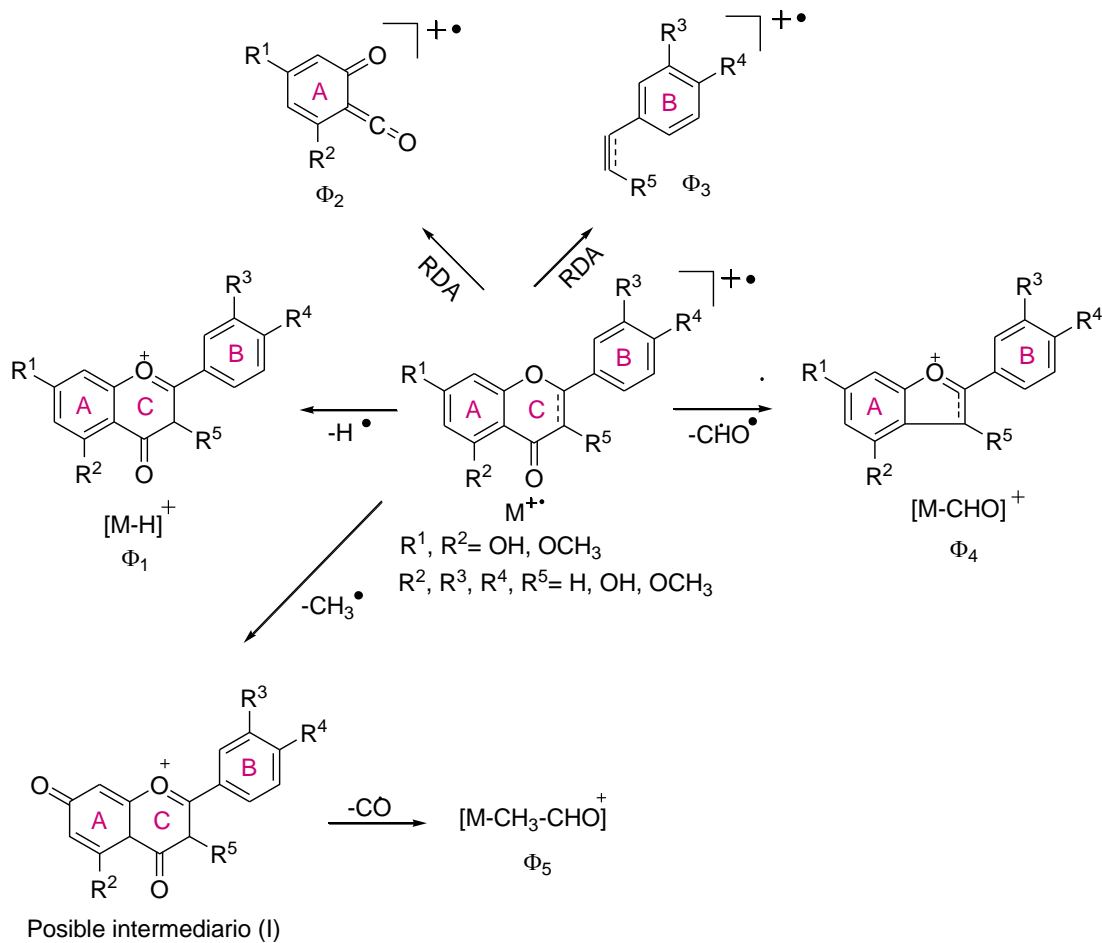
- **Serie de los flavonoides.** En todos los espectros de masas de los productos metilados excepto en el de la dimetil-pinocembrina (DMP), los iones moleculares correspondieron a los iones pico de base (**Tabla 29**).

Generalmente, la pérdida de un radical hidrógeno desde los respectivos iones moleculares corresponde a la principal ruta de fragmentación en estos compuestos, y conduce a la formación del catión  $\Phi_1$ . Una segunda ruta de fragmentación de los respectivos iones moleculares está condicionada por la ruptura retro-Diels Alder, para generar los iones  $\Phi_2$  y  $\Phi_3$ , dieno y dienófilo, respectivamente.

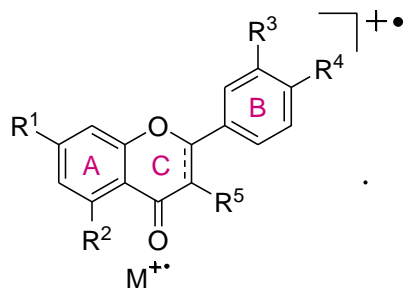
Adicionalmente, pero no menos importante, la pérdida sucesiva de un radical metilo y una molécula neutra de CO genera el posible catión tipo ciclopentadienilo  $\Phi_5$ , quizás a través de la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada intermediaria (I); además, se registra el fragmento  $\Phi_4$ , de baja o mediana intensidad, el cual es un posible producto de la apertura del anillo de  $\varphi$ -lactona en los iones moleculares, que posteriormente libera 29 unidades correspondientes a un radical formilo.

En el **Esquema 13**, se presentan las posibles rutas de fragmentación que experimentan los iones moleculares de los flavonoides metilados.

**Esquema 13.** Posibles rutas de fragmentación de los iones moleculares de los derivados metilados de la serie de flavonoides.



**Tabla 29.** Iones característicos y sus intensidades relativas (%) en los espectros de masas de los derivados metilados de la serie de flavonoides.



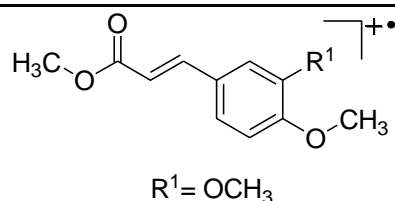
Producto metilado	<i>m/z</i> (I, %)					
	$M^{+\bullet}$	$\Phi_1$	$\Phi_2$	$\Phi_3$	$\Phi_4$	$\Phi_5$
MMP	270 (100)	269 (69)	166 (53)	104 (11)	241 (6)	227 (5)
DMP	284 (76)	283 (69)	180 (100)	104 (6)	255 (5)	241 (5)
DMN	300 (100)	299 (65)	166 (22)	134 (94)	271 (6)	257 (5)
TRMN	314 (100)	313 (79)	180 (72)	134 (88)	285 (8)	271 (5)
DMA	298 (100)	297 (15)	166 (7)	132 (11)	269 (25)	255 (16)
TRMA	312 (100)	311 (68)	180 (4)	132 (20)	283 (32)	269 (29)
TRML	328 (100)	327 (69)	162 (9)	167 (12)	299 (16)	285 (7)
TML	342 (100)	341 (61)	180 (3)	162 (7)	313 (28)	299 (5)
TRMK	328 (100)	327 (94)	166 (11)	162 (5)	299 (15)	285 (60)
TMQ	358 (100)	357 (60)	166 (10)	192 (3)	329 (14)	315 (38)

**MMP:** Monometil-pinocembrina, **DMP:** Dimetil-pinocembrina, **DMN:** Dimetil-naringenina, **TRMN:** Trimetil-naringenina, **DMA:** Dimetil-apigenina, **TRMA:** Trimetil-apigenina, **TML:** Tetrametil-luteolina, **TRML:** Trimetil-luteolina, **TRMK:** Trimetil-kaempferol, **TMQ:** Tetrametil-quercetina.

- **Serie de los ácidos fenólicos de bajo peso molecular.** Generalmente, la pérdida de un radical metilo desde los respectivos iones moleculares corresponde a la principal ruta de fragmentación en estos

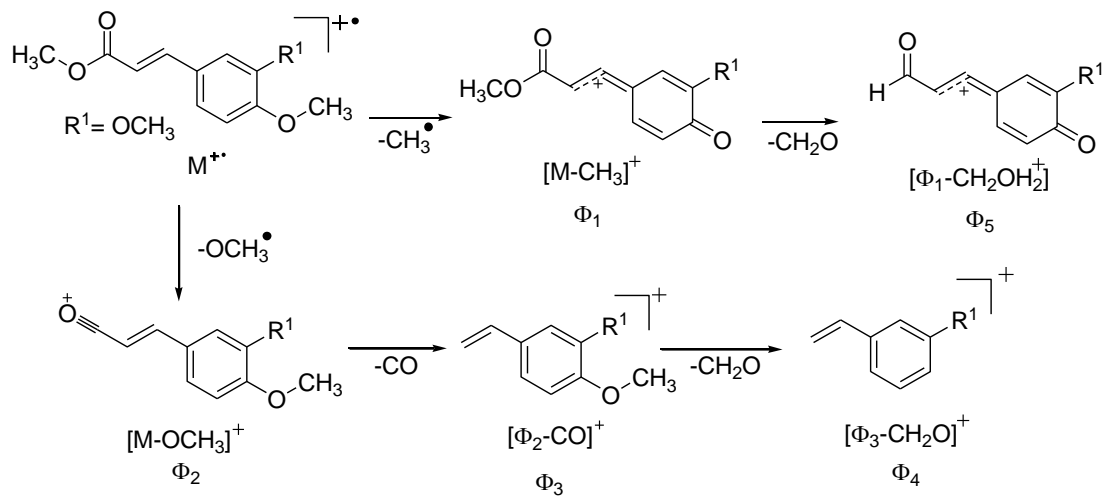
compuestos, y conduce a la formación del catión  $\Phi_1$  (**Tabla 30**). Otra ruta de fragmentación de los respectivos iones moleculares está dada por la pérdida de un radical metoxilo, para generar el respectivo catión  $\Phi_2$ . Además, la pérdida sucesiva de una molécula neutra de CO y una molécula neutra de formaldehído genera los posibles cationes  $\Phi_3$  y  $\Phi_4$ , respectivamente. Adicionalmente, la pérdida de una molécula neutra de formaldehído condiciona la formación del posible catión radical  $\Phi_5$ . Las posibles rutas de fragmentación, que experimentan los iones moleculares de los derivados metilados de los ácidos fenólicos de bajo peso molecular se presentan en el **Esquema 14**.

**Tabla 30.** Iones característicos y sus intensidades relativas (%) en los espectros de masas de los derivados metilados de los ácidos fenólicos de bajo peso molecular.



Compuesto	<i>m/z</i> (I, %)					
	$M^+$	$\Phi_1$	$\Phi_2$	$\Phi_3$	$\Phi_4$	$\Phi_5$
DMAPC	192 (70)	177 (64)	161 (100)	133 (30)	103 (5)	147 (4)
DMAFC	222 (100)	207 (15)	191 (51)	163 (8)	133 (9)	177 (8)

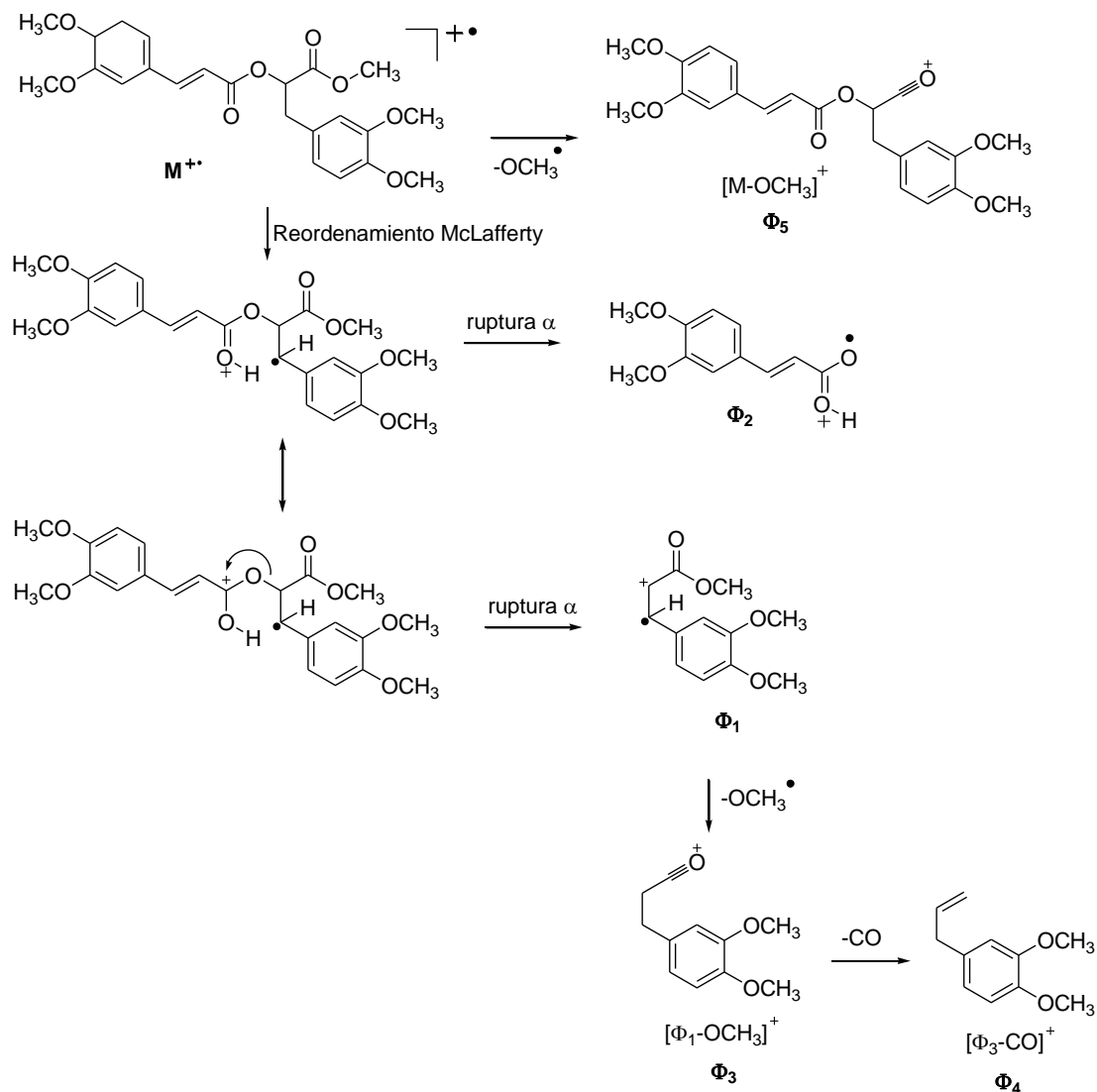
**Esquema 14.** Posibles rutas de fragmentación de los iones moleculares de los derivados metilados de los ácidos fenólicos de bajo peso molecular.



- **Serie de los ácidos fenólicos de alto peso molecular.** En el espectro de masas del derivado metilado del ácido rosmarínico se registra el ion molecular de baja intensidad que corresponde a su fórmula condensada. El espectro de masas del derivado metilado del ácido rosmarínico presenta un pico de base correspondiente al catión fragmento  $\Phi_1$ , que se genera del ion molecular por un reordenamiento de tipo McLafferty. De igual forma, el catión fragmento  $\Phi_2$  se genera del ion molecular por un reordenamiento de tipo McLafferty.

Adicionalmente, la pérdida sucesiva de un radical metoxilo y una molécula neutra de CO condiciona la generación de los cationes fragmentos  $\Phi_4$  y  $\Phi_5$ , respectivamente. Además, se registra el catión fragmento  $\Phi_5$  de baja intensidad, el cual corresponde a la pérdida del radical metoxilo a partir del ion molecular. En el **Esquema 15**, se presentan las posibles rutas de fragmentación, que experimenta el ion molecular del derivado metilado del ácido rosmarínico.

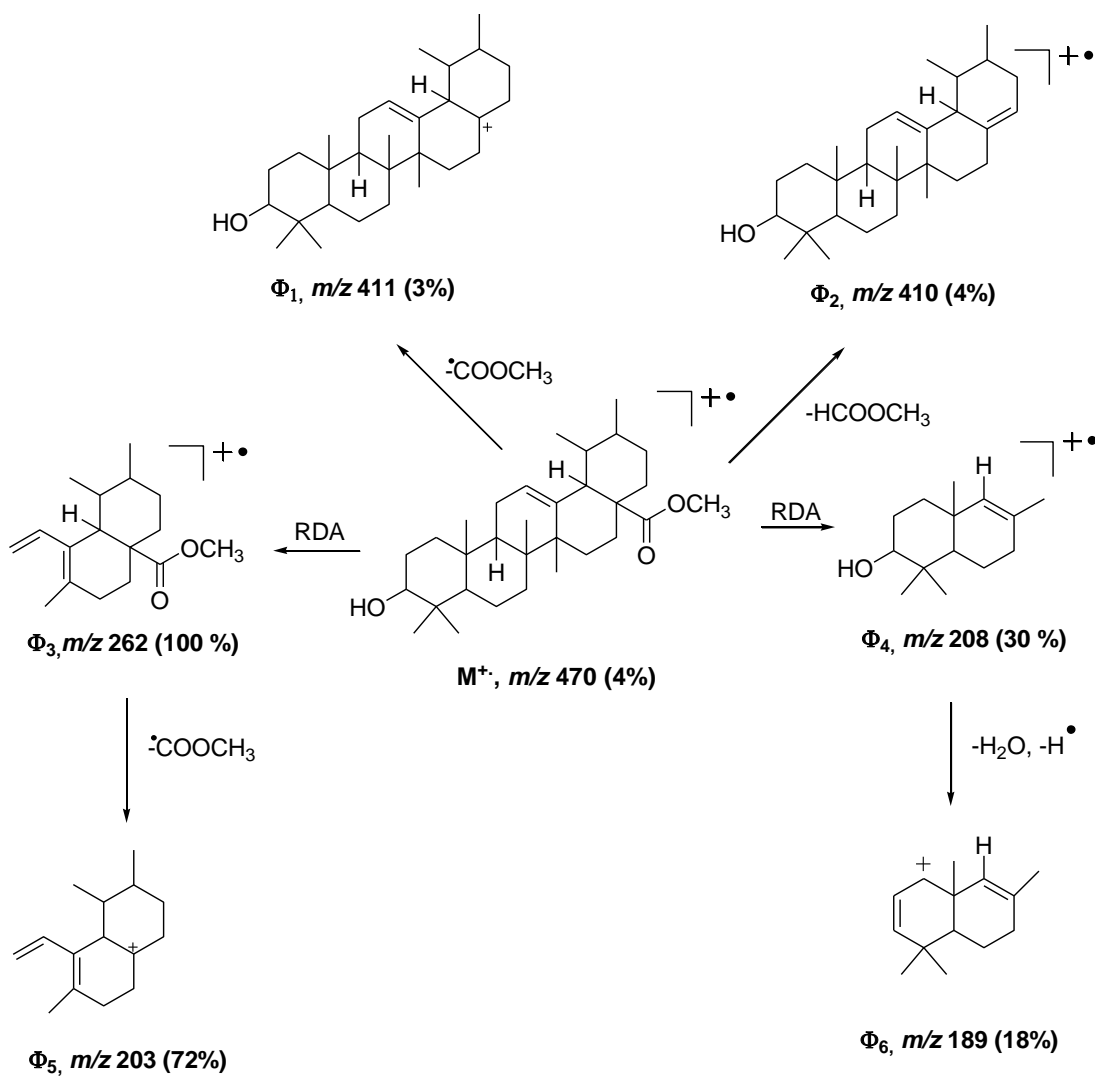
**Esquema 15.** Posibles rutas de fragmentación del ion molecular del derivado metilado del ácido rosmarínico.



En el espectro de masas del derivado metilado del ácido ursólico se registra el ion molecular de baja intensidad que corresponde a su fórmula condensada. La principal ruta de fragmentación del ion molecular está condicionada por la ruptura retro-Diels Alder para generar los iones  $\Phi_3$  y  $\Phi_4$ , dieno y dienófilo, respectivamente. Además, se registra el catión fragmento  $\Phi_6$  de intensidad media, el cual corresponde a la pérdida de agua y de un radical hidrógeno a partir del ion  $\Phi_4$  y el ion fragmento  $\Phi_2$  se genera del ión molecular por una pérdida de una molécula neutra de formiato de metilo.

Adicionalmente, la pérdida de un radical formiato a partir del ion molecular y de  $\Phi_3$  genera los posibles cationes  $\Phi_1$  y  $\Phi_5$ , respectivamente. En el **Esquema 16**, se presentan las posibles rutas de fragmentación que experimenta el ion molecular del derivado metilado del ácido ursólico.

**Esquema 16.** Posibles rutas de fragmentación del ion molecular del derivado metilado del ácido ursólico.



En los espectros de masas de los derivados metilados del ácido carnósico se registran los iones moleculares que corresponden a sus fórmulas condensadas. El espectro de masas del compuesto dimetilado (I) del ácido carnósico presenta un catión fragmento  $\Phi_1$ , que se genera del ión molecular por una pérdida de un radical formiato. El fragmento  $\Phi_2$  está condicionado por pérdida de una molécula neutra de formiato de metilo a partir del ion molecular. Adicionalmente, el fragmento  $\Phi_2$  está condicionado por la ruptura retro-Diels Alder para formar el dieno  $\Phi_3$ . La pérdida del radical  $\text{CH}_3\cdot$  y  $\text{C}_5\text{H}_9\cdot$  genera los cationes fragmentos  $\Phi_4$  y  $\Phi_5$ , respectivamente. El espectro de masas presenta un pico de base correspondiente al catión fragmento  $\Phi_6$ , que se forma del fragmento  $\Phi_2$  por un reordenamiento de hidrógeno. De igual forma, el catión fragmento  $\Phi_7$  se genera del fragmento  $\Phi_2$  por un reordenamiento hidrógeno.

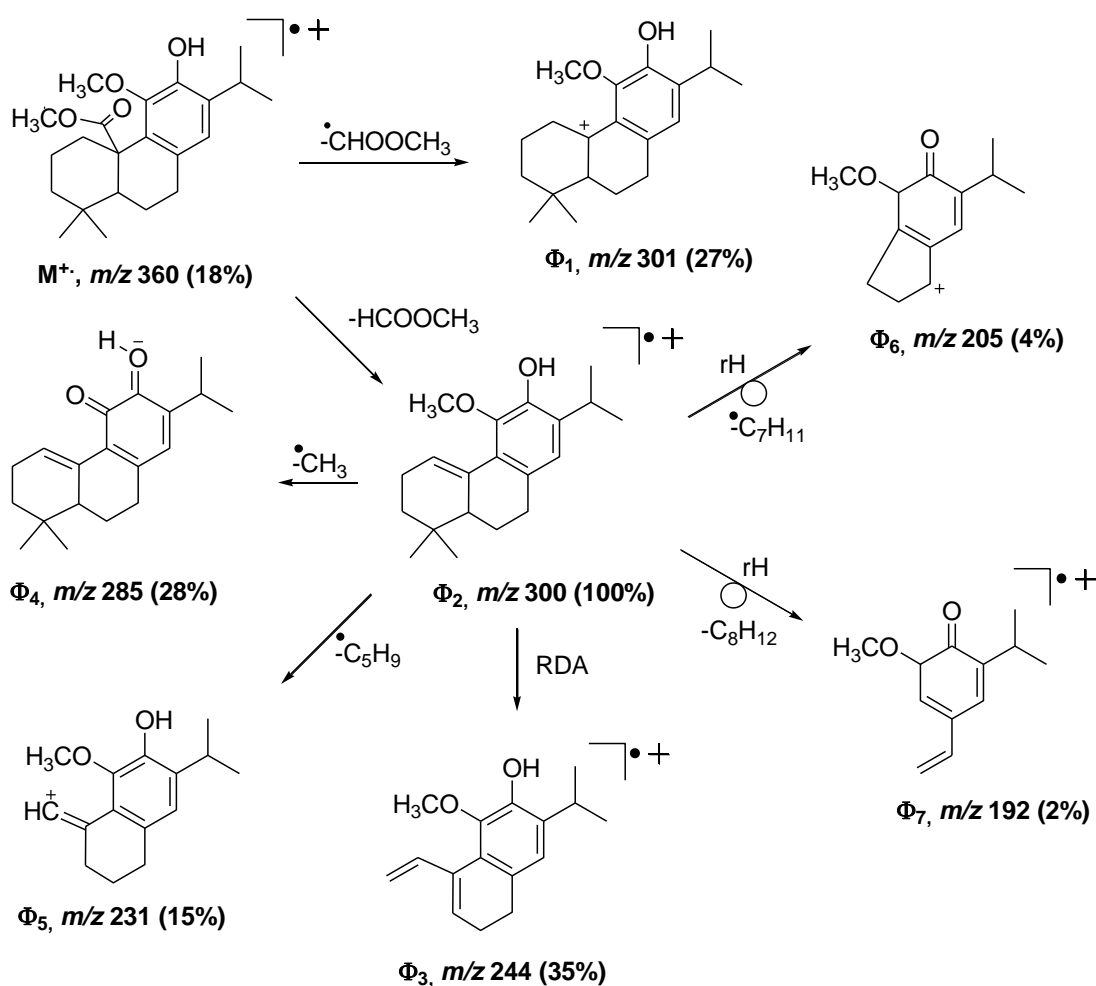
En el **Esquema 17**, se presentan las posibles rutas de fragmentación que experimenta el ion molecular del compuesto dimetilado (I) del ácido carnósico.

El espectro de masas del compuesto dimetilado (II) del ácido carnósico presenta una ruta de fragmentación similar a la del compuesto dimetilado (I) del ácido carnósico. La diferencia fundamental en los espectros de masas radica en variación de las intensidades de los iones fragmentos, ocasionada posiblemente por la diferencia en la posición del grupo hidróxilo en los derivados dimetilados. La variación de la intensidad de los iones fragmento  $\Phi_1$  y  $\Phi_2$ , se debe posiblemente a las interacciones tipo puente de hidrógeno entre los electrones disponibles del grupo carbonilo y el hidrogeno del grupo hidroxilo, en el compuesto dimetilado (I) del ácido carnósico. De igual forma, la presencia del hidrógeno del grupo hidroxilo en el compuesto dimetilado (I) del ácido carnósico, posiblemente favorece el reordenamiento de hidrógeno y

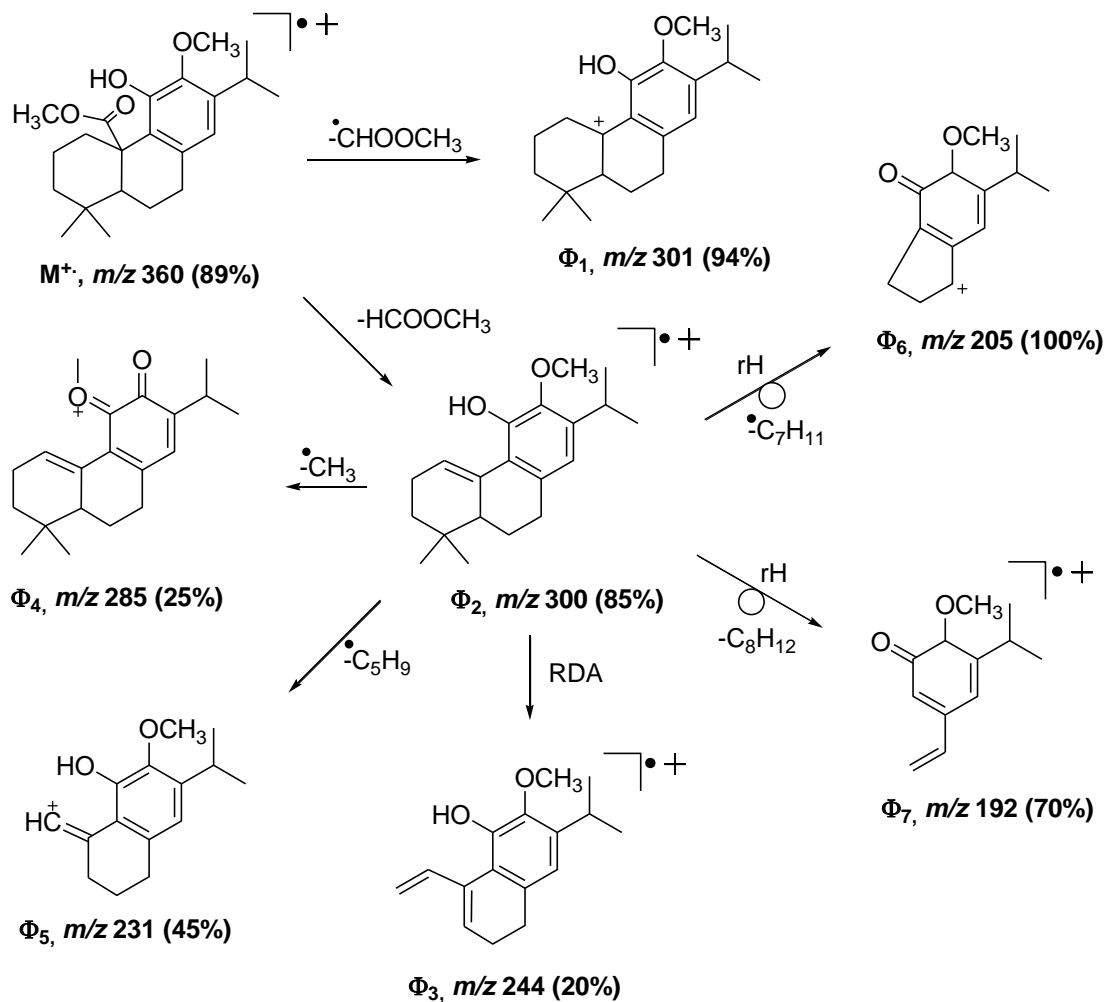
por ende, la formación de los fragmentos  $\Phi_6$  y  $\Phi_7$  de alta intensidad.

En el **Esquema 18**, se presentan las posibles rutas de fragmentación que experimenta el ion molecular del compuesto dimetilado (II) del ácido carnósico.

**Esquema 17.** Posibles rutas de fragmentación del ion molecular del compuesto dimetilado (I) del ácido carnósico.



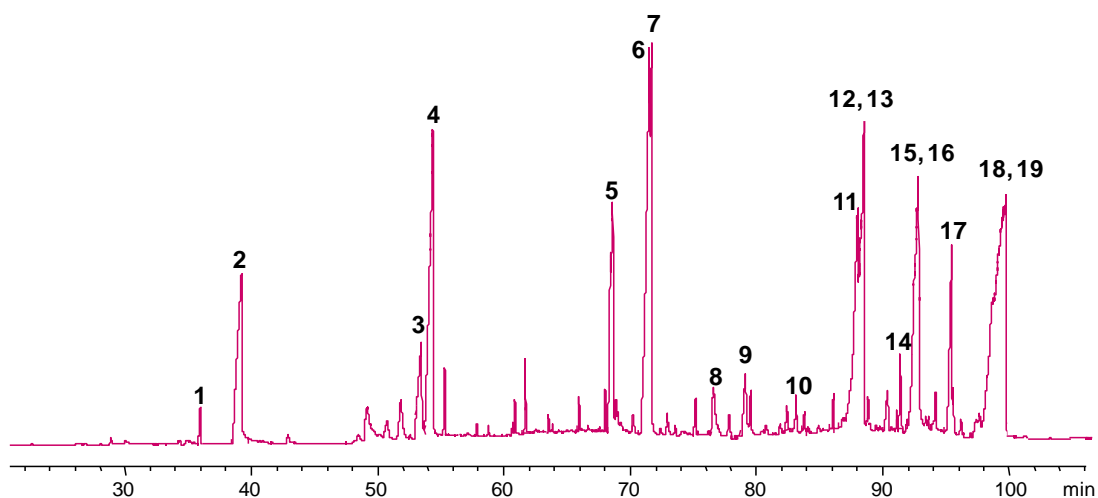
**Esquema 18.** Posibles rutas de fragmentación del ion molecular del compuesto dimetilado (II) del ácido carnósico.



#### 4.2.3 Selección de las condiciones de análisis cromatográfico por GC.

Después de realizar la derivatización de los compuestos fenólicos bajo estudio, se procedió a seleccionar las condiciones de su análisis cromatográfico por GC-FID. El criterio de selección fue la resolución de los derivados de los compuestos fenólicos, donde  $R_s$  tenía que ser igual o mayor que un valor de 1,5 [127]. Según lo reportado en la literatura [93, 94], el análisis por GC-FID de los derivados de compuestos fenólicos se realiza en columnas apolares de longitud de 30 m, con la inyección en modo *split* y la programación de temperatura de la columna que va hasta 300°C.

Para iniciar la selección de las condiciones de análisis, se tomó como base el trabajo realizado por Proestos, C. *et al.* [51]. En la **Figura 41**, se presenta el perfil cromatográfico de los derivados de compuestos fenólicos patrón, obtenido bajo las condiciones de análisis descritas por Proestos, C. *et al.* (**Anexo 6, Experimento 1**). Aunque se observa que la mayoría de los analitos se separan, los valores de resolución para las señales 6 y 7 y 11 y 12 son menores que 1,5 y se observa co-elución entre la señales 12 y 13, 15 y 16 y 18 y 19 (**Anexo 7, Experimento 1**). El tiempo de análisis, además, resultó muy largo (110 min), mientras que los primeros analitos comienzan a eluir después de 36 min de su inyección. Por tal razón, se modificó la programación de temperatura iniciando el análisis a 110 °C y realizando un gradiente lineal hasta 300°C a 2°C min<sup>-1</sup> (**Anexo 6, Experimento 2**). En este experimento, el tiempo de análisis se redujo en 20 min, la resolución entre los picos 3 y 4 disminuyó y, de igual forma que en el experimento 1, los valores de resolución para las señales 6 y 7 y 11 y 12 fueron menores de 1,5; se presentó la co-elución entre la señales 12 y 13, 15 y 16 y 18 y 19 (**Anexo 7, Experimento 2**).



**Figura 41.** Perfil cromatográfico típico obtenido por GC-FID de la mezcla de los derivados de los compuestos fenólicos patrón. **1.** *cis*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **2.** *trans*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **3.** *cis*-Trimetil-ácido caféico, **4.** *trans*-Trimetil-ácido caféico, **5.** Monometil-pinocembrina, **6.** Dimetil-ácido carnósico I, **7.** Dimetil-ácido carnósico II, **8.** Dimetil-pinocembrina, **9.** Dimetil-naringenina, **10.** Trimetil-naringenina, **11.** Dimetil-apigenina, **12.** Trimetil-apigenina, **13.** Trimetil-kaempferol, **14.** Tetrametil-luteolina, **15.** Trimetil-luteolina, **16.** Tetrametil-quercetina, **17.** *cis*-Pentametil-ácido rosmarínico, **18.** *trans*-Pentametil-ácido rosmarínico, **19.** Monometil-ácido ursólico.

Con el objetivo de disminuir el tiempo de análisis y simultáneamente mejorar la separación de los picos cromatográficos con la  $R_s < 1.5$  (picos críticos), se evaluaron diferentes programaciones de temperatura (**Anexo 6, Experimento 3-9**). Con ninguna de estas condiciones se logró la separación completa de todos los analitos bajo estudio, sin embargo, las condiciones con las cuales se obtuvieron valores de  $R_s$  más altos fueron las empleadas en el experimento 3 (**Anexo 7, Experimento 3-9**). Con el propósito de aumentar la resolución, se evaluó el gradiente ( $110^\circ\text{C}$  (5 min) hasta  $300^\circ\text{C}$  (10 min) @  $5^\circ\text{C min}^{-1}$ ) empleando una columna apolar DB5 de mayor longitud, *i.e.*, de 60 m (**Anexo 6, Experimento 10**). Al emplear la columna de 60 m se logró la separación de los picos críticos 3 y 4, 6 y 7 y 15

y 16 (**Anexo 7, Experimento 10**). Por tal razón, se descartó el uso de la columna de 30 m y se decidió continuar las pruebas con la columna de 60 m.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la cantidad de muestra sobre la resolución de los picos cromatográficos, inyectando una cantidad menor, *i.e.*, 0.4  $\mu\text{L}$  (**Anexo 6, Experimento 11**). No se observó sin embargo, ninguna mejora en la resolución de los picos cromatográficos (**Anexo 7, Experimento 11**); por tanto, se continuó inyectando una cantidad de muestra de 1  $\mu\text{L}$ .

En vista de no mejorar la resolución de los picos críticos, se evaluaron diferentes programaciones de temperatura; la temperatura final se incrementó a 310°C (**Anexo 6, Experimento 12-15**). Se observó que al emplear las condiciones del experimento 15 (110°C (3 min) hasta 290°C (5 min) @ 5°C min<sup>-1</sup>, luego hasta 310°C (10 min) @ 2,5°C min<sup>-1</sup>), los derivados de compuestos fenólicos bajo estudio sí se resolvían completamente (**Anexo 7, Experimento 12-15**).

Con base en los resultados de los experimentos realizados para el análisis por GC-FID de los derivados de los compuestos fenólicos bajo estudio, las condiciones con las cuales se obtiene su mejor separación se muestran en la **Tabla 31**.

**Tabla 31.** Parámetros cromatográficos seleccionados para el análisis por GC-FID de los derivados de los compuestos fenólicos.

Parámetro	Especificaciones
Columna	DB-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ), con la fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano).
Programación de temperatura	110°C (3 min) hasta 290°C (5 min) @ 5°C min <sup>-1</sup> , luego hasta 310°C (10 min) @ 2,5°C min <sup>-1</sup> .
Volumen de inyección de muestra	1 $\mu\text{L}$
Relación <i>split</i>	1:10
Flujo de gas de arrastre	1 mL/min
Temperatura del inyector	250 °C
Temperatura del detector	295 °C

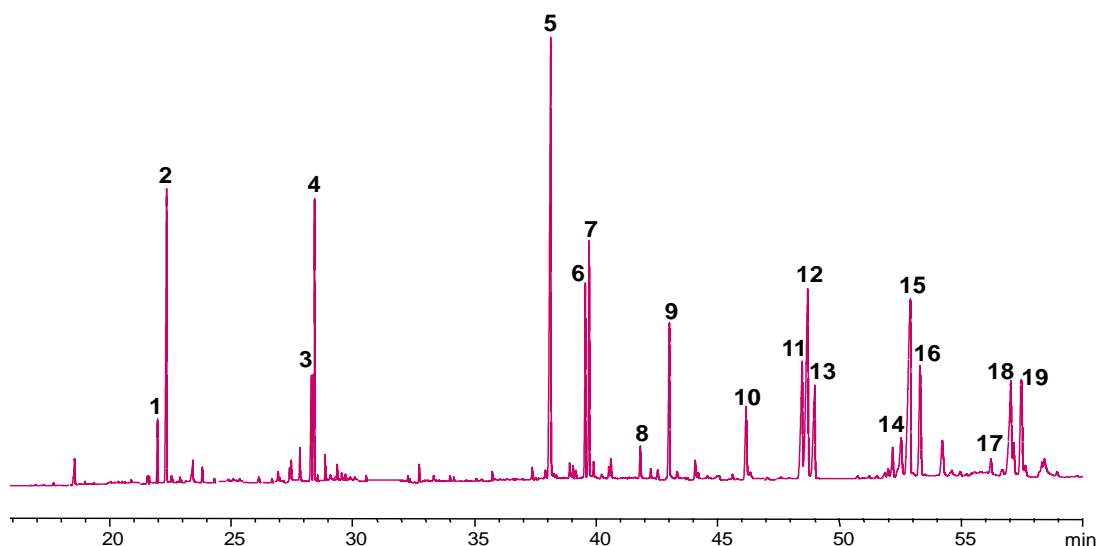
Una vez determinadas las condiciones de análisis por GC-FID, se inyectó cada uno de los derivados de los compuestos fenólicos bajo estudio, para determinar su tiempos de retención y la reproducibilidad de esta medición (**Tabla 32**).

En la **Figura 42**, se muestra un perfil cromatográfico típico de la mezcla de los derivados de los compuestos fenólicos de ACR, AU, ACF, APC, AR, A, L, Q, K, N y P, obtenido bajo las condiciones del análisis por GC-FID especificadas en la **Tabla 31**.

**Tabla 32.** Tiempos de retención de los derivados de compuestos fenólicos bajo estudio, analizados por GC-FID.

Nº de pico	Derivado de compuesto fenólico	$t_R$ , min $\pm$ S (n = 3)
1	<b>c-DMAPC</b>	23,13 $\pm$ 0,01
2	<b>t-DMAPC</b>	24,07 $\pm$ 0,02
3	<b>c-DMACF</b>	7,01 $\pm$ 0,01
4	<b>t-DMACF</b>	12,77 $\pm$ 0,02
5	<b>MMP</b>	13,34 $\pm$ 0,02
6	<b>DMACRI</b>	14,43 $\pm$ 0,02
7	<b>DMACRII</b>	18,25 $\pm$ 0,05
8	<b>DMP</b>	19,5 $\pm$ 0,2
9	<b>DMN</b>	27,83 $\pm$ 0,03
10	<b>TRMN</b>	29,9 $\pm$ 0,1
11	<b>DMA</b>	32,96 $\pm$ 0,01
12	<b>TRMA</b>	27,83 $\pm$ 0,03
13	<b>TRMK</b>	29,9 $\pm$ 0,1
14	<b>TML</b>	27,83 $\pm$ 0,03
15	<b>TRML</b>	29,9 $\pm$ 0,1
16	<b>TMQ</b>	32,96 $\pm$ 0,01
17	<b>c-PMAR</b>	27,83 $\pm$ 0,03
18	<b>t-PMAR</b>	29,9 $\pm$ 0,1
19	<b>MMAU</b>	32,96 $\pm$ 0,01

**c-DMAPC:** *cis*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **t-DMAPC:** *trans*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **c-TRMACF:** *cis*-Trimetil-ácido caféico, **t-TRMACF:** *trans*-Trimetil-ácido caféico, **MMP:** Monometil-pinocebrina, **DMACRI:** Dimetil-ácido carnósico I, **DMACRII:** Dimetil-ácido carnósico II, **DMP:** Dimetil-pinocebrina, **DMN:** Dimetil-naringenina, **TRMN:** Trimetil-naringenina, **DMA:** Dimetil-apigenina, **TRMA:** Trimetil-apigenina, **TRMK:** Trimetil-kaempferol, **TML:** Tetrametil-luteolina, **TRML:** Trimetil-luteolina, **TMQ:** Tetrametil-quercetina, **c-PMAR:** *cis*-Pentametil-ácido rosmarínico, **t-PMAR:** *trans*-Pentametil-ácido rosmarínico, **MMAU:** Monometil-ácido ursólico.



**Figura 42.** Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-FID de la mezcla de los derivados de los compuestos fenólicos. **1.** *cis*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **2.** *trans*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **3.** *cis*-Trimetil-ácido caféico, **4.** *trans*-Trimetil-ácido caféico, **5.** Monometil-pinocembrina, **6.** Dimetil-ácido carnósico I, **7.** Dimetil-ácido carnósico II, **8.** Dimetil-pinocembrina, **9.** Dimetil-naringenina, **10.** Trimetil-naringenina, **11.** Dimetil-apigenina, **12.** Trimetil-apigenina, **13.** Trimetil-kaempferol, **14.** Tetrametil-luteolina, **15.** Trimetil-luteolina, **16.** Tetrametil-quercetina, **17.** *cis*-Pentametil-ácido rosmarínico, **18.** *trans*-Pentametil-ácido rosmarínico, **19.** Monometil-ácido ursólico.

#### 4.2.4 Parámetros de eficiencia de la separación por GC-FID de los derivados de compuestos fenólicos.

Se determinaron los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica (**Sección 3.4.4**) de los derivados de los compuestos fenólicos, a saber: resolución, número de platos teóricos, factores de selectividad, retención y simetría (**Tabla 33**).

En la **Tabla 33** se observa que todos los derivados de los compuestos fenólicos bajo estudio fueron separados con  $R_s > 1,5$ . El número de platos teóricos  $N$ , para todos los compuestos fenólicos el  $N$  superó a 490.000 e indicó una eficiencia alta. En cuanto al factor de retención, se han encontrado rangos apropiados de  $k'$  entre 0,5 y 20 [127]. En la metodología

de análisis por GC-FID de los derivados de los compuestos fenólicos bajo estudio, el factor de retención estuvo entre 0,942 y 0,977. Para todos los analitos, el valor de  $\alpha$  fue mayor de 1,209. Finalmente, se observó que el factor de simetría de los compuestos fenólicos fue cercano a uno (0,80-1,12), lo cual indica que las señales cromatográficas no presentaban *tailing* o *fronting* excesivos, es decir, que los picos cromatográficos no se alejaban considerablemente de su esperada forma gaussiana [128].

**Tabla 33.** Parámetros de eficiencia de la separación de los derivados de los compuestos fenólicos por GC.

Nº de Pico	Analito	Resolución, $R_s$		Factor de retención, $k'$	Factor de selectividad, $\alpha$		Número de platos teóricos, N	Factor de simetría
1	<b>c-DMAPC</b>	-	-	0,942	-	-	3.294.300	0,87
2	<b>t-DMAPC</b>	$R_{s_{2-1}}$	25	0,944	$\alpha_{2-1}$	2,143	1.643.300	0,93
3	<b>c-DMACF</b>	$R_{s_{3-2}}$	104	0,945	$\alpha_{3-2}$	2,722	682.300	0,90
4	<b>t-DMACF</b>	$R_{s_{4-3}}$	2,9	0,947	$\alpha_{4-3}$	1,341	498.900	0,81
5	<b>MMP</b>	$R_{s_{5-4}}$	119	0,965	$\alpha_{5-4}$	2,521	1.963.600	0,96
6	<b>DMACRI</b>	$R_{s_{6-5}}$	27	0,966	$\alpha_{6-5}$	2,839	4.681.200	0,98
7	<b>DMACRII</b>	$R_{s_{7-6}}$	3,7	0,966	$\alpha_{7-6}$	1,304	4.309.900	0,96
8	<b>DMP</b>	$R_{s_{8-7}}$	43	0,968	$\alpha_{8-7}$	1,956	3.299.400	0,80
9	<b>DMN</b>	$R_{s_{9-8}}$	20	0,969	$\alpha_{9-8}$	1,929	2.844.600	0,96
10	<b>TRMN</b>	$R_{s_{10-9}}$	52	0,971	$\alpha_{10-9}$	2,076	3.171.100	0,85
11	<b>DMA</b>	$R_{s_{11-10}}$	33	0,972	$\alpha_{11-10}$	1,250	2.188.500	0,83
12	<b>TRMA</b>	$R_{s_{12-11}}$	3,0	0,972	$\alpha_{12-11}$	1,314	3.438.200	0,80

**Tabla 33.** Continuación.

13	<b>TRMK</b>	$R_{S_{13-12}}$	4,3	0,973	$\alpha_{13-12}$	1,306	2.702.700	0,91
14	<b>TML</b>	$R_{S_{14-13}}$	47	0,974	$\alpha_{14-13}$	1,876	2.215.500	0,83
15	<b>TRML</b>	$R_{S_{15-14}}$	4,7	0,975	$\alpha_{15-14}$	2,207	3.571.700	0,97
16	<b>TMQ</b>	$R_{S_{16-15}}$	6,8	0,975	$\alpha_{16-15}$	1,209	3.632.800	0,92
17	<b>c-PMAR</b>	$R_{S_{17-16}}$	52	0,976	$\alpha_{17-16}$	1,753	10.867.300	1,12
18	<b>t-PMAR</b>	$R_{S_{18-17}}$	14	0,976	$\alpha_{18-17}$	1,917	1.989.700	0,87
19	<b>MMAU</b>	$R_{S_{19-18}}$	5,6	0,977	$\alpha_{19-18}$	1,309	2.577.600	0,81

**c-DMAPC:** *cis*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **t-DMAPC:** *trans*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **c-TRMACF:** *cis*-Trimetil-ácido caféico, **t-TRMACF:** *trans*-Trimetil-ácido caféico, **MMP:** Monometil-pinocebrina, **DMACRI:** Dimetil-ácido carnósico I, **DMACRII:** Dimetil-ácido carnósico II, **DMP:** Dimetil-pinocebrina, **DMN:** Dimetil-naringenina, **TRMN:** Trimetil-naringenina, **DMA:** Dimetil-apigenina, **TRMA:** Trimetil-apigenina, **TRMK:** Trimetil-kaempferol, **TML:** Tetrametil-luteolina, **TRML:** Trimetil-luteolina, **TMQ:** Tetrametil-quercetina, **c-PMAR:** *cis*-Pentametil-ácido rosmarínico, **t-PMAR:** *trans*-Pentametil-ácido rosmarínico, **MMAU:** Monometil-ácido ursólico.

#### 4.2.5 Figuras analíticas de mérito para GC-FID.

- **Evaluación de la repetibilidad de los tiempos de retención ( $t_R$ ) y áreas cromatográficas.** Al inyectar seis veces 1  $\mu$ L de una solución de los derivados metilados de los compuestos fenólicos (punto de la curva de calibración, 160 ppm), se evaluó la repetibilidad del método. Los resultados para la evaluación del método, en cuanto a los  $t_R$  y áreas de picos cromatográficos, se observan en las **Tablas 34** y **35**, respectivamente.

Los coeficientes de variación (CV) de los tiempos de retención estuvieron entre 0,06 y 0,94% y, para las áreas cromatográficas, entre 1,5 y 8,3 %. En ambos casos, los CV no superaron los valores recomendados por las Buenas Prácticas de Laboratorio (2 y 10 % para tiempos de retención y áreas cromatográficas, respectivamente), lo que indica que el método cumplió con la norma y fue repetible.

**Tabla 34.** Repetibilidad de los  $t_R$  de los derivados metilados de los compuestos fenólicos, analizados por GC-FID.

Nº de pico	Analito	Tiempo de retención, min			$\langle \bar{X} \rangle$ (n = 6)	S	CV, %																																																																																																																																																																											
1	<b>c-DMAPC</b>	23,136	23,103	23,045	23,08	0,04	0,19																																																																																																																																																																											
		23,011	23,083	23,092				2	<b>t-DMAPC</b>	24,078	24,072	24,162	24,10	0,03	0,13	24,103	24,094	24,115	3	<b>c-DMACF</b>	25,012	25,112	25,208	25,11	0,06	0,25	25,104	25,134	25,087	4	<b>t-DMACF</b>	25,508	25,504	25,743	25,50	0,2	0,94	25,597	25,602	25,045	5	<b>MMP</b>	38,102	38,110	38,202	38,14	0,05	0,13	38,109	38,2	38,109	6	<b>DMACRI</b>	39,597	39,552	39,611	39,59	0,02	0,06	39,573	39,599	39,601	7	<b>DMACRII</b>	39,679	39,673	39,703	39,69	0,02	0,04	39,712	39,689	39,669	8	<b>DMP</b>	41,813	41,805	41,902	41,8	0,04	0,1	41,837	41,822	41,889	9	<b>DMN</b>	42,983	43,004	42,916	42,97	0,03	0,07	42,955	42,982	42,954	10	<b>TRMN</b>	46,124	46,138	46,203	46,2	0,03	0,1	46,173	46,182	46,208	11	<b>DMA</b>	48,375	48,435	48,462	48,43	0,03	0,07	48,402	48,458	48,439	12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09	48,618	48,611	48,597	13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03
2	<b>t-DMAPC</b>	24,078	24,072	24,162	24,10	0,03	0,13																																																																																																																																																																											
		24,103	24,094	24,115				3	<b>c-DMACF</b>	25,012	25,112	25,208	25,11	0,06	0,25	25,104	25,134	25,087	4	<b>t-DMACF</b>	25,508	25,504	25,743	25,50	0,2	0,94	25,597	25,602	25,045	5	<b>MMP</b>	38,102	38,110	38,202	38,14	0,05	0,13	38,109	38,2	38,109	6	<b>DMACRI</b>	39,597	39,552	39,611	39,59	0,02	0,06	39,573	39,599	39,601	7	<b>DMACRII</b>	39,679	39,673	39,703	39,69	0,02	0,04	39,712	39,689	39,669	8	<b>DMP</b>	41,813	41,805	41,902	41,8	0,04	0,1	41,837	41,822	41,889	9	<b>DMN</b>	42,983	43,004	42,916	42,97	0,03	0,07	42,955	42,982	42,954	10	<b>TRMN</b>	46,124	46,138	46,203	46,2	0,03	0,1	46,173	46,182	46,208	11	<b>DMA</b>	48,375	48,435	48,462	48,43	0,03	0,07	48,402	48,458	48,439	12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09	48,618	48,611	48,597	13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093						
3	<b>c-DMACF</b>	25,012	25,112	25,208	25,11	0,06	0,25																																																																																																																																																																											
		25,104	25,134	25,087				4	<b>t-DMACF</b>	25,508	25,504	25,743	25,50	0,2	0,94	25,597	25,602	25,045	5	<b>MMP</b>	38,102	38,110	38,202	38,14	0,05	0,13	38,109	38,2	38,109	6	<b>DMACRI</b>	39,597	39,552	39,611	39,59	0,02	0,06	39,573	39,599	39,601	7	<b>DMACRII</b>	39,679	39,673	39,703	39,69	0,02	0,04	39,712	39,689	39,669	8	<b>DMP</b>	41,813	41,805	41,902	41,8	0,04	0,1	41,837	41,822	41,889	9	<b>DMN</b>	42,983	43,004	42,916	42,97	0,03	0,07	42,955	42,982	42,954	10	<b>TRMN</b>	46,124	46,138	46,203	46,2	0,03	0,1	46,173	46,182	46,208	11	<b>DMA</b>	48,375	48,435	48,462	48,43	0,03	0,07	48,402	48,458	48,439	12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09	48,618	48,611	48,597	13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																	
4	<b>t-DMACF</b>	25,508	25,504	25,743	25,50	0,2	0,94																																																																																																																																																																											
		25,597	25,602	25,045				5	<b>MMP</b>	38,102	38,110	38,202	38,14	0,05	0,13	38,109	38,2	38,109	6	<b>DMACRI</b>	39,597	39,552	39,611	39,59	0,02	0,06	39,573	39,599	39,601	7	<b>DMACRII</b>	39,679	39,673	39,703	39,69	0,02	0,04	39,712	39,689	39,669	8	<b>DMP</b>	41,813	41,805	41,902	41,8	0,04	0,1	41,837	41,822	41,889	9	<b>DMN</b>	42,983	43,004	42,916	42,97	0,03	0,07	42,955	42,982	42,954	10	<b>TRMN</b>	46,124	46,138	46,203	46,2	0,03	0,1	46,173	46,182	46,208	11	<b>DMA</b>	48,375	48,435	48,462	48,43	0,03	0,07	48,402	48,458	48,439	12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09	48,618	48,611	48,597	13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																												
5	<b>MMP</b>	38,102	38,110	38,202	38,14	0,05	0,13																																																																																																																																																																											
		38,109	38,2	38,109				6	<b>DMACRI</b>	39,597	39,552	39,611	39,59	0,02	0,06	39,573	39,599	39,601	7	<b>DMACRII</b>	39,679	39,673	39,703	39,69	0,02	0,04	39,712	39,689	39,669	8	<b>DMP</b>	41,813	41,805	41,902	41,8	0,04	0,1	41,837	41,822	41,889	9	<b>DMN</b>	42,983	43,004	42,916	42,97	0,03	0,07	42,955	42,982	42,954	10	<b>TRMN</b>	46,124	46,138	46,203	46,2	0,03	0,1	46,173	46,182	46,208	11	<b>DMA</b>	48,375	48,435	48,462	48,43	0,03	0,07	48,402	48,458	48,439	12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09	48,618	48,611	48,597	13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																							
6	<b>DMACRI</b>	39,597	39,552	39,611	39,59	0,02	0,06																																																																																																																																																																											
		39,573	39,599	39,601				7	<b>DMACRII</b>	39,679	39,673	39,703	39,69	0,02	0,04	39,712	39,689	39,669	8	<b>DMP</b>	41,813	41,805	41,902	41,8	0,04	0,1	41,837	41,822	41,889	9	<b>DMN</b>	42,983	43,004	42,916	42,97	0,03	0,07	42,955	42,982	42,954	10	<b>TRMN</b>	46,124	46,138	46,203	46,2	0,03	0,1	46,173	46,182	46,208	11	<b>DMA</b>	48,375	48,435	48,462	48,43	0,03	0,07	48,402	48,458	48,439	12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09	48,618	48,611	48,597	13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																																		
7	<b>DMACRII</b>	39,679	39,673	39,703	39,69	0,02	0,04																																																																																																																																																																											
		39,712	39,689	39,669				8	<b>DMP</b>	41,813	41,805	41,902	41,8	0,04	0,1	41,837	41,822	41,889	9	<b>DMN</b>	42,983	43,004	42,916	42,97	0,03	0,07	42,955	42,982	42,954	10	<b>TRMN</b>	46,124	46,138	46,203	46,2	0,03	0,1	46,173	46,182	46,208	11	<b>DMA</b>	48,375	48,435	48,462	48,43	0,03	0,07	48,402	48,458	48,439	12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09	48,618	48,611	48,597	13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																																													
8	<b>DMP</b>	41,813	41,805	41,902	41,8	0,04	0,1																																																																																																																																																																											
		41,837	41,822	41,889				9	<b>DMN</b>	42,983	43,004	42,916	42,97	0,03	0,07	42,955	42,982	42,954	10	<b>TRMN</b>	46,124	46,138	46,203	46,2	0,03	0,1	46,173	46,182	46,208	11	<b>DMA</b>	48,375	48,435	48,462	48,43	0,03	0,07	48,402	48,458	48,439	12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09	48,618	48,611	48,597	13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																																																								
9	<b>DMN</b>	42,983	43,004	42,916	42,97	0,03	0,07																																																																																																																																																																											
		42,955	42,982	42,954				10	<b>TRMN</b>	46,124	46,138	46,203	46,2	0,03	0,1	46,173	46,182	46,208	11	<b>DMA</b>	48,375	48,435	48,462	48,43	0,03	0,07	48,402	48,458	48,439	12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09	48,618	48,611	48,597	13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																																																																			
10	<b>TRMN</b>	46,124	46,138	46,203	46,2	0,03	0,1																																																																																																																																																																											
		46,173	46,182	46,208				11	<b>DMA</b>	48,375	48,435	48,462	48,43	0,03	0,07	48,402	48,458	48,439	12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09	48,618	48,611	48,597	13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																																																																														
11	<b>DMA</b>	48,375	48,435	48,462	48,43	0,03	0,07																																																																																																																																																																											
		48,402	48,458	48,439				12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09	48,618	48,611	48,597	13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																																																																																									
12	<b>TRMA</b>	48,622	48,657	48,523	48,60	0,04	0,09																																																																																																																																																																											
		48,618	48,611	48,597				13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13	48,871	48,833	48,901	14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																																																																																																				
13	<b>TRMK</b>	48,897	48,995	48,992	48,91	0,07	0,13																																																																																																																																																																											
		48,871	48,833	48,901				14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08	52,521	52,601	52,598	15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																																																																																																															
14	<b>TML</b>	52,546	52,624	52,537	52,57	0,04	0,08																																																																																																																																																																											
		52,521	52,601	52,598				15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10	52,903	52,931	52,886	16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																																																																																																																										
15	<b>TRML</b>	52,803	52,963	52,892	52,90	0,05	0,10																																																																																																																																																																											
		52,903	52,931	52,886				16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06	53,298	53,311	53,305	17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																																																																																																																																					
16	<b>TMQ</b>	53,273	53,255	53,343	53,30	0,03	0,06																																																																																																																																																																											
		53,298	53,311	53,305				17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07	56,052	55,992	56,093																																																																																																																																																																
17	<b>c-PMAR</b>	56,035	56,033	55,987	56,03	0,04	0,07																																																																																																																																																																											
		56,052	55,992	56,093																																																																																																																																																																														

**Tabla 34.** Continuación.

18	<b>t-PMAR</b>	56,994	57,012	56,973	57,00	0,04	0,08
		56,998	56,948	57,078			
19	<b>MMAU</b>	57,914	58,012	57,912	58,0	0,1	0,1
		58,034	57,994	57,916			

**c-DMAPC:** *cis*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **t-DMAPC:** *trans*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **c-TRMACF:** *cis*-Trimetil-ácido caféico, **t-TRMACF:** *trans*-Trimetil-ácido caféico, **MMP:** Monometil-pinocebrina, **DMACRI:** Dimetil-ácido carnósico I, **DMACRII:** Dimetil-ácido carnósico II, **DMP:** Dimetil-pinocebrina, **DMN:** Dimetil-naringenina, **TRMN:** Trimetil-naringenina, **DMA:** Dimetil-apigenina, **TRMA:** Trimetil-apigenina, **TRMK:** Trimetil-kaempferol, **TML:** Tetrametil-luteolina, **TRML:** Trimetil-luteolina, **TMQ:** Tetrametil-quercetina, **c-PMAR:** *cis*-Pentametil-ácido rosmarínico, **t-PMAR:** *trans*-Pentametil-ácido rosmarínico, **MMAU:** Monometil-ácido ursólico.

**Tabla 35.** Repetibilidad de áreas de picos cromatográficos de los derivados metilados de los compuestos fenólicos, analizados GC-FID.

Nº de pico	Analito	Área			$\langle \bar{X} \rangle$ (n = 6)	S	CV, %
1	<b>c-DMAPC</b>	7,285	8,751	8,087	7,9	0,5	6,6
		8,020	7,450	7,840			
2	<b>t-DMAPC</b>	458,04	442,70	434,73	450	11	2,5
		437,55	455,32	461,46			
3	<b>c-DMACF</b>	3,432	4,262	4,082	4	0,3	8,3
		4,163	3,634	4,013			
4	<b>t-DMACF</b>	673,45	693,54	699,12	690	11	1,5
		688,34	678,02	698,13			
5	<b>MMP</b>	378,05	387,36	390,13	386	6	1,6
		385,73	395,23	381,57			
6	<b>DMACRI</b>	279,45	266,34	265,34	270	10	3,8
		282,64	254,63	268,32			
7	<b>DMACRII</b>	40,13	45,04	42,75	44	3	7,8
		49,86	44,67	41,36			
8	<b>DMP</b>	375,38	364,57	344,83	370	13	3,6
		382,21	369,03	358,26			
9	<b>DMN</b>	133,76	141,43	138,86	142	7	4,6
		150,37	140,42	150,12			
10	<b>TRMN</b>	357,52	333,41	345,14	360	15	4,3
		362,53	374,32	369,85			

**Tabla 35.** Continuación.

11	DMA	70,12	82,87	73,84	77	5	6,2
		79,05	74,42	80,09			
12	TRMA	370,28	343,74	377,75	360	12	3,3
		359,72	363,68	370,86			
13	TRMK	93,63	75,38	88,14	88	7	7,6
		90,835	92,623	85,845			
14	TML	293,58	306,32	318,55	300	12	3,9
		287,76	289,05	300,52			
15	TRML	139,69	148,37	129,89	140	8	5,7
		137,85	146,85	130,11			
16	TMQ	390,39	365,44	404,38	390	18	4,5
		418,54	388,23	399,72			
17	c-PMAR	9,22	9,15	8,46	9	0	4,2
		9,43	9,35	9,56			
18	t-PMAR	105,73	96,44	105,38	101	7	6,5
		107,38	98,27	90,67			
19	MMAU	86,34	81,88	92,38	87	3	4,0
		87,64	86,94	89,35			

**c-DMAPC:** *cis*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **t-DMAPC:** *trans*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **c-TRMACF:** *cis*-Trimetil-ácido caféico, **t-TRMACF:** *trans*-Trimetil-ácido caféico, **MMP:** Monometil-pinocebrina, **DMACRI:** Dimetil-ácido carnósico I, **DMACRII:** Dimetil-ácido carnósico II, **DMP:** Dimetil-pinocebrina, **DMN:** Dimetil-naringenina, **TRMN:** Trimetil-naringenina, **DMA:** Dimetil-apigenina, **TRMA:** Trimetil-apigenina, **TRMK:** Trimetil-kaempferol, **TML:** Tetrametil-luteolina, **TRML:** Trimetil-luteolina, **TMQ:** Tetrametil-quercetina, **c-PMAR:** *cis*-Pentametil-ácido rosmarínico, **t-PMAR:** *trans*-Pentametil-ácido rosmarínico, **MMAU:** Monometil-ácido ursólico.

- **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** Mediante la curva de calibración, para cada uno de los derivados metilados de los compuestos fenólicos (**Anexo 8**), se evaluaron la linealidad y la sensibilidad del método. Los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 36**. En el rango de concentraciones evaluadas (10-1300 ppm), se observó una buena linealidad (coeficiente de determinación,  $R^2=0,9994-0,9999$ ). Las pendientes de la curva de calibración muestran una sensibilidad del método moderada para los derivados metilados de los compuestos fenólicos ( $b= 1,3 - 2,9$ ),

excepto para los derivados metilados del ácido ursólico y la quercetina. La desviación estándar de los derivados metilados de los compuestos fenólicos estuvo en el intervalo de 0,03-0,3, lo cual muestra la precisión de las curvas de calibración. Por consiguiente, se puede inferir que el método fue aplicable para las concentraciones de los derivados metilados de los compuestos fenólicos examinadas.

**Tabla 36.** Linealidad y sensibilidad del método por GC-FID.

Analitos	Ecuación	R <sup>2</sup>	B	Sb	b ± tSb
<b>DMAPC</b>	y = 2,1001x	0,9996	2,1	0,3	2,1 ± 0,8
<b>DMACF</b>	y = 2,8166x	0,9998	2,8	0,3	2,8 ± 0,8
<b>DMACR</b>	y = 1,3141x	0,9998	1,3	0,1	1,3 ± 0,8
<b>DMAR</b>	y = 1,3808x	0,9994	1,4	0,2	1,4 ± 0,5
<b>DMAU</b>	y = 0,2962x	0,9994	0,29	0,03	0,29 ± 0,08
<b>DMP</b>	y = 2,6202x	0,9994	2,6	0,3	2,4 ± 0,8
<b>DMN</b>	y = 2,0234x	0,9998	2,0	0,2	2,0 ± 0,5
<b>DMA</b>	y = 2,0949x	0,9998	2,1	0,3	2,1 ± 0,8
<b>DMK</b>	y = 1,6254x	0,9999	1,6	0,1	1,6 ± 0,3
<b>DML</b>	y = 2,8976x	0,9999	2,9	0,2	2,9 ± 0,6
<b>DMQ</b>	y = 0,8549x	0,9998	0,85	0,04	0,85 ± 0,1

**DMAPC:** Derivados metilados del ácido *p*-cumárico, **DMACF:** Derivados metilados del ácido caféico, **DMACR:** Derivados metilados del ácido carnósico, **DMAR:** Derivados metilados del ácido rosmarínico, **DMAU:** Derivado metilado del ácido ursólico, **DMP:** Derivados metilados de la pinocembrina, **DMN:** Derivados metilados de la naringenina, **DMA:** Derivados metilados de la apigenina, **DMK:** Derivado metilado del kaempferol, **DML:** Derivados metilados de la luteolina, **DML:** Derivados metilados de la luteolina, **DMQ:** Derivados metilados de la quercetina.

- **Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LQO).** Para la determinación de LOD y LQO se siguieron los criterios descritos en la **Sección 3.4.5**. En la **Tabla 37** se observan los LOD y LQO para cada uno de los derivados metilados de los compuestos fenólicos estudiados.

**Tabla 37.** Límites de detección y cuantificación obtenidos por GC-FID de los derivados metilados de los compuestos fenólicos estudiados.

Analitos	LOD, ppm	LOQ, ppm
<b>DMAPC</b>	2,1	6,9
<b>DMACF</b>	1,9	6,3
<b>DMACR</b>	2,6	8,6
<b>DMAR</b>	4,9	16,3
<b>DMAU</b>	19,1	63,8
<b>DMP</b>	1,4	4,7
<b>DMN</b>	2,7	9,1
<b>DMA</b>	4,6	15,4
<b>DMK</b>	13,6	45,4
<b>DML</b>	2,8	9,2
<b>DMQ</b>	7,3	24,4

**DMAPC:** Derivados metilados del ácido *p*-cumárico, **DMACF:** Derivados metilados del ácido caféico, **DMACR:** Derivados metilados del ácido carnósico, **DMAR:** Derivados metilados del ácido rosmarínico, **DMAU:** Derivado metilado del ácido ursólico, **DMP:** Derivados metilados de la pinocembrina, **DMN:** Derivados metilados de la naringenina, **DMA:** Derivados metilados de la apigenina, **DMK:** Derivado metilado del kaempferol, **DML:** Derivados metilados de la luteolina, **DML:** Derivados metilados de la luteolina, **DMQ:** Derivados metilados de la quercetina.

- **Determinación de la reproducibilidad de  $t_R$  y áreas cromatográficas.** Para evaluar la reproducibilidad del método, se inyectó, durante tres días consecutivos, una solución de los derivados metilados de los compuestos fenólicos (160 ppm). Los resultados obtenidos para áreas cromatográficas y  $t_R$  se muestran en las **Tablas 38 y 39**.

Los coeficientes de variación para el caso de las áreas cromatográficas estuvieron en el intervalo de 2,2-9,1 % y para los  $t_R$  no superaron el 1%. Estos valores son aceptados por las Buenas Prácticas de Laboratorio y, por consiguiente, muestran que el método fue altamente reproducible.

**Tabla 38.** Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de los derivados metilados de los compuestos fenólicos analizados por GC-FID.

Nº de pico	Analito	Tiempo de retención, min			<X> (n = 3)	S	CV, %
		Día 1	Día 2	Día 3			
1	<b>c-DMAPC</b>	23,123	23,074	23,002	23,07	0,05	0,22
2	<b>t-DMAPC</b>	24,073	24,074	24,056	24,07	0,01	0,03
3	<b>c-DMACF</b>	25,056	25,101	25,217	25,12	0,07	0,27
4	<b>t-DMACF</b>	25,509	25,507	25,732	25,6	0,1	0,41
5	<b>MMP</b>	38,103	38,124	38,204	38,14	0,04	0,11
6	<b>DMACRI</b>	39,527	39,698	39,601	39,61	0,07	0,18
7	<b>DMACRII</b>	39,691	39,698	39,702	39,70	0,00	0,01
8	<b>DMP</b>	41,828	41,831	41,923	41,86	0,04	0,11
9	<b>DMN</b>	42,994	43,017	42,845	42,95	0,08	0,18
10	<b>TRMN</b>	46,151	46,180	46,201	46,18	0,02	0,04
11	<b>DMA</b>	48,397	48,444	48,421	48,42	0,02	0,04
12	<b>TRMA</b>	48,607	48,698	48,512	48,61	0,08	0,16
13	<b>TRMK</b>	48,893	48,947	48,965	48,94	0,03	0,06
14	<b>TML</b>	52,488	52,526	52,496	52,50	0,02	0,03
15	<b>TRML</b>	52,834	52,910	52,845	52,86	0,03	0,06
16	<b>TMQ</b>	53,284	53,298	53,300	53,29	0,01	0,01
17	<b>c-PMAR</b>	56,012	56,015	55,981	56,00	0,02	0,03
18	<b>t-PMAR</b>	56,934	57,006	56,987	56,98	0,03	0,05
19	<b>MMAU</b>	57,434	58,446	57,945	57,9	0,4	0,71

**c-DMAPC:** *cis*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **t-DMAPC:** *trans*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **c-TRMACF:** *cis*-Trimetil-ácido caféico, **t-TRMACF:** *trans*-Trimetil-ácido caféico, **MMP:** Monometil-pinocembrina, **DMACRI:** Dimetil-ácido carnósico I, **DMACRII:** Dimetil-ácido carnósico II, **DMP:** Dimetil-pinocembrina, **DMN:** Dimetil-naringenina, **TRMN:** Trimetil-naringenina, **DMA:** Dimetil-apigenina, **TRMA:** Trimetil-apigenina, **TRMK:** Trimetil-kaempferol, **TML:** Tetrametil-luteolina, **TRML:** Trimetil-luteolina, **TMQ:** Tetrametil-quercetina, **c-PMAR:** *cis*-Pentametil-ácido rosmarínico, **t-PMAR:** *trans*-Pentametil-ácido rosmarínico, **MMAU:** Monometil-ácido ursólico.

**Tabla 39.** Reproducibilidad de los  $t_R$  de los derivados metilados de los compuestos fenólicos obtenidos por GC-FID.

Nº de pico	Analito	Área			<X> (n = 3)	S	CV, %
		Día 1	Día 2	Día 3			
1	<b>c-DMAPC</b>	7,27	8,45	7,99	8	1	7,6
2	<b>t-DMAPC</b>	456,09	440,80	437,93	450	10	2,2
3	<b>c-DMACF</b>	3,85	4,28	4,03	4,1	0,2	5,4
4	<b>t-DMACF</b>	667,98	672,67	600,56	647	40	6,2
5	<b>MMP</b>	356,05	327,36	300,23	328	28	8,5
6	<b>DMACRI</b>	279,85	245,12	260,27	262	17	6,7
7	<b>DMACRII</b>	41,24	47,83	48,93	46	4	9,0
8	<b>DMP</b>	335,22	346,27	350,69	344	8	2,3
9	<b>DMN</b>	128,86	142,53	124,76	132	9	7,0
10	<b>TRMN</b>	377,75	355,01	390,11	374	18	4,8
11	<b>DMA</b>	70,76	83,50	78,34	78	6	8,3
12	<b>TRMA</b>	360,82	343,11	374,76	360	16	4,4
13	<b>TRMK</b>	90,21	78,20	87,32	85	6	7,4
14	<b>TML</b>	294,59	310,22	320,43	308	13	4,2
15	<b>TRML</b>	147,40	142,12	123,54	138	13	9,1
16	<b>TMQ</b>	394,16	375,39	413,27	394	19	4,8
17	<b>c-PMAR</b>	9,41	9,04	8,54	9,0	0,4	4,8
18	<b>t-PMAR</b>	102,80	99,45	115,62	106	9	8,1
19	<b>MMAU</b>	82,24	86,37	93,54	87	6	6,5

**c-DMAPC:** *cis*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **t-DMAPC:** *trans*-Dimetil-ácido *p*-cumárico, **c-TRMACF:** *cis*-Trimetil-ácido caféico, **t-TRMACF:** *trans*-Trimetil-ácido caféico, **MMP:** Monometil-pinocembrina, **DMACRI:** Dimetil-ácido carnósico I, **DMACRII:** Dimetil-ácido carnósico II, **DMP:** Dimetil-pinocembrina, **DMN:** Dimetil-naringenina, **TRMN:** Trimetil-naringenina, **DMA:** Dimetil-apigenina, **TRMA:** Trimetil-apigenina, **TRMK:** Trimetil-kaempferol, **TML:** Tetrametil-luteolina, **TRML:** Trimetil-luteolina, **TMQ:** Tetrametil-quercetina, **c-PMAR:** *cis*-Pentametil-ácido rosmarínico, **t-PMAR:** *trans*-Pentametil-ácido rosmarínico, **MMAU:** Monometil-ácido ursólico.

#### 4.3 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.

La extracción de los compuestos fenólicos de las nueve especies vegetales bajo estudio se realizó según lo indicado en la **Sección 3.5**. Con el propósito de comparación y, teniendo en cuenta que los compuestos fenólicos pueden

estar presentes en las matrices vegetales en su forma libre y como glicósidos, se realizó su extracción, acompañada de un paso adicional de hidrólisis ácida, pero también sin hidrólisis. En la **Tabla 40** se registran los rendimientos obtenidos con extracción con fluido supercrítico de las especies de *Lippia spp.* estudiadas. Los rendimientos de extracción más altos se alcanzaron en las plantas *L. graveolens* y *L. origanoides*, quimiotipos “carvacrol” y “felandreno”. Los rendimientos más bajos se obtuvieron para *L. citriodora*, *L. alba* quimiotipo “carvona” y *L. americana*.

**Tabla 40.** Rendimientos de los extractos obtenidos por SFE de las especies *Lippia spp.* bajo estudio.

Especie	Rendimiento de extracción, %
<i>L. alba</i> , quimiotipo “carvona”	0,3
<i>L. alba</i> , quimiotipo “citral”	1,2
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “felandreno”	3,1
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “timol”	2,3
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “carvacrol”	3,4
<i>L. americana</i>	0,8
<i>L. micromera</i>	1,9
<i>L. graveolens</i>	4,3
<i>L. citriodora</i>	0,3

#### 4.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.

##### 4.4.1 Cuantificación de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD.

Aplicando las metodologías desarrolladas para HPLC (**Sección 4.1.1**) y de extracción (**Sección 3.5**), los compuestos fenólicos bajo estudio en las plantas de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana* se cuantificaron mediante la técnica de patrón externo.

En primer lugar, se cuantificaron los compuestos fenólicos en los extractos, obtenidos por extracción con solvente, sin llevar a cabo hidrólisis previa (**Tabla 41**). En el extracto de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, se detectó la luteolina (0,034 mg/g de planta). En los tres quimiotipos de *L. origanoides*, se cuantificaron naringenina, luteolina y pinocembrina. *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol” y “timol”, presentaron contenido más alto de naringenina (1,3–1,8 mg/g de planta), seguido de luteolina (0,14–0,20 mg/g de planta) y pinocembrina (0,038–0,047 mg/g de planta). Por el contrario, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, presentó contenido alto de pinocembrina (7,3 mg/g de planta), seguido de naringenina (0,27 mg/g de planta) y luteolina (0,14 mg/g de planta). Para *L. citriodora* se cuantificó naringenina (0,035 mg/g de planta) y luteolina (0,028 mg/g de planta). En el caso de *L. graveolens*, se detectaron y cuantificaron quercetina, luteolina y naringenina, sin embargo, la pinocembrina no se registro en el extracto en concentración por encima del límite de detección. En las especies *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. americana* y *L. micromera*, no se detectaron compuestos fenólicos bajo estudio, por encima de sus límites de detección (0,24-2,36 ppm).

**Tabla 41.** Cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos bajo estudio en los extractos obtenidos con solvente, sin la hidrólisis, de especies *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*.

Especie	Contenido de compuestos fenólicos, mg/g de planta (n=3)										
	ACF	APC	AR	Q	N	L	K	A	P	ACR	AU
<i>L. alba</i> , quimiotipo “carvona”	<NMD <sup>a</sup>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,034 ± 0,005	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. alba</i> , quimiotipo “citral”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “carvacrol”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	1,5 ± 0,2	0,16 ± 0,02	<NMD	<NMD	0,042 ± 0,004	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “felandreno”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,27 ± 0,05	0,14 ± 0,01	<NMD	<NMD	7,3 ± 0,3	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “timol”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	1,4 ± 0,4	0,18 ± 0,02	<NMD	<NMD	0,045 ± 0,002	<NMD	<NMD
<i>L. citriodora</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,028 ± 0,001	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. americana</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. graveolens</i>	<NMD	<NMD	<NMD	0,075 ± 0,004	0,46 ± 0,02	0,07 ± 0,01	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. micromera</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD

<sup>a</sup> <NMD: No detectado por encima del nivel mínimo de detección (ver **Tabla 24**).

**ACF:** Ácido caféico; **ACR:** Ácido carnósico; **AU:** Ácido ursólico; **APC:** Ácido *p*-cumárico; **AR:** Ácido rosmarínico; **Q:** Quercetina; **N:** Naringenina; **L:** Luteolina; **K:** Kaempferol; **A:** Apigenina; **P:** Pinocebrina.

Se realizó la cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos obtenidos con solvente seguida de hidrólisis (**Sección 3.5.1**). En la **Tabla 42**, se observa que la cantidad de compuestos fenólicos (mg de compuesto fenólico/g de planta) aumentó en comparación con la obtenida en todos los extractos aislados con solvente, pero sin hidrólisis. Además, se detectaron algunos compuestos que no se registraron en los extractos sin hidrolizar, a saber: en *L. alba*, quimiotipo “cital”, se determinó la presencia de luteolina (1,86 mg/g de planta), en *L. origanoides*, quimiotipos “carvacrol” y “timol”, se determinó quercetina (0,57 y 0,51 mg/g de planta, respectivamente), en *L. graveolens*, se detectó apigenina (0,51 mg/g de planta), y, en el caso de *L. micromera*, se cuantificaron quercetina (0,24 mg/g de planta) y apigenina (1,03 mg/g de planta).

Estas variaciones se pueden atribuir a la presencia de flavonoides en forma conjugada, e.g., como glicósidos que, al ser sometidos a hidrólisis ácida, se hidrolizan formando el azúcar y el flavonoide. De esta forma, se registró el aumento de la cantidad de flavonoides cuantificados en su forma libre, en el extracto hidrolizado.

Se realizó también la cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos obtenidos con fluido supercrítico (SFE). En primer lugar, se analizaron los extractos SFE sin hidrolizar, luego con la subsiguiente hidrólisis.

En la **Tabla 43**, se observa que la cantidad de compuestos fenólicos detectados en los extractos SFE fue más baja en comparación con la detectada en los extractos obtenidos con solvente. Esto, se puede atribuir al hecho que los compuestos fenólicos son más solubles en mezclas

agua:metanol, empleadas en la extracción con solvente, que en CO<sub>2</sub> que se usó en la SFE. En los extractos obtenidos con SFE de las plantas bajo estudio, sólo se cuantificaron compuestos fenólicos en los tres quimiotipos de *L. origanoides*, a saber: en *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno” se detectaron naringenina (0,011 mg/g de planta) y pinocembrina (0,78 mg/g de planta); *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol” se cuantificaron (0,021 mg/g de planta) y naringenina (0,11 mg/g de planta), en *L. origanoides*, quimiotipo “citral” se determinaron pinocembrina (0,07 mg/g de planta) y naringenina (0,21 mg/g de planta) (**Tabla 43**).

Similarmente al procedimiento de la extracción con solvente, el análisis de compuestos fenólicos se realizó en los extractos obtenidos por SFE seguida de hidrólisis ácida (**Tabla 44**). En este caso, se observa que las cantidades de compuestos fenólicos no varían significativamente. Esto se puede explicar por el hecho que la solubilidad de los flavonoides glucosidados en el CO<sub>2</sub> es mucho más baja en comparación con la de los flavonoides libres, no conjugados con azúcares.

Al comparar el tipo y la cantidad de los compuestos fenólicos extraídos con solvente y con fluido supercrítico, se observó que con la SFE sólo se extrajeron pinocembrina y naringenina, mientras que la extracción con solvente permitió aislar de las plantas bajo estudio quercetina, luteolina, naringenina, apigenina y pinocembrina. La cantidad de naringenina y pinocembrina extraída con SFE fue más baja comparada con su cantidad extraída con solvente.

**Tabla 42.** Cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos bajo estudio en los extractos obtenidos por extracción con solvente seguida de hidrólisis, en especies vegetales de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*.

Especie	Contenido de compuestos fenólicos, mg/g de planta (n=3)											
	ACF	APC	AR	Q	N	L	K	A	P	ACR	AU	
<i>L. alba</i> , quimiotipo “carvona”	<NMD <sup>a</sup>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	1,41 ± 0,03	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	
<i>L. alba</i> , quimiotipo “citral”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	1,86 ± 0,06	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “carvacrol”	<NMD	<NMD	<NMD	0,57 ± 0,02	5,67 ± 0,05	2,92 ± 0,07	<NMD	<NMD	0,48 ± 0,03	<NMD	<NMD	
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “felandreno”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	1,26 ± 0,02	3,2 ± 0,1	<NMD	<NMD	30 ± 1	<NMD	<NMD	
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “timol”	<NMD	<NMD	<NMD	0,51 ± 0,3	5,56 ± 0,07	3,08 ± 0,04	<NMD	<NMD	0,7 ± 0,1	<NMD	<NMD	
<i>L. citriodora</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,26 ± 0,03	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	
<i>L. americana</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	
<i>L. graveolens</i>	<NMD	<NMD	<NMD	0,18 ± 0,02	1,06 ± 0,02	2,9 ± 0,6	<NMD	0,51 ± 0,01	<NMD	<NMD	<NMD	
<i>L. micromera</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,24 ± 0,05	<NMD	<NMD	1,03 ± 0,07	<NMD	<NMD	<NMD	

<sup>a</sup><NMD: Menor del nivel mínimo de detección (ver **Tabla 24**).

**ACF:** Ácido caféico; **ACR:** Ácido carnósico; **AU:** Ácido ursólico; **APC:** Ácido *p*-cumárico; **AR:** Ácido rosmarínico; **Q:** Quercetina; **N:** Naringenina; **L:** Luteolina; **K:** Kaempferol; **A:** Apigenina; **P:** Pinocebrina.

**Tabla 43.** Cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos bajo estudio en los extractos obtenidos con fluido supercrítico, sin posterior hidrólisis, de especies de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*.

Especie	Contenido de compuestos fenólicos, mg/g de planta (n=3)										
	ACF	APC	AR	Q	N	L	K	A	P	ACR	AU
<i>L. alba</i> , quimiotipo “carvona”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. alba</i> , quimiotipo “citral”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “carvacrol”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,09 ± 0,02	<NMD	<NMD	<NMD	0,029 ± 0,004	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “felandreno”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,032 ± 0,004	<NMD	<NMD	<NMD	0,98 ± 0,05	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “timol”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,11 ± 0,02	<NMD	<NMD	<NMD	0,05 ± 0,02	<NMD	<NMD
<i>L. citriodora</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. americana</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. graveolens</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. micromera</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD

<sup>a</sup><NMD: Menor del nivel mínimo de detección (ver **Tabla 24**).

**ACF:** Ácido caféico; **ACR:** Ácido carnósico; **AU:** Ácido ursólico; **APC:** Ácido *p*-cumárico; **AR:** Ácido rosmarínico; **Q:** Quercetina; **N:** Naringenina; **L:** Luteolina; **K:** Kaempferol; **A:** Apigenina; **P:** Pinocebrina.

**Tabla 44.** Cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos bajo estudio en los extractos obtenidos con fluido supercrítico, seguida de hidrólisis, en las especies de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*.

Especie	Contenido de compuesto fenólico, mg/g de planta (n=3)										
	ACF	APC	AR	Q	N	L	K	A	P	ACR	AU
<i>L. alba</i> , quimiotipo “carvona”	<NMD <sup>a</sup>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. alba</i> , quimiotipo “citral”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “carvacrol”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,11 ± 0,03	<NMD	<NMD	<NMD	0,021 ± 0,004	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “felandreno”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,011 ± 0,001	<NMD	<NMD	<NMD	0,78 ± 0,02	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “timol”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,21 ± 0,05	<NMD	<NMD	<NMD	0,07 ± 0,01	<NMD	<NMD
<i>L. citriodora</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. americana</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. graveolens</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. micromera</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD

<sup>a</sup><NMD: Menor del nivel mínimo de detección (ver **Tabla 24**).

**ACF:** Ácido caféico; **ACR:** Ácido carnósico; **AU:** Ácido ursólico; **APC:** Ácido *p*-cumárico; **AR:** Ácido rosmarínico; **Q:** Quercetina; **N:** Naringenina; **L:** Luteolina; **K:** Kaempferol; **A:** Apigenina; **P:** Pinocebrina.

**4.4.2 Cuantificación de los compuestos fenólicos por GC-FID.** Aplicando las metodologías desarrollada para GC-FID (**Sección 4.2.3**) y de extracción (**Sección 3.5**), se cuantificaron mediante la técnica de patrón externo los compuestos fenólicos bajo estudio en las plantas de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “cital”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*.

Para la cuantificación por GC-FID de los compuestos fenólicos en los extractos fue necesario realizar un paso de hidrólisis posterior a la extracción, con el fin de analizar los compuestos fenólicos en su forma libre y no como glucósidos. En primer lugar, se cuantificaron los compuestos fenólicos en los extractos, obtenidos por extracción con solvente, con hidrólisis (**Tabla 45**). De igual forma, que en los extractos analizados por HPLC, en el extracto de *L. alba*, quimiotipo “carvona” se detectó la luteolina. En los tres quimiotipos de *L. origanoides*, se cuantificaron naringenina, luteolina y pinocembrina. Para *L. citriodora*, se cuantificaron naringenina y luteolina. En el caso de *L. graveolens*, se detectaron y cuantificaron quercetina, luteolina y naringenina.

Se realizó también la cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos obtenidos con fluido supercrítico (SFE). Similarmente a la extracción con solvente, el análisis de compuestos fenólicos se realizó en los extractos obtenidos por SFE, seguida de hidrólisis ácida. En la **Tabla 46**, se observa que la cantidad de compuestos fenólicos detectados en los extractos SFE fue más baja en comparación con la detectada en los extractos obtenidos con solvente. Todos los anteriores compuestos se cuantificaron en la misma proporción hallada por cromatografía líquida.

**Tabla 45.** Cuantificación por GC-FID de los compuestos fenólicos bajo estudio en los extractos obtenidos por extracción con solvente seguida de hidrólisis, en especies vegetales de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*.

Especie	Contenido de compuestos fenólicos, mg/g de planta (n=3)										
	ACF	APC	AR	Q	N	L	K	A	P	ACR	AU
<i>L. alba</i> , quimiotipo “carvona”	<NMD <sup>a</sup>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	1,2 ± 0,1	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. alba</i> , quimiotipo “citral”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	1,69 ± 0,09	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “carvacrol”	<NMD	<NMD	<NMD	0,38 ± 0,07	6,7 ± 0,3	2,13 ± 0,05	<NMD	<NMD	0,31 ± 0,04	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “felandreno”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	1,1 ± 0,8	2,8 ± 0,5	<NMD	<NMD	27,3 ± 0,5	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “timol”	<NMD	<NMD	<NMD	0,21 ± 0,4	3,85 ± 0,02	2,87 ± 0,06	<NMD	<NMD	0,5 ± 0,1	<NMD	<NMD
<i>L. citriodora</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,26 ± 0,03	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. americana</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. graveolens</i>	<NMD	<NMD	<NMD	0,11 ± 0,05	0,91 ± 0,04	2,1 ± 0,3	<NMD	0,11 ± 0,09	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. micromera</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,11 ± 0,03	<NMD	<NMD	0,95 ± 0,08	<NMD	<NMD	<NMD

<sup>a</sup><NMD: Menor del nivel mínimo de detección (ver **Tabla 37**).

**ACF:** Ácido caféico; **ACR:** Ácido carnósico; **AU:** Ácido ursólico; **APC:** Ácido *p*-cumárico; **AR:** Ácido rosmarínico; **Q:** Quercetina; **N:** Naringenina; **L:** Luteolina; **K:** Kaempferol; **A:** Apigenina; **P:** Pinocebrina.

**Tabla 46.** Cuantificación por GC-FID de los compuestos fenólicos bajo estudio en los extractos obtenidos con fluido supercrítico, seguida de hidrólisis, en las especies de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, *L. alba*, quimiotipo “citral”, *L. origanoides*, quimiotipo “felandreno”, *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. americana*.

Especie	Contenido de compuesto fenólico, mg/g de planta (n=3)											
	ACF	APC	AR	Q	N	L	K	A	P	ACR	AU	
<i>L. alba</i> , quimiotipo “carvona”	<NMD <sup>a</sup>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. alba</i> , quimiotipo “citral”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “carvacrol”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,06 ± 0,02	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “felandreno”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,74 ± 0,05	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo “timol”	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,11 ± 0,02	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. citriodora</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. americana</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. graveolens</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
<i>L. micromera</i>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD

<sup>a</sup><NMD: Menor del nivel mínimo de detección (ver **Tabla 37**).

**ACF:** ácido caféico; **ACR:** ácido carnósico; **AU:** ácido ursólico; **APC:** ácido *p*-cumárico; **AR:** ácido rosmarínico; **Q:** quercetina; **N:** naringenina; **L:** luteolina; **K:** kaempferol; **A:** apigenina; **P:** pinocebrina.

En la **Tabla 47**, se compara la cantidad de compuestos fenólicos determinados por HPLC-DAD y GC-FID, en los diferentes extractos obtenidos de las especies del género *Lippia* bajo estudio.

La mayoría de las investigaciones sobre las plantas aromáticas está relacionada con el estudio de los metabolitos secundarios volátiles. Sin embargo, en los últimos años, el aumento del número de estudios sobre compuestos fenólicos en plantas aromáticas, ha sido considerable. Gran parte de estas publicaciones abordan aspectos clínicos y nutricionales. Entre estas, algunas publicaciones que hacen referencia a la cuantificación de los compuestos fenólicos bajo estudio en plantas aromáticas, reportan la presencia de quercetina, naringenina, pinocembrina, luteolina y apigenina. En la **Tabla 48**, se muestra la cantidad de compuestos fenólicos determinados en extractos obtenidos con solvente, realizado el mismo procedimiento de extracción empleado en la presente investigación, en plantas aromáticas de diferentes familias, a saber: Rutaceae, Geraniaceae, Fagáceae, Oleáceae, Lamiaceae, Veronaceae.

Al comparar los resultados obtenidos para las plantas del género *Lippia* bajo estudio, se observa que *L. alba*, quimiotipos “carvona” y “citrál”, presentan mayor contenido de luteolina que algunas especies de la familia Labiaceae; *L. origanoides*, quimiotipos “carvacrol”, “timol” y “felandreno”, presentan cantidades de naringenina, pinocembrina y luteolina, superiores y en algunos casos comparables, a las reportadas por los autores; *L. citriodora* y *L. micromera* tienen mayor contenido de luteolina y naringenina que las especies de la familia Labiaceae mencionadas; y para *L. graveolens* se observó menor contenido de naringenina, quercetina y pinocembrina, pero mayor proporción de luteolina y apigenina. En este sentido, se puede establecer que las plantas bajo estudio, principalmente, los quimiotipos de *L. alba* y *L. origanoides*, son promisorias como fuentes de antioxidantes naturales.

**Tabla 47.** Comparación de los compuestos fenólicos determinados por HPLC-DAD y GC-FID en los diferentes extractos obtenidos de las especies del género *Lippia* bajo estudio.

Especie	Método de extracción	Contenido de compuesto fenólico, mg de compuesto fenólico/g de planta (n=3)									
		Quercetina		Naringenina		Luteolina		Apigenina		Pinocembrina	
		HPLC	GC	HPLC	GC	HPLC	GC	HPLC	GC	HPLC	GC
<i>L. alba</i> , quimiotipo carvona	SFEH	<NMD <sup>a</sup>	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
	SFESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC
	STEH	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	1,41±0,03	1,2±0,1	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
	STESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	<NMD	NC	0,034±0,005	-	<NMD	NC	<NMD	NC
<i>L. alba</i> , quimiotipo citral	SFEH	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
	SFESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC
	STEH	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	1,86±0,06	1,69±0,09	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
	STESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC
<i>L.</i> <i>origanoides</i> , quimiotipo carvacrol	SFEH	<NMD	<NMD	0,11±0,03	0,06±0,02	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,021 ± 0,004	<NMD
	SFESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	0,09±0,02	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	0,029±0,004	NC
	STEH	0,57±0,02	0,38±0,07	5,67±0,05	6,7±0,3	2,92±0,07	2,13±0,05	<NMD	<NMD	0,48±0,03	0,31±0,04
	STESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	1,5±0,2	NC	0,16±0,02	NC	<NMD	NC	0,042±0,004	NC
<i>L.</i> <i>origanoides</i> , quimiotipo felandreno	SFEH	<NMD	<NMD	0,011±0,001	<NMD	ND	<NMD	<NMD	<NMD	0,78±0,02	0,74±0,05
	SFESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	0,032±0,004	NC	ND	NC	<NMD	NC	0,98±0,05	NC
	STEH	<NMD	<NMD	1,26±0,02	1,1±0,8	3,2±0,1	2,8±0,5	<NMD	<NMD	30±1	27,3±0,5
	STESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	0,27±0,05	NC	0,14±0,01	NC	<NMD	NC	7,3±0,3	NC

**Tabla 47.** Continuación.

<i>L. origanoides</i> , quimiotipo timol	SFEH	<NMD	<NMD	0,21±0,05	0,11±0,02	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,07±0,01	<NMD
	SFESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	0,11±0,02	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	0,05±0,02	NC
	STEH	0,51±0,3	0,21±0,4	5,56±0,07	3,85±0,02	3,08±0,04	2,87±0,06	<NMD	<NMD	0,7±0,1	0,5±0,1
	STESH <sup>b</sup>	ND	NC	1,4±0,4	NC	0,18±0,02	NC	<NMD	NC	0,045±0,002	NC
<i>L. citriodora</i>	SFEH	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
	SFESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC
	STEH	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	0,26±0,03	0,26±0,03	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD
	STESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	<NMD	NC	0,028±0,001	NC	<NMD	NC	<NMD	NC
<i>L. graveolens</i>	SFEH	ND	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	ND	<NMD	<NMD	<NMD
	SFESH <sup>b</sup>	ND	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	ND	NC	<NMD	NC
	STEH	0,18±0,02	0,11±0,05	1,06±0,02	0,91±0,04	2,9±0,6	2,1±0,3	0,51±0,01	0,11±0,09	<NMD	<NMD
	STESH <sup>b</sup>	0,075±0,004	NC	0,46±0,02	NC	0,07±0,01	NC	ND	NC	<NMD	NC
<i>L. micromera</i>	SFEH	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	<NMD	ND	<NMD	<NMD	<NMD
	SFESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	ND	NC	<NMD	NC
	STEH	<NMD	<NMD	0,24±0,05	0,11±0,03	<NMD	<NMD	1,03 ± 0,07	0,95±0,08	<NMD	<NMD
	STESH <sup>b</sup>	<NMD	NC	<NMD	NC	<NMD	NC	ND	NC	<NMD	NC

<sup>a</sup><NMD

Menor de el nivel mínimo de detección (ver **Tabla 24** y **Tabla 37**).

<sup>b</sup>

Los extractos sin hidrólisis sólo se analizaron por HPLC.

NC

No corresponde.

SFEH

Extracción con fluido supercrítico seguida de hidrólisis.

SFESH

Extracción con fluido supercrítico sin posterior hidrólisis.

STEH

Extracción con solvente seguida de hidrólisis.

STESH

Extracción con solvente sin posterior hidrólisis.

**Tabla 48.** Comparación de los compuestos fenólicos determinados en especies de diferentes familias de plantas aromáticas.

Especie	Familia	Contenido de compuesto fenólico, mg de compuesto fenólico/g de planta (n=3)					Ref.
		Quercetina	Naringenina	Pinocembrina	Luteolina	Apigenina	
<i>Ruta graveolens</i>	Rutaceae	0,031±0,001	<NMD	-	<NMD	<NMD	15
<i>Geranium purpureum</i>	Geraniaceae	0,11±0,02	<NMD	-	<NMD	<NMD	
<i>Castanea vulgaris</i>	Fagáceae	0,036±0,001	0,0017±0,002	-	<NMD	<NMD	
<i>Jasminum officinalis</i>	Oleáceae	0,035±0,0002	<NMD	-	<NMD	<NMD	
<i>Origanum dictamnus</i>	Lamiaceae	0,013±0,002	<NMD	-	<NMD	<NMD	
<i>Nepeta cataria</i>	Lamiaceae	<NMD	<NMD	-	0,036±0,002	<NMD	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	<NMD	<NMD	-	0,016±0,02	ND	130
<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	<NMD	<NMD	-	0,002±0,001	0,003±0,001	
<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	<NMD	<NMD	-	0,36±0,03	0,04±0,002	
<i>Menta viridis</i>	Lamiaceae	<NMD	<NMD	-	<NMD	0,007±0,001	
<i>Menta pelugium</i>	Lamiaceae	<NMD	0,42±0,02	-	<NMD	1,10±0,02	
<i>Origanum majorana</i>	Lamiaceae	<NMD	<NMD	-	<NMD	0,008±0,001	
<i>Lippia graveolens</i>	Verbenaceae	0,47±0,02	3,35±0,03	9,16±0,02	0,51±0,02	-	45
<i>Verbena rigida</i>	Verbenaceae	-	-	-	10,24±0,64	4,38±0,77	131
<i>Verbena ternera</i>	Verbenaceae	-	-	-	4,52±0,36	6,42±0,85	
<i>Verbena venosa</i>	Verbenaceae	-	-	-	3,81±1,03	4,76±0,62	
<i>L. alba</i> , quimiotipo carvona	Verbenaceae	<NMD <sup>a</sup>	<NMD	<NMD	1,41±0,03	<NMD	
<i>L. alba</i> , quimiotipo citral	Verbenaceae	<NMD	<NMD	<NMD	1,86±0,06	<NMD	
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo carvacrol	Verbenaceae	0,57±0,02	5,67±0,05	0,48±0,03	2,92±0,07	<NMD	Presente trabajo
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo felandreno	Verbenaceae	<NMD	1,26±0,02	30±1	3,2±0,1	<NMD	

**Tabla 48.** Continuación.

<i>L. origanoides</i> , quimiotipo timol	Verbenaceae	0,51±0,3	5,56±0,07	0,7±0,01	2,87±0,06	<NMD
<i>L. citriodora</i>	Verbenaceae	<NMD	<NMD	<NMD	0,26±0,03	<NMD
<i>L. graveolens</i>	Verbenaceae	0,18±0,02	1,06±0,02	<NMD	2,9±0,6	0,51±0,01
<i>L. micromera</i>	Verbenaceae	<NMD	0,24±0,05	<NMD	1,030,07	<NMD

<sup>a</sup><NMD: Menor del nivel mínimo de detección (ver **Tabla 24**).

## 4.5 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC Y GC.

HPLC y GC se destacan entre las técnicas empleadas para el análisis de compuestos fenólicos en diferentes matrices. Aunque ambas técnicas son efectivas, existen marcadas diferencias debido a la instrumentación empleada, los principios que rigen la separación y la preparación de la muestra. La comparación entre estas técnicas, en cuanto a su sensibilidad, la disponibilidad de recursos y el tiempo, resulta útil para establecer sus ventajas y desventajas para el análisis de compuestos fenólicos. Las diferencias halladas entre HPLC y GC, para determinar compuestos fenólicos en matrices vegetales, se analizaron con base en las figuras analíticas de mérito, el tiempo y el costo de análisis.

### 4.5.1 Figuras analíticas de mérito

**Límites de detección y cuantificación.** Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron más bajos para la metodología de análisis implementada por HPLC (**Tabla 49**). El menor LOD (1,4 mg/L) por GC, fue para pinocembrina, mientras en HPLC fue para el ácido carnósico (LOD 0,24 mg/L). En general, empleando la metodología de análisis implementada por GC tanto el LOD, como el LOQ obtenidos, son más del doble de los encontrados para la metodología por HPLC. Estos resultados dejan en evidencia las apreciables variaciones que pueden presentarse en el análisis, según la metodología y el equipo empleado. En este caso, las variaciones se pueden atribuir principalmente al analito estudiado en cada metodología de análisis, es decir, para GC se analizan los compuestos fenólicos metilados mientras que en HPLC se analizan los compuestos fenólicos sin metilar.

**Tabla 49.** Límites de detección y cuantificación de HPLC y GC de los compuestos fenólicos analizados.

Compuesto fenólico	LOD, ppm		LOQ, ppm	
	HPLC	GC	HPLC	GC
<b>ACF</b>	0,3	1,9	0,9	6,3
<b>APC</b>	0,5	2,1	1,6	6,9
<b>AR</b>	1,4	4,9	4,6	16,3
<b>Q</b>	0,7	7,3	2,5	24,4
<b>N</b>	0,7	2,7	2,2	9,1
<b>L</b>	0,8	2,8	2,6	9,2
<b>K</b>	1,7	13,6	5,6	45,4
<b>A</b>	1,1	4,6	3,8	15,4
<b>P</b>	0,4	1,4	1,2	4,7
<b>ACR</b>	0,2	2,6	0,8	8,6
<b>AU</b>	2,4	19,1	7,9	63,8

**ACF:** Ácido caféico; **ACR:** Ácido carnósico; **AU:** Ácido ursólico; **APC:** Ácido *p*-cumárico; **AR:** Ácido rosmarínico; **Q:** Quercetina; **N:** Naringenina; **L:** Luteolina; **K:** Kaempferol; **A:** Apigenina; **P:** Pinocebrina.

- **Linealidad y sensibilidad del método.** La mejor linealidad se obtuvo con la metodología implementada para GC, mientras que la sensibilidad más alta se logró con HPLC (**Tabla 50**). Esto indica, que la linealidad del método para el rango de 5 a 1400 mg/L, fue mayor para todos los compuestos fenólicos en el sistema de detección GC-FID, que para HPLC-DAD del equipo de HPLC. La metodología con HPLC resulta más sensible, pues genera mayor respuesta del detector, comparada con los resultados obtenidos con GC.

**Tabla 50.** Linealidad y sensibilidad de los métodos HPLC y GC.

Compuesto fenólico	R <sup>2</sup>		b ± Sb	
	HPLC	GC*	HPLC	GC
<b>ACF</b>	0,9991	0,9998	51,5 ± 0,7	2,8 ± 0,8
<b>APC</b>	0,9988	0,9996	41,0 ± 0,6	2,1 ± 0,8
<b>AR</b>	0,9991	0,9994	24,5 ± 0,3	1,4 ± 0,5
<b>Q</b>	0,9987	0,9998	66,2 ± 0,9	0,85 ± 0,1
<b>N</b>	0,9986	0,9998	61,3 ± 0,8	2,0 ± 0,5
<b>L</b>	0,9982	0,9999	117 ± 2	2,9 ± 0,6
<b>K</b>	0,9991	0,9999	32,5 ± 0,9	1,6 ± 0,3
<b>A</b>	0,9996	0,9998	68,7 ± 0,4	2,1 ± 0,8
<b>P</b>	0,9998	0,9994	37,2 ± 0,5	2,4 ± 0,8
<b>ACR</b>	0,9992	0,9998	60,5 ± 0,8	1,3 ± 0,8
<b>AU</b>	0,9992	0,9994	8,3 ± 0,8	0,29 ± 0,08

**ACF:** Ácido caféico; **ACR:** Ácido carnósico; **AU:** Ácido ursólico; **APC:** Ácido *p*-cumárico; **AR:** Ácido rosmarínico; **Q:** Quercetina; **N:** Naringenina; **L:** Luteolina; **K:** Kaempferol; **A:** Apigenina; **P:** Pinocebrina.

- **Repetibilidad.** Los valores máximos del CV, recomendados para áreas cromatográficas y tiempos de retención son 10 y 2%, respectivamente. Según estos valores, la repetibilidad de los métodos implementados en el presente trabajo fue alta. La **Tabla 51** muestra que, para HPLC, el máximo CV, para las áreas fue 4,3% (ACR) y, para los tiempos de retención, fue 1,12% (A). Mientras en GC, el máximo CV, para las áreas, fue 7,6% (K) y, para los tiempos de retención fue 0,6% (ACF). Lo anterior indica que para el análisis de compuestos fenólicos bajo las condiciones establecidas, la Repetibilidad de los tiempos de retención fue similar tanto para GC como para HPLC, mientras que para las áreas cromatográficas con HPLC se alcanzó una repetibilidad más alta.

**Tabla 51.** Comparación de las repetibilidades de los métodos de GC y HPLC para el análisis de compuestos fenólicos.

Analitos	Repetibilidad, CV, %			
	Tiempo de retención, min		Área, cuentas	
	GC	HPLC	GC	HPLC
<b>APC</b>	0,16	0,53	4,6	2,5
<b>ACF</b>	0,60	0,38	4,9	2,4
<b>ACR</b>	0,05	0,24	5,8	4,3
<b>AR</b>	0,07	0,21	5,4	3,0
<b>AU</b>	0,10	0,04	4,0	3,2
<b>P</b>	0,11	0,10	2,6	3,0
<b>N</b>	0,07	0,17	4,5	2,1
<b>A</b>	0,08	1,12	4,7	2,2
<b>K</b>	0,13	0,19	7,6	1,8
<b>L</b>	0,09	0,17	4,8	1,9
<b>Q</b>	0,06	0,16	4,5	2,5

**ACF:** Ácido caféico; **ACR:** Ácido carnósico; **AU:** Ácido ursólico; **APC:** Ácido *p*-cumárico; **AR:** Ácido rosmarínico; **Q:** Quercetina; **N:** Naringenina; **L:** Luteolina; **K:** Kaempferol; **A:** Apigenina; **P:** Pinocebrina.

- **Reproducibilidad.** El método de HPLC fue más reproducible en cuanto a las áreas cromatográficas, de acuerdo con los CV reportados en la **Tabla 52**. Para los tiempos de retención, la reproducibilidad fue similar para las dos técnicas implementadas. Se puede concluir que los dos métodos analíticos de compuestos fenólicos en matrices vegetales, se encuentran dentro de los rangos permitidos por las Buenas Prácticas de Laboratorio. Por consiguiente, ambos métodos pueden emplearse en el laboratorio para la cuantificación rutinaria de los compuestos fenólicos bajo estudio, siguiendo la presente metodología.

**Tabla 52.** Reproducibilidad de los métodos de GC y HPLC para el análisis de compuestos fenólicos.

Analitos	Reproducibilidad, CV, %			
	Tiempo de retención, min		Área, cuentas	
	GC	HPLC	GC	HPLC
<b>APC</b>	0,12	0,61	4,9	3,1
<b>ACF</b>	0,34	0,30	5,8	3,3
<b>ACR</b>	0,09	0,12	7,8	2,8
<b>AR</b>	0,04	0,51	6,5	4,0
<b>AU</b>	0,71	0,12	6,5	5,7
<b>P</b>	0,11	0,13	6,6	1,4
<b>N</b>	0,11	0,20	5,9	1,4
<b>A</b>	0,10	0,12	6,3	3,0
<b>K</b>	0,06	0,03	7,4	4,4
<b>L</b>	0,05	0,57	6,7	0,5
<b>Q</b>	0,01	0,28	4,8	3,1

**ACF:** Ácido caféico; **ACR:** Ácido carnósico; **AU:** Ácido ursólico; **APC:** Ácido *p*-cumárico; **AR:** Ácido rosmarínico; **Q:** Quercetina; **N:** Naringenina; **L:** Luteolina; **K:** Kaempferol; **A:** Apigenina; **P:** Pinocebrina.

**4.5.2 Tiempo de análisis.** Aunque ambos métodos son eficientes para el análisis de los compuestos fenólicos, se observa, sin embargo, que el tiempo de análisis cromatográfico por GC (60 min) es dos veces mayor que para HPLC (30 min). Además, el tiempo de preparación de la muestra para HPLC (30 min) es mucho más corto por GC (7 h). Es evidente, que el aumento en el tiempo de análisis total de una muestra para GC depende fundamentalmente del tiempo requerido para preparar la muestra.

**4.5.3 Costo de análisis.** El costo aproximado de análisis de los compuestos fenólicos, en una muestra vegetal, analizada por HPLC o GC, se detalla en la **Tabla 53**. En GC, el costo total del análisis por muestra es mayor que para HPLC, lo que constituye una desventaja desde el punto de vista económico. Sin embargo, es importante destacar que el mayor costo

para GC se debe a la preparación de la muestra y no a los costos del análisis cromatográfico. En la **Tabla 53** se observa que teniendo en cuenta sólo los costos de análisis cromatográfico, HPLC es más costosa que GC, dados los precios de los solventes grado HPLC y los consumibles que se requieren. Sumado a esto, HPLC tiene desventajas desde el punto de vista ambiental debido a los problemas inherentes al manejo de residuos químicos.

**Tabla 53.** Valores de análisis por muestra empleando las metodologías de análisis implementadas en este estudio.

DETALLE	HPLC*		GC	
	Cantidad	Valor, pesos colombianos	Cantidad	Valor, pesos colombianos
<b>Preparación de la muestra</b>				
Filtros para muestras	1	3000		
Metanol*	20 mL			
Agua*	20 mL			
Ácido clorhídrico			10 mL	460
BHT			50 mg	250
Acetato de etilo			30 mL	2820
Acetona Grado Pestanal			3 mL	200
Sulfato de dimetilo			60 µL	11
Carbonato de sodio			1 g	567
Diclorometano			10 mL	325
<b>Subtotal</b>		3000		4633
<b>Uso del equipo</b>				
		90000		90000
<b>Subtotal</b>		90000		90000
<b>Acondicionamiento y apagado del equipo</b>				
Metanol*	30 mL	1500		
Ácido o-fosfórico*	50 µL	17		
Agua*	40 mL	930		
<b>Subtotal</b>		2447		
<b>Análisis</b>				
Fase móvil				
Metanol*	15 mL	750		
Ácido o-fosfórico*	30 µL	10		
Agua*	15 mL	338		
<b>Subtotal</b>		1098		
<b>Mano de obra**</b>				
	1 h	7900	8 h	63200
<b>Subtotal</b>		7900		63200
<b>TOTAL</b>		104445		157833

\*Solventes grado HPLC; \*\*La mano de obra calificada se estimó para un salario mensual de un químico recién egresado \$1.500.000 pesos m/cte.

## 5. CONCLUSIONES

- ✓ En el presente trabajo de investigación, se implementaron dos metodologías de análisis cromatográfico por HPLC-DAD y GC-FID/MS para la determinación simultánea de un grupo de compuestos fenólicos, *i.e.*, ácidos carnósico, ursólico, caféico, *p*-cumárico, rosmarínico y apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, naringenina y pinocembrina, presentes en las plantas del género *Lippia* (*L. alba*, *L. organoides*, *L. micromera*, *L. americana*, *L. graveolens*, *L. citriodora*).
- ✓ Las metodologías implementadas cumplieron a cabalidad con los requerimientos establecidos por las Buenas Prácticas de Laboratorio, en cuanto a la repetibilidad y reproducibilidad de los tiempos de retención (C.V= 0,04-0,94%), las áreas cromatográficas (C.V= 0,5-8,3%) y coeficientes de correlación lineal ( $R^2 > 0,9991$ ), lo que permitió asegurar la calidad y la confianza de los resultados obtenidos y su aplicabilidad para el análisis de compuestos fenólicos en matrices vegetales bajo las condiciones de trabajo establecidas.
- ✓ Se realizó la derivatización simultánea por el método relativamente sencillo y rápido de los ácidos carnósico, ursólico, caféico, *p*-cumárico, rosmarínico y apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, naringenina y pinocembrina; lo que permitió hacer el análisis de estas sustancias por el método CG-FID/MS.
- ✓ La comparación de ambas técnicas, HPLC y GC, se basó en el estudio de las figuras analíticas de mérito, el costo y el tiempo de análisis. Aunque la metodología implementada por GC resultó ser bastante reproducible, repetible y sensible, no superó en estos tres

aspectos, a la deHPLC. La técnica HPLC resulto ser más rápida y menos costosa, fue más sensible, repetible y reproducible. Sin embargo, el uso de cada técnica dependerá del propósito del análisis, la disponibilidad de la muestra y del equipo cromatográfico, el tiempo y los reactivos, con que se cuentan. HPLC-DAD se recomienda para análisis de rutina, rápidos, de bajo costo y sencillos, tipo *screening* o prospección. No obstante, aunque la metodología implementada por GC-FID/MS implica mayor costo y tiempo de análisis, es imprescindible como técnica confirmatoria de los compuestos fenólicos, para evitar los falsos positivos, de los cuales la cromatografía líquida no esta excenta.

- ✓ En los extractos obtenidos con solvente de las plantas de *L. americana* y *L. micromera*, no se detectaron por ni HPLC, ni por GC, los compuestos fenólicos bajo estudio, por encima de los niveles mínimos de detección de los métodos (HPLC: 0,3-2,4 ppm y GC: 1,4-19,1 ppm). En las demás especies vegetales bajo estudio, se cuantificaron los siguientes compuestos fenólicos, a saber: luteolina, en las especies *L. alba*, quimiotipos “cital” (1,4 mg/g de planta) y “carvona” (1,8 mg/g de planta); naringenina (N), luteolina (L) y pinocembrina (P) en las especies de *L. origanoides*, quimiotipos “carvacrol” (N: 5,7 mg/g de planta, L: 2,9 mg/g de planta, P: 0,5 mg/g de planta), “felandreno” (N: 1,3 mg/g de planta, L: 3,2 mg/g de planta, P: 30 mg/g de planta) y “timol” (N: 5,5 mg/g de planta, L: 3,7 mg/g de planta, P: 0,7 mg/g de planta); luetolina en la especie *L. citriodora* (0,3 mg/g de planta); y quercetina (Q), naringenina y luteolina en la especie *L. graveolens* (Q: 0,2 mg/g de planta, N: 1,1 mg/g de planta, L: 2,9 mg/g de planta).

- ✓ En los extractos obtenidos con fluido supercrítico de las especies de *L. alba*, quimiotipos “citral” y “carvona”, *L. citriodora*, *L. graveolens*, *L. americana* y *L. micromera*, no se detectaron ni por HPLC, ni por GC, los compuestos fenólicos bajo estudio, por encima de los niveles mínimos de detección de los métodos. Sin embargo, se determinó naringenina y pinocebrina en las tres especies de *L. organoides*, quimiotipos “carvacrol” (N: 0,1 mg/g de planta, P: 0,02 mg/g de planta), “felandreno” (N: 0,2 mg/g de planta, P: 0,07 mg/g de planta) y “timol”.
  
- ✓ El resultado fundamental del presente trabajo de investigación fue establecer las mejores condiciones para el análisis de compuestos fenólicos y disponer de la información cualitativa y cuantitativa de los compuestos fenólicos presentes en las especies del género *Lippia* bajo estudio. Esta información fue un criterio fundamental para establecer cuáles de estas especies son promisorias como fuente antioxidantes de naturales. En este sentido, se estableció que de las especies del género *Lippia* bajo estudio, principalmente los quimiotipos de *L. alba* y *L. organoides* son promisorias como fuentes de antioxidantes naturales.

## 6. RECOMENDACIONES

- ✓ Evaluar la reacción de derivatización empleando agentes alquilantes acordes a los lineamientos de la química verde, e.g. carbonato de dimetilo, con el fin de evitar la generación de residuos altamente contaminantes.
  
- ✓ Emplear las metodologías de análisis implementadas por HPLC y GC en la búsqueda de nuevas especies ampliamente distribuidas en el territorio nacional, promisorias en cuanto a su contenido de compuestos fenólicos, pues su notable actividad antioxidante, los hace importantes en el mercado.
  
- ✓ En vista de las ventajas que tiene la HPLC para el análisis de los compuestos fenólicos bajo estudio, se recomienda implementar una metodología de análisis por HPLC-MS, que permita realizar un análisis confirmatorio y no sólo como técnica cromatográfica de *screening*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R.; Phenolic compound biochemistry; Springer, New York, EE.UU., **2008**, pp. 1-24.
2. BHAT, S.V.; NAGASAMPAGI, B.A.; SIVAKUMAR, M.; Chemistry of natural products, Springer, New York, EE.UU. **2005**, pp. 1-21.
3. ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R.; Flavonoids: chemistry, biochemistry and application; CRC Press, New York, EE. UU., **2006**, 1197 p.
4. BRIDLE, P.; GARCÍA, C.; Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC, *Food Chem.*, **1997**, 59, pp. 299-304.
5. SIMÓ, C.; IBÁÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F.; BARBAS, C.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; Analysis of antioxidants from orange juice obtained by countercurrent supercritical fluid extraction, using micellar electrokinetic chromatography and reverse-phase liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, pp. 6648-6652.
6. WILSON, E.; High-pressure liquid chromatography of apple juice phenolic compounds, *J. Sci. Food Agric.*, **1981**, 32, pp. 257-264.
7. MERKEN, H; BEECHER, G; Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 897, pp. 177–184.
8. SUÁREZ, B.; PALACIOS, N.; FRAGA, N.; RODRÍGUEZ, R.; Liquid chromatographic method for quantifying polyphenols in ciders by direct injection, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1066, pp. 105–110.

9. SPANOS, G.A.; WROLSTAD, R.E.; Influence of variety, processing and storage on the phenolic composition of pear juice. *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 38, pp. 817-824.
10. CALA, M.P.; VÁSQUEZ, A.M.; Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas, extraídas de plantas de la familia Labiaceae y determinación de su actividad antioxidante. Tesis de Grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **2008**, 151 p.
11. BONOLI, M.; PELILLO, M.; TOSCHI, T. G.; LERCKER, G.; Analysis of green tea catechins: comparative study between HPLC and HPCE, *Food Chem.*, **2003**, 81, pp. 631–638.
12. PELILLO, M.; BIGUZZI, B.; BENDINI, A.; TOSCHI, T. G.; VANZINI, M.; LERCKER, G.; Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins, *Food Chem.*, **2002**, 78, pp. 369–374.
13. GARCÍA, C.; BRIDLE, P.; Analysis of non-coloured phenolic compounds in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis, *Food Chem.*, **1995**, 54, pp. 349-352.
14. WANG, S.P.; HUANG, K.J.; Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1032, pp. 273–279.
15. PROESTOS, C.; BOZIARIS, I. S.; NYCHAS, G. J.; KOMAITIS, M.; Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity, *Food Chem.*, **2006**, 95, pp. 664–671.
16. SEÑORÁNS, F.J.; IBÁÑEZ, E.; CAVERO, S.; TABERA, J.; REGLERO, G.; Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 870, pp. 491–499.

17. IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; CREGO, A.L.; SEÑORÁNS, F.J.; CAVERO, S.; REGLERO, G.; Combined use of supercritical fluid extraction, micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, pp. 4060-4065.
18. YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.; POKORNÝ, J.; Natural antioxidants from herbs and spices, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2006**, 108, pp. 776–793.
19. ZHENG, W.; WANG, S.; Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J. Agric. Food. Chem.*, **2001**, 49, pp. 5165-5170.
20. SKALTSA, H.; HARVALA, Z.; Contribution a liýetude chimique d'*Origanum dictamnus* L.-2nd communication (Glucosides des feuilles), *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, **1987**, 21(1), p. 56.
21. BOHM, A.B.; The Flavonoids. Advances in Research Science, Chapman and Hall, New York, EE.UU., **1988**, 194 p.
22. PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ, D.; VILLAR, A.; *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review, *J. Ethnopharmacol.*, **2001**, 76, pp. 201–214.
23. RICE-EVANS, C. ; MILLER, N. ; PAGANGA, G. ; Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolics acids, *Free Rad. Biol. Med.*, **1996**, 20(7), pp. 933-956.
24. PÉREZ, G.; Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes, *Rev. Cub. Invest. Biomed.*, **2003**, 22(1), pp.48-57.
25. RIEMERSMA, R.A.; RICE-EVANS, C.A., TYRRELL, R.M.; CLIFFORD, M.N.; LEAN, M.E.; Tea flavonoids and cardiovascular health, *Q.J. Med.*, **2001**, 94, pp. 277-282.
26. TAMBA, Y.; OHBA, S.; KUBOTA, M.; YOSHIOKA, H.; YOSHIOKA, H.; YAMAZAKI, M.; Single GUV method reveals interaction of tea catechin,

- (-)-epigallocatechin gallate with lipid membranes, *Biophys. J.*, **2007**; 106, pp.97-105.
27. JESSUP, W.; RANKIN, S. M.; WHALLEY, C.V.; HOULT, J. R.; SCOTT, J.; LEAKE, D. S.; Alpha-tocopherol consumption during low-density-lipoprotein oxidation, *Biochem. J.*, **1990**, 265, pp. 399-405.
  28. DUFFY, S.J.; KEANEY, J.F., HOLBROOK, M.; GOKCE, N.; SWERDLOFF, P.L.; FREI, B.; VITA, J.A.; Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery, *Dis. Circulation*, **2001**, 104, pp. 151-156.
  29. HODGSON, J.M.; PUDDEY, I.B.; BURKE, V.; BEILIN, L.J.; JORDAN, N.; Effects on blood pressure of drinking green and black tea, *J. Hypertension*, **1999**, 17, pp.457-463.
  30. RICE-EVENS, C. A.; PACKER, L.; Flavonoids in health and disease, Segunda edición, Marcel Dekker, Inc., New York, EE.UU, **2003**, pp. 233-272.
  31. HALLIWELL, B.; Reactive oxygen species and the central nervous system, *J. Neurochem.*, **1992**, 59(5), pp. 1609–1623.
  32. FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J.; Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature*, **2000**, 408(6809), pp. 239–247.
  33. BEHL, C.; Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches, *Prog. Neurobiol.*, **1999**, 57(3), pp. 301–323.
  34. ZHANG, Y., DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.*, **2000**, 7(4), pp. 240–250.
  35. ALEXI, T.; BORLONGAN, C.V.; FAULL, R.L.; WILLIAMS, C.E.; CLARK, R.G.; GLUCKMAN, P.D.; HUGHES, P.E.; Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases, *Prog. Neurobiol.*, **2000**, 60(5), pp. 409–470.

36. COYLE, J.T.; PUTTFARCKEN, P.; Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders, *Science*, **1993**, 262(5134), pp. 689–695.
37. WESNES, K.A.; WARD, T.; MCGINTY, A.; PETRINI, O.; The memory enhancing effects of a *Ginkgo biloba*/Panax ginseng combination in healthy middle-aged volunteers, *Psychopharmacologia*, **2000**, 152(4), pp. 353–361.
38. KENNEDY, D. O.; SCHOLEY, A. B.; WESNES, K. A.; The dose-dependent cognitive effects of acute administration of *Ginkgo biloba* to healthy young volunteers, *Psychopharmacologia*, **2000**, 151(4), pp. 416–423.
39. MAURER, K.; IHL, R.; DIERKS, T.; FROLICH, L.; Clinical efficacy of *Ginkgo biloba* special extract Egb 761 in dementia of the Alzheimer type, *Phytomedicine*, **1998**, 5, pp. 417–424.
40. WATANABE, C.M.; WOLFFRAM, S.; ADER, P.; RIMBACH, G.; PACKER, L.; MAGUIRE, J.J.; SCHULTZ, P.G.; GOHIL, K.; The *in vivo* neuromodulatory effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98(12), pp. 6577–6580.
41. CSOKAY, B.; PRAJDA, N.; WEBER, G.; OLAH, E.; Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin, *Life Sci.*, **1997**, 60, pp. 2157–2163.
42. RZYMOWSKA, J.; GAWRON, A.; PAWLIKOWSKA, B.; JAKUBOWICZ, J.; WOJCIEROWSKI, J.; The effect of quercetin on induction of apoptosis, *Folia. Histochem. Cytobiol.*, **1999**, 37, pp. 125–126.
43. SAKAGAMI, H.; JIANG, Y.; KUSAMA, K.; ATSUMI, T.; UEHA, T.; TOGUCHI, M.; Induction of apoptosis by flavones, flavonols (3-hydroxyflavones) and isoprenoidsubstituted flavonoids in human oral tumor cell lines, *Anticancer Res.*, **2000**, 20, pp. 271–277.
44. MARTÍNEZ, A.; HERNÁNDEZ, L.; MENDOZA, S.; Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth), *Plant Foods Hum. Nutr.*, **2008**, 63, pp. 1–5.

45. LING, L.Z.; MUKHOPADHYAY, S.; ROBBINS, R.J.; HARNLY, J.M.; Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis, *J. Food Comp. Anal.*, **2007**, 20, pp. 361–369.
46. WÄCHTER, G.A.; VALCIC, S.; FRANZBLAU, S.G.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B.N.; Antitubercular activity of triterpenoids from *Lippia turbinata*, *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, pp. 37-41.
47. ONO, M.; ODA, E.; TANAKA, T.; LIDA, Y.; YAMASAKI, T.; MASUOKA, C.; IKEDA, T.; NOHARA, T.; DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*, *J. Nat. Med.*, **2008**, 62, pp. 101–106.
48. CARNAT, A.; CARNAT, A.P.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J.L.; The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea, *Fitoterapia*, **1999**, 70, pp.44-49.
49. HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F.; Ethnopharmacology of *Lippia alba*, *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, 116, pp. 211–222.
50. STASHENKO ,E.E.; MARTÍNEZ , J.R.; RUÍZ, C.A.; ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M.; *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis, *J. Sep.Sci.*, **2009**, 33(1), pp. 93-103.
51. PROESTOS, C.; SERELI, D.; KOMAITIS, M.; Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS, *Food Chem.*, **2006**, 95, pp. 44–52.
52. GARCÍA-BARRIGA, H.; Flora medicinal de Colombia. Botánica Médica. Tomo II. 2ª Ed., Tercer Mundo, Bogotá, **1992**, p. 634.
53. GUPTA, M.P.; 270 Plantas medicinales Iberoamericanas, Ed. Presencia; Santa Fe de Bogotá; **1995**, pp. 554-559.
54. BANDONI, A.L. (Ed.); Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de

- aromas y sabores; Ed. Red de Editoriales Universitarias; La Plata, Argentina; **2000**; pp. 85, 305, 321, 322.
55. HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; GRESSIER, B.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F.; Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*, *Phytother. Res.*, **2007**, 22, pp. 256–258.
  56. BASSANI, V.L.; ZÉTOLO, M.; DE LIMA, T.C.M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ, G.; LIMBERGER, R. P.; PETROVICK, P. R.; CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian false melissa), *J. Ethnopharmacol.*, **2002**, 82, pp. 207- 215.
  57. GUERRERO, M.F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R.; MARTÍN, M.L.; ARTEAGA, L.; SAN ROMAN, L.; *Lippia alba*: Tradicional uses, chemistry and pharmacology: a review, *J. Ethnopharmacol.*, **2001**, 76, pp. 37 - 42.
  58. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTÍNEZ, J.R.; 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**, 27(105), pp.579-597.
  59. RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCÍA, A.; RODRÍGUEZ, C.A.; RIVERO, R.; Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, **2003**, 87, pp. 241-246.
  60. GAZOLA, R.; MACHADO, D.; RUGGIERO, C.; SINGI, G.; MACEDO, M.; *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats, *Pharmacol. Res.*, **2004**, 50, pp. 477–480.
  61. RODRÍGUEZ, D.A.; SANABRIA, M.A.; Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que la causan, *Interciencia*, **2001**, 30(12), pp. 739-744.

62. RUÍZ, C.A.; Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K., en tres estados fenológicos, Proyecto de grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **2008**, 159 p.
63. HARBONE, J.B.; BAXTER, H.; Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants. Taylor and Francis. London, **1993**, p. 383.
64. MUÑOZ, L.F.; Plantas medicinales y aromáticas; estudio, cultivo, y procesado. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 4ª Ed, **2002**, pp. 175-179.
65. SKAL TSA, H.; SHAMMAS, G.; Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Medica*, **1998**, 54(5), pp. 465.
66. VALENTAO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; BASTOS, M.L.; Studies on the antioxidant activity of *lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid, *Biol. Pharm. Bull.*, **2002**, 25(10), pp. 1324-1327.
67. BILIA, A.R.; GIOMI, M.; INNOCENTI, M.; GALLORI, S.; VINCIERI, F.F.; HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, 46(3), pp. 463-470.
68. CASTAÑEDA, M.L; MUÑOZ, A.; MARTÍNEZ, J.R.; STASHENKO, E.E.; Estudio de la composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas Colombianas. *Scientia et Technica*, **2007**, 33, pp. 165-166.
69. DOMÍNGUEZ, X.A.; SÁNCHEZ, H.; SUÁREZ, M.; BALDAS, J.H.; GONZÁLEZ, M.R.; Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Medica*, **1989**, 55, pp. 208–209.

70. RASTRELLI, L.; CACERES, A.; MORALES, C.; DE SIMONE, F.; AQUINO, R.; Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry*, **1998**, 49, pp. 1829–1832.
71. LIN, L.Z.; MUKHOPADHYAY, S.; ROBBINS, R.J.; HARNLY, J.M.; Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis, *J. Food Comp. Anal.*, **2007**, 20, pp. 361–369.
72. MARTÍNEZ, A.; PUGA, R.; HERNÁNDEZ, L.H.; LOARCA, G.; MENDOZA, S.; Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth), *Plant Foods Hum. Nutr.*, **2008**, 63, pp. 1–5.
73. CAVERO, S.; GARCÍA-RISCO, M.R.; MARÍN, F.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; SEÑORÁNS, F.J.; REGLERO, G.; IBÁÑEZ, E.; Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano. Chemical and functional characterization via LC–MS and in vitro assays, *J. Supercrit. Fluids*, **2006**, 38, pp. 62-69.
74. BAYSAL, T.; ERSUS, S.; STARMANS, D.A.J.; Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of  $\beta$ -carotene and lycopene from tomato paste waste, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, pp. 5507-5511.
75. IBÁÑEZ, A.; OCA, A.; MURGA, G.; LÓPEZ, S.; TABERA, J.; REGLERO, G.; Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47(4), pp. 1400-1404.
76. MITRA, S.; Sample preparation techniques in analytical chemistry, New Jersey, EE.UU., **2003**, pp. 140-141.
77. WU, T.; ABDULLA, R.; ZHAO, Y.; YANG, Y.; CHEN, J.; AISA, H.; Simultaneous quantification of seven flavonoids in *Flos gossypii* by LC, *Chromatographia*, **2008**, 68, pp.467-470.

78. MATTILA,P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J.; Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, pp. 5834-5841.
79. KAKASY, A.; FÜZFAY, Z.; KURSINSZKI, L.; PERL, M.; LEMBERKOVICS, É.; Analysis of non-volatile constituents in *Dracocephalum* species by HPLC and GC-MS, *Chromatographia*, **2006**, 63, pp.S17–S22.
80. HE, X.; LIN, L.; LIAN, L.; Analysis of flavonoids from red clover by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 755, pp.127-132.
81. CROZIER, A.; JENSEN, E.; LEAN, M.; McDONALD, M.; Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 761, pp. 315-321.
82. DÍAZ, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.; Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, pp.2441-2469.
83. MARTÍNEZ, J.; Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds, CRC Press, Boca Ratón, EE.UU., **2008**, 367 p.
84. PEREIRA, C.; MEIRELES, A.; Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives, *Food Bioprocess Tech.*, **2010**, 3, pp. 340-372.
85. REVERCHON, E.; MARCO, I.; Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *J. Supercrit. Fluids*, **2006**, 38, pp.146-166.
86. CASTRO, H.I.; RODRÍGUEZ, L.I.; FERREIRA, S.R.; PARADA, F.A.; Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents, *J. Supercrit. Fluids*, **2010**, 51, pp.319-324.

87. YÉPEZ, B.; ESPINOZA, M.; LÓPEZ, S.; BOLAÑOS, G.; Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction, *Fluid Phase Equil.*, **2002**, 197, pp. 879-884.
88. MENDIOLA, J.A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F.J.; Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*, *Food Chem.*, **2007**, 102, pp. 1357-1367.
89. ZANCAN, K.C.; MARQUES, M.O.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.; Extraction of ginger (*Zingiber officinale* roscoe) oleoresin with CO<sub>2</sub> and co-solvents: a study of the antioxidant activity of the extracts, *J. Supercrit. Fluids*, **2002**, 24, pp. 57-76.
90. CARVALHO, R.N.; MOURA, L.S.; ROSA, P.; MEIRELES, A.A.; Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity, *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 35, pp. 197-204.
91. PIANTINO, C.R.; AQUINO, F.W.B.; FOLLEGATTI-ROMERO, L.A.; CABRAL, F.A.; Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*, *J. Supercrit. Fluids*, **2008**, 47(2), pp. 209-214.
92. MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R.; Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48(3), pp. 577-5799.
93. PERL, I.M.; FÜZFAI, Z.; Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1073, pp. 201-207.
94. RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEEN, W.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.; Analytical separation and detection methods for flavonoids, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1112, pp. 31-63.
95. FRANCISCO, M.L.; RESURRECCIÓN, A.V.; Development of reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) produced

- for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts, *Food Chem.*, **2009**, 117, pp. 356-363.
96. SPÁCIL, Z.; NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P.; Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography, *Talanta*, **2008**, 76, pp. 189–199.
  97. VOLPI, N.; BERGONZINI, G.; Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 42, pp. 354–361.
  98. LIU, X.; YANG, A. M.; SHI, Y. P.; Determination of flavonoids in tibetan herbal medicine of *Pyrethrum tatsienense* by HPLC with photodiode array detection, *J. Anal. Chem.*, **2008**, 63(5), pp. 472–476.
  99. CHEN, J.; LIU, Y.; SHI, Y. P.; Determination of flavonoids in the flowers of *Paulownia tomentosa* by high-performance liquid chromatography, *J. Anal. Chem.*, **2009**, 64(3), pp. 282–288.
  100. MATTILA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J.; Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode detection and electroarray detection, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48(12), pp. 5838-5481.
  101. OLSZEWSKA; M.; Separation of quercetin, sexangularetin, kaempferol and isorhamnetin for simultaneous HPLC determination of flavonoid aglycones in inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, 48, pp. 629-635.
  102. BEESLEY, T.E.; BUGLIO, B.; SCOTT, R.P.W; Quantitative chromatographic analysis, Marcel Dekker, Inc, New York, EE.UU., **2001**, capítulo 3.
  103. BLAU, K.; HALKET, J.; Handbook of derivates for chromatography, John Wiley & Sons, Chichester, England, **1993**, 357 p.
  104. DRUZD, J.; Chemical derivatization in gas chromatography; John Wiley & Sons, **1981**, New York, EE.UU., 223 p.

105. CLEMENT, R.E.; Gas chromatography: biochemical, biomedical and clinical applications, John Wiley & Sons, New York, EE.UU., **1990**, 385 p.
106. POOLE, C.F.; POLE, S.K.; Chromatography today, Elsevier, Amsterdam, **1991**, pp. 752-763.
107. AFT, H.; Chemistry of dihydroquercetin. I. Acetate derivatives, *J. Org. Chem.*, **1961**, 26(6), pp. 1958-1963.
108. DENG, F.; ZITO, S. W.; Development and validation of a gas chromatographic–mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in *Ginkgo biloba* L. extract and pharmaceutical preparations, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 986, pp. 121-127.
109. WATSON, D. G.; OLIVEIRA, E. J.; Solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine after consumption of *Ginkgo biloba* tablets, *J. Chromatogr. B*, **1999**, 723, pp. 203-210.
110. OLEAS, G. J.; YAN, J.; GOLDBERG, D. M.; Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection, *J. Chromatogr. B*, **2001**, 757, pp. 167-172.
111. SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; KARUMANCHIRI, A.; GOLDBERG, D.M.; A multiresidue derivatization gas chromatographic assay for fifteen phenolic constituents with mass selective detection, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, pp. 4405-4409.
112. GOMM, A.S.; NIERENSTEIN, M.; The exhaustive o-methylation of quercetin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1931**, 53(12), pp. 4408-4411.
113. HERGERT, H.L.; COAD, P.; LOGAN, A.V.; The methylation of dihydroquercetin, *J. Org. Chem.*, **1956**, 21(3), pp. 304-310.

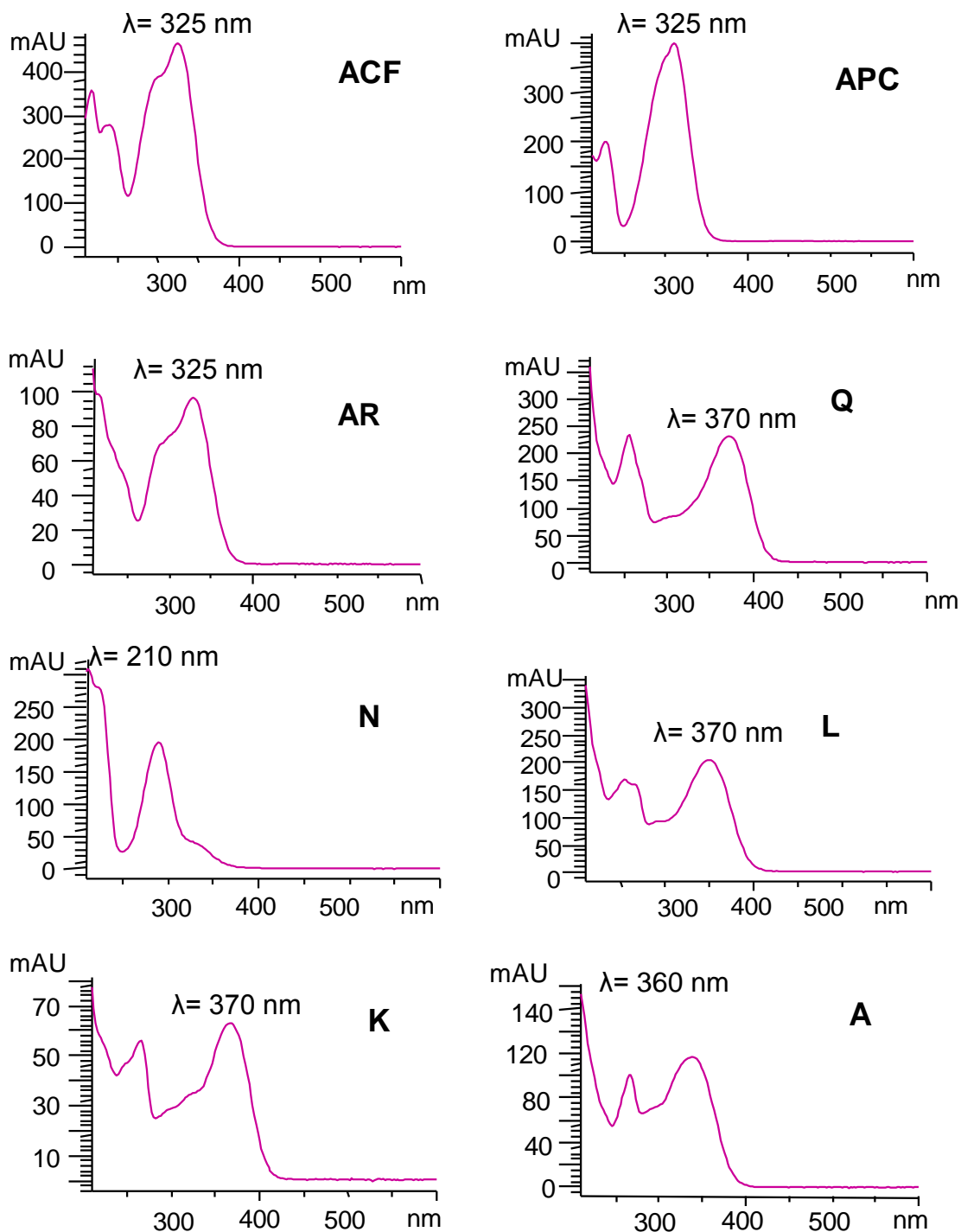
114. FORSYTH, W.G.; ROBERTS, J.B.; Cacao polyphenolics substances, *Biochem. J.*, **1959**, 74, pp.354-378.
115. SURYAPRAKASA; P.; PRABHAKARA, P.; Methylation of hydroxy flavonols using methyl iodide and potassium carbonate, *Proc. Math. Sci.*, **1940**, 12(6), pp. 495-497.
116. RIPPEY, J.C.; STALLWOOD, M.I.; Nine cases of accidental exposure to dimethyl sulphate –a potential chemical weapon, *Emerg. Med. J.*, **2005**, 22, pp. 878-879.
117. SHETTEGEN, T.; BRODING, H.C.; ANGERER, J.; DREXLER, H.; Dimethyl sulphate; a hidden problem in occupational medicine, *Occup. Environ. Med.*, **2004**, 61, pp. 73-75.
118. TUNDO, P.; New developments in dimethyl carbonate chemistry, *Pure Appl. Chem.*, **2001**, 73(7), pp. 1117-1124.
119. ONO, Y.; Dimethyl carbonate for environmentally benign reactions, *Pure & Appl. Chem.*, **1996**, 68(2), pp. 367-375.
120. TUNDO, P.; SELVA, M.; The Chemistry of dimethyl carbonate, *Acc. Chem. Res.*, **2002**, 35, pp. 706-717.
121. TUNDO, P. ROSSI, L.; LORIS, A.; Dimethyl carbonate as an ambident electrophile, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, pp. 2219-2224.
122. ROSSI, J.P.; DELFINO, J.M.; Cienciometría, instrumentos de evaluación y crítica. Revista *Ciencia hoy en línea*. Universidad de Buenos Aires, **2005**. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy89/cienciometria.htm>. Acceso el 13 de diciembre de 2009.
123. ARAÚJO, J.A.R.; ARENCIBIA, R.J.; Informetría, biblioteca y cienciometría: aspectos teórico-prácticos. **2002**. [Sitio en Internet]. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol10\\_4\\_02/aci040402.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol10_4_02/aci040402.htm). Acceso el 13 de diciembre de 2009.
124. SWART, M.; KRULL, I.; Analytical method development and validation. Ed. Marcel Dekker, New York, **1997**. 92 p.

125. MILLER, J.; MILLER, J.; Estadística para química analítica. 2ª Ed. Wilmington, Addison-Wesley Iberoamerican, **1993**, pp. 100-103.
126. HERTOGE, M.G.; HOLLMAN, P.C.; VENEMA, D.P.; Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoides in vegetables and fruits, *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, pp. 1591-1598.
127. QUATTROCCHI, O.; ANDRIZZI, S.; LABA, R.; Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Ed. Artes Gráficas Farro. Argentina, **1992**, pp-280-329.
128. SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; GLAJCH, J.; Practical HPLC method development. 2ª Ed. Ed. Wiley. New York, **1997**, pp. 21-57.
129. MEYER, V.; Pitfalls and errors of HPLC in pictures. 2ª Ed. Ed. Wiley. Alemania,. **2006**, pp. 22-28.
130. PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, E.; 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, pp. 1190-1195.
131. ATEF, A.; HUSSEIN, A.; TAGHREED, A.; Comparative study of the flavonoides of some *Verbena* species cultivated in Egypt by using high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217, pp. 6388-6393.

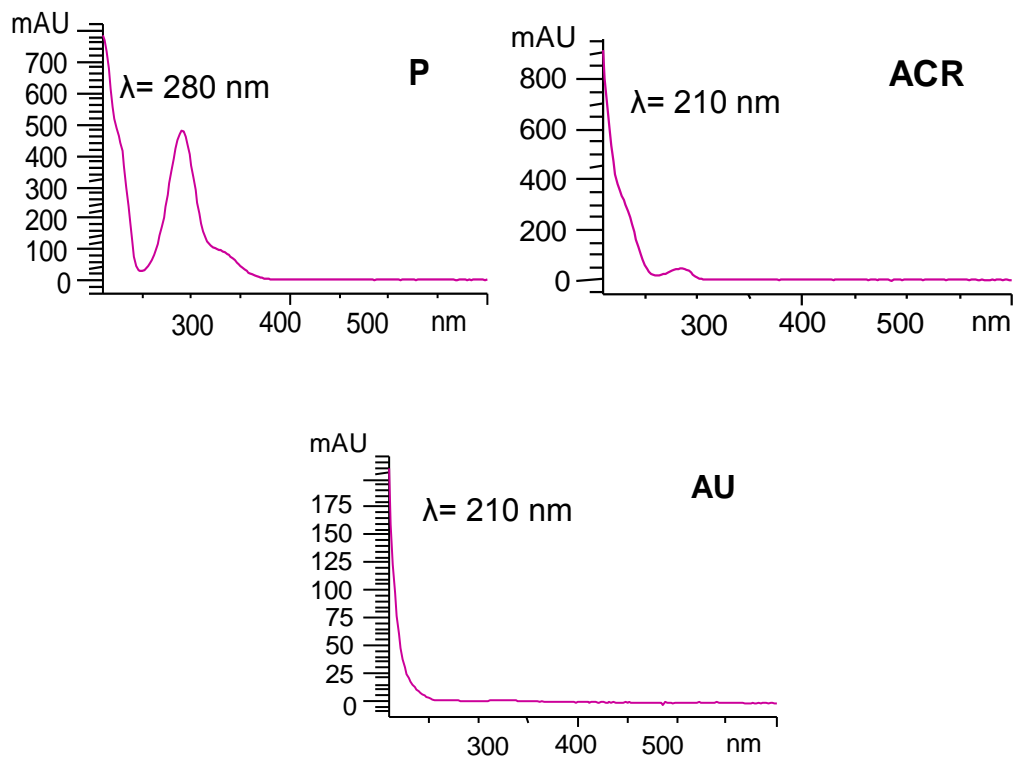
## **ANEXOS**

**ANEXO 1.** Espectros UV-Vis de los compuestos fenólicos.

**Figura 1-1.** Espectros UV-Vis de los compuestos fenólicos.



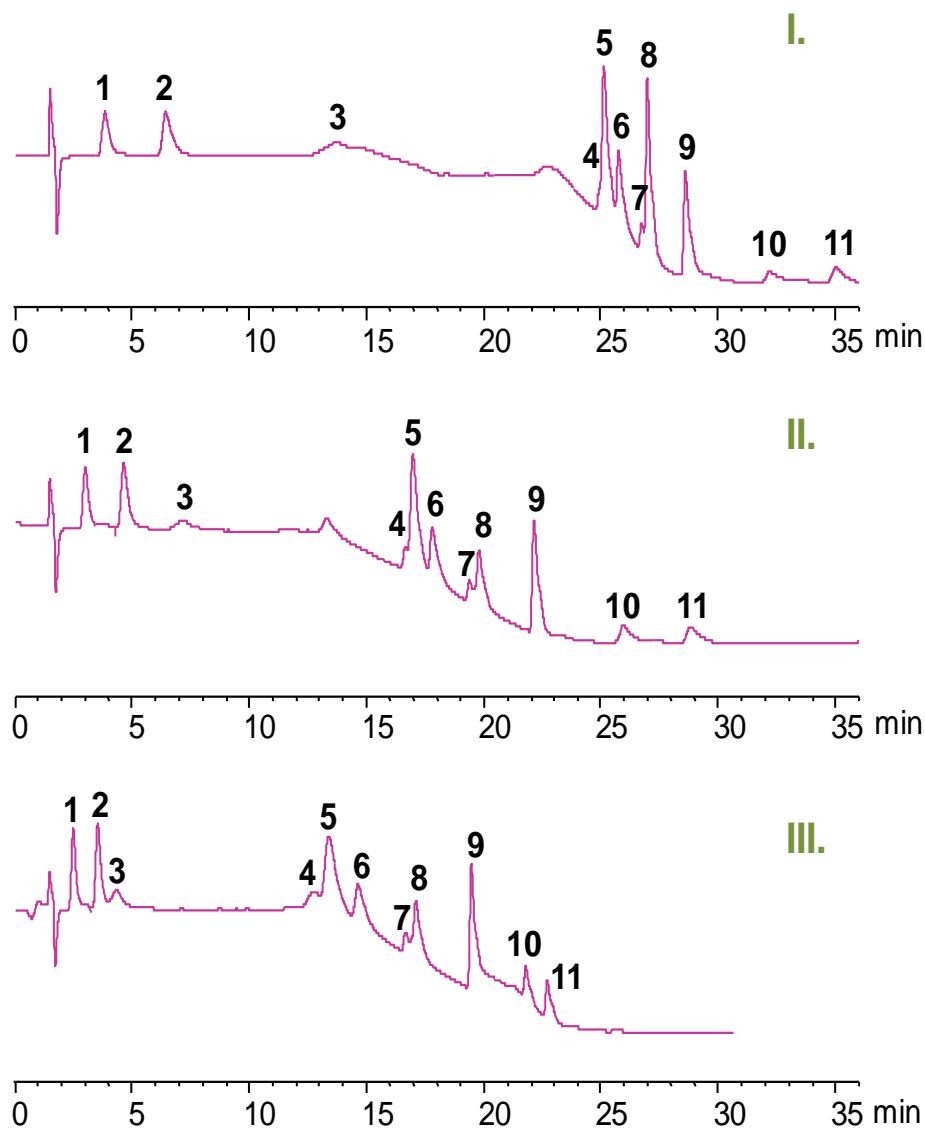
**Figura 1-1.** Continuación.



**ACF:** ácido caféico; **ACR:** ácido carnósico; **AU:** ácido ursólico; **APC:** ácido *p*-cumárico; **AR:** ácido rosmarínico; **Q:** quercetina; **N:** naringenina; **L:** luteolina; **K:** kaempferol; **A:** apigenina; **P:** pinocembrina

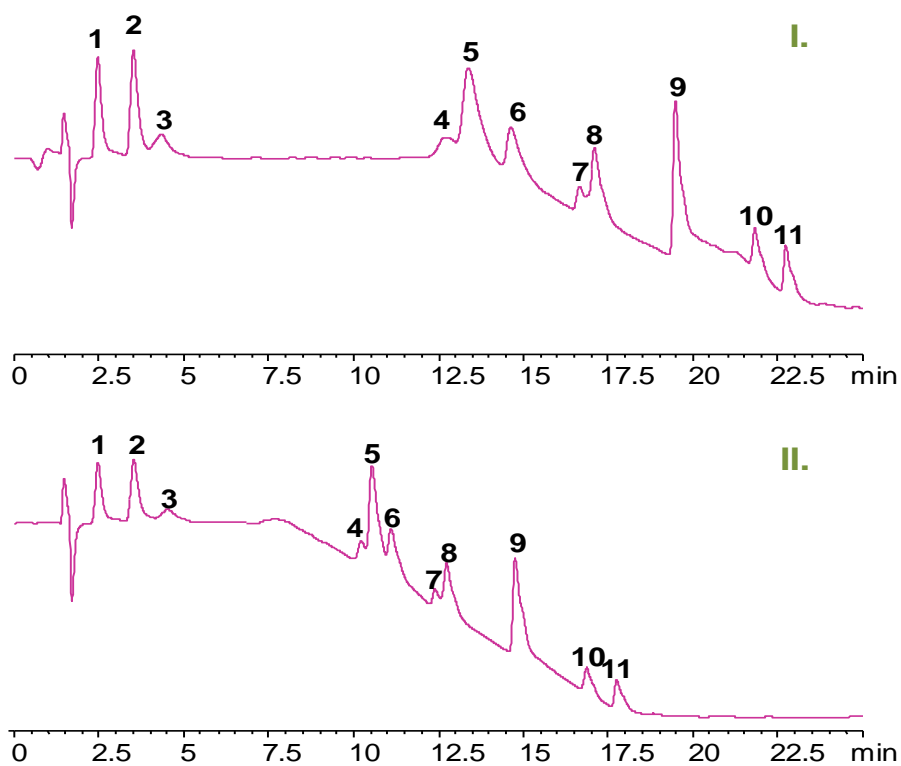
**ANEXO 2.** Perfiles cromatográficos de los compuestos fenólicos obtenidos durante la implementación de la metodología de análisis por HPLC.

**Figura 2-1.** Variación del gradiente de elución empleando como fase móvil ácido acético (0.1%) y metanol en diferentes proporciones.



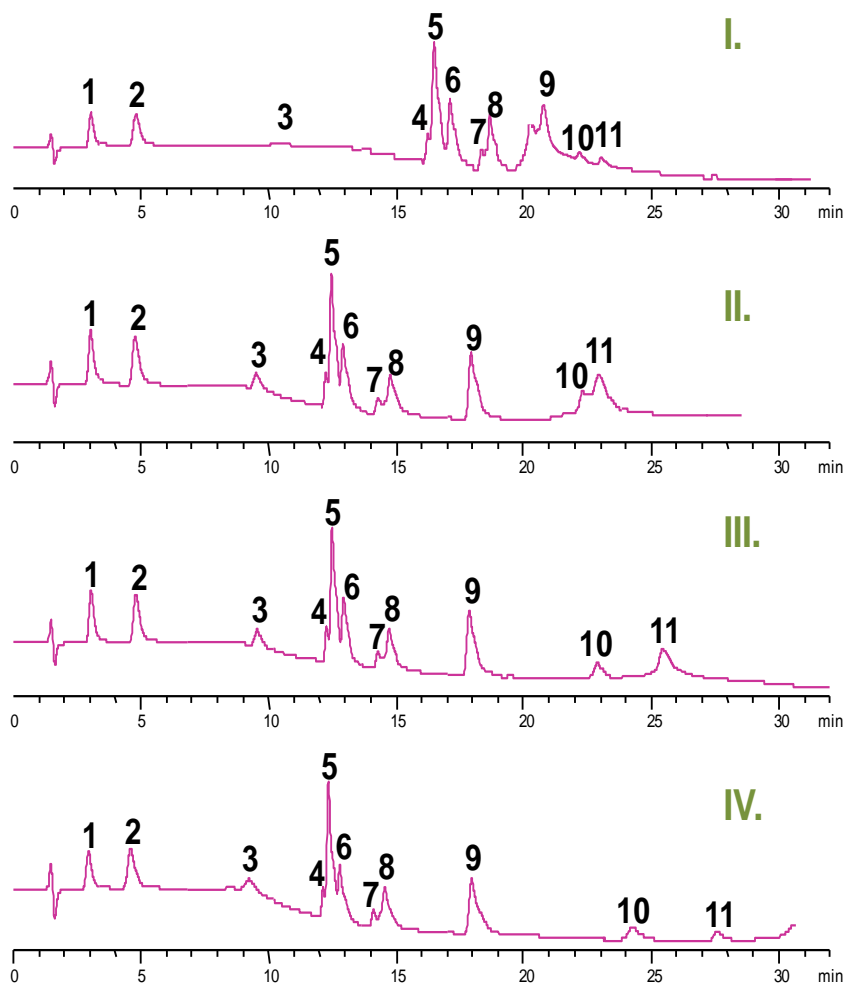
Cromatogramas típicos de compuestos fenólicos patrón, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil: 0,1% de ácido acético en agua (A), metanol (B); temperatura: 25 °C; flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 210 nm. **I.** 0-12 min: 35% B, 15 min: 40% B, 15-20 min: 40% B, 25 min: 70% B, 25-35 min: 70% B; **II.** 0-10 min: 40% B, 20 min: 70% B, 20-35 min: 70% B; **III.** 0-10 min: 45% B, 20 min: 80% B, 20-30 min: 80% B; **1.** ACF, **2.** APC, **3.** AR, **4.** Q, **5.** N, **6.** L, **7.** K, **8.** A, **9.** P, **10.** ACR, **11.** AU.

**Figura 2-2.** Variación del porcentaje de ácido acético en la fase móvil.



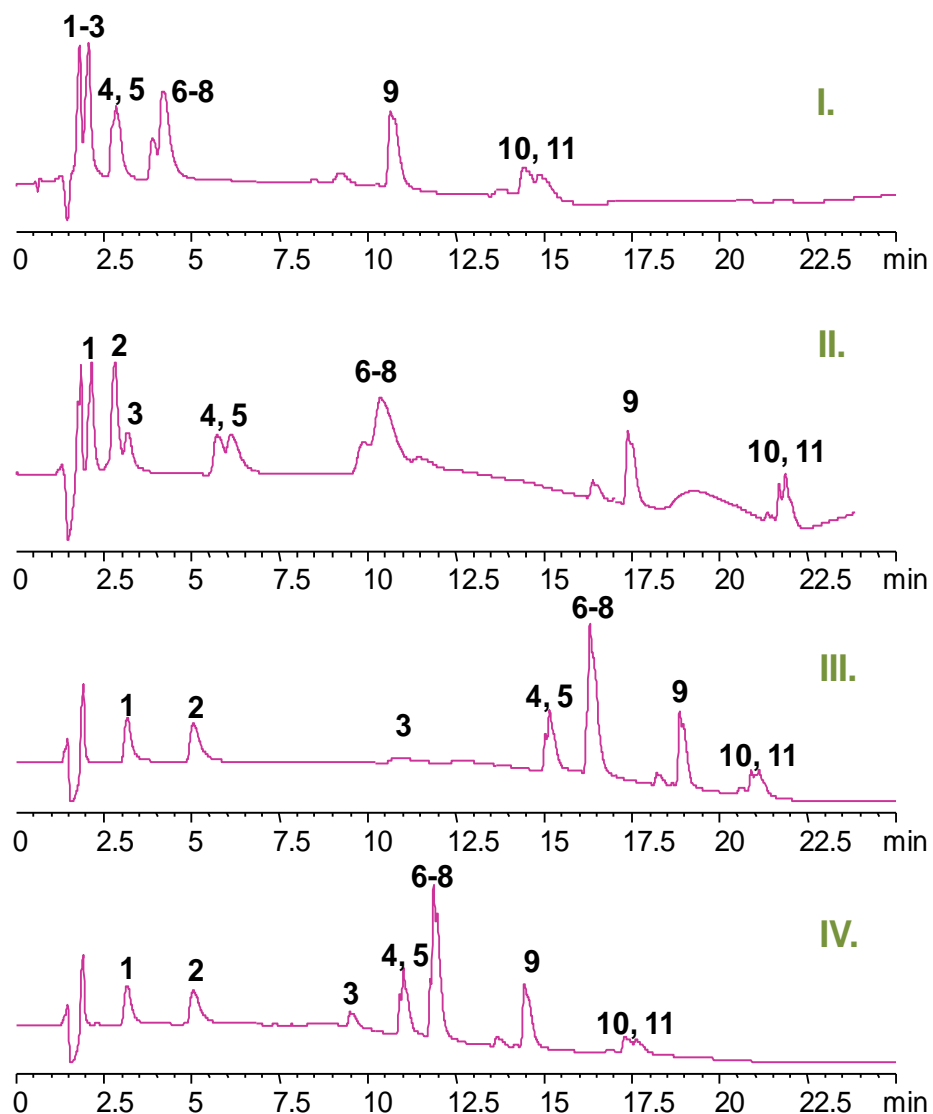
Cromatogramas típicos de compuestos fenólicos patrón, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil: ácido acético en agua (A), metanol (B); gradiente de elución: 0-10 min: 45% B, 20 min: 80% B, 20-30 min: 80% B; temperatura: 25 °C; flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 210 nm. **I.** 0,1% de ácido acético, **II.** 0,2% de ácido acético; **1.** ACF, **2.** APC, **3.** AR, **4.** Q, **5.** N, **6.** L, **7.** K, **8.** A, **9.** P, **10.** ACR, **11.** AU.

**Figura 2-3.** Variación gradiente de elución como fase móvil TFA (0.1%) y metanol en diferentes proporciones.



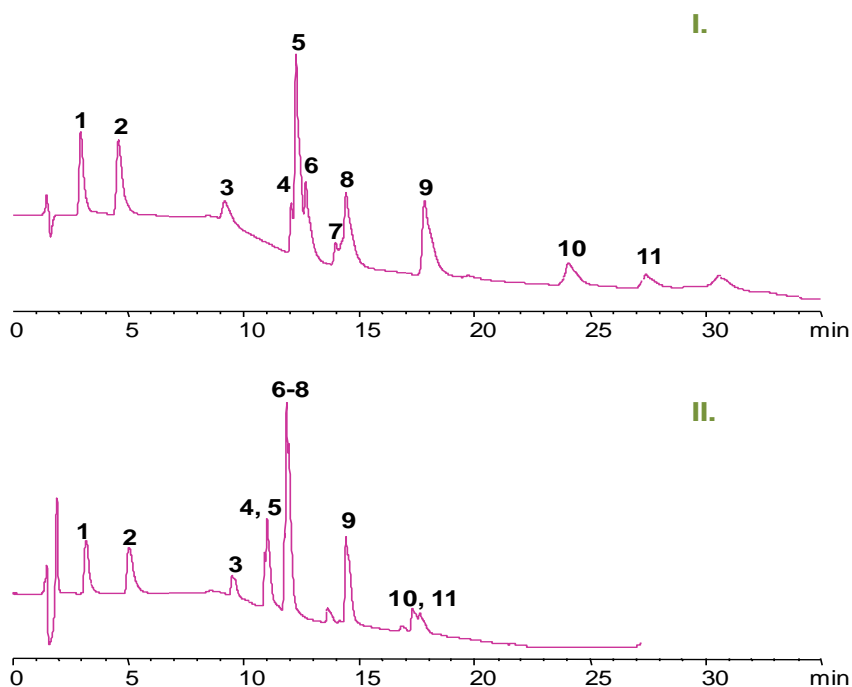
Cromatogramas típicos de compuestos fenólicos patrón, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil: 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (A), metanol (B); temperatura: 25 °C; flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 210 nm. **I.** 0-10 min: 40% B, 20 min: 80% B, 20-30 min: 80% B; **II.** 0-6 min: 40% B, 10 min: 60% B, 10-12 min: 60% B, 25 min: 80% B, 25-30 min: 80% B; **III.** 0-6 min: 40% B, 10 min: 60% B, 10-11 min: 60% B, 20 min: 70% B, 20-21 min: 70% B, 28 min: 80% B, 28-35 min: 80% B; **IV.** 0-6 min: 40% B, 10 min: 60% B, 10-11 min: 60% B, 25 min: 70% B, 25-26 min: 70% B, 33 min: 80 % B, 33-35 min: 80% B; **1.** ACF, **2.** APC, **3.** AR, **4.** Q, **5.** N, **6.** L, **7.** K, **8.** A, **9.** P, **10.** ACR, **11.** AU.

**Figura 2-4.** Variación del gradiente de elución empleando como fase móvil TFA (0.1%) y acetonitrilo en diferentes proporciones.



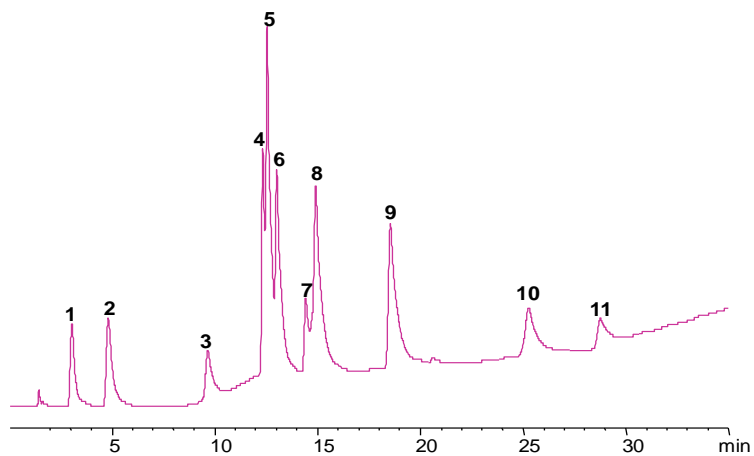
Cromatogramas típicos de compuestos fenólicos patrón, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil: 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (A), acetonitrilo (B); temperatura: 25 °C; flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 210 nm. **I.** 0-6 min: 40% B, 10 min: 60% B, 10-11 min: 60% B, 20 min: 70% B, 20-21 min: 70% B, 28 min: 80% B, 28-35 min: 80% B; **II.** 0-10min: 30% B, 20 min: 80% B, 20-25 min: 80% B; **III.** 0-10 min: 30% B, 20 min: 80% B, 20-25 min: 80% B; **IV.** 0-6 min: 20% B, 10 min: 50% B, 10-20 min: 80% B, 20-25 min: 80% B; **1.** ACF, **2.** APC, **3.** AR, **4.** Q, **5.** N, **6.** L, **7.** K, **8.** A, **9.** P, **10.** ACR, **11.** AU.

**Figura 2-5.** Variación del modificador orgánico empleando TFA (0,1%) como fase móvil.



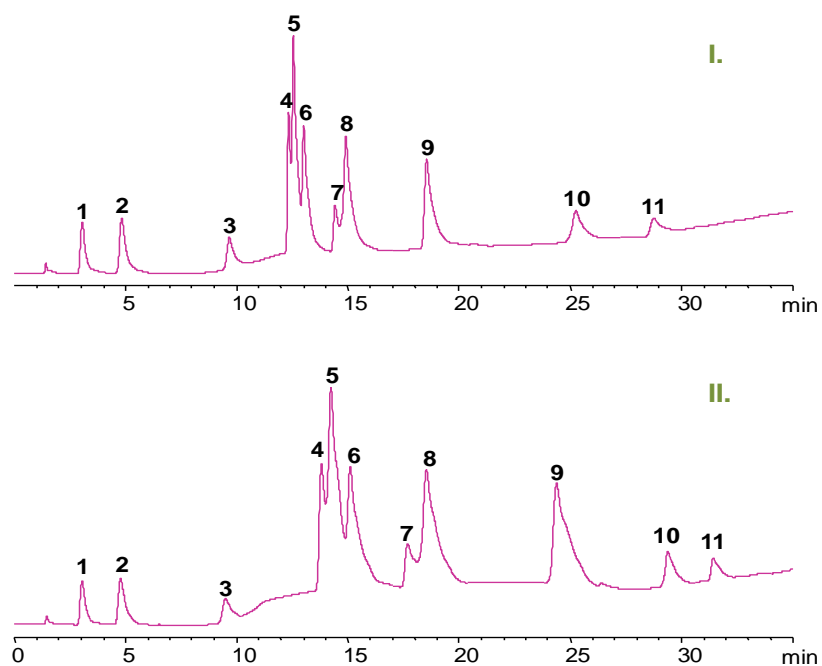
Cromatogramas típicos de compuestos fenólicos patrón, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Longitud de onda: 210 nm. **I.** Fase móvil: 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (A), metanol (B); temperatura: 25 °C; flujo: 1 mL/min; gradiente de elución: 0-6 min: 40% B, 10 min: 60% B, 10-11 min: 60% B, 25 min: 70% B, 25-26 min: 70% B, 33 min: 80 % B, 33-35 min: 80% B; **II.** Fase móvil: 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (A), acetonitrilo (B); temperatura: 25 °C; flujo: 1 mL/min; gradiente de elución: 0-6 min: 20% B, 10 min: 50% B, 10-20 min: 80% B, 20-25 min: 80% B; **1.** ACF, **2.** APC, **3.** AR, **4.** Q, **5.** N, **6.** L, **7.** K, **8.** A, **9.** P, **10.** ACR, **11.** AU.

**Figura 2-6.** Uso de ácido fosfórico en la fase móvil con metanol.



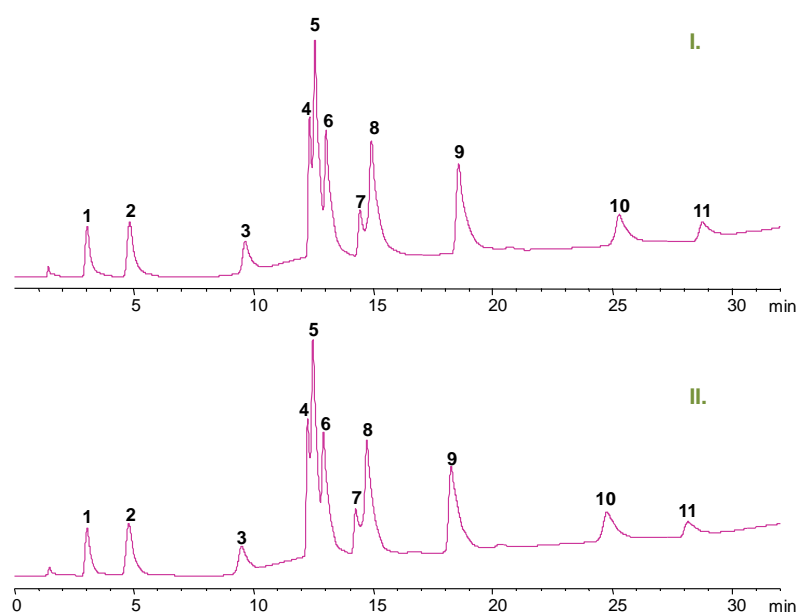
Cromatograma típico de compuestos fenólicos patrón, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil: 0,1% de ácido fosfórico en agua (A), metanol (B); temperatura: 25 °C; flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 210 nm; gradiente de elución: 0-6 min: 40% B, 10 min: 60% B, 10-11 min: 60% B, 25 min: 70% B, 25-26 min: 70% B, 33 min: 80% B, 33-35 min: 80% B; **1.** ACF, **2.** APC, **3.** AR, **4.** Q, **5.** N, **6.** L, **7.** K, **8.** A, **9.** P, **10.** ACR, **11.** AU.

**Figura 2-7.** Variación del flujo de la fase móvil.



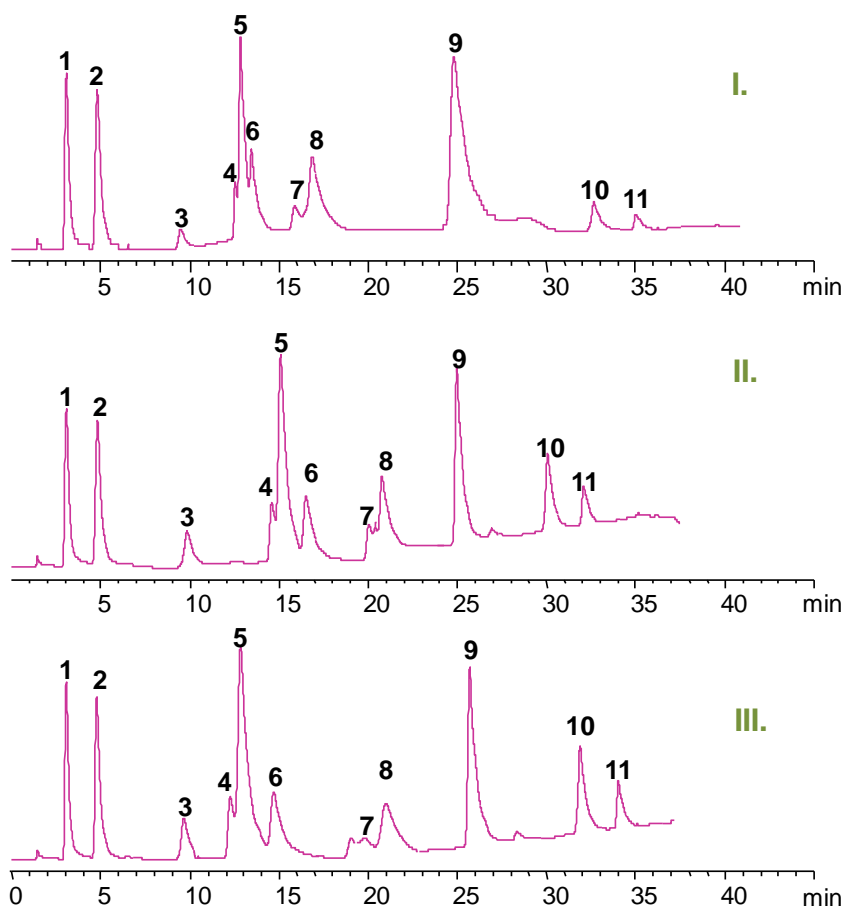
Cromatogramas típicos de compuestos fenólicos patrón, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil: 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (A), metanol (B); temperatura: 25 °C; longitud de onda: 210 nm; gradiente de elución: 0-6 min: 40% B, 10 min: 60% B, 10-11 min: 60% B, 25 min: 70% B, 25-26 min: 70% B, 33 min: 80% B, 33-35 min: 80% B; **I.** Flujo constante: 1 mL/min, **II.** Flujo variable: 0-10 min: 1 mL/min, 10-25 min: 0,5 mL/min, 25-35 min: 1 mL/min; **1.** ACF, **2.** APC, **3.** AR, **4.** Q, **5.** N, **6.** L, **7.** K, **8.** A, **9.** P, **10.** ACR, **11.** AU.

**Figura 2-8.** Efecto del uso del ácido *o*-fosfórico en el modificador orgánico.



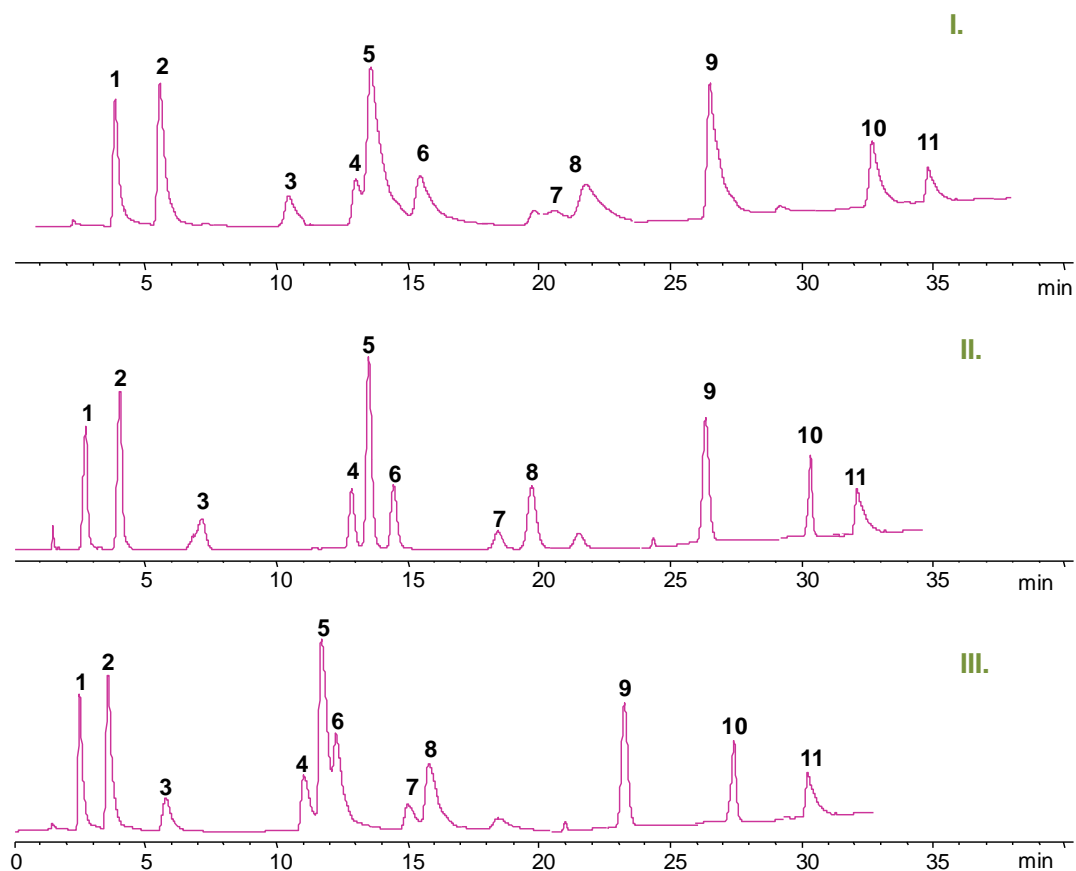
Cromatogramas típicos de compuestos fenólicos patrón, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Flujo: 1 mL/min; temperatura: 25 °C; longitud de onda: 210 nm; gradiente de elución: 0-6 min: 40% B, 10 min: 60% B, 10-11 min: 60% B, 25 min: 70% B, 25-26 min: 70% B, 33 min: 80% B, 33-35 min: 80% B; **I.** Fase móvil: 0,1% de ácido *o*-fosfórico en agua (A), metanol (B), **II.** Fase móvil: 0,1% de ácido *o*-fosfórico en agua (A), 0,1% de ácido *o*-fosfórico en metanol (B); **1.** ACF, **2.** APC, **3.** AR, **4.** Q, **5.** N, **6.** L, **7.** K, **8.** A, **9.** P, **10.** ACR, **11.** AU.

**Figura 2-9.** Variación del gradiente de elución de la fase móvil.



Cromatogramas típicos de compuestos fenólicos patrón, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil: 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (A), metanol (B); temperatura: 25 °C; flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 210 nm; gradiente de elución: **I.** 0-6 min: 40% B, 10 min: 60% B, 10-15 min: 60% B, 19 min: 70% B, 19-20 min: 70% B, 37 min: 100%B, 37-40 min: 100% B; **II.** 0-6 min: 40% B, 10 min: 50% B, 10-15 min: 50% B, 20 min: 60% B, 33 min: 100% B, 33-35 min: 80% B, **III.** 0-6 min: 40% B, 10 min: 48% B, 10-23 min: 48% B, 30 min: 100% B, 30-40 min 100% B; **1.** ACF, **2.** APC, **3.** AR, **4.** Q, **5.** N, **6.** L, **7.** K, **8.** A, **9.** P, **10.** ACR, **11.** AU.

**Figura 2-10.** Variación de la temperatura



Cromatogramas típicos de compuestos fenólicos patrón, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil: 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (A), metanol (B); flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 210 nm; gradiente de elución: 0-6 min: 40% B, 10 min: 48% B, 10-23 min: 48% B, 30 min: 100% B, 30-40 min 100% B; temperatura: I. 25 °C, II. 35 °C, III. 45 °C; 1. ACF, 2. APC, 3. AR, 4. Q, 5. N, 6. L, 7. K, 8. A, 9. P, 10. ACR, 11. AU.

**ANEXO 3.** Resolución,  $R_s$ , de los compuestos fenólicos obtenida durante la implementación de la metodología de análisis por HPLC.

**Tabla 3-1.** Resolución,  $R_s$ , de los compuestos fenólicos obtenida durante la implementación de la metodología de análisis por HPLC.

Señales	Ensayo	Resolución, $R_s$									
		Fig. 2-1	Fig. 2-2	Fig. 2-3	Fig. 2-4	Fig. 2-5	Fig. 2-6	Fig. 2-7	Fig. 2-8	Fig. 2-9	Fig. 2-10
2-1	I.	4,3	2,9	4,2	NC <sup>a</sup>	3,6	4,3	4,3	4,3	4,1	4,3
	II.	3,6	2,9	4,0	1,53	5,2	-	4,31	3,7	4,1	4,78
	III.	2,9	-	4,3	5,34	-	-	-	-	4,3	3,56
	IV.	-	-	3,6	5,2	-	-	-	-	-	-
3-2	I.	6,7	1,4	10,0	NC	8,13	9,53	9,53	9,53	8,16	8,21
	II.	3,3	1,5	9,7	1,32	4,19	-	9,58	7,49	8,78	6,61
	III.	1,5	-	7,5	4,5	-	-	-	-	8,21	4,86
	IV.	-	-	8,1	4,19	-	-	-	-	-	-
4-3	I.	13,4	9,5	9,2	NC	6,29	6,55	6,55	6,55	6,14	6,66
	II.	13,1	9,5	7,4	2,2	1,88	-	6,14	7,74	6,77	10,49
	III.	9,5	-	7,4	7,38	-	-	-	-	6,66	9,08
	IV.	-	-	6,2	1,88	-	-	-	-	-	-
5-4	I.	0,4	0,6	0,7	NC	0,75	0,75	0,75	0,75	0,11	0,64
	II.	0,6	0,8	0,4	0,89	0,65	-	0,6	0,65	0,65	1,85
	III.	0,8	-	0,7	0,06	-	-	-	-	0,64	1,12
	IV.	-	-	0,7	0,65	-	-	-	-	-	-

**Tabla 3-1.** Continuación.

6-5	I.	1,1	1,4	1,4	NC	1,03	1,26	1,36	1,36	1,36	1,83
	II.	1,2	1,1	1,2	NC	NC	-	1	1	1,66	3,25
	III.	1,4	-	1,2	NC	-	-	-	-	1,83	0,91
	IV.	-	-	1,0	NC	-	-	-	-	-	-
7-6	I.	2,8	2,7	3,3	NC	3,04	3,11	3,11	3,11	2,85	5,24
	II.	3,0	3,1	3,3	NC	NC	-	2,79	2,81	4,86	5,29
	III.	3,1	-	3,0	NC	-	-	-	-	5,24	3,96
	IV.	-	-	3,0	NC	-	-	-	-	-	-
8-7	I.	0,8	0,8	0,8	NC	1,09	1,03	1,03	1,03	0,91	1,3
	II.	0,8	0,8	0,8	NC	NC	-	0,89	0,85	1,19	2,8
	III.	0,8	-	0,9	NC	-	-	-	-	1,3	1,04
	IV.	-	-	1,0	NC	-	-	-	-	-	-
9-8	I.	4,5	5,4	4,4	9,2	5,83	6,63	6,63	6,63	7,49	5,98
	II.	5,4	4,6	5,2	8,92	3,32	-	5,88	5,34	5,94	9,52
	III.	5,4	-	5,7	4,13	-	-	-	-	5,98	9,32
	IV.	-	-	5,8	3,32	-	-	-	-	-	-
10-9	I.	4,8	4,7	1,8	9,07	4,88	9,41	9,41	9,41	8,67	9,08
	II.	6,2	4,2	5,3	7,57	6,33	-	12,27	5,27	7,94	12,26
	III.	4,7	-	6,4	2,74	-	-	-	-	9,08	10,06
	IV.	-	-	4,8	6,33	-	-	-	-	-	-

**Tabla 3-1.** Continuación.

11-10	<b>I.</b>	4,7	1,8	4,3	0,66	3,28	3,8	3,8	3,8	3,34	3,48
	<b>II.</b>	3,2	2,0	1,3	0,8	0,65	-	0,43	2,93	3,21	5,84
	<b>III.</b>	1,8	-	3,2	0,98	-	-	-	-	3,48	3,03
	<b>IV.</b>	-	-	3,5	0,65	-	-	-	-	-	-

NC: Rs no calculada (Las señales cromatográficas no se diferencian, co-elución de analitos).

**ANEXO 4.** Curvas de calibración de los compuestos fenólicos bajo estudio  
obtenidas por HPLC-DAD.

**Figura 4-1.** Curvas de calibración de los compuestos fenólicos por HPLC.

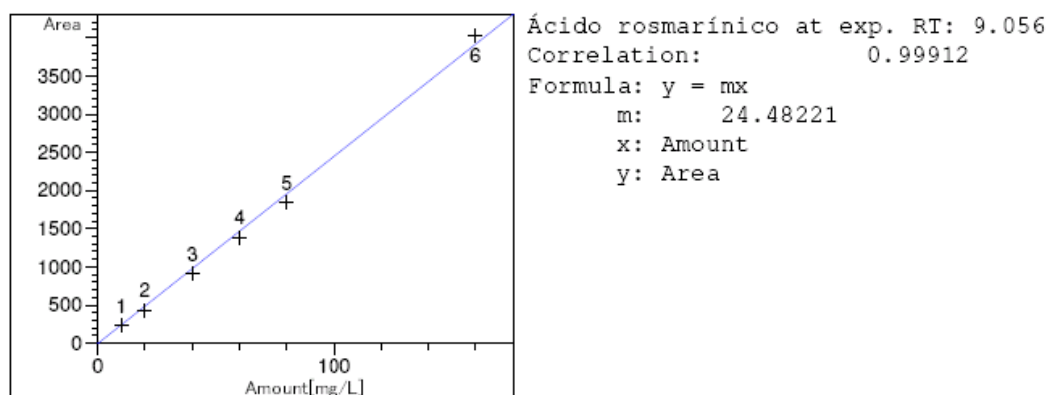
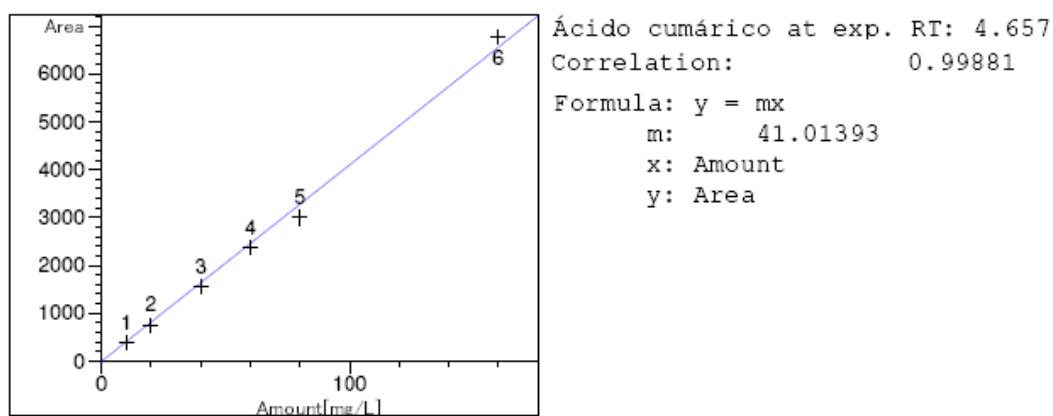
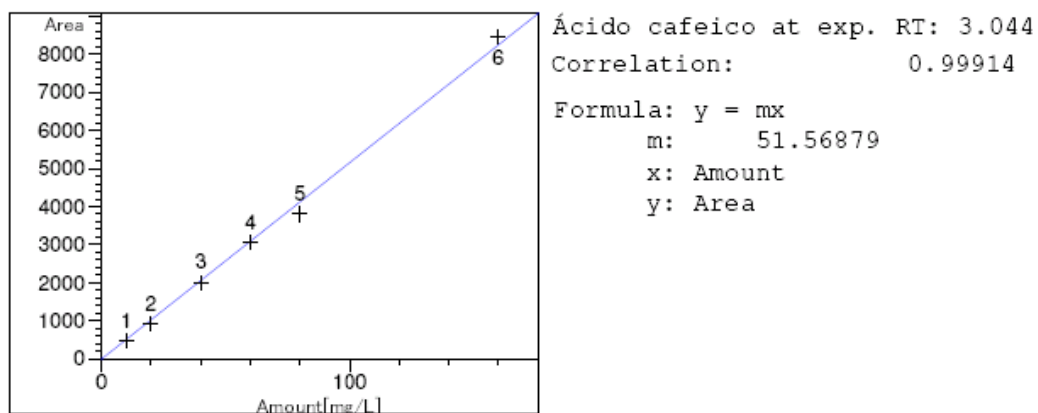
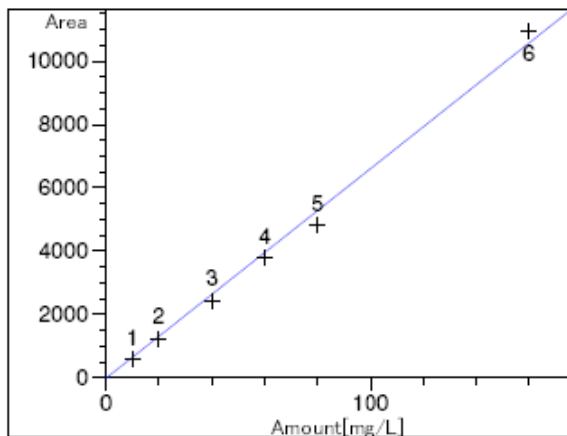
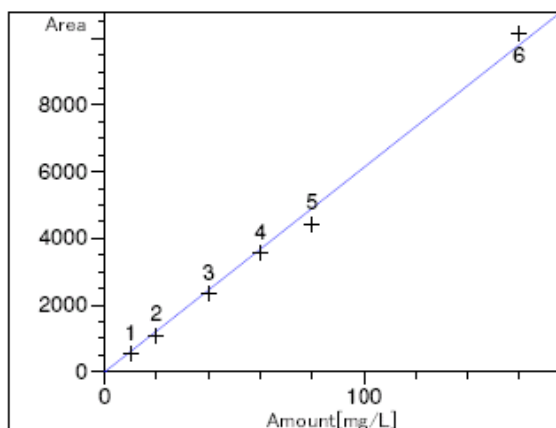


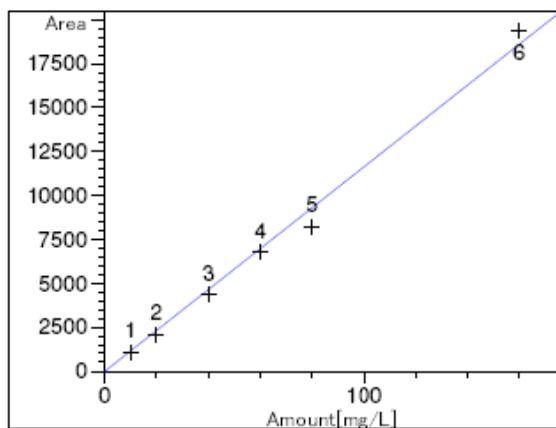
Figura 4-1. Continuación.



Quercetina at exp. RT: 14.609  
Correlation: 0.99865  
Formula:  $y = mx$   
m: 66.15363  
x: Amount  
y: Area

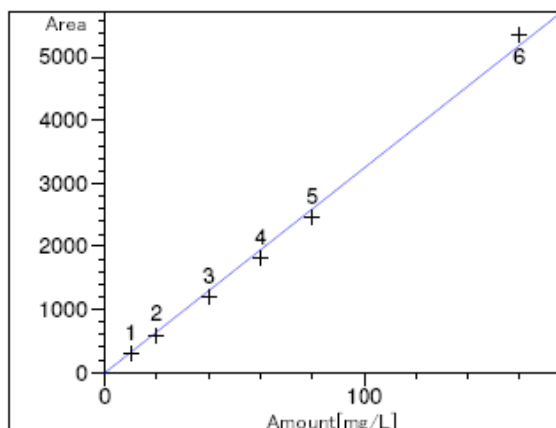


Naringenina at exp. RT: 15.138  
Correlation: 0.99864  
Formula:  $y = mx$   
m: 61.31218  
x: Amount  
y: Area

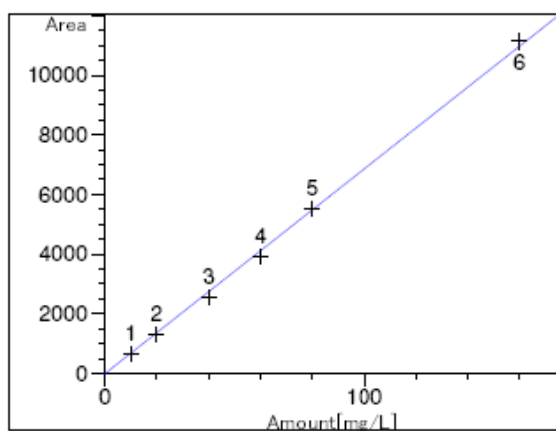


Luteolina at exp. RT: 16.849  
Correlation: 0.99820  
Formula:  $y = mx$   
m: 116.45718  
x: Amount  
y: Area

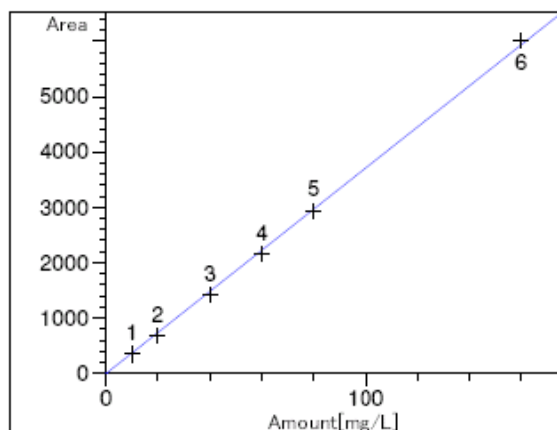
Figura 4-1. Continuación.



Kaempferol at exp. RT: 21.886  
Correlation: 0.99911  
Formula:  $y = mx$   
m: 32.50225  
x: Amount  
y: Area

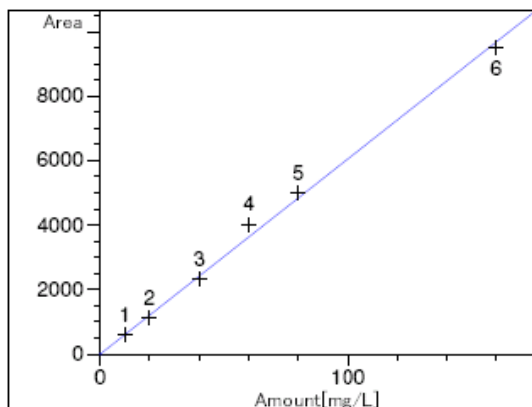


Apigenina at exp. RT: 23.835  
Correlation: 0.99964  
Formula:  $y = mx$   
m: 68.65285  
x: Amount  
y: Area

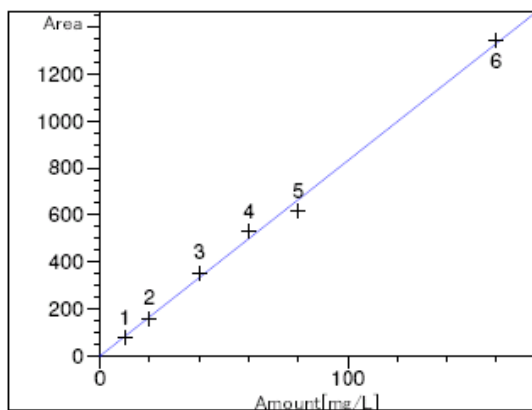


Pinocembrina at exp. RT: 28.493  
Correlation: 0.99980  
Formula:  $y = mx$   
m: 37.15356  
x: Amount  
y: Area

Figura 4-1. Continuación.



Ácido carnósico at exp. RT: 31.865  
Correlation: 0.99920  
Formula:  $y = mx$   
m: 60.54312  
x: Amount  
y: Area



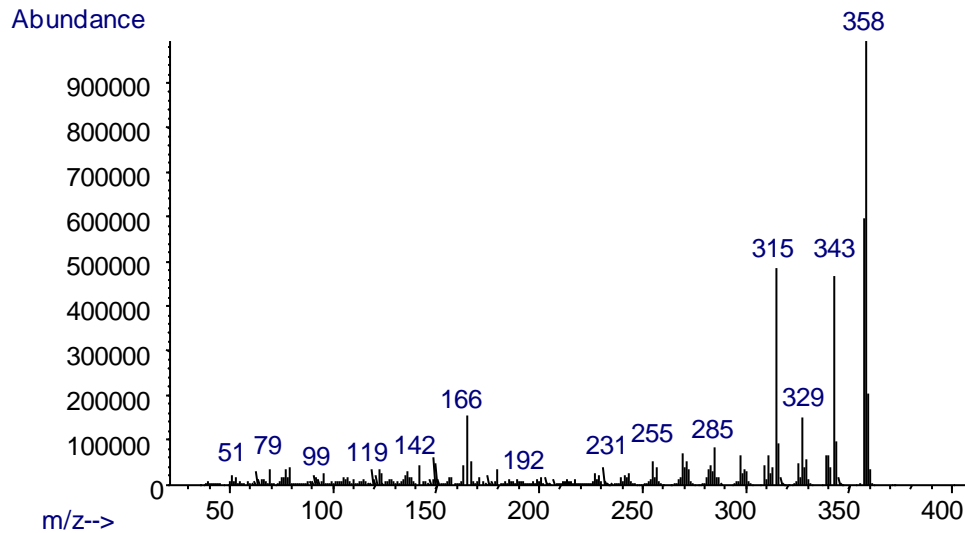
Ácido Ursólico at exp. RT: 33.059  
Correlation: 0.99922  
Formula:  $y = mx$   
m: 8.32966  
x: Amount  
y: Area

**ANEXO 5.** Espectros de masas y rutas de fragmentación de los derivados metilados de los compuestos fenólicos bajo estudio.

**Anexo 5.1** Espectros de masas de los derivados metilados de la serie de los flavonoides.

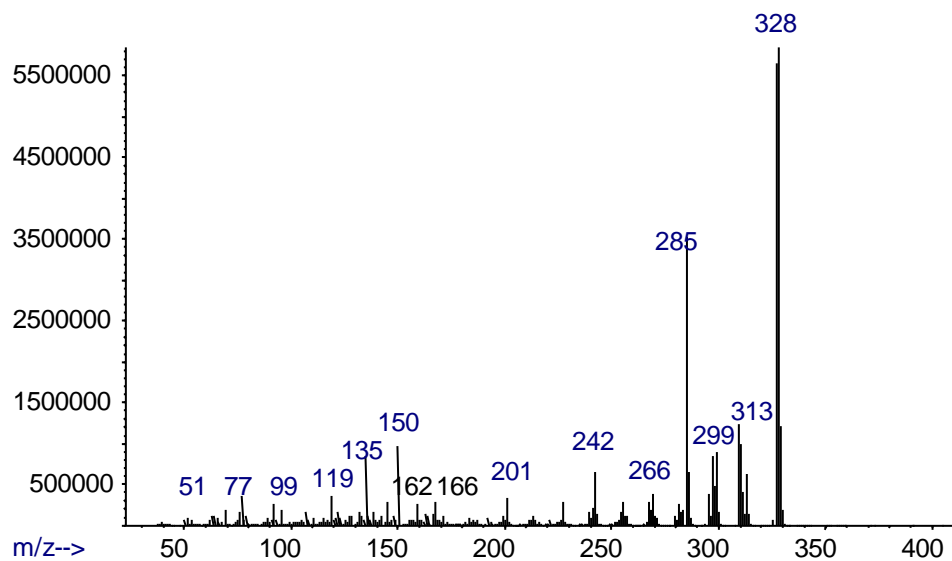
**Figura 5-1-1.** Espectro de masas del derivado metilado de quercetina.

**TMQ:** tetrametil-quercetina



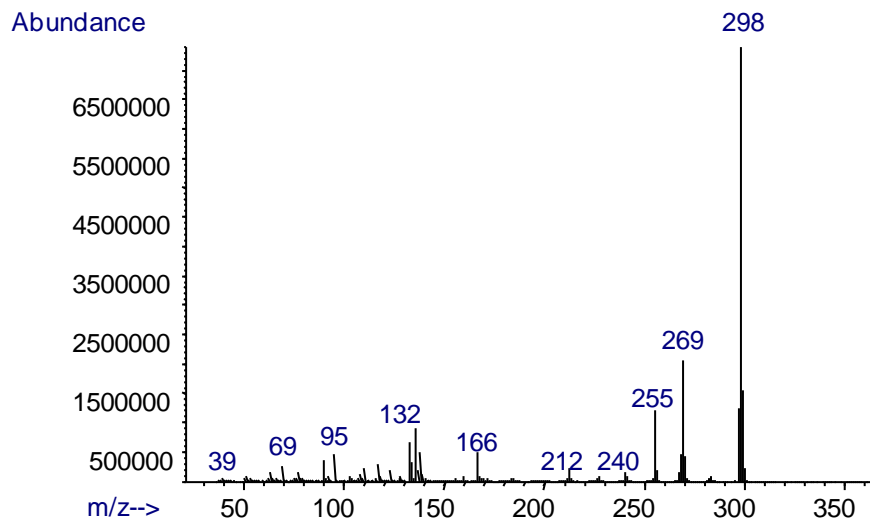
**Figura 5-1-2.** Espectro de masas del derivado metilado del kaempferol.

**TRMK:** trimetil-kaempferol

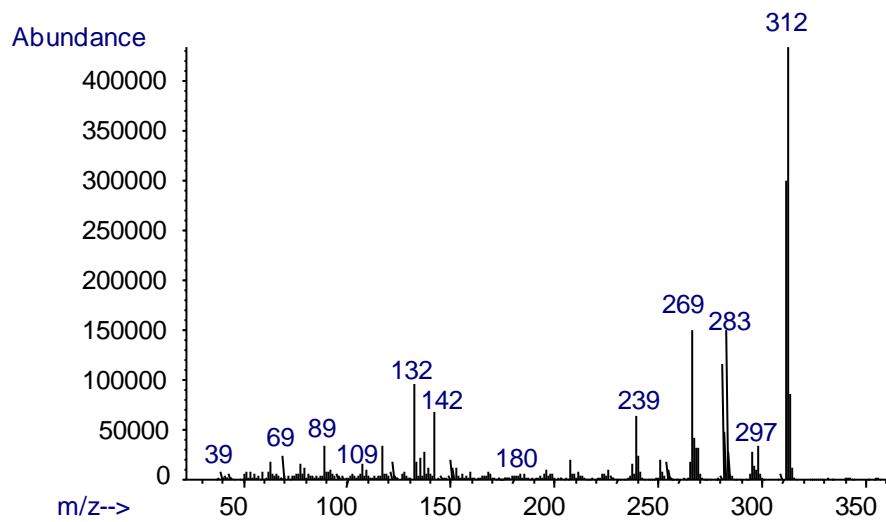


**Figura 5-1-3.** Espectro de masas de los derivados metilados de la apigenina.

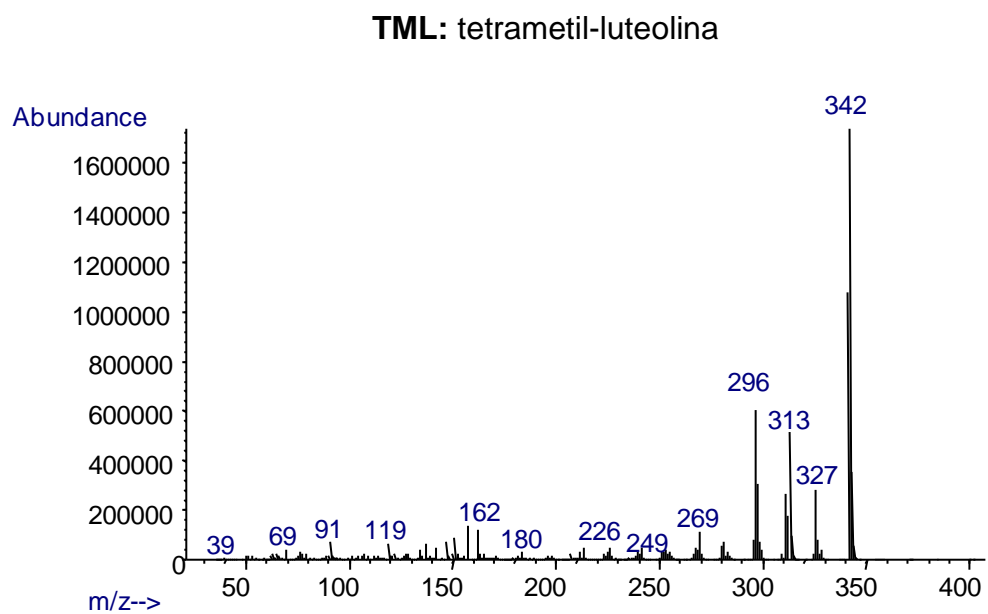
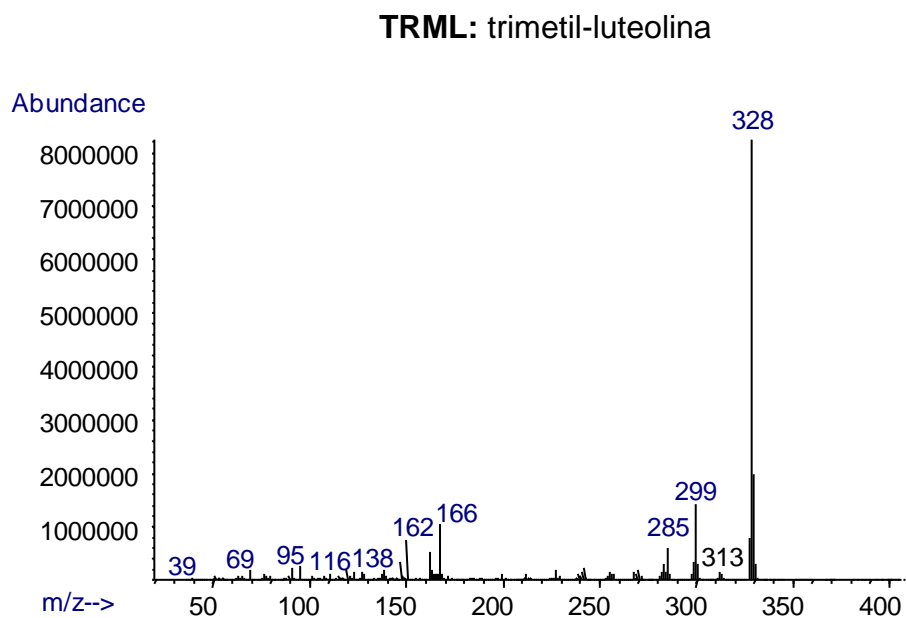
**DMA: dimetil-apigenina**



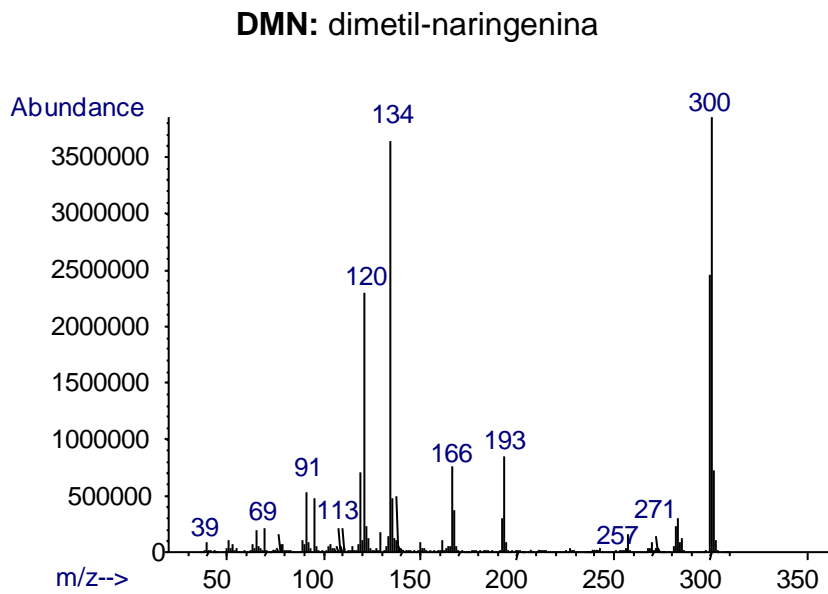
**TRMA: trimetil-apigenina**



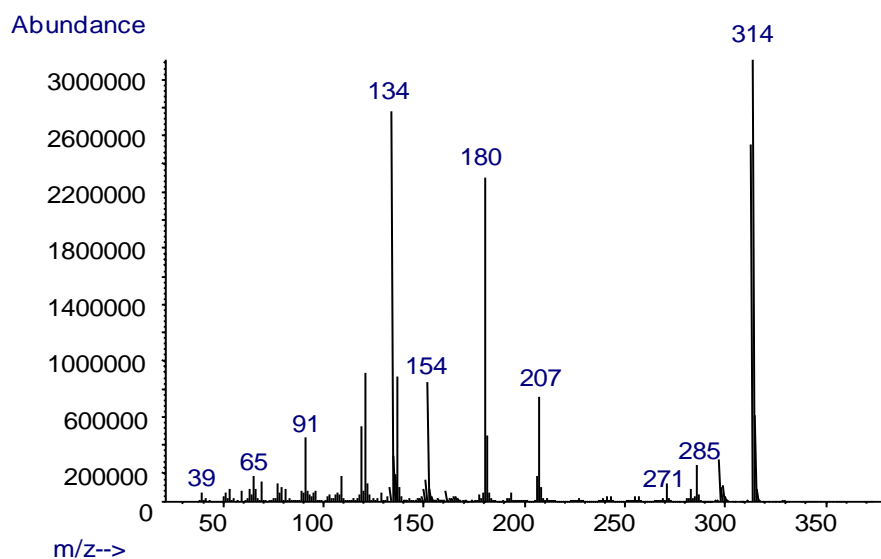
**Figura 5-1-4.** Espectro de masas de los derivados metilados de la luteolina.



**Figura 5-1-5.** Espectro de masas de los derivados metilados de la naringenina.

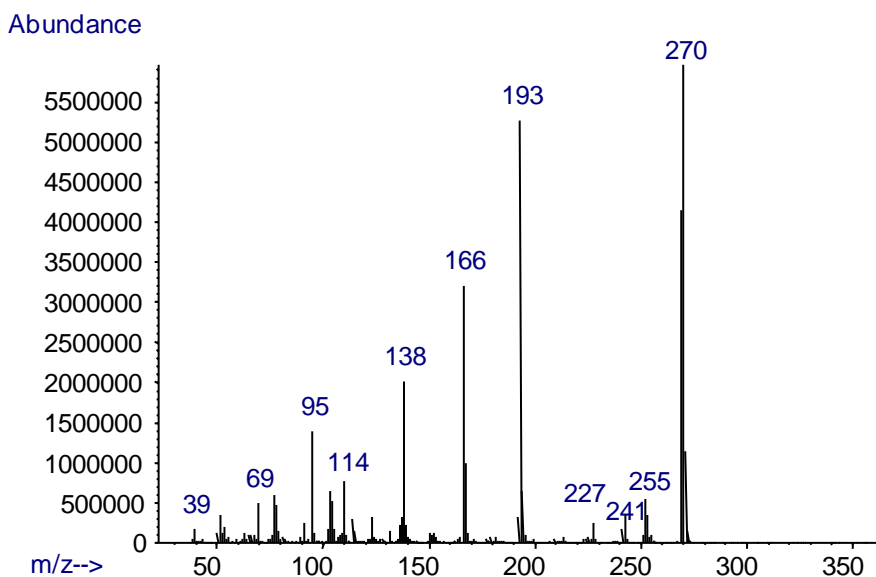


**TRMN: trimetil-naringenina**

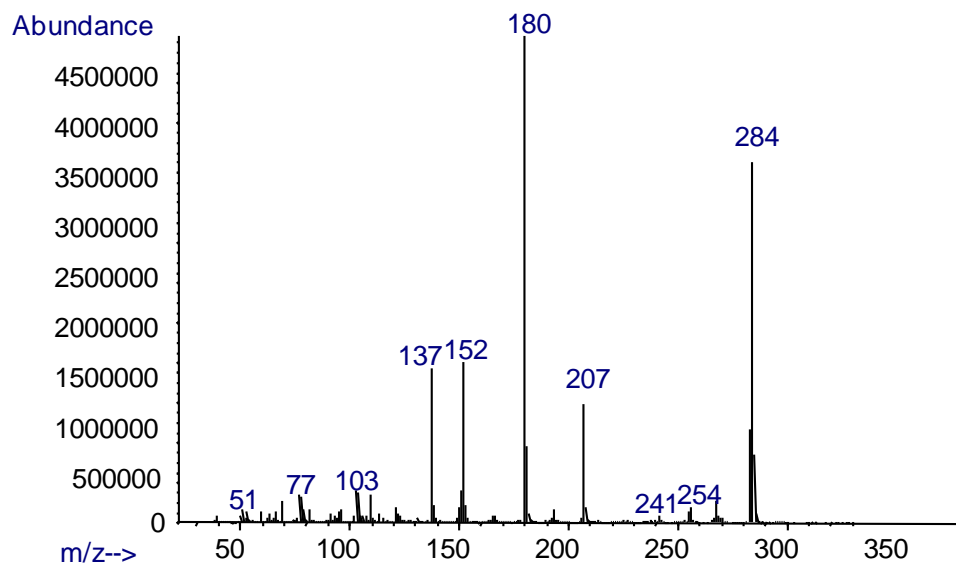


**Figura 5-1-6.** Espectro de masas de los derivados metilados de la pinocembrina.

**MMP: monometil-pinocembrina**



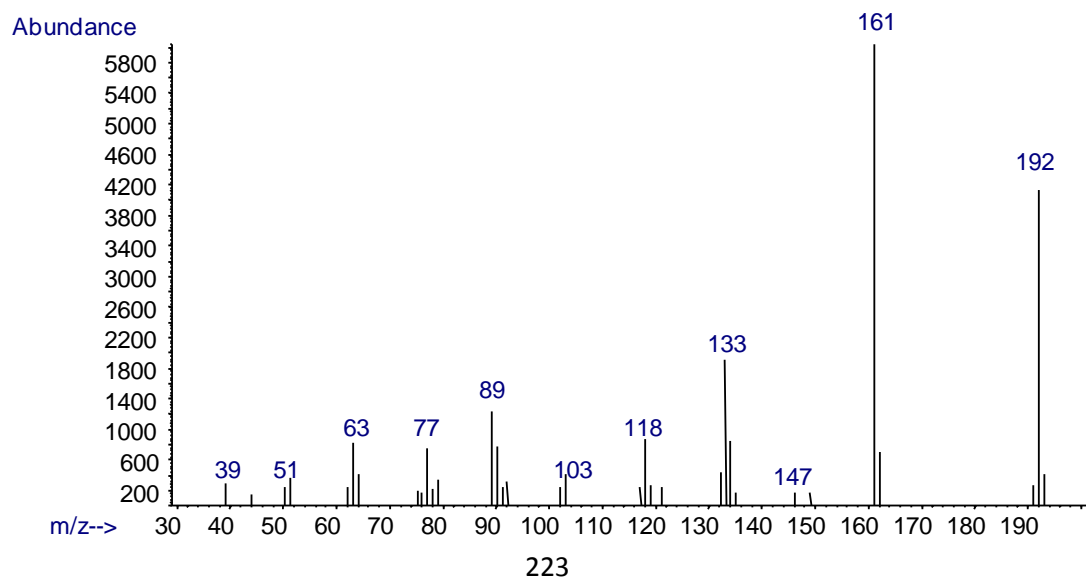
**DMP: dimetil-pinocembrina**



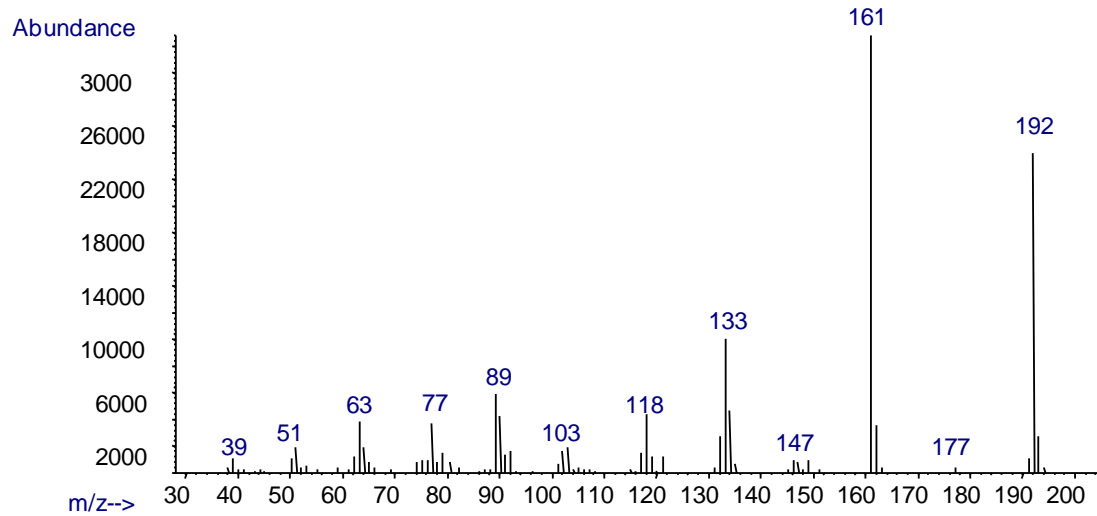
**Anexo 5.2** Espectros de masas de los derivados metilados los ácidos fenólicos de bajo peso molecular.

**Figura 5-2-1.** Espectro de masas de los derivados metilados del ácido *p*-cumárico.

**c-DMAPC:** *cis*-dimetil-ácido *p*-cumárico

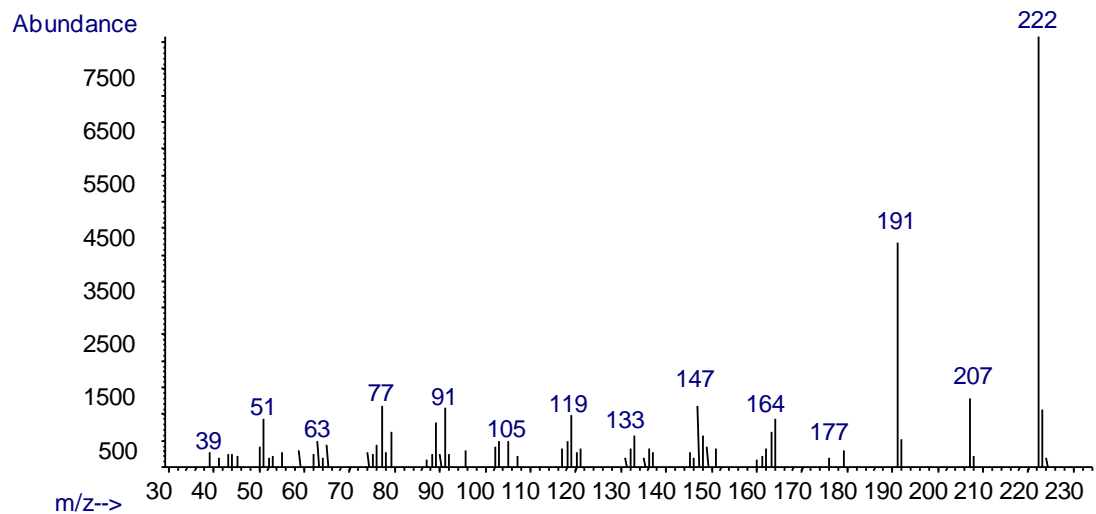


***t*-DMAPC: *trans*-dimetil-ácido *p*-cumárico**

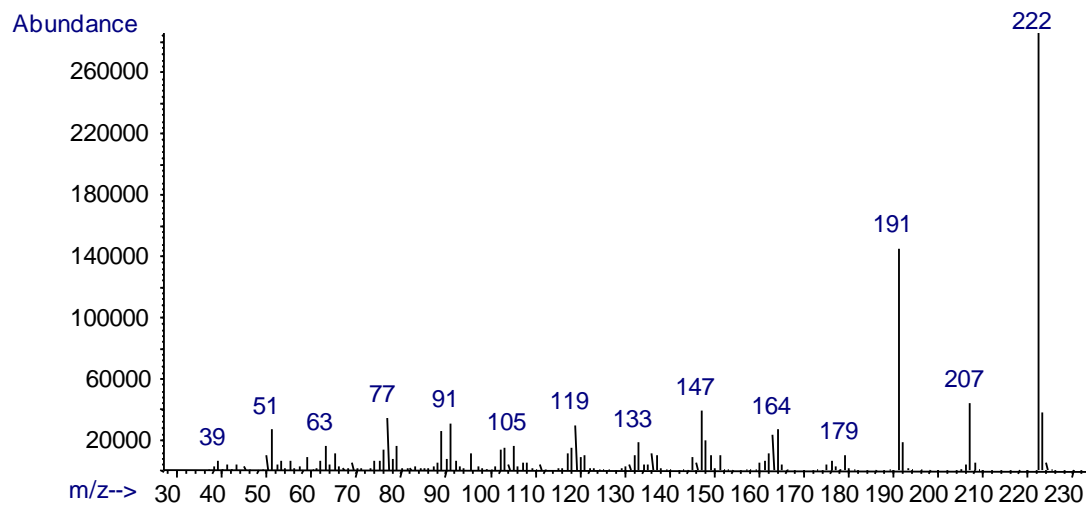


**Figura 5-2-2** Espectros de masas de los derivados metilados del ácido caféico.

***c*-DMACF: *cis*-trimetil-ácido caféico**



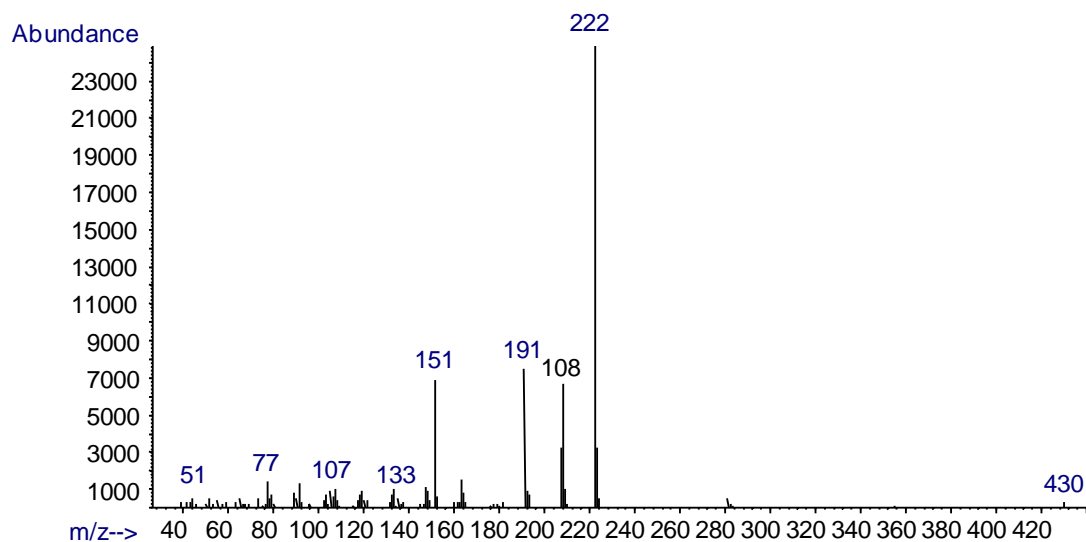
***t*-DMACF: *trans*-trimetil-ácido caféico**



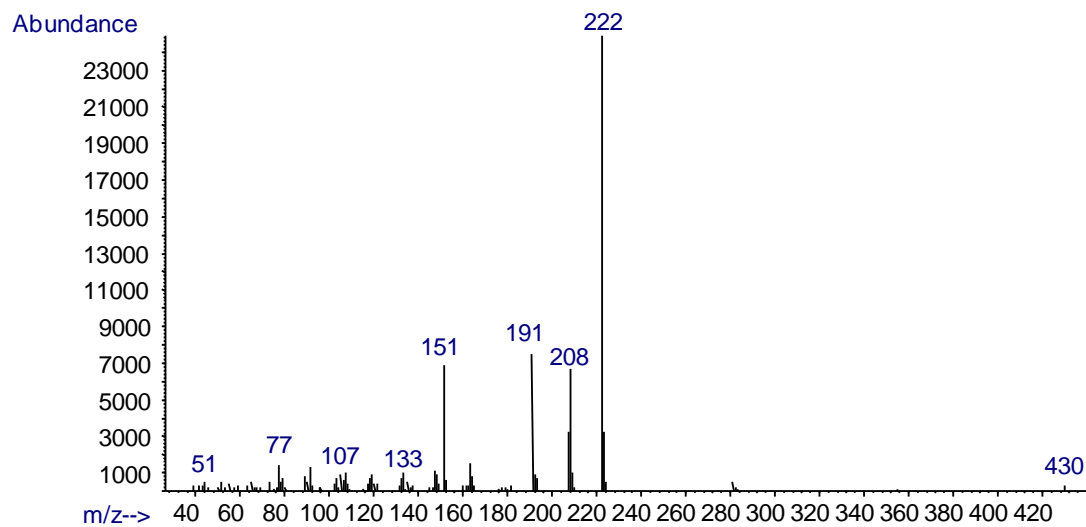
**Anexo 5.3** Espectros de masas de los derivados metilados los ácidos fenólicos de alto peso molecular.

**Figura 5-3-1.** Espectros de masas de los derivados metilados del ácido rosmarínico.

**c-PMAR:** *cis*-pentametil-ácido rosmarínico

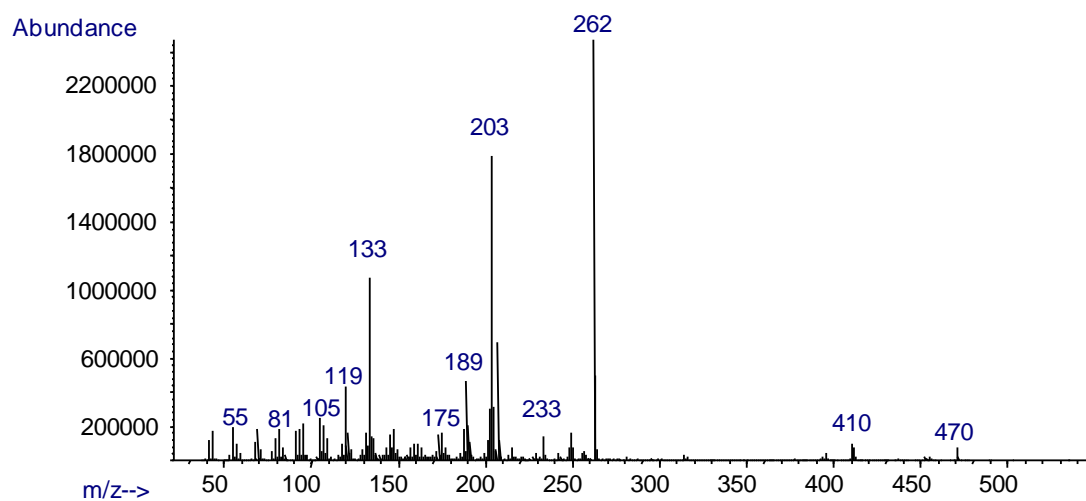


**t-PMAR:** *trans*-pentametil-ácido rosmarínico



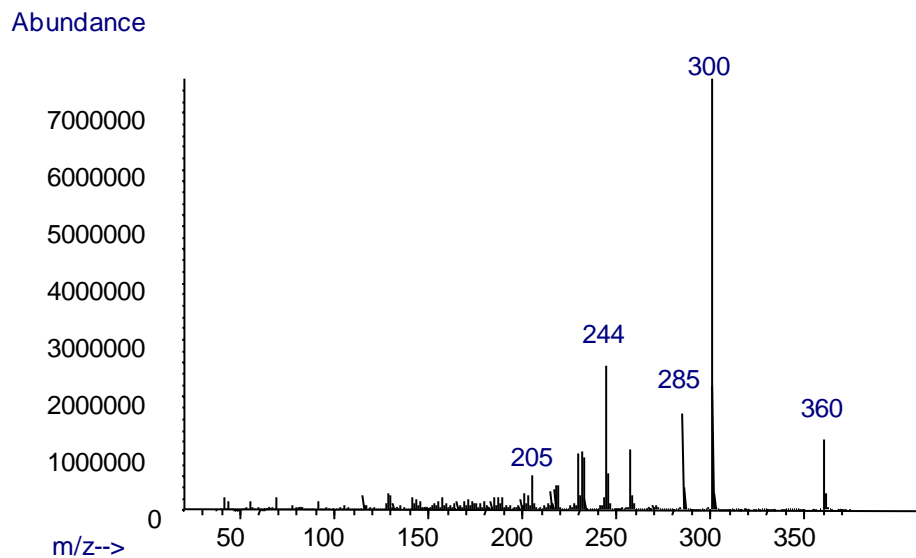
**Figura 5-3-2** Espectros de masas del derivado metilado del ácido ursólico.

**MMAU:** Monometil-ácido ursólico.

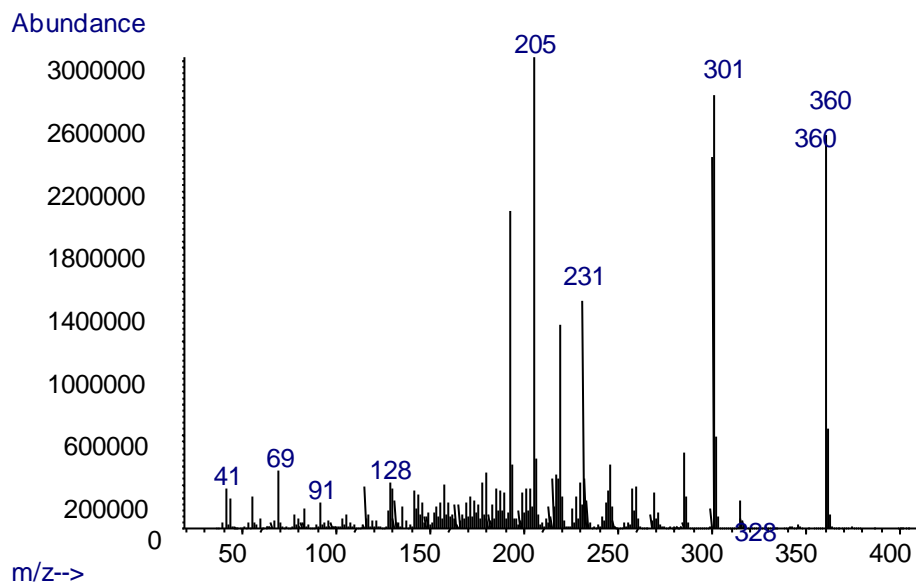


**Figura 5-3-3.** Espectros de masas del derivado metilado del ácido carnósico.

**DMACRI: dimetil-ácido carnósico I**



**DMACRII: dimetil-ácido carnósico II**



**ANEXO 6.** Condiciones de análisis cromatográfico evaluadas durante la implementación de la metodología de análisis por GC-FID.

**Tabla 6-1.** Condiciones de análisis cromatográfico evaluadas durante la implementación de la metodología de análisis por GC-FID.

Experimento	Condiciones de análisis	Tiempo de análisis (min)
1	<b>C:</b> DB5 <sup>a</sup> (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); <b>PT:</b> 70°C (3 min) hasta 135°C (10 min) @ 2°C min <sup>-1</sup> , luego hasta 220°C (10 min) @ 4°C min <sup>-1</sup> , finalmente, hasta 270°C (20 min) @ 3,5°C min <sup>-1</sup> ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 μL.	110
2	<b>C:</b> DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); <b>PT:</b> 110°C (5 min) hasta 300°C (10 min) @ 2°C min <sup>-1</sup> ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 μL.	90
3	<b>C:</b> DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); <b>PT:</b> 110°C (5 min) hasta 300°C (10 min) @ 5°C min <sup>-1</sup> ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 μL.	45
4	<b>C:</b> DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); <b>PT:</b> 100°C (5 min) hasta 220°C (10 min) @ 5°C min <sup>-1</sup> , luego hasta 300°C (10 min) @ 3,5°C min <sup>-1</sup> ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 μL.	60
5	<b>C:</b> DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); <b>PT:</b> 110°C (5 min) hasta 230°C (5 min) @ 5°C min <sup>-1</sup> , luego hasta 270°C (5 min) @ 5°C min <sup>-1</sup> , finalmente, hasta 300°C (10 min) @ 5°C min <sup>-1</sup> ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 μL.	54
6	<b>C:</b> DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); <b>PT:</b> 110°C (3 min) hasta 220°C (10 min) @ 4°C min <sup>-1</sup> , luego hasta 290°C (10 min) @ 3,5°C min <sup>-1</sup> ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 μL.	64
7	<b>C:</b> DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); <b>PT:</b> 110°C (3 min) hasta 230°C (5 min) @ 5°C min <sup>-1</sup> , luego hasta 290°C (10 min) @ 5°C min <sup>-1</sup> ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 μL.	48
8	<b>C:</b> DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); <b>PT:</b> 110°C (3 min) hasta 230°C (5 min) @ 5°C min <sup>-1</sup> , luego hasta 290°C (10 min) @ 10°C min <sup>-1</sup> ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 μL.	44

**Tabla 6-1.** Continuación.

9	<b>C:</b> DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ); <b>PT:</b> 110°C (3 min) hasta 200°C (3 min) @ 5°C $\text{min}^{-1}$ , luego hasta 230°C (5 min) @ 7°C $\text{min}^{-1}$ , finalmente, hasta 290°C (10 min) @ 7°C $\text{min}^{-1}$ ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 $\mu\text{L}$ .	48
10	<b>C:</b> DB5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ); <b>PT:</b> 110°C (5 min) hasta 300°C (10 min) @ 5°C $\text{min}^{-1}$ ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 $\mu\text{L}$ .	70
11	<b>C:</b> DB5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ); <b>PT:</b> 110°C (5 min) hasta 300°C (10 min) @ 5°C $\text{min}^{-1}$ ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 0,4 $\mu\text{L}$ .	70
12	<b>C:</b> DB5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ); <b>PT:</b> 110°C (3 min) hasta 270°C (5 min) @ 5°C $\text{min}^{-1}$ , luego hasta 310°C (10 min) @ 2,5°C $\text{min}^{-1}$ ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 $\mu\text{L}$ .	60
13	<b>C:</b> DB5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ); <b>PT:</b> 110°C (3 min) hasta 270°C (5 min) @ 5°C $\text{min}^{-1}$ , luego hasta 290°C (10 min) @ 2,5°C $\text{min}^{-1}$ , finalmente, hasta 310°C (10 min) @ 5°C $\text{min}^{-1}$ ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 $\mu\text{L}$ .	65
14	<b>C:</b> DB5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ); <b>PT:</b> 110°C (3 min) hasta 270°C (5 min) @ 5°C $\text{min}^{-1}$ , luego hasta 290°C (10 min) @ 2,5°C $\text{min}^{-1}$ , finalmente, hasta 310°C (10 min) @ 5°C $\text{min}^{-1}$ ; <b>S:</b> 1:30; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 $\mu\text{L}$ .	65
15	<b>C:</b> DB5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ); <b>PT:</b> 110°C (3 min) hasta 290°C (5 min) @ 5°C $\text{min}^{-1}$ , luego hasta 310°C (10 min) @ 2,5°C $\text{min}^{-1}$ ; <b>S:</b> 1:10; <b>V<sub>iny</sub>:</b> 1 $\mu\text{L}$ .	60

**C:** Columna; **PT:** Programación de temperatura; **S:** Relación *Split*; **V<sub>iny</sub>:** Volumen de inyección

<sup>a</sup> DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), con la fase estacionaria de 5%-fenil-`poli(metilsiloxano).

<sup>b</sup> DB5 (60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), con la fase estacionaria de 5%-fenil-`poli(metilsiloxano).

**ANEXO 7.** Resolución,  $R_s$ , de los compuestos fenólicos obtenida durante la implementación de la metodología de análisis por GC-FID.

**Tabla 7-1.** Resolución,  $R_s$ , de los compuestos fenólicos obtenida durante la implementación de la metodología de análisis por HPLC.

Señales	Resolución, $R_s$														
	Exp <sup>a</sup> 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10	Exp 11	Exp 12	Exp 13	Exp 14	Exp 15
2-1	7	10	10	9	9	7	12	7	3	43	37	19	20	23	25
3-2	76	53	24	24	26	25	30	21	20	56	45	69	66	80	104
4-3	1,9	1,0	1,2	1,0	1,0	1,1	1,0	0,7	1,0	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9
5-4	66	105	44	44	42	43	81	36	52	146	100	97	83	102	119
6-5	10	14	5	9	7	9	10	7	8	22	14	17	16	20	27
7-6	0,3	0,9	1,0	0,7	0,8	0,8	0,9	0,5	0,6	2,8	1,9	2,3	2,2	2,7	3,7
8-7	9	23	8	20	13	15	14	10	12	10	10	9	13	16	43
9-8	8	12	5	12	24	12	24	17	23	31	35	29	41	43	20
10-9	17	12	4	22	21	12	8	6	6	48	26	46	29	44	52
11-10	21	30	15	10	21	20	11	9	10	12	14	19	32	20	33
12-11	0,6	1,1	1,0	0,9	0,8	0,8	1,0	NC	0,5	1,0	0,9	1,0	1,3	0,9	3,0
13-12	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	1,4	1,3	0,8	NC	0,6	4,3
14-13	14	20	8	14	12	13	17	9	9	23	25	20	23	16	47
15-14	5,8	7,3	2,4	4,3	3,7	4,4	3,9	4,2	3,6	NC	NC	NC	NC	NC	4,7
16-15	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	2,4	2,0	1,0	1,2	1,4	6,8
17-16	9	11	5	8	8	8	22	9	10	33	31	18	28	26	52
18-17	12,3	11,4	2,3	6,1	5,6	5,7	5,6	3,2	4,3	1,0	1,1	0,7	1,0	1,1	13,5
19-18	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	1,4	1,2	1,0	5,6

NC :  $R_s$  no calculada (Las señales cromatográficas no se diferencian, co-elución de analitos).

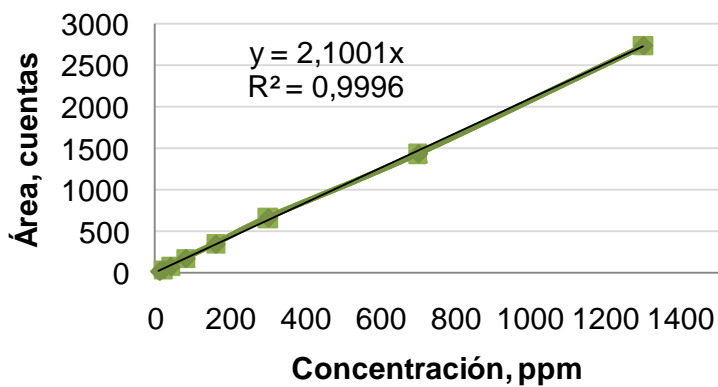
:  $R_s < 1,5$

<sup>a</sup>Exp : Experimento

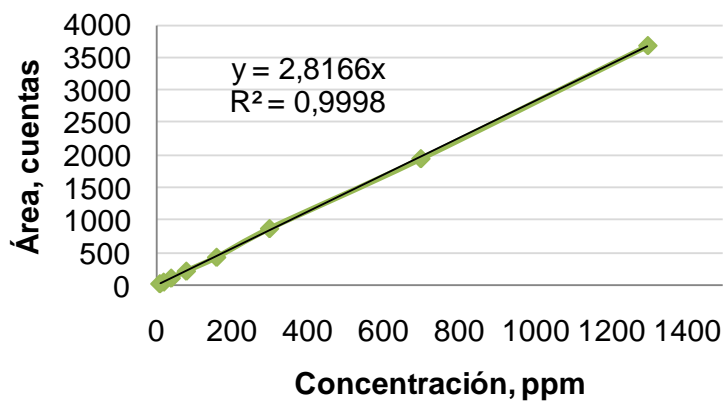
**ANEXO 8.** Curvas de calibración de los derivados de los compuestos fenólicos patrón bajo estudio obtenidos por GC-FID.

**Figura 8-1.** Curvas de calibración de los derivados de los compuestos fenólicos patrón por GC-FID.

**Derivados metilados del ácido *p*-cumárico**



**Derivados metilados del ácido caféico**



**Derivados metilados del ácido carnósico**

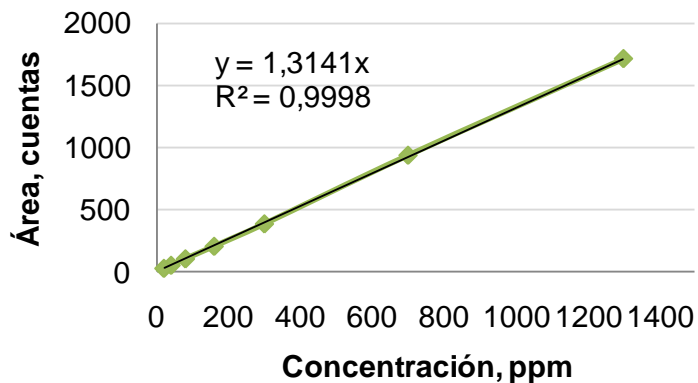
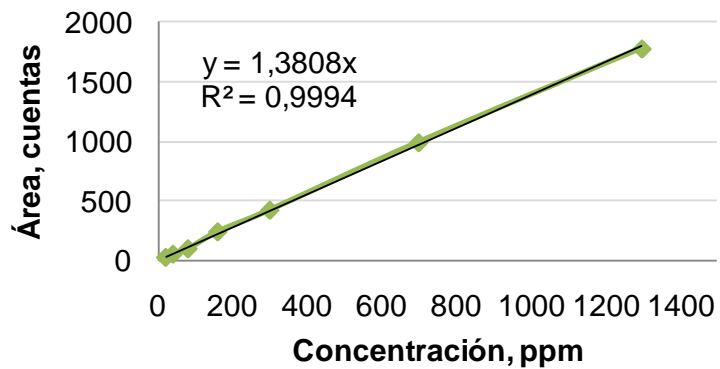
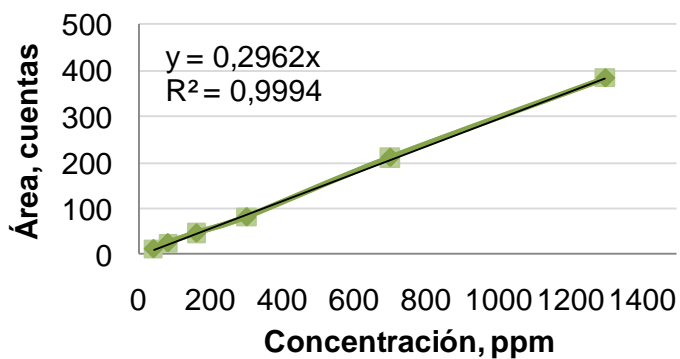


Figura 8-1. Continuación.

**Derivados metilados del ácido rosmarínico**



**Derivado metilado del ácido ursólico**



**Derivados metilados de la pinocembrina**

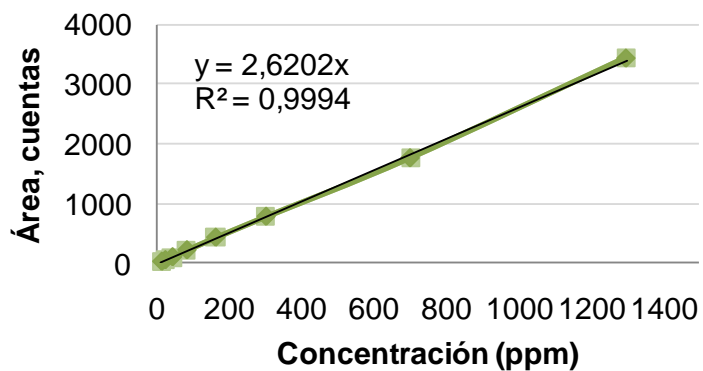
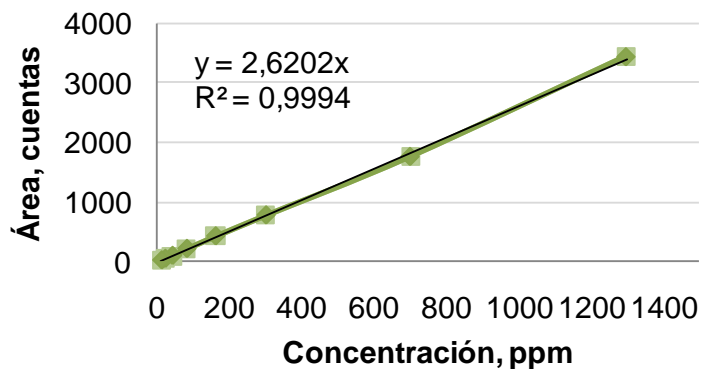
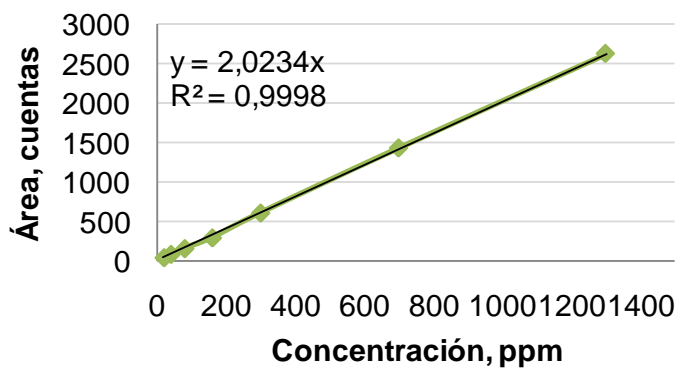


Figura 8-1. Continuación.

**Derivados metilados de la pinocembrina**



**Derivados metilados de la naringenina**



**Derivados metilados de la apigenina**

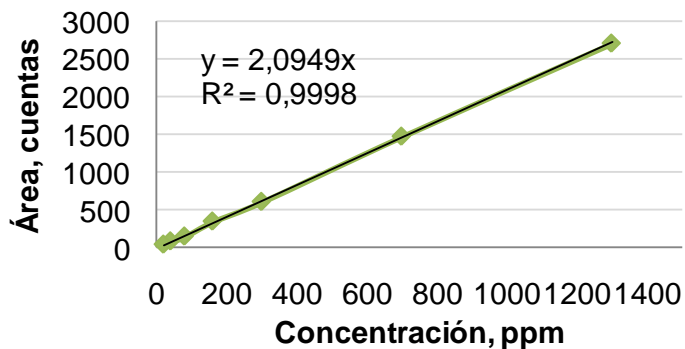
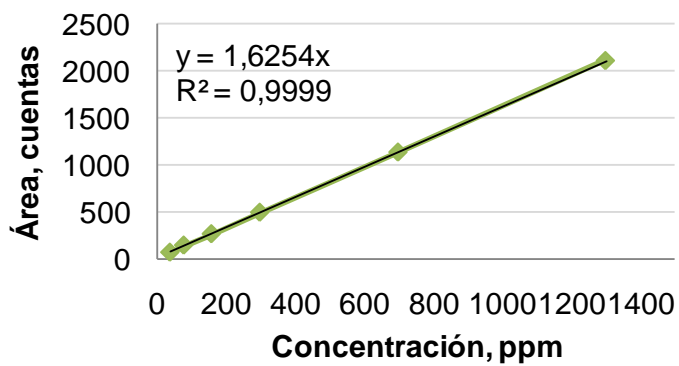
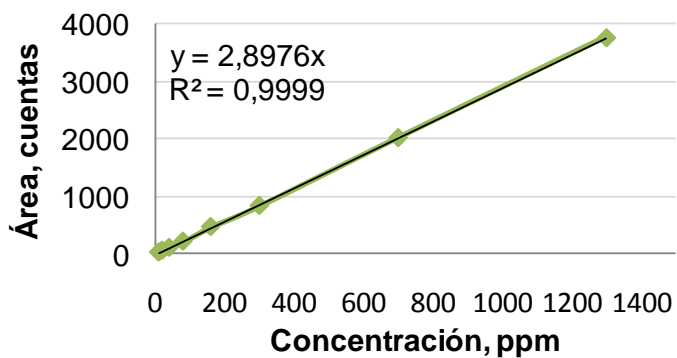


Figura 8-1. Continuación.

### Derivado metilado del kaempferol



### Derivados metilados de la luteolina



### Derivado metilado de la quercetina

