

**ANÁLISIS Y ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS
CON FLUIDO SUPERCRÍTICO Y DE LOS ACEITES ESENCIALES DE
DIFERENTES PLANTAS DEL GÉNERO *Piper***

ROGERIO ALEJANDRO SEBASTIAN SAAVEDRA BARRERA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

**ANÁLISIS Y ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS
CON FLUIDO SUPERCRÍTICO Y DE LOS ACEITES ESENCIALES DE
DIFERENTES PLANTAS DEL GÉNERO *Piper***

ROGERIO ALEJANDRO SEBASTIAN SAAVEDRA BARRERA

**Trabajo de grado para optar al título de
Químico**

**Director
JAIRO RENÉ MARTÍNEZ
Químico, Ph.D**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

AGRADECIMENTOS

A mis padres, por su dedicación a mi formación y sobre todo por enseñarme que el trabajo correcto dignifica al hombre.

Al equipo humano del Centro de Excelencia CENVAM, por el acompañamiento académico, indispensable para el desarrollo de este trabajo.

A COLCIENCIAS, por el apoyo financiero para la realización de esta investigación.

A Leonardo Niño, Juan Camilo Henríquez, Karol Carrillo, Katerine Gualteros, Jessica Mejía, Wendy Hernández, Samir Suárez y Gustavo Rodríguez. Pues con ellos cultivé una amistad perenne.

Rogelio Saavedra

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO	19
1.1. ACEITES ESENCIALES	19
1.1.1. Definición	19
1.1.2. Biogénesis de los aceites esenciales	20
1.1.3. Obtención de aceites esenciales	21
1.2. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	22
1.3. MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	24
1.4. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS	26
1.4.1. Cromatografía de gases	26
1.4.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	28
1.5. RADICALES LIBRES	30
1.6. ANTIOXIDANTES	32
1.7. ENSAYO DE CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE RADICALES OXÍGENO	34
1.8. GÉNERO <i>PIPER</i>	37
1.8.1. <i>Piper cumanense</i> Kunth	38
1.8.2. <i>Piper eriopodon</i> Miquel	39
1.8.3. <i>Piper peltatum</i> L.	40
1.8.4. <i>Piper marginatum</i>	41
1.8.5. <i>Piper dilatatifolium</i> Trel & Yunck	42
1.8.6. <i>Piper subflavum</i> var. <i>espejuelantum</i> (C. DC.) Trel & Yunck	43
2. CIENCIOMETRÍA	45
3. METODOLOGÍA	50
3.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL SILVESTRE	50
3.1.1. Permiso para recolección de material vegetal	50
3.1.2. Lugar de recolección del material vegetal	51

3.1.3. Selección del material vegetal	51
3.1.4. Identificación del material vegetal	52
3.1.5. Obtención de aceites esenciales	53
3.1.6. Preparación de la muestra para la extracción con fluidos supercríticos	54
3.1.7. Obtención de extractos con fluidos supercríticos	56
3.1.8. Análisis de aceites esenciales por GC-MS	57
3.1.9. Análisis de la fracción volátil de extractos SFE por HS-SPME con GC-MS	59
3.1.10. Ensayo de la capacidad de absorción del radical oxígeno	61
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	63
4.1. OBTENCIÓN DE ACEITES Y EXTRACTOS	64
4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LOS AE	66
4.2.1. <i>Piper cumanense</i> Kunth	66
4.2.2. <i>Piper eriopodon</i> (Miq.) C. DC.	67
4.2.3. <i>Piper peltatum</i> L.	70
4.2.4. <i>Piper marginatum</i> Jacq.	73
4.2.5. <i>Piper dilatatifolium</i> Trel. & Yunck	77
4.2.6. <i>Piper subflavum</i> var. <i>espejuelanum</i> (C. DC.) Trel. & Yunck.	80
4.2.7. Análisis general	81
4.3. ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES VOLÁTILES DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS CON FLUIDO SUPERCRÍTICO.	87
4.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ORAC	90
5. CONCLUSIONES	94
BIBLIOGRAFÍA	110
ANEXOS	122

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ruta biosintética del ácido mevalónico para la síntesis de terpenos	21
Figura 2. Esquema principal del montaje para micro-extracción en fase sólida	25
Figura 3. Espectros de masas e IRL en columnas polar y apolar de A) biciclogermacreno y B) germacreno B	30
Figura 4. Esquema general del mecanismo de auto-oxidación de un hidrocarburo y protección antioxidante	32
Figura 5. Mecanismo de oxidación de la fluoresceína en presencia de los radicales peroxilo	36
Figura 6. Fotografía de <i>Piper cumanense</i>	38
Figura 7. Fotografía de <i>Piper eriopodon</i>	39
Figura 8. Fotografía de <i>Piper peltatum</i>	40
Figura 9. Fotografía de <i>Piper marginatum</i>	41
Figura 10. Fotografía de <i>Piper dilatatifolium</i>	42
Figura 11. Fotografía de <i>Piper subflavum</i> var. espejuelanum	44
Figura 12. Número de publicaciones a partir del año 2000	45
Figura 13. Esquema representativo de la metodología	50
Figura 14. Esquema del montaje de hidroddestilación asistida por radiación de microondas	54
Figura 15. Proceso de secado A) Vivero instalaciones CENIVAM. B) Bandejas de secado de material vegetal	55
Figura 16. A) Molino de cuchillas Retsch SM100neu. B) Material vegetal seco y picado	55
Figura 17. Equipo de extracción con fluidos supercríticos	56
Figura 18. Cromatógrafo de gases GC Agilent Technologies 6890 Plus acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies MSD 5973 Network	58

Figura 19. Montaje usado en el monitoreo de fracción volátil de extractos SFE por HS-SPME	60
Figura 20. Lector de microplacas de 96 pozos	62
Figura 21. Perfil cromatográfico del AE de <i>Piper cumanense</i>	67
Figura 22. Perfil cromatográfico del AE de <i>Piper eriopodon</i>	68
Figura 23. Espectro de masas y ruta de fragmentación del compuesto tentativamente identificado como prelunularina (IE 70 eV).	69
Figura 24. Perfil cromatográfico del AE de <i>Piper peltatum</i>	71
Figura 25. Perfil cromatográfico del AE de <i>Piper marginatum</i>	74
Figura 26. Fragmentograma de masas del ión m/z 208, obtenido del AE del <i>P. marginatum</i>	74
Figura 27. Estructura de los fenilpropanoides identificados en el AE de <i>P. marginatum</i>	75
Figura 28. Perfil cromatográfico del AE de <i>Piper dilatatifolium</i>	77
Figura 29. Mecanismo de oxidación del biciclogermacreno a espatulenol	79
Figura 30. Perfil cromatográfico del AE de <i>Piper subflavum</i>	80
Figura 31. Curva de calibración del Trolox® para el ensayo ORAC.	91

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Categoría taxonómica del género <i>Piper</i>	37
Tabla 2. Número de publicaciones por especie.	47
Tabla 3. Sitio de recolección de las especies seleccionadas y características del terreno.	52
Tabla 4. Nombre científico y registro de las especies vegetales pertenecientes al género <i>Piper</i>	63
Tabla 5. Rendimientos de extracción de aceites esenciales y extractos SFE de las especies recolectadas	64
Tabla 6. Comparación de los componentes principales presentes en el AE de <i>P. eriopodon</i> .	70
Tabla 7. Comparación con estudios previos de los componentes principales presentes en el AE de <i>P. peltatum</i>	72
Tabla 8. Comparación de componentes mayoritarios reportados en el AE de <i>P. marginatum</i>	76
Tabla 9. Comparación de componentes mayoritarios reportados en el AE de <i>P. dilatatifolium</i>	78
Tabla 10. Comparación de componentes mayoritarios identificados en los AE de <i>P. subflavum</i> y <i>P. eriopodon</i>	81
Tabla 11. Familias de compuestos presentes en los AE.	82
Tabla 12. Compuestos frecuentes identificados en los AE de plantas del género <i>Piper</i>	85
Tabla 13. Valores de actividad antioxidante de los aceites esenciales y extractos SFE, obtenidos por el método ORAC	91

LISTADO DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Composición química del AE de <i>Piper cumanense</i> Kunth	123
Anexo B. Composición química del AE de <i>Piper eriopodon</i> (Miq.) C. DC.	124
Anexo C. Composición química del AE de <i>Piper peltatum</i>	125
Anexo D. Tabla de composición del AE de <i>Piper marginatum</i>	126
Anexo E. Tabla de composición del AE de <i>Piper dilatatifolium</i>	128
Anexo F. Tabla de composición de AE de <i>Piper subflavum</i> var. <i>espejuelanum</i>	129
Anexo G. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de <i>P. cumanense</i>	131
Anexo H. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de <i>P. eriopodon</i>	133
Anexo I. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de <i>P. peltatum</i>	135
Anexo J. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de <i>P. marginatum</i>	137
Anexo K. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de <i>P. dilatatifolium</i>	139
Anexo L. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de <i>P. subflavum</i> var. <i>espejuelanum</i> .	141

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
AE	Aceites esenciales
AO	Antioxidantes
AAPH	Cloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
BHT	Hidroxitolueno butilado
CENIVAM	Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
d_f	Espesor de la fase estacionaria
D.I.	Diámetro interno
EI	Impacto de electrones
f.e.	Fase estacionaria
FL	Fluoresceína
GC	Cromatografía de gases
IRL	Índice de retención lineal
MS	Espectrometría de masas
MWHD	Hidrodestilación asistida por radiación de microondas
ORAC	Capacidad de absorción de radicales oxígeno
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SPME-HS	Micro-extracción en fase sólida en espacio de cabeza
TAH	Transferencia de átomo de hidrógeno
t_R	Tiempo de retención
Trolox®	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

RESUMEN

TITULO: ANÁLISIS Y ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS CON FLUIDO SUPERCRÍTICO Y DE LOS ACEITES ESENCIALES DE DIFERENTES PLANTAS DEL GÉNERO *Piper**

AUTOR: Rogerio Alejandro Sebastian Saavedra Barrera**

PALABRAS CLAVE: *Piper marginatum*, *Piper eriopodon*, *Piper subflavum*, *Piper dilatatifolium*, *Piper cumanense*, *Piper peltatum*, aceite esencial, actividad antioxidante, ORAC.

El género *Piper* cuenta con más de 700 plantas distribuidas en Suramérica y es considerado uno de los géneros, de las angiospermas, que más contribuye a la biodiversidad colombiana. Estas plantas producen metabolitos secundarios responsables de una amplia variedad de actividades biológicas. En el presente trabajo se realizó la identificación química por GC-MS, de los metabolitos presentes en los aceites esenciales y en las fracciones volátiles de los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico. Las seis plantas estudiadas, *P. marginatum*, *P. eriopodon*, *P. subflavum*, *P. cumanense*, *P. peltatum* y *P. dilatatifolium*, fueron recolectadas en el departamento de Santander y los aceites esenciales se obtuvieron por medio de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. En los resultados, se identificaron seis fenilpropanoides que componen el aceite esencial de la especie *P. marginatum* y se reportó por primera vez la composición química de los aceites esenciales de *P. cumanense* y *P. subflavum*. El análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) permitió establecer una gran similitud entre los aceites esenciales de las especies *P. eriopodon* y *P. subflavum*. También se midió la capacidad antioxidante de dichos aceites y extractos, mediante el método ORAC. Este método permite evaluar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales por el mecanismo de reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno. La actividad antioxidante de todos los aceites esenciales fue superior a la de las sustancias de referencia, butil-hidroxitolueno (BHT) y α -tocoferol.

*Proyecto de grado.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: Dr, Jairo René Martínez

ABSTRACT

TITLE: ANALYSIS AND COMPARATIVE STUDY OF THE OBTAINED SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTS AND ESSENTIAL OILS OF DIFFERENT PLANTS OF THE GENUS *Piper**

AUTHOR: Rogerio Alejandro Sebastian Saavedra Barrera**

KEY WORDS: *Piper marginatum*, *Piper eriopodon*, *Piper subflavum*, *Piper dilatatifolium*, *Piper cumanense*, *Piper peltatum*, essential oils, antioxidant activity, ORAC.

More than 700 plants distributed all over South America belong to the *Piper* genus, which is considered among all angiosperms to be the one that contributes the most to Colombian biodiversity. These plants produce secondary metabolites responsible of a wide variety of biological activities. The metabolites within the essential oils and the volatile fractions from the supercritical CO₂ extracts were identified by gas chromatography with a mass spectrometry detector (GC-MS). Six plants were studied: *P. marginatum*, *P. eriopodon*, *P. subflavum*, *P. cumanense*, *P. peltatum* and *P. dilatatifolium*, all of them were gathered in the department of Santander and their essential oils were obtained by microwave-assisted hydrodistillation. Six different phenylpropanoids were identified in *P. marginatum*, and for the first time the chemical composition of *P. cumanense* and *P. subflavum* essential oils has been studied. A principal compounds analysis (PCA) allowed to establish a similarity between *P. eriopodon* and *P. subflavum* essential oils. The antioxidant capacity of these oils and the supercritical CO₂ extracts was measured using the oxygen radical absorption capacity (ORAC) method, assay based on a mechanism that involves an hydrogen atom transference (HAT). The antioxidant capacity of all the essential oils was higher than the one shown by standard reference substances like butylated hydroxytoluene (BHT).

* Project to degree

** Science Faculty, Chemical School, Director: Dr. Jairo René Martínez

INTRODUCCIÓN

La variedad de microclimas y la ubicación geográfica de Colombia convierten al país en uno de los mayores focos de biodiversidad en el mundo, posicionándolo como el país con la mayor variedad de especies vegetales [1]. Estos focos de biodiversidad poseen un gran interés científico, pues se traducen a nivel composicional en una gran variedad de compuestos químicos que una vez identificados y analizados son punto de partida para la formación de productos con valor agregado, o simplemente se convierten en la base estructural a partir de la cual se desarrollarán nuevos compuestos [1].

A pesar de la disponibilidad de recursos naturales y de ser considerado un país de tradición agrícola, no se ha desarrollado a nivel industrial un ejemplo replicable que permita aprovechar el comercio de las plantas aromáticas o sus derivados. La producción local de aceites esenciales es escasa y la demanda local se abastece en su mayoría de importaciones [1].

Restarle importancia al estudio de las plantas que forman parte de la biodiversidad colombiana, niega la posibilidad de adquirir información sobre nuevos compuestos o productos derivados y, sobre todo, pone en riesgo parte del patrimonio cultural de las regiones debido a la pérdida de tradiciones y de conocimientos, en algunos casos, ancestrales [2].

El género *Piper* cuenta con más de 700 especies distribuidas a lo largo de Sur América, adaptadas a climas tropicales y sub-tropicales [3]. Su amplia diversidad lo convierte en el género de la familia de las Piperaceae que más contribuye a la biodiversidad colombiana. Debido a su presencia en diversas regiones del país, muchas de estas especies han sido usadas en la etnomedicina [4]. Sin embargo, su impacto local se limita a la comercialización de especias, como la pimienta obtenida de los frutos de *P. nigrum*.

Gran parte de la investigación actual, enfocada en material vegetal, se centra en la búsqueda de sustituyentes químicos naturales para los antioxidantes sintéticos. Durante el metabolismo secundario de las plantas, algunas de las moléculas que se generan poseen actividad antioxidante. Con el fin de evaluar esta actividad, se han desarrollado diferentes métodos, cada uno enfocado en un mecanismo de acción particular. Uno de los más empleados es el método ORAC (ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno), a través del cual es posible evaluar actividad antioxidante por el mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno; este método ha sido aplicado tanto a sustancias sintéticas como naturales [5].

La capacidad antioxidante de plantas pertenecientes al género *Piper*, también ha sido determinada. Se ha encontrado que las amidas fenólicas, comunes en extractos obtenidos de la especie *Piper nigrum*, son responsables de su elevado poder protector contra oxidantes, superior al de otros compuestos naturales empleados comúnmente, como el α -tocoferol [6].

Muchas especies silvestres, autóctonas o aclimatadas, han hecho parte del desarrollo cultural y poseen actividad biológica que, por falta de investigación, solo la etnomedicina ha aprovechado. El análisis químico de estas especies, con las herramientas analíticas adecuadas, permite sugerir algunos usos posibles para sus aceites y extractos. Es por esto que el CENIVAM desarrolla proyectos para el estudio de la biodiversidad, como el proyecto “Búsqueda sistemática de especies vegetales promisorias de la biodiversidad colombiana, extracción, caracterización y evaluación de sus metabolitos secundarios y derivados funcionalizados”, que hace parte del Programa “Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética, farmacéutica y de productos de aseo con base en la biodiversidad colombiana”, en que se resalta la importancia de desarrollar el conocimiento químico enfocado en especies que hagan parte del ecosistema local.

Este desarrollo requiere estrategias que permitan la conservación de las especies y, sobre todo, su uso sostenible.

El objetivo principal de este trabajo fué el estudio de los metabolitos secundarios obtenidos, tanto de aceites esenciales como de extractos SFE de especies silvestre, con el fin de contribuir al estudio de la biodiversidad local. Por ello, se seleccionaron seis especies pertenecientes al género *Piper* identificadas como *P. cumanense*, *P. eriopodon*, *P. peltatum*, *P. marginatum*, *P. dilatatifolium* y *P. sublfavum* (var. espejuelanum), recolectadas en el departamento de Santander. Los aceites esenciales de estas plantas se obtuvieron por hidrodestilación asistida por radiación de microondas, alcanzando rendimientos entre 0.05 y 0.33% p/p. Por otra parte, los extractos obtenidos con fluidos supercríticos alcanzaron rendimientos entre 0.1 y 1.4% p/p.

Se determinó la composición química de los aceites esenciales usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), y se identificó una amplia variedad de compuestos con actividad fungicida, antibacterial, antiviral, antiinflamatoria y antioxidante. Entre los más frecuentes, se destacaron el óxido de cariofileno y el α -copaeno, presentes en todas las muestras analizadas.

Para evaluar la fracción volátil de los extractos obtenidos con fluidos supercríticos, se empleó, como técnica extractiva, la microextracción en fase sólida en espacio de cabeza. El análisis GC-MS de estas fracciones permitió identificar, como compuestos mayoritarios, una gran cantidad de sesquiterpenos e hidrocarburos afines con el fluido utilizado durante la extracción.

Finalmente, se evaluó la capacidad protectora de los aceites esenciales y extractos empleando el ensayo ORAC. Los resultados fueron comparados con el valor obtenido para los antioxidantes de referencia y mostraron que los aceites

esenciales de *P. marginatum* y *P. cumanense* exhibieron una capacidad antioxidante 3.6 y 4 veces mayor que la del α -tocoferol.

1. ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO

1.1. ACEITES ESENCIALES

1.1.1. Definición

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de metabolitos secundarios que poseen diversas características químicas y constituyen la huella digital del olor y sabor de las plantas. Se puede afirmar que los AE son pieza clave para la supervivencia de las plantas y que tienen un rol importante dentro de mecanismos relacionados con la defensa química, funciones fisiológicas, la comunicación con insectos e inclusive con otras plantas [7]. Los AE contienen compuestos volátiles rápidamente difuminables en el ambiente que pueden jugar, entre otros, el papel de compuestos alarma. También, se encuentran compuestos semi-volátiles como las ceras que cumplen funciones protectoras [8].

En su composición es común encontrar terpenos, fenoles, alcoholes, hidrocarburos alifáticos, ácidos y otras sustancias con diversas estructuras moleculares, caracterizadas, principalmente, por su bajo o medio peso molecular, su olor típico y alta volatilidad [1, 2]. La composición química de los AE está sujeta a variaciones que dependen de factores ambientales, del método de obtención del AE, de la parte de la planta de la cual se obtengan y del desarrollo fenológico, la época de recolección, entre otros factores [2].

Los terpenoides son los compuestos más comunes presentes en los AE. Poseen masas moleculares por debajo de las 400 u.m.a., por lo cual son analizables por cromatografía de gases. Su estructura molecular está conformada por dos o más unidades isoprénicas, de aquí su clasificación como monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), y diterpenos (C_{20}) [9]. Adams [10] realizó una amplia compilación de compuestos presentes en los aceites esenciales y en algunos

extractos vegetales, describió sus estructuras moleculares y algunos parámetros que permiten su comparación e identificación a través de GC-MS.

Muchos de estos terpenoides poseen isómeros ópticos responsables de la nota olfativa percibida en los aceites esenciales. Algunos de estos compuestos, aún a nivel de trazas, ejercen cambios significativos en las propiedades sensoriales y fisico-químicas de los aceites [11].

1.1.2. Biogénesis de los aceites esenciales

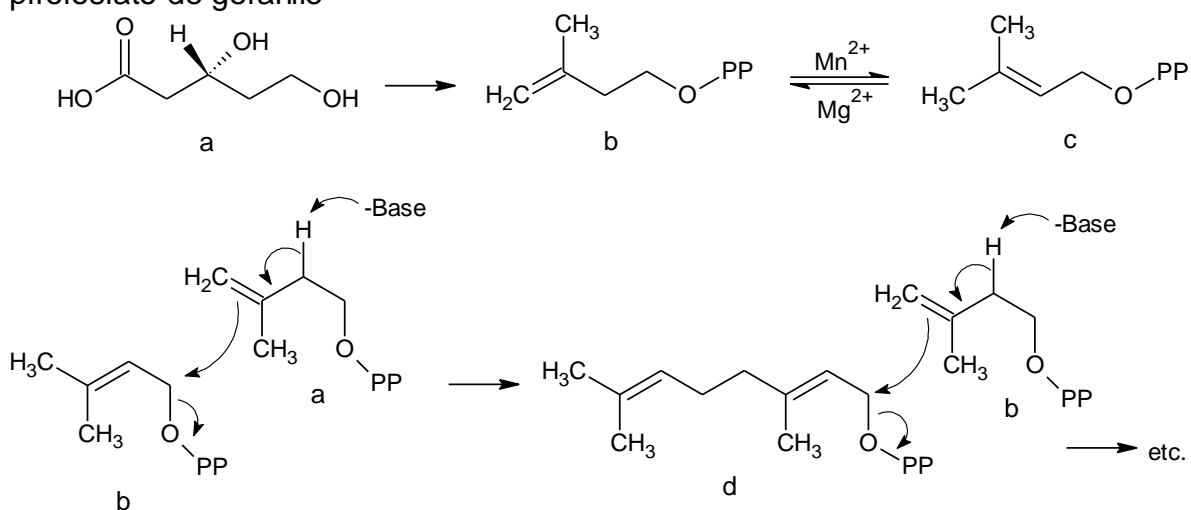
Las rutas metabólicas secundarias sintetizan, generalmente, compuestos con una distribución poco amplia en la naturaleza. A través de ellas, se generan algunos metabolitos que solo se encuentran en organismos específicos y son una expresión de la individualidad de las especies. Estos metabolitos secundarios no se producen bajo las mismas condiciones, en algunos casos, son la expresión de situaciones de estrés producidas por agentes externos, cumplen funciones atrayentes o repelentes y, para muchos de ellos, se desconoce su función en los organismos [12].

Los bloques constructivos empleados en las rutas de síntesis para metabolitos secundarios son, principalmente, productos o derivados del metabolismo primario. Entre ellos, se encuentran, el acetil-CoA, ácido shikimico, ácido mevalónico y la 5-fostato-1-deoxisilulosa [12].

En la **Figura 1**, se observa que los terpenos son biosintetizados a través de la ruta del ácido mevalónico **(a)**, formado a través de tres moléculas de acetil-CoA. Este compuesto, se convierte en pirofosfato de isopentilo **(b)**, mediante un proceso de fosforilación y eliminación de oxígeno; posteriormente, se isomeriza para formar el pirofosfato de prenilo **(c)**. La unión entre una molécula de pirofosfato de pentilo y

otra de pirofosfato de prenilo forma el pirofosfato de geranilo (**d**), base estructural de 10 unidades de carbono, implicada en la síntesis de los terpenoides. Otras adiciones de pirofosfato de isopentilo conducen a la formación de estructuras de 15, 20, 25 y más unidades de carbono [13].

Figura 2. Ruta biosintética del ácido mevalónico para la síntesis de terpenos [13]. a) Ácido mevalónico, b) pirofosfato de isopentilo, c) pirofosfato de prenilo, d) pirofosfato de geranilo



1.1.3. Obtención de aceites esenciales

Diversos manuscritos y reportes antiguos hacen referencia al uso de técnicas destilativas para la obtención de AE. Hasta el día de hoy, el interés en la explotación y comercialización de productos naturales ha contribuido al desarrollo e implementación industrial de estas técnicas, entre las que se encuentran la destilación por arrastre con vapor, destilación agua-vapor y la hidrodestilación [2].

1.1.3.1 Hidrodestilación

En esta técnica destilativa, el material vegetal se encuentra suspendido dentro del agua; así, al llegar al punto de ebullición, los vapores generados arrastran la

mezcla de volátiles que luego serán condensados para su separación por decantación [1, 2]. Las técnicas destilativas poseen ciertas ventajas frente a las extractivas, debido a la pureza con que se obtiene el producto, al no emplear solventes orgánicos que puedan contaminarlo, y a la facilidad con que se puede aplicar la técnica, directamente, en las zonas de producción del material vegetal. Sin embargo, existen algunas observaciones que se deben tener en cuenta: algunos compuestos de los AE son sensibles a la hidrólisis, pueden presentar compuestos oxigenados parcialmente solubles en agua y, en ocasiones, los tiempos requeridos para la destilación son extensos [2].

Con el fin de reducir tiempos de extracción, aumentar rendimientos y mejorar la calidad de los AE obtenidos, se han desarrollado diversas variaciones de las técnicas clásicas. Una de ellas, es el uso de la radiación de microondas, como fuente de energía, para el calentamiento de la mezcla de agua y material vegetal en la hidrodestilación. Esta variación es conocida como hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD, por sus siglas en inglés) y es ampliamente usada a escala de laboratorio; sin embargo, su aplicación industrial es limitada debido a la cantidad de muestra con la que se puede trabajar [14].

Como reemplazo a los sistemas de calentamiento convencionales, en MWHD el material es sometido a radiación de 2.45 GHz, frecuencia a la que aumenta la rotación de los dipolos y, con ello, la cantidad de colisiones moleculares que se generan dentro del recipiente que contiene la muestra, lo que produce un aumento de temperatura que, en este caso, es aprovechado para la ruptura del material vegetal y la volatilización de los componentes que forman los AE [14].

1.2. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) aprovecha las propiedades de transporte y la solubilidad que tienen algunos solventes, al alcanzar o sobrepasar

su punto crítico, para mejorar la obtención de extractos. Estos fluidos poseen algunas características como alta difusividad, compresibilidad, baja viscosidad y ausencia de tensión superficial, que los convierten en un buen sustituto de los solventes usados comúnmente en procesos extractivos [15].

Los fluidos supercríticos poseen una extractividad selectiva que es afectada por cambios en la temperatura y la presión. El cambio de estas variables es aprovechado para mejorar la solubilidad de ciertas familias de compuestos y enriquecer extractos en algunos metabolitos específicos, en un proceso denominado fraccionamiento. En la extracción de lípidos, esta selectividad es utilizada para la obtención de compuestos minoritarios de valor agregado como escualeno, tocoferoles y fitoesteroles. Por otro lado, la extracción en matrices vegetales, como salvia y romero, se aprovecha para la obtención de una gran gama de compuestos con aplicaciones antioxidantes. Sin embargo, su uso industrial es limitado debido a su alto costo de operación [15, 16].

Las matrices vegetales contienen metabolitos que varían desde bajas hasta altas polaridades y presentan un amplio rango de masas moleculares. Comúnmente, se emplea CO₂ como fluido supercrítico, ya que posee una mayor afinidad hacia sustancias apolares y levemente polares, de masas moleculares pequeñas. Es común encontrar en los extractos, con mayor frecuencia, terpenos y lípidos [2]. Debido a la relativa facilidad para alcanzar las condiciones críticas del CO₂, la SFE permite la obtención de compuestos termolábiles [15].

Dentro de los compuestos medianamente solubles en CO₂ supercrítico, se pueden contar algunos ácidos grasos, alcoholes, cafeína, nicotina y colesterol [2]. Para la extracción de metabolitos polares, se emplean modificadores o co-solventes; normalmente, son compuestos de elevada polaridad, en algunos casos alcoholes [15, 16].

Dentro de los parámetros operacionales, es posible optimizar la temperatura, el tiempo de extracción, el flujo de CO₂ y la presión. Las condiciones de secado y el tamaño de partícula pertenecen a las variables de pretratamiento del material vegetal, que pueden afectar el rendimiento de extracción [16].

En la obtención de extractos vegetales, los métodos tradicionales de extracción sólido-líquido requieren tiempos prolongados de operación, grandes cantidades de solvente y presentan algunas dificultades en la separación y limpieza final del extracto. En la SFE, el fluido empleado posee una mejor penetración y difusividad en el material vegetal. La baja tensión superficial que poseen estos fluidos permite su ingreso a través de los poros de matrices heterogéneas, lo que reduce tiempos de extracción y aumenta rendimientos [2].

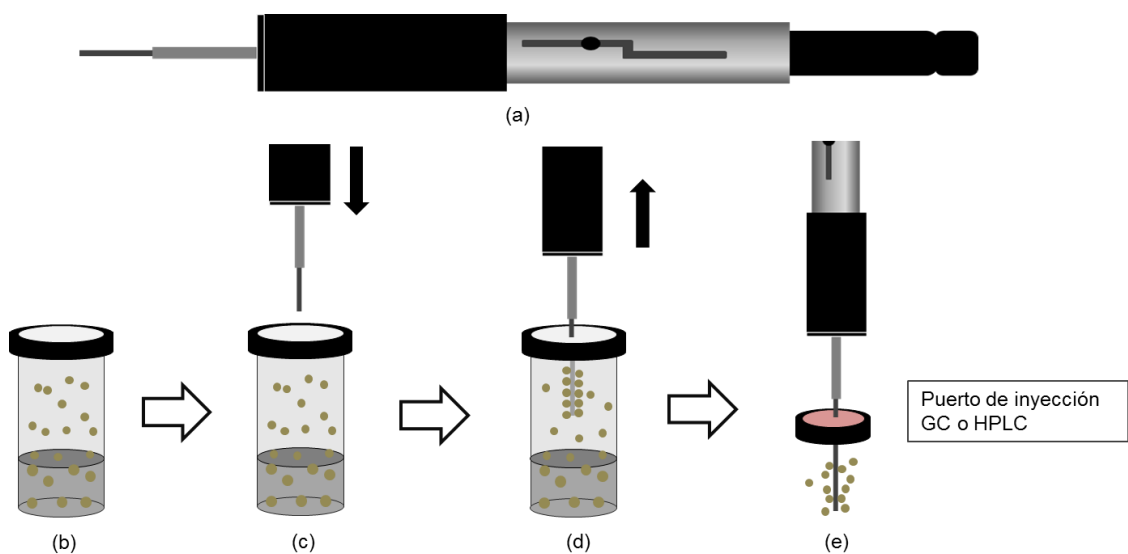
1.3. MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

El proceso de preparación de la muestra es parte crucial de la cadena analítica. Consume gran parte del tiempo empleado para el desarrollo de métodos, es una de las etapas donde ocurre la pérdida más grande de analitos y cada paso extra, aumenta la posibilidad de contaminación [17].

Debido a estas desventajas, presentes en la mayoría de las técnicas tradicionales, existe la necesidad de desarrollar métodos simples, eficientes y económicos, que faciliten el monitoreo y la evaluación de muestras [18, 19]. Como parte de la solución a esta problemática, se desarrolló la micro-extracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés). Esta técnica, perteneciente a la familia de técnicas “*solvent free*” y “*headspace*”, ha tenido gran aceptación en el campo científico, a tal punto que su aplicación se ha extendido al análisis de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles presentes en muestras ambientales, biomédicas, forenses, alimentos, bebidas y productos naturales [18, 19].

En esta técnica, se utiliza una fibra de sílice recubierta con un material polimérico orgánico, que puede ser líquido o sólido. Puede ser utilizada en tres modalidades a saber: inmersión en matriz, en espacio de cabeza (HS-SPME) o con el uso de membrana protectora [19]. En la **Figura 2** (a), se observa el dispositivo usado para el análisis por HS-SPME. Una pequeña porción de la muestra se deposita en un recipiente cerrado (b) dejando un espacio de cabeza (HS). El HS se deja saturar, preferiblemente, hasta alcanzar el equilibrio químico entre la fase gaseosa y la matriz (c). Cuando la fibra se suspende en el HS, los analitos que se encuentran en fase vapor sufren fenómenos de adsorción y/o absorción en el recubrimiento de la fibra (d). Una vez alcanzado el tiempo de sorción estipulado, la fibra se expone en el puerto de inyección del cromatógrafo para la desorción y análisis de los compuestos (e) [19].

Figura 3. Esquema principal del montaje para micro-extracción en fase sólida. Adaptación de Stashenko *et al.* [17]. a) Dispositivo para la extracción por SPME, b) Saturación de espacio de cabeza, c) Equilibrio químico, d) Saturación de la fibra, e) Desorción de la fibra.



Zhang y colaboradores [19] describieron el fenómeno extractivo, partiendo de un sistema de tres componentes en el que intervienen: el recubrimiento de la fibra, la

matriz y el HS. La cantidad de los analitos adsorbidos o absorbidos dependerá, entre otros factores, de la cinética del equilibrio que posean en estas tres fases y de su difusividad en el recubrimiento de la fibra [18-20]. El muestreo en el HS permite eliminar las interferencias debidas a impurezas presentes en la matriz y facilita el trabajo con muestras sólidas [19]. No obstante, la naturaleza de los analitos *target* y la complejidad de la matriz determinarán la dificultad para lograr una extracción adecuada [18].

Es importante tener en cuenta el tipo de matriz sobre la que se realizará la extracción; se ha demostrado que ésta tiene un efecto significativo sobre la cantidad de analitos que se extraen. Entre las variables a estandarizar, para lograr mejores resultados, se encuentran: la agitación, reducción del volumen del HS, tiempo de pre-equilibrio, temperatura, grosor de la fibra, tipo recubrimiento, adición de sales, entre otras [19, 20].

La SPME combina la extracción, la concentración y la transferencia de analitos en un único paso. El método puede hacerse selectivo si se eligen, adecuadamente, el modo de exposición, el tipo de fibra, el sistema de análisis, el uso o no de agentes derivatizantes, entre otros factores [17, 19, 21]. Hoy por hoy, se ha convertido en una técnica económica, sensible, selectiva, rápida, limpia y automatizable, presente en campos que van desde la búsqueda de nuevos analitos, hasta el monitoreo de la calidad en reacciones industrializadas [21].

1.4. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS

1.4.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) pertenece a la familia de las técnicas de separación. Su funcionamiento está relacionado con la separación de los

componentes de una mezcla en dos fases: una fase estacionaria (f.e.), que puede ser líquida o sólida, y una fase móvil, que consiste en un gas de arrastre [22]. Los compuestos de la mezcla deben distribuirse de forma asimétrica entre las dos fases, separándose de acuerdo con su constante de distribución (K_D). Siempre y cuando ésta constante sea diferente para cada uno de los compuestos analizados, estos tendrán un orden de elución diferente, que dependerá de su afinidad con la fase estacionaria [23, 24].

Es importante resaltar que la K_D depende de la naturaleza del analito, la naturaleza de las fases y la temperatura a la que se encuentre la columna cromatográfica. En la cromatografía de gases, el factor más importante es la temperatura, la fase móvil no interactúa con el analito y la fase estacionaria genera el efecto fundamental en la separación [24].

Debido a la compleja composición de los AE y al rango de masas al cual pertenecen sus componentes, la GC es la herramienta analítica adecuada para su análisis. Su uso permite obtener criterios para caracterizar aceites esenciales, estimar su calidad o descubrir nuevos compuestos [25].

El objetivo general, al aplicar la GC, es lograr una resolución completa de los compuestos de interés, en el menor tiempo posible [13, 25]. Sin embargo, la complejidad de los AE, que incluyen diversas formas isoméricas y una gran cantidad de estructuras derivadas de los terpenos, implica que la separación y determinación del número total de sus componentes podría ser una tarea prolongada y difícil [25].

El análisis de un AE requiere el uso de columnas con fases estacionarias que posean polaridades diferentes. En las columnas polares, el criterio de separación se fundamenta en la diferencia del momento dipolar de las moléculas, mientras que en columnas apolares, se relaciona con el punto de ebullición [1, 13, 22].

En la cromatografía de gases, se emplean los índices de retención lineal (IRL), como criterio de identificación. Éstos se determinan, teniendo en cuenta el tiempo de retención del analito de interés y los tiempos de retención de dos n-parafinas que eluyen antes y después del analito [1]. Teóricamente, los IRL sólo dependen de la polaridad de la fase estacionaria; por lo tanto, el análisis de AE a través de columnas de diferente polaridad permite tener más de un criterio de comparación, lo que aumenta la confianza de los resultados al momento de asignar compuestos a picos cromatográficos [13]. Al emplear detectores, como el detector de ionización en llama (FID, por sus siglas en inglés), o el detector de conductividad térmica (TCD), los IRL son el único criterio para la asignación de picos.

Cuando los parámetros cromatográficos y espectroscópicos de los compuestos analizados corresponden con aquellos registrados en la literatura, la identificación se considera tentativa. Para lograr una identificación confirmatoria, es necesario disponer del patrón certificado de la sustancia a identificar y obtener los datos a comparar bajo las mismas condiciones analíticas [1, 17].

1.4.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El método más sencillo de identificación de metabolitos secundarios es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), que consiste en la comparación de los espectros de masas de los analitos de la muestra, con los obtenidos o referenciados en diferentes bases de datos [13].

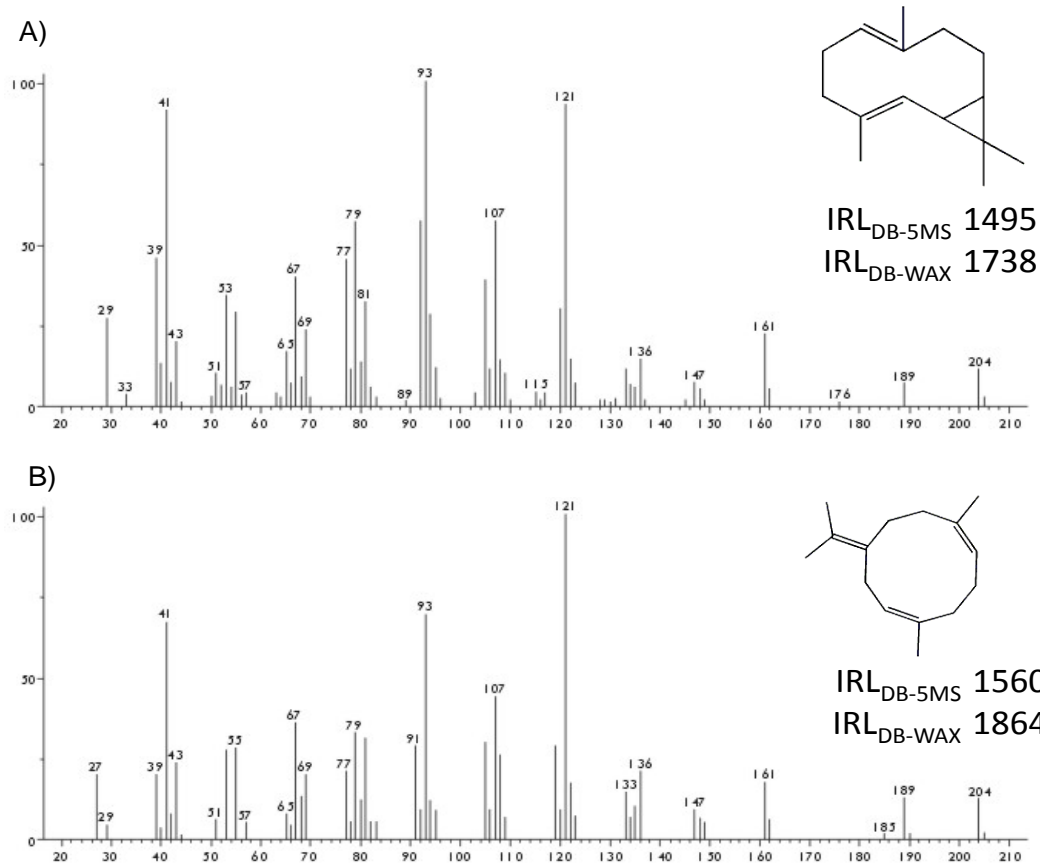
La espectrometría de masas tiene como principio fundamental la ionización de moléculas, para su posterior análisis, según su relación masa carga (m/z) [26]. Esta ionización puede ocurrir en fase condensada o en fase gaseosa y existen diferentes mecanismos para que se lleve a cabo. Algunos son: la adición o substracción de electrones, protonación o deprotonación, adición electrofílica, formación de *clusters*, entre otros [27, 28].

Uno de los mecanismos de ionización más comunes, es la ionización por impacto de electrones (EI). En la espectrometría de masas con EI, las moléculas a analizar son “bombardeadas” con electrones acelerados bajo un campo de 70 eV. La energía transferida a la molécula, al entrar en contacto con los electrones acelerados, supera su potencial de ionización generando el ión molecular. La mayoría de los iones moleculares que se generan poseen energía en exceso, ésta energía es suficiente para romper enlaces químicos y producir iones fragmento que serán analizados posteriormente. Las corrientes iónicas parciales son detectadas y, finalmente, se obtiene el espectro de masas, del que es posible obtener información sobre la masa molecular, fragmentos estructurales, grupos funcionales y su distribución en la molécula [26-28].

La GC-MS tiene la ventaja de que muchas de las moléculas presentes en los AE poseen espectros de masas únicos. Sin embargo, una de sus limitaciones radica en que no todos los tipos de isómeros pueden ser diferenciados a través de sus espectros de masas. Los terpenos, por ejemplo, poseen estructuras moleculares similares entre sí, por lo que un buen grado de coincidencia con los espectros reportados en la literatura, no siempre conduce a una identificación correcta [8, 13, 17].

Durante el proceso de ionización, fragmentos de moléculas diferentes pueden reorganizarse y formar estructuras moleculares idénticas que, por supuesto, producirán el mismo patrón de fragmentación [1]. En la **Figura 3**, se puede observar la similitud entre los espectros de masas de los sesquiterpenos biclogermacreno y germacreno B [13]. En estos casos, es común aprovechar los índices de retención, en columnas de diferente polaridad, como criterios de identificación, además del espectro de masas [1].

Figura 4. Espectros de masas e IRL, en columnas polar y apolar, de A) biciclogermacreno y B) germacreno B [29].



1.5. RADICALES LIBRES

Los radicales libres (RL) son especies químicas que poseen electrones desapareados, alta reactividad y tiempos de vida media muy cortos [30]. Estas especies, que en los seres vivos pueden ser generadas bajo condiciones fisiológicas o patológicas, cumplen un papel importante en el desarrollo y en la evolución de las especies [31].

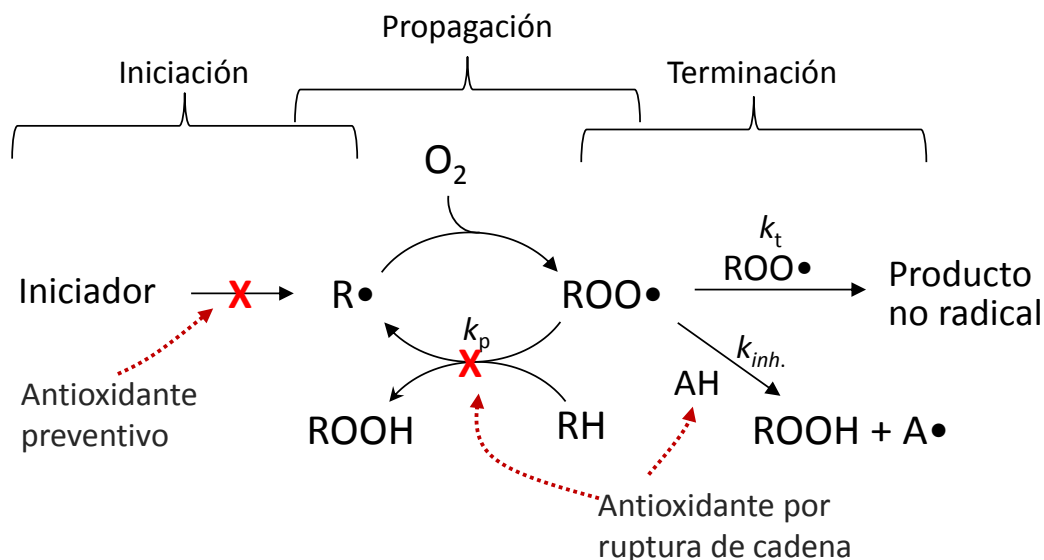
El radical oxígeno (O_2) es importante por su participación en la transducción de señales, en la transcripción genética y en la regulación de enzimas como la

guanilato ciclasa. Otro de los radicales con efectos benéficos en el organismo es el óxido nítrico (NO), involucrado en muchas de las funciones celulares como señalizador molecular [32].

El esquema mostrado en la **Figura 4** generaliza el proceso de autoxidación en presencia de especies reactivas de oxígeno. El proceso es iniciado por algunas especies radicales que, independientemente de su estructura de origen, tienen la capacidad de reaccionar con el sustrato (RH) removiendo un átomo de hidrógeno y generando el radical alquilo (R^{\bullet}). Este radical reacciona con el oxígeno (O_2) para formar un radical peroxilo (ROO^{\bullet}). En una serie de reacciones cíclicas, conocidas como pasos de propagación de la reacción en cadena radicalaria, los radicales peroxilo atacan a otras moléculas del sustrato para generar hidroperóxidos (ROOH) y nuevos radicales. La reacción se repite en varias ocasiones, hasta que dos especies radicales se unen generando un producto no radical; a este paso se le conoce como paso de terminación [33].

A pesar de los beneficios y su papel importante en el organismo, al actuar en concentraciones fisiológicas, los RL en exceso producen estrés oxidativo; bajo estas condiciones, ocurre un desequilibrio entre las especies oxidantes y el sistema de defensa del cuerpo. Los RL que se forman producen daños en proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, generando efectos nocivos que aumentan la posibilidad de desarrollar enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, cáncer y envejecimiento prematuro [31,32, 34].

Figura 5. Esquema general del mecanismo de auto-oxidación de un hidrocarburo y protección antioxidante. Tomado de Amorati *et al.* [33]



1.6. ANTIOXIDANTES

De manera general se define a los antioxidantes como “*especies químicas que, aun estando en concentraciones bajas comparadas con las de un sustrato oxidable, reducen significativamente, previenen o reparan la oxidación de ese sustrato*” [35]. Amorati *et al.* [33] los definen como moléculas capaces de reaccionar con RL o que poseen el poder reductor necesario para reparar el daño causado por el estrés oxidativo, estando en concentraciones por debajo del 1% con respecto a la matriz oxidable.

Los antioxidantes se dividen en dos grandes grupos, a saber: 1) Antioxidantes directos, aquellos capaces de disminuir o detener la reacción en cadena radicalaria, y 2) Antioxidantes indirectos, aquellos que no tienen un efecto directo en la protección de las moléculas, pero estimulan el incremento en las defensas antioxidantes de los sistemas vivos, induciendo la expresión de enzimas con actividad antioxidante [33].

A su vez, los antioxidantes directos se dividen en cuatro grupos. Los antioxidantes preventivos, que intervienen en el paso de iniciación de la reacción radicalaria retardando la formación inicial de especies radicales; un ejemplo de ellos son los agentes quelantes de metales. Los antioxidantes por ruptura de cadena o “*chain-breaking*”, que poseen una alta velocidad de reacción con los radicales peroxilo, mayor que la que posee el sustrato oxidable, y forman productos que no propagan la reacción de oxidación, como se pudo observar en la **Figura 4** (Sección 1.5). Los antioxidantes por mejora en el paso de terminación o “*termination-enhancing*”, que sufren reacciones de auto-oxidación; sin embargo, se caracterizan por tener un proceso de terminación bastante rápido; al mezclarlos con un sustrato oxidable, disminuyen la eficiencia total de la reacción de oxidación [33, 35, 36]. Por último, encontramos los antioxidantes de reparación o enzimas *de-novo*, que consisten en complejos enzimáticos encargados de la reparación de daños en el ADN, proteínas, lípidos y peróxidos, y que detienen la cadena de propagación de la reacción oxidativa [36].

Cuando las especies reactivas de oxígeno se generan *in vivo*, muchos antioxidantes pueden participar en el proceso de defensa. La efectividad de los antioxidantes, en dicho caso, está ligada al tipo de especie química que inicia la reacción, cómo, dónde y en qué tipo de sustrato actúa. Por ejemplo, el ácido ascórbico previene la peroxidación lipídica causada por el humo del cigarrillo, pero su efectividad es baja en la protección de proteínas plasmáticas [35].

Existe un amplio espectro de compuestos que se emplean como antioxidantes en las industrias alimenticia y cosmética, provenientes tanto de fuentes naturales como de la síntesis química; en general, se encuentran, compuestos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides, proteínas, productos de reacción de Maillard, fosfolípidos y esteroides [37]. Debido a la capacidad que poseen algunos de los antioxidantes sintéticos comunes, como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), para promover la proliferación de tumores, en algunos

mamíferos, existe interés general por encontrar nuevos antioxidantes provenientes de fuentes naturales [35, 38].

Algunos AE, especialmente aquellos con una concentración significativa de compuestos fenólicos, exhiben actividad antioxidante similar a la alcanzada con el BHT y BHA. Estudios realizados en los AE de especies como *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* [33], *Lippia alba* y algunas especies cultivadas en Colombia [39], demuestran que, las fuentes naturales de antioxidantes tienen una aplicación potencial para su uso en matrices alimenticias y esto promueve el desarrollo de nuevos estudios en campos como la química de alimentos y la medicina alternativa [33,39].

1.7. ENSAYO DE CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE LOS RADICALES OXÍGENO

De acuerdo con las reacciones involucradas en los ensayos de capacidad antioxidante se encuentran dos mecanismos de acción generales: por transferencia de átomo de hidrógeno (TAH) y por transferencia de electrón (TE). [40,41]

La mayoría de los ensayos TAH aplican reacciones competitivas en las cuales el sustrato y la muestra, que se supone posee capacidad antioxidante, compiten por reaccionar con los radicales peroxilo generados a través de la composición térmica de azocompuestos. Por su parte, los ensayos TE miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, monitoreando cambios de coloración durante la reacción [40].

El ensayo de capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC), pertenece a los ensayos del tipo TAH. Puede ser aplicado tanto a antioxidantes hidrofóbicos como

a hidrofílicos [40, 42]. Otras de sus ventajas son, la combinación de tiempo y grado de inhibición para la cuantificación de la actividad antioxidante; es un ensayo semi-automatizable y permite monitorear varias muestras en simultáneo [43].

En el método ORAC, la pérdida de la fluorescencia de la fluoresceína es un indicador de la extensión del daño causado por los radicales peroxilo [43]. El efecto protector de un antioxidante es determinado por la evaluación del área bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína (FL), comparada con la de un blanco en el cual no hay antioxidantes presentes [40].

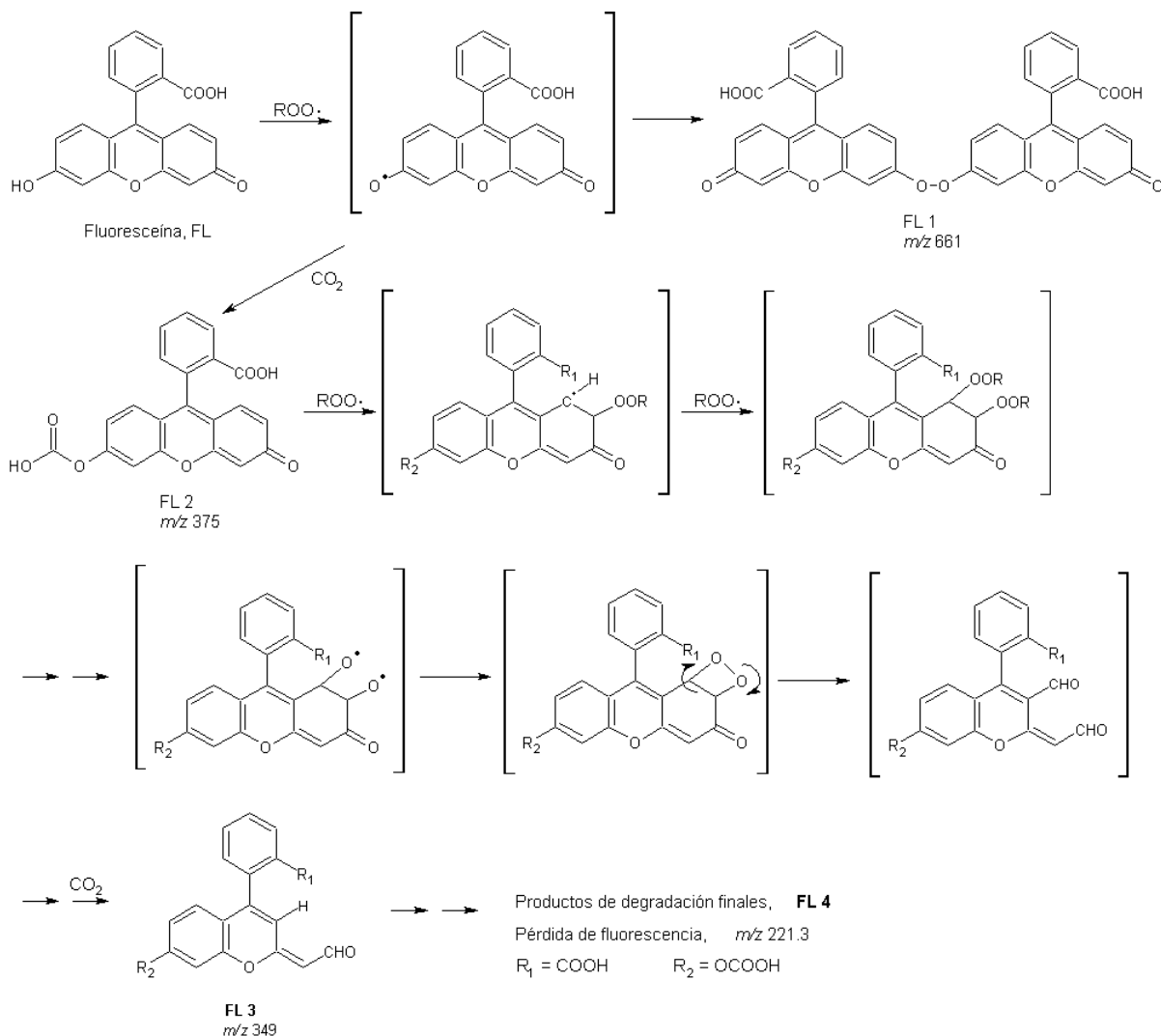
Ou *et al.* [5] elucidaron que este ensayo es del tipo TAH, identificando los productos oxidados de la FL por LC-MS; además describieron el proceso de peroxidación de la FL explicando la pérdida de fluorescencia, como se muestra en la **Figura 5**.

El primer paso en la oxidación de la **FL** consiste en el retiro de un átomo de hidrógeno del grupo fenol, por acción del radical peroxilo, lo que forma el radical fenoxilo; este puede formar dímeros de **FL1** (m/z 661), o bien, puede reaccionar con el CO_2 para formar el producto oxidado **FL2** (m/z 375). Un nuevo ataque de los radicales peroxilo sobre los dobles enlaces de la **FL2** produce un intermediario endoperóxido, que se descompone para formar **FL3**, (m/z 349). Como resultado de continuar la oxidación sobre **FL3** aparece el producto mayoritario **FL4** (m/z 221) que no posee emisión en el mismo rango que la **FL**, 515 nm [5].

Como fuente de radicales peroxilo, se emplea un azo-iniciador, el hidrocloreuro de 2,2'-azobis(2-aminopropano) (AAPH), el cual se adiciona a la muestra incubada a 37 °C y previamente mezclada con FL.

Es importante tener en cuenta que el ensayo ORAC no representa una prueba de la actividad antioxidante total de una muestra. Para elucidar un perfil completo de la actividad antioxidante, es necesario desarrollar diferentes métodos que actúen sobre las diferentes especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [5, 40, 41].

Figura 6. Mecanismo de oxidación de la fluoresceína en presencia de los radicales peroxilo, propuesto por Ou *et al.* [5]. FL1 (m/z 661), FL2 (m/z 375), FL3 (m/z 349), FL4 (m/z 221).



1.8. GÉNERO *PIPER*

La familia Piperaceae comprende, según Samuel y Morawetz [44], entre 10 y 12 géneros diferentes. Según los autores, esta imprecisión se debe a la dificultad de establecer límites genéricos y a las discrepancias entre diferentes autores al momento de establecer criterios taxonómicos. Las plantas pertenecientes a esta familia se encuentran en climas cálidos, medios o fríos, y comprenden una gran cantidad de hierbas y, más frecuentemente, arbustos. Una de sus principales características consiste en la formación de inflorescencias espigadas y frutos en baya [4]. Los géneros más representativos de la familia Piperaceae son: *Piper*, *Peperomia*, *Trienopiper*, *Pothomorphe* y *Ottonia*. De éstos, *Piper* presenta una cantidad de especies mayor que 700, solo en Suramérica, por lo que se considera uno de los géneros más extensos de las angiospermas [4, 44].

El género *Piper* está conformado por arbustos, hierbas y lianas, y es fácilmente identificable por sus caracteres reproductivos, que consisten en inflorescencias muy densas que pueden encontrarse en posición axilar o terminal; la dimensión de éstas varía entre 3 y 150 cm de longitud y pueden ser erectas o colgantes [45]. Su categoría taxonómica se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Categoría taxonómica del género *Piper*

Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae
Género	<i>Piper</i>

Las especies del género *Piper* se encuentran distribuidas en diversas zonas del planeta con climas tropicales. La mayor diversidad de estas especies, se concentra en las regiones tropicales de Centro y Sur América. Otra región del

mundo con abundancia de especies de este género es Asia meridional, donde se han registrado más de 300 especies algunas de las cuales son de importancia económica elevada [5,45].

1.8.1. *Piper cumanense* Kunth

La especie *P. cumanense*, se encuentra en algunos países de Centro y Sur América, como Costa Rica, Brasil, Colombia y Ecuador [46]. Este arbusto leñoso alcanza hasta tres metros de altura y crece en elevaciones entre los 500 y 1500 m.s.n.m. [47]. Sus hojas son aromáticas, lisas, opuestas y con margen levemente aserrado; además, posee entrenudos conspicuos e inflorescencias en amento (ver **Figura 6**).

Figura 7. Fotografía de *Piper cumanense* [Tomada por Nelson Contreras, 2014]



En la medicina local, se emplea para el tratamiento de síntomas de la malaria. La actividad antimalárica, se ha demostrado, *in vitro*, en el trabajo de Garavito *et al.* [48], quienes estudiaron el extracto etanólico de la especie. También, se ha estudiado su actividad antifúngica y la de diferentes compuestos aislados de sus inflorescencias [46, 47].

1.8.2. *Piper eriopodon* Miquel

Éste arbusto, conocido localmente como cordoncillo, alcanza hasta 4 m de altura, es ramificado, posee tallos glabros, verdes y lignificados con entrenudos conspicuos. Sus hojas son simples, opuestas, con venaciones pronunciadas y escamosas al tacto. Posee inflorescencias axilares en amento, que alcanzan una longitud entre 7 y 9 cm (ver **Figura 7**).

Se utiliza en la medicina folclórica por sus propiedades analgésicas, antirreumáticas y diuréticas. También, se usa en el tratamiento de cálculos renales, afecciones bronquiales y como antídoto contra mordeduras de serpiente.

Figura 8. Fotografía de *Piper eriopodon* [Tomada por Nelson Contreras, 2014]



Los estudios realizados con la especie *P. eriopodon* han demostrado que su aceite esencial, que posee actividad antifúngica, está compuesto principalmente por dilapiol, *trans*- β -cariofileno, β -selineno y 10-*epi*-cubebol [49]. Para el extracto etanólico de sus hojas, que también posee actividad antifúngica [49], se han demostrado citotoxicidad sobre *Artemia franciscana* [50] y actividad herbicida [51].

1.8.3. *Piper peltatum* L.

Esta especie es conocida localmente como congo, anisillo, hoja de rayo o Santamaría; en algunas regiones de la amazonia es llamada malvarisco o caapeba. Se encuentra distribuida desde el oriente de la India hasta Sur y Centroamérica [52]. Alcanza, aproximadamente, 3 m de altura y posee tallos verdes, glabros y con nodos conspicuos. Sus hojas son anchas redondeadas, tomentosas, alternas y con peciolo alargado. Cuenta con inflorescencias axilares, agrupadas y erectas (ver **Figura 8**).

Figura 9. Fotografía de *Piper peltatum* [Tomada por Nelson Contreras, 2014]



Es ampliamente utilizada en la medicina folclórica por sus propiedades como antiinflamatoria, coagulante, diurética [52], antiviral [53], vermífuga, antimicrobial, antimalárica y estimulante del sistema linfático [54, 55]. Sus extractos, metanólico y etanólico, poseen una alta capacidad antioxidante [55, 56]. Silva *et al.* [57] demostraron que esta actividad está ligada a la presencia del 4-nerolidilcatecol, un efectivo antioxidante presente en las raíces, hojas e inflorescencias de la especie *P. peltatum*.

Según Pino *et al.* [58], el aceite esencial de *P. peltatum* se compone, principalmente, de óxido de cariofileno, espatulenol, *trans*-calameneno y α -copaeno. Otros autores reportaron la presencia de β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, *trans*-nerolidol y *cis*-calameneno como componentes principales [52].

1.8.4. *Piper marginatum*

La especie *P. marginatum*, se conoce comúnmente como aguardientillo, corazón de la Virgen, hoja de raya o anisillo. Se encuentra distribuida en Centro y Suramérica, y es empleada ampliamente por tribus nativas de la región amazónica de Brasil. Este arbusto, de aproximadamente 1 m de altura, posee hojas acorazonadas alternas, con margen entero, nervadas y membranosas; la longitud de éstas varía entre 8 y 15 cm [59]. Su tallo principal es verde y glabro; además posee inflorescencias axilares en amento (ver **Figura 9**).

Figura 10. Fotografía de *Piper marginatum* [Tomada por Nelson Contreras, 2014]



Sus usos en la medicina folclórica varían según la región en que se encuentre. En algunas regiones de Colombia, es utilizada como analgésico, antiinflamatorio y

hemostático. En la región amazónica de Brasil su infusión se emplea en el tratamiento de disfunciones vesiculares y del hígado; también es usada para aliviar dolores dentales y como antiinflamatorio [60, 61]. En algunas regiones, sus frutos sustituyen a la pimienta negra como saborizantes [60].

Su aceite esencial y su extracto etanólico presentan actividad antifúngica e insecticida [60, 62, 63]. La composición química de los aceites esenciales de 22 plantas de esta especie, fue evaluada por Andrade *et al.* [59], quienes identificaron 7 quimiotipos, cuyos componentes principales fueron α -pineno *trans* y *cis*- β -ocimeno, 3,4-dioximetil-propiofenona, β -cariofileno y germacreno D.

1.8.5. *Piper dilatatifolium* Trel & Yunck

Este arbusto, conocido con el nombre de cordoncillo, se encuentra distribuido en Suramérica y en la parte oriental de la India. Alcanza alturas entre 2 y 3 m, posee tallos verdes y glabros con entrenudos conspicuos [64]. Sus hojas son ovaladas, simples y alternas; con margen interno y venación pronunciada. Sus inflorescencias, axilares en amento, alcanzan longitudes entre 5 y 7 cm (ver **Figura 10**).

Figura 11. Fotografía de *Piper dilatatifolium* [Tomada por Nelson Contreras, 2014]



En la etnomedicina local, se emplea por su actividad contra cálculos del riñón y afecciones bronquiales. Además, se le atribuyen propiedades como antirreumática, diurética y estimulante. Silva *et al.* [65] demostraron la eficacia de la especie *P. dilatatifolium* en la inhibición de germinación del hongo *Crinipellis perniciososa*, causante de la enfermedad “escoba de bruja”, que afecta cultivos de cacao. Terreaux *et al.* [66] evaluaron la actividad antifúngica de la especie, trabajaron con 6 derivados del ácido benzoico y 3 chalconas del extracto de las hojas aisladas en diclorometano; según sus resultados, 4 de estos compuestos presentaron actividad antifúngica.

Se han reportado estudios en los que se evalúa la composición química del AE de hojas de *P. dilatatifolium*. Uno de ellos es el presentado por Cysne *et al.* [67] quienes reportaron la presencia de α -felandreno, δ -3-careno, biciclogermacreno y *trans*-cariofileno, como componentes principales. Por otra parte, Andrade *et al.* [64] estudiaron la composición de 12 aceites esenciales obtenidos de muestras diferentes de *P. dilatatifolium*, recolectadas en la región amazónica de Brazil; dentro de los componentes principales identificaron germacreno D, espatulenol, *trans*- α -bisaboleno, biciclogermacreno, β -elemeno, limoneno y α -felandreno, como compuestos frecuentes en los aceites esenciales analizados.

1.8.6. Piper subflavum var. espejuelanum (C. DC.) Trel & Yunck

Los estudios acerca de la especie *P. subflavum* son escasos, en la literatura solo se encuentran reportes de georreferenciación. Según los datos disponibles, esta especie se encuentra distribuida exclusivamente en Colombia, en la región del Cauca y a lo largo de la Cordillera Oriental, a alturas cercanas a los 1700 m.s.n.m. Debido a su uso local, se le atribuyen propiedades como antidiarréico, antihelmíntico, bactericida e insecticida. Se observó que esta hierba alcanza una altura de 1.5 m. Su tallo o eje principal presenta lenticelas. Además, posee hojas cordadas, simples y alternas (ver **Figura 11**).

Figura 12. Fotografía de *Piper subflavum* var. *espejuelanum* [Tomada por Nelson Contreras, 2014]

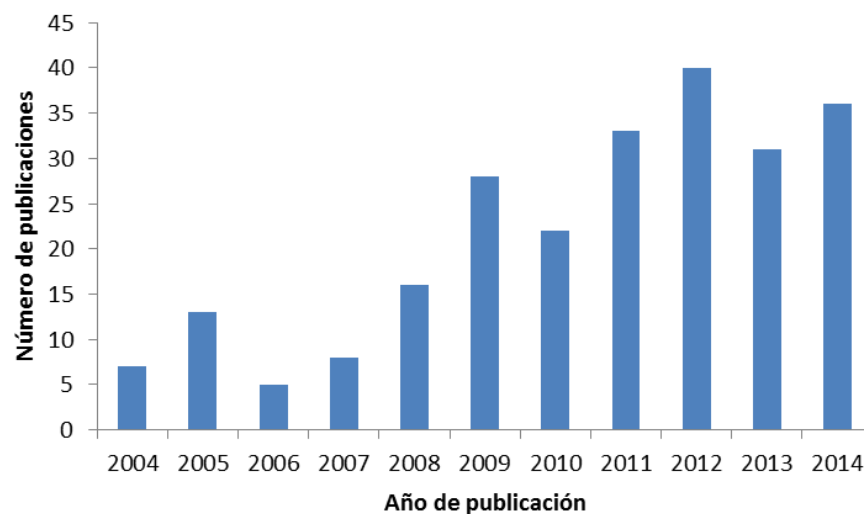


2. CIENCIOMETRÍA

Para evaluar el impacto científico y el interés en el género *Piper*, se realizó una búsqueda bibliográfica de las publicaciones enfocadas en estudiar la composición química de diferentes especies pertenecientes a este género, utilizando la base de datos *Scopus* (*Elsevier*) según la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY (piper) AND TITLE-ABS-KEY (chemical composition).

En la **Figura 12**, se observa que, entre los años 2004 y 2014, la cantidad de publicaciones enfocadas en el estudio de la composición química del género *Piper* aumentó de 5 a más de 30 registros anuales. Esto demuestra el interés científico creciente en el género. Los nuevos componentes activos aislados, y los resultados positivos de diferentes pruebas de bioactividad, permiten estimar que algunas de las especies del género *Piper* poseen un elevado potencial para su uso en diferentes campos, como la medicina, la ciencia y la industria.

Figura 13. Número de publicaciones anuales a partir del año 2000. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 2004-2014. Fecha de consulta: 30-12-2014. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (piper), AND TITLE-ABS-KEY (chemical composition).



Boll *et al.* [68] trabajaron con cerca de cuarenta especies del género y reportaron el aislamiento de diversas amidas de cadena corta, derivadas de la N-isobutilamida, con actividad insecticida. Resaltaron la presencia de otras moléculas como amidas heterocíclicas, lignanos y neolignanos. Parmar *et al.* [3] identificaron propenilfenoles, terpenos, chalconas, dihidrochalconas, flavonas y flavonoles.

En 1994, Jantan *et al.* [69] realizaron un estudio comparativo de la composición química de los AE obtenidos de cinco especies del género, a saber: *P. aduncum*, *P. lanatum*, *P. pedicellosum*, *P. penangense* y *P. betle*. En el AE de la especie *P. aduncum* determinaron la presencia de dilapiol (65%), además de una mezcla de monoterpenos y sesquiterpenos como constituyentes minoritarios. Los AE de las especies *P. lanatum*, *P. penangense* y *P. betle* poseían un mayor contenido en sesquiterpenos, contrario a la composición química del AE de *P. pedicellosum* cuyos componentes mayoritarios fueron monoterpenos. En sus conclusiones sugirió el uso de los AE como marcadores taxonómicos para la clasificación de especies, siempre y cuando no existan variaciones ontogenéticas o quimiotipos que interfieran en la diferenciación de éstas.

Dias *et al.* [70] estudiaron diez especies de la familia Piperaceae, de las cuales, siete pertenecían al género *Piper*; en todas ellas, reportaron, en común, la presencia de 13 sesquiterpenos y una cantidad menor de monoterpenos, en sus AE.

Por último, Nakatani *et al.* [6] evaluaron y compararon la actividad antioxidante y antimicrobial de los extractos de las especies *P. nigrum*, *P. retrofractum* y *P. baccatum*; determinaron que algunas amidas fenólicas, aisladas de dichos extractos, poseen una actividad antioxidante más efectiva que el α -tocoferol, similar a la de los antioxidantes sintéticos, BHA y BHT.

Usando la base de datos *Scopus* (*Elsevier*), con la ecuación de búsqueda, TITLE-ABS-KEY (Género especie), se evaluó el impacto científico de cada una de las especies recolectadas para este estudio.

Tabla 2. Número de publicaciones por especie. Fecha de consulta: 30-12-2014. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“Género especie”)

Especie	Publicaciones
<i>Piper cumanense</i>	5
<i>Piper eriopodon</i>	4
<i>Piper peltatum</i>	64
<i>Piper marginatum</i>	54
<i>Piper dilatatifolium</i>	12
<i>Piper subflavum</i>	0

En la **Tabla 2**, se observa el número de publicaciones reportadas. Las especies con el mayor número de publicaciones son *P. peltatum* y *P. marginatum* con 64 y 54 publicaciones respectivamente. Por otra parte, no se encontraron publicaciones para *P. subflavum*.

Para la especie *P. cumanense* no se reportan estudios enfocados en su aceite esencial o en determinar la composición química de su extracto; algunos de los estudios realizados evaluaron la actividad antimalárica de su extracto etanólico. Otros, determinaron la estructura de diferentes derivados del ácido benzoico y cromenos aislados de la especie.

En dos de las publicaciones encontradas para la especie *P. eriopodon*, se evaluaron la composición química de su aceite esencial, su actividad citotóxica y fungicida. También, se han realizado pruebas que evalúan la actividad herbicida

de extractos hidro-alcohólicos de la especie. Dentro de los resultados no se encuentran trabajos enfocados en evaluar la actividad antioxidante de extractos o aceites esenciales.

Dentro de las especies recolectadas, para este trabajo, *P. peltatum* ha sido la más estudiada; según la búsqueda realizada en las bases de datos, se han reportado 64 artículos para esta especie. Un 51% de las publicaciones pertenecen al área de la farmacología, el 37% a ciencias biológicas, el 31% a la medicina y el 21% de los resultados se enmarcan en el área de química. El interés en esta planta puede relacionarse con su amplio uso en la medicina folclórica y con su actividad comprobada como antimalárica, antibiótica y con la actividad antioxidante que presentan sus extractos. Se han hecho seis publicaciones enfocadas en el análisis del aceite esencial de *P. peltatum* y 15 en las que se evalúa la actividad antioxidante de sus extractos o algunos de los compuestos aislados de la planta.

P. marginatum cuenta con 52 publicaciones de las que un 60% pertenecen al área de agricultura y ciencias biológicas, el 40% a farmacología, el 19% a bioquímica y el 19% a química. Esta planta ampliamente utilizada en la selva amazónica por sus propiedades curativas y en algunos casos como sustituyente de la pimienta negra, ha sido estudiada ampliamente en Brasil, donde se reportan 26 publicaciones. En Colombia se han reportado cuatro trabajos enfocados en la especie o algunas de sus propiedades medicinales.

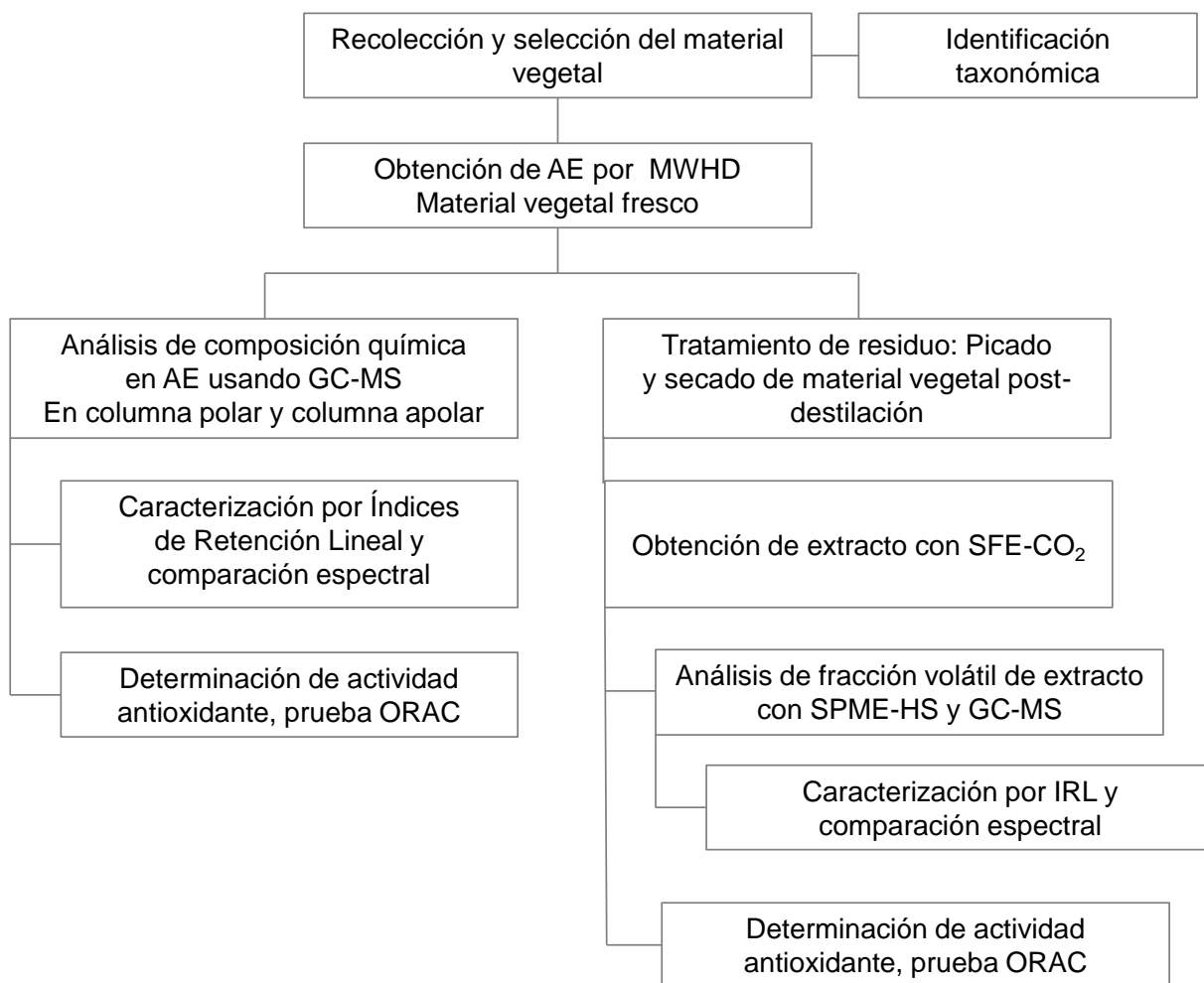
No se reportan resultados con la búsqueda *Piper dilatatifolium*. Sin embargo, este nombre corresponde a un sinónimo de *Piper dilatatum*. Al modificar la ecuación de búsqueda, se observan 12 resultados. Andrade *et al.* [64] estudiaron la variabilidad del aceite esencial para muestras de la especie, recolectadas en diferentes zonas de Brasil, y describieron la existencia de 7 quimiotipos. También, se encuentran reportes que describen la actividad antifúngica y citotóxica de extractos y aceites esenciales obtenidos de *P. dilatatifolium* (Syn: *P. dilatatum*).

Para la especie *P. subflavum*, no se reportan resultados en la literatura; además, no posee sinonimia como alternativa de búsqueda. Este trabajo constituye el primer reporte enfocado en la caracterización de su aceite esencial y en evaluar la actividad antioxidante de la especie.

3. METODOLOGÍA

El diagrama de flujo, que se presenta a continuación, resume las actividades elaboradas para el desarrollo de este trabajo.

Figura 14. Esquema representativo de la metodología



3.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL SILVESTRE

3.1.1. Permiso para recolección de material vegetal

La recolección de las especies silvestres se realizó según lo establecido en el Decreto 1376 del 2013 emitido por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo

Sostenible, “*por el cual se reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial*”, para la Unión temporal Bio-Red-Co-CENIVAM, en el marco del desarrollo del Programa “ *Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética, farmacéutica y de productos de aseo con base en la biodiversidad colombiana*”. Contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados para investigación científica con fines de prospección biológica No. 101 entre el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM.

3.1.2. Lugar de recolección del material vegetal

La expedición botánica, en la que se recolectaron muestras de 27 especies vegetales, se realizó entre el 14 y el 17 de julio del 2014. Los sitios escogidos para la colecta, ubicados en el departamento de Santander, pertenecen a las provincias de Soto, Mares y Guanentá. El sitio de recolección, al igual que la tipología del terreno, para las plantas seleccionadas, se observan en la **Tabla 3**. La recolección del material vegetal, se llevó a cabo por el biólogo Roberto Tulio González Mina, quien, además, agregó al registro algunos de los usos locales de las especies seleccionadas.

3.1.3. Selección del material vegetal

El material vegetal se recolectó teniendo en cuenta los siguientes criterios

- Olor aromático apreciable
- Plantas desarrolladas, preferiblemente en estado de floración o próximo a él.
- Especies fuera de riesgo de extinción.
- Especies con población local abundante.

Tabla 3. Sitio de recolección de las especies seleccionadas y características del terreno.

Coordenadas de colecta	Nombre común	Características del terreno	Ubicación
06°49'54,2" N 73°17'09,2" W	Cordoncillo	Vegetación que se desarrolla paralela a la vía, exposición moderada a la luz solar. Altitud 1647 m.s.n.m.	Vía Zapatoca-Cuchilla del ramo, km 8.
06°50'16,4" N 73°18'31,2" W	Cordoncillo	Crecimiento cercano a fuente hídrica, cercana a otras piperáceas, en suelo arcilloso y húmedo. Altitud 2152 m.s.n.m.	Vía Zapatoca – Cuchilla del ramo, km 8
06°50'08,0" N 73°18'54,8" W	Congo, anisillo, hoja de rayo, Santamaría	Crecimiento en zona intervenida semi-sombreada, cercana a fuente hídrica y rodeada de otras piperáceas. Altitud 2124 m.s.n.m.	Vía Zapatoca – Cuchilla del ramo, km 8
06°45'19,0" N 73°16'46,4" W	Aguardientillo, corazón de la Virgen, hoja de raya	Crecimiento en bosque secundario dentro de plantación densa, con humedad alta, rodeada de gramíneas. Altitud 1720 m.s.n.m.	Vía Zapatoca – La fuente, km 10
06°45'18,9" N 73°16'46,6" W	N.R.	Crecimiento en bosque secundario con humedades edáfica y ambiental altas. Altitud 1728 m.s.n.m.	Vía Zapatoca – La fuente, km 10
06°45'19,0" N 73°16'46,7" W	N.R.	Crecimiento aledaño a fuente hídrica, acompañada de vegetación de hábito arbustivo y herbáceo. Altitud 1725 m.s.n.m.	Vía Zapatoca – La fuente, km 10

*N.R. No se reportó nombre común para la especie

3.1.4. Identificación del material vegetal

La identificación de las plantas aromáticas recolectadas se llevó a cabo en el Herbario Nacional Colombiano (HNC), del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Las *exsiccatae* de las especies vegetales quedaron registradas según los números de colecta relacionados en la **Tabla 4** (Sección 4.1) y poseen un pliego testigo en el Herbario del Centro de Investigación CENIVAM.

3.1.5. Obtención de aceites esenciales

Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHd); para ello, se utilizó un equipo *Clevenger*, con reservorio de destilación *Dean-Stark*. Como sistema de calentamiento, se usó un horno doméstico *LG*, modelo MS1142X, con una potencia de salida de 1200 W y una frecuencia de radiación de 2.45 GHz (ver **Figura 14**).

Las hojas y tallos del material vegetal recolectado, aproximadamente 300 g por cada destilación, se picaron y depositaron en un balón de fondo redondo de 2 L y luego se humedecieron con agua (300 mL).

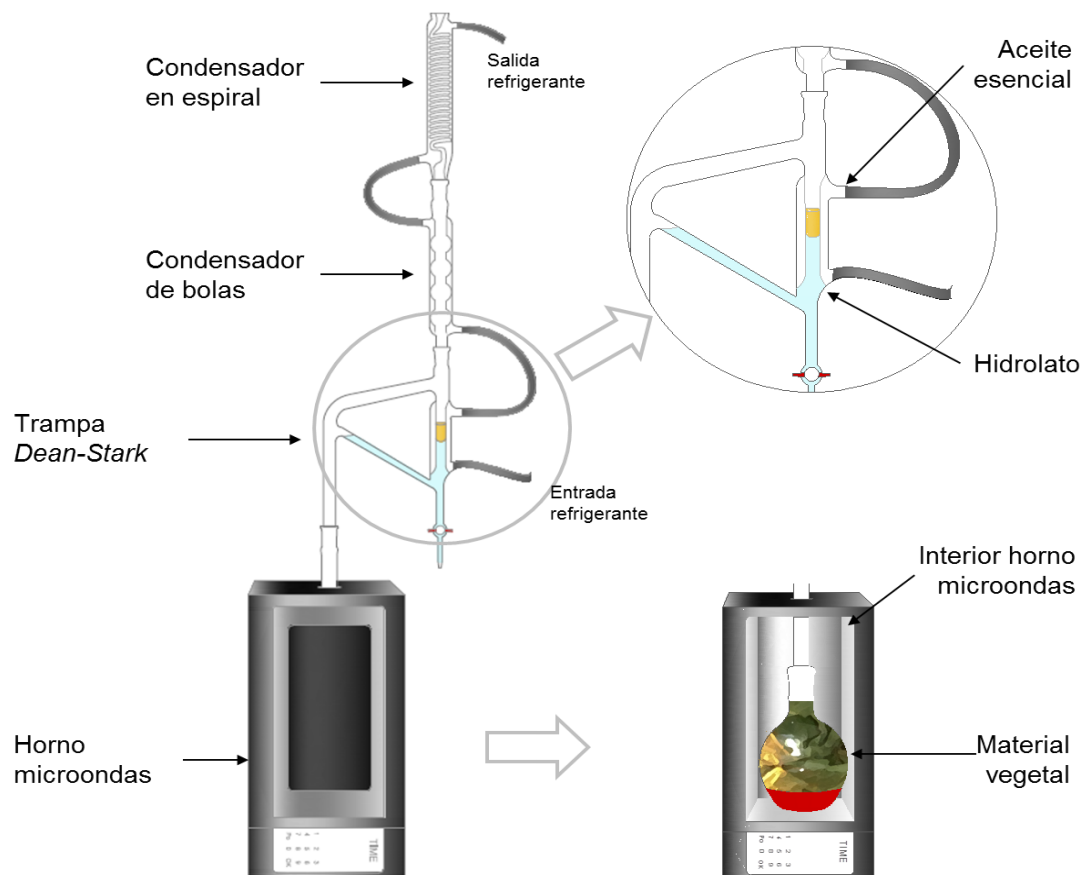
El horno microondas se programó para trabajar a un 50% de la potencia total de salida. El material vegetal, se calentó durante 45 min, en intervalos de 15 min, dejando un tiempo de reposo de 2 min entre intervalos [71].

Para evitar el daño causado por humedad, los AE obtenidos se secaron con Na_2SO_4 anhidro (J.T. Baker, Phillisburg, NJ, EE.UU.). Luego, se filtraron para eliminar residuos sólidos y se pesaron en una balanza *METTLER-TOLEDO* AL204. Posteriormente, fueron almacenados en ausencia de luz y refrigerados a 4 °C.

El rendimiento del AE obtenido (% p/p), se calculó aplicando la Ecuación 1, teniendo en cuenta el peso del material vegetal utilizado (W_{mv}) y el peso del aceite esencial recolectado (W_{AE}):

$$\text{Rendimiento (\% p/p)} = \frac{W_{AE}}{W_{mv}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Figura 15. Esquema del montaje de hidrodestilación asistida por radiación de microondas



3.1.6. Preparación de la muestra para la extracción con fluidos supercríticos

Después de su destilación, el material vegetal se secó en un horno a una temperatura de 60 °C, durante 5 días aproximadamente. Luego, las muestras se extendieron en bandejas y se llevaron a un vivero para continuar el proceso de secado hasta alcanzar una humedad máxima del 20% (ver **Figura 15**).

Una vez seco el material vegetal, se picó en un molino de cuchillas *Retsch* modelo SM100neu (Haan, Alemania), equipado con un tamiz de 1 mm, y se

almacenó en frascos de vidrio para su posterior extracción con CO₂ supercrítico (ver **Figura 16**).

Figura 16. Proceso de secado A) Vivero instalaciones CENVAM. B) Bandejas de secado de material vegetal. [Tomada por Rogerio Saavedra, 2014]



Figura 17. A) Molino de cuchillas Retsch SM100neu. B) Material vegetal seco y picado. [Tomada por Rogerio Saavedra, 2014]



3.1.7. Obtención de extractos con fluidos supercríticos

Para obtener los extractos se empleó un equipo *Thar SFE-2000-2-FMC50* (*Thar Instruments, Inc.*, Pittsburg, EE.UU.) equipado con un portamuestras en acero inoxidable con capacidad para 2 dm³ y dos colectores tipo ciclón. El control de temperatura, flujo y presión se realizó por medio de un computador, mediante el *software Process Suite Thar* (*Thar Technologies, Inc.* Pittsburg, EE.UU.). **Figura 17.**

Se depositaron, aproximadamente, 500 g del material vegetal, seco y picado, en el portamuestras del equipo. Como fluido supercrítico, se utilizó CO₂, a una temperatura de 40 °C y a una presión de 300 bar. La extracción se llevó a cabo durante un periodo de 2 h con un flujo de CO₂ de 30 g/min. Los extractos obtenidos se pesaron y luego se almacenaron, en frascos ámbar, a una temperatura de 4 °C, para su posterior análisis. El cálculo de los rendimientos se realizó teniendo en cuenta la **Ecuación 1.**

Figura 18. Equipo de extracción con fluidos supercríticos Thar SFE-200-2-FMC50. [Tomada por Rogerio Saavedra, 2014]



3.1.8. Análisis de aceites esenciales por GC-MS

Para la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los AE, se disolvieron 50 μL del aceite esencial y se aforaron a 1 mL con diclorometano. Las diluciones resultantes se almacenaron en viales de 2 mL.

El análisis se llevó a cabo en un equipo GC *Agilent Technologies 6890 Plus* (Palo Alto, California, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network*. Para la separación de los compuestos, se emplearon una columna cromatográfica con fase estacionaria (f.e.) polar de poli(etilenglicol) (DB-WAX, *J & W Scientific*, Folsom, California, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I., x 0.25 μm , d_f , y otra apolar, con f.e. de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, California, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I., x 0.25 μm , d_f (ver **Figura 18**).

Como gas de arrastre se empleó helio (99.995%, gas AP, Linde Bogotá), con una velocidad volumétrica de flujo de 1 mL/min. La temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C y el volumen inyectado fue de 2 μL , en modo de inyección *split* (1:30).

Para el análisis en columna polar (DB-WAX), la temperatura del horno inició en 50 °C durante 5 min, luego aumentó 4 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 150 °C y se mantuvo durante 7 min. Después, se aumentó la temperatura a 4 °C/min hasta 230 °C, y se mantuvo fija por 40 min.

En el análisis usando la columna apolar (DB-5MS), la temperatura del horno inició en 45 °C durante 5 min, luego aumentó 4 °C/min hasta alcanzar 150 °C manteniéndola fija por 2 min. Después, se incrementó 5 °C/min hasta alcanzar 250 °C, y se mantuvo fija por 5 min. Finalmente, se elevó hasta 275 °C a 10 °C/min, y se mantuvo a esta temperatura por 50 min.

Para la identificación tentativa de los compuestos, se calcularon los índices de retención lineales (IRL) en ambas columnas y se compararon con los reportados en la literatura [10]. Para el cálculo de los IRL, se emplearon los tiempos de retención de un patrón de n -parafinas, C₁₀-C₂₅, analizado bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras. El cálculo se realizó teniendo en cuenta la **Ecuación 2** [22].

$$IRL = (100 \times n) + 100 \left[\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde n es el número de átomos de carbono de la n -parafina que eluye antes del compuesto de interés; t_{RX} , es el tiempo de retención del compuesto de interés; t_{Rn} y t_{RN} , corresponden a los tiempos de retención de las n -parafinas que eluyen antes y después, respectivamente.

Figura 19. Cromatógrafo de gases GC Agilent Technologies 6890 Plus acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies MSD 5973 Network. [Tomada por Rogerio Saavedra, 2014]



Además de los IRL, como criterio de identificación, se utilizaron los espectros de masas obtenidos por impacto de electrones (EI) usando una energía de ionización de 70 eV, con los disponibles en las bases de datos Adams [10] NIST [72] y Wiley [73].

La cantidad relativa de cada compuesto, se calculó por medio de la **Ecuación 3**, en la que se tienen en cuenta el área cromatográfica del pico y el área cromatográfica total.

$$\% A_i = \frac{\text{Área cromatográfica del pico } i}{\text{Área cromatográfica total}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

3.1.9. Análisis de la fracción volátil de extractos SFE por HS-SPME con GC-MS

Se tomaron, aproximadamente, 50 mg de cada extracto y, se depositaron en un vial ámbar de 4 mL. El vial se calentó a 70 °C y se dejó un tiempo de 10 min para alcanzar el equilibrio térmico. Transcurrido este tiempo, se expuso una fibra de micro-extracción en fase sólida, recubierta con Carboxen®/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) de 75 µm de grosor, en el espacio de cabeza (HS) de la muestra. La fibra se expuso durante 30 min (tiempo de saturación), (ver **Figura 19**).

Una vez saturada la fibra, se desorbió en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases GC *Agilent Technologies 6890 Plus* acoplado a un espectrómetro de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network*. El análisis, se realizó usando las columnas polar (DB-WAX) y apolar (DB-5MS) descritas en la sección 3.1.8., y los IRL se calcularon, teniendo en cuenta los tiempos de retención de las *n*-parafinas inyectadas de forma manual, bajo los mismos parámetros cromatográficos usados para las muestras. La identificación de los compuestos, se realizó teniendo en cuenta los IRL de ambas columnas y los espectros de masas obtenidos por EI a 70 eV.

Figura 20. Montaje usado en el monitoreo de fracción volátil de extractos SFE por HS-SPME. [Tomada por Rogerio Saavedra, 2014]



Las muestras se inyectaron de forma manual, con una temperatura en el puerto de 250 °C, en el modo *split* (1:30) y con un flujo de gas de arrastre de 1 mL/min, a una velocidad promedio de 26 cm/s. La temperatura del horno, para la columna DB-5MS fue la siguiente: temperatura inicial de 45 °C durante 5 min; luego aumentó a 150 °C con una velocidad de 4 °C/min y se mantuvo estable por 2 min. Posteriormente, aumentó hasta 250 °C a 5 °C/min y se mantuvo por 5 min, para luego aumentar, a una velocidad de 10 °C/min, hasta alcanzar 275 °C, y finalizar a esta temperatura durante 50 min.

Para la columna DB-WAX, la programación de temperatura del horno inició en 50 °C por 5 min, luego se aumentó la temperatura a 5 °C/min hasta 150 °C y se mantuvo estable por 2 min; después, se incrementó nuevamente a 5 °C/min hasta alcanzar 230 °C y se mantuvo estable durante 35 min.

3.1.10. Ensayo de la capacidad de absorción del radical oxígeno

Se tomaron 10 mg de AE o extracto SFE y se aforaron a 1 mL con metanol. Debido a que los AE se solubilizaron completamente, solo los extractos SFE se agitaron en un baño de ultrasonido *Elmasonic* modelo S15H (Signen, Alemania) durante 30 min y luego 15 s en un *Shaker IKA* modelo MS1-S1 (Wilmington, EE.UU.). Después, se centrifugaron durante 15 min y se filtraron.

Se preparó una solución de *buffer* fosfato de 75 mM y pH 7.4, según el procedimiento empleado por Rodríguez *et al.* [74] y una solución madre de fluoresceína de 8.16×10^{-5} M. Además, las muestras se diluyeron a 1000 ppm en metanol y estas, a su vez, se diluyeron a concentraciones entre 10 y 100 ppm en los diferentes pozos de la microplaca agitando durante 5 min.

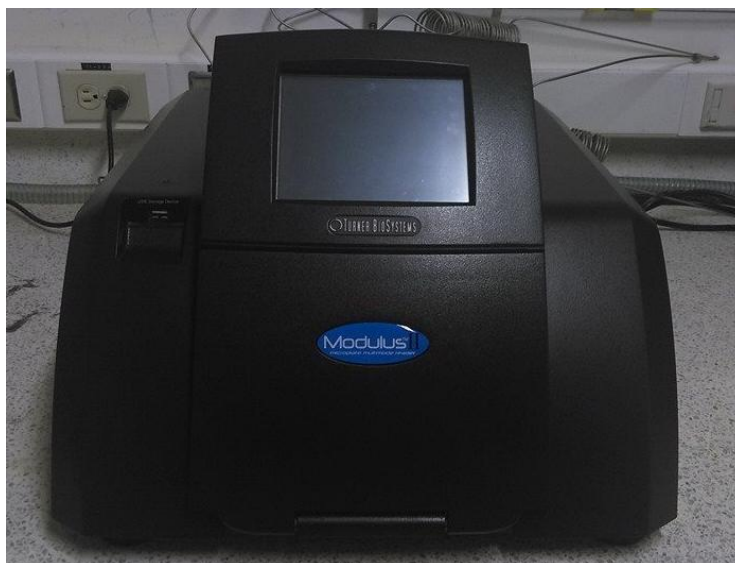
Se adicionaron muestra diluida (25 μ L) y solución de fluoresceína (150 μ L) en cada pozo de la microplaca. La solución resultante, se incubó durante 20 min a 37 °C y a continuación se agregó solución del radical AAPH (25 μ L), de concentración 153 mM, en cada uno de los pozos.

Para la lectura de fluorescencia, se empleó un lector de microplacas de 96 pozos *Turner Biosystems Inc. ModulosTM Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, EE.UU.), con su módulo de fluorescencia provisto de filtros que transmiten longitudes de onda de 490 nm de excitación y 510-570 nm de emisión [43], (ver **Figura 20**).

El área bajo la curva de fluorescencia (ABC) es directamente proporcional a la capacidad protectora, contra los radicales peroxilo, que posea la muestra. Ésta se calculó usando la **Ecuación 4**, donde f_i corresponde a la fluorescencia medida en un tiempo i y f_0 corresponde a la fluorescencia inicial de la muestra.

$$ABC = \sum \frac{f_i}{f_o} \quad \text{Ecuación 4}$$

Figura 21. Lector de microplacas de 96 pozos Turner Biosystems Inc. Módulos™ Microplate Multimode Reader. [Tomada por Rogerio Saavedra, 2014]



Para determinar la actividad antioxidante de cada extracto o AE, se calculó el área neta bajo la curva de fluorescencia de cada muestra, teniendo en cuenta el ABC del blanco y el ABC de la muestra, como se muestra en la **Ecuación 5**.

$$ABC_{neta} = ABC_{muestra} - ABC_{blanco} \quad \text{Ecuación 5}$$

Para cada una de las muestras, el ABC_{neta} se extrapólo en una curva de calibración previamente realizada, en la que se utilizó como estándar de control el Trolox[®]. El resultado se expresó como μmol de Trolox[®]/g de muestra [5, 43]. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresaron como valor promedio \pm la desviación estándar. Las pruebas también se realizaron, utilizando el α -tocoferol y el butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidantes de referencia.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como resultado de la expedición botánica, se obtuvieron muestras de 27 especies vegetales distintas. Según la identificación realizada por el Herbario Nacional Colombiano (HNC), seis de las especies pertenecían al género *Piper*. Dichas plantas fueron seleccionadas para el desarrollo de este trabajo.

Las piperáceas seleccionadas fueron identificadas como: *P. eriopodon*, *P. marginatum*, *P. dilatatifolium*, *P. subflavum*, *P. cumanense* y *P. peltatum*. Sus códigos de colecta y los códigos de registro en el HNC se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Nombre científico y registro de las especies vegetales pertenecientes al género *Piper*

Nombre científico	N° Col. CENIVAM	N° Registro HNC	Determinó
<i>Piper cumanense</i> Kunth.	009	578977	W. Trujillo-C
<i>Piper eriopodon</i> (Miq.) C. DC.	014	578364	W. Trujillo-C
<i>Piper peltatum</i> L.	016	-----	W. Trujillo-C
<i>Piper marginatum</i> Jacq.	019	578365	W. Trujillo-C
<i>Piper dilatatifolium</i> Trel. & Yunck.	020	578975	W. Trujillo-C
<i>Piper subflavum</i> var. <i>espejuelanum</i> (C. DC.) Trel. & Yunck.	021	578976	W. Trujillo-C

Los estudios fitoquímicos desarrollados con especies del género *Piper* indicaron la presencia de compuestos con propiedades farmacológicas y biológicas [67], entre las que se encontraron propiedades insecticidas [68], medicinales [69] y antifúngicas [49]. Investigaciones previas realizadas con algunas de las especies seleccionadas demostraron que éstas poseen propiedades herbicidas [51], antivirales [53], antiinflamatorias [70], entre otras.

4.1. OBTENCIÓN DE ACEITES Y EXTRACTOS

Los rendimientos de los aceites esenciales son uno de los puntos clave a la hora de evaluar la rentabilidad y viabilidad de aprovechar una especie vegetal [1, 2]. Para este trabajo, los rendimientos de los AE variaron entre el 0,05 y 0,33%, y solo dos de las especies estudiadas presentaron un rendimiento superior al 0,1%. *P. peltatum* fue la especie con el rendimiento de AE más bajo (0,05% p/p). Por otra parte, el rendimiento más alto se alcanzó con la especie *P. marginatum* (0,33% p/p). Los valores de rendimientos de AE, obtenidos para cada especie, se reportan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Rendimientos de extracción de aceites esenciales y extractos SFE de las especies recolectadas

Especie	Rendimiento (%) p/p	
	Aceite Esencial	Extracto SFE
<i>Piper cumanense</i>	0,12	1,36
<i>Piper eriopodon</i>	0,05	0,42
<i>Piper peltatum</i>	0,03	0,35
<i>Piper marginatum</i>	0,33	0,14
<i>Piper dilatatifolium</i>	0,08	0,36
<i>Piper subflavum</i>	0,05	0,92

Algunos de los rendimientos encontrados en la literatura, para la obtención de AE por hidrodestilación de las partes aéreas de *P. marginatum*, son similares al valor reportado en este trabajo (0,33% p/p). Autran *et al.* [60] encontraron diferencias significativas en el rendimiento al trabajar con hojas (0,39% p/p) y tallos frescos (0,03% p/p). Souto *et al.* [62] reportaron rendimientos del 0,4 y 1,4% p/p para la hidrodestilación de las hojas secas de dos quimiotipos de *P. marginatum*.

En el trabajo realizado por Andrade *et al.* [59], a 22 muestras de hojas de *P. marginatum* provenientes de diferentes micro-hábitats de la Amazonía de Brasil, los rendimientos variaron entre el 0,3 y 2,0%. Se observó, por resultados previos,

que el rendimiento del AE para esta y otras especies está ligado al origen de las muestras, el quimiotipo utilizado y la parte de la planta a partir de la que se obtenga el AE [2].

El rendimiento obtenido para la especie *P. peltatum* (0,03% p/p), fue menor que el alcanzado por Pino *et al.* [58] quienes, trabajando con hojas secas de la especie, lograron un rendimiento del 0,1% p/p. En el trabajo realizado por Moraes *et al.* [52], los resultados obtenidos para la hidrodestilación de cuatro muestras de *P. peltatum*, recolectadas en estado de floración, variaron entre el 0,1 y el 0,2%. En estos estudios, las hidrodestilaciones se realizaron utilizando material vegetal seco. Se conoce, por trabajos realizados en otras especies, que el secado del material vegetal puede afectar el rendimiento y calidad de los AE obtenidos [75].

A la fecha, no se han reportado estudios sobre rendimientos en la obtención de AE a partir de *P. cumanense*, *P. eriopodon*, *P. dilatatifolium* o *P. subflavum*.

Los rendimientos determinados para los extractos obtenidos con fluidos supercríticos (SFE) fueron mayores que los rendimientos para los AE. El rendimiento de extracto SFE más alto se obtuvo para la especie *P. cumanense* (1,36% p/p) y el más bajo para *P. marginatum* (0,14% p/p). En la literatura científica, no se encuentran reportes enfocados en el uso de la SFE para la obtención de extractos a partir de las especies estudiadas.

Los altos rendimientos de los extractos obtenidos se pueden relacionar con la facilidad que poseen los fluidos supercríticos de penetrar la matriz vegetal. Al alcanzar presiones superiores a la presión crítica, el fluido adquiere la capacidad de solvatación de los líquidos sin perder la difusividad de los gases, lo que aumenta la superficie de contacto con la matriz y favorece la transferencia de masas por el fenómeno convectivo [15].

Los rendimientos de los AE y de los extractos SFE no son comparables, debido a que los dos procesos se aplicaron a matrices en diferentes estados. Los AE fueron obtenidos de material vegetal seco, mientras que para los extractos SFE, la matriz vegetal había sido destilada, secada y pulverizada previamente. Estos procedimientos afectan tanto el rendimiento como la naturaleza química de las sustancias retiradas del material vegetal.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LOS AE

4.2.1. *Piper cumanense* Kunth

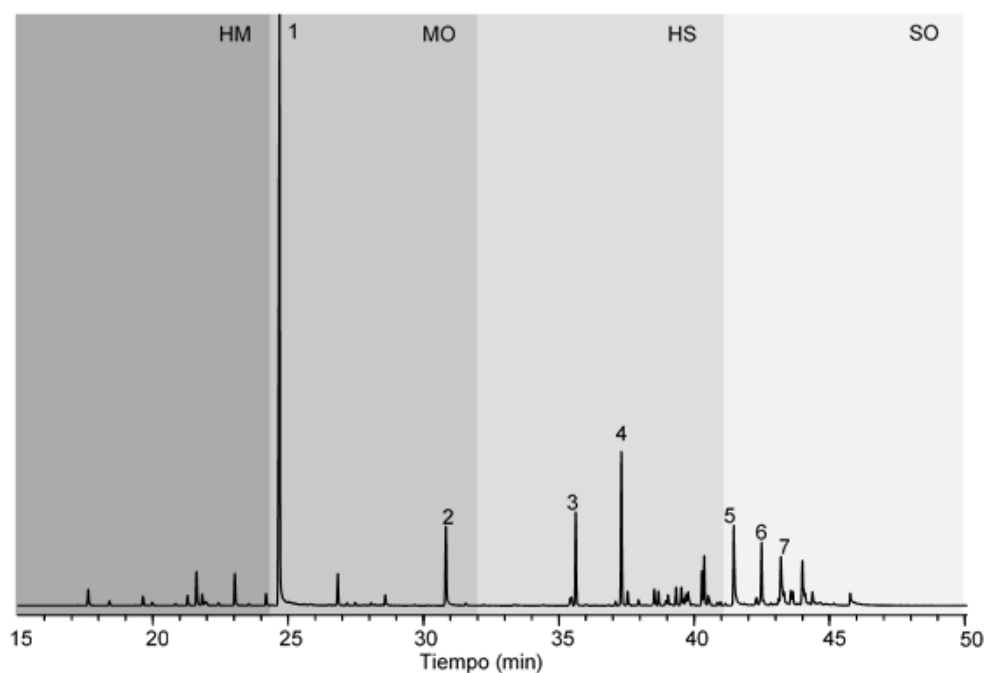
Para esta especie, se identificaron 32 picos (porcentaje de área >0,2%), que correspondieron a un 92,5% del área cromatográfica total. Según los resultados obtenidos, el AE de *P. cumanense* se compuso, principalmente, de monoterpenos oxigenados (44%), en su mayoría alcoholes (37,9% del área cromatográfica total). El perfil cromatográfico obtenido por columna apolar (DB-5MS) se observa en la **Figura 21**, y la composición química se detalla en el **Anexo A**.

En el AE de *P. cumanense*, se identificaron linalol (37,2%), *trans*- β -cariofileno (8,8%), *trans*-nerolidol (5,8%), α -copaeno (5,4%) y piperitona (4,6%), como componentes principales. Es importante aclarar, que no se han reportado estudios previos relacionados con la identificación de la composición química del AE de esta especie.

El nerolidol, presente en el AE de *P. cumanense* como isómero *trans*, es un sesquiterpeno alifático, usado frecuentemente en la elaboración de productos cosméticos y de aseo. Sin embargo, en el campo de la farmacéutica se han reportado diferentes propiedades para el nerolidol, entre las que se resaltan la antioxidante [76] antihemolítica, antiviral [77], antiparasitaria y antimalárica [78].

Se ha demostrado que, debido a su hidrofobicidad, este compuesto penetra fácilmente la membrana plasmática e interactúa con las proteínas estructurales y funcionales intracelulares. Debido a esto, tanto el compuesto como algunos de los AE de los cuales proviene, son usados como punto de partida para el desarrollo de tratamientos antivirales de origen natural [77].

Figura 22. Perfil cromatográfico del AE de *Piper cumanense*. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Monoterpenos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos (HS) sesquiterpenos oxigenados (SO). 1) Linalol, 2) piperitona, 3) α -copaeno, 4) *trans*- β -cariofileno, 5) *trans*-nerolidol, 6) óxido de cariofileno, 7) dilapiol.

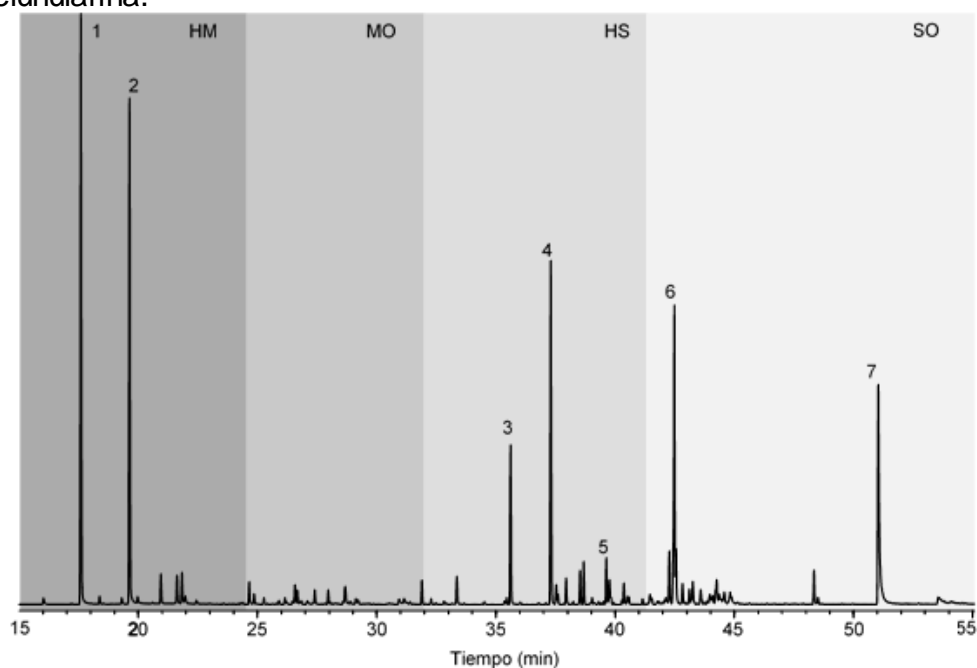


4.2.2. *Piper eripodon* (Miq.) C. DC.

Para el AE de *P. eripodon*, se detectaron 35 metabolitos (área relativa >0,2%), de los que se identificaron 31. La suma del área relativa de los compuestos identificados corresponde al 83,3% del área cromatográfica total. El perfil cromatográfico del AE obtenido en columna apolar, se observa en la **Figura 22** y la composición química del AE se detalla en el **Anexo B**.

El AE de *P. eriopodon* está compuesto por una cantidad significativa de monoterpenos (38,4%) y sesquiterpenos (25,2%). Dentro de los compuestos mayoritarios se identificaron: α -pineno (18,8%), β -pineno (16,1%), α -copaeno (5,5%), *trans*- β -cariofileno (11,6%) y óxido de cariofileno (10,8%).

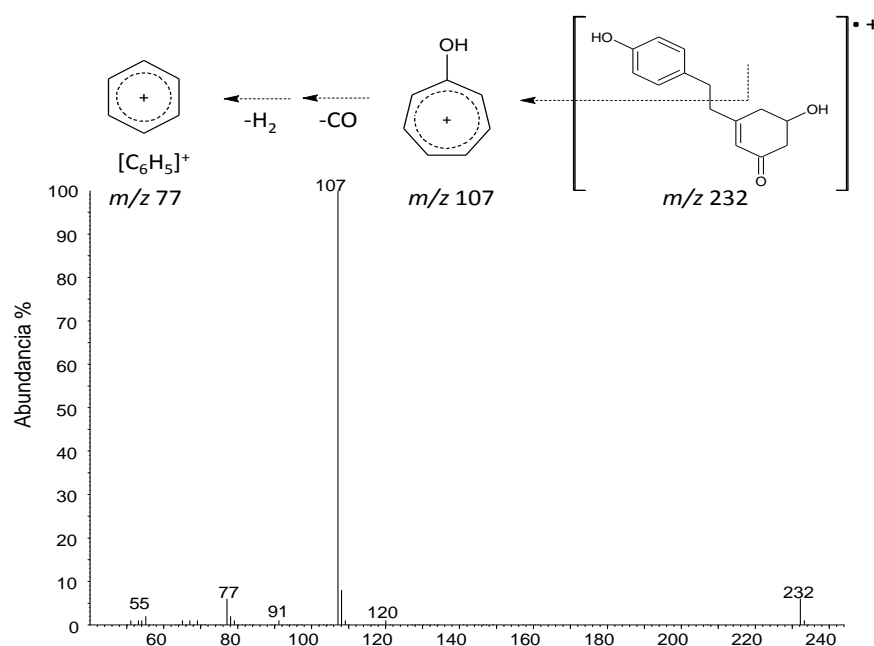
Figura 23. Perfil cromatográfico del AE de *Piper eriopodon*. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Monoterpenos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos (HS) sesquiterpenos oxigenados (SO). 1) α -Pineno, 2) β -pineno, 3) α -copaeno, 4) *trans*- β -cariofileno, 5) β -selineno, 6) óxido de cariofileno, 7) prelunularina.



En el cromatograma de *P. eriopodon*, se observa el pico 7 (11,4%), identificado por su espectro de masas como prelunularina, (ver **Figura 23**). Para este metabolito, no se han reportado índices de retención. En su espectro de masas se observa la formación del ion molecular con m/z 232. El ion pico de base m/z 107, corresponde a un fragmento C_7H_7O típico de compuestos fenólicos, generado luego de la escisión simple de un enlace en la posición β , con respecto al anillo aromático, y se relaciona con el fragmento de m/z 77 que se genera luego de la pérdida de CO.

La prelunularina, metabolito precursor de los bis-bibenzilos, se encuentra principalmente en briofitas, como *Marchantia polymorpha* y *Ricciocarpos natans* [79]. Los bis-benzilos son metabolitos secundarios que presentan actividad relajante, antimicrobial y antifúngica elevada; sin embargo, su uso es limitado debido a que también poseen alta citotoxicidad [80].

Figura 24. Espectro de masas y ruta de fragmentación del compuesto tentativamente identificado como prelunularina (IE 70 eV).



Los resultados obtenidos para la composición química de la especie difieren de los reportados por Tangarife *et al.* [49] quienes, trabajando con muestras recolectadas en el departamento del Cesar, identificaron el dilapiol (38,8%), como componente mayoritario, mientras que este compuesto no se detectó en el AE analizado.

Por otra parte, el AE analizado en este estudio contenía α -pineno (18,8%) y β -pineno (16,1%) como componentes mayoritarios. Sin embargo, en el análisis reportado por Tangarife *et al.* [49], estos compuestos se identificaron en cantidades por debajo del 4%. Las muestras fueron recolectadas en regiones

diferentes del país y expuestas a diferentes condiciones ambientales, lo que afecta su metabolismo secundario y, como consecuencia, genera variaciones en la composición química de los AE. Los compuestos mayoritarios identificados en los AE, de las muestras analizadas en este trabajo, y los resultados reportados para la especie recolectada en el departamento del Cesar, se observan en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Comparación de los componentes principales presentes en el AE de *P. eriopodon*.

Compuestos mayoritarios	Área relativa (%)	
	Santander ^[A]	Cesar ^[B]
α -Pineno	18,8	2,1
10-epi-Cubebol	ND	3,9
Dilapiol	ND	38,8
β -Selineno	1,5	5,0
β -Pineno	16,1	3,3
α -Copaeno	5,5	ND
<i>trans</i> - β -Cariofileno	11,6	8,1
Óxido de cariofileno	10,8	3,8

^[A] Resultados obtenidos experimentalmente

^[B] Resultados reportados por Tangarife *et al.* [49]

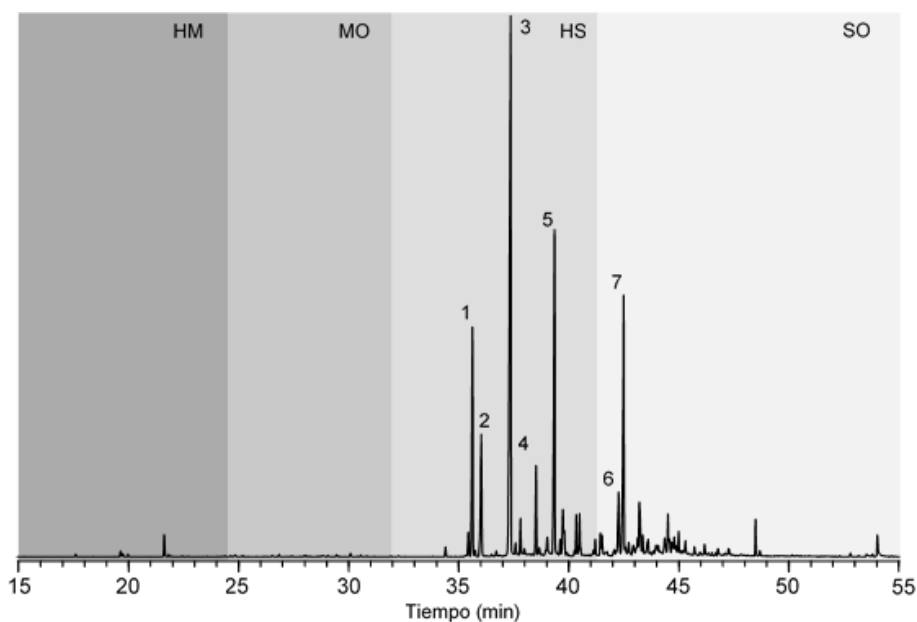
ND Compuesto no detectado

4.2.3. *Piper peltatum* L.

Mediante el análisis cromatográfico del AE, se detectaron 27 picos (área relativa >0,2%), de los que se identificaron 25 (ver **Figura 24**). La suma de sus áreas cromatográficas correspondió a un 90,3% del área cromatográfica total. Este AE se compuso, principalmente, por sesquiterpenos (66,8%) y sesquiterpenos oxigenados (20,7%). Sus componentes principales fueron: *trans*- β -cariofileno (28,6%), germacreno D (13,4%), α -copaeno (8,8%), β -elemeno (5,7%) y espatulenol (3,2%). La composición química detallada del AE de *P. peltatum*, se encuentra en el **Anexo C**.

Durante el análisis cromatográfico, se observó que los picos del *neo*-intermedol y fitol, solo se detectaron en el cromatograma obtenido en fase apolar (DB-5MS). Su ausencia en el análisis en fase polar (DB-WAX), se puede relacionar con su alta afinidad con la fase estacionaria (polietilenglicol) y su baja cantidad relativa en el aceite esencial. Al ser moléculas polares y medianamente volátiles, poseen tiempos de retención altos ($t_R > 55$ min); su elución coincide con el incremento del sangrado de la columna y la señal producida por sus iones podría ser solapada por las señales del ruido.

Figura 25. Perfil cromatográfico del AE de *Piper peltatum*. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Monoterpenos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos (HS), sesquiterpenos oxigenados (SO). 1) α -Copaneno, 2) β -elemeno, 3) *trans*- β -cariofileno, 4) α -humuleno, 5) germacreno D, 6) espatulenol, 7) óxido de cariofileno.



El germacreno D está presente en muchas especies de las angiospermas, gimnospermas e inclusive en algunas briofitas. A pesar de esto, su función biológica en las plantas aún no es clara. Algunos autores afirman que este metabolito juega un papel importante en la síntesis de cadinenos y selinenos [81]. Diversos estudios han demostrado que el germacreno D puede ser isomerizado en

condiciones ácidas para obtener cadinanos, murolanos y amorfanos, o convertirse en bourboneno, muroleno o amorfeno mediante reacciones fotoquímicas. Este compuesto podría ser un importante precursor para la biosíntesis de diferentes sesquiterpenos [82].

La composición química obtenida para el AE de *P. peltatum* es similar a la reportada por Moraes *et al.* [52] para el AE de la especie recolectada en Brasil, pero difiere de los resultados reportados por Pino *et al.* [58] quienes trabajaron con especímenes recolectados en Cuba, (ver **Tabla 7**).

Tabla 7. Comparación con estudios previos de los componentes principales presentes en el AE de *P. peltatum*

Compuestos mayoritarios	Área relativa (%)		
	Colombia ^[A]	Cuba ^[B]	Brasil ^[C]
α-Copaeno	8,8	5,2	ND
β-Elemeno	5,7	0,3	ND
<i>trans</i> -β-Cariofileno	28,6	0,1	39,1
<i>trans</i> -Calameneno	ND	5,4	ND
α-Humuleno	3,0	ND	4,0
Germacreno D	13,4	2,8	13,3
Biciclogermacreno	ND	ND	5,8
Espatuleno	3,2	9,0	1,0
Óxido de cariofileno	11,0	22,9	ND
Cadaleno	0,4	4,1	ND
<i>trans</i> -Nerolidol	0,7	ND	4,8

^[A] Resultados obtenidos experimentalmente

^[B] Resultados reportados por Pino *et al.* [58]

^[C] Resultados reportados por Moraes *et al.* [52]

ND. Compuesto no detectado

Las especies recolectadas en Colombia y Brasil cuentan con *trans*-β-cariofileno y germacreno-D como componentes principales. Sin embargo, para la especie recolectada en Cuba, estos metabolitos representan solo el 3,8% de la

composición química del AE. El óxido de cariofileno, que compuso un 11,0% del AE analizado, representó un 22,9% para las muestras de Cuba, y no se detectó en las muestras recolectadas en Brasil [52, 58].

4.2.4. *Piper marginatum* Jacq.

Los resultados del análisis GC-MS indican la presencia de 30 compuestos (área relativa >0,2%), de los cuales 29 fueron identificados y la suma de sus áreas relativas corresponde a un 95,0% del área cromatográfica total. El AE se compuso principalmente de sesquiterpenos (50,5%) y se observó una cantidad considerable de fenilpropanoides (19,8%). Los picos mayoritarios fueron bicilogermacreno (22,6%), *trans*- β -cariofileno (15,7%), 2-metoxi-4,5-metilendioxi-propiofenona (11,7%), α -copaeno (7,4%) y espatulenol (5,1%). En la **Figura 25**, se observa el perfil cromatográfico del AE de *P. marginatum* y su composición química detallada, se muestra en el **Anexo D**.

En este aceite esencial se identificaron seis metabolitos pertenecientes a la familia de los fenilpropanoides. El fragmentograma de masas obtenido al seleccionar el ion m/z 208, permite observar cinco de estos compuestos, pertenecientes al grupo de los trimetóxidos de benceno. Debido a su peso molecular (192 u.m.a.), la croweacina no genera el ión m/z 208; por lo tanto no se observó en el fragmentograma de masas, (ver **Figura 26**). La estructura de los cinco fenilpropanoides principales se observa en la **Figura 27**.

Figura 26. Perfil cromatográfico del AE de *Piper marginatum*. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Monoterpenos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos (HS), sesquiterpenos oxigenados (SO). 1) γ -Terpineno, 2) α -copaeno, 3) *trans*- β -cariofileno, 4) biciclogermacreno, 5) espatulenol, 6) isómero de la metoxi-4,5-metilendioxil-propiofenona 7) 2-Metoxi-4,5-metilendioxil-propiofenona.

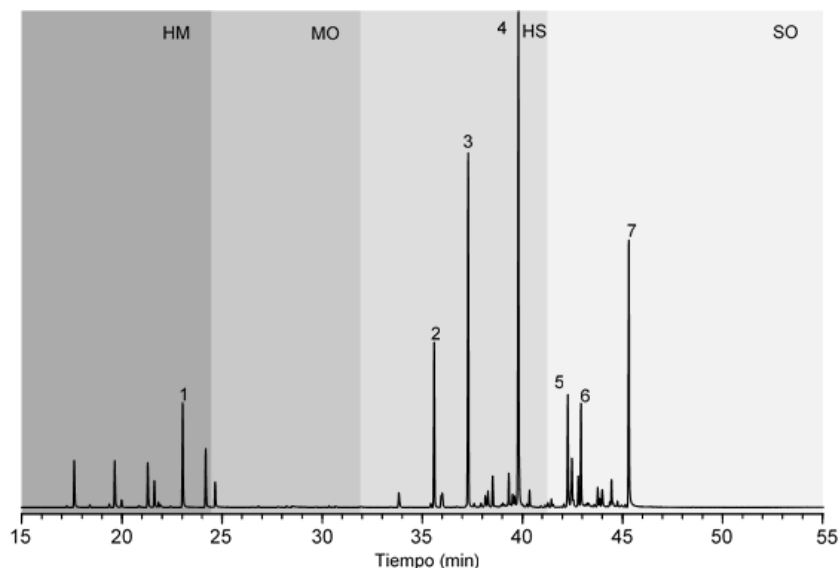
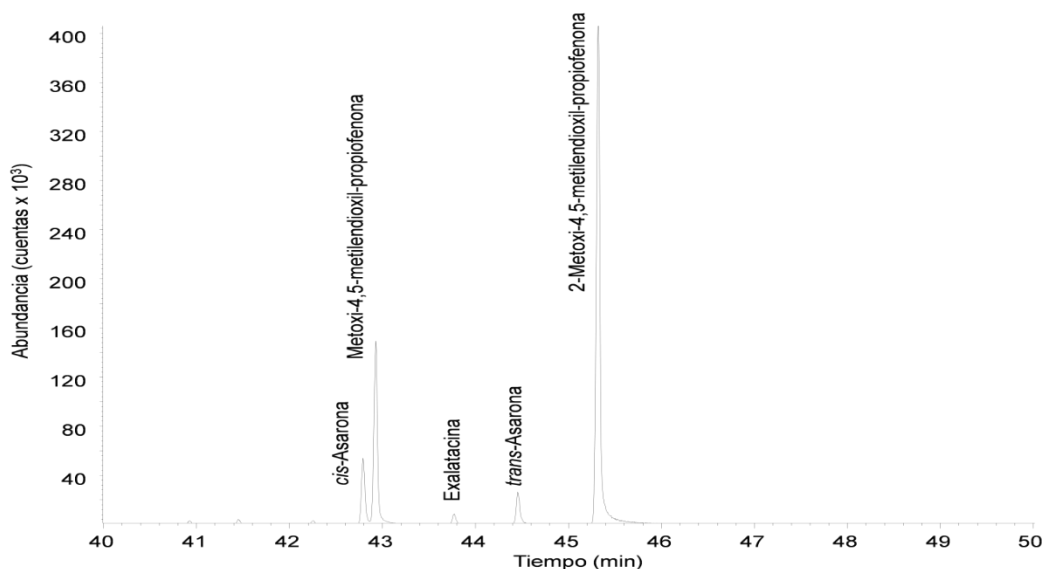
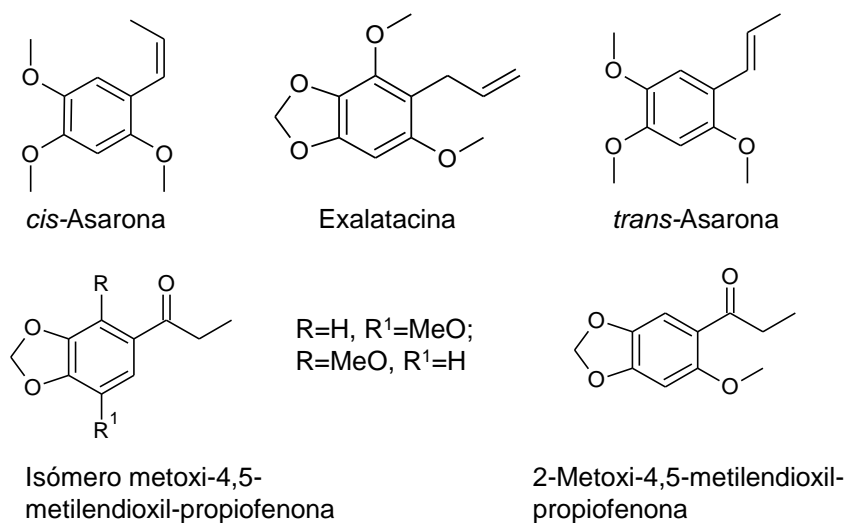


Figura 27. Fragmentograma de masas del ión m/z 208, obtenido del AE del *P. marginatum* Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV).



Los fenilpropanoides han sido investigados ampliamente por sus propiedades antibióticas, antioxidantes e insecticidas, y por su papel como señalizadores moleculares en interacciones planta-insecto [83]. Entre ellos, se encuentran las asaronas, que son metabolitos que poseen actividad genotóxica y hepatocarcinogénica que no se observa en otros fenilpropanoides. Hasheminejad *et al.* [84] propusieron que su efecto nocivo podría estar relacionado con dos de los sustituyentes metoxi unidos al anillo aromático.

Figura 28. Estructura de los fenilpropanoides identificados en el AE de *P. marginatum*



En el AE de *P. marginatum*, se identificaron los isómeros *cis*- y *trans*-asarona, ampliamente estudiados por su actividad ansiolítica [85] y antioxidante [86]. La *cis*-asarona posee actividad antiinflamatoria [87] y se ha planteado su uso en el tratamiento de problemas mentales como depresión, insomnio, ansiedad, sicosis y epilepsia [88].

En la **Tabla 8**, se comparan los compuestos mayoritarios identificados en el AE de *P. marginatum* con los resultados reportados en la literatura para muestras recolectadas en otras regiones. Se resalta la presencia de los sesquiterpenos

trans- β -cariofileno, biciclogermacreno y *cis*-asarona en todos los análisis reportados. Se observó similitud con los resultados reportados por Andrade *et al.* [64], con respecto a la presencia de *trans*- β -cariofileno, biciclogermacreno y 2-metoxi-4,5-metilendioxil-propiofenona. Según los reportes de la literatura, este último compuesto no se detectó en los trabajos realizados con las muestras recolectadas en Tolima y Pernambuco [49, 59, 60].

Tabla 8. Comparación de componentes mayoritarios reportados en el AE de *P. marginatum*

Compuestos mayoritarios	Área relativa (%)			
	Colombia		Brasil	
	Santander ^[A]	Tolima ^[B]	Pernambuco ^[C]	Monte Alegre ^[D]
γ -Terpineno	4,7	ND	ND	0,3
α -Felandreno	ND	11,1	ND	ND
α -Copaeno	7,4	ND	0,6	ND
<i>trans</i> - β -Cariofileno	15,7	11,0	7,5	13,6
Biciclogermacreno	22,6	4,1	9,4	15,8
Elemicina	ND	18,0	0,3	0,9
Espatulenol	5,1	ND	ND	0,8
2-Metoxi-4,5-metilendioxil-propiofenona	11,7	ND	ND	26,3
Isoelemicina	ND	9,2	ND	ND
Limoneno	0,2	7,5	ND	0,2
Elemol	ND	ND	9,7	2,5
<i>cis</i> -Asarona	1,2	1,3	30,4	8,8
Pachulol	ND	ND	16,0	ND
2-Hidroxi-4,5-metilendioxil-propiofenona	ND	ND	ND	21,9

^[A] Resultados obtenidos experimentalmente

^[B] Resultados reportados por Tangarife *et al.* [49].

^[C] Resultados reportados por Autran *et al.* [60].

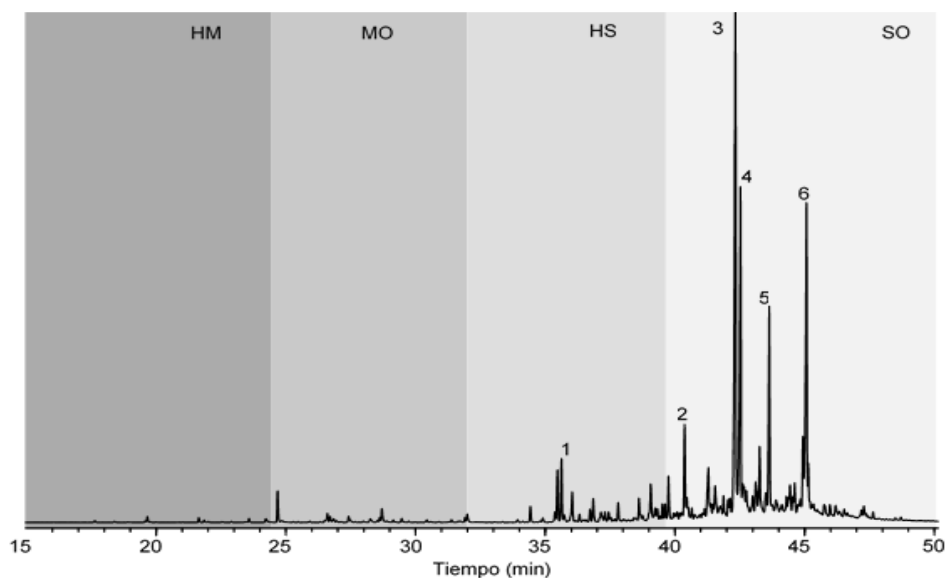
^[D] Resultados reportados por Andrade *et al.* [59].

La identificación de la *cis*- y *trans*-asarona en el AE limita su uso en la fabricación de productos de consumo humano. Su uso se encuentra condicionado a una previa cuantificación de estos compuestos y requiere el desarrollo de pruebas de citotoxicidad.

4.2.5. *Piper dilatatifolium* Trel. & Yunck

En el AE de *Piper dilatatifolium* se detectaron 30 compuestos, de los que 21 fueron identificados. La suma de sus áreas relativas corresponde a un 64,2% del área cromatográfica total, (ver **Figura 28**). Dentro de los compuestos mayoritarios, se identificaron espatulenol (24,4%), óxido de cariofileno (13,4%) y 10-*epi*-cubebol (3,2%). Este AE está compuesto, principalmente, por sesquiterpenos oxigenados (52,4%). Dentro de los compuestos identificados, no se detectaron monoterpenos. La tabla con la composición detallada del AE se muestra en el **Anexo E**.

Figura 29. Perfil cromatográfico del AE de *Piper dilatatifolium*. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Monoterpenos (M), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos (S) sesquiterpenos oxigenados (SO). 1) α -Copaeno, 2) 10-*epi*-cubebol, 3) espatulenol, 4) óxido de cariofileno, 5) sesquiterpeno oxigenado (P.M. 220), 6) sesquiterpeno oxigenado (P.M. 206).



Como se observa en la **Tabla 9**, la composición química del AE de *P. dilatatifolium*, difiere de los resultados obtenidos en trabajos anteriores. En los resultados reportados por Cysne *et al.* [67], para muestras recolectadas en el estado de Ceará (Brasil), el AE se compuso en un 42% por monoterpenos y los componentes principales fueron: biciclogermacreno (25,0%), α -felandreno (22,5%) y *trans*- β -cariofileno (10,3%). Ninguno de estos compuestos fue identificado en el AE de la muestra analizada para este trabajo.

Tabla 9. Comparación de componentes mayoritarios reportados en el AE de *P. dilatatifolium*

Compuestos mayoritarios	Área relativa (%)		
	Colombia ^[A]	Brasil	
		Ceará ^[B]	Roraima ^[C]
Espatulenol	24,4	ND	11,8
Óxido de cariofileno	13,4	0,6	1,0
10- <i>epi</i> -Cubebol	3,2	ND	ND
α -Felandreno	ND	22,5	ND
δ -3-Careno	ND	10,2	ND
<i>trans</i> - β -Cariofileno	ND	10,3	3,7
Biciclogermacreno	ND	25,0	7,4
<i>trans</i> -Nerolidol	ND	6,2	10,2
Germacreno D	ND	4,2	12,6

^[A] Resultados obtenidos experimentalmente

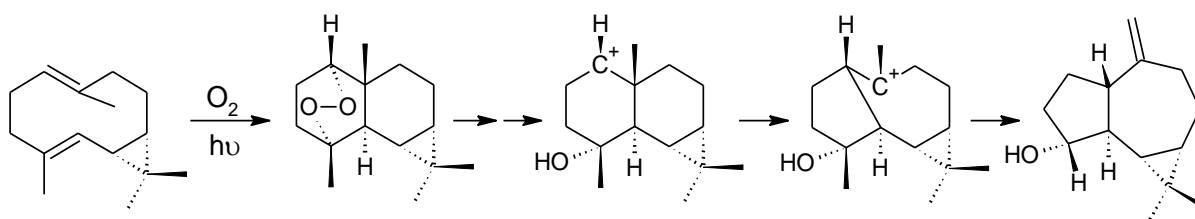
^[B] Resultados reportados por Cysne *et al.* [67]

^[C] Resultados reportados por Andrade *et al.* [64]

En los resultados obtenidos por Andrade *et al.* [64], al analizar AE de muestras recolectadas en el estado de Roraima (Brasil), tampoco se reportaron monoterpenos y solo se encontró similitud en la identificación de espatulenol dentro de los componentes mayoritarios.

Según Toyota *et al.* [89], existe relación entre la presencia de biciclogermacreno y espatulenol en algunas muestras. En su investigación, encontraron que el compuesto identificado como biciclogermacreno, presente en extractos metanólicos de diferentes plantas, desaparecía luego de cuatro meses de almacenamiento de las muestras y aparecía el pico correspondiente al espatulenol; por ello, sugirieron que el biciclogermacreno sufre reacciones de oxidación convirtiéndose en espatulenol, como se muestra en la **Figura 29** [89]. Este hecho se podría relacionar con la ausencia del biciclogermacreno en las muestras analizadas.

Figura 30. Mecanismo de oxidación del biciclogermacreno a espatulenol, propuesto por Toyota *et al.* [89]



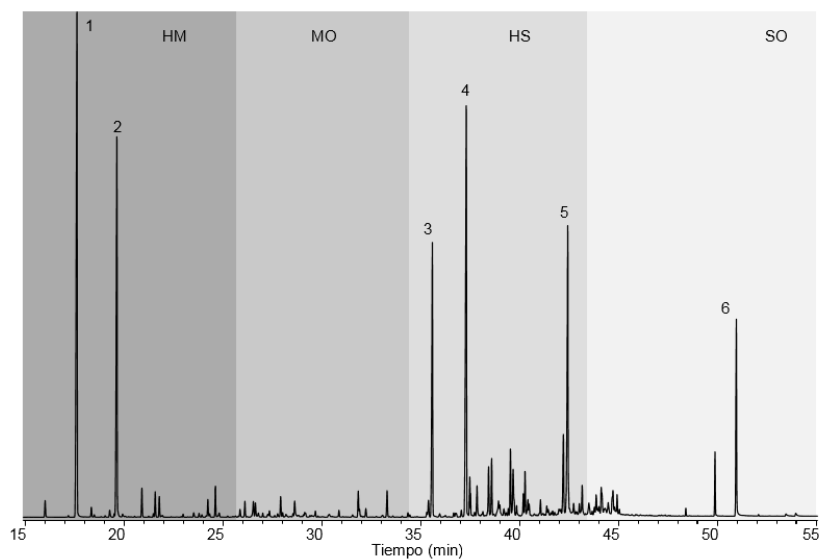
Al espatulenol se le atribuye la actividad antiinflamatoria que presentan los AE de *Cinnamomum osmopholeum* y *Garcinia brasiliensis*, matrices vegetales en las que éste es uno de sus componentes mayoritarios [90, 91]. Además, en los estudios realizados por Ziae *et al.* [92], quienes trabajaron con extractos de *Salvia mirzayanii*, el espatulenol representó un 60% de la composición química total y se demostró que este compuesto induce la apoptosis de linfocitos activos. Estos resultados sugieren que las matrices ricas en este compuesto, podrían ser usadas como parte del tratamiento de alteraciones en el sistema linfático.

4.2.6. *Piper subflavum* var. *espejuelanum* (C. DC.) Trel. & Yunck.

El AE de esta planta, se compone principalmente de sesquiterpenos (38.6%) y monoterpenos (34.1%). En el análisis GC-MS, se detectaron 31 picos de los cuales 28 fueron identificados y corresponden a un 90.2% del área cromatográfica total. Dentro de estos los mayoritarios fueron: *trans*- β -cariofileno (15.9%), α -pineno (18.9%), β -pineno (13.2%), óxido de cariofileno (10.5%) y el α -copaeno (9.2%). El perfil cromatográfico para el AE de esta especie, se observa en la **Figura 30** y su composición química detallada, se encuentra en el **Anexo F**.

Para esta muestra, se encontró, en el mismo tiempo de retención, el pico atribuido a la prelunularina en el AE de *Piper peltatum*, y se observó una gran similitud en la composición química de ambas muestras, como se puede observar en la **Tabla 10**. En la literatura, no se han reportado investigaciones en las que se estudien el AE o los extractos obtenidos de esta especie.

Figura 31. Perfil cromatográfico del AE de *Piper subflavum*. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). 1) α -Pineno, 2) β -pineno, 3) α -copaeno, 4) *trans*- β -cariofileno, 5) óxido de cariofileno, 6) prelunularina.



Los pinenos, identificados como componentes mayoritarios de esta muestra, son monoterpenos que se encuentran, principalmente, en la trementina [93]. Además, son aprovechados en la industria para la obtención de canfeno, a través de catalizadores ácidos en ausencia de agua. El canfeno es un intermediario importante para la síntesis de compuestos como el toxafeno, acetato de bornilo, isoborneol, alcanfor, entre otros [94, 95].

Tabla 10. Comparación de componentes mayoritarios identificados en los AE de *P. subflavum* y *P. eriopodon*

Compuestos mayoritarios	Área relativa (%)	
	<i>P. eriopodon</i>	<i>P. subflavum</i>
α -Pinoeno	18,6	18,9
β -Pinoeno	16,1	13,2
α -Copaeno	5,5	9,2
<i>trans</i> - β -Cariofileno	11,6	15,9
Óxido de cariofileno	10,8	10,5
Prelunularina	11,4	5,7

4.2.7. Análisis general

Según los resultados de la composición química por familias (ver **Tabla 11**), todas las muestras presentaron una cantidad representativa (>10%) de sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados. Se destacan las especies *P. peltatum* y *P. marginatum*, por la cantidad de sesquiterpenos presentes en sus AE (área relativa >50%). La mayor cantidad de monoterpenos oxigenados, se detectó en el AE de *P. cumanense* (44,2%), y el AE de *P. dilatatifolium* presentó la mayor proporción de sesquiterpenos oxigenados (52,4%). Se destacó la ausencia de monoterpenos en el AE de *P. dilatatifolium*, y su baja cantidad relativa (<1%) en el AE de *P. peltatum*. También, es importante resaltar la presencia de los fenilpropanoides (19,8%) en el AE de *P. marginatum*. El sesquiterpeno α -copaeno y el óxido de cariofileno, perteneciente a la familia de los sesquiterpenos oxigenados, fueron detectados en todas las muestras.

El α -copaeno, presente en los AE analizados en cantidades entre el 2,2 y 9,2%, pertenece a la familia de los sesquiterpenos tricíclicos. Este metabolito es uno de los componentes principales de los AE y extractos obtenidos de plantas como *Xylopija laevigata*, *Cedrelopsis grevei* y *Annona reticulata* [96]. Ha despertado interés en el campo de la agronomía, debido a su actividad como atrayente para el macho de la mosca *Ceratitidis capitata*, plaga que ataca los cultivos de cítricos, guayaba, entre otros [97, 98]; además, incrementa la capacidad antioxidante en cultivos de linfocitos humanos [96] y exhibe citotoxicidad en células cancerosas del tipo N2a. Por esta razón, Túrquez *et al.* [99] proponen su uso como agente potencial anticancerígeno.

Tabla 11. Familias de compuestos presentes en los AE.

Familia de compuestos	Área relativa (%)					
	PC	PE	PP	PM	PD	PS
Monoterpenos	7,2	38,4	0,9	15,7	ND	34,2
Monoterpenos oxigenados	44,2	5,2	1,2	1,2	1,6	2,7
Alcoholes	37,9	1,6	ND	1,2	1,1	0,8
Aldehídos	ND	0,8	ND	ND	0,5	ND
Cetonas	6,4	0,5	1,2	ND	ND	0,6
Éteres	ND	0,4	ND	ND	ND	ND
Ésteres	ND	1,9	ND	ND	ND	1,3
Sesquiterpenos	25,9	25,2	66,8	50,5	10,1	38,7
Sesquiterpenos oxigenados	14,1	14,2	20,7	7,8	52,4	14,3
Alcoholes	6,5	3,4	8,0	5,1	32,7	3,7
Aldehídos	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cetonas	ND	ND	1,7	ND	2,8	ND
Éteres	7,6	10,8	11,1	2,7	16,9	ND
Ésteres	ND	ND	ND	ND	ND	10,5
Otras familias	1,1	0,3	0,8	19,8	2,2	0,5
Total identificado	92,5	83,3	90,5	95,0	66,4	90,3

PC: *P. cumanense*, PE: *P. eriopodon*, PP: *P. peltatum*, PM: *P. marginatum*, PD: *P. dilatatifolium*, PS: *Piper subflavum*. ND, familia de compuestos no detectada.

Por otra parte, el óxido de cariofileno es un sesquiterpenoide bicíclico común en plantas medicinales y comestibles, como *Syzygium aromaticum*, *Citrus spp.* y *Ocimum basilicum* [100]. Pese a poseer un grupo epóxido en su estructura, considerado intermediario reactivo electrofílico, y tener la facilidad de penetrar la membrana celular, es considerado un producto seguro para su uso en las industrias de fragancias y cosméticos, pues se ha demostrado que no posee potencial genotóxico [100]. Además de sus propiedades anti-inflamatorias, antifúngicas y analgésicas comprobadas [101-103], es útil para el control de ácaros. Ha demostrado una actividad acaricida siete veces mayor que la del benzoato de benzilo, compuesto sintético que, debido a su uso frecuente, genera serios problemas de resistencia en las plagas [104].

El linalol es un alcohol monoterpénico acíclico, biosintetizado a través de la ruta del isopentenil pirofosfato [105]. Se encuentra como componente principal en los AE de semillas de cilantro (*Coriandrum sativum*) [106] y hojas de albahaca (*Ocimum basilicum*) [107]. Estudios enfocados en la bioactividad de este metabolito indican que posee actividades antiinflamatoria [108], antibacterial [109], entre otras. Comercialmente, es aprovechado por las industrias para la fabricación de productos cosméticos, como aditivo de detergentes, ceras y durante el procesamiento de comidas y bebidas, por ser agente aromatizante y saborizante. En la industria, es un importante intermediario para la síntesis de vitaminas A y E; además, es útil para la producción de iononas, farnesol y citronelol [110].

El α -pineno, perteneciente a la familia de los monoterpenos al igual que el p -cimeno, inhibe la proliferación de hepatomas [111] y posee propiedades anti-inflamatorias superiores que las de su enantiómero β -pineno [112]. Los estudios reportados por Leite *et al.* [113] demostraron que inhibe la proliferación de las bacterias Gram-positivas causantes de la endocarditis infecciosa.

El *trans*- β -cariofileno es uno de los compuestos mayoritarios presentes en los AE de la pimienta negra (*Piper nigrum*) y la marihuana (*Cannabis sativa*) [114]. Debido a su actividad antiinflamatoria y analgésica, se ha estudiado su uso en terapias que involucran activadores de receptores nerviosos vinculados con el tratamiento de inflamaciones y el control del dolor [115].

La variedad de compuestos que exhiben los AE del género *Piper*, sugiere el uso de estas especies como alternativa para el control de bacterias y virus. Además, es necesario tener en cuenta que una cantidad considerable de los compuestos identificados ha sido aprovechada por su potencial antiinflamatorio y antinociceptivo, por lo que estos AE se pueden proyectar como punto de partida para el desarrollo de alternativas naturales para el control del dolor y procesos terapéuticos de recuperación.

Es importante resaltar la presencia de compuestos detectados solo en los cromatogramas en fase apolar. Dentro de estos, se destacan el *neo*-intermedol y el fitol, presentes en el AE de *P. peltatum*; la croweacina en *P. marginatum* y los compuestos δ -3-careno y aromadendreno presentes en el AE de *P. subflavum*. Estos compuestos constituyen un ejemplo claro de la importancia del análisis de mezclas complejas usando columnas cromatográficas de diferente polaridad. Debido a diferentes factores, entre los que se encuentran la similitud en el momento dipolar con otros metabolitos presentes en los AE y su elevada afinidad por la fase estacionaria o simplemente por su cantidad relativa, sus señales pueden coeluir o ser solapadas por la señal de ruido, haciéndolas indistinguibles durante la interpretación.

En la **Tabla 12**, se presenta el listado con los metabolitos secundarios más frecuentes (cantidad relativa >0,1%), identificados en los AE de las seis especies. En ella, se describen los usos y algunas de las actividades biológicas que dan valor agregado a las plantas analizadas.

Tabla 12. Compuestos frecuentes identificados en los AE de plantas del género *Piper*

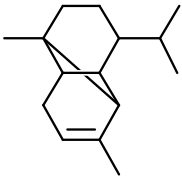
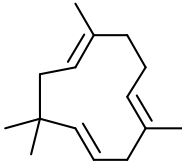
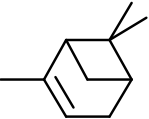
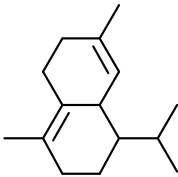
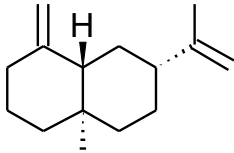
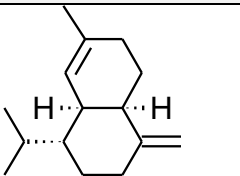
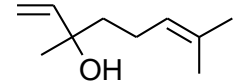
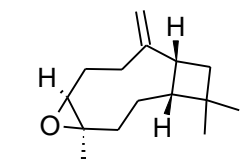
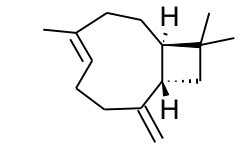
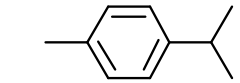
Estructura	Compuesto	PC	PE	PP	PM	PD	PS	Bioactividad y/o usos
	α -Copaeno	++	++	++	++	+	++	Atractante del macho de la mosca <i>Ceratitis capitata</i> [97-98]. Citotóxico para células cancerosas del tipo Na2 [99]. Incrementa la capacidad antioxidante de linfocitos humanos [96].
	α -Humuleno	+	+	+	+		+	Posee actividad antinociceptiva, antialérgica y antiinflamatoria similar a la dexametasona [116, 117]. Citotóxico para células del tipo adenocarcinoma MCF-7 [118]. Inhibe la proliferación de bacterias <i>Mycobacterium tuberculosis</i> [119]
85 	α -Pineno	+	+++	+	+		+++	Inhibe la proliferación de hepatomas [111]. Posee propiedades antiinflamatoria [112] y bactericida [113].
	δ -Cadineno	+	+	+	+		+	Fraccionamiento guiado por bioensayos, en aceites esenciales de <i>Schinus molle</i> , indican que posee actividad bactericida sobre <i>Streptococcus pneumoniae</i> [120].
	β -Selineno		+	+	+	+	+	Sesquiterpeno bicíclico identificado en los AE de <i>P. hispidum</i> , <i>P. aleyreanum</i> y <i>P. anonifolium</i> ; plantas que exhiben propiedades antioxidantes y antifúngicas [121]

Tabla 102. Continuación

Estructura	Compuesto	PC	PE	PP	PM	PD	PS	Usos
	γ -Muroleno	+	+	+	+	+		Atractante para el macho de las especies <i>Bruchophagus roddi</i> [122] y <i>Lobesia brotana</i> , plaga que ataca a los cultivos de uva [123].
	Linalol	+++	+		+	+	+	Actividad antiinflamatoria [108] y antibacterial [109]. Usado en la síntesis de vitaminas A y E, iononas, farnesol y citronelol [110].
98 	Óxido de cariofileno	+	+++	+++	+	+++	+++	Induce la apoptosis de linfomas y neuroblastomas [102]. Exhibe actividades analgésica, antiinflamatoria [101] larvicida, acaricida [104] y antifúngica [103]. Seguro para el desarrollo de productos cosméticos [100].
	<i>trans</i> - β -Cariofileno	++	+++	+++	+++		+++	Posee actividades antiinflamatoria y antinociceptiva por enlace con el neuroreceptor CB ₂ [114], también presenta propiedades antioxidantes, antibacteriales gastroprotectivas, ansiolíticas y anestésicas [115]
	<i>p</i> -Cimeno	+	+	+	+		+	Exhibe actividades analgésica y antiinflamatoria <i>in vivo</i> [124]. Posee propiedades antioxidantes y capacidad neuroprotectora [125].

PC: *P. cumanense*, PE: *P. eriopodon*, PP: *P. peltatum*, PM: *P. marginatum*, PD: *P. dilatatifolium*, PS: *Piper subflavum*.

Compuesto presente en: cantidad relativa >0,1% (+), >5% (++) , >10% (+++).

4.3. ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES VOLÁTILES DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS CON FLUIDO SUPERCRÍTICO.

Es necesario resaltar que el material vegetal, usado para la extracción SFE, fue previamente sometido a hidroddestilación asistida por radiación de microondas y, para su posterior extracción, se llevó a cabo un proceso de secado en horno. Estos pasos previos disminuyeron la cantidad de metabolitos volátiles en la matriz, lo que se evidencia en la ausencia de monoterpenos y monoterpenoides en los extractos analizados. Se detectaron pocos compuestos con pesos moleculares por debajo de los 200 g/mol; algunos, como el ácido acético, son el producto de procesos de fermentación bacteriana en las muestras.

Debido a que el CO₂ usado como fluido supercrítico es una molécula apolar, los metabolitos obtenidos en el extracto SFE son, en su mayoría, apolares o ligeramente polares. Se presume que, por esta razón, a pesar de usar una fibra CAR/PDMS (conocida por su capacidad de adsorber compuestos de diferente polaridad), no se encontraron compuestos polares, previamente identificados en los AE. No se detectaron alcoholes a pesar de que, en especies como *P. eriopodon*, estos formaron parte de los metabolitos mayoritarios identificados en los AE.

El uso de la SPME, como técnica extractiva, reúne la limpieza, extracción y concentración de los analitos en un solo paso, en el que los analitos son adsorbidos en la fibra. Así, los ácidos grasos y demás compuestos pesados, presentes en los extractos, no interfirieron con el análisis de los metabolitos volátiles presentes.

Los extractos obtenidos, de las seis especies, presentaron una fracción volátil con composición química similar. En estas fracciones, se destaca la abundancia de α -copaeno (áreas relativas entre 18,9 y 46,3%) y *trans*- β -cariofileno (áreas relativas entre el 6,7 y 33,5%).

En la fracción volátil del extracto SFE, obtenida a partir de la especie *P. cumanense*, los componentes principales identificados fueron: α -copaeno (21,6%), *trans*- β -cariofileno (13,8%), pentadecano (7,4%), γ -cadineno (8,6%) y δ -cadineno (6,1%). Se determinaron, en total, 33 compuestos, en su mayoría sesquiterpenos, y la suma de sus áreas relativas corresponde a un 98,0% del área cromatográfica total. El perfil cromatográfico y la composición química detallada se muestra en el **Anexo G**.

La fracción volátil del extracto SFE de *P. eriopodon*, tuvo como componentes mayoritarios α -copaeno (46,3%), *trans*- β -cariofileno (14,4%), aromadendreno (4,5%), *allo*-aromadendreno (5,2%) y óxido de cariofileno (4,7%). El área relativa correspondiente a los monoterpenos y monoterpenos oxigenados pasó de ser un 43,6% en los AE, a solo el 2,5%, en el extracto SFE. El pico correspondiente a la prelunularina, no se detectó en la fracción volátil; este hecho puede estar ligado a la poca solubilidad que presenta este compuesto, que posee dos grupos hidroxilo en su estructura, con el CO₂ usado como solvente de extracción. La composición química detallada y su respectivo cromatograma, se encuentran en el **Anexo H**.

En el extracto SFE de *P. peltatum*, la fracción volátil se compuso, principalmente, de α -copaeno (22,3%), β -elemeno (4,5%), *trans*- β -cariofileno (33,5%), α -humuleno (3,4%), y óxido de cariofileno (7,1%). Los sesquiterpenos oxigenados aparecieron con un 7,1% del área cromatográfica total, mientras que en el AE, estos representaban un 20,7%. En total, se identificaron 27 picos que corresponden a un 92,1% del área cromatográfica. En el **Anexo I**, se muestran la composición química detallada y el perfil cromatográfico para esta fracción volátil.

Los compuestos mayoritarios identificados en la fracción volátil de *P. marginatum* fueron: α -copaeno (24,5%), *trans*- β -cariofileno (22,3%), pentadecano (14,9%), y biciclogermacreno (9,0%). Se detectaron, aunque en menor proporción, los picos de cuatro de los fenil propanoides presentes en el AE. No se observaron mono- o sesquiterpenos oxigenados, pertenecientes al grupo de los alcoholes. En total, se

identificaron 32 compuestos, que representan el 95,8% del área cromatográfica total. La tabla con la composición química detallada se presenta en el **Anexo J**.

Para el extracto SFE de *P. dilatatifolium*, los compuestos mayoritarios fueron ciclosativeno (8,8%), α -copaeno (18,9%), *trans*- β -cariofileno (6,7%), pentadecano (19,3%) y heptadecano (9,1%). Se identificaron, en total, 28 compuestos, que corresponden a un 86,7% del área cromatográfica total. La cantidad de hidrocarburos detectados, se puede relacionar con la afinidad del solvente de extracción con los compuestos apolares. El cromatograma de la fracción volátil y la composición química, se detallan en el **Anexo K**.

En la fracción volátil de la especie *P. subflavum*, se detectaron α -copaeno (33,6%), *trans*- β -cariofileno (6,7%), *allo*-aromadendreno (5,2%), β -selineno (4,2%) y óxido de cariofileno (5,5%). Este fue el único extracto donde se observó una cantidad de monoterpenos y monoterpenos oxigenados superior al 5% del área cromatográfica total. Los pinenos, componentes mayoritarios del AE, se detectaron como picos minoritarios en la fracción volátil del extracto SFE. No se detectaron alcoholes derivados de monoterpenos o sesquiterpenos. Fueron identificados 34 picos en el perfil cromatográfico, que corresponden a un 85.2% del área cromatográfica total. La composición química detallada y el perfil cromatográfico se muestran en el **Anexo L**.

De manera general, se observó la disminución en el área relativa de los compuestos polares, previamente detectados en los AE, y un aumento del área relativa de los compuestos apolares. Este hecho puede relacionarse con la afinidad de los compuestos con el fluido supercrítico usado para la extracción. Otros factores que pueden influir en la detección de los compuestos son: la temperatura alta y el tiempo prolongado de exposición de la fibra de SPME, que favorecen la retención de sesquiterpenos.

Es importante destacar la presencia de compuestos “nuevos” no detectados en los AE, presentes en las fracciones volátiles de los extractos obtenidos con SFE

(cantidad relativa >0,5%). Entre ellos se encuentran: α -ylangeno, ciclopentadecano y α -cadineno en *P. cumanense*; heptanal, isodieno, *ar-curcumeno* y δ -cadineno en *P. eriopodon*; ácido acético, α -muroleno y δ -cadineno en *P. peltatum*; ciclosativeno, α -amorfenol, γ -cadineno y selina-3,7(11)-dieno *P. marginatum*; *trans*- β -cariofileno, α -humuleno, biciclogermacreno y α -cadineno en *P. dilatatifolium*; y *cis*-calameneno, γ -muroleno, ciclosativeno y carvona, en *P. subflavum*.

La composición química de la fracción volátil de los extractos SFE indica la presencia de compuestos con propiedades antivirales, antibacterianas, antiinflamatorias y antinociceptivas, previamente identificados en los AE. Las propiedades farmacológicas que exhiben estos compuestos, podrían justificar el uso de estas especies en la etnomedicina. Además, estas propiedades proyectan a las especies del género *Piper*, como posibles bases para el desarrollo de fármacos de origen natural.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ORAC

Para evaluar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales y de los extractos obtenidos por SFE, se implementó el método ORAC y los valores obtenidos, expresados en (μ mol Trolox® / g sustancia), se compararon con los obtenidos para los antioxidantes de referencia BHT (derivado fenólico sintético) y α -tocoferol (compuesto de origen natural, conocido como vitamina E).

Según Prior *et al.* [126], el método ORAC representa el mecanismo de actividad antioxidante a través de la transferencia de un átomo de hidrógeno, que, es el más relevante en la biología humana. En la **Figura 31**, se muestra la curva de calibración elaborada para el cálculo de la actividad antioxidante de los AE y los extractos SFE; los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 13**.

Figura 32. Curva de calibración del Trolox® para el ensayo ORAC.

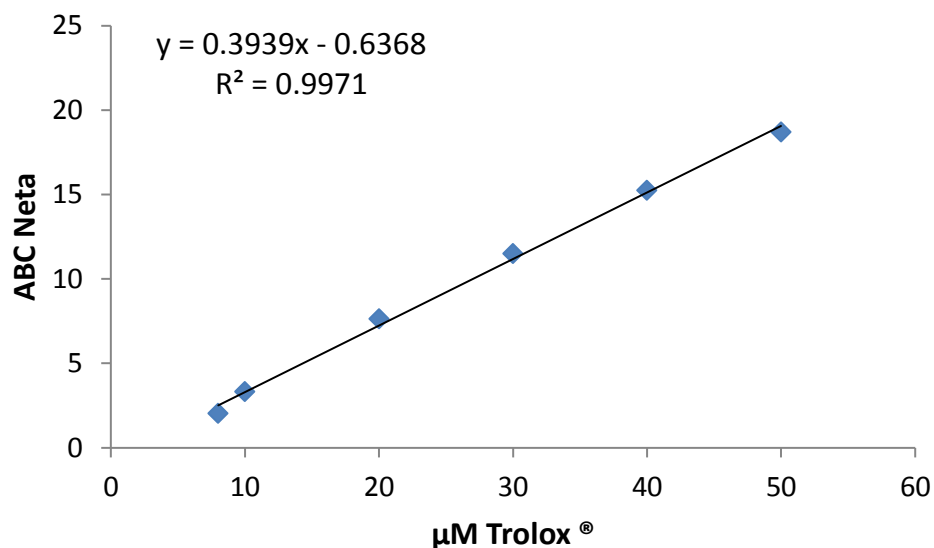


Tabla 13. Valores de actividad antioxidante para los aceites esenciales y extractos SFE, obtenidos por el método ORAC

Especie evaluada	Valor ORAC (μmol Trolox®/g de sustancia), (± s, n=3)	
	Aceite Esencial	Extracto SFE
<i>Piper cumanense</i>	2010±68	630±15
<i>Piper eriopodon</i>	740±12	449±7
<i>Piper peltatum</i>	ND*	400±15
<i>Piper marginatum</i>	1800±130	1255±81
<i>Piper dilatatifolium</i>	680±55	390±9
<i>Piper subflavum</i>	830±50	661±13
Sustancias de referencia		
BHT		410±15
α-Tocoferol		498±2

*Capacidad antioxidante no determinada por escasez de la muestra

En la **Tabla 13**, se observa que todos los AE analizados presentaron una actividad antioxidante mayor que la de los antioxidantes de referencia, BHT y α -tocoferol. La especie con el AE que presentó valor ORAC más alto fue *P. cumanense* (2010 ± 68 $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) con una actividad antioxidante aproximadamente cinco veces mayor que la del α -tocoferol. La actividad antioxidante más baja, para los AE, la presentó la especie *P. dilatatifolium* (680 ± 55 $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia); aun así, su valor fue 1.6 veces mayor que el obtenido para el α -tocoferol. Debido a la escasez de muestra no se pudo determinar el valor ORAC para el AE de *P. peltatum*.

En cuanto a los extractos SFE, solo las especies *P. dilatatifolium* y *P. peltatum* presentaron actividad antioxidante por debajo de la reportada para el antioxidante de referencia BHT (390 ± 9 y 400 ± 15 $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia, respectivamente). El valor más alto, se obtuvo para el extracto SFE de *P. marginatum* (1255 ± 81 $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia); éste fue 2.5 veces mayor que el obtenido para el α -tocoferol.

En general, se observó que los extractos SFE presentaron una capacidad antioxidante más baja que la alcanzada por los AE. Según la composición química analizada para cada muestra, los AE poseen una mayor cantidad de moléculas con grupos hidroxilo que los extractos SFE. En estos grupos, el hidrógeno enlazado al oxígeno es considerado un hidrógeno lábil, ideal para neutralizar los radicales peroxilo previamente generados.

Al observar la composición química de la fracción volátil de *P. marginatum*, no se encontraron compuestos con grupos hidroxilos a los que se les pudiera el elevado valor ORAC que exhibió la muestra. Sin embargo, se ha demostrado que algunos monoterpenos y sesquiterpenos poseen actividad antioxidante elevada, aún actuando bajo el mecanismo TAH. Tal es el caso del *trans*- β -cariofileno, compuesto mayoritario en la fracción volátil de *P. marginatum*, que, según Donati *et al.* [128], exhibe un valor ORAC (3200 ± 173 $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) superior que el de los antioxidantes de referencia.

La alta actividad antioxidante exhibida por el AE de *P. cumanense* puede atribuirse a la abundancia de los alcoholes monoterpénicos que lo componen (37,9% del área cromatográfica total). En el AE de *P. marginatum*, se ha demostrado que, el espatulenol y *trans*- β -cariofileno, con abundancias relativas del 5,1 y 15,7% respectivamente, exhiben actividad antioxidante [128]. Sin embargo, no se puede descartar que algunos de los componentes minoritarios puedan presentar efectos aditivos y/o sinérgicos que contribuyan a la actividad antioxidante del AE total.

Tanto los extractos SFE, como los AE de las especies analizadas, exhibieron propiedades antioxidantes equiparables y en muchos casos, superiores a las de los antioxidantes comunes BHT y α -tocoferol. Según los resultados obtenidos, las plantas del género *Piper* estudiadas se caracterizaron por poseer actividades antioxidantes elevadas. Estos resultados sugieren el uso de AE y extractos SFE obtenidos a partir de estas plantas, como alternativa natural para prevenir el deterioro oxidativo de otras matrices.

5. CONCLUSIONES

Durante la expedición botánica realizada en las provincias de Soto, Vélez y Guanentá del departamento de Santander-Colombia, se recolectaron 27 especies vegetales; de estas, seis fueron identificadas como pertenecientes al género *Piper* (*P. cumanense*, *P. eriopodon*, *P. marginatum*, *P. peltatum*, *P. dilatatifolium* y *P. subflavum* var. *espejuelanum*). Sus partes aéreas fueron utilizadas para la obtención de AE por MWDH y extractos por SFE; se obtuvieron rendimientos que variaron entre el 0,03 y 0,33% para los AE y entre 0,14 y 1,36% para los extractos SFE. La especie con el rendimiento de AE más alto fue *P. marginatum* (0,33%), mientras el rendimiento más alto para la SFE se alcanzó con la especie *P. cumanense* (1,36%).

Se estudió por primera vez la composición química de los AE de *P. cumanense*, y de *P. subflavum* var. *espejuelanum*. El AE *P. cumanense*, se caracterizó por la abundancia de monoterpenos oxigenados, principalmente, alcoholes, de los cuales el linalol fue el compuesto mayoritario (37,2%). Por otra parte, el AE de *P. subflavum*, se compuso, principalmente, de: trans- β cariofileno (15,9%), α -pineno (18,9%), y β -pineno (13,2%).

Las composiciones químicas de los AE y de las fracciones volátiles de los extractos obtenidos por SFE, se determinaron usando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. En general, los AE analizados presentaron una cantidad representativa de sesquiterpenos (10,1-66,8%); especialmente los AE de *P. peltatum* (66,8%) y *P. marginatum* (50,5%). También, se resalta la presencia de los fenilpropanoides presentes en el AE de *P. marginatum* (19,8%), de sesquiterpenos oxigenados en *P. dilatatifolium* (52,4%) y de monoterpenos oxigenados en *P. cumanense* (44,2%).

En las fracciones volátiles, monitoreadas usando HS-SPME, se identificaron, mayoritariamente, sesquiterpenos. En su composición química, no se encontraron

metabolitos polares, hecho relacionado con el uso del CO₂ en estado supercrítico como solvente de extracción.

Los resultados del ensayo ORAC demostraron que los AE de las especies estudiadas poseen actividad antioxidante mayor que la exhibida por las sustancias de referencia, BHT y α -tocoferol. Entre ellas, se resalta la actividad antioxidante de los AE de las especies *P. cumanense* (2010 \pm 68 μ molTrolox®/g de sustancia) y *P. marginatum* (1800 \pm 130 μ molTrolox®/g de sustancia). En cuanto a los extractos SFE, el valor más alto, lo exhibió la especie *P. marginatum* (1255 \pm 81 μ molTrolox®/g de sustancia).

Se observó que muchas de las moléculas frecuentes, identificadas en los AE analizados, poseen actividades antiinflamatorias, antivirales antibacteriales y anestésicas, comprobadas por otros estudios, relacionadas con el uso tradicional que se ha dado a estas especies. Estos resultados, sugieren el estudio de las especies del género *Piper* como punto de apoyo para el desarrollo de tratamientos médicos alternativos.

6. RECOMENDACIONES

Al exhibir una capacidad antioxidante significativamente superior a la determinada para las sustancias de referencia, los AE podrían ser usados para la protección de diversas matrices. Sin embargo, esta aplicación requiere el desarrollo de pruebas de citotoxicidad que respalden su uso en productos de consumo.

El ensayo ORAC permite estimar la actividad antioxidante de las muestras por el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno. Sin embargo, para conocer la protección antirradicalaria total que exhiben estas especies, es necesario aplicar ensayos enfocados en otros mecanismos de acción como el de transferencia de electrón, por lo que se sugiere evaluar la capacidad antioxidante de las muestras a través de ensayos como el de peroxidación lipídica y ABTS.

Es necesario ampliar el análisis realizado a los extractos SFE con el fin de conocer la fracción no volátil que los compone.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Stashenko E. Aceites esenciales. Primera edición. *Universidad Industrial de Santander*. Bucaramanga, **2009**; pp. 13-34, 39-50, 87-122.
- 2 Bandoni A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. *CYTED. Subprograma IV., proyecto IV. 6. Universidad de Buenos Aires*. Buenos Aires, **2002**. pp. 11-38, 82-92, 180-214
- 3 Parmar V., Jain S., Bisht K., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O., Prasad A., Wengel J., Olsen C. y Boll P. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*. **1997**, 46. pp. 597-673
- 4 García H. Flora medicinal de Colombia. Botánica médica. I Vol. Segunda edición. *Tercer mundo editores*. Bogotá, **1992**. pp. 222-235
- 5 Ou B., Hampsch M. y Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, 49. pp. 4619-4626
- 6 Nakatani N., Inatani R., Ohta H., Nishioka A. Chemical constituents of peppers (*Piper* spp.) and application to food preservation: naturally occurring antioxidative compounds. *Environmental Health Perspectives*. **1986**, 67. pp. 135-142
- 7 Stashenko E. Aceites esenciales: el espíritu de las plantas. *Innovación y ciencia*. **2010**, 17. pp. 28-43
- 8 Marriott P., Shellie R. y Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*. **2001**, 936. pp. 1-22
- 9 Sell C. S. A fragrant introduction to terpenoid chemistry. Primera edición. *The Royal Society of Chemistry*. Cambridge, **2003**. pp. 1-18
- 10 Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Cuarta edición. *Allured Publishing Corporation*. Illinois, **2007**.
- 11 Ohloff G. Importance of minor components in flavors and fragrances. *Perfumer and Flavorist*. **1978**, 3. pp. 11-22
- 12 Dewick P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Segunda Edición. *John Wiley & Sons*. Chichester, **2002**. pp. 7-12, 167-172

- 13 Baser K. y Buchbauer G. Handbook of essential oils. Science, technology and applications. *CRC press. Taylor and Francis group*. Boca Raton, **2010**. pp. 39-81, 121-183
- 14 Kauffman B. y Christen P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*. **2002**, 13. pp. 105-113
- 15 Ndiomu D. y Simpson C. Some applications of supercritical fluid extraction. *Analytica Chimica Acta*. **1988**, 213. pp. 237-243
- 16 Reverchon E. y De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*. **2006**, 38. pp. 146-166
- 17 Stashenko E. y Martínez J. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*. **2011**, 3. pp. 25-48
- 18 Steffen A. y Pawliszyn J. Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44. pp. 2187-2193
- 19 Zhang Z. y Pawliszyn J. Headspace Solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*. **1993**, 65. pp. 1843-185
- 20 Gorecki T. y Yu X., Pawliszyn J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *The Analyst*. **1999**, 124. pp. 643-649
- 21 Pawliszyn J. Theory of solid phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*. **2000**, 38. pp. 270-278
- 22 Stashenko E. y Martínez J. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*. **2009**, 1. pp. 29-45
- 23 Stashenko E. y Martínez J. GC y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica*. **2010**, 2. pp. 23-46
- 24 McNair H. y Miller J. Basic gas chromatography. Segunda edición. *John Wiley & Sons*. Hoboken, **2009**. pp. 1-14
- 25 Marriott P., Shellie R. y Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*. **2001**, 936. pp. 1-22
- 26 Silverstein R. y Webster F. Spectrometric identification of organic compounds. Sexta edición. *John Wiley & Sons*. New York, **1998**. pp. 2-15

- 27 Stashenko E. y Martínez J. Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación. *Scientia Chromatographica*. **2009**, 1. pp. 19-36
- 28 Williams D. y Fleming I. Spectroscopic methods in organic chemistry. Cuarta edición. *McGraw-Hill Book Company*. Mainhead, **1987**. pp. 150-159
- 29 The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals, [Sitio de internet] disponible en: www.pherobase.com/kovats/. Fecha de consulta: 5 de febrero de 2015
- 30 Fang Z., Yang S. y Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. **2002**, 18. pp. 872-879
- 31 Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or What's the matter in oxygen? *Annals of The New York Academy of Sciences*. **1999**, 893. pp. 13-18
- 32 Holmes O., Bernstein C. y Bernstein H. Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: a review. *Mutation Research*. **1992**, 275. pp. 305-315
- 33 Amorati R., Foti M. y Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, 61. pp. 10835-10847
- 34 Ashok B. y Ali R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Experimental Gerontology*. **1999**, 34. pp. 293-303
- 35 Hallywell B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. **1995**, 49. pp. 1341-1348
- 36 Panchawat S., Rathore K. y Sisodia S. A review on herbal antioxidants. *International Journal of PharmaTech Research*. **2010**, 2. pp. 232-239
- 37 Choe E. y Min D. Mechanism of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2009**, 8. pp. 345-358
- 38 Williams G., Iatropoulos M. y Whysner J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food and Chemical Toxicology*. **1999**, 37. pp. 1027-1038
- 39 Olivero J., Gonzales T., Güette J., Jaramillo B. y Stashenko E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **2010**, 20. pp. 568-574
- 40 Huang D., Ou B. y Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53. pp. 1841-1856

- 41 Badarinath A., Mallikarjuna K., Madhu C., Ramkanth S., Rajan T. y Gnanaprakash K. A review on *In-vitro* antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmaTech Research*. **2010**, 2. pp. 1276-1285
- 42 Prior R., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B. y Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51. pp. 3273-3279
- 43 Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. y Prior R. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50. pp. 4437-4444
- 44 Samuel R. y Morawetz W. Chromosomal evolution within *Piperaceae*. *Plant Systematics and Evolution*. **1989**, 166. pp. 105-117
- 45 Dyer L. y Palmer A. *Piper*: A model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution. Primera Edición. *Kluwer Academic, Plenum Publishers*. New York, **2004**. pp. 1-4
- 46 Parra J., Patiño O., Prieto J., Delgado W. y Cuca L. A new benzoic acid derivative isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*. **2013**, 6. pp. 590-592
- 47 Parra J., Delgado W. y Cuca L. Cumanensic acid, new chromene isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*. **2011**, 4. pp. 280-282
- 48 Garavito G., Rincón J., Arteaga L., Hata Y., Bourdy G., Gimenez A., Pinzón R. y Deharo E. Antimalarial activity of some Colombia medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, 107. pp. 460-462
- 49 Tangarife V., Correa J., Roa V., Pino N., Betanur L., Durán D., Stashenko E. y Mesa A. Anti-dermatophyte, anti-Fusarium and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of Piper genus. *Journal of Essential Oil Research*. **2014**, 26. pp. 221-227
- 50 Olivero J., Güete J. y Stashenko E. Acue toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus Lippia and Piper collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. **2009**, 8. pp. 419-427

- 51 Mendoza C., Celis A. y Pachón M. Herbicide effects of piper extracts on a seed bank in fusagasuga (Colombia). *Acta Horticulturae*. **2014**, 1030. pp. 77-82
- 52 Moraes M., Machado S. y Ortiz M. Essential oil of the *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. *Journal of Essential Oil Research*. **2004**, 16. pp. 15-16
- 53 Gustafson K., Cardellina J., McMahon J., Pannell L., Cragg G. y Boyd M. The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Photomorphe peltata*. *Journal of Organic Chemistry*. **1992**, 57. pp. 2809-2811
- 54 Breitbach U., Niehues M., Lopes N., Faria J. y Brandao M. Amazonian Brazilian plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. *Journal of Ethnopharmacology*. **2013**, 147. pp. 180-189
- 55 Desmarchelier C., Mongelli E., Coussio J. y Ciccía G. Inhibition of lipid peroxidation and iron (II)-dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **1997**, 30. pp. 85-91
- 56 Luz A., Domingos J., Zoghi M., Andrade E., da Silva M. y Maia J. Volatile constituents of Brazilian piperaceae, part 5., The oils of *Pothomorphe umbellata* and *P. peltata*. *Journal of Essential Oil Research*. **1999**, 11. pp. 479-481
- 57 Silva E., Silva A., Lagos K., Rocha L., Oliveira O., Carvalho M., Maia F., Tadei W. y Pohlit A. Stability and antioxidant activity of semi-synthetic derivatives of 4-nerolidylcatechol. *Molecules*. **2013**, 18. pp. 178-189
- 58 Pino J., Marbot R., Bello A. y Urquiola A. Essential oils of *Piper peltata* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. **2004**, 16. pp. 124-126
- 59 Andrade E., Carreira L., da Silva M., da Silva J., Bastos C., Sousa P., Guimaraes E. y Maia J. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chemistry and Biodiversity*. **2008**, 5. pp. 197-208
- 60 Autran E., Neves I., da Silva C., Santos G., da Camara C. y Navarro D. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresource Technology*. **2009**, 100. pp. 2284-2288
- 61 Reigada J., Tcacenco C., Andrade L., Kato M., Porto A. y Lago J. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). *Tetrahedron: Asymmetry*. **2007**, 18. pp. 1054-1058

- 62 Souto R., Harada A., Andrade E. y Maia J. Insecticidal activity of Piper essential oils from de Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical Entomology*. **2012**, 41. pp. 510-517
- 63 Assis C., Gondim M., Siqueira H. y da Camara C. Toxicity of essential oils from plants towards *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and *Suidasia pontifica* Oudemans (Acari:Astigmata). *Journal of Stored Products Research*. **2011**, 47. pp. 311-315
- 64 Andrade E., Alves C., Guimaraes E., Carreira L. y Maia J. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2011**, 39. pp. 669-675
- 65 Silva D. y Bastos C. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. *Fitopatologia Brasileira*. **2007**, 32. pp. 143-145
- 66 Terreaux C., Gupta M. y Hostettmann K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry*. **1998**, 49. pp. 461-464
- 67 Cysne J., Canuto K., Pessoa O., Nunes E. y Silveira E. Leaf essential oils of four *Piper* species from the State of Ceará – Northeast of Brazil. *Journal of Brazilian Chemical Society*. **2005**, 16. pp. 1378-1381
- 68 Boll P., Parmar V., Tyagi O., Prasad A., Wengel J. y Olsen C. Some recent isolation studies from potential insecticidal *Piper* species. *Pure and Applied Chemistry*. **1994**, 66. pp. 2339-2342
- 69 Jantan I., Ahmad A.R, Ahmad A.S. y Mohd A. A comparative study of the essential oils of five *Piper* species from Peninsular Malaysia. *Flavour and Fragrance Journal*. **1994**, 9. pp. 339-342
- 70 Dias P., Moreira D., Guimaraes E. y Coelho M. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from de Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry*. **2001**, 58. pp. 547-551
- 71 Tsarkova T. Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de las plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas. Tesis de maestria. Escuela de química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, **1997**. pp. 13-36
- 72 NIST, Standard Reference Database; NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program; **2008**, Data Version 05; Gaithersburg, EE.UU.
- 73 Wiley 138 L, Mass Spectral Database; *John Wiley & Sons*, **1990**, EE.UU

- 74 Rodríguez E., Árias E., Vásquez E., Martínez J. y Stashenko E. Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava* obtenidos con CO₂ supercrítico. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*. **2012**, 36. pp. 305-315
- 75 Sefidkom F., Abdasi K., Khaniki G. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Food Chemistry*. **2006**, 99. pp. 19-23
- 76 Nogueira J., Cardoso A., Silva J., Sousa P., Pegentino D. y Mendes R. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. *Neurochemical Research*. **2013**, 38. pp. 1861-1870
- 77 Lee K., Lee J.H., Kim S., Cho M. y Lee J. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. *Environmental Biotechnology*. **2014**, 98. pp. 9447-9457
- 78 Silva M., Oliveira G., Carvalho R. y Sousa D. Antischistosomal activity of the terpene Nerolidol. *Molecules*. **2014**, 19. pp. 3793-3803
- 79 Kunz S. y Becker H. Bibenzyl derivatives from the liverwort *Ricciocarpus natans*. *Phytochemistry*. **1994**, 36. pp. 675-677
- 80 Niu C., Qu J. y Lou H. Antifungal bis[bibenzyls] from the Chinese liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Chemistry and Biodiversity*. **2006**, 3. pp. 34-40
- 81 Noge K. y Becerra J. Germacrene D, a common sesquiterpene in the genus *Bursera* (Burseraceae). *Molecules*. **2009**, 14. pp. 5289-5297.
- 82 Büllow, N. y König W. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry*. **2000**, 55. pp. 141-168.
- 83 Hahlbrock K. y Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **1989**, 40. pp. 347-369
- 84 Hasheminejad G. y Caldwell J. Genotoxicity of the alkenylbenzenes α - and β -asarone, myristicin and elemicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*. **1994**, 32. pp. 223-231
- 85 Lee B., Sur B., Yeom M., Shim I., Lee H. y Hahm D. Alpha-asarone, a major component of *Acorus gramineus*, attenuates corticosterone-induced anxiety-

- like behaviours via modulating TrkB signaling process. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. **2014**, 18. pp. 191-200
- 86 Devi S., Mali A., Rahee M. y Belinda E. Antioxidant properties of alpha asarone. *Asian Journal of Biochemistry*. **2014**, 9. pp. 107-113
- 87 Lim H., Kumar H., Kim B., More S., Kim I., Park J., Park S., Kim S. y Choi D. β -Asarone (cis-2,4,5-trimethoxy-1-allyl phenyl), attenuates pro-inflammatory mediators by inhibiting NF- κ B signaling and the JNK pathway in LPS activated BV-2 microglia cells. *Food and Chemical Toxicology*. **2014**, 72. pp. 265-272
- 88 Somnuk A., Palanuvej C. y Ruangrunsi N. The pharmacognostic specification of *Acorus calamus* dried rhizome with special reference to α - and β -asarone contents in its essential oil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. **2014**, 26. pp. 97-100
- 89 Toyota M., Koyama H., Mizutani M. y Asakawa Y. (-)-*ent*-Spathulenol isolated from liverworts is an artefact. *Phytochemistry*. **1996**, 41. pp. 1347-1350
- 90 Chao L., Hua K., Hsu H., Cheng S., Liu J. y Chang S. Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53. pp. 7274-7278.
- 91 Martins F., Doriguetto A., Souza T., Souza K., Santos M., Moreira M. y Barbosa L. Composition, and anti-inflammatory and antioxidant activities of the volatile oil from the fruit peel of *Garcinia brasiliensis*. *Chemistry and Biodiversity*. **2008**, 5. pp. 251-258
- 92 Ziaei A., Ramezan M., Wright L., Paetz C., Schneider B. y Amirghofran Z. Identification of spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the immunomodulatory effects. *Phytotherapy Research*. **2011**, 25. pp. 557-562.
- 93 Mirov N., Zavarin E. y Snajberk K. Chemical composition of the turpentines of some Eastern mediterranean pines in relation to their classification. *Phytochemistry*, **1966**, 5. pp. 97-107
- 94 Allahverdiev A., Gündüz G. y Murzin D. Kinetics of α -pinene isomerization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. **1998**, 37. pp. 2373-2377
- 95 Gündüz G. y Findil S. Isomerization of α -pinene to camphene. *Journal of the American Oil Chemists' society*. **1997**, 74. pp. 1145-1151
- 96 Türkez H., Celik K. y Togar B. Effects of copaene, a tricyclic sesquiterpene, on human lymphocytes cells in vitro. *Cytotechnology*. **2014**, 66. pp. 597-603

- 97 Shelly T. Exposure to α -copaene-containing oils enhances mating success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. **2001**, 94. pp. 497-502
- 98 Nishida R., Shelly T., Whittier T. y Kaneshiro K. α -Copaene, a potential rendezvous cue for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*? *Journal of Chemical Ecology*. **2000**, 26. pp. 87-100
- 99 Türkez H., Togar B., Tatar A., Geyikoglu F. y Hacimuftuoglu A. Cytotoxic and cytogenetic effects of α -copaene on rat neuron and N2a neuroblastoma cell lines. *Biologia*. **2014**, 569. pp. 936-942
- 100 Sotto A., Maffei F., Hrelia P., Castelli F., Sarpietro M. y Mazzanti G. Genotoxicity assessment of β -caryophyllene oxide. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **2013**, 66. pp. 264-268
- 101 Chavan M., Wakte P. y Shinde D. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*. **2010**, 17. pp. 149-151
- 102 Sain S., Naoghare P., Devi S., Daiwile A., Krishnamurthi P. y Chakrabarti T. Beta caryophyllene and caryophyllene oxide, isolated from *Aegle marmelos*, as the potent anti-inflammatory agent against lymphoma and neuroblastoma cells. *Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. **2014**, 13. pp. 45-55
- 103 Yang D., Michel L., Chaumont J. y Millet J. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia*. **1999**, 148. pp. 79-82
- 104 Oh M., Yang J., Kim M. y Lee H. Acaricidal activities of β -caryophyllene oxide and structural analogues derived from *Psidium cattleianum* oil against house dust mites. *Pest Management Science*. **2014**, 70. pp. 757-762
- 105 Raguso R. y Pichersky E. A day in the life of a linalool molecule: Chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: Linalool biosynthesis in flowering plants. *Plant Species Biology*. **1999**, 14. pp. 95-120
- 106 Argañosa G., Sosulski F. y Slikard A. Seed yields and essential oil of northern-grown coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. **1998**, 6. pp. 23-32
- 107 Nykänen I. High resolution gaschromatographic-mass-spectrometric determination of the flavour composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivated in Finland. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*. **1986**, 182. pp. 205-2011

- 108 Peana A., D'Aquila P., Panin F., Serra G., Pippia P. y Moretti M. Anti-inflammatory activity of linalol and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*. **2002**, 9. pp. 721-726
- 109 Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*. **2004**, 94. pp. 223-253
- 110 Aprotosoae A., Hancianu M., Costache I. y Miron A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*. **2014**, 29. pp. 193-219
- 111 Chen W., Xu B., Mao J., wei F., Li M., Liu T., Jin X. y Zhang L. Inhibitory effects of α -pinene on hepatoma carcinoma cell proliferation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. **2014**, 15. pp. 3293-3297
- 112 Rufino A., Ribeiro M., Judas F., Salgueiro L., Lopes M., Cavaleiro C. y Mendes A. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- α -pinene: structural and enantiomeric selectivity. *Journal of Natural Products*. **2014**, 77. pp. 264-269
- 113 Leite A., Oliveira E., Leite E., Fátima M., Nogueira V. y Almeida I. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2007**, 43. pp. 121-126
- 114 Gertsch J., Leonti M., Raduner S., Racz I., Chen J-Z., Xie X., Altmann K., Karsak M. y Zimmer A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2008**, 105. pp. 9099-9104
- 115 Freire L., Andersen M., Gama V., Molska G. y Carlini E. The oral administration of *trans*-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. *Phytomedicine*. **2014**, 21. pp. 356-362
- 116 Rogerio A., Andrade E., Leite D., Figueiredo C. y Calixto J. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology*. **2009**, 158. pp. 1074-1087
- 117 Fernandes E., Passos G., Medeiros R., Cunha F., Ferreira J., Campos M., Pianowski L y Calizto J. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*. **2007**, 569. pp. 228-236

- 118 Legault J. y Pichette A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **2007**, 59. pp. 1643-1647.
- 119 Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K. y Lekphrom R. Bioactive constituents of the roots of *Polyalthia cerasoides*. *Journal of Natural Products*. **2007**, 70. pp. 1536-1538.
- 120 Pérez A., Torres A., Rivas V., Salazar A. y Waksman N. Activity against *Streptococcus pneumoniae* of the essential oil and δ -cadinene isolated from *Schinus molle* fruit. *Journal of Essential Oil Research*. **2011**, 23. pp. 25-28
- 121 Silva J., Pinto L., Burbano R., Montenegro R., Guimaraes E., Andrade E. y Maia J. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*. **2014**, 58. pp. 55-60
- 122 Kamm J. y Buttery R. Response of the alfalfa seed chalcid, *Bruchophagus roddi*, to alfalfa volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **1983**, 33, pp. 129-134
- 123 Katerinopoulos H., Pagona G., Afratis A., Stratigakis N. y Roditakis N. Composition and insect attracting activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Chemical Ecology*. **2005**, 31. pp. 111-122
- 124 Souza J., Menezes P., Viana M., Rigoldi L., Guedes J., Pens D., Souza A. y Quintans J. Improvement of *p*-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine*. **2013**, 20. pp. 436-440
- 125 Mendes T., Fonseca R., Fernandes I., Lopes G., Araujo A., Lima S. y Mendes R. Evaluation of *p*-cymene, a natural antioxidant. *Pharmaceutical Biology*. **2015**, 53. pp. 423-428
- 126 Prior R., Wu X. y Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53. pp. 4290-4302
- 127 Mesa A., Rincón D., Toro J., Tamayo A., Blair S. y Rojano B. Actividad antioxidante de *Piper piedecuestanum* Trel. y Yunk y *Piper subpedale* Trel y Yunk. *Revista Latinoamericana de Química*. **2011**, 39. pp. 91-99
- 128 Donati M., Mondin A., Chen Z., Mendes F., Braga B., Schirato G., Pastore P. y Frolidi G. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, *trans*-anetole, β -caryophyllene and myrcene. *Natural Product Research*. **2014**, 3. pp. 1-8

- 129 Babushok V., Linstrom P. y Zenkevich G. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. **2011**, 40. pp. 1-47
- 130 Stashenko E., Martínez J., Cala M., Durán D. y Caballero D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*. **2013**, 36; pp. 192-202
- 131 Choi H. Characteristic odor components of Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) peel oil. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2005**, 53. pp. 1642-1647.
- 132 Högnadóttir A. y Rouseff R. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2003**, 998. pp. 201-211
- 133 Aliboudhar H., Tigrine-Kordkani N., Hanifi N. y Meklati B. Volatiles profiling and antioxidant activity evaluation of different parts of a medicinal plant: *Anacyclus clavatus*. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. **2013**, 19. pp. 33-47
- 134 Frizzo C., Serafini L., Dellacasa E., Lorenzo D. y Moyna P. Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. from southern Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*. **2001**, 16. pp. 286-288
- 135 Tuberoso C., Kowalczyk A., Coroneo V., Russo M., Dessi S. y Cabras P. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and antifungal activities of the essential oil of *Achillea ligustica* All. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53. pp. 10148-10153
- 136 Joulain D. y König W. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. *E.B.-Verlag*. Hamburg, **1998**
- 137 Menut C., Lamaty G., Weyertahl P., Marschall H., Seelmann I. y Amvam P. Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXI. Tricyclic sesquiterpenes from the root essential oil of *Echinops giganteus* var. *lelyi* C.D. Adams. *Flavour and Fragrance Journal*. **1997**, 12. pp. 415-421
- 138 Andriamaharavo N. Retention Data. NIST Mass spectrometry Data Center. *NIST Mass Spectrometry Data Center*. **2014**
- 139 Chang L., Sheng L., Yang M. y An D. Retention index of the essential oil in temperature-programmed capillary column gas chromatography. *Acta Pharmacologica Sinica*. **1989**, 24. pp. 847-852

- 140 Braggins T. Effect of stress-related changes in sheep meat ultimate pH on cooked odor and flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44. pp. 2352-2360
- 141 Wang G., Tian L., Fan Y. y Qi M. Headspace single drop microextraction gas chromatography mass spectrometry for the analysis of volatile compounds from herbal Asari. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. **2013**. pp. 1-6
- 142 Karioti A., Skaltsa H., Demetzos C. y Perdetzoglou D. Effect of nitrogen concentration of the nutrient solution on the volatile constituents of leaves of *Salvia fruticosa* Mill. In solution culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51. pp. 6505-6508
- 143 Courtois E., Timothy C., Blandinieres P., Stien D., Bessiere J., Houel E., Baraloto C. y Chave J. Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: a survey in French Guiana. *Journal of Chemical Ecology*. **2009**, 35. pp. 1349-1362

BIBLIOGRÁFIA

Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Cuarta edición. *Allured Publishing Corporation*. Illinois, **2007**.

Aliboudhar H., Tigrine-Kordkani N., Hanifi N. y Meklati B. Volatiles profiling and antioxidant activity evaluation of different parts of a medicinal plant: *Anacyclus clavatus*. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. **2013**, 19. pp. 33-47

Allahverdiev A., Gündüz G. y Murzin D. Kinetics of α -pinene isomerization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. **1998**, 37. pp. 2373-2377

Amorati R., Foti M. y Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, 61. pp. 10835-10847

Andrade E., Alves C., Guimaraes E., Carreira L. y Maia J. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2011**, 39. pp. 669-675

Andrade E., Carreira L., da Silva M., da Silva J., Bastos C., Sousa P., Guimaraes E. y Maia J. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chemistry and Biodiversity*. **2008**, 5. pp. 197-208

Andriamaharavo N. Retention Data. NIST Mass spectrometry Data Center. *NIST Mass Spectrometry Data Center*. **2014**

Aprotosoiaie A., Hancianu M., Costache I. y Miron A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*. **2014**, 29. pp. 193-219

Argañosa G., Sosulski F. y Slikard A. Seed yields and essential oil of northern-grown coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. **1998**, 6. pp. 23-32

Ashok B. y Ali R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Experimental Gerontology*. **1999**, 34. pp. 293-303

Assis C., Gondim M., Siqueira H. y da Camara C. Toxicity of essential oils from plants towards *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and *Suidasia pontifica* Oudemans (Acari: Astigmata). *Journal of Stored Products Research*. **2011**, 47. pp. 311-315

Autran E., Neves I., da Silva C., Santos G., da Camara C. y Navarro D. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresource Technology*. **2009**, 100. pp. 2284-2288

Babushok V., Linstrom P. y Zenkevich G. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. **2011**, 40. pp. 1-47

Badarinath A., Mallikarjuna K., Madhu C., Ramkanth S., Rajan T. y Gnanaprakash K. A review on *In-vitro* antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmaTech Research*. **2010**, 2. pp. 1276-1285

Bandoni A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. *CYTED. Subprograma IV., proyecto IV. 6. Universidad de Buenos Aires*. Buenos Aires, **2002**. pp. 11-38, 82-92, 180-214

Baser K. y Buchbauer G. Handbook of essential oils. Science, technology and applications. *CRC press. Taylor and Francis group*. Boca Raton, **2010**. pp. 39-81, 121-183

Boll P., Parmar V., Tyagi O., Prasad A., Wengel J. y Olsen C. Some recent isolation studies from potential insecticidal *Piper* species. *Pure and Applied Chemistry*. **1994**, 66. pp. 2339-2342

Braggins T. Effect of stress-related changes in sheep meat ultimate pH on cooked odor and flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44. pp. 2352-2360

Breitbach U., Niehues M., Lopes N., Faria J. y Brandao M. Amazonian Brazilian plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. *Journal of Ethnopharmacology*. **2013**, 147. pp. 180-189

Büllow, N. y König W. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry*. **2000**, 55. pp. 141-168.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*. **2004**, 94. pp. 223-253

Chang L., Sheng L., Yang M. y An D. Retention index of the essential oil in temperature-programed capillary column gas chromatography. *Acta Pharmacologica Sinica*. **1989**, 24. pp. 847-852

Chao L., Hua K., Hsu H., Cheng S., Liu J. y Chang S. Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53. pp. 7274-7278.

Chavan M., Wakte P. y Shinde D. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*. **2010**, 17. pp. 149-151

Chen W., Xu B., Mao J., wei F., Li M., Liu T., Jin X. y Zhang L. Inhibitory effects of α -pinene on hepatoma carcinoma cell proliferation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. **2014**, 15. pp. 3293-3297

Choe E. y Min D. Mechanism of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2009**, 8. pp. 345-358

Choi H. Characteristic odor components of Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) peel oil. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2005**, 53. pp. 1642-1647.

Courtois E., Timothy C., Blandinieres P., Stien D., Bessiere J., Houel E., Baraloto C. y Chave J. Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: a survey in French Guiana. *Journal of Chemical Ecology*. **2009**, 35. pp. 1349-1362

Cysne J., Canuto K., Pessoa O., Nunes E. y Silveira E. Leaf essential oils of four *Piper* species from the State of Ceará – Northeast of Brazil. *Journal of Brazilian Chemical Society*. **2005**, 16. pp. 1378-1381

Desmarchelier C., Mongelli E., Coussio J. y Ciccia G. Inhibition of lipid peroxidation and iron (II)-dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **1997**, 30. pp. 85-91

Devi S., Mali A., Rahee M. y Belinda E. Antioxidant properties of alpha asarona. *Asian Journal of Biochemistry*. **2014**, 9. pp. 107-113

Dewick P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Segunda Edición. *John Wiley & Sons*. Chichester, **2002**. pp. 7-12, 167-172

Dias P., Moreira D., Guimaraes E. y Coelho M. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from de Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry*. **2001**, 58. pp. 547-551

Donati M., Mondin A., Chen Z., Mendes F., Braga B., Schirato G., Pastore P. y Froldi G. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, *trans*-anetole, β -caryophyllene and myrcene. *Natural Product Research*. **2014**, 3. pp. 1-8

Dyer L. y Palmer A. *Piper*: A model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution. Primera Edición. *Kluwer Academic, Plenum Publishers*. New York, **2004**. pp. 1-4

Fang Z., Yang S. y Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. **2002**, 18. pp. 872-879

- Fernandes E., Passos G., Medeiros R., Cunha F., Ferreira J., Campos M., Pianowski L y Calizto J. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*. **2007**, 569. pp. 228-236
- Freire L., Andersen M., Gama V., Molska G. y Carlini E. The oral administration of *trans*-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. *Phytomedicine*. **2014**, 21. pp. 356-362
- Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or What's the matter in oxygen? *Annals of The New York Academy of Sciences*. **1999**, 893. pp. 13-18
- Frizzo C., Serafini L., Dellacasa E., Lorenzo D. y Moyna P. Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. from southern Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*. **2001**, 16. pp. 286-288
- Garavito G., Rincón J., Arteaga L., Hata Y., Bourdy G., Gimenez A., Pinzón R. y Deharo E. Antimalarial activity of some Colombia medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, 107. pp. 460-462
- García H. Flora medicinal de Colombia. Botánica médica. I Vol. Segunda edición. *Tercer mundo editores*. Bogotá, **1992**. pp. 222-235
- Gertsch J., Leonti M., Raduner S., Racz I., Chen J-Z., Xie X., Altmann K., Karsak M. y Zimmer A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2008**, 105. pp. 9099-9104
- Gorecki T. y Yu X., Pawliszyn J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *The Analyst*. **1999**, 124. pp. 643-649
- Gündüz G. y Findil S. Isomerization of α -pinene to camphene. *Journal of the American Oil Chemists' society*. **1997**, 74. pp. 1145-1151
- Gustafson K., Cardellina J., McMahan J., Pannell L., Cragg G. y Boyd M. The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Photomorphe peltata*. *Journal of Organic Chemistry*. **1992**, 57. pp. 2809-2811
- Hahlbrock K. y Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **1989**, 40. pp. 347-369
- Hallywell B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. **1995**, 49. pp. 1341-1348

Hasheminejad G. y Caldwell J. Genotoxicity of the alkenylbenzenes α - and β -asarone, myristicin and elemicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*. **1994**, 32. pp. 223-231

Högnadóttir A. y Rouseff R. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2003**, 998. pp. 201-211

Holmes O., Bernstein C. y Bernstein H. Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: a review. *Mutation Research*. **1992**, 275. pp. 305-315

Huang D., Ou B. y Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53. pp. 1841-1856

Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. y Prior R. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50. pp. 4437-4444

Jantan I., Ahmad A.R, Ahmad A.S. y Mohd A. A comparative study of the essential oils of five *Piper* species from Peninsular Malaysia. *Flavour and Fragrance Journal*. **1994**, 9. pp. 339-342

Joulain D. y König W. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. *E.B.-Verlag*. Hamburg, **1998**

Kamm J. y Buttery R. Response of the alfalfa seed chalcid, *Bruchophagus roddi*, to alfalfa volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **1983**, 33, pp. 129-134

Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K. y Lekphrom R. Bioactive constituents of the roots of *Polyalthia cerasoides*. *Journal of Natural Products*. **2007**, 70. pp. 1536-1538.

Karioti A., Skaltsa H., Demetzos C. y Perdetzoglou D. Effect of nitrogen concentration of the nutrient solution on the volatile constituents of leaves of *Salvia fruticosa* Mill. In solution culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51. pp. 6505-6508

Katerinopoulos H., Pagona G., afratis A., Stratigakis N. y Roditakis N. Composition and insect attracting activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Chemical Ecology*. **2005**, 31. pp. 111-122

Kauffman B. y Christen P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*. **2002**, 13. pp. 105-113

Kunz S. y Becker H. Bibenzyl derivatives from the liverwort *Ricciocarpus natans*. *Phytochemistry*. **1994**, 36. pp. 675-677

Lee B., Sur B., Yeom M., Shim I., Lee H. y Hahm D. Alpha-asarone, a major component of *Acorus gramineus*, attenuates corticosterone-induced anxiety-like behaviours via modulating TrkB signaling process. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. **2014**, 18. pp. 191-200

Lee K., Lee J.H., Kim S., Cho M. y Lee J. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. *Environmental Biotechnology*. **2014**, 98. pp. 9447-9457

Leguault J. y Pichette A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **2007**, 59. pp. 1643-1647.

Leite A., Oliveira E., Leite E., Fátima M., Nogueira V. y Almeida I. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2007**, 43. pp. 121-126

Lim H., Kumar H., Kim B., More S., Kim I., Park J., Park S., Kim S. y Choi D. β -Asarone (cis-2,4,5-trimethoxy-1-allyl phenyl), attenuates pro-inflammatory mediators by inhibiting NF- κ B signaling and the JNK pathway in LPS activated BV-2 microglia cells. *Food and Chemical Toxicology*. **2014**, 72. pp. 265-272

Luz A., Domingos J., Zoghi M., Andrade E., da Silva M. y Maia J. Volatile constituents of Brazilian piperaceae, part 5., The oils of *Pothomorphe umbellate* and *P. peltate*. *Journal of Essential Oil Research*. **1999**, 11. pp. 479-481

Marriott P., Shellie R. y Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*. **2001**, 936. pp. 1-22

Marriott P., Shellie R. y Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*. **2001**, 936. pp. 1-22

Martins F., Doriguetto A., Souza T., Souza K., Santos M., Moreira M. y Barbosa L. Composition, and anti-inflammatory and antioxidant activities of the volatile oil from the fruit peel of *Garcinia brasiliensis*. *Chemistry and Biodiversity*. **2008**, 5. pp. 251-258

McNair H. y Miller J. Basic gas chromatography. Segunda edición. *John Wiley & Sons*. Hoboken, **2009**. pp. 1-14

Mendes T., Fonseca R., Fernandes I., Lopes G., Araujo A., Lima S. y Mendes R. Evaluation of *p*-cymene, a natural antioxidant. *Pharmaceutical Biology*. **2015**, 53. pp. 423-428

Mendoza C., Celis A. y Pachón M. Herbicide effects of piper extracts on a seed bank in fusagasuga (Colombia). *Acta Horticulturae*. **2014**, 1030. pp. 77-82

Menut C., Lamaty G., Weyertahl P., Marschall H., Seelmann I. y Amvam P. Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXI. Tricyclic sesquiterpenes from the root essential oil of *Echinops giganteus* var. *Ielyi* C.D. Adams. *Flavour and Fragrance Journal*. **1997**, 12. pp. 415-421

Mesa A., Rincón D., Toro J., Tamayo A., Blair S. y Rojano B. Actividad antioxidante de *Piper piedecuestanum* Trel. y Yunk y *Piper subpedale* Trel y Yunk. *Revista Latinoamericana de Química*. **2011**, 39. pp. 91-99

Mirov N., Zavarin E. y Snajberk K. Chemical composition of the turpentine of some Eastern mediterranean pines in relation to their classification. *Phytochemistry*; **1966**, 5. pp. 97-107

Moraes M., Machado S. y Ortiz M. Essential oil of the *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. *Journal of Essential Oil Research*. **2004**, 16. pp. 15-16

Nakatani N., Inatani R., Ohta H., Nishioka A. Chemical constituents of peppers (*Piper* spp.) and application to food preservation: naturally occurring antioxidative compounds. *Environmental Health Perspectives*. **1986**, 67. pp. 135-142

Ndiomu D. y Simpson C. Some applications of supercritical fluid extraction. *Analytica Chimica Acta*. **1988**, 213. pp. 237-243

Nishida R., Shelly T., Whittier T. y Kaneshiro K. α -Copaene, a potential rendezvous cue for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*? *Journal of Chemical Ecology*. **2000**, 26. pp. 87-100

NIST, Standard Reference Database; NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program; **2008**, Data Version 05; Gaithersburg, EE.UU.

Niu C., Qu J. y Lou H. Antifungal bis[bibenzyls] from the Chinese liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Chemistry and Biodiversity*. **2006**, 3. pp. 34-40

Noge K. y Becerra J. Germacrene D, a common sesquiterpene in the genus *Bursera* (Burseraceae). *Molecules*. **2009**, 14. pp. 5289-5297.

Nogueira J., Cardoso A., Silva J., Sousa P., Pegentino D. y Mendes R. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. *Neurochemical Research*. **2013**, 38. pp. 1861-1870

Nykänen I. High resolution gaschromatographic-mass-spectrometric determination of the flavour composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivated in Finland. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. **1986**, 182. pp. 205-2011

Oh M., Yang J., Kim M. y Lee H. Acaricidal activities of β -caryophyllene oxide and structural analogues derived from *Psidium cattleianum* oil against house dust mites. *Pest Management Science*. **2014**, 70. pp. 757-762

Ohloff G. Importance of minor components in flavors and fragrances. *Perfumer and Flavorist*. **1978**, 3. pp. 11-22

Olivero J., Gonzales T., Güette J., Jaramillo B. y Stashenko E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **2010**, 20. pp. 568-574

Olivero J., Güete J. y Stashenko E. Acue toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. **2009**, 8. pp. 419-427

Ou B., Hampsch M. y Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, 49. pp. 4619-4626

Panchawat S., Rathore K. y Sisodia S. A review on herbal antioxidants. *International Journal of PharmaTech Research*. **2010**, 2. pp. 232-239

Parmar V., Jain S., Bisht K., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O., Prasad A., Wengel J., Olsen C. y Boll P. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*. **1997**, 46. pp. 597-673

Parra J., Delgado W. y Cuca L. Cumanensic acid, new chromene isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*. **2011**, 4. pp. 280-282

Parra J., Patiño O., Prieto J., Delgado W. y Cuca L. A new benzoic acid derivative isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*. **2013**, 6. pp. 590-592

Pawliszyn J. Theory of solid phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*. **2000**, 38. pp. 270-278

Peana A., D'Aquila P, Panin F., Serra G., Pippia P. y Moretti M. Anti-inflammatory activity of linalol and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*. **2002**, 9. pp. 721-726

Pérez A., Torres A., Rivas V., Salazar A. y Waksman N. Activity against *Streptococcus pneumoniae* of the essential oil and δ -cadinene isolated from *Schinus molle* fruit. *Journal of Essential Oil Research*. **2011**, 23. pp. 25-28

Pino J., Marbot R., Bello A. y Urquiola A. Essential oils of *Piper peltata* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. **2004**, 16. pp. 124-126

Prior R., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B. y Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51. pp. 3273-3279

Prior R., Wu X. y Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolixs in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53. pp. 4290-4302

Raguso R. y Pichersky E. A day in the life of a linalool molecule: Chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: Linalool biosynthesis in flowering plants. *Plant Species Biology*. **1999**, 14. pp. 95-120

Reigada J., Tcacenco C., Andrade L., Kato M., Porto A. y Lago J. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) antifungal activities and kinetic resolution of (*RS*)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). *Tetrahedron: Asymmetry*. **2007**, 18. pp. 1054-1058

Reverchon E. y De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*. **2006**, 38. pp. 146-166

Rodríguez E., Árias E., Vásquez E., Martínez J. y Stashenko E. Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava* obtenidos con CO₂ supercrítico. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*. **2012**, 36. pp. 305-315

Rogério A., Andrade E., Leite D., Figueiredo C. y Calixto J. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology*. **2009**, 158. pp. 1074-1087

Rufino A., Ribeiro M., Judas F., Salgueiro L., Lopes M., Cavaleiro C. y Mendes A. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- α -pinene: structural and enantiomeric selectivity. *Journal of Natural Products*. **2014**, 77. pp. 264-269

Sain S., Naoghare P., Devi S., Daiwile A., Krishnamurthi P. y Chakrabarti T. Beta caryophyllene and caryophyllene oxide, isolated from *Aegle marmelos*, as the potent anti-inflammatory agenst against lymphoma and neuroblastoma cells. *Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. **2014**, 13. pp. 45-55

Samuel R. y Morawetz W. Chromosomal evolution within *Piperaceae*. *Plant Systematics and Evolution*. **1989**, 166. pp. 105-117

- Sefidkom F., Abdasi K., Khaniki G. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Food Chemistry*. **2006**, 99. pp. 19-23
- Sell C. S. A fragrant introduction to terpenoid chemistry. Primera edición. *The Royal Society of Chemistry*. Cambridge, **2003**. pp. 1-18
- Shelly T. Exposure to α -copaene-containing oils enhances mating success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. **2001**, 94. pp. 497-502
- Silva D. y Bastos C. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. *Fitopatologia Brasileira*. **2007**, 32. pp. 143-145
- Silva E., Silva A., Lagos K., Rocha L., Oliveira O., Carvalho M., Maia F., Tadei W. y Pohlit A. Stability and antioxidant activity of semi-synthetic derivatives of 4-nerolidylcatechol. *Molecules*. **2013**, 18. pp. 178-189
- Silva J., Pinto L., Burbano R., Montenegro R., Guimaraes E., Andrade E. y Maia J. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*. **2014**, 58. pp. 55-60
- Silva M., Oliveira G., Carvalho R. y Sousa D. Antischistosomal activity of the terpene Nerolidol. *Molecules*. **2014**, 19. pp. 3793-3803
- Silverstein R. y Webster F. Spectrometric identification of organic compounds. Sexta edición. *John Wiley & Sons*. New York, **1998**. pp. 2-15
- Somnuk A., Palanuvej C. y Ruangrunsi N. The pharmacognostic specification of *Acorus calamus* dried rhizome with special reference to α - and β -asarone contents in its essential oil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. **2014**, 26. pp. 97-100
- Sotto A., Maffei F., Hrelia P., Castelli F., Sarpietro M. y Mazzanti G. Genotoxicity assessment of β -caryophyllene oxide. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **2013**, 66. pp. 264-268
- Souto R., Harada A., Andrade E. y Maia J. Insecticidal activity of Piper essential oils from de Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical Entomology*. **2012**, 41. pp. 510-517
- Souza J., Menezes P., Viana M., Rigoldi L., Guedes J., Pens D., Souza A. y Quintans J. Improvement of *p*-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine*. **2013**, 20. pp. 436-440

Stashenko E. Aceites esenciales. Primera edición. *Universidad Industrial de Santander*. Bucaramanga, **2009**; pp. 13-34, 39-50, 87-122.

Stashenko E. Aceites esenciales: el espíritu de las plantas. *Innovación y ciencia*. **2010**, 17. pp. 28-43

Stashenko E. y Martínez J. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*. **2009**, 1. pp. 29-45

Stashenko E. y Martínez J. Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación. *Scientia Chromatographica*. **2009**, 1. pp. 19-36

Stashenko E. y Martínez J. GC y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica*. **2010**, 2. pp. 23-46

Stashenko E. y Martínez J. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*. **2011**, 3. pp. 25-48

Stashenko E., Martínez J., Cala M., Durán D. y Caballero D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*. **2013**, 36; pp. 192-202

Steffen A. y Pawliszyn J. Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44. pp. 2187-2193

Tangarife V., Correa J., Roa V., Pino N., Betanur L., Durán D., Stashenko E. y Mesa A. Anti-dermatophyte, anti-Fusarium and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of Piper genus. *Journal of Essential Oil Research*. **2014**, 26. pp. 221-227

Terreaux C., Gupta M. y Hostettmann K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry*. **1998**, 49. pp. 461-464

The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals, [Sitio de internet] disponible en: www.pherobase.com/kovats/. Fecha de consulta: 5 de febrero de 2015

Toyota M., Koyama H., Mizutani M. y Asakawa Y. (-)-*ent*-Spathulenol isolated from liverworts is an artefact. *Phytochemistry*. **1996**, 41. pp. 1347-1350

Tsarkova T. Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de las plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas. Tesis de maestría. Escuela de química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, **1997**. pp. 13-36

Tuberoso C., Kowalczyk A., Coroneo V., Russo M., Dessi S. y Cabras P. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and antifungal activities of the essential oil of *Achillea ligustica* All. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53. pp. 10148-10153

Türkez H., Celik K. y Togar B. Effects of copaene, a tricyclic sesquiterpene, on human lymphocytes cells in vitro. *Cytotechnology*. **2014**, 66. pp. 597-603

Türkez H., Togar B., Tatar A., Geyikoglu F. y Hacimuftuoglu A. Cytotoxic and cytogenetic effects of α -copaene on rat neuron and N2a neuroblastoma cell lines. *Biologia*. **2014**, 569. pp. 936-942

Wang G., Tian L., Fan Y. y Qi M. Headspace single drop microextraction gas chromatography mass spectrometry for the analysis of volatile compounds from herbal Asari. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. **2013**. pp. 1-6

Wiley 138 L, Mass Spectral Database; *John Wiley & Sons*, **1990**, EE.UU

Williams D. y Fleming I. Spectroscopic methods in organic chemistry. Cuarta edición. *McGraw-Hill Book Company*. Mainhead, **1987**. pp. 150-159

Williams G., Iatropoulos M. y Whysner J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food and Chemical Toxicology*. **1999**, 37. pp. 1027-1038

Yang D., Michel L., Chaumont J. y Millet J. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia*. **1999**, 148. pp. 79-82

Zhang Z. y Pawliszyn J. Headspace Solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*. **1993**, 65. pp. 1843-185

Ziaei A., Ramezan M., Wright L., Paetz C., Schneider B. y Amirghofran Z. Identification of spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the immunomodulatory effects. *Phytotherapy Research*. **2011**, 25. pp. 557-562.

ANEXOS

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ACEITES ESENCIALES

Anexo A. Composición química del AE de *Piper cumanense* Kunth

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
α -Pino	937	939 ^[10]	1024	1025 ^[129]	0,9	HM
Canfeno	954	954 ^[10]	1068	1068 ^[129]	0,3	HM
β -Pino	982	979 ^[10]	1111	1110 ^[129]	0,5	HM
α -Terpino	1020	1017 ^[10]	ND	ND	0,6	HM
p -Cimeno	1028	1024 ^[10]	1275	1270 ^[129]	1,9	HM
Limoneno	1033	1029 ^[10]	1203	1198 ^[129]	0,6	HM
γ -Terpino	1062	1059 ^[10]	1212	1245 ^[129]	1,8	HM
Terpinoleno	1089	1088 ^[10]	1251	1282 ^[129]	0,7	HM
Linalol	1101	1096 ^[10]	1550	1553 ^[130]	37,2	MO
Alcanfor	1156	1146 ^[10]	1533	1528 ^[131]	1,7	MO
α -Terpineol	1201	1190 ^[129]	1706	1694 ^[129]	0,7	MO
Piperitona	1262	1254 ^[129]	1741	1730 ^[129]	4,6	MO
Ciclosativeno	1384	1371 ^[10]	1496	1483 ^[129]	0,9	HS
α -Copaeno	1388	1387 ^[130]	1505	1491 ^[129]	5,4	HS
α -Santaleno	1429	1422 ^[10]	ND	ND	0,2	HS
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1436	1436 ^[130]	1613	1606 ^[130]	8,8	HS
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1442	1434 ^[10]	1596	1576 ^[129]	0,7	HS
Aromadendreno	1454	1464 ^[132]	1623	1620 ^[129]	0,3	HS
α -Humuleno	1472	1472 ^[130]	1686	1674 ^[130]	1,0	HS
<i>allo</i> -Aromadendreno	1476	1478 ^[133]	1661	1649 ^[129]	0,8	HS
γ -Murolo	1487	1479 ^[10]	1703	1690 ^[129]	0,5	HS
Germacreno D	1495	1500 ^[132]	1727	1713 ^[133]	1,0	HS
Pentadecano	1501	1500 ^[10]	1500	1500	1,1	H
<i>epi</i> -Zoraneno	1507	1501 ^[10]	ND	ND	0,6	HS
α -Murolo	1510	1504 ^[133]	1734	1723 ^[129]	1,0	HS
γ -Cadineno	1527	1517 ^[134]	1771	1763 ^[129]	1,7	HS
δ -Cadineno	1530	1523 ^[10]	1767	1756 ^[129]	2,6	HS
<i>cis</i> -Calameneno	1535	1529 ^[10]	1847	1835 ^[129]	0,3	HS
<i>trans</i> -Nerolidol	1566	1563 ^[A]	2045	2036 ^[129]	5,8	SO
Óxido de cariofileno	1601	1600 ^[130]	1999	2005 ^[130]	3,6	SO
Dilapiol	1628	1620 ^[10]	2372	2346 ^[129]	3,9	SO

Continuación **Anexo**

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
<i>epi</i> -1-Cubenol	1644	1647 ^[135]	2080	2088 ^[129]	0,7	SO

HM Monoterpeno, MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno, SO Sesquiterpeno oxigenado, H Hidrocarburo
 ND. Compuesto no detectado

Anexo B. Composición química del AE de *Piper eripodon* (Miq.) C. DC.

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
Heptanal	901	901 ^[10]	1187	1185 ^[129]	0,3	O
α -Pino	936	939 ^[10]	1024	1025 ^[129]	18,6	HM
Canfeno	954	954 ^[10]	1068	1068 ^[129]	0,3	HM
β -Pino	982	979 ^[10]	1112	1110 ^[129]	16,1	HM
Mirceno	990	990 ^[10]	1165	1161 ^[129]	0,2	HM
δ -3-Careno	1012	1011 ^[10]	1152	1147 ^[129]	1,0	HM
<i>p</i> -Cimeno	1028	1024 ^[10]	1275	1270 ^[129]	1,1	HM
Limoneno	1033	1029 ^[10]	1203	1198 ^[129]	1,0	HM
Linalol	1100	1096 ^[10]	1550	1553 ^[130]	0,8	MO
Óxido de α -pino	1106	1097 ^[10]	ND	ND	0,4	MO
<i>trans</i> -Pinocarveol	1149	1139 ^[10]	1667	1660 ^[129]	0,7	MO
Pinocarvona	1170	1164 ^[10]	ND	ND	0,5	MO
Mirtenal	1204	1195 ^[10]	1643	1632 ^[129]	0,8	MO
Acetato de bornilo	1291	1288 ^[10]	ND	ND	0,8	MO
Acetato de mirtenilo	1329	1326 ^[10]	1700	1692 ^[129]	1,1	MO
α -Copaeno	1387	1387 ^[130]	1505	1491 ^[129]	5,5	HS
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1435	1436 ^[130]	1613	1606 ^[130]	11,6	HS
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1442	1434 ^[10]	1593	1576 ^[129]	0,5	HS
Aromadendreno	1454	1464 ^[132]	1623	1620 ^[129]	0,9	HS
α -Humuleno	1472	1472 ^[130]	1686	1674 ^[130]	1,1	HS
<i>allo</i> -Aromadendreno	1476	1478 ^[133]	1661	1649 ^[129]	1,4	HS
γ -Muroleno	1487	1479 ^[10]	ND	ND	0,2	HS
β -Selineno	1505	1509 ^[130]	1734	1744 ^[130]	1,5	HS

Continuación. **Anexo B**

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
α-Muroleno	1509	1504 ^[133]	1734	1714 ^[129]	1,3	HS
α-Selineno	1510	1517 ^[132]	ND	ND	0,2	HS
δ-Cadineno	1529	1523 ^[10]	1766	1756 ^[129]	0,7	HS
α-Calacoreno	1556	1548 ^[136]	1928	1921 ^[129]	0,2	HS
<i>trans</i> -Nerolidol	1566	1563 ^[10]	2044	2036 ^[129]	0,2	SO
Espatuleno	1593	1588 ^[137]	2137	2127 ^[129]	1,7	SO
Óxido de cariofileno	1600	1600 ^[130]	1999	2005 ^[130]	10,8	SO
Viridiflorol	1603	1612 ^[135]	2090	2090 ^[129]	1,7	SO
C ₁₄ H ₂₂ O ₂ NO ID	1629				1,1	SO
C ₁₄ H ₂₀ O ₂ NO ID	1667				1,1	SO
C ₁₅ H ₂₄ O NO ID	1836				1,1	SO
Prelunularina	1962	NR	3540	NR	11,4	O

HM Monoterpeno, MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno, SO

Sesquiterpeno oxigenado, O Otras familias

ND. Compuesto no detectado

NO ID Compuesto no identificado

NR. Índice de retención lineal no reportado en la literatura

Anexo C. Composición química del AE de *Piper peltatum*

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
α-Pineno	936	939 ^[10]	ND	ND	0,1	HM
<i>p</i> -Cimeno	1028	1024 ^[10]	1275	1270 ^[129]	0,7	HM
α-Cubebeno	1356	1348 ^[10]	1468	1460 ^[129]	0,4	HS
Ciclosativeno	1383	1371 ^[10]	1496	1483 ^[129]	0,9	HS
α-Copaeno	1388	1387 ^[130]	1505	1491 ^[129]	8,8	HS
β-Elemeno	1398	1390 ^[129]	1601	1591 ^[129]	5,7	HS
<i>trans</i> -β-Cariofileno	1437	1436 ^[130]	1613	1606 ^[130]	28,6	HS
β-Copaeno	1444	1446 ^[130]	ND	ND	0,4	HS
Geranil acetona	1451	1455 ^[10]	1862	1854 ^[129]	1,2	HS
α-Humuleno	1471	1472 ^[130]	1686	1674 ^[130]	3,0	HS
γ-Muroleno	1486	1479 ^[10]	1702	1690 ^[129]	0,8	HS

Continuación. **Anexo C**

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
Germacreno D	1496	1500 ^[132]	1723	1713 ^[133]	13,4	HS
β-Selineno	1504	1509 ^[130]	1737	1744 ^[130]	0,5	HS
Cubebol	1508	1515 ^[10]	1953	1942 ^[129]	2,0	SO
α-Selineno	1510	1517 ^[132]	1737	1725 ^[129]	0,7	HS
δ-Cadineno	1528	1523 ^[10]	1767	1756 ^[129]	1,3	HS
cis-Calameneno	1534	1529 ^[10]	1846	1835 ^[129]	1,6	HS
trans-Nerolidol	1565	1563 ^[10]	2045	2036 ^[129]	0,7	SO
Espatulanol	1593	1588 ^[137]	2136	2127 ^[129]	3,2	SO
Óxido de cariofileno	1601	1600 ^[130]	1999	2005 ^[130]	11,0	SO
C ₁₄ H ₂₂ O ^{NO ID}	1625				0,8	SO
C ₁₅ H ₂₆ O ^{NO ID}	1628				2,9	SO
epi-1-Cubenol	1643	1647 ^[135]	2079	2088 ^[129]	0,8	SO
Neointermedol	1676	1666 ^[10]	ND	ND	1,3	SO
Cadaleno	1687	1688 ^[138]	2236	2233 ^[129]	0,4	HS
Hexahidrofarnesilacetona	1843	1844 ^[10]	2130	2124 ^[129]	1,0	O
Fitol	2111	2116 ^[10]	ND	ND	0,8	O

HM Monoterpeno, MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno,

SO Sesquiterpeno oxigenado, O Otras familias

ND. Compuesto no detectado

NO ID Compuesto no identificado

Anexo D. Composición química del AE de *Piper marginatum*

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
α-Pineno	937	939 ^[10]	1024	1025 ^[129]	2,2	HM
Sabineno	976	975 ^[10]	1124	1122 ^[129]	0,2	HM
β-Pineno	982	979 ^[10]	1111	1110 ^[129]	2,2	HM
Mirceno	990	990 ^[10]	1165	1161 ^[129]	0,3	HM
α-Terpineno	1020	1017 ^[10]	1183	1177 ^[129]	2,1	HM
p-Cimeno	1028	1024 ^[10]	1275	1270 ^[129]	1,2	HM
Limoneno	1033	1029 ^[10]	1203	1198 ^[129]	0,2	HM
γ-Terpineno	1061	1059 ^[10]	1251	1245 ^[129]	4,7	HM

Continuación. **Anexo D**

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
Terpinoleno	1089	1088 ^[10]	1289	1282 ^[129]	2,6	HM
Linalol	1100	1096 ^[10]	1550	1553 ^[130]	1,2	MO
α -Copaeno	1387	1387 ^[130]	1505	1491 ^[129]	7,4	HS
β -Bourboneno	1396	1396 ^[130]	1533	1523 ^[129]	0,5	HS
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1436	1436 ^[130]	1613	1606 ^[130]	15,7	HS
Aromadendreno	1454	1464 ^[132]	1623	1620 ^[129]	0,1	HS
Croweacina	1464	1459 ^[129]	ND	ND	0,8	O
α -Humuleno	1471	1472 ^[130]	1686	1674 ^[130]	1,4	HS
γ -Muroleno	1486	1479 ^[10]	ND	ND	0,1	HS
Germacreno D	1495	1500 ^[132]	1723	1713 ^[133]	1,3	HS
Pentadecano	1501	1500 ^[10]	1500	1500	0,5	H
β -Selineno	1504	1509 ^[130]	1734	1744 ^[130]	0,4	HS
Biciclogermacreno	1510	1510 ^[130]	1746	1750 ^[130]	22,6	HS
δ -Cadineno	1529	1523 ^[10]	1766	1756 ^[129]	0,7	HS
Espatulanol	1593	1588 ^[137]	2137	2127 ^[129]	5,1	SO
Óxido de cariofileno	1600	1600 ^[130]	1999	2005 ^[130]	2,7	SO
<i>cis</i> -Asarona	1612	1617 ^[10]	2342	2318 ^[139]	1,2	O
Metoxi-4,5-metilendioxil-propiofenona*	1617	1627 ^[59]	2365	NR	4,1	O
C ₁₅ H ₂₄ O ^{NO ID}	1649				0,8	SO
Exalatacina	1658	1656 ^[10]	2428	NR	1,0	O
<i>trans</i> -Asarona	1675	1676 ^[10]	2457	2445 ^[139]	0,9	O
2-Metoxi-4,5-metilendioxil-propiofenona	1708	1713 ^[59]	2365	NR	11,7	O

HM Monoterpeno, MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno,

SO Sesquiterpeno Oxigenado, H Hidrocarburo, O Otras familias

ND Compuesto no detectado

NO ID Compuesto no identificado

NR Índice de retención lineal no reportado en la literatura

*Isómero no especificado

Anexo E. Tabla de composición del AE de *Piper dilatatifolium*

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
Linalol	1101	1096 ^[10]	1550	1553 ^[130]	1,1	MO
Mirtenal	1204	1195 ^[10]	1643	1631 ^[129]	0,5	MO
α -Cubebeno	1357	1348 ^[10]	1468	1460 ^[129]	0,6	HS
Ciclosativeno	1384	1371 ^[10]	1497	1483 ^[129]	1,9	HS
α -Copaeno	1388	1387 ^[130]	1505	1491 ^[129]	2,2	HS
β -Elemeno	1399	1390 ^[10]	1601	1591 ^[129]	1,3	HS
<i>cis</i> - α -Bergamoteno	1422	1415 ^[129]	1579	1560 ^[129]	0,9	HS
<i>trans</i> -Murola-3,5-dieno	1451	1453 ^[10]	1627	NR	0,7	HS
α -Amorfenol	1474	1482 ^[10]	1668	1693 ^[129]	0,8	HS
γ -Muroleno	1488	1479 ^[10]	1710	1690 ^[129]	1,9	HS
Pentadecano	1501	1500 ^[10]	1500	1500	0,5	HS
β -Selineno	1504	1509 ^[130]	1734	1744 ^[130]	0,5	HS
Cubebol	1509	1515 ^[10]	1939	1942 ^[129]	1,7	SO
10- <i>epi</i> -Cubebol	1530	1535 ^[10]	1953	NR	3,2	SO
Elemol	1561	1548 ^[10]	2089	2079 ^[129]	2,8	SO
C ₁₅ H ₂₄ O ^{NO ID}	1569				1,7	SO
C ₁₄ H ₂₀ O ₂ ^{NO ID}	1580				0,9	SO
1,5-Epoxisalvial-4(14)-eno	1586	NR	1939	NR	0,5	SO
Palustrol	1589	1581 ^[143]	1944	1930 ^[129]	0,7	SO
Espatuleno	1595	1588 ^[137]	2137	2127 ^[129]	24,4	SO
Óxido de cariofileno	1602	1600 ^[130]	2000	2005 ^[130]	13,4	SO
Mezcla compuestos ^{NO ID}	1624				1,7	
Epóxido de humuleno II	1630	1629 ^[130]	2057	2047 ^[129]	2,9	SO
C ₁₅ H ₂₄ O ^{NO ID}	1639				1,0	SO
C ₁₅ H ₂₄ O ^{NO ID}	1644		2269		7,4	SO
Mustakona	1674	1677 ^[10]	2293	NR	1,0	SO
C ₁₅ H ₂₄ O ^{NO ID}	1681				1,0	SO
C ₁₅ H ₂₂ O ^{NO ID}	1693		2279		2,8	SO
C ₁₄ H ₂₂ O ^{NO ID}	1698		2288		13,7	O

Continuación. **Anexo E**

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
Heptadecano	1701	1700	1700	1700	1,7	H

MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno, SO Sesquiterpeno oxigenado

H Hidrocarburo, O Otras familias

ND Compuesto no detectado

NO ID Compuesto no identificado

NR Índice de retención lineal no reportado en la literatura

Anexo F. Composición química del AE de *Piper subflavum* var. espejuelanum

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
Heptanal	901	902 ^[10]	1187	1185 ^[129]	0,5	OT
α -Pinoeno	937	939 ^[10]	1024	1025 ^[129]	18,9	HM
β -Pinoeno	982	979 ^[10]	1111	1110 ^[129]	13,2	HM
δ -3-Careno	1011	1011 ^[10]	ND	ND	0,8	HM
<i>p</i> -Cimeno	1027	1024 ^[10]	1275	1270 ^[129]	0,7	HM
Limoneno	1032	1029 ^[10]	1200	1198 ^[129]	0,5	HM
Linalol	1100	1096 ^[10]	1550	1553 ^[130]	0,8	MO
<i>cis</i> -Pinocanfona	1183	1172 ^[10]	ND	ND	0,6	MO
Mirtenol	1202	1195 ^[10]	ND	ND	0,5	MO
Acetato de bornilo	1289	1288 ^[10]	ND	ND	0,5	MO
Acetato de mirtenilo	1327	1326 ^[10]	1701	1692 ^[129]	0,8	MO
α -Ylangeno	1381	1375 ^[10]	1500	1484 ^[129]	0,6	HS
α -Copaeno	1386	1387 ^[130]	1505	1491 ^[129]	9,2	HS
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1435	1436 ^[130]	1612	1606 ^[130]	15,9	HS
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1440	1434 ^[10]	1595	1576 ^[129]	1,1	HS
β -Copaeno	1442	1446 ^[130]	ND	ND	0,6	HS
Aromadendreno	1452	1464 ^[132]	ND	ND	0,9	HS
α -Humuleno	1470	1472 ^[130]	1686	1674 ^[130]	1,5	HS
<i>allo</i> -Aromadendreno	1474	1478 ^[133]	1661	1649 ^[129]	1,6	HS
β -Selineno	1502	1509 ^[130]	1734	1744 ^[130]	1,9	HS
α -Muroleno	1507	1504 ^[133]	1739	1714 ^[129]	1,9	HS

Continuación. **Anexo F**

Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
	DB-5MS		DB-WAX			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
γ-Cadineno	1524	1517 ^[134]	1779	1763 ^[129]	0,6	HS
δ-Cadineno	1527	1523 ^[10]	1774	1756 ^[129]	1,2	HS
α-Calacoreno	1553	1548 ^[136]	1935	1921 ^[129]	0,5	HS
Espatuleno	1592	1588 ^[137]	2137	2127 ^[129]	2,6	SO
Oxido de cariofileno	1599	1600 ^[130]	1999	2005 ^[130]	10,5	SO
C ₁₅ H ₂₄ O ^{NO ID}	1627				0,9	SO
15-Copaenol	1663				1,1	SO
Cadaleno	1686	1688 ^[138]	2247	2233 ^[129]	1,1	HS
C ₁₆ H ₁₈ O ₂	1908				1,5	O
Prelunularina	1960	NR	3540	NR	5,7	O

HM Monoterpeno, MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno,

SO Sesquiterpeno oxigenado, O Otras familias

ND Compuesto no detectado

NO ID Compuesto no identificado

NR Índice de retención lineal no reportado en la literatura

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LAS FRACCIONES VOLÁTILES DE EXTRACTOS OBTENIDOS POR SFE

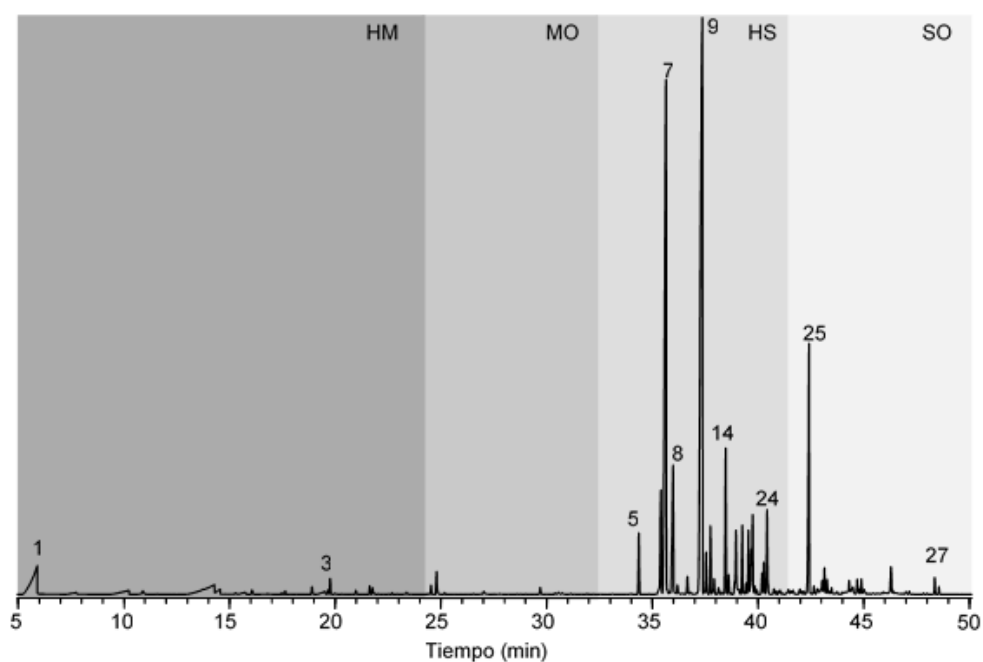
Anexo G. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de *P. cumanense*

N° pico	Compuesto	Índice de retención lineal				Cantida d relativa, %	Tipo
		DB-5MS		DB-WAX			
		Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
1	α -Pinoeno	936	939 ^[10]	1025	1025 ^[129]	0,5	MO
2	Benzaldehído	964	960 ^[10]	1530	1518 ^[129]	0,3	O
3	β -Pinoeno	981	979 ^[10]	ND	ND	0,1	MO
4	6-Metil-5-hepten(2)ona	983	985 ^[10]	1339	1336 ^[129]	0,2	O
5	<i>p</i> -Cimeno	1027	1024 ^[10]	1274	1270 ^[129]	0,3	MO
6	Piperitona	1261	1252 ^[10]	ND	ND	0,4	MO
7	Piperonal	1346	1332 ^[10]	2253	2244 ^[139]	0,4	O
8	α -Cubebeno	1356	1348 ^[10]	1470	1460 ^[129]	0,3	HS
9	α -Ylangeno	1384	1375 ^[10]	1500	1484 ^[129]	5,4	HS
10	α -Copaeno	1392	1387 ^[130]	1512	1491 ^[129]	21,6	HS
11	α -Gurjuneno	1421	1413 ^[136]	ND	ND	0,1	HS
12	α -Santaleno	1432	1422 ^[10]	1584	1583 ^[129]	0,8	HS
13	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1439	1436 ^[130]	1618	1606 ^[130]	13,8	HS
14	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1443	1434 ^[10]	1596	1576 ^[129]	2,6	HS
15	Aromadendreno	1455	1464 ^[132]	1627	1620 ^[129]	1,9	HS
16	α -Humuleno	1472	1472 ^[130]	1688	1674 ^[130]	1,6	HS
17	<i>allo</i> -Aromadendreno	1477	1478 ^[133]	1666	1649 ^[129]	3,3	HS
18	Ciclopentadecano	1484	1488 ^[140]	1526	1522 ^[141]	1,3	H
19	γ -Muroloeno	1487	1479 ^[10]	1705	1690 ^[129]	2,8	HS
20	Germacreno D	1495	1500 ^[132]	ND	ND	0,6	HS
21	Pentadecano	1505	1500 ^[10]	1507	1500	7,4	H
22	Epizoraneno	1508	1501 ^[10]	1726	NR	1,5	HS
23	α -Muroloeno	1510	1504 ^[133]	1739	1714 ^[129]	3,2	HS
24	β -Bisaboleno	1516	1508 ^[129]	ND	ND	0,3	HS
25	γ -Cadineno	1529	1517 ^[134]	1779	1763 ^[129]	8,6	HS
26	δ -Cadineno	1532	1523 ^[10]	1774	1756 ^[129]	6,1	HS
27	<i>cis</i> -Calameneno	1536	1529 ^[10]	1850	1835 ^[129]	3,0	HS
28	α -Cadineno	1550	1551 ^[10]	ND	ND	0,7	HS
29	β -Calacoreno	1556	1565 ^[10]	1935	1940	0,4	HS

30	Óxido de cariofileno	1602	1600 ^[130]	2013	2005 ^[130]	4,9	SO
31	Dilapiol	1627	1620 ^[10]	2372	2346 ^[129]	2,8	SO
32	Cadaleno	1687	1688 ^[138]	2247	2233 ^[129]	0,1	HS
33	Heptadecano	1699	1700 ^[10]	1701	1700	0,7	H

MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno,
 SO Sesquiterpeno oxigenado, H Hidrocarburo
 ND Compuesto no detectado

Perfil cromatográfico de la fracción volátil de *P. cumanense*. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Monoterpenos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos (HS), sesquiterpenos oxigenados (SO).



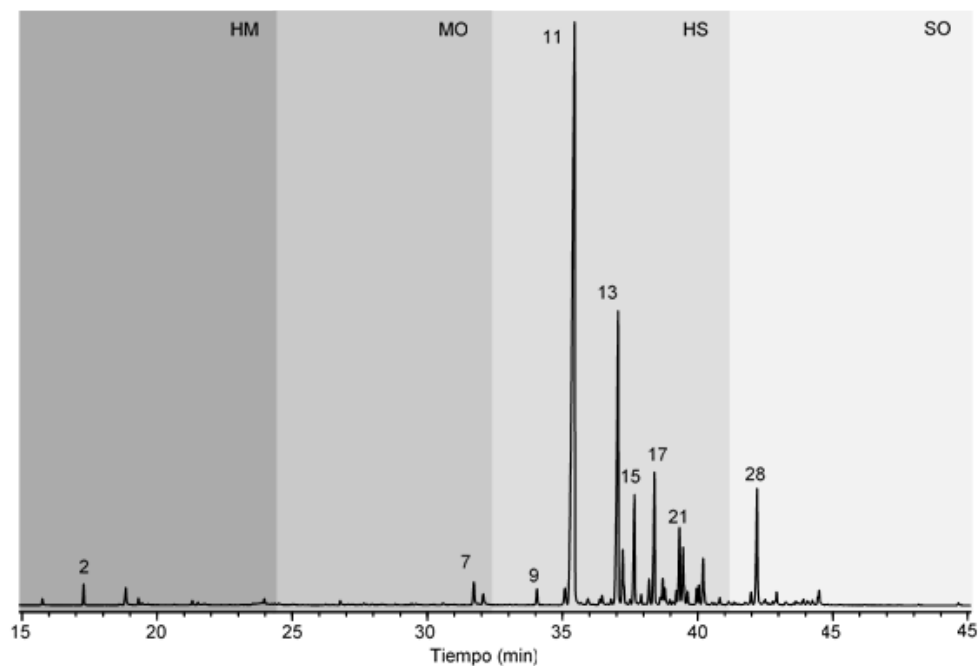
Anexo H. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de *P. eriopodon*

N° pico	Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
		DB-5MS		DB-WAX			
		Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
1	Heptanal	901	901 ^[10]	1184	1185 ^[129]	0,2	O
2	α -Pinenol	936	939 ^[10]	1022	1025 ^[129]	0,6	HM
3	Heptanol	971	966 ^[10]	1453	1448 ^[129]	0,7	O
4	β -Pinenol	981	979 ^[10]	1107	1110 ^[129]	0,2	HM
5	<i>p</i> -Cimeno	1027	1024 ^[10]	1273	1270 ^[129]	0,2	HM
6	<i>trans</i> -2-Nonen-1-al	1162	1161 ^[10]	1539	1536 ^[129]	0,1	O
7	Timol	1294	1290 ^[10]	2179	2164 ^[129]	1,0	MO
8	Carvacrol	1304	1299 ^[10]	2211	2210 ^[129]	0,5	MO
9	α -Cubebeno	1355	1348 ^[10]	1470	1460 ^[129]	0,6	HS
10	Isoledeno	1382	1376 ^[10]	1625	1604 ^[133]	0,9	HS
11	α -Copaeno	1392	1387 ^[130]	1515	1491 ^[129]	46,3	HS
12	α -Gurjuneno	1420	1413 ^[136]	ND	ND	0,2	HS
13	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1438	1436 ^[130]	1622	1606 ^[130]	14,4	HS
14	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1443	1434 ^[10]	1599	1576 ^[129]	2,4	HS
15	Aromadendreno	1455	1464 ^[132]	1632	1620 ^[129]	4,5	HS
16	α -Humuleno	1471	1472 ^[130]	1691	1674 ^[130]	1,0	HS
17	<i>allo</i> -Aromadendreno	1477	1478 ^[133]	1670	1649 ^[129]	5,1	HS
18	γ -Muroleno	1486	1479 ^[10]	1705	1690 ^[129]	0,9	HS
19	<i>ar</i> -Curcumeno	1488	1480 ^[10]	1782	1773 ^[129]	0,7	HS
20	Pentadecano	1501	1500 ^[10]	1503	1500	0,4	HS
21	β -Selineno	1505	1509 ^[130]	1743	1744 ^[130]	3,0	HS
22	α -Muroleno	1509	1504 ^[133]	1740	1714 ^[129]	2,4	HS
23	β -Bisaboleno	1515	1508 ^[129]	1737	1727 ^[129]	0,4	HS
24	γ -Cadineno	1526	1517 ^[134]	1778	1763 ^[129]	0,5	HS
25	δ -Cadineno	1529	1523 ^[10]	1772	1756 ^[129]	0,6	HS
26	<i>cis</i> -Calameneno	1534	1529 ^[10]	1850	1835 ^[129]	2,0	HS
27	α -Calacoreno	1556	1548 ^[136]	ND	ND	0,2	HS

28	Óxido de cariofileno	1602	1600 ^[130]	2013	2005 ^[130]	4,7	SO
29	Cadalenol	1688	1688 ^[138]	2244	2233 ^[129]	0,5	HS

HM Monoterpeno, MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno,
 SO Sesquiterpeno oxigenado, O Otras familias
 ND Compuesto no detectado

Perfil cromatográfico de la fracción volátil de *P. eriopodon*. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Monoterpenos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos (HS), sesquiterpenos oxigenados (SO).

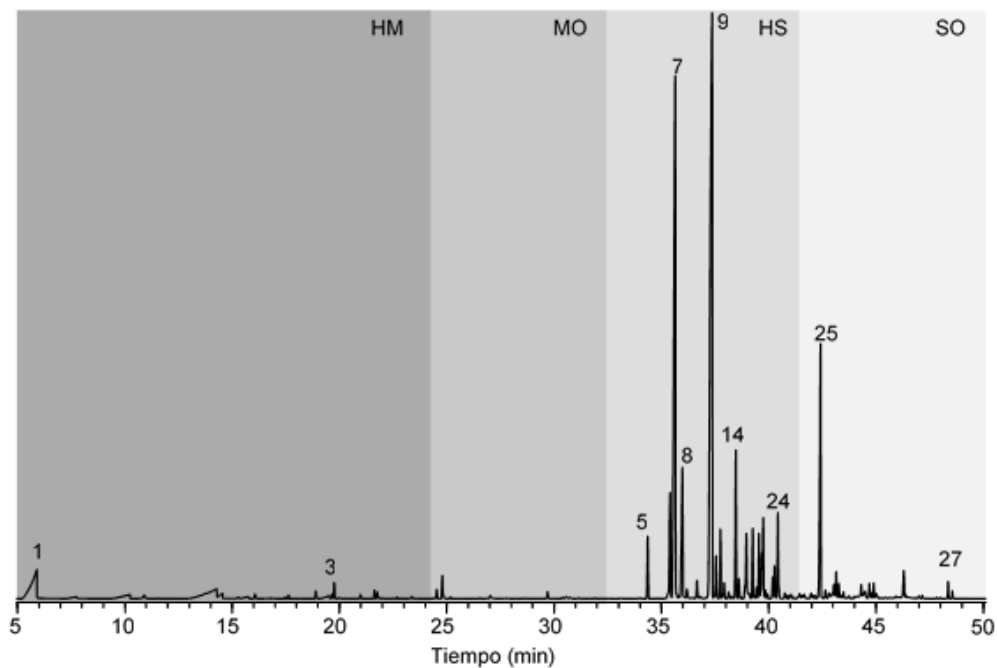


Anexo I. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de *P. peltatum*

N° pico	Compuesto	Índice de retención lineal				Cantid ad relativa, %	Tipo
		DB-5MS		DB-WAX			
		Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
1	Ácido acético	601	NR	1440	1434 ^[129]	4,1	O
2	Benzaldehido	964	960 ^[10]	1528	1518 ^[129]	0,2	O
3	6-Metil-2-hepten-2-ona	983	985 ^[10]	1339	1336 ^[129]	0,4	O
4	<i>p</i> -Cimeno	1027	1024 ^[10]	1272	1270 ^[129]	0,2	HM
5	α -Cubebeno	1356	1348 ^[10]	1469	1460 ^[129]	1,5	HS
7	α -Copaeno	1390	1387 ^[130]	1511	1491 ^[129]	22,3	HS
8	β -Elemeno	1398	1390 ^[129]	1603	1591 ^[129]	4,5	HS
9	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1439	1436 ^[130]	1620	1606 ^[130]	33,5	HS
10	β -Copaeno	1444	1446 ^[130]	ND	ND	1,0	HS
12	Geranil acetona	1451	1455 ^[10]	1859	1854 ^[129]	1,6	SO
13	<i>trans</i> - β -Farneseno	1456	1456 ^[10]	ND	ND	0,4	HS
14	α -Humuleno	1471	1472 ^[130]	1688	1674 ^[130]	3,4	HS
15	<i>allo</i> -Aromadendreno	1476	1478 ^[133]	ND	ND	0,5	HS
16	γ -Muroleno	1486	1479 ^[10]	1702	1690 ^[129]	1,6	HS
17	Germacreno D	1494	1500 ^[132]	1727	1713 ^[133]	1,6	HS
18	Pentadecano	1500	1500 ^[10]	1500	1500	0,2	O
19	β -Selineno	1504	1509 ^[130]	1740	1744 ^[130]	1,4	HS
20	α -Muroleno	1508	1504 ^[133]	ND	ND	1,1	HS
21	α -Selineno	1510	1517 ^[132]	1743	1725 ^[129]	1,7	HS
22	γ -Cadineno	1525	1517 ^[133]	1776	1763 ^[129]	0,5	HS
23	δ -Cadineno	1528	1523 ^[10]	1770	1756 ^[129]	0,7	HS
24	<i>cis</i> -Calameneno	1533	1529 ^[10]	1849	1835 ^[129]	2,1	HS
25	Óxido de cariofileno	1601	1600 ^[130]	2013	2005 ^[130]	7,1	SO
26	Cadalenol	1687	1688 ^[138]	2245	2233 ^[129]	0,2	HS
27	Fitona	1842	1845 ^[142]	2132	2124 ^[129]	0,3	O

HM Monoterpeno, MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno,
 SO Sesquiterpeno oxigenado, O Otras familias
 ND Compuesto no detectado

Perfil cromatográfico de la fracción volátil de *P. peltatum*. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Monoterpenos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos (HS), sesquiterpenos oxigenados (SO).



Anexo J. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de *P. marginatum*

N° pico	Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
		DB-5MS		DB-WAX			
		Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
1	Benzaldehido	964	960 ^[10]	1529	1518 ^[129]	0,1	O
2	<i>p</i> -Cimeno	1027	1024 ^[10]	1274	1270 ^[129]	0,1	HM
3	Tridecano	1300	1300 ^[10]	ND	ND	0,1	O
4	δ -Elemeno	1341	1338 ^[10]	1480	1469 ^[129]	0,6	HS
5	α -Cubebeno	1356	1348 ^[10]	ND	ND	0,1	HS
6	Ciclosativeno	1383	1371 ^[10]	1495	1483 ^[129]	1,0	HS
7	α -Copaeno	1391	1387 ^[130]	1511	1491 ^[129]	24,5	HS
8	β -Bourboneno	1398	1396 ^[130]	1534	1523 ^[129]	2,0	HS
9	α -Gurjuneno	1421	1413 ^[136]	1545	1529 ^[129]	0,2	HS
10	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1439	1436 ^[130]	1618	1606 ^[130]	22,3	HS
11	β -Copaeno	1444	1446 ^[130]	ND	ND	0,3	HS
12	Aromadendreno	1454	1464 ^[132]	1626	1620 ^[129]	0,8	HS
13	α -Humuleno	1471	1472 ^[130]	1688	1674 ^[130]	2,2	HS
14	<i>allo</i> -Aromadendreno	1476	1478 ^[133]	1665	1649 ^[129]	0,4	HS
15	γ -Muroleno	1486	1479 ^[10]	1703	1690 ^[129]	1,2	HS
16	α -Amorfenoleno	1490	1482 ^[10]	1690	1693 ^[129]	0,7	HS
17	Germacreno D	1495	1500 ^[132]	1727	1713 ^[133]	0,6	HS
18	δ -Selineno	1498	1492 ^[10]	ND	ND	0,5	HS
19	Pentadecano	1504	1500 ^[10]	1507	1500	14,9	HS
20	Biciclogermacreno	1512	1510 ^[130]	1753	1750 ^[130]	9,0	HS
21	γ -Cadineno	1526	1517 ^[134]	1777	1763 ^[129]	0,7	HS
22	δ -Cadineno	1529	1523 ^[10]	1771	1756 ^[129]	2,0	HS
23	<i>cis</i> -Calameneno	1534	1529 ^[10]	ND	ND	0,2	HS
24	α -Calacoreno	1555	1548 ^[136]	1934	1921 ^[129]	0,2	HS
25	Selina-3,7(11)dieno	1558	1546 ^[10]	1800	1783 ^[129]	1,2	HS
26	Óxido de cariofileno	1600	1600 ^[130]	2012	2005 ^[130]	1,8	SO
27	<i>cis</i> -Asarona	1611	1617 ^[10]	2342	2318 ^[139]	1,0	SO
28	Metoxi-4,5-metilendioxil-propiofenona*	1617	1627 ^[59]	ND	ND	2,4	O
29	Exalatacina	1655	1656 ^[10]	2425	NR	0,2	SO
30	<i>trans</i> -Asarona	1673	1676 ^[10]	2455	2445 ^[139]	0,3	SO
31	Heptadecano	1700	1700 ^[10]	1700	1700	1,0	O

32	2-Metoxi-4,5-metilendioxil-propiofenona	1707	1713 ^[59]	2517	NR	3,2	O
----	---	------	----------------------	------	----	-----	---

HM Monoterpeno, MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno,

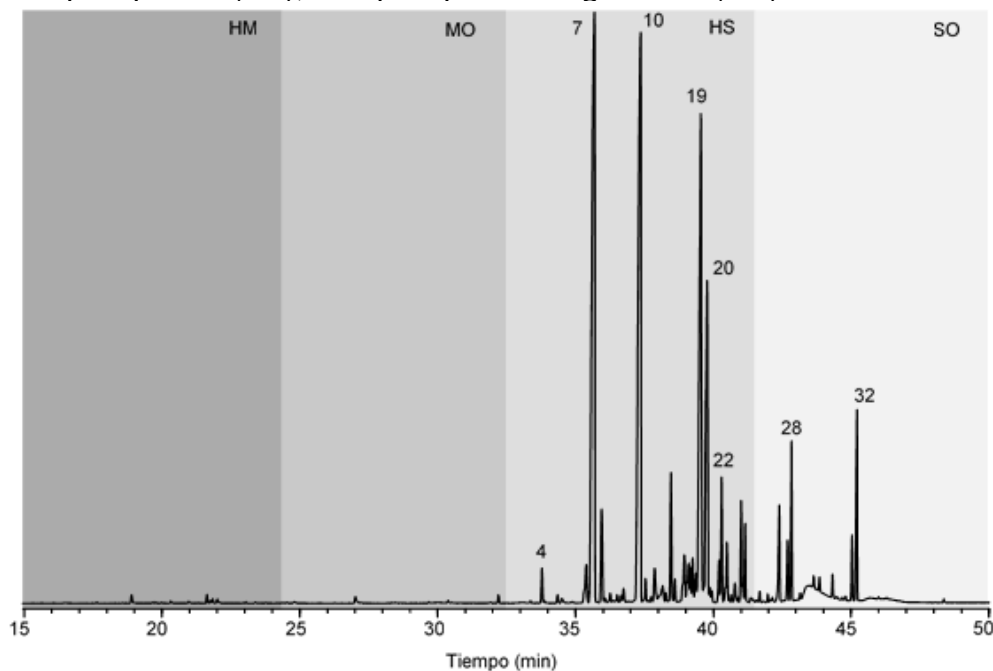
SO Sesquiterpeno oxigenado, O Otras familias

ND Compuesto no detectado

NR Índice de retención lineal no reportado

*Isómero no especificado

Perfil cromatográfico de la fracción volátil de *P. marginatum*. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Monoterpenos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos (HS), sesquiterpenos oxigenados (SO).



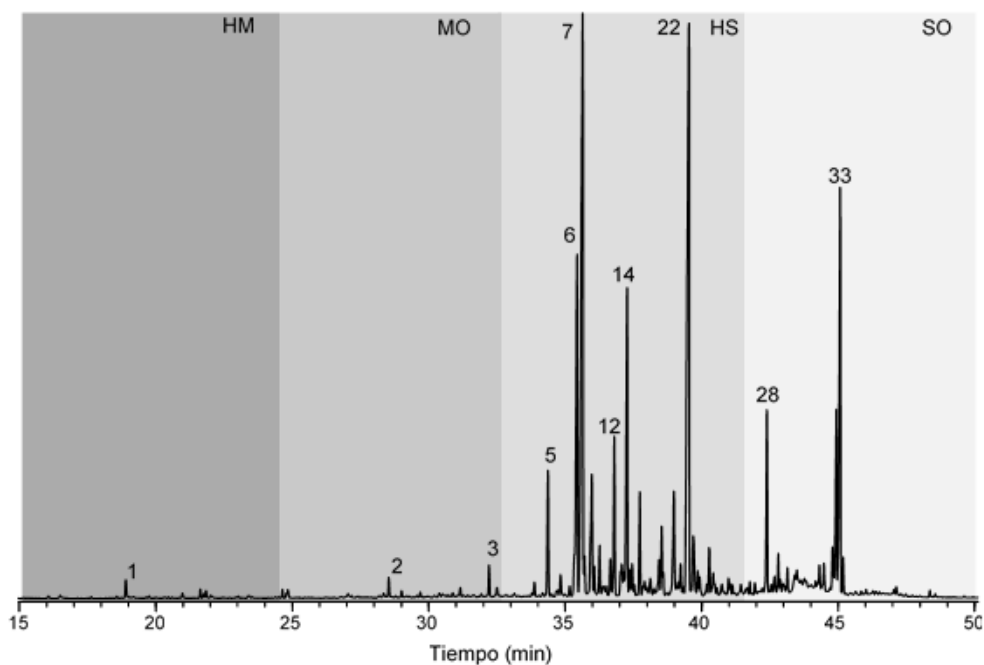
Anexo K. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de *P. dilatatifolium*

N° pico	Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
		DB-5MS		DB-WAX			
		Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
1	Benzaldehído	964	960 ^[10]	1529	1518 ^[129]	0,3	O
2	Dodecano	1199	1200 ^[10]	1201	1200	0,3	O
3	Tridecano	1300	1300 ^[10]	1302	1300	0,5	O
4	δ-Elemeno	1343	1338 ^[10]	1481	1469 ^[129]	0,3	HS
5	α-Cubebeno	1356	1348 ^[10]	1470	1460 ^[129]	2,8	HS
6	Ciclosativeno	1384	1371 ^[10]	1502	1483 ^[129]	8,8	HS
7	α-Copaeno	1390	1387 ^[130]	1512	1491 ^[129]	18,9	HS
8	β-Bourboneno		1396 ^[130]	1535	1523 ^[129]		HS
9	β-Elemeno	1398	1390 ^[129]	1601	1591 ^[129]	3,2	HS
10	Tetradecano	1401	1400 ^[10]	1404	1400	0,5	O
11	C ₁₅ H ₂₄ ^{NO ID}	1407				0,9	HS
12	<i>cis</i> -α-Bergamoteno	1422	1415 ^[129]	1578	1560 ^[129]	3,1	HS
13	α-Santaleno	1429	1422 ^[10]	1584	1583 ^[129]	0,4	HS
14	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1436	1436 ^[130]	1617	1606 ^[130]	6,7	HS
15	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	1442	1434 ^[10]	1595	1576 ^[129]	0,6	HS
16	<i>trans</i> -Murolo-3,5-dieno	1450	1453 ^[10]	ND	ND	1,8	HS
17	α-Humuleno	1471	1472 ^[130]	1688	1674 ^[130]	0,8	HS
18	α-Amorfeno	1474	1482 ^[10]	ND	ND	1,2	HS
19	<i>allo</i> -Aromadendreno	1476	1478 ^[133]	1666	1649 ^[129]	0,4	HS
20	γ-Muroleno	1487	1479 ^[10]	1703	1690 ^[129]	2,6	HS
21	Germacreno D	1494	1500 ^[132]	1727	1713 ^[133]	0,6	HS
22	Pentadecano	1504	1500 ^[10]	1508	1500	19,3	O
23	Biciclogermacreno	1509	1510 ^[130]	1753	1750 ^[130]	1,6	HS
24	β-Bisaboleno	1514	1508 ^[129]	ND	ND	0,3	HS
25	δ-Cadineno	1529	1523 ^[10]	1771	1756 ^[129]	0,8	HS
26	<i>cis</i> -Calameneno	1534	1529 ^[10]	1849	1835 ^[129]	0,2	HS
27	Selina-3,7(11)dieno	1552	1546 ^[10]	1800	1783 ^[129]	0,2	HS
28	Óxido de cariofileno	1600	1600 ^[130]	2012	2005 ^[130]	3,5	SO
29	<i>cis</i> -Asarona	1611	1617 ^[10]	ND	ND	0,4	SO
30	Mustakona	1673	1677 ^[10]	2293	NR	0,5	SO
31	C ₁₅ H ₂₂ O ^{NO ID}	1691				1,0	SO
32	C ₁₄ H ₂₂ O ^{NO ID}	1696				3,4	O

33 Heptadecano 1701 1700 1703 1700 9,1 O

HM Monoterpeno, MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno,
SO Sesquiterpeno oxigenado, O Otras familias
ND Compuesto no detectado
NR Índice de retención lineal no reportado

Perfil cromatográfico de la fracción volátil de *P. dilatatifolium*. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Monoterpenos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos (HS), sesquiterpenos oxigenados (SO).



Anexo L. Tabla composición química y perfil cromatográfico de la fracción volátil del extracto SFE de *P. subflavum* var. *espejuelanum*.

N° pico	Compuesto	Índice de retención lineal				Cantidad relativa, %	Tipo
		DB-5MS		DB-WAX			
		Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
1	Heptanal	900	901 ^[10]	1185	1185 ^[129]	0,3	O
2	α -Pinoeno	935	939 ^[10]	1025	1025 ^[129]	0,4	HM
3	β -Pinoeno	981	979 ^[10]	1106	1110 ^[129]	0,2	HM
4	Mirceno	989	990 ^[10]	1161	1161 ^[129]	0,2	HM
5	<i>p</i> -Cimeno	1027	1024 ^[10]	1273	1270 ^[129]	1,3	HM
6	Limoneno	1032	1029 ^[10]	1200	1198 ^[129]	1,7	HM
7	γ -Terpinoeno	1061	1059 ^[10]	1248	1245 ^[129]	0,4	HM
9	Carvona	1250	1243 ^[10]	1749	1734 ^[129]	0,8	MO
10	α -Cubebeno	1356	1348 ^[10]	1470	1460 ^[129]	0,5	HS
11	Ciclosativeno	1383	1371 ^[10]	1500	1483 ^[129]	1,6	HS
12	α -Copaeno	1391	1387 ^[130]	1513	1491 ^[10]	33,6	HS
13	α -Gurjuneno	1420	1413 ^[136]	1546	1529 ^[129]	0,1	HS
14	α -Santaleno	1430	1422 ^[129]	1583	1583 ^[129]	0,4	HS
15	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1438	1436 ^[130]	1617	1606 ^[129]	6,7	HS
16	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1442	1434 ^[10]	1596	1576 ^[129]	2,8	HS
17	β -Copaeno	1444	1446 ^[130]	ND	ND	1,2	HS
18	Aromadendreno	1455	1464 ^[136]	1627	1620 ^[129]	3,6	HS
19	α -Humuleno	1471	1472 ^[130]	1688	1674 ^[130]	2,1	HS
20	<i>allo</i> -Aromadendreno	1476	1478 ^[133]	1666	1649 ^[129]	5,2	HS
21	Ciclopentadecano	1483	1488 ^[140]	ND	ND	0,4	H
22	γ -Muroloeno	1485	1479 ^[10]	1703	1690 ^[10]	1,4	HS
23	<i>ar</i> -Curcumeno	1488	1480 ^[10]	1781	1773 ^[129]	0,6	HS
24	Pentadecano	1500	1500 ^[10]	1503	1500	1,4	O
25	β -Selinoeno	1504	1509 ^[130]	1741	1744 ^[130]	4,2	HS
26	α -Muroloeno	1509	1504 ^[133]	1739	1714 ^[129]	2,5	HS
27	α -Selinoeno	1510	1517 ^[132]	1744	1725 ^[129]	0,6	HS
28	β -Bisaboleno	1514	1508 ^[129]	1736	1727 ^[129]	0,5	HS
29	γ -Cadineno	1526	1517 ^[134]	1777	1763 ^[129]	1,5	HS
30	δ -Cadineno	1529	1523 ^[10]	1771	1756 ^[129]	1,1	HS
31	<i>cis</i> -Calameneno	1533	1529 ^[10]	1849	1835 ^[129]	1,2	HS
32	α -Calacoreno	1554	1548 ^[136]	1934	1921 ^[129]	0,5	HS

33	Óxido de Cariofileno	1600	1600 ^[130]	2013	2005 ^[130]	5,5	SO
34	Cadaleno	1686	1688 ^[10]	2246	2233 ^[129]	0,4	HS
35	Heptadecano	1700	1700 ^[10]	1700	1700	0,3	H

HM Monoterpeno, MO Monoterpeno oxigenado, HS Sesquiterpeno,

SO Sesquiterpeno oxigenado, O Otras familias

ND Compuesto no detectado

Perfil cromatográfico de la fracción volátil de *P. subflavum* var. espejuelanum. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Monoterpenos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos (HS), sesquiterpenos oxigenados (SO).

