

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS Y
ACEITES ESENCIALES DE SEIS ESPECIES DE *Lippia spp.* (FAMILIA
VERBENACEAE), POR DIFERENTES MÉTODOS (ABTS⁺, ORAC Y
MONITOREO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA)**

YURI CÓRDOBA CAMPO

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

2014

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS Y
ACEITES ESENCIALES DE SEIS ESPECIES DE *Lippia spp.* (FAMILIA
VERBENACEAE), POR DIFERENTES MÉTODOS (ABTS⁺, ORAC Y
MONITOREO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA)**

YURI CÓRDOBA CAMPO

Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Química

Directora:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph. D.

Co-director:

JAIRO R. MARTÍNEZ, Químico, Ph. D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA

MAGISTER EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2014

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	22
1. MARCO TEÓRICO	25
1.1 RADICALES LIBRES	25
1.2 ANTIOXIDANTES	27
1.3 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS Y NATURALES	28
1.3.1 Antioxidantes sintéticos	29
1.3.2 Antioxidantes naturales	33
1.3.3 Compuestos fenólicos	34
1.3.4 Flavonoides	35
1.4 MÉTODOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	38
1.4.1 Capacidad de absorción de los radicales de oxígeno	39
1.4.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	44
1.4.3 Peroxidación lipídica	45
2. ANTECEDENTES	49
2.1 <i>Lippia origanoides</i>	49
2.2 <i>Lippia alba</i>	51
2.3 <i>Lippia micromera</i>	52
2.4 <i>Lippia citriodora</i>	53
2.5 <i>Lippia graveolens</i>	55
2.6 <i>Lippia americana</i>	56
3. CIENCIOMETRÍA	58

4. METODOLOGÍA	63
4.1 MATERIALES Y REACTIVOS	63
4.1.1 Reactivos, materiales y equipos.	63
4.2 MATERIAL VEGETAL	65
4.2.1 Secado de material vegetal	65
4.3 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	65
4.3.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	65
4.3.2 Extracción con fluido supercrítico	67
4.3.3 Extracción con solvente	69
4.3.4 Preparación de las muestras para el análisis cromatográfico y la evaluación de la capacidad antirradicalaria	70
4.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	70
4.4.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	71
4.4.2 Capacidad de absorción del radical de oxígeno-hidrofílico	72
4.4.3 Capacidad de absorción del radical de oxígeno-lipofílico	73
4.4.4 Análisis de ácidos grasos	73
4.4.5 Peroxidación lipídica	74
4.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	75
4.5.1 Análisis por GC-MS	75
4.5.2 Análisis por GC-FID	77
4.5.3 Análisis por HPLC-DAD	78
4.5.4 Análisis por GC-ECD	79
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	81
5.1 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL ENSAYO ORAC PARA ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS. FIGURAS ANÁLITICAS DE MÉRITO.	81
5.1.1 Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método	81
5.1.2 Determinación de los niveles mínimos de detección y cuantificación	82
5.1.3 Evaluación de la precisión	83
5.1.4 Evaluación de la exactitud	84

5.2 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA EL ENSAYO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	85
5.3 RENDIMIENTOS DE LOS ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS OBTENIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LAS SEIS ESPECIES DE <i>Lippia spp.</i>	87
5.4 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES Y LOS EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS Y ETANÓLICOS OBTENIDOS DE LAS ESPECIES DE <i>Lippia spp.</i> BAJO ESTUDIO	93
5.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES Y EXTRACTOS DE PLANTAS DEL GÉNERO <i>Lippia</i> , BAJO ESTUDIO	116
6. CONCLUSIONES	136
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
BIBLIOGRAFIA	157
ANEXOS	178

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructuras de algunos compuestos antioxidantes sintéticos.	31
Figura 2. Curvas de decaimiento de la fluorescencia de la fluoresceína inducida por los radicales peroxilo.	40
Figura 3. Mecanismo propuesto por Ou et al. [37] para la oxidación de la fluoresceína en presencia de los radicales peroxilo (AAPH).	42
Figura 4. Puentes de oxígeno glicosídicos por enlaces α -(1,4) entre dos moléculas de glucopiranosas.	43
Figura 5. Estructuras químicas de α -CD, β -CD y γ -CD	44
Figura 6. Estructura química del catión-radical ABTS ⁺ .	45
Figura 7. Etapas generales del proceso de la peroxidación lipídica.	46
Figura 8. Esquema general de derivatización de aldehídos con PFPH.	48
Figura 9. Planta de Lippia origanoides. Fuente: Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.	50
Figura 10. Planta de Lippia alba. Fuente: Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.	52
Figura 11. Planta de Lippia micromera. Fuente: Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.	53
Figura 12. Planta de Lippia citriodora. Fuente: Fotografía tomada por Cala, M. en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 10 de julio de 2009.	54
Figura 13. Planta de Lippia graveolens. Fuente: Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.	55
Figura 14. Planta de Lippia americana. Fuente: Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.	57
Figura 15. El número de publicaciones (2005-2013, Scopus, Elsevier) sobre los aceites esenciales y extractos de seis plantas del género Lippia. Fuente:	

- Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 2005-2013. Fecha de consulta: 6 de mayo de 2013. Ecuaciones de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (ESSENTIAL OIL AND LIPPIA SPP.)) y (TITLE-ABS-KEY (EXTRACT AND LIPPIA SPP.)). 59
- Figura 16. Relación entre áreas de conocimiento y el número de publicaciones sobre los compuestos fenólicos en las diferentes especies de *Lippia* spp. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 2005-2013. Fecha de consulta: 6 de mayo de 2013. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (PHENOLIC COMPOUNDS AND LIPPIA SPP.)). 60
- Figura 17. Relación entre los años y el número de publicaciones sobre la actividad antioxidante de diferentes especies de *Lippia* spp. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 2005-2013. Fecha de consulta: 6 de mayo de 2013. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (ANTIOXIDANTS AND LIPPIA SPP.)). 61
- Figura 18. Secado de material vegetal de las seis especies de *Lippia* spp. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Vivero, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013. 66
- Figura 19. Montaje para hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. A. Montaje para hidrodestilación. B. Reservorio de destilación Dean-Stark y C. Horno doméstico Samsung. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Antonie Lavoiser, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013. 67
- Figura 20. Equipo Thar SFE-2000-2-FMC50 empleado para obtener los extractos de las seis especies de *Lippia* spp. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Daniel Bernoulli, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013. 68
- Figura 21. Montaje para la realización de la extracción con solventes. A. Ultrasonido y B. Material vegetal seco utilizado para realizar la extracción. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de fichas técnicas y vivero, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013. 69

Figura 22. Lector de microplacas Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader (Sunnyvale, CA, EE. UU.) A. Lector de microplacas y Transferpette® -8/-12 y B. Microplacas de poli (estireno) de 96 pozos. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio fichas técnicas, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.	71
Figura 23. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 Series GC System, acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5973 Network, equipado con un puerto de inyección split/splitless y un inyector automático Agilent 7863 Series. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación analítica, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.	77
Figura 24. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N Series GC System, acoplado a un detector de ionización en llama (FID), equipado con un puerto de inyección split/splitless y un inyector automático Agilent 7863B Series. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación analítica, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.	78
Figura 25. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Agilent Technologies 1200 Series. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación analítica, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.	79
Figura 26. Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard HP 6890 Plus, acoplado a un detector de captura de electrones (ECD), equipado con un puerto de inyección split/splitless. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación analítica, CENIVAM, UIS, el 27 de abril de 2013.	80
Figura 27. Gráfica de efectos principales.	86
Figura 28. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del AE de L. micromera obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).	94

Figura 29. Distribución, por familias, de compuestos de los AE del género <i>Lippia</i> obtenidos MWHD.	103
Figura 30. Perfil cromatográfico típico del extracto SFE de <i>L. micromera</i> . Columna DB-5 (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).	111
Figura 31. Factores de dilución utilizados para el AE de <i>L. origanoides</i> (quimiotipo Felandreno).	116
Figura 32. Oxidación del ABTS con persulfato de potasio, para la generación del catión-radical ABTS ⁺ [133].	121
Figura 33. Efecto de la concentración de RMCD en el ABC neta del α -tocoferol.	123
Figura 34. Perfil cromatográfico de los aldehídos derivados con PFPH, productos de la peroxidación lipídica del aceite de girasol. Columna DB-5 (60 m), split 1:30.	128
Figura 35. Estructuras de los flavonoides encontrados en algunas de las <i>Lippia</i> spp.	133
Figura 36. Atrapamiento de los radicales libres por flavonoides.	134

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno, radicales y no radicales.	26
Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes según diferentes criterios.	28
Tabla 3. Propiedades, aplicaciones, y regulaciones del BHA, BHT y TBHQ.	32
Tabla 4. Antioxidantes naturales comunes usados como preservantes de comidas.	33
Tabla 5. Clasificación de los compuestos fenólicos.	34
Tabla 6. Estructura y clasificación de los flavonoides, según los grupos sustituyentes en los anillos.	36
Tabla 7. Listado de algunos métodos para medir la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .	39
Tabla 8. Reactivos, materiales y equipos usados.	63
Tabla 9. Condiciones experimentales usadas para obtener los extractos SFE.	68
Tabla 10. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método ORAC para antioxidantes lipofílicos, empleando la curva de calibración del Trolox [®] .	82
Tabla 11. Repetibilidad de los valores de ABC de soluciones de Trolox [®] (50 µM).	83
Tabla 12. Reproducibilidad de los valores ORAC del α-tocoferol.	84
Tabla 13. Factores y niveles evaluados en el diseño factorial 2 ² más estrella.	85
Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta del diseño experimental realizado.	85
Tabla 15. Identificación taxonómica de las seis especies de <i>Lippia spp.</i> empleados en esta investigación.	88
Tabla 16. Porcentajes de rendimiento de los AE obtenidos por hidrodestilación de las plantas del género <i>Lippia</i> (hojas, tallos y flores), bajo estudio.	88

Tabla 17. Porcentajes de rendimiento de diferentes plantas del genero <i>Lippia</i> provenientes de diferentes lugares.	90
Tabla 18. Rendimientos de los extractos etanólicos y extractos obtenidos por SFE-CO ₂ de las seis especies de <i>Lippia spp.</i>	91
Tabla 19. Rendimientos de los extractos obtenidos con CO ₂ supercrítico del género <i>Lippia</i> obtenidos por Cala, M. [86].	92
Tabla 20. Cuantificación de los compuestos mayoritarios de los AE de las especies de <i>Lippia spp.</i>	95
Tabla 21. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes presentes en los AE de las seis especies de <i>Lippia spp.</i>	96
Tabla 22. Estructuras químicas y usos de los principales compuestos encontrados en el género <i>Lippia</i> .	100
Tabla 23. Análisis GC-MS de los extractos obtenidos con fluido supercrítico de plantas del género <i>Lippia</i> bajo estudio.	108
Tabla 24. Cuantificación de los compuestos mayoritarios de los extractos obtenidos con CO ₂ supercrítico de las especies de <i>Lippia spp.</i>	110
Tabla 25. Cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos encontrados en los extractos, obtenidos con solventes o CO ₂ supercrítico, de plantas género <i>Lippia</i> , bajo estudio.	114
Tabla 26. Valores de capacidad antioxidante de los AE y extractos obtenidos con CO ₂ supercrítico y solventes de las plantas bajo estudio.	117
Tabla 27. Reportes de la actividad antioxidante medida por el método ORAC, de plantas de orégano y cedrón [130-132].	120
Tabla 28. Valores ORAC-L de los aceites esenciales y extractos supercríticos del género <i>Lippia</i> .	124
Tabla 29. Valores TAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g de sustancia) de los aceites esenciales y extractos supercríticos de las seis especies de <i>Lippia spp.</i> , por el método ORAC.	125
Tabla 30. Cantidad relativa (%) de los ácidos grasos presentes en el aceite de girasol, utilizado en esta investigación.	127

Tabla 31. Efecto protector de los aceites esenciales, extractos y sustancias de referencia contra la degradación oxidativa en el aceite de girasol.

128

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DE LOS AE Y EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS	179
ANEXO B. TABLAS DE COMPOSICIÓN DE LOS AE Y EXTRACTOS OBTENIDOS CON CO ₂ SUPERCRÍTICO BAJO ESTUDIO	192
ANEXO C CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS COMPONENTES PRESENTES DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y SUPERCRÍTICOS	207
ANEXO D. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	210
ANEXO E. PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LOS AE Y EXTRACTOS OBTENIDOS CON CO ₂ SUPERCRÍTICOS DE LAS PLANTAS DEL GÉNERO <i>Lippia</i>	212
ANEXO F. CONTRIBUCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE REFERENCIA A LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MUESTRAS EVALUADAS	225

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAPH	<i>2,2'-Azobisisobutyramidiniem dihydro chloride</i> (cloruro de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano)).
ABC	Área bajo la curva.
AE	Aceite esencial.
ABTS ⁺	<i>2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid</i> (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico).
ALH	Ácido linoleico.
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i> (butil-hidroxitolueno).
BHA	<i>Butylated hydroxyanisole</i> (butil-hidroxianisol).
ca.	Circa (aproximadamente).
CD	Ciclodextrina.
CV	Coeficiente de variación.
CoQ	Coenzima.
CUPRAC	<i>Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity</i> (capacidad antioxidante reductora del Cu ⁺²).
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (detector de arreglo de diodos).
d _f	Espesor de la fase estacionaria.
D.I.	Diámetro interno.
DNPH	<i>2,4-Dinitrophenylhydrazine</i> (2,4-dinitrofenil-hidracina).
EC	<i>Effective Concentration</i> (concentración efectiva).
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> (detector de captura de electrones).
ET	<i>Electron Transfer</i> (transferencia de un electrón).
et al.	<i>Et alii</i> (y otros).
ERO	Especies reactivas del oxígeno.

e.g.	<i>Exempli gratia</i> (por ejemplo).
eV	Electrón-Voltio.
EI	<i>Electron impact</i> (impacto de electrones).
FA	<i>Fatty Acids</i> (ácidos grasos).
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (ésteres metílicos de ácidos grasos).
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> .
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (poder antioxidante reductor del hierro).
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (detector de ionización en llama).
FL	<i>Fluorescein</i> (fluoresceína).
GC	<i>Gas Chromatography</i> (cromatografía de gases).
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i> (transferencia de un átomo de hidrógeno).
L.	<i>Lippia</i> .
LRI	Índice de retención lineal.
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (espectrometría de masas).
<i>m/z</i>	Relación masa/carga.
NMD	Nivel mínimo de detección.
NMC	Nivel mínimo de cuantificación.
NPD	<i>Nitrogen Phosphorus Detector</i> (detector de nitrógeno y fósforo).
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (capacidad de absorción de radical de oxígeno).
PDMS/DVB	<i>Polidimethylsiloxane/divinylbenzene</i> (poli (dimetilsiloxano)/divinilbenceno).
PFPH	<i>Pentafluorophenylhydrazine</i> (pentaflúorfenil-hidracina).
RMCD	<i>Randomly Methylated β-Cyclodextrin</i> (β -Ciclodextrina metilada).
RL	Radicales libres.

SE	<i>Solvent Extraction</i> (extracción con solvente).
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (extracción con fluido supercrítico).
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (microextracción en fase sólida).
TAC	<i>Total Antioxidant Capacity</i> (capacidad antioxidante total)
TBHQ	<i>tert-Butyl hydroquinone</i> (<i>tert</i> -Butilhidroquinona).
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (capacidad antioxidante equivalente al Trolox®).
Trolox®	<i>6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid</i> (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).
USDA	<i>The U.S. Department of Agriculture.</i>
UIS	Universidad Industrial de Santander.

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE SEIS ESPECIES DE *Lippia spp.* (FAMILIA VERBENACEAE), POR DIFERENTES MÉTODOS (ABTS⁺, ORAC Y MONITOREO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA)

AUTOR: Yuri Córdoba Campo **

PALABRAS CLAVE: Antioxidante, radicales, ORAC, ABTS⁺, extractos con fluido supercrítico, aceites esenciales.

DESCRIPCIÓN

En el metabolismo secundario, las plantas desarrollan rutas que conducen a la formación de compuestos de interés para las industrias farmacéutica, perfumística o de alimentos, entre otras. Algunos de estos metabolitos son compuestos antioxidantes, los cuales inhiben o previenen la oxidación de un sustrato cuando se encuentran presentes en bajas concentraciones.

Una fuente promisoriosa de antioxidantes naturales son las plantas aromáticas y medicinales, por ejemplo, del género *Lippia*, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en nuestro país. A partir de este género, se pueden conseguir diferentes fracciones, obtenidas por diferentes técnicas, que permiten la obtención de compuestos con posibles propiedades antioxidantes.

En este trabajo de investigación, se evaluaron la capacidad antioxidante y la composición química de AE, extractos obtenidos con fluido supercrítico (SF) y con disolventes en seis especies del género *Lippia*, i.e., *L. alba* (quimiotipos Citral y Carvona), *L. organoides* (quimiotipos Timol, Carvacrol y Felandreno), *L. micromera*, *L. citriodora*, *L. graveolens* y *L. americana*. La evaluación de la capacidad antioxidante se evaluó por diferentes técnicas tales como ORAC, peroxidación lipídica y el ensayo de decoloración del ABTS⁺.

Además, la composición química de los aceites esenciales y de los extractos obtenidos de las seis especies de *Lippia spp.* se estableció por GC acoplada a un MS y un FID y LC-DAD. En general, los aceites esenciales y los extractos de los tres quimiotipos de *L. organoides* y *L. graveolens* fueron los que presentaron mayores capacidad antioxidante, en comparación a la de sus compuestos individuales y los antioxidantes sintéticos BHT y α -tocoferol.

* Trabajo de investigación

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Maestría en Química Director: Elena E. Stashenko
Codirector Jairo R. Martínez

ABSTRACT

TITLE: ANTIOXIDANT EVALUATION CAPACITY OF EXTRACTS AND ESSENTIAL OILS OF SIX SPECIES *Lippia spp.* (VERBENACEAE family) BY MEANS OF DIFFERENT METHODS (ABTS⁺, ORAC Y LIPID PEROXIDATION MONITORING)

AUTHOR: Yuri Córdoba Campo^{**}

KEY WORDS: antioxidant, radicals, ORAC, ABTS⁺, extracts with supercritical fluid, essential oils

DESCRIPTION

On secondary metabolism, plants develop paths that lead to compounds composition that are well seen by pharmaceutical, perfumery and food industries, among others. Some of these metabolites are antioxidant compounds, which prevent the oxidation of one substrate when they are in low concentrations.

One reliable source of natural antioxidants are the aromatic and medical plants, such as the case of the *Lippia* genre which can be widely found across our country. Regarding this, many fractions can be obtained, by means of different techniques that permit to obtain compounds with different antioxidant properties. In this research work, the antioxidant capacity and chemical composition of AE was evaluated. These extracts were obtained by supercritical fluid (SF) and by solvents on six species of the *Lippia* genre i.e., *L. alba* (Citral and Carvone chemotypes), *L. origanoides* (Thymol, Carvacrol and Phellandrene chemotypes), *L. micromera*, *L. citriodora*, *L. graveolens* and *L. americana*. The evaluation of the antioxidant capacity was evaluated by different techniques such as ORAC, lipid peroxidation and the ABTS⁺ decoloration assay.

Furthermore, the chemical composition of the essential oils and the obtained extracts from the six *Lippia spp* species was established by GC connected to MS, FID and LC-DAD. By and large, the essential oils and the extracts of the three chemotypes of *L. origanoides* and *L. graveolens* presented bigger antioxidant capacity compared to the individual compounds and the synthetic antioxidants BHT and α -tocoferol

* Work of investigation

** Faculty Sciences, School in chemistry, Master in Chemistry Director: Elena E. Stashenko
Codirector Jairo R. Martínez

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país privilegiado por sus riquezas naturales, por la variedad de su geografía y por la diversidad de sus ecosistemas. Sin embargo, ello no ha sido muy aprovechado, debido a que, por ejemplo, las plantas aromáticas nativas, han sido muy poco estudiadas, a pesar de que tienen un alto potencial económico [1,2], como una fuente de compuestos bioactivos, obtenidos a partir de los aceites esenciales (AE) o extractos, que podrían tener características y propiedades nuevas, con los posibles usos en diferentes ramas de la industria.

En el metabolismo secundario, las plantas desarrollan rutas que conducen a la formación de compuestos de interés para las industrias farmacéutica, perfumística o de alimentos, entre otras. Algunos de estos metabolitos son compuestos antioxidantes, los cuales, inhiben o previenen la oxidación de un sustrato cuando se encuentran presentes en bajas concentraciones; y desde el punto de vista biológico, son aquellos compuestos que protegen a los sistemas vivos de los agentes que causan el deterioro oxidativo [3].

Los compuestos antioxidantes pueden estar clasificados en compuestos de tipo natural y sintético. Sin embargo, estudios relacionados con los antioxidantes sintéticos han demostrado que estos pueden ser tóxicos y causar una serie de enfermedades, si no se consumen o manejan ciertas cantidades establecidas por las legislaciones de los diversos países [4-7]. Por esta razón, en los últimos 10 años, ha disminuido el interés en estos compuestos, y por consiguiente están siendo reemplazados por antioxidantes de origen natural.

Para evaluar la actividad antioxidante de estos compuestos, se han desarrollado diferentes ensayos, ya sea para antioxidantes puros o mezclas, tanto de origen

sintético, como natural. La significancia y la relevancia de las evaluaciones antioxidantes para alimentos y en sistemas biológicos depende del método usado, pero no existe una metodología de análisis estándar, única, para ello. Además, la capacidad antioxidante, puede darse a través de dos mecanismos de reacción. En unos ensayos, el mecanismo se realiza por la transferencia de un átomo de hidrógeno, como es el método ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno); la inhibición de la oxidación del ácido linoleico, entre otros; y reacciones llevadas a cabo mediante la transferencia de un electrón, como en el método TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox[®]) [8,9].

Una fuente promisoría de antioxidantes naturales son las plantas aromáticas y medicinales, por ejemplo, del género *Lippia*, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en nuestro país y constituyen una materia prima que aún no ha sido aprovechada [10]. A partir de este género, se pueden conseguir diferentes fracciones, obtenidas por diferentes técnicas, que permiten la obtención de compuestos con posibles propiedades antioxidantes. Existen diferentes técnicas de extracción para la obtención de compuestos antioxidantes de diferentes materiales vegetales, tales como: la extracción con solventes (SE) y con fluido supercrítico (SFE), y la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD).

En este trabajo de investigación, se evaluaron la capacidad antioxidante y la composición química de AE, extractos obtenidos con fluido supercrítico (SF) y con disolventes en seis especies del género *Lippia*, i.e., *L. alba* (quimiotipos Citral y Carvona), *L. origanoides* (quimiotipos Timol, Carvacrol y Felandreno), *L. micromera*, *L. citriodora*, *L. graveolens* y *L. americana*. La evaluación de la capacidad antioxidante se evaluó por diferentes técnicas tales como capacidad de absorción de los radicales libres de oxígeno (ORAC), peroxidación lipídica y el ensayo de decoloración del catión-radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico) (ABTS⁺). La capacidad antioxidante de los extractos y los AE se

comparó con la de las sustancias de referencia. Además, la composición química de los aceites esenciales y de los extractos obtenidos de las seis especies de *Lippia spp.* se estableció por cromatografía de gases (GC) acoplada a un detector selectivo de masas (MS) y un detector de ionización en llama (FID) y cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de diodos LC-DAD, usando diferentes criterios (t_R , LRI (índice de retención lineal), MS, bases de datos).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 RADICALES LIBRES

El interés por especies radicalarias surge por primera vez en 1900, cuando Moses Gomberg demostró la existencia del radical trifenilmetilo ($\text{Ph}_3\text{C}^\cdot$). Posteriormente, los radicales libres (RL) se definieron como especies químicas que tienen un electrón desapareado, que son muy reactivos, y con tiempos de vida media muy cortos. Además, estas especies moleculares juegan un papel muy importante en la vida y en la evolución biológica, como el radical de oxígeno que interviene en los procesos de transducción de las señales, transcripción del gen, entre otras. Además, el monóxido de nitrógeno (NO^\cdot) es una molécula producida por las células endoteliales, esenciales para la regulación de la relajación y la proliferación de células musculares lisas vasculares, angiogénesis, y, el producido por las neuronas, sirve como un neurotransmisor [1,12].

Se ha demostrado, que la concentración de los RL incrementa con la actividad metabólica, implicando reacciones de oxidación-reducción. El desequilibrio entre la generación de especies oxidantes y la acción de los sistemas de defensa del organismo, produce un cambio en el balance, a favor de los oxidantes, lo que genera el llamado estrés oxidativo. Estos prooxidantes se refieren a especies reactivas de oxígeno (ERO), que pueden ser clasificadas en dos grupos de compuestos, radicales y no radicales (**Tabla 1**) [13].

Las ERO ejercen su acción oxidante, dependiendo del medio donde se encuentren. Por ejemplo, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ posee diferentes propiedades debido a que su pKa es 4.8, el superóxido puede existir en forma de $\text{O}_2^{\cdot-}$ o, a pH bajos, como hidroperoxilo (HO_2). Este último puede penetrar más fácilmente las membranas

celulares y, en un ambiente hidrofílico, el $O_2^{\cdot -}$ y HO_2 pueden actuar como agentes reductores. Por otro lado, el OH^{\cdot} es un agente oxidante que puede ser producido por la reacción de Fenton, por primera vez descrita en 1894 (**Esquema 1**); esta especie puede reaccionar rápidamente con moléculas orgánicas e inorgánicas en la célula, incluyendo ADN, proteínas, lípidos, azúcares, entre otros [13-5].



Esquema 1. Producción del radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton.

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno, radicales y no radicales.

	Nombre	Símbolo
Radicales	Oxígeno triplete	3O_2
	Ion superóxido	$O_2^{\cdot -}$
	Hidroxilo	OH^{\cdot}
	Peroxilo	ROO^{\cdot}
	Alcoxilo	RO^{\cdot}
	Óxido nítrico	NO^{\cdot}
No radicales	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
	Ácido hipocloroso	$HOCl$
	Ozono	O_3
	Oxígeno singulete	1O_2
	Peroxinitrato	$ONOOH$

El H_2O_2 causa daño a la célula a concentraciones bajas (10 μM), se disuelve fácilmente en agua y puede penetrar las membranas biológicas [13-15].

A esta especie radicalarias, en las últimas tres décadas, se les han atribuido el desarrollo de diversas enfermedades, a saber: cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y, en general, al envejecimiento [12, 14, 16].

1.2 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante se define como “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o previene la oxidación de ese sustrato” [3].

Los primeros reportes realizados sobre sustancias inhibidoras de los RL fueron hechos por Berthollet en 1797, más tarde, Duclaux demostró la participación del oxígeno atmosférico en la oxidación de los ácidos grasos [17]. Posteriormente, se encontró que la oxidación de los acilgliceroles insaturados puede generar olores rancios en aceites de pescado. Después, Moureu y Dufraise reportaron la posibilidad de usar sustancias químicas sintéticas, especialmente, compuestos fenólicos, para retardar la descomposición oxidativa de los lípidos presentes en las comidas [18].

Estudios posteriores se han enfocado en observar qué otros efectos podrían tener estas sustancias. De ahí, el interés alrededor del mundo por sus posibles efectos benéficos en relación con la prevención del estrés oxidativo y enfermedades relacionadas [18].

Un antioxidante es un compuesto caracterizado como efectivo *in vivo* [19,20], si cumple con los siguientes requerimientos:

- Debe reaccionar efectivamente con los RL.
- El producto de reacción del antioxidante con los RL no debe ser más tóxico para el organismo que el radical removido.
- El antioxidante potencial debe estar presente en el organismo en una concentración suficiente para neutralizar el efecto de los RL.
- El tiempo de vida media del antioxidante debe ser lo suficientemente largo para reaccionar con el oxidante.

- Los radicales formados por el antioxidante no deben realizar reacciones en cadena, pero son neutralizados por la reacción con otros radicales, para formar un producto estable.

Los antioxidantes se pueden clasificar teniendo en cuenta diferentes criterios, ya sea de acuerdo con su solubilidad, su sistema de defensa o su origen [4-7] (**Tabla 2**). Sin embargo, durante las últimas dos décadas aparecen cada vez más, diferentes compuestos antioxidantes de origen natural, que pueden tener efectos benéficos contra la deterioración oxidativa.

Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes según diferentes criterios.

Criterio	Clasificación	Ejemplos
Solubilidad	Hidrofílicos	Vitamina C.
	Hidrofóbicos	Carotenoides y vitamina E.
Mecanismo de defensa	Preventivos	Glutación peroxidasa, catalasa.
	Atrapadores de radicales	Flavonoides, BHT.
	Reparadores o <i>de novo</i>	Enzimas proteolíticas o reparadoras del ADN.
Origen	Natural	Quercetina, pinocebrina.
	Sintético	BHA, TBHQ.

1.3 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS Y NATURALES

Los consumidores y las organizaciones de control están preocupados por la seguridad de las comidas y, sobre todo, por los posibles efectos nocivos de los aditivos sintéticos en la salud del ser humano. A pesar de su bajo costo y la alta estabilidad de los antioxidantes sintéticos, estudios realizados han detectado un posible efecto carcinogénico, los cuales han contribuido con la disminución de su uso o consumo [6]. De ahí que recientes investigaciones, se estén enfocando al aislamiento e identificación de antioxidantes de origen natural [7].

1.3.1 Antioxidantes sintéticos Los antioxidantes sintéticos fueron introducidos hace unas décadas (ca. 1940). Entre estos, se encuentran fenoles butilados y polifenoles, que son más baratos (\$ 10-20 por libra) que los naturales, y, a menudo, mucho más eficaces en los procesos de retardación de la degeneración oxidativa [7,21].

Los antioxidantes sintéticos son compuestos químicos que no se producen en la naturaleza; se adicionan a los diversos productos para evitar o prevenir la oxidación. Sin embargo, hay un gran número de exigencias alrededor de su uso, debido a que deben tener la aprobación para la regulación de estos aditivos. Por lo tanto, solo unos pocos antioxidantes sintéticos han sido utilizados en comidas [7].

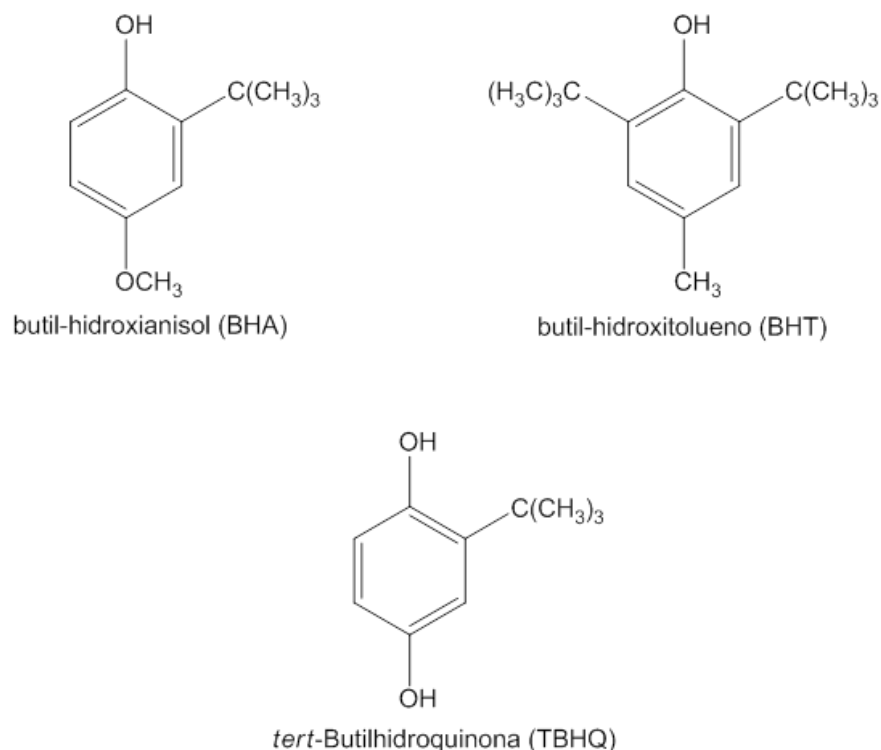
El butil-hidroxitolueno (BHT) y el butil-hidroxianisol (BHA) son los antioxidantes sintéticos más usados en las comidas según el “*National Research Council Food Additive Committee*”. El BHA tiene una estabilidad ligeramente alta y es más efectivo para proteger el sabor y el color de las comidas. Además, el BHA es más eficaz para preservar las comidas que contienen grasas de animales, con ácidos grasos de cadena corta. El BHT y BHA tienen puntos de ebullición de 265 y 268°C, respectivamente; ambas sustancias se pueden usar en los materiales para empacar la comida, ya sea por adición directa en los revestimientos interiores o indirectamente como emulsiones, en donde ellos migran a la comida. Estos antioxidantes han mostrado tener un efecto sinérgico, cuando se usan en combinación, especialmente, en productos derivados de nueces [21,22].

El BHT es producido en los EE.UU., Europa occidental, Japón, entre otros. Aunque, el uso del BHT no está en aumento, aún es alto. Su precio está entre \$1.6 y \$2 por kg, que lo hace el antioxidante más económico hasta ahora [22]. El BHA y BHT producen una gran actividad antioxidante. Por ello, las comidas contienen mezclas por encima de 0.02% de BHA/BHT [7].

Otro antioxidante sintético, bastante utilizado, es la *tert*-butilhidroquinona (TBHQ), usada principalmente en la preservación de las comidas, especialmente, en los aceites vegetales, aún más que el BHA y BHT. Sin embargo, el TBHQ no es permitido en comidas en Canadá y en los EE. UU., cuando está en combinación con el galato de propilo [7]. En la figura 1, se pueden observar las estructuras de los antioxidantes más utilizados.

Según Botterweck *et al.* [6] en un estudio realizado, en 1986, entre 120.852 hombres y mujeres de 55 a 69 años de edad, que tuvieron una dieta rica en alimentos como aceites, mayonesas y sopas secas, que contenían BHA y BHT, no se encontraron evidencias claras de una asociación entre una dieta que contenía bajos niveles de BHA y BHT, y los riesgos de cáncer de estómago en los humanos. Sin embargo, “*The International Agency for Research on Cancer*” concluye que hay evidencia suficiente sobre la carcinogenicidad del BHA en animales de experimentación, pero es limitada para el BHT [5,23]. Además, en Colombia, el Ministerio de Salud tiene establecidas las cantidades máximas permitidas para cada uno de los antioxidantes usados en los alimentos listos para el consumo [24]. El resumen de las regulaciones, aplicaciones y propiedades del BHA, BHT y TBHQ se muestra en la **Tabla 3** [25].

Figura 1. Estructuras de algunos compuestos antioxidantes sintéticos.



Estudios *in vivo* del BHA en los ratones, realizados por Iverson [26], demostraron un respuesta positiva en los estómagos de los ratones, representada en una inflamación en la mucosa. Esta patología se observó cuando el BHA se administró por sonda en aceite, o cuando se suministraron en la dieta o como una mezcla seca (BHA, 2%). Usando este mismo protocolo, el TBHQ mostró el mismo efecto, pero menos pronunciado que el BHA; igualmente, el BHT produjo un incremento en la proliferación celular, pero el efecto fue menor que lo observado por el BHA.

La síntesis de nuevos antioxidantes sintéticos para los alimentos está limitada por los crecientes costos de la investigación y desarrollo; estos costos están asociados con la evaluación de su seguridad y el tiempo requerido para obtener una aprobación reglamentaria de aditivos. Estas restricciones, y también la preferencia del consumidor por los aditivos naturales, han llevado a la industria a investigar materiales naturales como una fuente de nuevos antioxidantes [7].

Tabla 3. Propiedades, aplicaciones, y regulaciones del BHA, BHT y TBHQ.

Nombre	BHA	BHT	TBHQ
Utilización en las comidas	Carne, especias, cereales, puré de papas deshidratados, mezcla de bebidas, vitaminas, levadura, aceites vegetales, grasas animales quesos procesados, margarina y aceites esenciales.	Cereales, mercancías cocinadas al horno, papas fritas, aceites vegetales, bocadillos, mantequilla, margarina y mariscos congelados.	Cereales secos, grasas comestibles, margarina, papas fritas, carne de ave, embutidos secos de carne, empanadas de carne y aceites vegetales.
Función en las comidas	Conservante antioxidante atrapador de los RL formados durante la auto-oxidación de los lípidos insaturados. También posee actividad antimicrobiana como un compuesto fenólico.	Antioxidante conservante; previene el enranciamiento oxidativo en aceites que contienen los alimentos, atrapa a los RL formados durante la auto-oxidación de los lípidos insaturados. Posee actividad antimicrobiana como un fenol.	Evita la rancidez oxidativa de alimentos desarrollada por la formación de RL.
Efecto sinérgico;	BHT, galato de propilo, metionina, ácidos cítrico y fosfórico.	BHA.	BHA y ácido cítrico.
Cuestiones de seguridad alimentaria	Ha demostrado la formación de tumores en el estómago de animales.	Este antioxidante no ha sido sujeto a una gran crítica.	Ha mostrado mutagenicidad <i>in vivo</i> .
Legislación	EE.UU.: nivel máximo aprobado para uso general; FDA 0.02% y USDA 0.01% del peso de la grasa. Reino Unido y Europa: aprobado Cánada: aprobado Australia/países alrededor del océano pacífico y Japón: aprobado.	EE.UU.: nivel máximo aprobado para uso general; FDA 0.02% y USDA 0.01% del peso de la grasa. Reino Unido y Europa: aprobado Cánada: aprobado Australia/ países alrededor del océano pacífico y Japón: aprobado.	EE.UU.: no se permite usar en combinación con el galato de propilo, FDA 0.02% y USDA 0.01% del peso de la grasa. Europa, Reino Unido, Noruega, Dinamarca, Suecia, Suiza: no se permite su uso en comida. Australia, Nueva Zelanda: permitido su uso en comidas. Japón: no se permite su uso en comida

FDA: Food and Drug Administration

USDA: The U.S. Department of Agriculture

1.3.2 Antioxidantes naturales Los antioxidantes naturales son compuestos que provienen de plantas, frutas o fuentes animales, interfieren en la formación de RL y retardan la oxidación; previenen, por ejemplo, en las comidas el desarrollo de olores y sabores no deseados, resultantes de la oxidación. Los productos alimenticios están sujetos a diferentes procesos para su preservación y almacenamiento, y los antioxidantes adicionados podrían disminuir, por lo tanto, estos productos son fortificados con cantidades adicionales de antioxidantes, siempre y cuando estén dentro de los límites permitidos [22,27].

Las fuentes más comunes de antioxidantes naturales son cereales, frutas cítricas, cacao, el grano de café, hierbas y especias, entre otras (**Tabla 4**) [21].

Tabla 4. Antioxidantes naturales comunes usados como preservantes de comidas.

Compuesto	Fuente natural
Vitamina C	Frutas (frutas cítricas), algunos vegetales, tomate.
Vitamina E / tocoferoles	Cereales, brócoli, coliflor, aceites (oliva, girasol), almendra, avellana.
β -Caroteno	Pimentón, espinaca, perejil, tomates, zanahoria, batata, albaricoque, papaya.
Flavonoides	Papa, tomate, lechuga, cebolla, trigo, chocolate, uva, vino, té.
Antocianinas	Alto contenido en vinos rojos, algunos en whiskey.
Licopeno	Tomate, papaya, sandía, uvas rojas.
CoQ10	Salvado de trigo, carnes orgánicas (hígado de pollo).

Entre los antioxidantes naturales más comunes figuran los compuestos fenólicos, e.g., tocoferoles, flavonoides y compuestos relacionados como cumarinas, derivados del ácido cinámico y chalconas, diterpenos fenólicos y ácidos fenólicos. Si se utiliza un antioxidante para algún uso práctico, este compuesto extraído de una fuente natural debe cumplir varios criterios, a saber: no poseer olor, sabor o color, que se le pueda dar al producto, además, una actividad antioxidante alta, en pequeñas concentraciones, en dicho producto. Por ejemplo, los antioxidantes

presentes o adicionados a las comidas son funcionales a concentraciones muy pequeñas, usualmente, hasta el 0.02% [27].

1.3.3 Compuestos fenólicos Los compuestos fenólicos poseen uno o más grupos hidroxilo unidos a uno o varios anillos aromáticos. El término “fenólicos” incluye un gran y diverso grupo de compuestos químicos, y se clasifican en grupos basados en el número de carbonos en la molécula (**Tabla 5**) [15].

Tabla 5. Clasificación de los compuestos fenólicos.

Estructura	Clase
C ₆	Fenoles simples
C ₆ – C ₁	Ácidos fenólicos
C ₆ – C ₂	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos
C ₆ – C ₃	Ácidos cinámicos, aldehídos y alcoholes de cinamilo Cumarinas, isocumarinas y cromonas
C ₁₅	Chalconas, auronas, dihidrochalconas Flavanos, flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, antocianinas
C ₃₀	Biflavonilos
C ₆ – C ₁ - C ₆ , C ₆ – C ₂ – C ₆	Benzofenonas, xantonas, estilbenos
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Quinonas
C ₁₈	Betacianinas

Los compuestos polifenólicos se encuentran comúnmente en las plantas y en algunos casos, son los metabolitos secundarios más abundantes; además, han sido reportados en diversas investigaciones por sus múltiples efectos biológicos, incluyendo su actividad antioxidante. Las plantas que poseen una cantidad alta de estos compuestos, han despertado un gran interés en la industria de los alimentos, porque estos metabolitos pueden retardar la degradación oxidativa de lípidos, y por lo tanto mejorar la calidad y el valor nutricional del alimento [28]. Trabajos recientes [5,28], se enfocan hacia el aprovechamiento del alto potencial

antioxidante de estos compuestos fenólicos, incluyendo los flavonoides y otros fenoles.

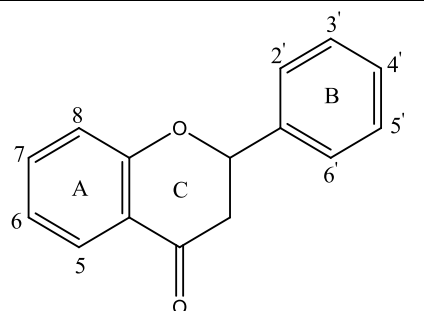
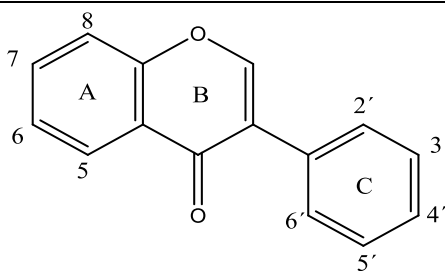
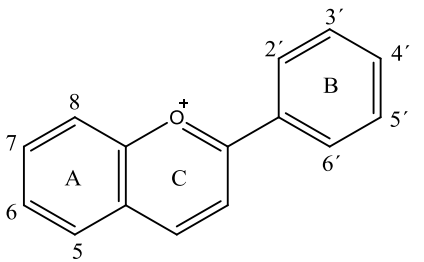
1.3.4 Flavonoides Los flavonoides son compuestos que fueron descritos por Szent-György, quien en 1930 aisló la citrina de la cáscara de limón, la cual regulaba la permeabilidad de los capilares [29]. El término "flavonoides" se usa generalmente para describir un gran número de productos naturales (C_{15}), que comparten en su estructura un esqueleto común de difenil-piranos ($C_6-C_3-C_6$); poseen dos anillos fenilo, unidos a través de un anillo C de pirano (C) [15,29].

Las sustituciones en los anillos subdividen a los flavonoides en varias familias, tal como se puede observar en la **Tabla 6** [30].

Tabla 6. Estructura y clasificación de los flavonoides, según los grupos sustituyentes en los anillos.

Clase	Estructura general	Flavonoide	Patrón de sustitución
Flavanol		(+)-Catequina (-)-Epicatequina Galato de epigallocatequina	3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4', 5'-OH
Flavona		Apigenina Rutina Luteolina	5, 7, 4'-OH 5, 7, 3', 4'-OH, 4'-Glucosa 5, 7, 3', 4'-OH
Flavonol		Kaempferol Quercetina	3,5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH

Tabla 6. Continuación.

Flavanona		Naringenina	5, 7, 4'-OH
		Taxifolina	3, 5, 7, 3',4'-OH
		Pinocembrina	5, 7-OH
Isoflavona		Genisteina	5, 7, 4'-OH
		Daidzeina	7, 4'-OH
Antocianidina		Apigenidina	5, 7, 4'-OH
		Cianidina	3, 5, 7, 4'-OH, 3, 5-OMe

Los flavonoides normalmente son metabolitos que dan la pigmentación a las plantas con colores como rojo, amarillo, azul y púrpura, entre otros. También, a estos compuestos cada vez más se les han asociado diversos efectos benéficos para la salud, provenientes de dietas ricas en frutas y verduras [31].

Las propiedades biológicas, farmacológicas y medicinales de los flavonoides han sido ampliamente estudiadas. Entre las múltiples actividades biológicas que se encuentran figuran anticarcinogénica, antiinflamatoria, antibacterial, antialérgica, antiviral, entre otras. Sin embargo, la más interesante es la actividad antioxidante [32].

Los flavonoides son poderosos antioxidantes contra los RL, y su actividad depende de las propiedades redox y de las diferentes partes de su estructura química. Entre los criterios para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides figuran, *e.g.*, la presencia de una estructura O-dihidroxi en el anillo B, grupos OH en las posiciones 3 y 5, O-metilación, enlace doble 2-3 [30,31].

1.4 MÉTODOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes pueden actuar a través de diferentes mecanismos, y un solo ensayo no puede evaluar los diferentes modos de acción de los antioxidantes. En los ensayos convencionales (ABTS⁺, DPPH[·], entre otros) [8] se han utilizado espectrofotómetros UV-Visible que emplean celdas; sin embargo, este método es muy tedioso, ya que requiere bastante tiempo para realizar las medidas, y solo permite la lectura de una muestra al tiempo, mientras demanda una gran cantidad de reactivos. Por ello, estos ensayos han sido reemplazados por lectores de microplacas de 6, 12, 24, 48, 96 y hasta 384 pozos, que permiten disminuir el tiempo de análisis y leer hasta 384 muestras al tiempo, usando muy pequeñas cantidades.

Con base en las reacciones químicas, la mayoría de ensayos de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: (1) ensayos basados en reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) o (2) ensayos que involucran la transferencia de un electrón (ET). Los ensayos ET tienen en cuenta una reacción redox con el oxidante (también una prueba para monitorear la reacción) como un indicador del punto final de la reacción. Mientras los ensayos HAT, se basan en el seguimiento cinético de las reacciones competitivas y la cuantificación es derivada de curvas cinéticas, el método ET usa un radical estable sintético, una molécula oxidable o un antioxidante [8,9] (**Tabla 7**).

Tabla 7. Listado de algunos métodos para medir la capacidad antioxidante *in vitro*.

Ensayo antioxidante	Simplicidad	Mecanismo	Tiempo requerido
ORAC (<i>oxygen radical absorbance capacity</i>)	++	HAT	++
FRAP (<i>ferric reducing antioxidant power</i>)	+++	ET	--
TEAC (<i>Trolox[®] equivalent antioxidant capacity</i>)	+	ET	-
DPPH [·]	+	HAT	+
CUPRAC (<i>cupric ion reducing antioxidant capacity</i>)	+++	HAT	+

+, ++, +++ = característica deseable a altamente deseable.

-, --, --- = característica menos deseable a altamente no deseable.

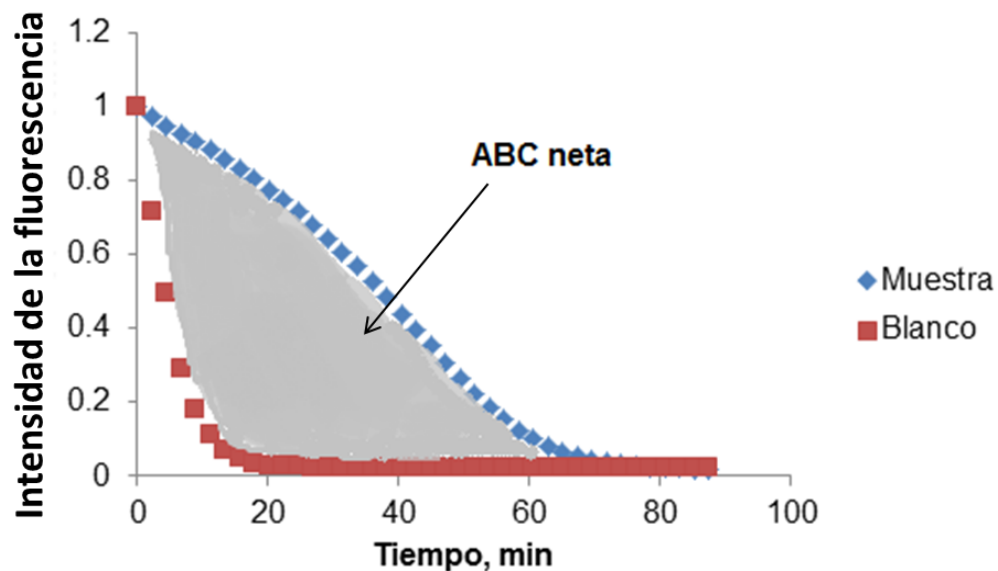
1.4.1 Capacidad de absorción de los radicales de oxígeno El método de medición de la capacidad de absorción de los radicales de oxígeno (ORAC) se basa en la inhibición de la oxidación de los radicales peroxilo, esta es iniciada por la descomposición térmica de un compuesto azo, AAPH (cloruro de 2,2'- azobis (2-amidinopropano)). La reacción de oxidación de los radicales peroxilo fue estudiada por primera vez por Glazer [33,34] y Ghiselli *et al.* [35]. Sin embargo, este ensayo no fue capaz de cuantificar los resultados y se limitó a la lectura de una sola muestra. Un subsecuente desarrollo realizado por Cao *et al.* [36], usando una

molécula fluorescente, la B- ficoeritrina (B-PE), proteína aislada de *Porphyridium cruentum*, logró disminuir algunos de estos problemas. La pérdida de fluorescencia de B-PE indicaba el daño causado por los radicales peroxilo, y, el efecto protector de un antioxidante era medido por el área bajo la curva (ABC) de la muestra comparado con el blanco, combinando el porcentaje de inhibición y el tiempo de inhibición de la acción de un radical libre con el antioxidante en una sola cantidad. El ABC (**Figura 2**) se calcula como sigue:

$$ABC = 0.5 + f_1/f_0 + \dots + f_i/f_0 + \dots + f_{34}/f_0 + 0.5 (f_{35}/f_0)$$

Donde f_0 = fluorescencia inicial medida a 0 min y f_i = fluorescencia medida a un tiempo i .

Figura 2. Curvas de decaimiento de la fluorescencia de la fluoresceína inducida por los radicales peroxilo.

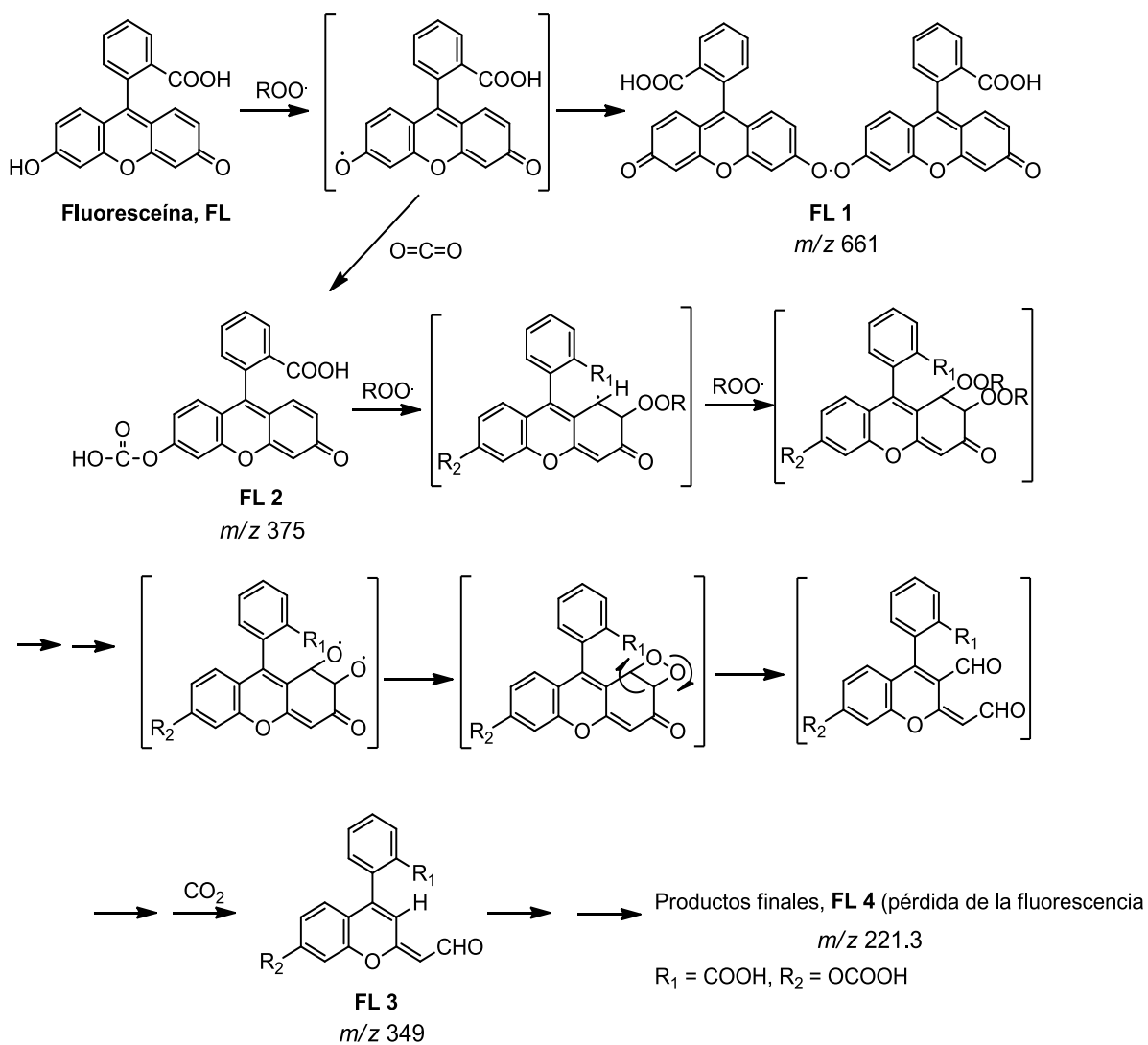


Pero, la B-PE produjo muchas inconsistencias, lo cual resultó en una variabilidad en la reacción con los radicales peroxilo, además, no es fotoestable. Esta

desventaja llevó a la búsqueda de una molécula que pudiera reemplazarla. Los autores Ou *et al.* [37] reportaron el uso de la fluoresceína 3',6'-dihidroxi-spiro (isobenzofurano-1[3H],9'[9H]-xanteno)-3-ona, como una molécula fluorescente con excelente fotoestabilidad; este método implicó bastante tiempo y trabajo. Este mecanismo de oxidación fue elucidado por los productos caracterizados por LC/MS (el modo de ionización fue modo negativo) implicando, en primer lugar, la oxidación de FL (**Figura 3**), cuando el ROO[·] sustrae un hidrógeno del grupo fenólico, para formar un radical fenóxilo estable (FLO[·]), que rápidamente puede sufrir dimerización para dar **FL 1**, con *m/z* 661. Alternativamente, el FLO[·] puede atacar trazas de CO₂, que se encuentran en la solución *buffer*, y producir **FL 2** en *m/z* 375.0. Además de sustraer un hidrógeno, el ROO[·] se puede unir a los enlaces dobles C-C para formar un radical estable, que puede reaccionar con otro radical peroxilo, formando un intermediario endoperóxido, el cual se descompone para dar el producto **FL 3** (*m/z* 349.0). Además, se encuentra el producto mayoritario de la oxidación de la FL, **FL 4** (*m/z* 221.3), que no presenta fluorescencia y es derivado de **FL 3**.

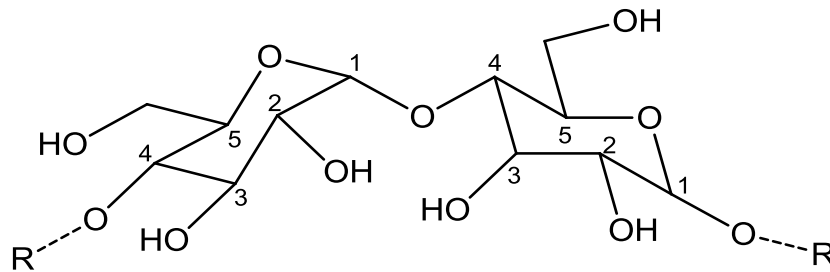
Más tarde, el método ORAC fue semiautomatizado y adaptado a un analizador COBAS FARA II, pero la completa automatización fue realizada por Huang *et al.* [38] en un lector de microplacas de 96 pozos; este ensayo fue realizado en medio acuoso, restringiendo la evaluación de la actividad antioxidante de los antioxidantes lipofílicos. Sin embargo, los estudios realizados por Huang *et al.* [39] lograron superar este obstáculo utilizando RMCD (*randomly methylated β-cyclodextrin*).

Figura 3. Mecanismo propuesto por Ou *et al.* [37] para la oxidación de la fluoresceína en presencia de los radicales peroxilo (AAPH).



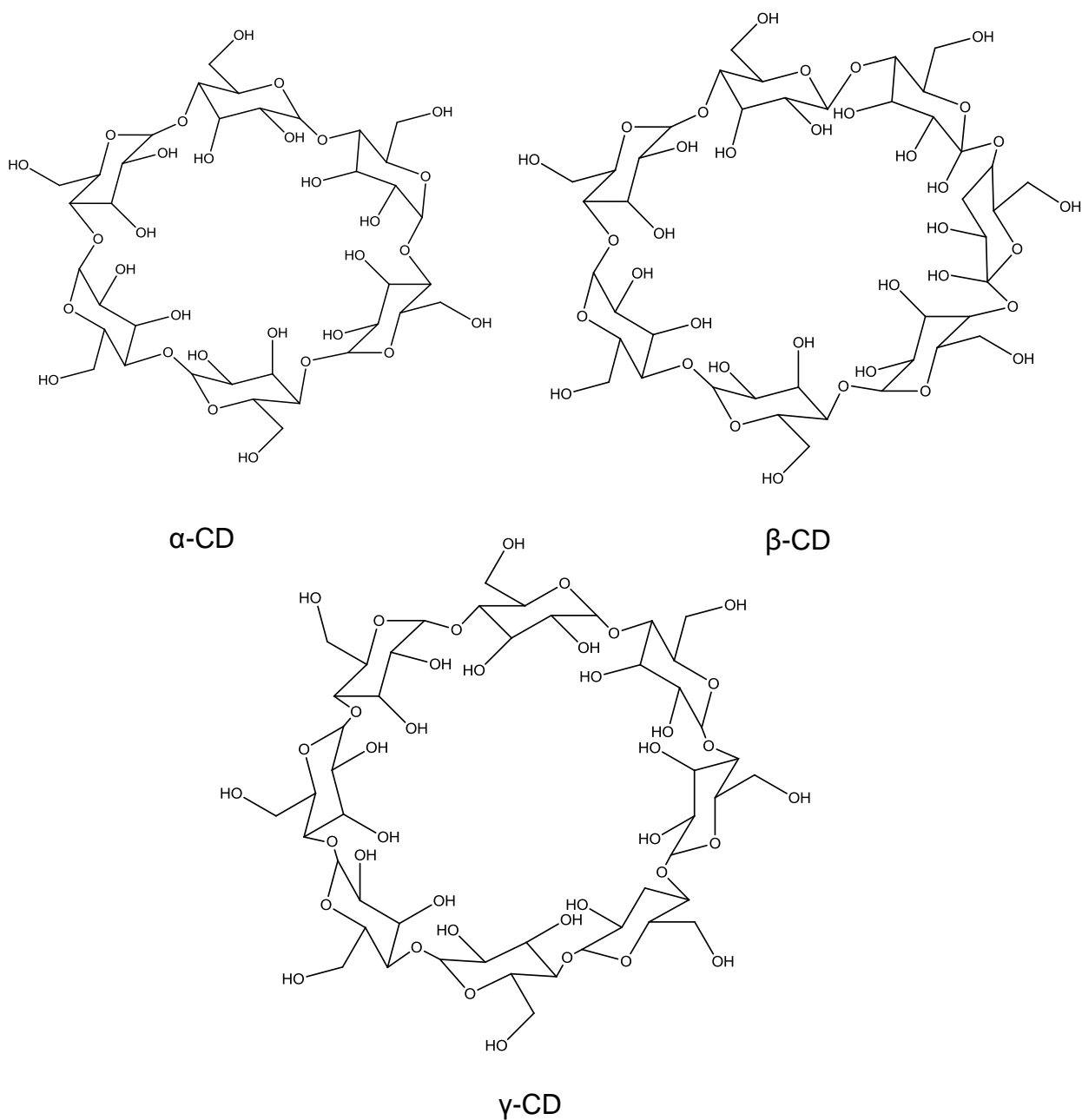
Las ciclodextrinas (CD) son oligómeros cíclicos de α -D-glucopiranososa que pueden ser producidas por la transformación del almidón por ciertas bacterias como *Bacillus macerans* [40]; estos productos cíclicos son formados por el enlace entre unidades de glucopiranososa a través de puentes de oxígeno glicosídicos α -(1,4) (Figura 4) [41].

Figura 4. Puentes de oxígeno glicosídicos por enlaces α -(1,4) entre dos moléculas de glucopiranososa.



Hay tres tipos de CD: α -CD, β -CD y γ -CD, compuestas, respectivamente, de seis, siete y ocho unidades glicosílicas unidas por enlaces α -(1,4) (**Figura 5**). El anillo, que constituye las CD, es un cilindro cónico: su cavidad está formada por puentes de hidrógeno y de oxígeno glicosídicos. También, existen muchos derivados de ciclodextrinas que pueden ser producidos por aminaciones o esterificaciones de los grupos hidroxilo primarios o secundarios. Dependiendo del sustituyente, la solubilidad de los derivados de las ciclodextrinas cambia. Estos derivados de las CD producen un cambio en el volumen de la cavidad hidrofóbica que podría mejorar su solubilidad y estabilidad contra la luz o el oxígeno [42].

Figura 5. Estructuras químicas de α -CD, β -CD y γ -CD



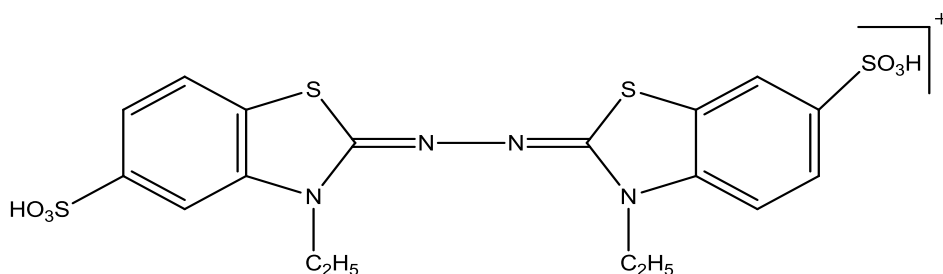
1.4.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺-El ensayo del ABTS⁺ [ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina sulfónico)] fue reportado por primera vez por Miller *et al.* [43] en 1993; este catión-radical fue formado a partir de la

incubación del ABTS con metmioglobina y peróxido de hidrógeno, y cuando se adicionaba el antioxidante antes de agregar el peróxido de hidrógeno, ocasionaba el retraso en la aparición del catión-radical ABTS^+ . Sin embargo, esta metodología tuvo inconvenientes, por posibles interferencias de los antioxidantes con el sistema de generación de radicales, llevando a una estimación de los valores de actividad antioxidante por debajo de los reales [44].

Más adelante, Re *et al.* [45] modificaron este ensayo, generando primero el cromóforo azul-verdoso ABTS^+ (**Figura 6**), a través de la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio, con máximos de absorción de 645, 734 y 815 nm. La adición de los compuestos antioxidantes al ABTS^+ conduce a su decoloración [46].

La capacidad de los antioxidantes presentes en una muestra para prevenir la oxidación del ABTS^+ se compara con la del Trolox[®], un análogo hidrosoluble de la vitamina E, y se expresa como valores TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*). El valor TEAC se define como la concentración de una solución de Trolox[®] con un potencial antioxidante equivalente a una concentración 1 mM del compuesto antioxidante bajo estudio [46].

Figura 6. Estructura química del catión-radical ABTS^+ .



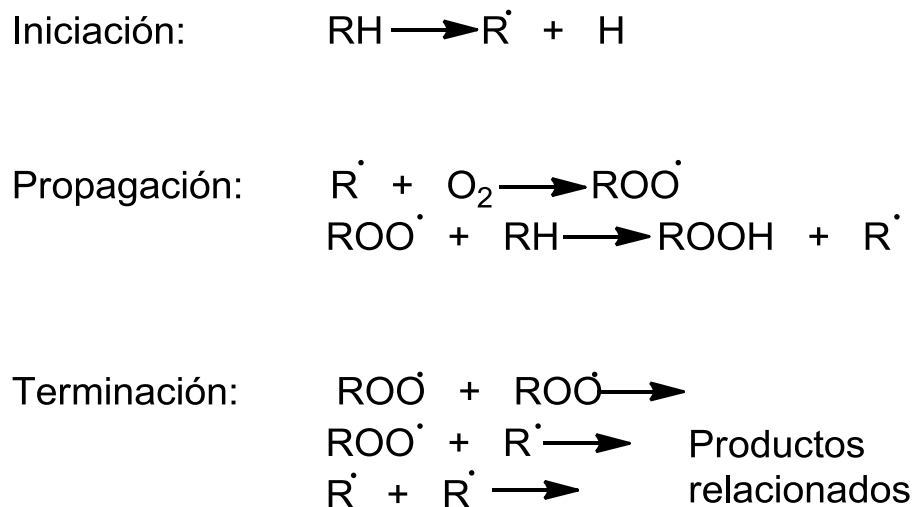
1.4.3 Peroxidación lipídica Los lípidos son compuestos que tienen varias funciones en el cuerpo, tales como fuente de energía, constituyentes en las

membranas celulares y de tejidos nerviosos. Además, algunos son ácidos grasos esenciales que se encuentran en las grasas de los alimentos [47].

Sin embargo, cuando los lípidos son oxidados, se genera su degradación. Este proceso se llama peroxidación lipídica, y es una serie de reacciones químicas que generan el deterioro de los alimentos y afectan su calidad sensorial y nutricional. Los iniciadores más comunes de este proceso son O_2^- , 1O_2 , OH^\cdot y RO^\cdot [47,48].

Se conoce que el proceso de peroxidación lipídica (**Figura 7**) transcurre a través de la producción de radicales y se lleva a cabo en varias etapas [47], a saber:

Figura 7. Etapas generales del proceso de la peroxidación lipídica.



El paso inicial es la formación de radicales, puede iniciarse por diversos factores como la irradiación, presencia de iones metálicos o especies reactivas del oxígeno. La reacción se inicia por la remoción de un hidrógeno del ácido graso, en el grupo metilénico adyacente al enlace doble. El radical generado reacciona con oxígeno molecular para formar un radical peroxilo (ROO^\cdot). El ROO^\cdot puede abstraer un H^\cdot del ácido graso insaturado para formar hidroperóxidos ($ROOH$) y una nueva especie radicalaria (R^\cdot), que también puede reaccionar con O_2 , para dar origen a

otro radical ROO \cdot , y así se propaga la reacción en cadena. Este proceso puede terminar por la reacción entre las diferentes especies radicalarias formadas [47]. Esta oxidación conduce a la formación de aldehídos y cetonas de masa molecular baja [49,50], dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos [51,52]; la determinación de estos productos se puede usar como un indicador del progreso de la peroxidación lipídica.

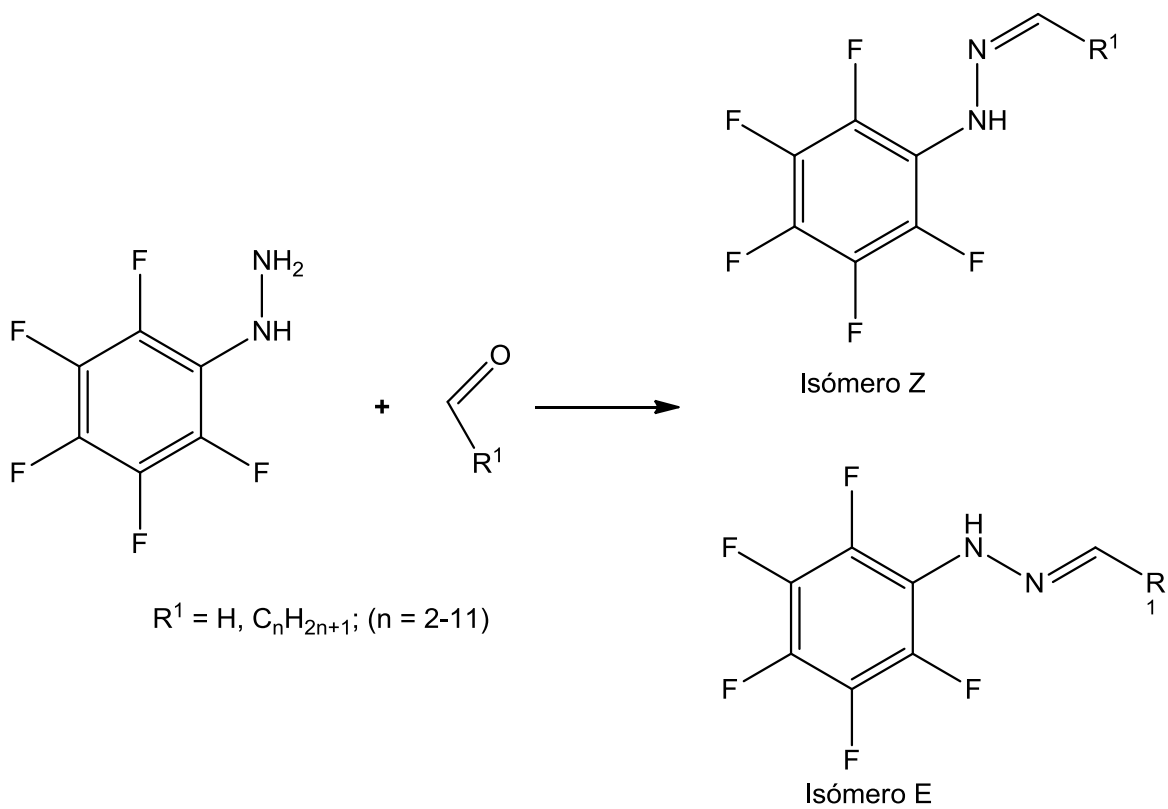
En la determinación de estos productos del proceso de peroxidación lipídica, se han utilizado una variedad de ensayos para evaluar la capacidad antioxidante. Algunos de estos ensayos se enfocan en la habilidad de una sustancia para atrapar especies radicalarias, examinando el proceso de la peroxidación lipídica en un sistema lipídico modelo, en el cual la peroxidación puede ser inducida por diferentes métodos (reacción de Fenton, radiación UV, calentamiento, etc.) en presencia o ausencia de la sustancia con propiedades antioxidantes [53].

Entre los productos finales de este proceso es el hexanal, generado a partir del ácido linoléico. Este ácido es uno de los ácidos grasos más susceptibles a la oxidación, y está presente en la mayoría de alimentos que se consumen a diario, especialmente, en la grasa de pollo y aceites de maíz, cártamo, soya, girasol, entre otros [7,54]. Sin embargo, la alta reactividad y la alta volatilidad de compuestos carbónílicos de bajo peso molecular hacen necesario derivatizar estos compuestos, para la detección de los derivados por técnicas cromatográficas o espectroscópicas [53,55].

Existen diferentes agentes derivatizantes, pero el más usado es la pentaflúorfenilhidracina, PFPH, debido a que sus derivados son más volátiles que los obtenidos con otros agentes, por ejemplo, 2,4-dinitrofenilhidracina, DNPH, y es más adecuado para el análisis por la cromatografía de gases [48,53]. Por otra parte, los derivados del PFPH poseen cinco átomos de flúor, lo que causa un aumento en la especificidad de la molécula e incrementa la respuesta en un

detector de captura de electrones (ECD) o un detector de nitrógeno-fósforo (NPD) [48,53,55] (**Figura 8**).

Figura 8. Esquema general de derivatización de aldehídos con PFPH.



2. ANTECEDENTES

Colombia es un país con una flora rica, muy diversa, aún poco estudiada; de ahí que ha sido centro de atención de diversas investigaciones, para la búsqueda de plantas con componentes activos para diversos beneficios. A nivel nacional, sólo una pequeña parte de especies vegetales ha sido estudiada a profundidad. Por lo tanto, es necesaria la permanente búsqueda de especies vegetales promisorias, que puedan contribuir al desarrollo de nuevos sectores agroindustriales en el país [1,2].

Según Srivastava *et al.* [56], la familia Verbenaceae fue por primera vez descrita por J. St. Hill en 1805; comprende aproximadamente 91 géneros y 3000 especies, distribuidas principalmente en los trópicos, subtrópicos y algunas otras zonas templadas; son plantas de interés económico, debido a que proporcionan maderas, aceites o frutos comestibles; además, son de gran valor ornamental y se emplean en jardinería, algunas de ellas, con propiedades medicinales.

Uno de los géneros pertenecientes a esta familia es *Lippia*, que incluye 381 especies de hierbas, arbustos y pequeños árboles distribuidos principalmente a lo largo de países de Suramérica, Centroamérica y África. Los usos más comunes son para enfermedades respiratorias, resfriados, gripe, bronquitis, entre otros [10].

2.1 *Lippia origanoides*

La planta de *L. origanoides* (orégano) es una especie endémica de algunos países de América Central (México, Guatemala, Cuba) y norte de América del Sur, especialmente, en la región de Amazonía (Colombia, Brasil, Venezuela, Guyana)

[57]. En Colombia, se encuentra como un arbusto muy ramificado, con hojas ovadas y el ápice redondeado, de 3.5 a 5 cm de largo y 1.5 a 2.5 cm de ancho, posee inflorescencias axiales de colores blancos y muy aromáticas (**Figura 9**) [58,59]. A esta especie, en Colombia, también se le conoce como orégano cimarrón, orégano, orégano ancho, orégano de cerro (Guajira, Cauca, Norte de Santander y Magdalena), y en otros países, como Salva-de Marajó y orégano (Norte de Brasil y México) [57,59]. Existen al menos tres quimiotipos de *L. organoides*, dos de los cuales tienen como componentes mayoritarios, timol y carvacrol; el otro quimiotipo se caracteriza por la presencia de felandrenos en alta concentración [60].

Esta planta presenta un especial interés debido a las diferentes propiedades que posee. En Venezuela, la decocción de *L. organoides* H.B.K. es usada para estimular el apetito [10]. Entre sus propiedades, se encuentran: antimicrobiana [57], antígenotóxica [62] y antioxidante [63, 64]; además, esta planta alivia los dolores estomacales e indigestiones [10]. Por otra parte, el AE ha demostrado tener repelencia contra el *Tribolium castaneum* [61] y en las células Vero [63]; además, inhibe el desarrollo de promastigotes de *Leishmania chagasi*, y es efectivo contra *Candida parapsilosis* y *E. coli*. [63].

Figura 9. Planta de *Lippia organoides*. Fuente: Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



Celis C. [63] y Muñoz *et al.* [64] estudiaron la actividad antioxidante de varias especies vegetales aromáticas cultivadas en Bucaramanga, y encontraron, que el AE de *L. origanoides* tenía una actividad antioxidante cercana o superior a la de los antioxidantes sintéticos, y es una posible fuente promisoría de antioxidantes de tipo fenólico, timol y carvacrol.

Estudios realizados en Alto Patía (Nariño) demuestran que los AE del orégano silvestre (*L. origanoides*) tienen una alta actividad antioxidante por el ensayo ABTS⁺ en comparación con la de otros AE provenientes del género *Lippia*, cultivadas en otros departamentos de Colombia, y además su actividad fue similar a la de los antioxidantes sintéticos BHA y BHT [65].

2.2 *Lippia alba*

L. alba (pronto alivio) es nativa de América, crece en México, Sur América y el Caribe, en laderas, a la orilla de caminos y riveras de los ríos. Es un arbusto aromático de 1 hasta 2 m de alto, sus ramas son largas y densamente puberulentas (**Figura 10**) [63,66,67]. En Colombia, se le conoce popularmente como pronto alivio, alivia dolor, curayá, chiva, maíz tostado, orégano calentano (Antioquia, Cesar, Meta, Chocó, Norte de Santander, respectivamente) [59]. Con base en la composición y el posible camino biosintético, existen al menos siete quimiotipos de *L. alba* [67]. Según los compuestos mayoritarios en sus aceites, estos son: quimiotipo I (citral, linalol, *trans*- β -cariofileno), quimiotipo II (tagenona), quimiotipo III (limoneno con una cantidad variables de carvona), quimiotipo IV (mirceno), quimiotipo V (γ -terpineno), quimiotipo VI (alcanfor, 1,8-cineol) y quimiotipo VII (estragol) [67]. En Colombia, están los quimiotipos I y III, y una forma combinada (I/III) también ha sido encontrada [68].

L. alba es probablemente una de las especies más estudiadas en el género *Lippia*, entre sus propiedades, se encuentran antiséptica, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, entre otras [67].

Figura 10. Planta de *Lippia alba*. Fuente: Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



Puertas *et al.* [69] y Celis, C. [63] analizaron la actividad antioxidante de los AE obtenidos por hidrodestilación; estos mostraron capacidad antiradicalaria relativamente baja contra el catión-radical ABTS⁺ y el DPPH[·]. Celis, C. concluyó que dicha actividad es causada principalmente por el contenido de nerol, geraniol y citral, este último en menor proporción. Por otro lado, en el distrito de Rajshahi (Bangladesh) la ciudad de Natore [70] Ara y Nur estudiaron los extractos metanólicos de *L. alba* provenientes de la ciudad de Natore, y encontraron que son efectivos en atrapar el radical DPPH[·], en comparación con el ácido ascórbico.

2.3 *Lippia micromera*

Es una planta nativa presumiblemente del Norte de Sur América (Colombia, Venezuela, Guayana), del Caribe (Cuba, Puerto Rico) y de Nicaragua. Es un

arbusto aromático de hasta 2 m de alto, es muy ramificado y sus hojas son angulares. Las hojas frescas se utilizan como condimento para la carne, sopa, razón por la cual la gente la cultiva en sus hogares [71]. Popularmente, se conoce como orégano u orégano de castilla, y se usa para diferentes enfermedades gastrointestinales, respiratorias y diuréticas (**Figura 11**) [72].

Figura 11. Planta de *Lippia micromera*. Fuente: Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



Los AE obtenidos a partir de esta planta han mostrado diferentes tipos de actividades, entre ellos, la citotoxicidad contra la *Artemia franciscana* [73] y la actividad antimicrobiana alta en los hongos y cepas de levadura [72]. Muñoz *et al.* [64,74] evaluaron la actividad antioxidante de los AE de *L. micromera*, que presentaron capacidad antioxidante más baja, que las sustancias de referencia, BHA y α -tocoferol.

2.4 *Lippia citriodora*

L. citriodora o *Aloysia citriodora* Palau (*L. triphylla* H.B.K., *Aloysia triphylla*, entre otros sinónimos) es un arbusto de hasta 3 m de altura, muy aromático, es muy

ramificado, y desprovisto de pelos (**Figura 12**). Crece desde Chile hasta Uruguay, Bolivia, Paraguay y sur de Brasil, y en el centro y noroeste de la Argentina [75]. En Colombia, se le conoce como cidrón, cedrón, luisa, yerbaluisa, luisa de Chile y alegría [59].

Figura 12. Planta de *Lippia citriodora*. Fuente: Fotografía tomada por Cala, M. en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 10 de julio de 2009.



En el año 2007, Argyropoulou *et al.* [76] demostraron que la composición química del AE obtenido de las hojas de *L. citriodora* cambiaba de acuerdo con la etapa de desarrollo, lo que se refleja en los porcentajes de los componentes principales (citral y limoneno). Diferentes compuestos aislados e identificados de esta planta han demostrado varias propiedades como analgésica (acteosida), antinociceptiva (artemítina y hesperidina) y espasmolítica [77-79].

Estudios previos de *L. citriodora* se enfocaron en la composición química, y revelaron la presencia de varios flavonoides en extractos [80-83]. Valentão *et al.* [84] y Pereira *et al.* [85] estudiaron la actividad antioxidante de infusiones y extractos supercríticos y encontraron su alto valor y el potencial como una fuente de antioxidantes naturales.

2.5 *Lippia graveolens*

L. graveolens conocida como orégano mexicano u orégano de monte, es un arbusto delgado de 2 m de alto, la planta es nativa del sur de Texas hasta Nicaragua [66]. Es una planta medicinal aromática utilizada en los países tropicales de América Central y del Sur para enfermedades gastrointestinales y respiratorias, entre otras (**Figura 13**) [86].

Los AE de *L. graveolens* tienen como componentes mayoritarios el timol y carvacrol [87]. Arana *et al.* [88] estudiaron el proceso de microencapsulación de los AE usando β -ciclodextrina como un proceso alternativo para proteger a los AE de la luz, aire y humedad; que pueden ocasionar oxidación o volatilización de los mismos; la microencapsulación aumentó en todos los casos evaluados la actividad antioxidante, lo que significó que se puede usar menor cantidad de aceite para obtener la misma actividad antiradicalaria.

Figura 13. Planta de *Lippia graveolens*. Fuente: Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



Martínez *et al.* [89] demostraron la actividad acaricida alta de los aceites esenciales de *L. graveolens*, que produjo una alta mortalidad (90-100%) contra el *Rhipicephalus microplus*. Otros estudios demuestran que en los extractos metanólicos de esta especie, se encuentran más de 20 flavonoides e iroides [90, 91].

Estudios realizados por González *et al.* [92], Avilla *et al.* [93] y Martínez *et al.* [94] confirman la actividad antioxidante de las fracciones polares obtenidas a partir de diferentes partes de la planta, que se atribuye a la presencia de diversos compuestos como flavonol, kaempferol, naringenina, ácido rosmarínico, entre otros.

2.6 *Lippia americana*

En diferentes departamentos de Colombia, esta planta se conoce con diferentes nombres comunes, entre ellos se encuentran: yuco, velita, varita de lazo (Santander, Atlántico, Bolívar, respectivamente) [59]. Es una planta que se encuentra distribuida en América Central y del Sur [10] (**Figura 14**).

Stashenko *et al.* [95] reportaron que en los extractos de *L. americana* obtenidos con CO₂ supercrítico no se encuentran ninguno de los 11 antioxidantes patrón evaluados (ácidos caféico, carnósico, ursólico, *p*-cumárico y rosmarínico, quercetina, naringenina, luteolina, kaempferol, apigenina y pinocembrina). Por otra parte, los AE están compuestos, en su gran mayoría, por sabineno, *trans*- β -cariofileno y germacreno D.

Figura 14. Planta de *Lippia americana*. Fuente: Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



3. CIENCIOMETRÍA

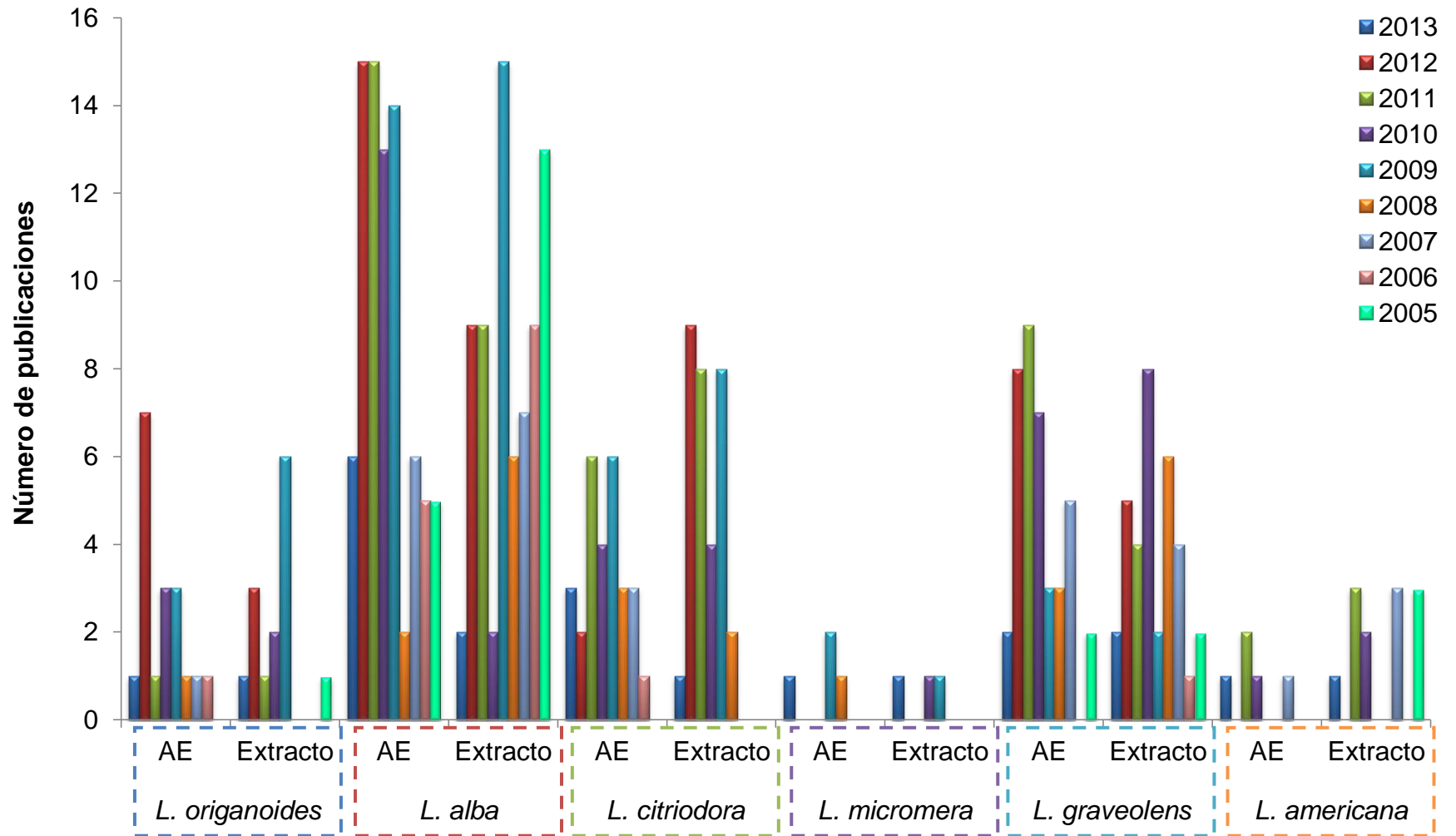
La bibliometría es una herramienta que permite situar a un país, una institución, una área temática o un individuo en el contexto mundial de la producción científica; permite analizar, comparar y cuantificar la actividad científica (publicaciones, patentes) en función del tiempo, usando diferentes herramientas, entre ellas, exploradores de *internet*, bases de datos y patentes, que ayudan en el proceso de organización de la información [96,97].

La gran diversidad que tiene Colombia va acompañada de una gran variedad química, es decir, los diferentes tipos de metabolitos secundarios que se pueden encontrar en diferentes especies de un mismo género. Estas sustancias son de gran interés en varias temáticas, a saber: química, biología, bioquímica, medicina, entre otras [1,2].

Unas de estas especies son del género *Lippia*. Con el fin de examinar las investigaciones recientes sobre las diferentes especies del género *Lippia* y su actividad antioxidante, se efectuó un estudio bibliométrico de la producción científica usando como base de datos *Scopus (Elsevier)*.

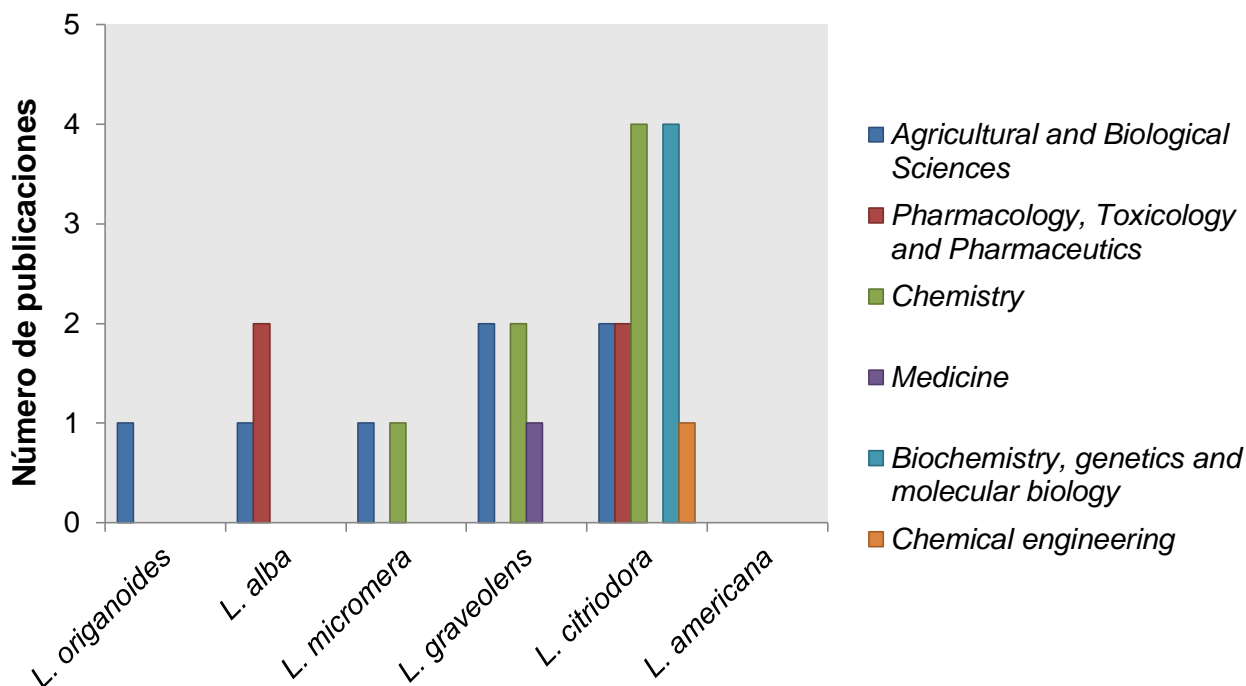
A partir de estas plantas aromáticas se han obtenido diferentes fracciones como: aceites esenciales y extractos, en donde el mayor número de publicaciones son sobre *L. alba* (153 publicaciones), seguido de *L. graveolens* (73 publicaciones), estas investigaciones han ido en aumento en los últimos cuatro años; la mayoría de artículos científicos se relacionan con el estudio de metabolitos secundarios y actividades antibacteriana, antitumoral, repelente, antiinflamatoria, entre otras, que poseen estas fracciones. Por otra parte, pocas publicaciones se han realizado con respecto a *L. micromera* y *L. americana*.

Figura 15. El número de publicaciones (2005-2013, *Scopus, Elsevier*) sobre los aceites esenciales y extractos de seis plantas del género *Lippia*. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 2005-2013. Fecha de consulta: 6 de mayo de 2013. Ecuaciones de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (ESSENTIAL OIL AND LIPPIA SPP.)) y (TITLE-ABS-KEY (EXTRACT AND LIPPIA SPP.)).



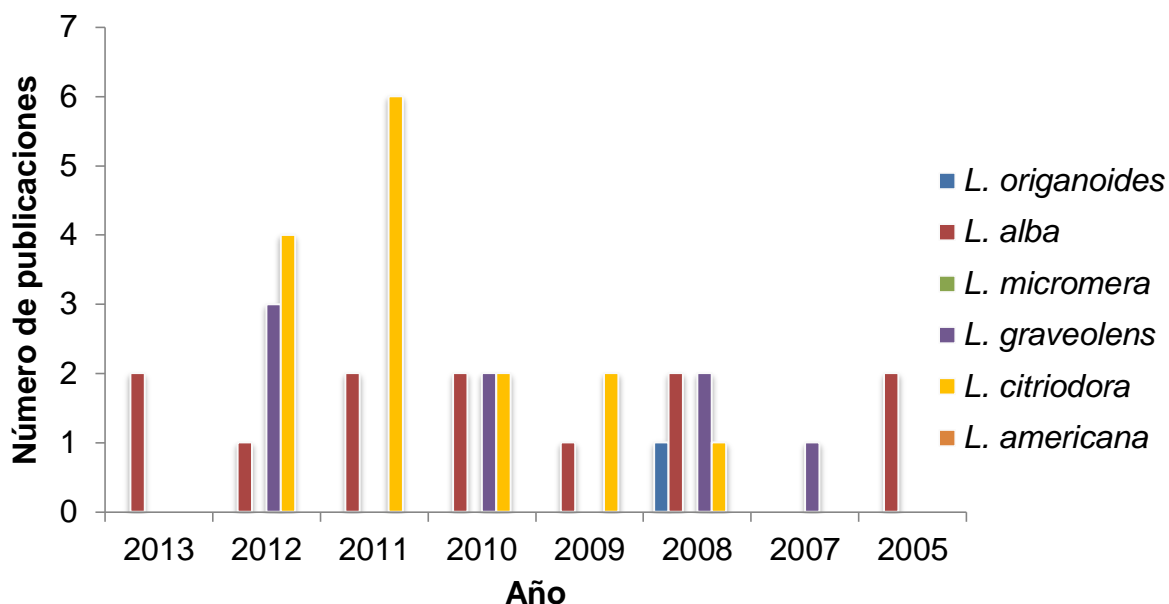
Entre los metabolitos de mayor interés figuran los compuestos fenólicos; como se puede observar en la **Figura 16**, en donde la mayoría de investigaciones de estos compuestos en las plantas del género *Lippia*, son publicadas en áreas como *Agricultural and Biological Sciences* y *Chemistry*. La mayoría de publicaciones están relacionadas con la caracterización química por diferentes técnicas analíticas (LC-DAD, GC-MS y GC-FID) y su actividad antioxidante (DPPH', sistema de ácido linoleico/ β -caroteno, ORAC, radicales hidroxilo y superóxido). Cabe resaltar, que hasta la fecha, no se encontraron, publicaciones sobre la existencia de estos compuestos en *L. americana*.

Figura 16. Relación entre áreas de conocimiento y el número de publicaciones sobre los compuestos fenólicos en las diferentes especies de *Lippia spp.* Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 2005-2013. Fecha de consulta: 6 de mayo de 2013. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (PHENOLIC COMPOUNDS AND LIPPIA SPP).



En la **Figura 17**, se puede observar que a partir del año 2011, se presenta un gran aumento de publicaciones sobre la búsqueda de antioxidantes de las especies de *Lippia spp.* Los diversos estudios sobre la actividad antioxidante en esta especie se han realizado usando varios ensayos, a saber: catión-radical ABTS⁺, radical DPPH, peroxidación lipídica (sistema modelo: ácido linoleico), entre otros. La mayoría de estas investigaciones se han realizado en *L. graveolens*, *L. citriodora* y *L. alba*; no se registran en esta base de datos los estudios en *L. micromera* y *L. americana*.

Figura 17. Relación entre los años y el número de publicaciones sobre la actividad antioxidante de diferentes especies de *Lippia spp.* Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 2005-2013. Fecha de consulta: 6 de mayo de 2013. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (ANTIOXIDANTS AND LIPPIA SPP)).



Esta actividad antioxidante siempre se ha comparado con los antioxidantes sintéticos como BHT, BHA; los cuales son los más usados en diferentes áreas de la industria; sin embargo, estos compuestos han demostrado algunos efectos adversos sobre animales de experimentación (Veáse **Sección 1.3.1.**).

Diversas investigaciones [63-65,69,70,74] sobre la actividad antiradicalaria de algunos aceites esenciales o extractos provenientes del género *Lippia*, han demostrado que estos pueden superar la actividad antioxidante de los compuestos sintéticos, siendo de esta manera, una fuente promisoría de antioxidantes.

4. METODOLOGÍA

4.1 MATERIALES Y REACTIVOS

4.1.1 Reactivos, materiales y equipos. Los reactivos, materiales y equipos, utilizados en esta investigación, se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Reactivos, materiales y equipos usados.

NOMBRE	ESPECIFICACIONES
Reactivos y solventes	
Metanol	Pureza: 99.8%; <i>Mallinckrodt Baker Inc.</i> (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU.).
Etanol	Pureza: 99.8%; <i>Mallinckrodt Baker Inc.</i> (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU.).
Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
α-Tocoferol	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Hidroxitolueno butilado (BHT)	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Timol	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Carvacrol	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Ácido ferúlico	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
1,8-Cineol	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Borneol	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Limoneno	Pureza: 96%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
<i>trans</i> -β-Cariofileno	Pureza: 98.5%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Tabla 8. Continuación.	
ABTS	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
AAPH	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Persulfato de potasio (PDS)	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
α-Felandreno	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
<i>p</i> -Cimeno	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
γ-Terpineno	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Quercetina	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).

NOMBRE	ESPECIFICACIONES
Carvona	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Citral	Pureza: 95%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Linalol	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Pentaflúorfenilhidracina (PFPH)	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Fluoresceína	<i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, EE.UU.).
K ₂ HPO ₄	Pureza: 99.1%; (J.T. Baker, Phillisburg, NJ, EE. UU.)
CH ₃ COONa	Pureza: 99.995%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Pinocembrina	Pureza: 97%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Naringenina	Pureza: 95%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Apigenina	Pureza: 95%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Na ₂ SO ₄ anhidro	Pureza: 99.1%; (J.T. Baker, Phillisburg, NJ, EE. UU.)
Material de laboratorio	
Balones aforados	2, 5, 25, 100 mL; Scott (Texas, EE. UU.).
Vasos de precipitado	50, 100, 250 mL; Scott (Texas, EE. UU.).
Micropipetas	2-20, 25-250, 100-1000 µL; Brand (Wertheim, Alemania).
<i>Transferpette</i> multicanal	10-200 µL; -8/-12 <i>Electronic</i> Brand (Wertheim, Alemania)
Filtros de membrana	Filtros de membrana PVDF de 0.45 µm de <i>Millipore</i> (Sao Paulo, Brasil).
Microplacas	Transparentes y negras de poli(estireno) de 96 pozos <i>ThermoFisher Scientific</i> (Massachusetts, EE.UU.)
Equipos de laboratorio	
Balanza analítica	<i>Mettler Toledo</i> AL204, (Nänicon, Suiza).
pH-metro	MPC227 de <i>Mettler Toledo</i> (Schwezenbach, Suiza).
Ultrasonido	<i>Elmasonic</i> E30H (Elma, Alemania).
<i>MS2 Minishaker</i>	<i>IKA</i> (Wilmington, EE. UU.).
Lector de microplacas	<i>Turner Biosystems Inc.</i> , <i>ModulusTM II Microplate Multimode Reader</i> (Sunnyvale, CA, EE. UU.)
Centrífuga	<i>Compac II Centrifuge</i> , <i>Clay Adams</i> (Sparks, M.D. EE.UU.).
Plancha de calentamiento	<i>RC Velp Scientifica</i> (Usmate, Italy)

4.2 MATERIAL VEGETAL

Las especies estudiadas, *L. origanoides* (quimiotipos Timol, Carvacrol y Felandreno), *L. alba* (quimiotipos Citral y Carvona), *L. citriodora*, *L. micromera* y *L. americana*, se cosecharon (hojas, tallos y flores) en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander, a 960 m.s.n.m (Bucaramanga, Colombia). Parte del material vegetal recolectado se utilizó en fresco; la parte restante, se colocó a secar (Véase **Sección 4.2.1**). La identificación taxonómica de las especies estudiadas, se realizó en el Herbario Nacional Colombiano de Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias (Universidad Nacional de Colombia, Bogotá).

4.2.1 Secado de material vegetal El material vegetal se colocó en un picador/triturador forrajero TRF 300 (Metalúrgica TRAPP Ltda, Jaraguá do Sul, Brasil) acondicionado con un tamiz de 12 mm; luego de la trituración, se colocó en bandejas y se llevó al vivero (**Figura 18**).

4.3 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

4.3.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas Los AE del material vegetal picado (hojas y tallos) de las plantas estudiadas se obtuvieron (ca. 200 g) por hidrodestilación, en un equipo *Clevenger*, con reservorio de destilación *Dean-Stark*, adaptado a un sistema de calentamiento por radiación de microondas; se usó un horno doméstico *Samsung*, modelo AMW0113M, con una potencia de salida de 1200 W y una frecuencia de radiación de 2.5 GHz. Al balón de destilación (2 L), se adicionó agua destilada (300 mL). El tiempo total de extracción fue de 45 min, dividido en tres turnos, cada uno de 15 min, un tiempo

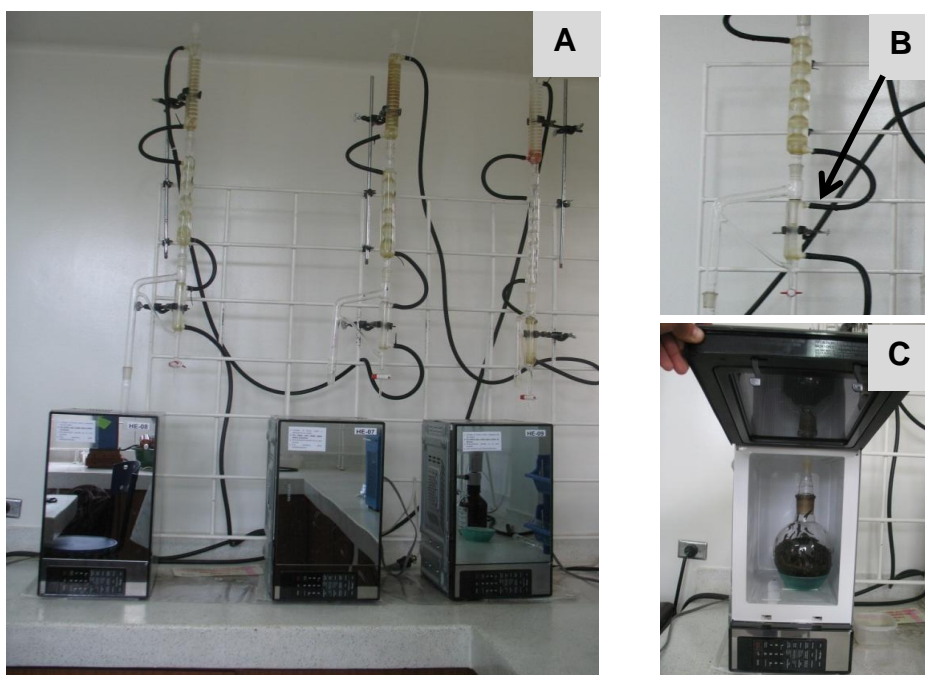
de reposo de 2 min, entre cada intervalo. La potencia del horno (600 W) se fijó en 50% de la potencia total del equipo (**Figura 19**) [98].

Los AE obtenidos se secaron con Na_2SO_4 anhidro (J.T. Baker, Phillisburg, NJ, EE. UU.), para evitar su daño por humedad y para preparar las muestras para el análisis cromatográfico. Los AE obtenidos se pesaron en una balanza *METTLER-TOLEDO* AL204 (Nänicon, Suiza), los pesos se promediaron, y el rendimiento de los AE se calculó con base en el peso inicial del material vegetal utilizado.

Figura 18. Secado de material vegetal de las seis especies de *Lippia spp.* Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Vivero, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



Figura 19. Montaje para hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. **A.** Montaje para hidrodestilación. **B.** Reservorio de destilación *Dean-Stark* y **C.** Horno doméstico *Samsung*. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Antonie Lavoiser, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



4.3.2 Extracción con fluido supercrítico Las extracciones con fluido supercrítico (SFE, por sus siglas en inglés) se realizaron en un equipo *Thar SFE-2000-2-FMC50* (*Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE. UU.*) (**Figura 20**), equipado con un portamuestra en acero inoxidable con capacidad para $2 \times 10^{-3} \text{m}^3$; un sistema de separación y colección de los extractos tipo ciclón, con capacidad de $5 \times 10^{-4} \text{m}^3$; regulador automático de presión; bombas de alta presión P-200A (*Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE. UU.*), para el CO_2 y P-50 (*Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.*), para el modificador y un medidor de flujo *Sitrans FC Massflo tipo MASS 6000* (*Siemens AG, Berlín, Alemania*). El control de las temperaturas, flujos y presiones, se efectuó desde un computador, mediante el *Software Process Suite Thar* (*Thar Technologies, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.*).

Figura 20. Equipo *Thar SFE-2000-2-FMC50* empleado para obtener los extractos de las seis especies de *Lippia spp.* Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Daniel Bernoulli, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



En la **Tabla 9**, se presentan las condiciones de extracción empleadas para conseguir los extractos de las plantas bajo estudio [86].

Tabla 9. Condiciones experimentales usadas para obtener los extractos SFE.

CONDICIONES DE EXTRACCIÓN	
Material vegetal	500 g
Presión	50 MPa
Temperatura	333 K
Flujo	40 g/min
Tiempo de extracción, estático	20 min
Tiempo de extracción, dinámico	100 min

4.3.3 Extracción con solvente Para la extracción con solventes (SE, por sus siglas en inglés) se siguió la metodología descrita por Hertog *et al.* [99], con algunas modificaciones. Los extractos se prepararon de la siguiente manera: al material vegetal (0.5 g), previamente secado y picado, se le adicionó de una solución (40 mL) de etanol al 62.5% (**Figura 21**). Posteriormente, la mezcla se colocó en ultrasonido durante 15 min; luego se filtró y el material vegetal se sometió a dos extracciones más. Las tres porciones obtenidas se mezclaron y la mezcla se rotoevaporó a 50 °C, a presión reducida. Posteriormente, el extracto se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno (99.995%, Linde, Bogotá, Colombia) y, finalmente, se pesó en una balanza *METTLER-TOLEDO* AL204 (Nánicon, Suiza).

Figura 21. Montaje para la realización de la extracción con solventes. **A.** Ultrasonido y **B.** Material vegetal seco utilizado para realizar la extracción. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de fichas técnicas y vivero, CENIVAM, UIS-Bucaramaga, el 27 de abril de 2013.



4.3.4 Preparación de las muestras para el análisis cromatográfico y la evaluación de la capacidad antirradicalaria Los AE se disolvieron en diferentes solventes, a saber: metanol, etanol o diclorometano, dependiendo del tipo de análisis: antioxidantes (TEAC, ORAC) o cromatográfico (GC-MS, GC-FID, LC-DAD).

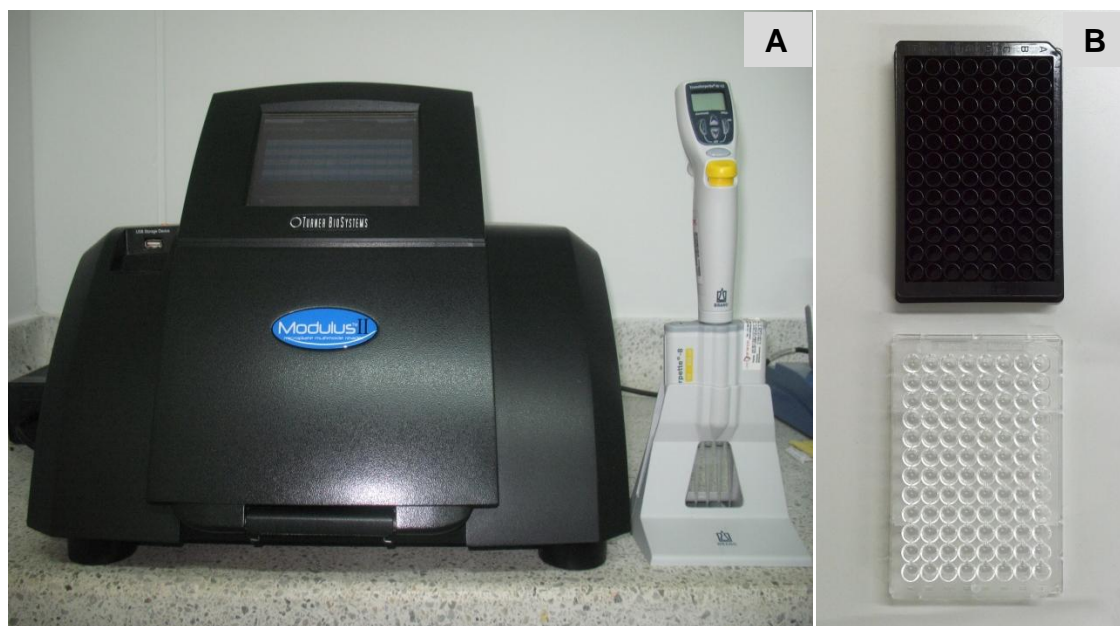
De los extractos obtenidos con solventes y CO₂ supercrítico, se pesaron 10 mg en una balanza *METTLER-TOLEDO AL204* (Nánicon, Suiza). Posteriormente, se adicionó el solvente (1 mL) y la mezcla se sometió a sonicación (frecuencia de 35 kHz) durante 30 min, en un equipo *Elmasonic E30H* (Elma, Alemania), con agitación orbital a 2500 rpm, por 1 min en un *MS2 Minishaker IKA* (Wilmington, NC, EE. UU.); y luego se sometieron a la centrifugación (3600 rpm) durante 15 min, en una centrifuga *Compact II Centrifuge, Clay Adams* (Sparks, M.D. EE.UU.). Finalmente, se tomaron alícuotas del sobrenadante para los respectivos análisis.

4.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Las mediciones de la capacidad antioxidantes se realizaron siguiendo cuatro metodologías, *i.e.*, capacidad de absorción de los radicales de oxígeno para antioxidantes lipofílicos (ORAC-L) e hidrofílicos (ORAC-H), el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺ y el monitorio de la peroxidación lipídica. La determinación de la capacidad antirradicalaria de los AE, extractos obtenidos con solventes y CO₂ supercrítico y sustancias de referencia, se efectuó en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., ModulusTM II Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, CA, EE. UU.), provisto con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos, equipado con módulos de absorbancia (UV-Vis) y un módulo de fluorescencia con filtros, que manejan longitudes de onda de 490 nm de excitación y 510-570 nm de emisión (**Figura 22**). Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar.

El llenado de las microplacas se realizó con una *Transferrpette*[®] -8/-12 *Electronic* (Brand, Alemania). Todas las soluciones de AAPH, RMCD, catión-radical ABTS⁺, fluoresceína, entre otros, y las muestras (AE y extractos) se almacenaron en nevera (4 °C), en ausencia de luz.

Figura 22. Lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., ModulusTM II Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, CA, EE. UU.) **A.** Lector de microplacas y *Transferrpette*[®] -8/-12 y **B.** Microplacas de poli (estireno) de 96 pozos. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio fichas técnicas, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



4.4.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺. El procedimiento se realizó según lo descrito por Arias, G. [100]. Se preparó una solución del catión-radical ABTS⁺, mezclando el persulfato de potasio (2.45 mM) con una solución de ABTS (7 mM). Esta se homogeneizó y se sometió a sonicación por 30 min, y se dejó reaccionar por 24 h a 4 °C, en ausencia de luz. Una vez formado el catión-radical ABTS⁺, diariamente, se preparaban soluciones trabajo de absorbancia 0.710 ± 0.003 .

La solución de trabajo se adicionaba a las diferentes concentraciones de los extractos y los AE o sustancias de referencia, hasta que resultara en una inhibición entre el 10 y 80% del blanco de absorbancia. El porcentaje de inhibición de los extractos, AE y sustancias de referencia se calculó, según la **Ecuación 1**.

$$\text{Inhibición de } A_{\lambda=750} (\%) = [1 - A_f / A_o] \times 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde:

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

A_o : Absorbancia del blanco de reacción (catión-radical sin inhibir).

La capacidad antioxidante se determinó mediante la disminución en la coloración azul-verdosa del catión-radical ABTS⁺, que, al reaccionar con el posible antioxidante (AH), genera el ABTS incoloro [101], de la siguiente manera:



Los valores de la capacidad antioxidante de las muestras se expresaron como $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ muestra, teniendo en cuenta la curva de calibración del Trolox[®].

4.4.2 Capacidad de absorción del radical de oxígeno-hidrofílico Este procedimiento se realizó de acuerdo con metodología de Arias, G. [100] y Huang *et al.* [39]. Se adicionó fluoresceína (FL) a las diluciones en la microplaca, se agitó e incubó a 37 °C, por 15 minutos. Después de transcurrido este tiempo se adicionó rápidamente la solución de AAPH, y, se registró la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína, en función del tiempo. Como estándar de control en las mediciones se utilizó Trolox[®] y se cuantificó, usando la curva de calibración.

La respuesta a la capacidad antioxidante de las muestras fue el área bajo la curva (ABC) (**Ecuación 2**), con respecto a la curva del blanco, la cual es directamente

proporcional al valor ORAC expresado en $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g de muestra. Los datos fueron analizados con un programa macro de Microsoft Excel, elaborado en el CENIVAM. El valor ABC se calculó como sigue:

$$\mathbf{ABC = 0.5 + f_1 / f_0 + \dots + f_i / f_0 + \dots + f_{34} / f_0 + 0.5 (f_{35} / f_0)} \quad \mathbf{Ecuación 2}$$

Donde:

f₀ : Fluorescencia inicial medida a un tiempo de 0 min.

f_i : Fluorescencia medida a un tiempo i.

4.4.3 Capacidad de absorción del radical de oxígeno-lipofílico Para el ensayo de la capacidad de absorción del radical de oxígeno para antioxidantes lipofílicos (ORAC-L), se preparó una solución de β -ciclodextrina metilada (RMCD) al 7% en una mezcla acetona/agua (1/1, v/v). A partir de esta solución, se disolvieron todas las muestras evaluadas, hasta obtener una concentración apropiada que se encontrara dentro del rango de la curva de calibración del Trolox[®]. La solución de RMCD se usó como blanco y para disolver el Trolox[®].

La muestra se mezcló con la fluoresceína, posteriormente, una solución de AAPH se adicionó a la mezcla y rápidamente la microplaca se incubó por 20 min, y se procedió a realizar la respectiva lectura. Las medidas se tomaron a 37 °C. El cálculo del valor ABC se determinó mediante la **Ecuación 2**, y, el valor ORAC se expresó como $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g de muestra.

4.4.4 Análisis de ácidos grasos El análisis de los ácidos grasos (FA) del aceite de girasol, se realizó mediante la obtención de sus ésteres metílicos, según las Normas ISO 5509 y 5508, *Animal and Vegetables Fats and Oil- Analysis by GC of Methyl Esters of Fatty Acids*, de la siguiente manera:

Se tomó aceite de girasol (100 mg), se adicionó complejo de trifluoro de boro al 14% en metanol (5 mL). La mezcla, con agitación, se sumergió en un baño de aceite a 85-90 °C por 45 min, tiempo establecido en experimentos previos, realizados en el Laboratorio de Cromatografía. Posteriormente, la muestra se retiró del baño de aceite y se dejó reposar durante 5 min. Finalmente, se realizó la extracción de los FA, en forma de sus ésteres metílicos (FAME) con *n*-hexano (3 x 1 mL). A una fracción del extracto orgánico (0.5 mL), se adicionó *n*-tetradecano (0.5 µL), la mezcla se aforó a 1.0 mL, con el mismo solvente. La solución final se analizó por el GC-FID.

La identificación de los FA en el aceite de girasol, se realizó por comparación de los t_R de sus ésteres metílicos, con los de las mezclas certificadas de FAME GLC10, GLC50, GLC70, GLC80 y GLC100, adquiridas de Matreya, *Inc.* (Pennsylvania, EE. UU.). Los patrones se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas, que la muestra de aceite de girasol. La identificación de los FA adicionalmente se confirmó con base en sus espectros de masas.

4.4.5 Peroxidación lipídica Este método se realizó según la metodología de Stashenko *et al.* [53,55], con algunas modificaciones. Se midió el efecto protector de los AE, extractos y sustancias de referencia contra el deterioro oxidativo de una matriz sometida a calentamiento, rica en ácido linoléico (aceite de girasol).

El aceite de girasol (2 g) se colocó en un recipiente ambar de 4.5 mL, y se puso a calentar a 110 ± 5 °C, por 120 min. Mientras tanto, la fibra de SPME (PDMS/DVB, 65 µm) se saturó con PFPH (0.1 mmol/L), a temperatura ambiente, durante 40 min. Después del calentamiento de la muestra, la fibra de SPME se expuso por 5 min al espacio de cabeza de la muestra.

Las hidrazonas formadas directamente en la fibra de SPME se desorbieron por inserción directa de la fibra de SPME en el puerto de inyección (250 °C, 10 min) de

un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de captura de electrones (Véase **Sección 4.8**). Para el blanco, se realizó el mismo procedimiento, sin adicionar los aceites o extractos. El grado de protección se determinó con base en la cantidad de hexanal (derivado de PFPH) producido.

El efecto protector se calculó, según la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de protección, \%} = \left[\frac{A B - A M}{A B} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

A B : Área del pico cromatográfico del hexanal en el sistema lipídico sin antioxidante.

A M : Área del pico del hexanal en el sistema lipídico con antioxidante.

4.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

4.5.1 Análisis por GC-MS La separación e identificación de los metabolitos secundarios se realizó 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* (**Figura 23**). La separación de los compuestos se llevó a cabo en dos columnas capilares, una con la fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, df, y la otra, con f.e. polar de poli(etilenglicol) (DB-WAX, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, df. Se empleó helio (99.995%, gas AP, Linde, Bogotá, Colombia) como gas de arrastre en el análisis cromatográfico, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y una velocidad volumétrica de flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector fue de 250 °C, modo de inyección

split (30:1) y un volumen de inyección de 2 µL. La temperatura del horno durante la corrida cromatográfica se programó de 45 a 150 °C, a una velocidad de 4 °C/min, luego, se calentó hasta 250 °C a 5 °C/min, donde se mantuvo 5 min; finalmente, la temperatura se subió hasta 275 °C, a una velocidad de 10 °C/min. La velocidad lineal media del gas fue de 26 cm/s. La temperatura de la fuente de ionización se mantuvo a 230 °C, mientras que la del cuadrupolo, a 150 °C. Los iones-fragmento en los espectros de masas se obtuvieron por impacto con electrones de energía (EI) de 70 eV, en un rango de masas entre 45 y 450 uma, con una velocidad de barrido de radiofrecuencia de 3,58 *scan/s*.

Para la identificación de los compuestos, se emplearon los índices de retención lineales (IRL), que se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de patrones de *n*-parafinas C₁₀-C₂₅, analizados bajo las mismas condiciones operacionales que las muestras, según la siguiente ecuación.

$$\text{IRL} = 100 \times n + 100 \left[\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

n y **N**: Número de átomos de carbonos de los *n*-alcanos que eluyen antes (*n*) y después (*N*) del compuesto de interés.

t_{RX} : Tiempo de retención del compuesto de interés.

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

Además, se compararon los espectros de masas experimentales con los de las bases de datos disponibles (*Adams*, *NIST* y *Wiley*). Se empleó los *software* *MSDCHEMSTATION* de *Agilent Technologies G1701DA*.

Figura 23. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Series GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863 Series*. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación analítica, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



4.5.2 Análisis por GC-FID La cuantificación de los compuestos presentes en las diferentes fracciones aisladas se llevó a cabo por el método de calibración externa. Se realizaron curvas de calibración, usando material de referencia certificado, de los componentes mayoritarios de los AE y SFE en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N* (*Agilent*, Palo Alto, California, EE. UU.), acoplado a un detector de ionización en llama (FID) (**Figura 24**). La separación de los compuestos se efectuó en una columna capilar con f.e. apolar 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μ m, d_f. Se empleó helio (99.995%, gas AP, Linde, Bogotá, Colombia) como gas de arrastre en el análisis cromatográfico, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y una velocidad volumétrica de flujo de 1 mL/min.

La temperatura del inyector fue de 250 °C, modo de inyección *split* (30:1) y un volumen de inyección de 1 µL. La temperatura del horno del cromatógrafo se cambió de 45 a 275 °C, siguiendo la misma programación usada para el análisis por GC-MS. La temperatura del detector fue de 280 °C. Los flujos de los gases se mantuvieron así: aire, 300 mL/min (99.005%, zero AP, Linde, Colombia); hidrógeno, 30 mL/min (99.995%, gas AP, Linde, Bogotá, Colombia) y nitrógeno, 30 mL/min (99.995%, gas AP, Linde, Bogotá, Colombia).

Figura 24. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Series GC System*, acoplado a un detector de ionización en llama (FID), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863B Series*. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación analítica, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



4.5.3 Análisis por HPLC-DAD El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo *Agilent Technologies 1200*, equipado con un bomba cuaternaria *Agilent Technologies G1354A*, un inyector automático *Agilent Technologies Series 1200 G1328B* y un detector UV-Vis de arreglo de diodos *G1315B*, y una columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 µm) (**Figura 25**). El

procesamiento de los datos se realizó usando el *software Agilent Technologies Chemstation B.0.03 SR1*.

Figura 25. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies 1200 Series*. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación analítica, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 27 de abril de 2013.



La identificación de algunos antioxidantes en los extractos obtenidos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención (t_R) y los espectros UV-Vis, con las sustancias de referencia certificadas, e.g., pinocembrina, naringenina, apigenina, entre otras. La cuantificación se realizó por el método del estándar externo, por medio de curvas de calibración (áreas vs. concentración). Con base en la curva, se calcularon las concentraciones de los metabolitos secundarios en los extractos obtenidos con solvente y CO₂ supercrítico, de las especies bajo estudio.

4.5.4 Análisis por GC-ECD El análisis del derivado del hexanal con PFPH se realizó en un cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 6890 *Plus* (**Figura 26**), acoplado a un detector de captura de electrones (ECD, ⁶³Ni, 280 °C), equipado con puerto de inyección *split/splitless* (se inyectó en modo *split* 1:10). Se empleó una columna HP-5 de 30 m x 0.25 mm D.I. x 0.33 μm, d_f, 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) (HP-5, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.). Se

utilizó helio como gas de arrastre (99.995%, gas AP, Linde, Bogotá, Colombia), con flujo volumétrico de 1 mL/min y como gas auxiliar argón/metano (9:1). La temperatura del puerto de inyección fue 250 °C. La temperatura del horno durante la corrida cromatográfica se programó de la siguiente manera: desde 100 °C (5 min) hasta 250 °C (2 min), a 10 °C/min.

Figura 26. Cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard HP 6890 Plus*, acoplado a un detector de captura de electrones (ECD), equipado con un puerto de inyección *split/splitless*. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación analítica, CENIVAM, UIS, el 27 de abril de 2013.



5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL ENSAYO ORAC PARA ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS. FIGURAS ANÁLITICAS DE MÉRITO.

El método fue validado empleando como sustancias de referencia el Trolox[®] y el α -tocoferol.

5.1.1 Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método Los errores en los valores de la pendiente y el corte en el eje (**Ecuación 5**) y, se expresaron como las desviaciones estándar de la pendiente (**Ecuación 6**) e intercepto (

Ecuación 7) [102, 103], como sigue:

$$S_{y/x} = \frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n - 2}^{0.5} \quad \text{Ecuación 5.}$$

$$S_a = \frac{S_{y/x}}{\left(\sum_i (X_i - \bar{X})^2 \right)^{0.5}} \quad \text{Ecuación 6.}$$

$$S_b = S_{y/x} \frac{\sum_i X_i^2}{n \sum_i (X_i - \bar{X})^2}^{0.5} \quad \text{Ecuación 7.}$$

Los valores de S_a y S_b fueron utilizados para estimar los límites de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen; por lo tanto, la pendiente tuvo límites de $b \pm tS_b$ y la ordenada de $a \pm tS_a$. Donde t , se utilizó con un nivel de confianza del 95% y $(n-2)$ grados de libertad.

La evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método, se realizó con base en la curva de calibración del Trolox[®], en el rango de 8-120 µM de Trolox[®]. En la **Tabla 10**, se muestran los resultados obtenidos, en donde se observó una buena linealidad (coeficiente de determinación $R^2 = 0.998$). La desviación estándar de la pendiente de la curva de calibración para el ensayo ORAC-L para antioxidantes lipofílicos fue de 0.03 (límite de confianza del 95%), lo cual muestra la precisión alta de la curva. Por lo tanto, el método ORAC para antioxidantes lipofílicos fue aplicable para un rango de concentraciones evaluado. Los errores en los valores de la pendiente y el intercepto, fueron reportados con un límite de confianza del 95%.

Tabla 10. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método ORAC para antioxidantes lipofílicos, empleando la curva de calibración del Trolox[®].

R^2	PENDIENTE, INTERCEPTO,		S_a	$a \pm tS_a$	S_b	$b \pm tS_b$
	a	b				
0.9997	0.19	4.12	0.01	0.19 ± 0.032	0.02	4.12 ± 0.041
Ecuación: $Y (ABC) = aX (\mu M) + b$						

5.1.2 Determinación de los niveles mínimos de detección y cuantificación

Para la determinación del nivel mínimo de detección (NMD) (**Ecuación 8**) y el nivel mínimo de cuantificación (NMC) (**Ecuación 9**) [102, 103], se empleó la curva de calibración realizada en la **sección 0**, usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{NMD} = \frac{(K S_B)}{a} \quad \text{Ecuación 8.}$$

Donde,

K: 3

a : Pendiente de la curva de calibración

S_B : Desviación estándar del blanco

$$NMC = \frac{(K S_B)}{a}$$

Ecuación 9.

Donde,

K: 10

Por lo tanto, los valores de NMD y NMC fueron 2.37 y 7.88 μM Trolox[®], respectivamente.

5.1.3 Evaluación de la precisión Para expresar el grado de concordancia entre los resultados de las réplicas, se determinó la repetibilidad y reproducibilidad, expresadas en términos del coeficiente de variación (**Ecuación 10**).

$$CV, \% = \frac{s}{X} \times 100$$

Ecuación 10.

Donde:

X: Promedio de las mediciones

s : Desviación estándar de las mediciones

Según la **Tabla 11**, la realización de varias réplicas, bajo las mismas condiciones, demostró un coeficiente de variación menor que el 2%, lo que manifiesta una precisión y repetibilidad del método alta, de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio [104], que establecen un valor máximo permisible del 10% para este parámetro.

Tabla 11. Repetibilidad de los valores de ABC de soluciones de Trolox[®] (50 μM).

	ABC NETA					
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	ENTRE DÍAS
X	12.9	12.4	12.6	12.5	12.61	12.60
s	0.24	0.21	0.22	0.20	0.022	0.20
CV, %	1.87	1.69	1.75	1.59	0.18	1.62

En la **Tabla 12**, se presentan los resultados de los valores ORAC realizados por dos analistas en dos días diferentes, obteniéndose coeficientes de variación menores del 3%, que son los valores aceptables, según las guías de validación de métodos analíticos.

Tabla 12. Reproducibilidad de los valores ORAC del α -tocoferol.

ANALISTA	VALOR ORAC			X	s	CV, %
	(μmol Trolox®/ mmol α -Tocoferol)					
A	680.77	662.01	652.28	660	14	2.18
B	671.97	687.37	672.69	677	9	1.28

5.1.4 Evaluación de la exactitud Para la determinación de la exactitud (**Ecuación 11**), se tomó como valor verdadero, el valor ABC (6.07) del α -tocoferol a 25 μ M, reportado por Huang *et al.* [39]; encontrándose en este estudio un valor de ABC neta de 6.53, demostrando que la concentración medida está dentro del 7% del ABC real del compuesto.

$$\text{Exactitud} = 1 - \frac{V_f - V_d}{V_f} \times 100 \quad \text{Ecuación 11.}$$

Donde:

V_f : Promedio de las mediciones

V_f : Desviación estándar de las mediciones

El valor de exactitud encontrado en este estudio fue 107%, el cual expresa una tendencia positiva del 7%, es decir, que la concentración determinada está dentro del 7% de la concentración real del analito.

5.2 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA EL ENSAYO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

En esta investigación, se realizó un experimento factorial 2^2 más estrella con tres réplicas en el centro para determinar cuáles factores (temperatura de calentamiento y tiempo de exposición) tenían incidencia significativa sobre la producción del derivado del hexanal [105]. En la **Tabla 13**, se muestran los factores del diseño para evaluar la cantidad de hidrazona generada durante la peroxidación lipídica del aceite de girasol.

Tabla 13. Factores y niveles evaluados en el diseño factorial 2^2 más estrella.

Factor	Niveles		Unidad
	+	-	
Temperatura, T	25	220	°C
Tiempo de exposición, t	60	120	min

El análisis de varianza ANOVA permitió evaluar estadísticamente las variables que tuvieron incidencia significativa, a saber: tiempo de exposición y temperatura de calentamiento sobre la cantidad de hidrazona producida. Se usó el *software Statgraphics Centurion XV* versión 15.2.05. La **Tabla 14** muestra los resultados del análisis de varianza obtenido con el *software*.

Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta del diseño experimental realizado.

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón-F	Valor-P
A:TEMPERATURA	0.12996	1	0.12996	2.08	0.2091
B:Tiempo	0.139016	1	0.139016	2.22	0.1963
AA	5.36421	1	5.36421	85.73	0.0002
AB	0.0000994331	1	0.0000994331	0.00	0.9697
BB	0.0789589	1	0.0789589	1.26	0.3123
Error total	0.312844	5	0.0625688		

El valor crítico del parámetro F para 1 y 5 grados de libertad con un nivel de probabilidad $P = 0.05$, fue de 6.61. Tal como se observa en la **Tabla 14**, se concluye que solamente el factor de temperatura al cuadrado tuvo una incidencia significativa en la cantidad de hidrazona producida.

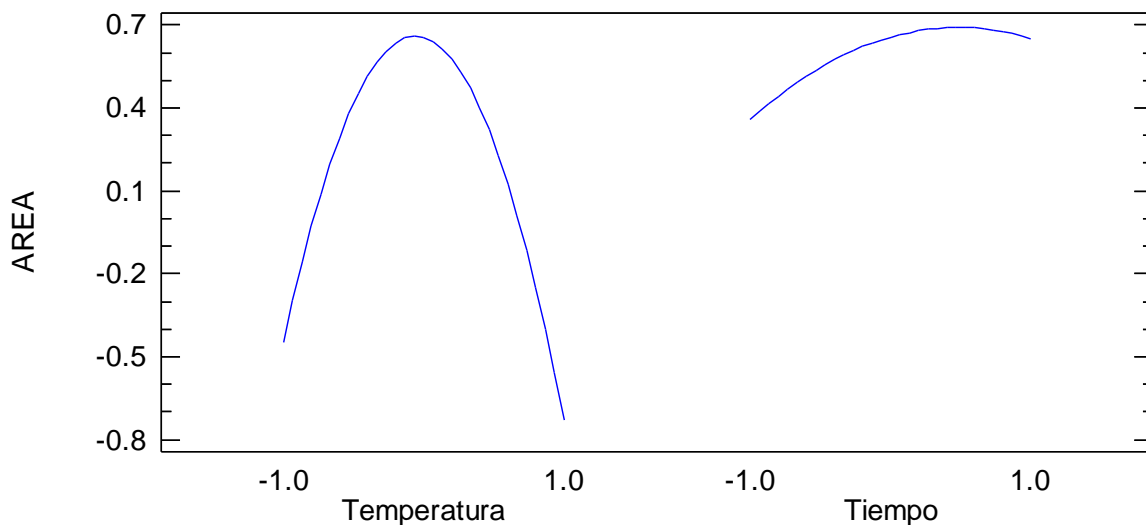
La ecuación del modelo ajustado es (**Ecuación 12**):

$$\text{ÁREA} = 0.05654 - 0.14 * T - 1.24389 * T^2 \quad \text{Ecuación 12}$$

La ecuación presenta el mejor valor de R^2 estadístico ajustado y corresponde al 0.9119, siendo este un valor aceptable de regresión para los datos.

De la **Figura 27**, se puede afirmar, que cuando el tiempo se encuentra en su nivel alto y la temperatura en su nivel intermedio, se produce cantidad más alta de la hidrazona del hexanal.

Figura 27. Gráfica de efectos principales.



El efecto de la temperatura sugiere que, al aumentar la temperatura del nivel bajo al nivel alto, se encuentra un punto óptimo de producción del derivado del hexanal.

Con respecto al tiempo, el aumento de esta variable favorece la generación de este derivado.

Según el diseño de experimento, que modela el comportamiento del área de la hidrazona, se observa que el mejor tratamiento se obtiene cuando hay un mayor tiempo de exposición de la fibra a la fase vapor de la matriz lipídica y su temperatura está en un nivel intermedio, es decir, a 110 °C.

Haciendo el análisis de superficie de respuesta con el *software Statgraphics*, se encontró un óptimo de temperatura (110 °C) y tiempo (120 min), que pueden seguir siendo usados para el ensayo de peroxidación lipídica.

5.3 RENDIMIENTOS DE LOS ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS OBTENIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LAS SEIS ESPECIES DE *Lippia spp.*

Las plantas de *L. organoides* (quimiotipos Timol, Carvacrol y Felandreno), *L. alba* (quimiotipos Citral y Carvona), *L. americana*, *L. graveolens*, *L. micromera* y *L. citriodora*, utilizadas en esta investigación, se recolectaron en las parcelas experimentales cultivadas en el CENIVAM. La identificación taxonómica de las plantas se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) (Tabla 15).

Tabla 15. Identificación taxonómica de las seis especies de *Lippia spp.* empleados en esta investigación.

Especie	Familia	Nº COL*
<i>L. organoides</i> (quimiotipo Timol)	Verbenaceae	519799
<i>L. organoides</i> (quimiotipo Carvacrol)	Verbenaceae	512075
<i>L. organoides</i> (quimiotipo Felandreno)	Verbenaceae	519798
<i>L. alba</i> (quimiotipo Citral)	Verbenaceae	512077
<i>L. alba</i> (quimiotipo Carvona)	Verbenaceae	512078
<i>L. micromera</i>	Verbenaceae	516924
<i>L. citriodora</i>	Verbenaceae	517189
<i>L. graveolens</i>	Verbenaceae	555839
<i>L. americana</i>	Verbenaceae	516287

* La identificación taxonómica fue realizada por el Dr. José Luis Fernández.

Los rendimientos de los AE se encontraron dividiendo el peso del AE obtenido sobre el peso inicial de material vegetal usado. En la **Tabla 16**, se presentan los porcentajes de rendimientos de los AE obtenidos por MWHD. Los valores calculados fueron el promedio de tres mediciones.

Tabla 16. Porcentajes de rendimiento de los AE obtenidos por hidrodestilación de las plantas del género *Lippia* (hojas, tallos y flores), bajo estudio.

Especie	Rendimiento, % ($\pm s$, n=3)
<i>L. organoides</i> (quimiotipo Timol)	1.84 \pm 0.023
<i>L. organoides</i> (quimiotipo Carvacrol)	2.4 \pm 0.15
<i>L. organoides</i> (quimiotipo Felandreno)	1.132 \pm 0.0071
<i>L. alba</i> (quimiotipo Citral)	0.41 \pm 0.012
<i>L. alba</i> (quimiotipo Carvona)	0.46 \pm 0.015
<i>L. graveolens</i>	1.77 \pm 0.092
<i>L. americana</i>	0.016 \pm 0.0013
<i>L. micromera</i>	0.71 \pm 0.037
<i>L. citriodora</i>	0.047 \pm 0.0044

Los AE, que presentaron el mayor rendimiento, fueron obtenidos de las plantas de *L. organoides* (quimiotipos Timol y Carvacrol) (1.84-2.40%); seguidas de las

plantas de *L. graveolens*, *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno) y *L. micromera* (1.77, 1.13 y 0.71%, respectivamente).

Los rendimientos de *L. origanoides* encontrados en esta investigación, fueron muy similares a los obtenidos por Ruíz, C. [58] y Escobar *et al.* [107] en Bucaramanga, Santander (Colombia); además, fueron más altos que los rendimientos logrados en los trabajos de Oliveira *et al.* [57] en Brasil. Sin embargo, el rendimiento más alto fue de ca. 3.3%, encontrado en Alto Patía (límites de los departamentos del Cauca y Nariño), en donde los autores Arango *et al.* [106] reportaron la influencia de algunos factores sobre el rendimiento del AE, entre ellos: el sitio de recolección, época de recolección y edad de la hoja, y concluyeron que la zona de origen y la edad de las hojas (hojas maduras) tenían un efecto significativo sobre el rendimiento del AE.

Los rendimientos de los AE obtenidos de *L. alba* (0.4-0.5%) fueron muy parecidos a los obtenidos en otras investigaciones realizadas en Colombia y Brasil [107,108]. Pero, en Santander (Colombia), Escobar *et al.* [107] reportaron un rendimiento hasta del 1.0% para esta misma especie, y Stashenko *et al.* [109] concluyeron que el rendimiento obtenido por el método MWHD fue el más ventajoso en cuanto al tiempo de extracción (30 min, 0.7%), en comparación con la hidrodestilación convencional (2 horas, 0.69%), mientras que, la composición del AE se mantuvo prácticamente sin variación (**Tabla 17**).

El rendimiento del AE de *L. micromera* recolectado en Venezuela (0.65%) fue similar al encontrado en esta investigación ($0.71 \pm 0.037\%$) [72]. Sin embargo, el AE obtenido a partir de solo hojas de *L. micromera*, cultivada en Bucaramanga, tuvo un rendimiento alto (1.6 %) [64] en comparación con el estudiado en Venezuela (**Tabla 17**).

El rendimiento del AE ($1.77 \pm 0.092\%$) de *L. graveolens* fue diferente a los obtenidos de plantas cultivadas en otros países (El Salvador y México). El valor alto del rendimiento (4-4.3%), obtenido por Castillo *et al.* [110] en México, corresponde a la hidrodestilación fraccionada, que permitió aumentar el rendimiento del AE y el contenido de fenoles en él.

El rendimiento bajo del AE de *L. citriodora* ($0.047 \pm 0.0044\%$) fue muy similar al obtenido por Escobar *et al.* [107], de plantas recolectadas en diferentes departamentos de Colombia, *i.e.*, Antioquia (Rionegro) y Quindío (Armenia) (**Tabla 17**).

No se encontraron reportes, con respecto al rendimiento del AE de *L. americana* (**Tabla 17**).

Las diferencias de rendimientos encontrados en plantas cultivadas en diferentes países o departamentos, se deben a las variaciones en las condiciones ecológicas a las que están sometidas las plantas, tal como reportaron Sangwan *et al.* [111], quienes propusieron que las diferencias en la producción de los AE se deben a varios factores, entre ellos: la composición del suelo, temperatura, humedad, clima, nivel de fertilización y época de cosecha, entre otros.

Tabla 17. Porcentajes de rendimiento de diferentes plantas del genero *Lippia* provenientes de diferentes lugares.

Especie	Lugar de recolección del material vegetal	Rendimiento, %	Ref.
<i>L. organoides</i>	Cordón Panamericano del Alto Patía, municipio de Taminango, en límites de los departamentos de Cauca y Nariño.	3.3	65, 106
	Ciudad de Oriximiná, Pará State, Brasil.	1.0	57
	Diferentes municipios de Colombia.	1-4.4	107

Especie	Lugar de recolección del material vegetal	Rendimiento, %	Ref.
	Bucaramanga, Colombia.	0.4-2.3	58, 64
<i>L. alba</i>	Río de Janeiro, Estado de Ceará, São Paulo. Brasil.	0.2-0.6	108
	Diferentes municipios de Colombia.	0.4-1.0	107, 109
<i>L. micromera</i>	San Francisco-Tovar, Mérida. Venezuela.	0.7	72
	Cesar, Colombia.	2.0	107
	Bucaramanga, Colombia.	1.6	64
<i>L. citriodora</i>	Diferentes municipios de Colombia.	0.3-0.4	107
<i>L. graveolens</i>	Cerca al área El Sauce (Departamento la Unión), El Salvador	0.3-0.4	87
	Los estados de Coahuila, Queretaro y Jalisco, México	4.0-4.3	110

Los extractos aislados de plantas del género *Lippia*, se obtuvieron bajo las mismas condiciones establecidas por Cala M. [86], y presentaron valores de porcentajes de rendimientos que aparecen en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Rendimientos de los extractos etanólicos y extractos obtenidos por SFE-CO₂ de las seis especies de *Lippia spp.*

Especie	Rendimiento, % (*± s, n=3)	
	Extracción con CO ₂ supercrítico	Extracción con solventes*
<i>L. origanoides</i> (quimiotipo Timol)	2.1	12.1 ± 0.85
<i>L. origanoides</i> (quimiotipo Carvacrol)	2.4	19 ± 1.3
<i>L. origanoides</i> (quimiotipo Felandreno)	2.2	23 ± 1.0
<i>L. alba</i> (quimiotipo Citral)	1.6	10.4 ± 0.79
<i>L. alba</i> (quimiotipo Carvona)	0.6	5.9 ± 0.47
<i>L. graveolens</i>	3.5	11.0 ± 0.79
<i>L. americana</i>	0.7	5.0 ± 0.29
<i>L. micromera</i>	1.7	8.7 ± 0.36
<i>L. citriodora</i>	0.9	4.6 ± 0.27

Los rendimientos de los extractos con CO₂ supercrítico de los quimiotipos de *L. origanoides* estuvieron en un rango de 2.1-2.4%, y para *L. alba*, entre 0.6-1.6%. El rendimiento obtenido a partir de *L. graveolens* (3.5%) fue el más alto de las especies de *Lippia spp.* estudiadas, mientras que para *L. alba* (quimiotipo Carvona), *L. americana* y *L. citriodora* se obtuvieron los rendimientos más bajos (0.55, 0.67 y 0.87%, respectivamente). Para los extractos etanólicos de los quimiotipos de *L. origanoides*, fueron en un rango de 12.1-23%, los de *L. alba* estuvieron en el rango de 5.9-10.4%. Tal como en la extracción con CO₂, *L. alba* (quimiotipo Carvona), *L. americana* y *L. citriodora* obtuvieron los rendimientos más bajos (5.9 ± 0.47%, 5.0 ± 0.29%, 4.6 ± 0.27%, respectivamente). Entre los extractos etanólicos, *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno) alcanzó el mayor rendimiento (23 ± 1.0%).

Los rendimientos de los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico mostraron la misma tendencia a los obtenidos por Cala, M. (**Tabla 19**) para estas seis especies de *Lippia spp.* [86].

Tabla 19. Rendimientos de los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico del género *Lippia* obtenidos por Cala, M. [86].

Especie	Rendimiento, %	
	En esta investigación	Reportado por Cala, M. [86].
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo Timol	2.1	2.3
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo Carvacrol	2.4	3.4
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo Felandreno	2.2	3.1
<i>L. alba</i> , quimiotipo Citral	1.6	1.2
<i>L. alba</i> , quimiotipo Carvona	0.6	0.3
<i>L. graveolens</i>	3.5	4.3
<i>L. americana</i>	0.7	0.8
<i>L. micromera</i>	1.7	1.9
<i>L. citriodora</i>	0.9	0.3

Sin embargo, no se podría llegar a comparar directamente los rendimientos encontrados en este trabajo con los resultados reportados por otros autores, debido a que las condiciones de presión, temperatura, flujo del fluido supercrítico CO₂, entre otros, no fueron idénticas. Por primera vez, se han reportan los rendimientos de extractos etanólicos de estas especies.

5.4 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES Y LOS EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS Y ETANÓLICOS OBTENIDOS DE LAS ESPECIES DE *Lippia spp.* BAJO ESTUDIO

La identificación se realizó según los índices de retención lineales (IRL), espectros de masas (EI, 70 eV) y usando las sustancias de referencia certificadas. Cabe resaltar, que los espectros de masas obtenidos se compararon con los de las bases de datos *Adams*, *NIST* y *Wiley*, lo que permitió hacer una identificación tentativa de las sustancias presentes en las muestras. Además, se utilizaron sustancias de referencia certificadas de los compuestos mayoritarios de cada una de las muestras (**Tabla 8**).

Para la cuantificación de los componentes mayoritarios de los AE se elaboraron curvas de calibración de algunos compuestos (Véase **Anexo A**). Para ello, se preparó una solución *stock* y, a partir de ella se prepararon soluciones de diferente concentración, que se analizaron bajo los mismos parámetros operacionales cromatográficos empleados para el análisis de las muestras bajo estudio. Una vez obtenidos los datos, se realizaron las curvas de calibración (área vs concentración) para cada uno de los metabolitos secundarios usados. Finalmente, se calcularon las concentraciones de los compuestos presentes en los AE usando las curvas de calibración de las sustancias de referencia certificadas. Las concentraciones se expresaron en miligramos (mg) de compuesto por mililitro (mL) de AE (**Tabla 20**).

En total, se encontraron 89 compuestos en los nueve AE estudiados (**Tabla 21**) en cantidades relativas > 0.04%, de los cuales, se identificaron ca. 96-99%.

En la **Figura 28**, se presenta un perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles, aislados por MWHD, de hojas y tallos de *L. micromera*. En las **Tablas 2.1-2.18** del **Anexo B**, se reportan los compuestos identificados y sus cantidades relativas (%±s, n = 3). En el **Anexo E**, se encuentran los perfiles cromatográficos de las especies de *Lippia spp.* estudiadas.

Figura 28. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del AE de *L. micromera* obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

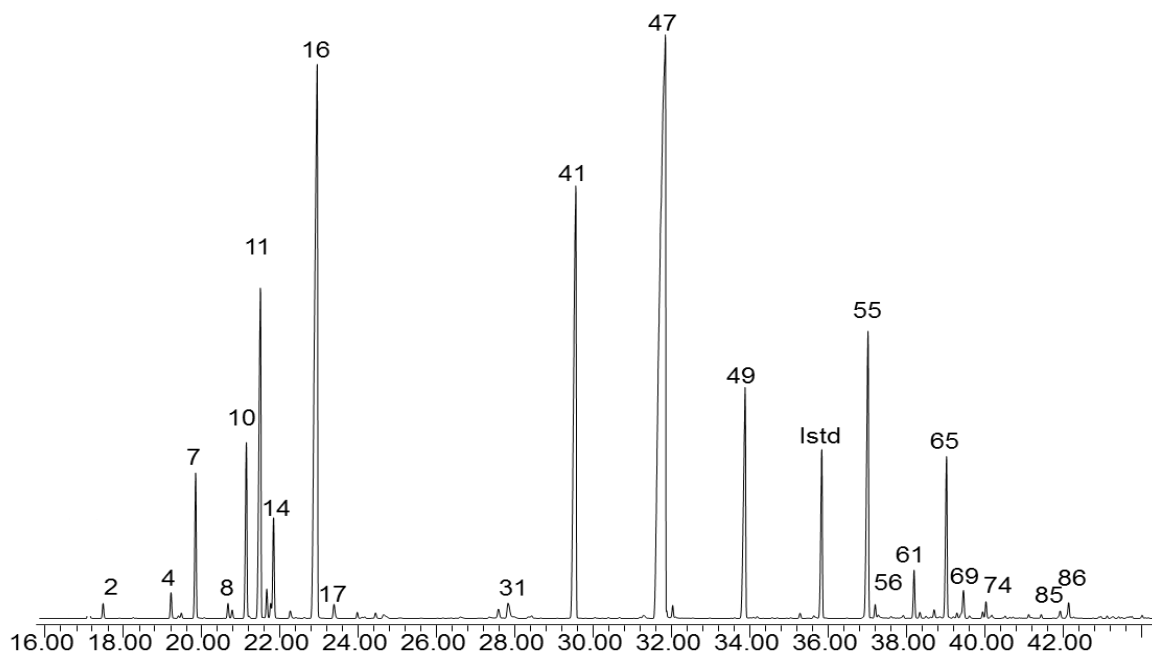


Tabla 20. Cuantificación de los compuestos mayoritarios de los AE de las especies de *Lippia spp.*

Compuesto	mg sustancia/mL AE (\pm s, n=3)								
	<i>L. organoides</i> , Timol	<i>L. organoides</i> , Carvacrol	<i>L. organoides</i> , Felandreno	<i>L. alba</i> , Citral	<i>L. alba</i> , Carvona	<i>L. graveolens</i>	<i>L. americana</i>	<i>L. micromera</i>	<i>L. citriodora</i>
1,8-Cineol	3.5 \pm 0.30	-	150 \pm 7.3	-	-	-	-	32.9 \pm 0.66	22 \pm 1.1
α -Pinoeno	3.1 \pm 0.18	3.1 \pm 0.24	37 \pm 1.8	-	-	2.2 \pm 0.11	4.5 \pm 0.24	1.7 \pm 0.14	4.8 \pm 0.38
Borneol	-	-	2.4 \pm 0.19	20 \pm 1.8	6.3 \pm 0.44	-	-	-	-
Carvacrol	33 \pm 1.3	410 \pm 3.1	-	-	-	130 \pm 10.8	-	-	-
Carvona	-	-	-	-	290 \pm 11.8	-	-	-	-
Neral	-	-	-	500 \pm 16.8	-	-	11.6 \pm 0.46	-	480 \pm 21.6
Geranial	-	-	-	486 \pm 6.1	-	-	17.4 \pm 0.62	-	440 \pm 2.3
α -Felandreno	5.1 \pm 0.28	6.4 \pm 0.49	400 \pm 14.9	-	-	5.1 \pm 0.12	-	7.7 \pm 0.29	-
Linalol	8.6 \pm 0.72	-	17 \pm 1.1	16.8 \pm 0.19	10.2 \pm 0.46	16.3 \pm 0.19	-	-	9.5 \pm 0.42
<i>p</i> -Cimeno	45.6 \pm 0.15	56 \pm 4.2	85 \pm 6.5	-	-	48 \pm 2.6	-	56 \pm 2.2	-
Timol	500 \pm 3.2	90 \pm 7.7	66 \pm 4.8	-	-	425 \pm 3.2	27 \pm 1.9	374 \pm 10.2	45 \pm 2.3
<i>trans</i> - β - Cariofileno	23 \pm 1.2	-	170 \pm 13.8	11.4 \pm 0.31	2.0 \pm 0.11	30 \pm 2.2	247 \pm 1.7	41 \pm 1.7	3.0 \pm 0.19

Tabla 21. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes presentes en los AE de las seis especies de *Lippia spp.*

No	Compuesto	IRL		<i>L. organoides</i>			<i>L. alba</i>		<i>L. americana</i>	<i>L. citriodora</i>	<i>L. graveolens</i>	<i>L. micromera</i>
		DB-5MS	DB-WAX	Timol	Carvacrol	Felandreno	Citral	Carvona				
1	α -Tujeno	931	1028	0.48	0.89	0.48	-	-	-	-	0.38	-
2	α -Pineno	937	1024	0.16	0.20	1.83	0.04	0.05	0.30	0.18	0.11	0.29
3	Canfeno	955	1069	-	-	0.33	-	0.13	-	-	-	-
4	Sabineno	975	1124	-	-	1.01	-	-	5.32	0.28	-	0.40
5	1-Octen-3-ol	979	1452	0.13	-	-	0.22	0.18	-	-	0.22	-
6	β -Pineno	983	1112	0.04	-	0.50	-	-	-	-	-	0.08
7	β -Mirceno	993	1166	2.09	2.68	1.45	-	0.44	-	0.12	1.94	2.27
8	α -Felandreno	1011	1171	0.11	0.17	14.11	-	0.05	0.08	-	0.10	0.23
9	Δ^3 -Careno	1012	1153	0.08	0.12	-	-	-	-	-	0.07	0.14
10	α -Terpineno	1022	1184	0.98	1.64	0.46	-	-	-	0.05	0.86	2.83
11	<i>p</i> -Cimeno	1029	1276	4.03	7.65	7.21	0.07	-	-	0.24	4.79	6.23
12	Limoneno	1033	1204	0.22	0.28	7.58	0.39	37.85	0.19	4.57	0.20	0.42
13	β -Felandreno	1036	1213	0.06	-	-	-	-	0.18	-	-	-
14	1,8-Cineol	1040	1219	0.11	-	12.47	0.21	0.05	-	1.12	-	1.45
15	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1047	1237	0.11	0.17	0.86	0.05	0.33	0.41	1.61	0.10	0.12
16	γ -Terpineno	1065	1251	3.36	9.43	2.53	-	-	-	0.68	3.63	18.04
17	Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1073	1558	0.17	0.28	0.27	-	-	-	0.12	0.27	0.25
18	Terpinoleno	1094	1289	-	-	0.41	-	-	0.06	-	-	0.13
19	Linalol	1101	1549	0.23	0.11	0.81	0.59	0.26	-	0.27	1.13	0.06
20	Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	1104	1472	0.16	-	0.34	-	-	-	-	-	0.12

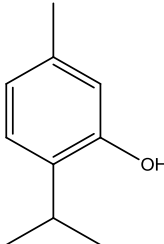
No	Compuesto	IRL		<i>L. origanoides</i>			<i>L. alba</i>		<i>L. americana</i>	<i>L. citriodora</i>	<i>L. graveolens</i>	<i>L. micromera</i>
		DB-5MS	DB-WAX	Timol	Carvacrol	Felandreno	Citral	Carvona				
21	<i>cis</i> -p-2-Mentenol	1129	1573	-	-	0.31	-	-	-	-	-	-
22	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1138	1456	-	-	-	-	0.10	-	0.05	-	-
23	<i>trans</i> -p-2-Mentenol	1147	1635	-	-	0.18	-	-	-	-	-	-
24	Citronelal	1153	1904	-	-	-	0.13	-	-	-	-	-
25	<i>cis</i> -Isocitral	1160	1576	-	-	-	-	-	-	0.83	-	-
26	<i>cis</i> -Crisantenol	1162	1439	-	-	-	0.13	-	-	-	-	-
27	Epóxido de rosefurano	1171	1608	-	-	-	0.23	-	-	0.15	-	-
28	δ-Terpineol	1177	1630	-	-	0.39	-	-	-	-	-	-
29	Borneol	1180	1713	-	0.25	0.04	1.05	0.34	-	-	0.28	-
30	<i>trans</i> -Isocitral	1181	-	-	-	-	-	-	-	0.13	-	-
31	Terpinen-4-ol	1187	1578	0.82	0.60	1.22	-	-	-	0.34	0.62	0.26
32	Umbellulona	1189	1657	0.12	-	-	-	-	-	-	-	0.19
33	α-Terpineol	1198	1706	-	-	0.93	-	-	-	0.41	-	0.07
34	<i>cis</i> -Piperitol	1204	-	-	-	0.11	-	-	-	-	-	-
35	<i>cis</i> -Sabinol	1210	1679	-	-	0.16	-	-	-	-	-	-
36	<i>cis</i> -Dihidro-carvona	1203	1517	-	-	-	-	0.08	-	-	-	-
37	<i>trans</i> -Dihidro-carvona	1211	1639	-	-	-	-	0.09	-	-	-	-
38	<i>trans</i> -Piperitol	1214	-	-	-	0.14	-	-	-	-	-	-
39	Nerol	1227	1805	-	-	-	0.05	-	-	2.61	-	-
40	<i>cis</i> -Carveol	1229	1873	-	-	-	1.75	0.23	-	-	-	-
41	Metil timil éter	1231	1600	0.85	0.80	0.03	-	-	-	-	0.57	-
42	Neral	1244	1692	-	-	-	31.35	-	0.18	24.75	-	-
43	Geraniol	1253	1854	-	-	-	8.77	-	0.59	2.59	0.30	-
44	Carvona	1259	1750	-	-	-	-	48.23	-	-	-	-
45	Piperitona	1265	1643	-	-	-	-	1.24	-	-	-	-
46	Geranial	1274	1740	-	-	-	44.74	-	1.04	34.09	-	-

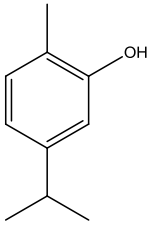
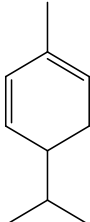
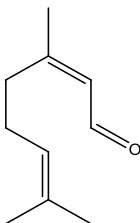
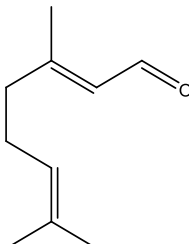
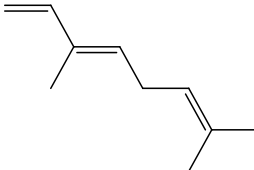
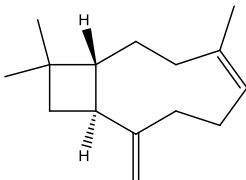
No	Compuesto	IRL		<i>L. origanoides</i>			<i>L. alba</i>		<i>L. americana</i>	<i>L. citriodora</i>	<i>L. graveolens</i>	<i>L. micromera</i>
		DB-5MS	DB-WAX	Timol	Carvacrol	Felandreno	Citral	Carvona				
47	Timol	1294	2188	76.02	12.13	4.23	-	-	1.54	-	64.59	53.55
48	Carvacrol	1303	2218	1.95	54.38	0.05	-	-	-	3.78	12.19	0.14
49	Acetato de carvacrilo	1348	-	-	0.06	-	-	-	-	-	-	-
50	Piperitenona	1349	1838	-	-	-	0.17	2.15	-	-	-	-
51	Acetato de timilo	1356	1859	-	-	-	-	-	-	-	-	3.04
52	Eugenol	1357	2074	0.61	0.41	-	-	-	-	-	0.53	-
53	α -Copaeno	1389	1505	-	-	0.09	1.69	-	0.08	0.51	-	0.08
54	β -Elemeno	1392	1604	-	-	-	-	-	4.16	-	-	-
55	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1434	1616	2.22	2.95	1.99	0.71	0.12	26.45	0.21	2.94	5.54
56	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1440	1595	0.37	0.16	-	-	0.07	-	-	0.40	0.23
57	β -Copaeno	1443	1609	-	-	16.02	-	-	0.44	-	-	-
58	Aromadendreno	1454	1624	-	-	0.81	-	-	-	-	0.11	-
59	<i>trans</i> - β -Farneseno	1457	1668	-	-	-	0.29	-	0.14	0.14	-	-
60	γ -Muroloeno	1463	1706	-	-	-	-	0.20	0.97	-	-	-
61	α -Humuleno	1470	1688	1.22	1.60	0.19	0.17	0.31	2.39	0.44	1.50	-
62	<i>allo</i> -aromadendreno	1474	1661	-	-	-	-	-	-	-	-	0.62
63	<i>ar</i> -Curcumeno	1486	1779	2.24	-	8.21	-	-	1.14	4.03	-	-
64	Biciclosesquifelandreno	1493	1632	-	-	-	0.33	-	-	-	-	-
65	Germacreno D	1495	1724	-	-	0.51	0.76	0.05	37.68	0.05	0.28	2.25
66	α -Zingibereno	1502	1710	0.18	-	1.21	-	6.82	-	0.33	0.07	-
67	Isobutanoato de geranilo	1505	1643	-	-	-	0.04	-	-	-	-	-
68	β -Selineno	1506	1738	-	-	-	-	-	0.50	-	-	-
69	Biciclogermacreno	1508	1747	-	-	-	-	-	6.73	3.95	-	0.40
70	α -Bulneseno	1512	1728	-	-	-	0.40	-	-	-	-	-
71	β -Bisaboleno	1513	1733	-	0.47	1.49	-	-	0.29	-	0.09	-

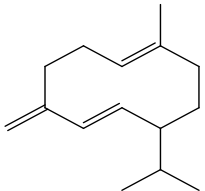
No	Compuesto	IRL		<i>L. origanoides</i>			<i>L. alba</i>		<i>L. americana</i>	<i>L. citriodora</i>	<i>L. graveolens</i>	<i>L. micromera</i>
		DB-5MS	DB-WAX	Timol	Carvacrol	Felandreno	Citral	Carvona				
72	δ-Amorfenol	1514	1669	-	-	-	-	0.22	-	-	-	-
73	γ-Cadineno	1522	1772	-	-	0.41	0.18	-	-	-	0.38	-
74	δ-Cadineno	1528	1779	-	-	0.22	-	-	1.54	-	-	-
75	<i>cis</i> -Calameneno	1533	1846	0.06	0.14	1.15	-	-	2.18	-	-	0.06
76	<i>trans</i> -γ-Bisaboleno	1536	1692	-	-	-	0.79	0.18	-	-	-	-
77	Elemol	1559	2089	-	-	0.09	-	-	-	-	-	-
78	<i>trans</i> -Nerolidol	1536	1692	-	-	-	0.18	-	-	2.39	-	-
79	<i>trans</i> -Cadin-1,4-dieno	1545	1796	-	-	-	-	-	1.93	-	-	-
80	<i>trans</i> -Nerolidol	1564	1938	-	-	-	-	-	0.22	-	-	-
81	Germacreno B	1575	1837	-	-	-	-	-	0.19	-	-	-
82	Germacreno D-4-ol	1591	2062	-	-	-	-	-	0.68	-	-	-
85	Espatulenol	1595	2138	-	-	1.15	-	-	-	3.84	-	0.05
86	Óxido de cariofileno	1602	2002	0.28	0.10	0.14	1.32	0.14	1.31	2.07	0.07	0.14
87	Guaiol	1611	2100	-	-	0.46	-	-	-	-	-	-
88	Epóxido de humuleno II	1627	1962	0.11	0.09	-	0.04	-	-	-	0.09	-
89	α-Cadinol	1652	2198	-	-	2.86	-	-	0.52	0.43	-	-

Los metabolitos secundarios más comunes encontrados en estas especies aromáticas fueron: α -pineno (0.04-1.83%), limoneno (0.19-37.85%), *trans*- β -ocimeno (0.05-1.61%), linalol (0.06-1.13%), *trans*- β -cariofileno (0.12-26.45%), α -humuleno (0.17-2.39%), óxido de cariofileno (0.07-2.07%), β -mirceno (0.12-2.68%), α -felandreno (0.08-14.11%), *p*-cimeno (0.07-7.65%) y germacreno D (0.05-37.68%). En los AE de *L. organoides*, 18 compuestos comunes se encontraron en estos tres quimiotipos; sin embargo, a pesar de que pertenecen a la misma especie, compuestos como timol, carvacrol y α -felandreno estaban en diferentes concentraciones. Por otra parte, en los quimiotipos de *L. alba* solo 13 compuestos fueron comunes en el aceite de esta planta; y compuestos como neral, geranial y carvona estuvieron en cantidades relativas del 31-48%. Otros AE también demostraron ser una fuente importante de metabolitos secundarios, a saber: *trans*- β -ocimeno (18.04% en *L. micromera*), neral y geranial (24.75 y 34.09%, respectivamente, en *L. citriodora*), timol (64.59 y 53.55% en *L. graveolens* y *L. micromera*, respectivamente), *trans*- β -cariofileno (26.45% en *L. americana*) y germacreno D (37.68% en *L. americana*). Estas plantas aromáticas estudiadas demostraron ser una fuente interesante para el aislamiento de estos compuestos de los aceites, porque han sido utilizados para diferentes finalidades (**Tabla 22**).

Tabla 22. Estructuras químicas y usos de los principales compuestos encontrados en el género *Lippia*.

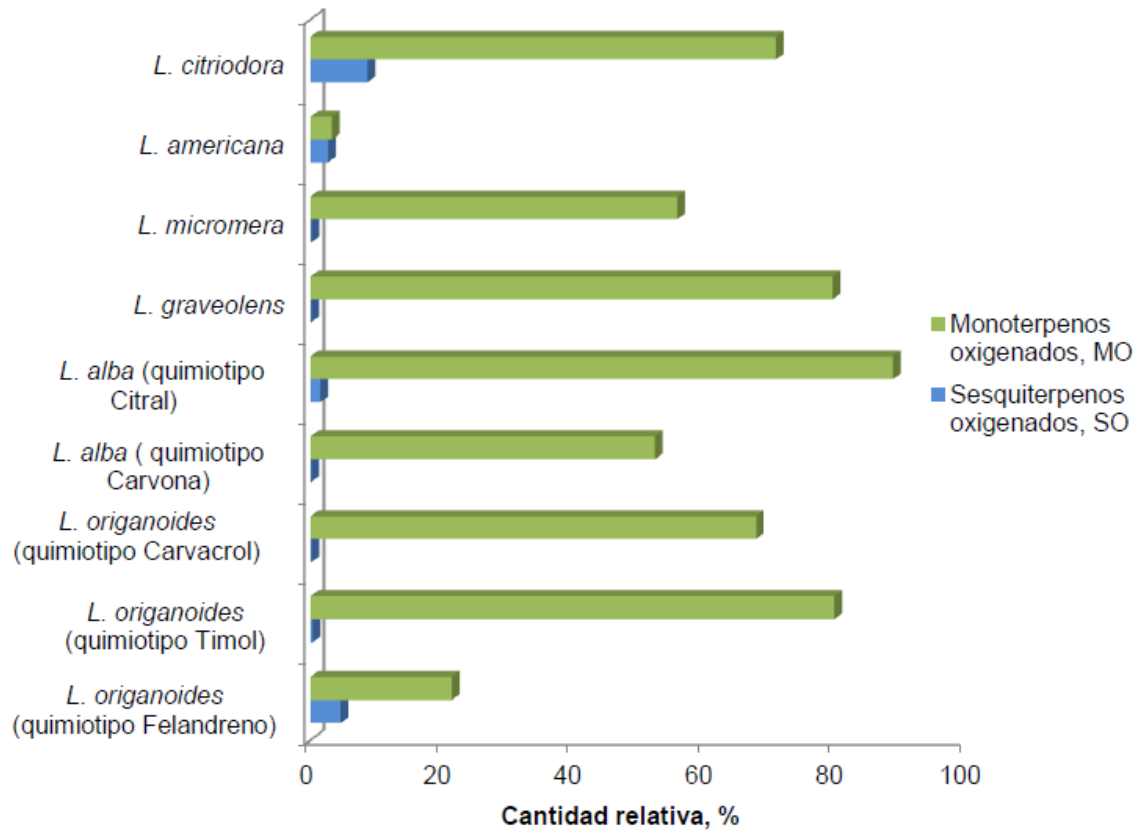
Compuesto	Especie	Uso
	Timol	<i>L. organoides</i> , <i>L. micromera</i> y <i>L. graveolens</i>
		Antifúngico, herbicida, insecticida, antimicrobial [112,113].

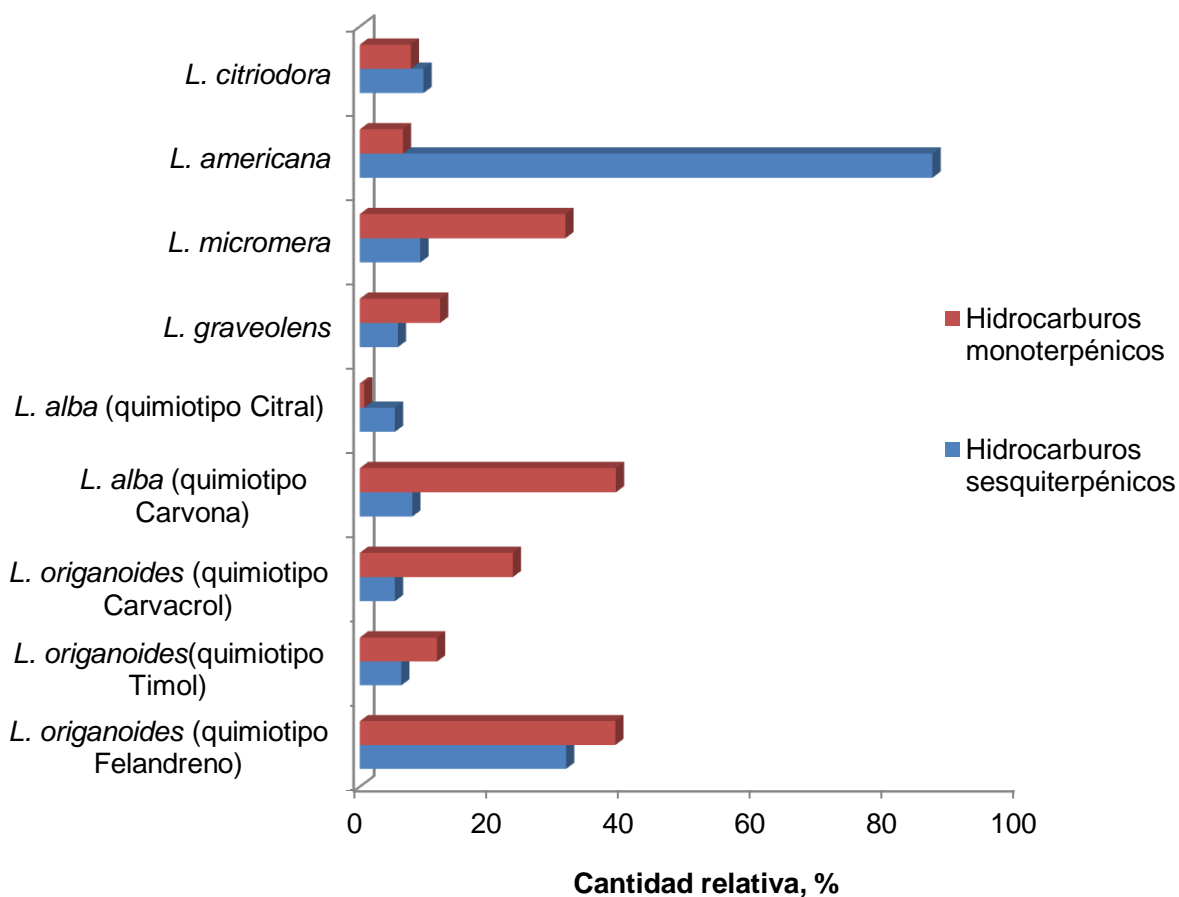
Compuesto	Especie	Uso
	Carvacrol	<i>L. origanoides</i> y <i>L. graveolens</i> Antifúngico, herbicida, insecticida , acaricida [112,89]
	α -Felandreno	<i>L. origanoides</i> Insecticida [114,115]
	Neral	<i>L. citriodora</i> y <i>L. alba</i> Propiedades antifúngicas, adición a las comidas, en cosméticos como aromatizante [116].
	Geranial	
	<i>trans</i> - β -Ocimeno	<i>L. micromera</i> Insecticida [117].
	<i>trans</i> - β -Cariofileno	<i>L. americana</i> Antiinflamatorio [118].

Compuesto	Especie	Uso
	Germacrene D	<i>L. americana</i>
		Insecticida [119]

La composición de los aceites estudiados se caracterizó principalmente por la presencia de monoterpenos oxigenados, los cuales constituyen del 21-89% del total de la muestra, entre los que se encuentran el 1,8-cineol (0.05-12%), timol (1-76%), carvacrol (0.05-54%), carvona (48%), neral (0.2-31%), geranial (1-45%), entre otros; sin embargo, *L. americana* presentó el más bajo porcentaje de estos compuestos oxigenados (3.35%). En menor proporción, se encuentran los sesquiterpenos oxigenados, *i.e.*, óxido de cariofileno (0.07-1.3%), α -cadinol (0.5-2.9%), epóxido de humuleno II (0.04-1%) y espatulenol (0.05-3.8%). Cabe resaltar, que el aceite de *L. americana* presentó un alto contenido de hidrocarburos sesquiterpénicos, representados principalmente por *trans*- β -cariofileno (26.45%) y germacrene D (37.68%) (**Figura 29**).

Figura 29. Distribución, por familias, de compuestos de los AE del género *Lippia* obtenidos MWHD.





Oliveira *et al.* [57] reportaron la composición química de los AE obtenidos de las hojas de *L. origanoides*; estos AE mostraron un alto contenido de monoterpenos oxigenados (66%), y un bajo contenido de hidrocarburos monoterpénicos (20.7%), sesquiterpenoides (9%) y sesquiterpenos oxigenados (1.1%); carvacrol fue el componente principal (38.6%), seguido de timol (18.5%), en comparación con el aceite obtenido en este estudio, se encontró una mayor cantidad de monoterpenos oxigenados (68.2%), representado principalmente por la presencia de carvacrol (54%). Dos Santos *et al.* [120] estudiaron los AE obtenidos de las hojas de las plantas de *L. origanoides* provenientes de diferentes lugares de Brasil (Cabeceiras, Campo Maior y José de Freitas), en los cuales su componente mayoritario fue carvacrol (42.9, 37.3 y 33.5%, respectivamente), seguido de *p*-cimeno (15.8, 12.1 y 11.9%, respectivamente). De esta manera, la distribución

de los metabolitos secundarios de *L. origanoides* mostró variaciones relativas en diferentes países, inclusive, para a un mismo quimiotipo, predominando una mayor cantidad de carvacrol en el quimiotipo de *L. origanoides* estudiado.

En la planta de *L. alba* (quimiotipo Citral), se encontró citral, mezcla de neral y geranial, estos compuestos han sido reportadas en una gran variedad de frutas y vegetales, incluyendo limón, lima, naranja, albaricoque y otros [121]; sin embargo, el citral también ha sido encontrado como componente principal (82.7%) en el aceite de *Cymbopogon citratus* [122], una planta usada en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades nerviosas y gastrointestinales, cantidad superior a la encontrada en esta investigación (71%). Por otra parte, en la literatura [108, 116, 123] se encuentran diferentes publicaciones acerca de la composición química de los AE de *L. alba*, que varía en función de la época de cosecha, quimiotipo, origen, entre otros. Por ejemplo, Tavares *et al.* [108] analizaron la composición de los AE de varios quimiotipos de *L. alba* provenientes de diferentes regiones de Brasil, y encontraron que después de la floración ocurre una mayor producción del aceite; sin embargo, los porcentajes de los componentes principales de estos aceites, neral, geranial, carvona y linalol, sufren una ligera disminución durante la época de floración. Estudios realizados en India (Varanisi) [116] y Colombia (Santander) [123] demuestran las variaciones en la cantidad de geranial (22.21 y 30.5%, respectivamente) y neral (14.20 y 23.6%, respectivamente) producidos por el mismo quimiotipo de *L. alba*, al comparar con las obtenidas en este estudio, se observa una mayor formación de estos compuestos (31.3% neral y 45% geranial).

Diferentes cantidades relativas de timol y carvacrol han sido encontradas en el AE de *L. graveolens*. Martínez *et al.* [89] reportaron que el AE obtenido de las hojas de *L. graveolens*, provenientes de Jalisco (México), tienen cantidades relativas de timol y carvacrol muy similares (24.59 y 24.54%, respectivamente). Por otra parte, Pino *et al.* [124] establecieron que el AE de este orégano (El Salvador) está

compuesto en su mayoría por compuestos oxigenados; timol (57.9%) y carvacrol (20.6%) constituyen cerca del 79% de la mezcla de estos compuestos oxigenados; composición muy similar a la encontrada en este estudio. Esta variación en la composición se debe a varios factores, entre estos, la época de recolección y la parte de la planta usada para obtener su AE. Vernin *et al.* [87] demostraron que en las partes aéreas de *L. graveolens*, recolectadas en época de floración, recogidas a mediados de noviembre y a finales de diciembre, se observa una disminución en sus componentes mayoritarios, es decir, en noviembre se produjo 71% de carvacrol, mientras que en diciembre originó solo 34.6% de carvacrol, y en el caso del timol fue 7 y 4.9%, respectivamente.

Estudios realizados en Atenas [76] muestran que las hojas frescas de *L. citriodora*, recolectadas en mayo (estado vegetativo) y septiembre (periodo de floración), reflejan el cambio en la composición del AE. En mayo, los componentes principales fueron geranial (38.7%), neral (24.5%) y limoneno (5.8%), constituyendo el 69% del total del aceite. Mientras que en septiembre, el AE produjo limoneno (17.7%), geranial (26.8%) y neral (21.8%), formando el 66.3% del aceite. Además, en septiembre, en comparación con mayo, la fracción de hidrocarburos monoterpénicos fue enriquecida, principalmente por limoneno. Los cambios observados dependen de la fisiología de la planta, y de la época de su desarrollo. La composición del aceite recolectado en mayo fue similar a la encontrada en este estudio, neral (24.75%) y geranial (34.09%), al igual que la composición química del AE de *Aloysia triphylla* reportada por Stashenko *et al.* [125], con neral (20%) y geranial (38.30%).

El AE proveniente de *L. micromera*, estudiada en esta investigación, fue rico en monoterpenos oxigenados, representando un 59.15% del total del aceite, constituido principalmente por timol (53.55%), compuesto mayoritario también encontrado en esta especie por Stashenko *et al.* [95] y Rojas *et al.* [72].

Los diferentes cambios en la cantidad y composición química de los AE están influenciados por la fisiología de la planta y las condiciones de su hábitat. Por ejemplo, la época de florecimiento es una fase crucial del crecimiento de la planta, cuando ocurren grandes cambios. La transición del estado vegetativo a la etapa de floración, es cuando ocurren los cambios en los porcentajes de los metabolitos secundarios, porque en esta etapa, la planta se defiende contra los posibles enemigos, cambiando la cantidad de ciertos metabolitos; podría ser que tenga el propósito de disuadir o atraer insectos o resistir a patógenos microbianos que puedan perjudicar a la planta durante la floración, que es una fase crucial. Además, también factores como la humedad, sitio de recolección del material, variaciones climáticas, entre otros, afectan el contenido de AE y, también su composición química [111].

Tabla 23. Análisis GC-MS de los extractos obtenidos con fluido supercrítico de plantas del género *Lippia* bajo estudio.

No	Compuesto	IRL	<i>L. origanoides</i>			<i>L. alba</i>		<i>L. americana</i>	<i>L. citriodora</i>	<i>L. graveolens</i>	<i>L. micromera</i>
		DB-5MS	Timol	Carvacrol	Felandreno	Citral	Carvona				
1	α -Pinoeno	937	-	-	1.27	-	-	-	-	-	1.04
2	B-Mirceno	993	-	-	-	-	-	-	-	0.82	-
3	α -Felandreno	1011	-	-	9.52	-	-	-	-	-	-
4	p -Cimeno	1029	0.54	4.76	7.01	-	-	-	-	3.41	18.40
5	Limoneno	1033	-	-	3.03	1.01	2.71	-	-	-	-
6	1,8-Cineol	1040	-	-	9.46	-	-	-	-	-	3.01
7	γ -Terpineno	1065	-	4.18	1.83	-	-	-	-	1.52	-
8	Linalol	1101	-	-	-	0.65	-	-	-	-	-
9	Carvona	1211	-	-	-	-	47.13	-	-	-	-
10	<i>cis</i> -Carveol	1229	-	-	-	0.69	-	-	-	-	-
11	Neral	1244	-	-	-	28.41	-	-	-	-	-
12	Geraniol	1253	-	-	-	4.69	-	-	-	-	-
13	Geranial	1274	-	-	-	35.63	-	-	-	-	-
14	Timol metil éter	1231	-	-	-	-	-	-	-	0.67	16.81
15	Timol	1294	88.75	36.76	11.28	-	-	-	-	85.92	43.82
16	Carvacrol	1303	1.86	48.46	-	-	-	-	-	-	-
17	α -Copaeno	1389	-	-	-	1.35	-	7.89	-	-	-
18	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1434	1.73	3.88	24.98	13.33	-	23.62	-	3.95	5.35
19	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1443	1.55	-	-	-	-	-	-	0.57	8.57
20	Germacreno D	1457	-	-	0.96	3.52	46.89	34.81	-	-	-
21	α -Humuleno	1470	1.07	1.96	12.73	2.67	-	2.34	-	1.88	-

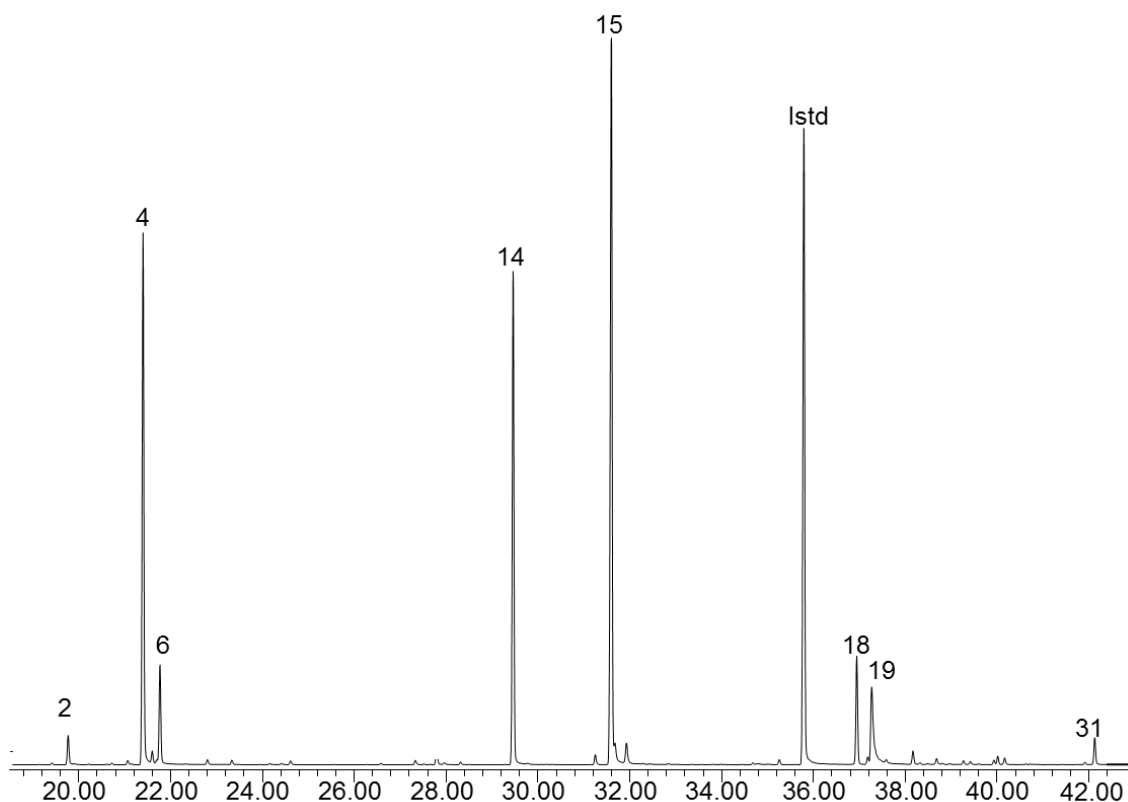
No	Compuesto	IRL	<i>L. origanoides</i>			<i>L. alba</i>		<i>L. americana</i>	<i>L. citriodora</i>	<i>L. graveolens</i>	<i>L. micromera</i>
		DB-5MS	Timol	Carvacrol	Felandreno	Citral	Carvona				
22	<i>allo</i> -aromadendreno	1474	-	-	0.87	-	1.41	3.61	-	-	-
23	Biciclosesquifelandreno	1493	-	-	-	0.44	-	-	-	-	-
24	α -Zingibereno	1502	0.26	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Biciclogermacreno	1509	-	-	0.58	1.17	-	4.25	-	0.32	-
26	<i>cis</i> -Calameneno	1533	-	-	2.02	2.26	-	8.13	-	-	-
27	δ -Amorfeno	1536	-	-	-	-	-	2.09	-	-	-
28	Ácido dodecanoico	1558	-	-	-	-	-	-	78.95	-	-
29	Dodecanoato de etilo	1592	-	-	-	-	-	-	3.59	-	-
30	Espatuleno	1595	-	-	-	-	-	5.52	-	-	-
31	Óxido de cariofileno	1602	0.46	-	3.19	3.05	-	-	-	0.34	2.26
32	C ₁₅ H ₂₅	1610	-	-	-	-	-	2.72	-	-	-
33	α -Eudesmol	1672	-	-	4.72	-	-	-	-	-	-
34	C ₁₀ H ₁₄	1680	-	-	4.04	-	-	-	-	-	-
35	Esclareno	1959	3.78	-	-	-	-	-	-	-	-
36	C ₁₅ H ₂₄ O	1838	-	-	2.37	-	-	-	-	-	-
37	Hexadodecanoato de etilo	1993	-	-	-	-	-	-	7.98	-	-
38	Fitol	2108	-	-	-	-	-	-	7.59	0.57	-
39	C ₁₈ H ₃₆		-	-	-	-	-	-	1.88	-	-

Tabla 24. Cuantificación de los compuestos mayoritarios de los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico de las especies de *Lippia spp.*

Compuesto	mg sustancia/mg SFE (\pm s, n=3)								
	<i>L. origanoides</i> , Timol	<i>L. origanoides</i> , Carvacrol	<i>L. origanoides</i> , Felandreno	<i>L. alba</i> , Citral	<i>L. alba</i> , Carvona	<i>L. graveolens</i>	<i>L. americana</i>	<i>L. micromera</i>	<i>L. citriodora</i>
1,8-Cineol			137.4 \pm 8.03					48.4 \pm 8.43	
α -Pino									
Borneol									
Carvacrol	31.2 \pm 2.23	381.2 \pm 6,76							
Carvona					171.6 \pm 8.31				
Neral				451.9 \pm 2.74					
Geranial				358.5 \pm 9.82					
α -Felandreno			542.5 \pm 3.72						
Linalol									
<i>p</i> -Cimeno			108.3 \pm 2.94			32.4 \pm 2.09		106.4 \pm 5.42	
Timol	512.3 \pm 1.46	98.2 \pm 2.84	134.1 \pm 9.61			539.1 \pm 5.21		201.7 \pm 7.53	
<i>trans</i> - β - Cariofileno	13 \pm 1.98	10.3 \pm 1.31	259.1 \pm 4.21	43.6 \pm 7.35		36.1 \pm 9.36	230.7 \pm 7.64	39.8 \pm 2.84	

En la **Figura 30**, se presenta un perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios, aislados por SFE, de *L. micromera*. En la **Tabla 23**, se registran los resultados del análisis por GC-MS; se presentan compuestos identificados y sus cantidades relativas (%). Se detectaron 32 sustancias en cantidades relativas >0.2%, de las cuales, se identificaron positivamente los que representan el 94-99% del área cromatográfica total. Los demás cromatogramas del género *Lippia*, se muestran en el **Anexo E**. En la **Tabla 24**, se muestran las concentraciones de los compuestos presentes en los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico usando las curvas de calibración de las sustancias de referencia certificadas. Las concentraciones se expresaron en miligramos (mg) de compuesto por miligramo (mg) de extracto.

Figura 30. Perfil cromatográfico típico del extracto SFE de *L. micromera*. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).



El extracto SFE de *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno) presentó la mayor cantidad de hidrocarburos monoterpénicos (22.6%), seguido del extracto de *L. micromera* (19.4%).

El contenido de timol y carvacrol fue similar al de los AE estudiados (**Tabla 21**). En los extractos supercríticos de *L. origanoides* (quimiotipo Timol y Felandreno) y *L. graveolens* se encontró una mayor cantidad de estos compuestos. Sin embargo, en los extractos obtenidos con CO₂ supercríticos de *L. americana* y *L. citriodora* no se detectaron estos metabolitos, mientras que en el AE de *L. origanoides* (quimiotipo Carvacrol) se encontró una cantidad de carvacrol alta (54.38%). Por otra parte, en el extracto de *L. citriodora* se detectó ácido dodecanoico, representado por el 78.95% del área cromatográfica total.

El germacreno D se encontró en cantidades relativas entre 35 y 47% en los extractos de *L. alba* (quimiotipo Carvona) y *L. americana*. Este compuesto, tal como ha sido reportado, posee una actividad insecticida, también la actividad repelente contra los afidios (piojos de las plantas) y garrapatas, además, mostró ser un precursor de varios sesquiterpenos y componente principal de los extractos del género *Bursera* [119].

Junto con la caracterización química de los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico hecha por GC-MS y GC-FID, se realizó también su análisis por cromatografía líquida (HPLC) acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD). Igualmente, esta caracterización se realizó a los extractos etanólicos. Para la cuantificar los compuestos identificados en los extractos, se construyeron curvas de calibración (Véase **Anexo C**) con sustancias de referencia certificadas. Las concentraciones se expresaron en miligramos (mg) de compuesto por gramo (g) de extracto.

En la **Tabla 25**, se presentan las concentraciones (mg sustancia/ g extracto) de los compuestos identificados en los extractos, obtenidos con CO₂ supercrítico y etanol (62.5%), de las plantas aromáticas bajo estudio.

Se detectaron cuatro flavonoides de tipo flavona (luteolina y apigenina) y flavanona (pinocebrina y naringenina). Pinocebrina se encontró en todos los extractos con CO₂ supercrítico de *L. origanoides* y en los extractos etanólicos de *L. graveolens* y *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno). El extracto con CO₂ supercrítico de *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno) tuvo una mayor cantidad de pinocebrina (12.64 ± 0.07 mg/g de extracto), seguido de su extracto etanólico (5.41 ± 0.06 mg/g de extracto).

Tabla 25. Cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos encontrados en los extractos, obtenidos con solventes o CO₂ supercrítico, de plantas género *Lippia*, bajo estudio.

Especie	Luteolina		Naringenina		Apigenina		Pinocebrina	
	Área	mg/g extracto	Área	mg/g extracto	Área	mg/g extracto	Área	mg/g extracto
Extractos con CO₂ supercrítico								
<i>L. origanoides</i> , Timol	-	-	-	-	-	-	130 ± 21.2	0.13 ± 0.062
<i>L. origanoides</i> , Felandreno	-	-	-	-	-	-	4880 ± 27.1	12.64 ± 0.074
<i>L. origanoides</i> , Carvacrol	-	-	-	-	-	-	1210 ± 12.1	2.96 ± 0.031
<i>L. alba</i> , Citral	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. alba</i> , Carvona	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. graveolens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. americana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. micromera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. citriodora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Extractos etanólicos								
<i>L. origanoides</i> , Timol	335 ± 2.1	2.14 ± 0.012	510 ± 28.3	3.8 ± 0.32	239 ± 3.5	1.86 ± 0.042	306 ± 3.1	0.58 ± 0.015
<i>L. origanoides</i> , Felandreno	-	-	-	-	-	-	2140 ± 22.2	5.41 ± 0.062
<i>L. origanoides</i> , Carvacrol	-	-	72 ± 3	0.36 ± 0.02	207.5 ± 0.92	1.50 ± 0.015	-	-
<i>L. alba</i> , Citral	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. alba</i> , Carvona	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. graveolens</i>	153 ± 6.2	1.02 ± 0.031	560 ± 19.2	4.2 ± 0.15	347 ± 2.2	3.09 ± 0.031	266 ± 4.1	0.47 ± 0.013
<i>L. americana</i>	-	-	-	-	-	-	239 ± 2.5	0.40 ± 0.014
<i>L. micromera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. citriodora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

En el caso de los extractos etanólicos de *L. origanoides* (quimiotipo Timol) y *L. graveolens*, se detectaron y cuantificaron luteolina, naringenina, apigenina y pinocembrina. En los extractos con CO₂ supercrítico de *L. alba*, *L. graveolens*, *L. americana*, *L. micromera* y *L. citriodora*, y, extractos etanólicos de *L. alba*, *L. micromera* y *L. citriodora*, no se detectaron los compuestos fenólicos mencionados.

Al comparar el tipo y la cantidad de compuestos fenólicos extraídos con fluido supercrítico y con solvente, se observa que con CO₂ supercrítico solo se logró extraer pinocembrina, donde la presión fue lo suficientemente alta para extraer algunas sustancias, mientras que la extracción con etanol al 62.5% permitió aislar otros flavonoides, que facilitó la liberación de los solutos de la matriz sólida a la fase del solvente, al quebrar las membranas celulares, lo que resulta en mayor interacción de los compuestos de interés con el solvente. Otro factor es la polaridad alta de la mezcla etanol-agua, que permitió extraer otros flavonoides [126]. Uno de los inconvenientes, que presenta el CO₂ supercrítico, es su baja polaridad, que no permitió la extracción de otros solutos polares. Esta técnica de extracción se ve afectada por numerosos factores, a saber: temperatura, presión, el flujo, el tiempo de extracción, la presencia de un co-solvente, entre otros, que modifican la selectividad de la extracción con fluido supercrítico [127].

Bimakr *et al.* y Liza *et al.* [128, 129] variaron la presión, temperatura y cantidad de co-solvente, para demostrar que un aumento en la cantidad de co-solvente incrementa la polaridad del dióxido de carbono, a una mayor presión (210 bar) acelera la transferencia de masa de los analitos y un incremento de la temperatura hasta 50 °C, aumenta el rendimiento de extracción de los flavonoides de las hojas de *Mentha spicata* L. y *Strobilanthes crispus*, factores que se podrían utilizar para aumentar la extracción de flavonoides.

5.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES Y EXTRACTOS DE PLANTAS DEL GÉNERO *Lippia*, BAJO ESTUDIO

En la presente investigación, se utilizó FL como indicador del daño causado por los radicales peroxilo y la posible protección generada por los componentes de los AE o extractos, obtenidos de las especies de *L. organoides* (quimiotipos Timol, Carvacrol y Felandreno), *L. alba* (quimiotipos Citral y Carvona), *L. micromera*, *L. citriodora*, *L. americana* y *L. graveolens*. Para comparación, se emplearon patrones de los compuestos mayoritarios y compuestos antioxidantes más utilizados (BHT y vitamina E). Cabe resaltar, que para cada muestra se realizaron diferentes factores de dilución, con el fin de escoger aquella concentración, que permitiera alcanzar porcentajes de fluorescencia menores del 5% del valor inicial (**Figura 31**). En la tabla 26, se reportan los valores de capacidad antioxidante obtenidos para las fracciones estudiadas y las sustancias de referencia utilizadas.

Figura 31. Factores de dilución utilizados para el AE de *L. organoides* (quimiotipo Felandreno).

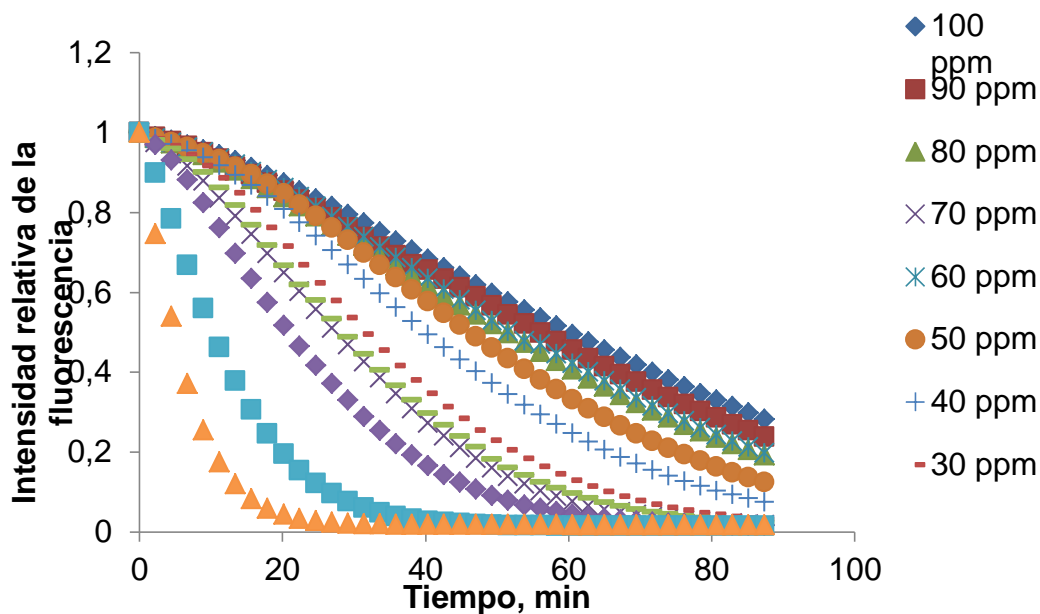


Tabla 26. Valores de capacidad antioxidante de los AE y extractos obtenidos con CO₂ supercrítico y solventes de las plantas bajo estudio.

Muestra	Métodos de medición (\pm s, n = 3)	
	ORAC-H (μ mol Trolox [®] / g sustancia)	ABTS ⁺ (μ mol Trolox [®] / g sustancia)
Aceites esenciales		
<i>L. origanoides</i> , Timol	2840 \pm 72	5090 \pm 42
<i>L. origanoides</i> , Carvacrol	3400 \pm 120	5200 \pm 109
<i>L. origanoides</i> , Felandreno	1820 \pm 82	310 \pm 2.5
<i>L. alba</i> , Citral	2000 \pm 77	24.8 \pm 0.43
<i>L. alba</i> , Carvona	1340 \pm 54	126.4 \pm 0.71
<i>L. graveolens</i>	3990 \pm 58	5410 \pm 48
<i>L. americana</i>	1200 \pm 27	239 \pm 4.3
<i>L. micromera</i>	2050 \pm 78	2750 \pm 80
<i>L. citriodora</i>	3630 \pm 40	41 \pm 2.4
Extractos obtenido con CO₂ supercrítico		
<i>L. origanoides</i> , Timol	2340 \pm 14	2340 \pm 26
<i>L. origanoides</i> , Carvacrol	2050 \pm 48	1320 \pm 11
<i>L. origanoides</i> , Felandreno	4200 \pm 130	2460 \pm 22
<i>L. alba</i> , Citral	1900 \pm 131	38 \pm 1
<i>L. alba</i> , Carvona	1670 \pm 53	452 \pm 6
<i>L. graveolens</i>	1830 \pm 35	2130 \pm 28
<i>L. americana</i>	784 \pm 7	225 \pm 8
<i>L. micromera</i>	1910 \pm 72	1110 \pm 26
<i>L. citriodora</i>	560 \pm 26	48 \pm 3
Extractos etanólicos		
<i>L. origanoides</i> , Timol	2010 \pm 27	139 \pm 2
<i>L. origanoides</i> , Carvacrol	2150 \pm 7	165.5 \pm 0.5
<i>L. origanoides</i> , Felandreno	7190 \pm 96	342 \pm 2
<i>L. alba</i> , Citral	340 \pm 15	19.3 \pm 0.3
<i>L. alba</i> , Carvona	310 \pm 14	23 \pm 2
<i>L. graveolens</i>	2100 \pm 130	300 \pm 3
<i>L. americana</i>	2690 \pm 33	184 \pm 4
<i>L. micromera</i>	1860 \pm 60	120 \pm 5
<i>L. citriodora</i>	1410 \pm 64	81 \pm 4

Muestra	Métodos de medición (\pm s, n = 3)	
	ORAC-H ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia)	ABTS ⁺ ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia)
Timol	3000 \pm 103	5700 \pm 125
Carvacrol	3410 \pm 50	4609 \pm 6
BHT	457 \pm 9	4760 \pm 23
α -Tocoferol	550 \pm 13	2429 \pm 7
1,8-Cineol	299 \pm 5	N.D.

Tabla 26. Continuación.

Quercetina	26170 \pm 21	13720 \pm 94
Citral	990 \pm 27	N.D.
α -Felandreno	1040 \pm 18	136 \pm 3
<i>trans</i> - β -Cariofileno	2800 \pm 109	N.D.
<i>p</i> -Cimeno	219 \pm 2	N.D.
1,8-Cineol	299 \pm 5	N.D.
γ -Terpineno	1766 \pm 8	N.D.

N. D. : No se observó disminución en la coloración

Según los datos de la

Tabla 26 de los valores ORAC para los AE de las diferentes especies de *Lippia spp.* y, teniendo en cuenta los valores encontrados para las sustancias de referencia, e.g., timol, carvacrol, BHT, entre otros, el AE de *L. graveolens* (3990 \pm 58 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia) presentó la mayor actividad antioxidante, seguido de los aceites de *L. citriodora* y *L. organoides* (quimiotipo Carvacrol) (3630 \pm 40 y 3400 \pm 120 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia, respectivamente). El AE de *L. graveolens* contiene alta cantidad relativa de carvacrol y timol (**Tabla 20**); y superó la capacidad antioxidante del BHT (457 \pm 9 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia) y de sus compuestos mayoritarios, timol (3000 \pm 103 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia) y carvacrol (3410 \pm 50 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia).

En el caso de los extractos, obtenidos con fluido supercrítico, la planta de *L. organoides* (quimiotipo Felandreno) (4200 \pm 130 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia)

mostró una mayor protección a la fluoresceína contra los radicales peroxilo; y el menos activo fue el extracto de *L. citriodora* ($560 \pm 26 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia). La baja actividad antioxidante del extracto de *L. citriodora*, se debe, posiblemente, al alto contenido de ácidos grasos y sus ésteres (**Tabla 23**). De igual manera, el extracto etanólico de *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno) ($7190 \pm 96 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia) alcanzó la mayor actividad antioxidante.

Según los datos presentes en la tabla 26 de los valores ORAC para los AE y extractos obtenidos del género *Lippia* y, teniendo en cuenta los valores reportados para las sustancias de referencia, se puede concluir que el extracto etanólico de *L. origanoides* (Felandreno) presentó la capacidad antioxidante más alta, seguido del extracto obtenido con fluido supercrítico de este mismo quimiotipo, que se debe, posiblemente, a la presencia de la pinocembrina (5.41 mg/g extracto).

Esta actividad antioxidante de los diferentes aceites y extractos, se puede atribuir a los compuestos presentes en las muestras, es decir, que se debe tanto a los componentes principales como a la presencia de aquellos constituyentes que se encuentran en pequeñas cantidades, el efecto aditivo o la sinergia entre ellos [100, 109].

En los extractos de orégano de las plantas estudiadas en la presente investigación, exhibieron un mayor efecto protector a la FL, que los extractos obtenidos por Su *et al.* [130] y Jiménez *et al.* [131](**Tabla 27**).

Por otra parte, el valor ORAC de los extractos de *L. citriodora* encontrados en esta investigación, fueron menores que los reportados por Funes *et al.* [132], quienes atribuyen dicha actividad a la presencia de un compuesto mayoritario, verbascósido. Sin embargo, los autores exponen que el efecto sinérgico de este compuesto con el resto de compuestos minoritarios (otros fenilpropanoides y flavonas) no se puede descartar (**Tabla 27**).

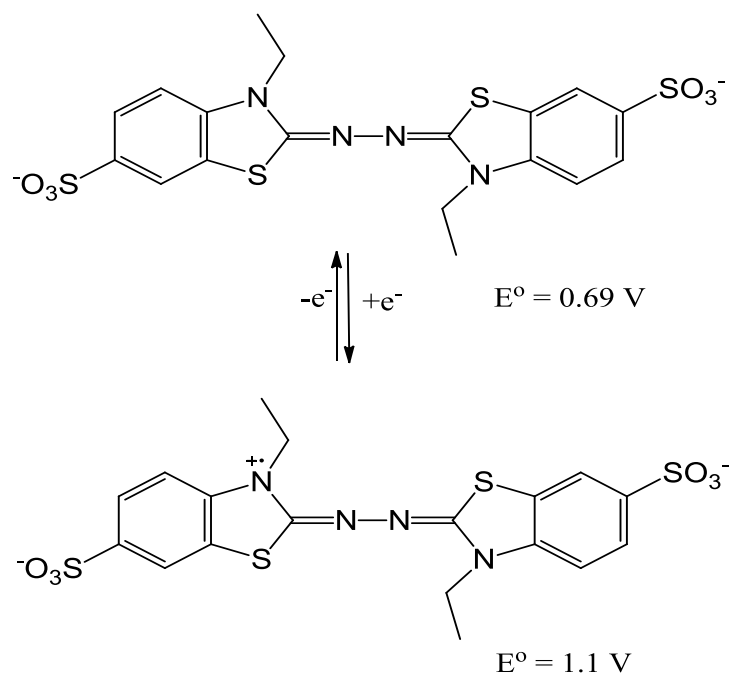
Tabla 27. Reportes de la actividad antioxidante medida por el método ORAC, de plantas de orégano y cedrón [130-132].

Extracto	Material vegetal	Valor ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g muestra)	Ref.
Extractos obtenidos con una mezcla acetona:agua al 50%	Hojas de orégano	1230 \pm 41.46	130
Extractos acetona/agua/ácido acético, liofilizado	Orégano	1130 \pm 104	131
Extracto etanólico	Cedrón	4080 \pm 234	132

El otro ensayo usado para evaluar la actividad antioxidante es el método TEAC o ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} (**Figura 32**). Esta especie se forma a partir de la oxidación del ABTS con persulfato de potasio, generándose una especie radicalaria azul-verdosa que tiene un máximo de absorción de 734 nm [133].

Para los AE, ricos en timol y carvacrol, la actividad secuestradora de radicales, fue mayor comparada con los antioxidantes de referencia (BHT, α -tocoferol y carvacrol); los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico, y los extractos etanólicos; sin embargo, la actividad de los AE, formados por timol y carvacrol, no logró superar la actividad del patrón de timol. El AE de *L.graveolens* (5410 \pm 48 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia) mostró la actividad más alta. En este aceite la cantidad relativa de timol fue mayor que la de carvacrol (64.59 y 12.19%, respectivamente). Por otra parte, el aceite de *L. origanoides* (quimiotipo Carvacrol) (5200 \pm 109 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia) también demostró una alta actividad antioxidante, con la presencia de timol y carvacrol en proporción relativa inversa a la del AE de *L. graveolens* (12.13 y 54.38%, respectivamente). Cabe resaltar, que el AE de *L. micromera*, con presencia de timol (53.33%) y carvacrol (0.14%), también mostró una actividad antioxidante buena.

Figura 32. Oxidación del ABTS con persulfato de potasio, para la generación del catión-radical ABTS^{•+} [133].



Los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico de las plantas de *L. origanoides* (quimiotipos Timol y Felandreno) y de *L. graveolens* presentaron mayor actividad antiradicalaria; en menor proporción, lo hizo el extracto de *L. alba* (quimiotipo Citral), debido a la ausencia de compuestos capaces de disminuir la absorbancia del catión-radical ABTS^{•+}. Entre los extractos etanólicos, el obtenido de *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno) presentó la mayor actividad antioxidante, medida por el método ABTS^{•+}.

Al comparar los resultados de los AE de este estudio, con los de las investigaciones realizadas por Muñoz *et al.* [64], se observa que el AE de *L. origanoides* (alto contenido de carvacrol y, en menor proporción, el timol), obtenido por estos autores, y con una actividad antioxidante de 4500 μmol Trolox[®]/g sustancia, no superó a la de los aceites de *L. origanoides* (quimiotipos Timol y Carvacrol) y *L. graveolens* (5090 ± 42, 5200 ± 109 y 5410 ± 48 μmol Trolox[®]/g

sustancia, respectivamente) de esta investigación, porque el contenido de compuestos fenólicos, timol y carvacrol, en los aceites obtenidos en este estudio tuvieron una cantidad relativa más alta (**Tabla 21**), en comparación con lo reportado por Muñoz *et al.* [64]. Lo mismo se presentó para el caso del AE de *L. micromera* ($2750 \pm 80 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia) con 24.7% de timol y 3.5% de carvacrol, donde la actividad fue más alta que la reportada por Muñoz *et al.* [64], *L. micromera* ($1840 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia). En el 2001, Puertas *et al.* [69] reportaron que la actividad contra el catión-radical ABTS⁺ del aceite de *L. alba*, era relativamente baja, al igual que lo reportado en este estudio.

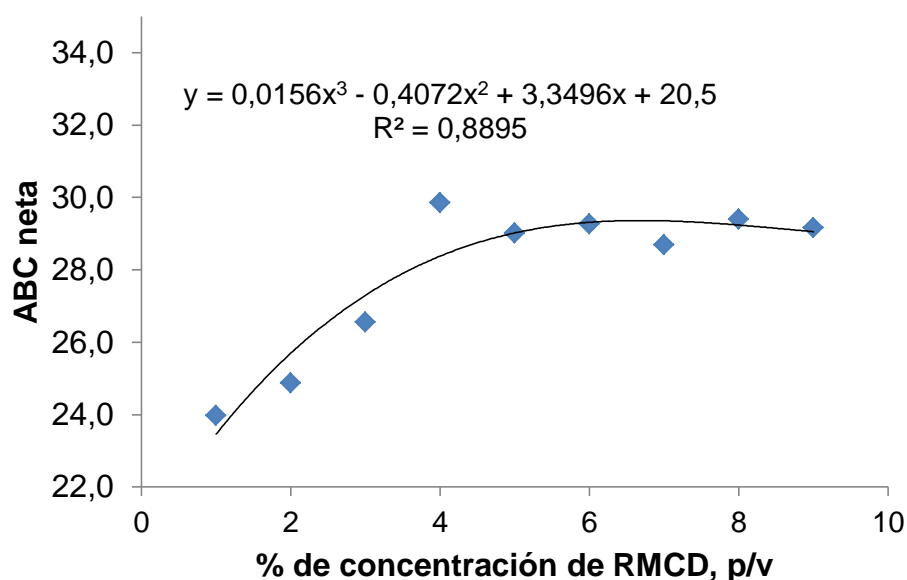
Por otra parte, estudios elaborados en Brasil [134], revelan que el aceite de *Lippia grandis*, con un contenido de timol 45.8% y carvacrol 9.9% (**Tabla 21**), no superan la capacidad antioxidante de los aceites estudiados en este trabajo, debido a que la relación de cantidades relativas de timol (64.59%) y carvacrol (12.19%) encontradas en esta investigación eran más altas (**Tabla 21**).

En el año 2009, Funes *et al.* [132] encontraron que el extracto de *L. citriodora* tenía un valor TEAC de $810 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia, más alto que el valor determinado para el verbascósido puro, compuesto mayoritario, y postularon que los componentes minoritarios del extracto, como flavonas, podrían contribuir al incremento de la capacidad antioxidante del extracto, probablemente, por un efecto sinérgico.

Al igual que los antioxidantes hidrofílicos, los antioxidantes lipofílicos juegan un papel muy importante. Sin embargo, para evaluar la actividad antioxidante de estos compuestos, no existía un método que permitiese medirla. Huang *et al.* [39] lograron superar este obstáculo, introduciendo β -metilciclodextrina (RMCD), que es una molécula que permite solubilizar los antioxidantes lipofílicos en una solución acuosa.

Con el fin de establecer la concentración de RMCD necesaria para solubilizar las muestras, se evaluó el ABC neta de α -tocoferol (50 μ M) con diferentes concentraciones de RMCD (p/v) en una solución de *buffer* fosfato 75 mM (pH 7.4). El ABC neta del α -tocoferol incrementó con la concentración de RMCD, y al utilizar una ecuación de grado 3, se encontró que 6.67%, *i.e.*, aproximadamente 7%, es la concentración de RMCD para solubilizar el α -tocoferol en *buffer*.

Figura 33. Efecto de la concentración de RMCD en el ABC neta del α -tocoferol.



Por esta razón, en esta investigación se utilizó 7% de RMCD para solubilizar las muestras de los AE y extractos obtenidos con CO₂ supercrítico (**Tabla 28**). Los valores L-ORAC encontrados son más bajos que los valores ORAC para antioxidantes hidrofílicos. En el caso de los aceites, los quimiotipos Timol y Carvacrol pertenecientes a *L. origanoides*, mostraron una mayor actividad antioxidante y, en menor proporción, *L. citriodora*. Por otra parte, entre los extractos obtenidos por CO₂ supercrítico, las plantas del quimiotipo Felandreno protegieron en mayor grado a la fluoresceína del ataque de los radicales peroxilo. Esto demuestra que la actividad antioxidante de estas fracciones no se debe

solamente a antioxidantes de tipo hidrofílico, como compuestos fenólicos; sino también a otros compuestos como α -felandreno, α -pineno, entre otros.

Tabla 28. Valores ORAC-L de los aceites esenciales y extractos supercríticos del género *Lippia*.

Especie	Valor ORAC-L ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g de sustancia)*	
	Aceite esencial	Extracto obtenido con CO ₂ supercrítico
<i>L. origanoides</i> (quimiotipo Timol)	1860 \pm 89	1700 \pm 115
<i>L. origanoides</i> (quimiotipo Carvacrol)	1690 \pm 84	1530 \pm 33
<i>L. origanoides</i> (quimiotipo Felandreno)	260 \pm 15	2610 \pm 54
<i>L. alba</i> (quimiotipo Citral)	1310 \pm 82	1480 \pm 18
<i>L. alba</i> (quimiotipo Carvona)	360 \pm 18	780 \pm 12
<i>L. graveolens</i>	1510 \pm 55	1160 \pm 36
<i>L. americana</i>	660 \pm 25	98 \pm 5
<i>L. micromera</i>	730 \pm 27	1200 \pm 163
<i>L. citriodora</i>	120 \pm 11	270 \pm 21

* \pm s; n = 3

Además, la presencia de γ -tocoferol en los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico de los tres quimiotipos de *L. origanoides* y en *L. alba* (quimiotipo Citral) (Véase **Anexo B. Tabla 2.19**) contribuyó a dicha actividad. Al tener en cuenta los valores TAC (*Total Antioxidant Capacity*) [135], el cual fue calculado como la suma de los valores H-ORAC y L-ORAC de cada uno de los aceites y extractos evaluados (**Tabla 29**), se encontró que los aceites y extractos obtenidos con CO₂ supercríticos de los tres quimiotipos de *L. origanoides* y *L. graveolens* presentaron los valores más grandes de actividad antioxidante total. Sin embargo, se encontró que la actividad antioxidante fue en gran parte por el método ORAC-H, es decir, que la capacidad atrapadora de radicales libres de los aceites esenciales y extractos obtenidos con CO₂ supercrítico, se debe en gran parte a la presencia de compuestos antioxidantes, a saber: timol, carvacrol, luteolina, entre otros.

Tabla 29. Valores TAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g de sustancia) de los aceites esenciales y extractos supercríticos de las seis especies de *Lippia spp.*, por el método ORAC.

Especie	Valor TAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g de sustancia)	
	Aceite esencial	Extracto obtenido con CO_2 supercrítico
<i>L. origanoides</i> (quimiotipo Timol)	4520	4040
<i>L. origanoides</i> (quimiotipo Carvacrol)	5090	2850
<i>L. origanoides</i> (quimiotipo Felandreno)	2080	5070
<i>L. alba</i> (quimiotipo Citral)	3310	1518
<i>L. alba</i> (quimiotipo Carvona)	1700	1232
<i>L. graveolens</i>	5500	3290
<i>L. americana</i>	1860	323
<i>L. micromera</i>	2780	2310
<i>L. citriodora</i>	3750	318

Estas capacidades antioxidantes no solo dependen de la composición de los aceites y extractos evaluados, sino también del método usado para medirlas. Hay varios métodos para medir dichas actividades, los cuales pueden ser clasificados en dos tipos: ensayos transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT), ORAC, o transferencia de un electrón (ET), TEAC. Es decir, un solo método no es suficiente para medir la capacidad antioxidante; razón por la cual hay que tener en cuenta los diferentes modos de acción de los antioxidantes [8, 44, 46].

Los principios de los ensayos ORAC y TEAC son diferentes, como sus mecanismos de acción, incluyendo la velocidad y el tipo de reacción, que contribuyen a las diferencias en los datos. Además, el ensayo ORAC tiene en cuenta la acción cinética de los antioxidantes, lo cual podría explicar la diferencia de los resultados obtenidos por el ensayo ORAC y TEAC. Sin embargo, se observa que *L. origanoides* (quimiotipos Timol, Felandreno y Carvacrol) y *L. graveolens* son las plantas con mayor actividad antioxidante, medida por ambos métodos. El método ORAC fue más adecuado que el ensayo TEAC, para determinar las propiedades antioxidantes de las muestras evaluadas, debido a que

por el método ORAC, se logró dar valores de actividad antioxidante para compuestos como 1,8-Cineol, *trans*- β -Cariofileno, entre otros; mientras que por el método TEAC no se observaron; estos compuestos no se pueden descartar porque contribuyen a la actividad antioxidante de los aceites y extractos evaluados.

Prior *et al.* [44] reportaron la importancia del mecanismo HAT sobre el ET, debido a su mecanismo de acción; porque en el mecanismo HAT, los radicales utilizados son radicales peroxilo, los cuales son especies predominantes en las comidas y en sistemas biológicos, razón por eso es uno de los ensayos *in vitro* que más simulan su acción en sistemas reales.

En la presente investigación, también se evaluó la capacidad antioxidante de los aceites y extractos en un sistema lipídico modelo, el aceite de girasol, sometido a calentamiento (Véase **Sección 0**). En las operaciones de fritura, a menudo, el aceite se usa varias veces, a temperaturas elevadas. Además, diferentes factores como el oxígeno y el agua proveniente del producto alimenticio, ocasionan una serie de reacciones químicas con una consecuente degradación del aceite de fritura y del mismo producto alimenticio. A altas temperaturas, se forma un gran número de compuestos volátiles y no volátiles [136]. En general, estos aceites son una fuente rica de ácidos grasos, por ejemplo, el aceite de girasol se usa ampliamente en los productos alimenticios como una fuente esencial de ácido linoleico; sin embargo, a partir de este ácido se pueden generar aldehídos, productos secundarios finales de la peroxidación lipídica, cuyo monitoreo sirve para determinar el grado de avance de peroxidación lipídica [136].

La composición de ácidos grasos en el aceite de girasol (Véase **Anexo D**), se determinó a través de su extracción con solvente, seguida de una derivatización (Véase **Sección 0**). En la **Tabla 30**, se muestran las cantidades relativas (%) de los ácidos grasos presentes en el aceite de girasol. El ácido linoleico (C18, 57.08 \pm

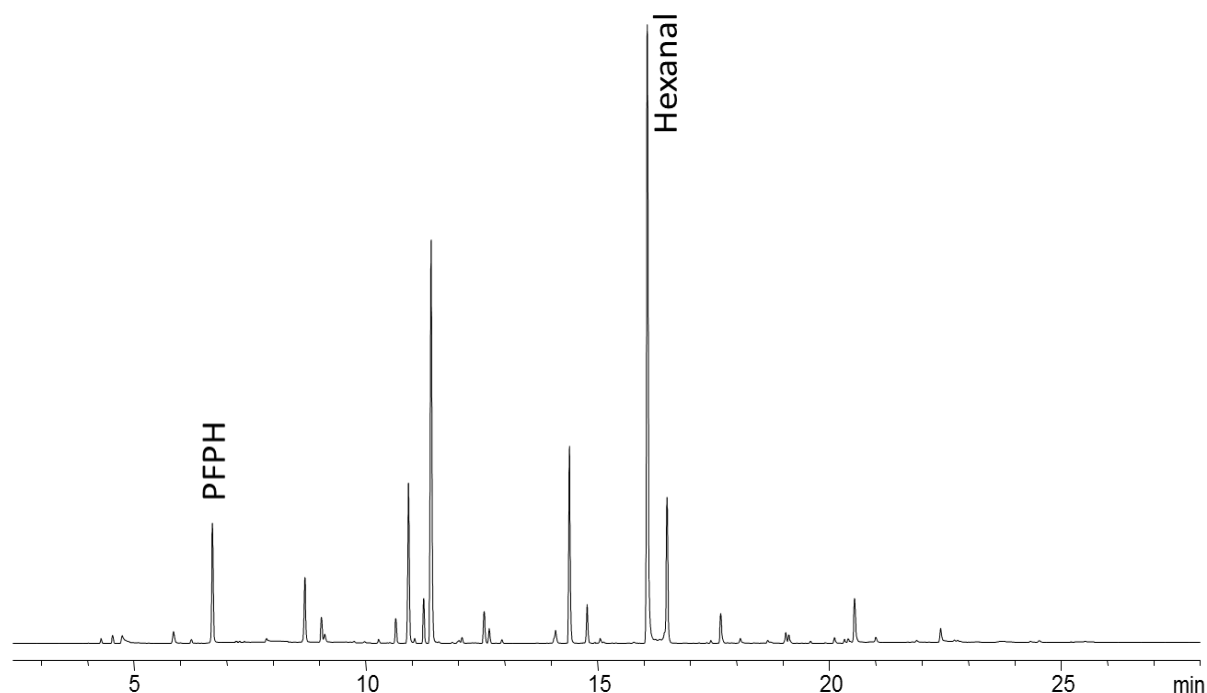
0.019%) fue el mayoritario; también, se encontraron los ácidos oleico ($27.59 \pm 0.014\%$) y palmítico ($6.12 \pm 0.049\%$), entre otros.

Tabla 30. Cantidad relativa (%) de los ácidos grasos presentes en el aceite de girasol, utilizado en esta investigación.

No. Pico	Ácido	Cantidad relativa, %
1	Ácido mirístico	0.07 ± 0.019
2	Ácido pentadecanoico	0.02 ± 0.032
3	Ácido palmítico	6.12 ± 0.049
4	Ácido palmitoleico	0.08 ± 0.019
5	Ácido esteárico	4.35 ± 0.092
6	Ácido oleico	27.59 ± 0.014
7	Ácido linoléico	57.08 ± 0.019
8	Ácido linolénico	0.14 ± 0.029
9	Ácido araquídico	0.29 ± 0.026
10	Ácido eicosenoico	0.17 ± 0.064
11	Ácido behénico	0.73 ± 0.076
12	Ácido lignocérico	0.23 ± 0.041

En la figura 34, se muestra el perfil cromatográfico de los derivados hidrazónicos de los compuestos carbonílicos, productos de la oxidación de los ácidos durante dos horas de calentamiento del aceite de girasol. En el cromatograma, se puede observar, no solo el derivado del hexanal, sino también otros derivados de los aldehídos, productos de la peroxidación de otros ácidos grasos que hacen parte del aceite de girasol (**Tabla 30**).

Figura 34. Perfil cromatográfico de los aldehídos derivados con PFPH, productos de la peroxidación lipídica del aceite de girasol. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30.



En la **Tabla 31**, se muestra el grado de protección de los AE, extractos y sustancias de control, y la concentración de hexanal producido durante el proceso de oxidación térmica del aceite de girasol. En el **Anexo D**, se encuentra la curva de calibración realizada, para determinar la concentración del hexanal generado en cada una de las muestras evaluadas.

Tabla 31. Efecto protector de los aceites esenciales, extractos y sustancias de referencia contra la degradación oxidativa en el aceite de girasol.

Muestra	Efecto protector*, %	Hexanal*, ppm
Aceite esencial		
<i>L. origanoides</i> , Timol	74.4 ± 0.64	1.76 ± 0.062
<i>L. origanoides</i> , Carvacrol	86.26 ± 0.032	0.64 ± 0.013
<i>L. origanoides</i> , Felandreno	53 ± 1.6	4.1 ± 0.16
<i>L. alba</i> , Citral	57.9 ± 0.12	3.59 ± 0.017
<i>L. alba</i> , Carvona	43 ± 2.4	4.7 ± 0.22

Muestra	Efecto protector[*], %	Hexanal[*], ppm
<i>L. citriodora</i>	69 ± 1.5	2.4 ± 0.15
<i>L. graveolens</i>	86.0 ± 0.53	0.75 ± 0.056
<i>L. micromera</i>	57 ± 1.2	3.4 ± 0.12
<i>L. americana</i>	45 ± 1.7	4.5 ± 0.16
Extractos obtenidos con CO₂ supercrítico		
<i>L. organoides</i> , Timol	59 ± 1.7	3.4 ± 0.17
<i>L. organoides</i> , Carvacrol	40 ± 2.3	5.0 ± 0.22
<i>L. organoides</i> , Felandreno	75 ± 1.6	1.7 ± 0.15
<i>L. alba</i> , Citral	31 ± 2.2	6.4 ± 0.22
<i>L. alba</i> , Carvona	33.3 ± 0.97	5.64 ± 0.093
<i>L. graveolens</i>	44.4 ± 0.73	4.60 ± 0.071
<i>L. americana</i>	30 ± 1.3	6.0 ± 0.13
<i>L. micromera</i>	39.3 ± 0.21	5.08 ± 0.021
<i>L. citriodora</i>	31 ± 2.2	5.8 ± 0.21
Extractos etanólicos		
<i>L. organoides</i> , Timol	40 ± 1.9	5.4 ± 0.19
<i>L. organoides</i> , Carvacrol	38.0 ± 0.36	5.61 ± 0.043
<i>L. organoides</i> , Felandreno	85.1 ± 0.68	0.85 ± 0.075
<i>L. alba</i> , Citral	28 ± 1.3	6.6 ± 0.13
<i>L. alba</i> , Carvona	24.0 ± 0.77	7.03 ± 0.082
<i>L. micromera</i>	38.0 ± 0.35	5.61 ± 0.035
<i>L. citriodora</i>	15.6 ± 0.88	7.32 ± 0.086
<i>L. graveolens</i>	37 ± 1.9	5.7 ± 0.19
<i>L. americana</i>	20.6 ± 0.12	6.85 ± 0.012
BHT	42 ± 2.1	5.2 ± 0.20
α-Tocoferol	5.7 ± 0.37	8.88 ± 0.044
Felandreno	61 ± 2.1	3.3 ± 0.21
Carvona	55 ± 2.0	3.9 ± 0.20
Timol	72 ± 1.8	2.2 ± 0.18
Carvacrol	68 ± 1.6	2.6 ± 0.17
Citral	53 ± 3.8	4.0 ± 0.39

* ± s, n = 2

Durante el proceso de peroxidación lipídica, en presencia de los AE y extractos, se encontró que todas las sustancias lograron ejercer un efecto protector sobre la degradación del aceite de girasol, actuando como atrapadores de los radicales

libres, y formando especies más estables. Los resultados demuestran, que los aceites de *L. origanoides* (quimiotipos Timol y Carvacrol) y *L. graveolens*, y los extractos etanólicos y supercríticos de *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno), lograron proteger al aceite de girasol en un rango entre 74-86%. Además, superaron la protección ejercida por las sustancias de referencia, debido a la presencia de compuestos fenólicos y otras sustancias, que fueron capaces de retardar la producción del derivado del hexanal.

Entre los AE, *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno), *L. alba* (quimiotipo Citral) y *L. americana*, fueron en cuya presencia se generó una mayor cantidad del hexanal. También, en la presencia de los extractos obtenidos con CO₂ supercríticos y etanólicos de *L. alba* (quimiotipos Citral y Carvona), *L. citriodora* y *L. americana*, la producción de este compuesto fue más alta, entre 5-7 ppm; lo que evidencia su poco efecto protector.

Estudios realizados por Stashenko *et al.* [109] y Orozco H. [137] en los AE de *L. alba* (quimiotipo Carvona), mostraron un alto efecto protector antioxidante *in vitro*, medido en dos sistemas lipídicos modelo (emulsión del ácido linoleico y en un desodorante en gel), a la misma concentración que la de la vitamina E y el BHA, logrando proteger a estos sistemas lipídicos; las diferencias observadas se deben posiblemente a los diferentes sistemas lipídicos modelo usados, que influyen sobre el valor de la actividad antioxidante; además, del tipo de sustrato utilizado y el método empleado para acelerar el deterioro oxidativo.

En el 2011, Rojas *et al.* [138] realizaron la degradación del aceite de girasol inducida por la radiación UVA, en donde el AE de *L. origanoides*, presentó el efecto protector más alto (33%), debido a los fenoles (timol y carvacrol) en él presentes, lo que resultó en un buen efecto protector en este sistema; sin embargo, no lograron superar la actividad de la vitamina E o BHT. Por otra parte, el extracto con CO₂ supercrítico exhibió el mayor efecto protector (50%) para una

concentración del extracto de 0.5%, similar a la de la vitamina E. De igual manera, estos extractos de *L. origanoides* lograron ejercer un efecto protector en una crema cosmética irradiada por 12 h con luz UVA.

Contreras *et al.* [139] evaluaron el efecto protector de varios aceites esenciales en una matriz lipídica (aceite de girasol) sometida a los rayos UVA, demostrando que solo el aceite de *L. alba* fue el que logró superar al BHA, en una concentración de 2% (p/p).

Estudios realizados por Salgar [140], con el AE de orégano, rico en timol (35.6%), mostraron diferentes efectos protectores, según el sistema lipídico evaluado. En la degradación térmica del aceite de girasol, a una concentración del aceite de 1% (p/p), se alcanzó un grado de protección de 35.76%, menor, que el del BHA y del α -tocoferol (48%). Por otra parte, en el segundo sistema (oxidación del ácido linoleico, inducida por FeSO_4), el aceite esencial alcanzó el mayor efecto protector (79.18%) a una concentración de 2% (p/p), mayor o igual que el BHA (56%) y el α -tocoferol (79%). Con respecto al presente trabajo, el efecto protector de *L. origanoides*, rico en timol, mostró un efecto protector del 74%, siendo un poco bajo en comparación a lo reportado por Salgar [140]. El efecto protector se debe posiblemente al contenido de timol (76%) en este aceite.

Los estudios realizados demuestran que la actividad antioxidante alta presentada por algunos AE y extractos, se debe a la presencia de compuestos fenólicos o a la presencia de otros compuestos capaces de proteger a diferentes sustratos oxidables. Como es el caso de los derivados fenólicos, timol y carvacrol, encontrados en *L. origanoides*, *L. graveolens* y *L. micromera*, los cuales han mostrado actividad antioxidante alta, en comparación con otras sustancias de referencia.

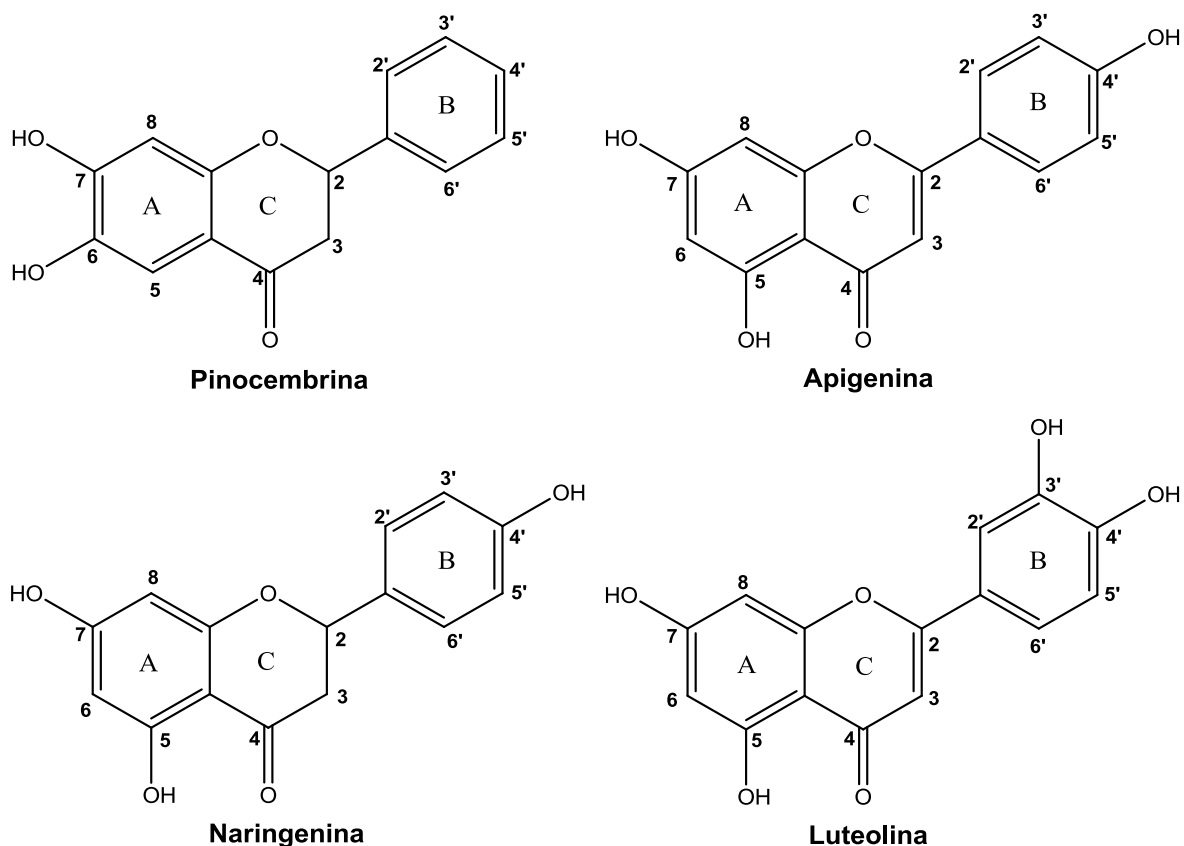
En el 2008, Mastelić *et al.* [142], sintetizaron derivados hidroximetilados de timol, carvacrol y eugenol, y demostraron una capacidad antioxidante más alta que los compuestos de partida. Al igual que Yanishlieva *et al.* [141] manifestaron la actividad antioxidante alta de estos compuestos en dos sistemas lipídicos evaluados.

Además, en esta investigación se encontraron flavonoides (**Tabla 25**). Diversas investigaciones relacionan la estructura de estos compuestos con la actividad antioxidante, en donde, el anillo B es el que provee en gran parte dicha actividad, y, el anillo A, en menor proporción. El enlace doble 2,3 también contribuye a la deslocalización de los electrones π entre los anillos B y C, los cuales ayudan a la estabilización del radical, después de la abstracción del hidrógeno [30, 143].

La efectividad de un antioxidante está dada por sus propiedades químicas, incluyendo energías de enlace de hidrógeno, potenciales de reducción, deslocalización de los electrones, entre otras; que podrían influenciar en la efectividad de los antioxidantes en atrapar a las especies radicalarias [18].

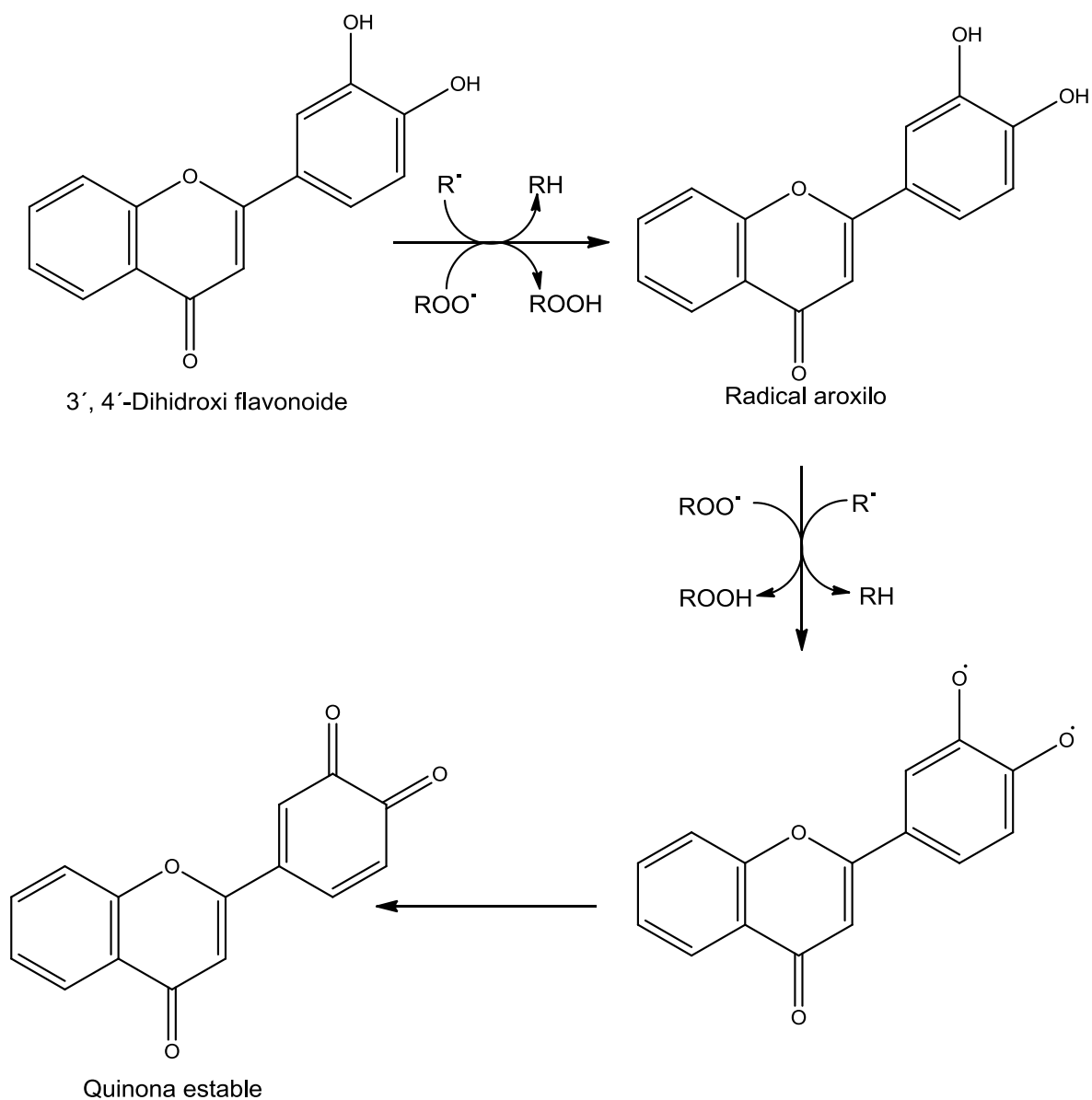
La capacidad antioxidante de los flavonoides como pinocembrina, apigenina, naringenina y luteolina, encontrados en los extractos de *L. graveolens*, *L. americana* y en los tres quimiotipos de *L. origanoides*, se relaciona con el número y la posición de los grupos hidroxilo presentes en los anillos aromáticos, y el enlace doble 2, 3 en sus estructuras (Figura 35).

Figura 35. Estructuras de los flavonoides encontrados en algunas de las *Lippia spp.*



La configuración de los grupos hidroxilo en el anillo B es uno de los factores más determinantes en el atrapamiento de las especies radicalarias. Los grupos hidroxilo en el anillo B pueden donar un hidrógeno a los radicales libres, resultando en un radical estable del flavonoide. Una estructura 3',4'-catecol en el anillo B potencializa fuertemente esta actividad. Generalmente, la oxidación de un flavonoide ocurre en el anillo B, cuando el catecol está presente, resultando un radical o-semiquinona estable (**Figura 36**) [18].

Figura 36. Atrapamiento de los radicales libres por flavonoides.



La flavona, apigenina, con una conformación no planar y un ángulo de torsión de 16.5°, aproximadamente; presenta un grupo hidroxilo en la posición 4'OH en el anillo B, a partir del cual se forma el radical más estable, obtenido por la abstracción del hidrógeno del hidroxilo de la posición C4' [144]. La luteolina presenta un ángulo de torsión de 16.3° y una conformación no planar; la oxidación de esta flavona tiene lugar en el anillo B, que posee dos grupos hidroxilo en las

posiciones 3' y 4' del anillo B, lo que le confiere más estabilidad a esta flavona, en comparación con la apigenina [144]. Por otra parte, la naringenina con dos grupos hidroxilo en el anillo A y un solo grupo 4'-OH en el anillo B, muestra actividad antioxidante, a pesar de la ausencia de un enlace insaturado 2,3 y la estructura dihidroxi en el anillo B [145].

En el **Anexo F**, se puede observar la contribución de los compuestos mayoritarios de los AE y extractos a la actividad antioxidante, calculados a partir de los valores de actividad antioxidante de los compuestos individuales y la concentración de cada uno de estos compuestos en las muestras evaluadas. En ellas, se observa que los compuestos fenólicos como timol y carvacrol proveen un aporte mayor a la actividad antioxidante de especies como *L. origanoides* (quimiotipos Timol y Carvacrol), *L. micromera* y *L. graveolens*. Además, hidrocarburos monoterpénicos, monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos como 1,8-Cineol, *p*-Cimeno, neral, *trans*- β -Cariofileno, entre otros; contribuyen, aunque en algunos casos es poca, a la actividad antiradicalaria. Sin embargo, en el AE y extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *L. americana* y *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno), se observa que gran parte de la actividad antioxidante es atribuida al *trans*- β -Cariofileno. Demostrando que dicha capacidad antiradicalaria de los AE y extractos no solo puede ser atribuida a los compuestos fenólicos, sino también, a otros compuestos presentes en las muestras. Investigaciones realizadas por Ruberto *et al.* [146] reportan el estudio de noventa y ocho compuestos puros presentes en los aceites esenciales, sujetos a la medición de su actividad antioxidante en dos sistemas lipídicos modelo. Se demostró que los hidrocarburos monoterpénicos, en particular los α - y γ -terpinenos, muestran actividad antioxidante, la cual ha sido similar a la del α -tocoferol.

6. CONCLUSIONES

Usando hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), fluido supercrítico (SFE, CO₂) y solventes (EtOH, 62.5%), se aislaron, respectivamente, los aceites esenciales y los extractos, seis especies de *Lippia spp.* (*L. origanoides*, *L. alba*, *L. micromera*, *L. americana*, *L. graveolens* y *L. citriodora*), cultivadas en parcelas experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM (UIS).

La composición química de los aceites esenciales y extractos, obtenidos del género *Lippia*, se determinó por cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas y un detector de ionización en llama; cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un detector de arreglo de diodos. En los nueve aceites esenciales, se encontraron en total 89 compuestos, en cantidades relativas mayores del 0.04%, de los cuales se identificaron ca. 96-99%. Por otra parte, en los SFE, se detectaron 32 sustancias en cantidades relativas >0.2%, de los cuales se identificaron positivamente el 94-99% del área cromatográfica total. En los extractos, se detectaron cuatro flavonoides de tipo flavona (luteolina y apigenina) y flavanona (pinocembrina y naringenina).

Teniendo en cuenta los valores encontrados para las sustancias de referencia, e.g., timol, carvacrol, BHT, entre otros, el AE de *L. graveolens* presentó la mayor actividad antioxidante por el método ORAC ($3990 \pm 58 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia), seguido de los aceites de *L. citriodora* y *L. origanoides* (quimiotipo Carvacrol) (3630 ± 40 y 3400 ± 120 , respectivamente); además el aceite de *L. graveolens* logró superar al BHT ($457 \pm 9 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia) y a sus compuestos mayoritarios, timol ($3000 \pm 103 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia) y carvacrol ($3410 \pm 50 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia). En el caso de los extractos, obtenidos con fluido supercrítico, el extracto de *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno) (4200 ± 130

$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia) protegió en mayor grado a la fluoresceína del ataque de los radicales peroxilo; y mientras que el extracto de *L. citriodora* resultó menos activo ($560 \pm 26 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia). El extracto etanólico de *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno) también mostró la actividad antioxidante más alta ($7190 \pm 96 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia).

Según el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺, se encontró que el AE de *L. graveolens* ($5410 \pm 48 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia), con timol (64.6%) y carvacrol (12.2%) presentes como compuestos mayoritarios, mostró una actividad antiradicalaria muy alta. Cabe resaltar, que *L. micromera*, con presencia de timol (53.33%) y carvacrol (0.14%), también posee una buena actividad antioxidante. Los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico a partir de *L. origanoides* (quimiotipos Timol y Felandreno) y *L. graveolens* presentaron mayor actividad antiradicalaria; en menor proporción, lo hizo el extracto de *L. alba* (quimiotipo Citral), debido a la ausencia de compuestos capaces de disminuir la absorbancia del catión-radical ABTS⁺. Los extractos etanólicos de *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno) presentaron la mayor actividad antioxidante.

La evaluación de la capacidad antioxidante de aceites y extractos en el sistema lipídico modelo del aceite de girasol, sometido a calentamiento, demostró que los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico y extractos etanólicos de *L. origanoides* (Felandreno), y los AE de *L. origanoides* (Timol y Carvacrol) y *L. graveolens*, lograron proteger al aceite de girasol en un rango entre 74-86%; además, superaron la protección ejercida por las sustancias de referencia evaluadas, debido a la presencia de compuestos fenólicos (timol, carvacrol, flavonas, flavanonas y otras sustancias), que fueron capaces de disminuir el proceso de oxidación del aceite de girasol.

El método ORAC fue más adecuado que el ensayo TEAC, para determinar las propiedades antioxidantes de las muestras evaluadas, debido a que por el método

ORAC, se logró dar valores de actividad antioxidante para compuestos como 1,8-Cineol, *trans*- β -Cariofileno, entre otros; mientras que por el método TEAC no se observaron; estos compuestos no se pueden descartar, porque contribuyen a la actividad antioxidante de los aceites y extractos evaluados.

7. RECOMENDACIONES

Realizar otro tipo de ensayos de capacidad antioxidante con diferentes generadores de radicales libres (OH, H₂O₂, entre otros) que permitan simular un ambiente biológico, y realizar métodos de peroxidación lipídica que proporcione el desempeño de un antioxidante en una situación real, usando otros sistemas lipídicos modelo u otras fuentes de hexanal; proporcionando información sobre los diferentes modos de acción de los antioxidantes evaluados.

Analizar la composición química, la capacidad antirradicalaria de las especies de *Lippia spp.* en diferentes estados fenológicos, que permita establecer en qué época se produce una mayor cantidad de compuestos con propiedades antioxidantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. El paraíso de la biodiversidad, [Sitio de internet] disponible en: <http://colombiacuriosa.blogspot.com/2006/02/biodiversidad.html>. Fecha de consulta: 18 de julio de 2013.
2. Colombia curiosa, [Sitio de internet] disponible en: http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/la_tierra_del_cafe/el_paraiso_de_la_biodiversidad/. Fecha de consulta: 18 de julio de 2013.
3. HALLIWELL, B. Antioxidant characterization, methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. **1995**. 49. pp. 1341-1348.
4. PANCHAWAT, S., RATHORE, K. y SISODIA, S. A review on herbal antioxidants. *International Journal of PharmTech Research*. **2010**. 2. pp. 232-239.
5. NOGUCHI, N., WATANABE, A. y HONGLIAN, S. Diverse functions of antioxidants. *Free Radical Research*. **2000**. 33. pp. 809-817.
6. BOTTERWECK, A., VERHAGEN, H., GOLDBOHM, R., KLEINJANS, J. y BRANDT, P. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food and Chemical Toxicology*. **2000**. 38. p.p. 599-605.
7. AKOH, C. y MIN, D. Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology. Marcel Dekker. Nueva York. **2002**. Capítulo 15. pp. 512-522.
8. HUANG, D., OU, B. y PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**. 53. pp. 1841-1856.
9. 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 PharmTech Research*. **2010**. 2. pp. 1276-1285.
10. PASCUAL, M., SLOWING, K., CARRETERO, E., SÁNCHEZ, D. y VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. **2001**. 76. pp. 201-214.
 11. DAVIES, K. y PRYOR, W. The evolution of free radical biology and medicine: A 20-year history. *Free Radical Biology & Medicine*. **2005**. 39. pp. 1263-1290.
 12. FANG, Y., YANG, S. y WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. **2002**. 18. pp. 872-879.
 13. KOHEN, R. y NISKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. **2002**. 30. pp. 620-650.
 14. ARUOMA, O. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1998**. 75. pp. 199-212.
 15. VERMERRIS, W. y NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry. Springer. Dordrecht. **2006**. Capítulo 1. pp. 2, 58.
 16. ASHOK, B. y ALI, R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Experimental Gerontology*. **1999**. 34. pp. 293-303.
 17. MOUREU, C. y DUFRAISSE, C. Catalysis and auto-oxidation. Anti-oxygenic and pro-oxygenic activity. *Chemical Reviews*. **3**. pp. 113-162.
 18. SHAHIDI, F. Bailey's industrial oil & fat products. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. **2005**. Capítulo 11. pp. 432-433, 439, 472.
 19. RAO, V. Phytochemicals as nutraceuticals-global approaches to their role in nutrition and health. InTech. Croacia **2012**. Capítulo 1. p. 3.
 20. GVOZDJÁKOVÁ, A. Mitochondrial medicine. Mitochondrial metabolism, diseases, diagnosis and therapy. Springer. Eslovaquia. **2008**. Capítulo 2. p. 23.

21. VENKATESH, R. y SOOD, D. A review of the physiological implications of antioxidants in food. Tesis de pregrado. Worcester Polytechnic Institute. **2011**. pp. 22, 24.
22. KUMAR, A. Antioxidants: Natural and synthetic. Amani International. Alemania. **2006**. pp. 4, 24.
23. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation, [Sitio de internet] disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol40/volume40.pdf>. Fecha de consulta: 18 de julio de 2013.
24. Ministerio de Salud. Resolución número 4124 de 1991, [Sitio de internet] disponible en: http://www.invima.gov.co/Invima/normatividad/docs_alimentos/resolucion_4124_1991.pdf. Fecha de consulta: 17 de julio de 2013.
25. SAHIDI, F. y ZHONG, Y. Bailey's industrial oil and fat products. John Wiley & Sons. **2005**. Capítulo 12. pp. 493-498.
26. IVERSON, F. *In vivo* studies on butylated hydroxyanisole. *Food and Chemical Toxicology*. **1999**. 37. pp. 993-997.
27. TZIA, C. y LIADAKIS, G. Extraction optimization in food engineering. Marcel Dekker. Nueva York. **2003**. Capítulo 10. pp. 340-341.
28. WOJDYLO, A., OSZMIANSKI, J. y CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. **2007**. 105. pp. 940-949.
29. MARTÍNEZ, S., GONZÁLEZ, J., CULEBRAS, J. y TUÑÓN, M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitaria*. **2002**. 6. pp. 271-278.
30. HEIM, K., TAGLIAFERRO, A. y BOBILYA, D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **2002**. 13. pp. 572-584.
31. GROTEWOLD, E. The science of flavonoids. Springer. Nueva York. **2006**. Capítulo 3. p. 71.

32. PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. **2000**. 63. pp. 1035-1042.
33. GLAZER, A. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine. *FASEB Journal*. **1988**. 9. pp. 2487-2491.
34. GLAZER, A. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods in Enzymology*. **1990**. 186. pp. 161-168.
35. GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E. y FERRO, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*. **1994**. 18. pp. 29-36.
36. CAO, G., ALESSIO, H. y CUTLER, R. Oxygen-Radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. **1993**. 14. pp. 303-311.
37. 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.
38. HUANG, D., OU, B., HAMPSCH, 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.
39. HUANG, D., OU, B., HAMPSCH, M., FLANAGAN, J. y DEEMER, E. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**. 50. pp. 1815-1821.
40. JEANG, C., LIN, D. y HSIEH, S. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase of the same gene expressed from *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**. 53. pp. 6301-6304.

41. ASTRAY, G., GONZÁLEZ, C., MEJUTO, J., RIAL, R. y SIMAL, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloid*. **2009**. 23. pp. 1631-1640.
42. MARTIN DEL VALLE, E. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. **2004**. 31. pp. 1033-1046.
43. MILLER, N., RICE-EVANS, C., DAVIES, M., GOPINATHAN, V. y MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. **1993**. 84. pp. 407-412.
44. 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.
45. RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. y RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. **1999**. 26. pp. 1231- 1237.
46. ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P., PATSALIDES, E., McDONALD, S. y ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. **2002**. 127. pp. 183-98.
47. FOX, P. y McSWEENEY, P. Advanced dairy chemistry. Volume 2. Lipids. Springer. Nueva York. **2006**. Capítulo 16. pp. 557-558.
48. SHIBAMOTO, T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2006**. 41. pp. 12-25.
49. ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. y ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hidroxy-nonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*. **1991**. 11. pp. 81-128.
50. SAYRE, L., ZELASKO, D., HARRIS, P., PERRY, G., SALOMON, R. y SMITH, M. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end

- products are increase in alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. **1997**. 68. pp. 2092-2097.
51. DEVASAGAYAM, T., BOLOOR, K. y RAMASARMA, T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. **2003**. 40. pp. 303-308.
 52. HALLIWELL, B. y CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **1993**. 57. pp. 715-725.
 53. STASHENKO, E., PUERTAS, M. y MARTÍNEZ, J. SPME determination of volatile aldehydes for evaluation on *in-vitro* antioxidant activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2002**. 373. pp. 70-74.
 54. BAUDI, S. Química de los alimentos. Alhambra mexicana. Ciudad de México. **1990**. Capítulo 4. p. 218.
 55. STASHENKO, E., PUERTAS, M., SALGAR, W., DELGADO, W. y MARTÍNEZ, J. Solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *Journal of Chromatography A*. **2000**. 886. pp. 175-181.
 56. SRIVASTAVA, R. y CHOUDHARY, R. Species diversity and economic importance of the family Verbenaceae in arunachal Pradesh. *Bulletin of Arunachal Forest Research*. **2008**. 24. pp. 1-21.
 57. OLIVEIRA, D., LEITÃO, G., BIZZO, H., LOPES, D., ALVIANO, D., ALVIANO, C. y LEITÃO, S. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry*. **2007**. 101. pp. 236-240.
 58. RUÍZ, C. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K., en tres estados fenológicos. Tesis de pregrado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2008**. p. 37.
 59. Herbario nacional colombiano, [Sitio de internet] disponible en: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/>. Fecha de consulta: 26 de abril de 2013.

60. STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J., RUÍZ, C., ARIAS, G., DURÁN, C., SALGAR, W. y CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation base on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*. **2010**. 33. pp. 93-103.
61. CABALLERO, K., OLIVERO, J. y STASHENKO, E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Product Research*. **2012**. 50. pp. 62-65.
62. VICUÑA, G., STASHENKO, E. y FUENTES, J. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*. **2010**. 81. pp. 343-349.
63. CELIS, C. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. Tesis de pregrado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2007**. pp. 15, 115-117, 121-125.
64. MUÑOZ, A., KOUZNETSOV, V. y STASHENKO, E. Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, *trans*-anetol o estragol. *Revista de la Universidad Industrial de Santander, Salud*. **2009**. 41. pp. 287-294.
65. ARANGO, O., PANTOJA, D., SANTACRUZ, L. y HURTADO, A. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del Alto Patía. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. **2012**. 10. pp. 79-86.
66. MORATAYA, M. Caracterización farmacopéica de cuatro plantas aromáticas nativas de Guatemala: Albahaca de monte (*Ocimum micranthum*), orégano (*Lippia graveolens*), Salvia Sija (*Lippia alba*) y Salviyá (*Lippia chiapasensis*). Tesis de pregrado. Universidad San Carlos de Guatemala. **2006**. p. 14.

67. HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., JOSEPH, H. y BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*. **2008**. 116. pp. 211-222.
68. LÓPEZ, M., STASHENKO, E. y FUENTES, J. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. *Genetics and Molecular Biology*. **2011**. 34. pp. 479-488.
69. PUERTAS, M., HILLEBRAND, S., STASHENKO, E. y WINTERHALTER, P. *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from Oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. **2002**. 17. pp. 380-384.
70. ARA, N. y NUR, H. *In vitro* antioxidant activity of methanolic leaves and flowers extracts of *Lippia alba*. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. **2009**. 4. pp. 107-110.
71. STAPLES, G. y KRISTIANSEN, M. Ethnic culinary herbs. A guide to identification and cultivation in Hawai. University in Hawai Press. Hawai. **1999**. p. 56.
72. ROJAS, L., MORA, D., CHATAING, B., GUERRERO, B. y USUBILLAGA, A. Chemical composition and bioactivity on bacteria and fungi of the essential oil from *Lippia micromera* Schauer. *Journal of Essential Oil Research*. **2009**. 12. pp. 69-75.
73. OLIVERO, J., GUETTE, J. y STASHENKO, E. Acute 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.
74. MUÑOZ, A., CASTAÑEDA, M., BLANCO, K., CARDENAS, C., REYES, J., KOUZNETSOV, V. y STASHENKO, E. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica*. **2007**. 33. pp. 125-128.
75. DELLACASSA, E. y BANDONI, A. Hierbaluisa. *Aloysia citriodora* Palau. *Fitoterapia*. **2003**. 3. pp. 19-25.

76. ARGYROPOULOU, C., DAFERERA, D., TARANTILIS, P., FASSEAS, C. y POLISSIOU, M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2007**. 35. pp. 831-837.
77. NAKAMURA, T., OKUYAMA, E., TSUKADA, A., YAMAZAKI, M., SATAKE, M., NISHIBE, S., DEYAMA, T., MORIYA, A., MARUNO, M. y NISHIMURA, H. Acteoside as the analgesic principle of cedron (*Lippia triphylla*), a Peruvian medicinal plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1997**. 45. pp. 499-504.
78. QNAIS, E., ABU-SAFIEH, K., ABU-DIEYWH, M. y ABDULLA, F. Antinociceptive effect of two flavonoids from *Aloysia triphylla* L. *Jordan Journal of Biological Sciences*. **2009**. 2. pp. 167-170.
79. RAGONE, M., SELLA, M., CONFORTI, P., VOLONTÉ, M. y CONSOLINI, A. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**. 113. pp. 258-266.
80. CARNAT, A., CARNAT, A.P., FRAISSE, D. y LAMAISON, J. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia*. **1999**. 70. pp. 44-49.
81. VALENTÃO, P., ANDRADE, P., AREIAS, F., FERRERES, F. y SEABRA, R. Analysis of Vervain flavonoids by HPLC/Diode Array detection method. Its application to quality control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**. 47. pp. 4579-4582.
82. CARNAT, A., CARNAT, A.P., CHAVIGNON, O., HEITZ, A., WYLDE, R. y LAMAISON, J. Luteolin 7-diglucuronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. *Planta Medicinal*. **1995**. 61. p. 490.
83. SKAL TSA, H. y SHAMMAS, G. Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Medicinal*. **1988**. 54. p. 465.

84. VALENTÃO, p., FERNANDES, E., CARVALHO, F., ANDRADE, P., SEABRA, R. y BASTOS, M. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusión: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2002**. 25. pp. 1324-1327.
85. PEREIRA, C. y MEIRELES, A. Evaluation of global yield, composition, antioxidant activity and cost of manufacturing of extracts from lemon verbena (*Aloysia triphylla* [L'HÉRIT.] Britton) and mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Journal of Food Process Engineering*. **2007**. 30. pp. 150-173.
86. CALA, M. Determinación de antioxidantes fenólicos en plantas aromáticas del genero *Lippia spp.* (Familia Verbenaceae) empleando cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia. Tesis de Maestría. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2011**. pp. 45-81.
87. VERNIN, G., LAGEOT, C., GAYDOU, E. y PARKANYIL, C. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K form El Salvador. *Flavour and Fragrance Journal*. **2001**. 16. pp. 219-226.
88. ARANA, A., ESTARRÓN, M., OBLEDO, E., PADILLA, E., SILVA, R. y LUGO, E. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexicano orégano essential oils (*Lippia graveolens* H.B.K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*. **2010**. 50. pp. 585-590.
89. MARTÍNEZ, M., ROSARIO, R., CASTILLO, G., FLORES, J., ALVAREZ, A. y LUGO, E. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. **2011**. 48. pp. 822-827.
90. LIN, L., MUKHOPADHYAY, S., ROBBINS, E. y HARNLY, J. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by

- LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2007**. 20. p.p. 361-369.
91. RASTRELLI, L., CACERES, A., MORALES, C., DE SIMONE, F. y AQUINO, R. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry*. **1998**. 49. pp. 1829-1832.
 92. GONZÁLEZ, M., HERNÁNDEZ, M., KITE, G. y MARTÍNEZ, M. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*. **2007**. 30. pp. 43-49.
 93. AVILLA, R., GASTÉLUM, G., CAMACHO, A., TORRES, J. y NEVÁRES, G. Extracts of Mexican orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*. **2010**. 3. pp. 434-440.
 94. MARTÍNEZ, A., PUGA, R., HERNÁNDEZ, L., LOARCA, G. y MENDOZA, S. Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plant Foods for Human Nutrition*. **2008**. 63. pp. 1-5.
 95. 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.
 96. Papel de la informetría y de la cienciometría y su perspectiva nacional e internacional, [Sitio de internet] disponible en: <http://eprints.rclis.org/5162/1/sci06100.pdf>. Fecha de consulta: 17 de julio de 2013.
 97. Bibliometría, informetría, cienciometría: su etimología y alcance conceptual, [Sitio de internet] disponible en: <http://es.scribd.com/doc/133501377/Bibliometria-Infometria>. Fecha de consulta: 17 de julio de 2013.
 98. 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. **1997**. pp. 13-36.
- 99.** HERTOOG, M., HOLLMAN, P. y VENEMA, D. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1992**. 40. pp. 1591-1598.
 - 100.** ARIAS, G. Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citriodora*, cultivadas en el municipio Sucre (Santander). Tesis de Maestría. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2012**. pp. 66-70.
 - 101.** CAMPOS, A. y LISSI, E. Kinetics of the reaction between 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *International Journal of Chemical Kinetics*. **1999**. 29. pp.219-224.
 - 102.** MILLER, J. y MILLER, J. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. Pearson. Gosport. **2010**. Capítulo 5. pp. 119-121.
 - 103.** LANÇAS, F. Validação de métodos cromatográficos de análise. RIMA. Río de Janeiro **2004**. Capítulo 2. pp. 9-26.
 - 104.** Guía de validación de métodos analíticos. [Sitio de internet] disponible en: www.netsalud.sa.cr/ms/drc/pciudadano/guia_01.doc. Fecha de consulta: 20 de julio de 2013.
 - 105.** GUTIÉRREZ, H. y SALAZAR, R. Análisis y diseño de experimentos. McGraw-Hill. Ciudad de México. **2008**. Capítulo 5. pp. 128-138.
 - 106.** ARANGO, O., HURTADO, A. y TORO, I. Efecto del origen, la época de recolección y la edad de las hojas en el rendimiento y el contenido de timol de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. *Acta Agronómica*. **2012**. 61. pp. 207-213.
 - 107.** ESCOBAR, P., LEAL, S., HERRERA, L., MARTÍNEZ, J. y STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp.

- essential oils and their major components. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **2010**. 105. pp. 184-190.
108. TAVARES, E., JULIÃO, L., LOPES, D., BIZZO, H., LAGE, C. y LEITÃO, S. Análise do óleo esencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2005**. 15. pp. 1-5.
 109. STASHENKO, E. JARAMILLO, B. y MARTÍNEZ, J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*. **2004**. 1025. pp. 93-103.
 110. CASTILLO, G., GARCÍA, J. y ESTARRÓN, M. Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) essential oil. *Journal of Food Process Engineering*. **2007**. 30. pp. 661-669.
 111. SANGWAN, N., FAROOQI, A., SHABIH, F. y SANGWAN, R. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. **2001**. 34. pp. 3-21.
 112. KORDALI, S., CAKIR, A., OZER, H., CAKMAKCI, R., KESDEK, M. y METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. *Bioresource Technology*. **2008**. 99. pp. 8788-8795.
 113. DEL NOBILE, M., CONTE, A., INCORONATO, A. y PANZA, O. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering*. **2008**. 89. pp. 57-63.
 114. CHENG, S., HUANG, C., CHEN, Y., YU, J., CHEN, W. y CHANG, S. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. *Bioresource Technology*. **2009**. 100. pp. 452-456.
 115. PARK, I., LEE, S., CHOI, D., PARK, J. y AHN, Y. Insecticidal activities of constituents in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtuse* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Stored Product Research*. **2003**. 39. pp. 375-384.

116. SHUKLA, R., KUMAR, A., SINGH, P. y DUBEY, N. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpetne aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. *International Journal of Food Microbiology*. **2009**. 135. pp. 165-170.
117. BAMONIRI, A., MAZOOCHI, A., MIRJALILI, B. Study of the bioactive and fragrant constituents extracted from leaves and aerial parts of *Psammgeton canescens* (DC.) Vatke from central iran by nano scale injection. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. **2009**. 4. pp. 411-414.
118. FERNANDES, E., PASSOS, G., MEDEIROS, R., DA CUNHA, F., FERREIRA, J., CAMPOS, M., PIANOWSKI, L. y CALIXTO, J. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbeacea*. *European Journal of Pharmacology*. **2007**. 569. pp. 228-236.
119. NOGE, K. y BECERRA, J. Germacrene D, a common sesquiterpene in the genus *Bursera* (Burseraeae). *Molecules*. **2009**. 14. pp. 5289-5297.
120. DOS SANTOS, F., LOPES, J. y CITO, G. Composition and biological activity of essential from *Lippia organoides* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*. **2004**. 16. pp. 504-506.
121. NOGUEIRA, A., CARVALHO, R., SOUZA, C., CHAHOUD, I. y PAUMGARTTEN, F. Study on the embryofeto-toxicity of citral in the rat. *Toxicology*. **1995**. 96. pp. 105-113.
122. BASSOLÉ, I., LAMIEN-MEDA, A., BAYALA, B., OBAME, L., IIBOUDO, A., FRANZ, C., NOVAK, J., NEBIÉ, R. y DICKO, M. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*. **2011**. 18. pp. 1070-1074.
123. MESA-ARANGO, A., MONTIEL-RAMOS, J., ZAPATA, B., DURÁN, C., BETANCUR-GALVIS, L. y STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown:

- composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **2009**. 104. pp. 878-884.
124. PINO, J., ROSADO, A., BALUJA, R. y BORGES, P. Analysis of the essential oil of Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK). *Nahrung/Food*. **1989**. 33. pp. 289-295.
 125. STASHENKO, E., JARAMILLO, B. y MARTÍNEZ, J. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*. **2003**. 27. pp. 579-589.
 126. VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2001**. 8. p.p. 303-313.
 127. SMITH, R. Supercritical fluids in separation science-the dreams, the reality and the future. *Journal of Chromatography A*. **1999**. 856. pp. 83-115.
 128. BIMAKR, M., ABDUL, R., GANJLOO, A., SALEENA, F., SALLEH, L. y ISLAM, M. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves by using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*. **2012**. 5. pp. 912-920.
 129. LIZA, M., RAHMAN, A., MANDANA, B., JINAP, S., RAHMAT, A., Z Aidul, I. y HAMID, A. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from *Strobilanthes crispus* (Pecah Kaca). *Food and Bioprocess Technology*. **2010**. 88. pp. 319-326.
 130. SU, L., YIN, J., CHARLES, D., ZHOU, K., MOORE, J. y YU, L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chemistry*. **2007**. 100. pp. 990-997.
 131. JIMENEZ, D., GIUFRIDA, F., GOLAY, P., COTTING, C., LARDEAU, A. y KEELY, B. Antioxidant activity of oregano, parsley, and olive mill

- wastewaters in bulk oils and oil-in-water emulsions enriched in fish oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**. 56. pp. 7151-7159.
- 132.** FUNES, L., FERNÁNDEZ, S., LAPORTA, O., PONS, A., ROCHE, E., SEGURA, A., FERNÁNDEZ, A. y MICOL, V. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chemistry*. **2009**. 117. pp. 589-598.
- 133.** BRANCHI, B., GALLI, C. y GENTILI, P. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: and apparent paradox. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2005**. 3. pp. 2604-2614.
- 134.** DAMASCENO, E., SILVA, J., ANDRADE, E., SOUSA, P. y MAIA, J. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2011**. 21. pp. 78-85.
- 135.** ARNAO, M., CANO, A. ACOSTA, M. Hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. **2001**. 73. pp. 239-244.
- 136.** ALADEDUNYE, F. y PRZYBYLSKI, R. Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content. *Food Chemistry*. **2013**. 141. pp. 2373-2378.
- 137.** OROZCO, H. Estudio comparativo de la actividad antioxidante (antirradicalaria) de aceites esenciales y extractos de orégano de monte (*Lippia origanoides*) y pronto alivio (*Lippia alba*) en un desosodorante en gel. Tesis de pregrado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2011**. pp. 75-80.
- 138.** ROJAS, V. y SANTAMARÍA, M. Estudio del uso de mezclas de aceites esenciales y extractos de *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis* como antioxidantes naturales en cremas cosméticas. Tesis de pregrado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2011**. pp. 87-94.
- 139.** CONTRERAS, N., MARTÍNEZ, J. y STASHENKO, E. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites volátiles de cuatro plantas de

uso tradicional mediante la medición de la peroxidación lipídica de aceite. *Scientia et Technica*. **2006**. 30. pp. 365-370.

- 140.** SALGAR, W. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia *Labiatae*. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2001**. pp. 48-64.
- 141.** YANISHLIEVA, N., MARINOVA, E. GORDON, M. y RANEVA, V. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. **1999**. 64. pp. 59-66.
- 142.** MASTELIĆ, J., JERKOVIĆ, E., BLAŽEVIĆ, I., POLJAK-BLAŽI, M., BOROVIĆ, S., IVANČIĆ-BAĆE, I., SMREČKI, V., ŽARKOVIĆ, N., BRČIĆ-KOSTIĆ, K., VIKIĆ-TOPIĆ, D. y MÜLLER, N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**. 56. pp. 3989-3996.
- 143.** CHEN, Z., CHAN, P., HO, K., FUNG, K. y WANG, F. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1996**. 79. pp. 157-163.
- 144.** LEOPOLDINI, M., PRIETO, I., RUSSO, N. y TOSCANO, M. Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. *Journal of Physical Chemistry*. **2004**. 108. pp. 92-96.
- 145.** RICE-EVANS, C., MILLER, N. y PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. **1996**. 20. pp. 933-956.
- 146.** RUBERTO, G. y BARATTA, M. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. **2000**. 69. pp. 167-174.

BIBLIOGRAFIA

AKOH, C. y MIN, D. Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology. Marcel Dekker. Nueva York. **2002**. Capítulo 15. pp. 512-522.

ALADEDUNYE, F. y PRZYBYLSKI, R. Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content. *Food Chemistry*. **2013**. 141. pp. 2373-2378.

ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P., PATSALIDES, E., McDONALD, S. y ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. **2002**. 127. pp. 183-98.

ARA, N. y NUR, H. *In vitro* antioxidant activity of methanolic leaves and flowers extracts of *Lippia alba*. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. **2009**. 4. pp. 107-110.

ARANA, A., ESTARRÓN, M., OBLEDO, E., PADILLA, E., SILVA, R. y LUGO, E. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexicano orégano essential oils (*Lippia graveolens* H.B.K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*. **2010**. 50. pp. 585-590.

ARANGO, O., HURTADO, A. y TORO, I. Efecto del origen, la época de recolección y la edad de las hojas en el rendimiento y el contenido de timol de aceites esenciales de *Lippia organoides* H.B.K. *Acta Agronómica*. **2012**. 61. pp. 207-213.

ARANGO, O., PANTOJA, D., SANTACRUZ, L. y HURTADO, A. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del Alto Patía. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. **2012**. 10. pp. 79-86.

ARGYROPOULOU, C., DAFERERA, D., TARANTILIS, P., FASSEAS, C. y POLISSIOU, M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2007**. 35. pp. 831-837.

ARIAS, G. Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citriodora*, cultivadas en el municipio Sucre (Santander). Tesis de Maestría. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2012**. pp. 66-70.

ARNAO, M., CANO, A. ACOSTA, M. Hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. **2001**. 73. pp. 239-244.

ARUOMA, O. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1998**. 75. pp. 199-212.

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

ASTRAY, G., GONZÁLEZ, C., MEJUTO, J., RIAL, R. y SIMAL, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloid*. **2009**. 23. pp. 1631-1640.

AVILLA, R., GASTÉLUM, G., CAMACHO, A., TORRES, J. y NEVÁRES, G. Extracts of Mexican orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*. **2010**. 3. pp. 434-440.

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 PharmTech Research*. **2010**. 2. pp. 1276-1285.

BAMONIRI, A., MAZOOCHI, A., MIRJALILI, B. Study of the bioactive and fragrant constituents extracted from leaves and aerial parts of *Psammgeton canescens* (DC.) Vatke from central iran by nano scale injection. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. **2009**. 4. pp. 411-414.

BASSOLÉ, I., LAMIEN-MEDA, A., BAYALA, B., OBAME, L., IIBOUDO, A., FRANZ, C., NOVAK, J., NEBIÉ, R. y DICKO, M. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*. **2011**. 18. pp. 1070-1074.

BAUDI, S. Química de los alimentos. Alhambra mexicana. Ciudad de México. **1990**. Capítulo 4. p. 218.

Bibliometría, informetría, ciencimetría: su etimología y alcance conceptual, [Sitio de internet] disponible en: <http://es.scribd.com/doc/133501377/> Bibliometria-Infometria. Fecha de consulta: 17 de julio de 2013.

BIMAKR, M., ABDUL, R., GANJLOO, A., SALEENA, F., SALLEH, L. y ISLAM, M. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves by using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*. **2012**. 5. pp. 912-920.

BOTTERWECK, A., VERHAGEN, H., GOLDBOHM, R., KLEINJANS, J. y BRANDT, P. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food and Chemical Toxicology*. **2000**. 38. p.p. 599-605.

BRANCHI, B., GALLI, C. y GENTILI, P. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: and apparent paradox. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2005**. 3. pp. 2604-2614.

CABALLERO, K., OLIVERO, J. y STASHENKO, E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Product Research*. **2012**. 50. pp. 62-65.

CALA, M. Determinación de antioxidantes fenólicos en plantas aromáticas del genero *Lippia spp.* (Familia Verbenaceae) empleando cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia. Tesis de Maestría. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2011**. pp. 45-81.

CAMPOS, A. y LISSI, E. Kinetics of the reaction between 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *International Journal of Chemical Kinetics*. **1999**. 29. pp.219-224.

CAO, G., ALESSIO, H. y CUTLER, R. Oxygen-Radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. **1993**. 14. pp. 303-311.

CARNAT, A., CARNAT, A.P., CHAVIGNON, O., HEITZ, A., WYLDE, R. y LAMAISON, J. Luteolin 7-diglucuronide, the major flavonoide compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. *Planta Medicinal*. **1995**. 61. p. 490.

CARNAT, A., CARNAT, A.P., FRAISSE, D. y LAMAISON, J. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia*. **1999**. 70. pp. 44-49.

CASTILLO, G., GARCÍA, J. y ESTARRÓN, M. Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) essential oil. *Journal of Food Process Engineering*. **2007**. 30. pp. 661-669.

CELIS, C. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. Tesis de pregrado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2007**. pp. 15, 115-117, 121-125.

CHEN, Z., CHAN, P., HO, K., FUNG, K. y WANG, F. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1996**. 79. pp. 157-163.

CHENG, S., HUANG, C., CHEN, Y., YU, J., CHEN, W. y CHANG, S. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. *Bioresource Technology*. **2009**. 100. pp. 452-456.

Colombia curiosa, [Sitio de internet] disponible en: http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/la_tierra_del_cafe/el_paraiso_de_la_biodiversidad/. Fecha de consulta: 18 de julio de 2013.

CONTRERAS, N., MARTÍNEZ, J. y STASHENKO, E. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites volátiles de cuatro plantas de uso tradicional mediante la medición de la peroxidación lipídica de aceite. *Scientia et Technica*. **2006**. 30. pp. 365-370.

DAMASCENO, E., SILVA, J., ANDRADE, E., SOUSA, P. y MAIA, J. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2011**. 21. pp. 78-85.

DAVIES, K. y PRYOR, W. The evolution of free radical biology and medicine: A 20-year history. *Free Radical Biology & Medicine*. **2005**. 39. pp. 1263-1290.

DEL NOBILE, M., CONTE, A., INCORONATO, A. y PANZA, O. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering*. **2008**. 89. pp. 57-63.

DELLACASSA, E. y BANDONI, A. Hierbaluisa. *Aloysia citriodora* Palau. *Fitoterapia*. **2003**. 3. pp. 19-25.

DEVASAGAYAM, T., BOLOOR, K. y RAMASARMA, T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. **2003**. 40. pp. 303-308.

DOS SANTOS, F., LOPES, J. y CITO, G. Composition and biological activity of essential from *Lippia organoides* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*. **2004**. 16. pp. 504-506.

El paraíso de la biodiversidad, [Sitio de internet] disponible en: <http://colombiacuriosa.blogspot.com/2006/02/biodiversidad.html>. Fecha de consulta: 18 de julio de 2013.

ESCOBAR, P., LEAL, S., HERRERA, L., MARTÍNEZ, J. y STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp.* essential oils and their major components. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **2010**. 105. pp. 184-190.

ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. y ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hidroxy-nonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*. **1991**. 11. pp. 81-128.

FANG, Y., YANG, S. y WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. **2002**. 18. pp. 872-879.

FERNANDES, E., PASSOS, G., MEDEIROS, R., DA CUNHA, F., FERREIRA, J., CAMPOS, M., PIANOWSKI, L. y CALIXTO, J. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbeacea*. *European Journal of Pharmacology*. **2007**. 569. pp. 228-236.

FOX, P. y McSWEENEY, P. Advanced dairy chemistry. Volume 2. Lipids. Springer. Nueva York. **2006**. Capítulo 16. pp. 557-558.

FUNES, L., FERNÁNDEZ, S., LAPORTA, O., PONS, A., ROCHE, E., SEGURA, A., FERNÁNDEZ, A. y MICOL, V. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chemistry*. **2009**. 117. pp. 589-598.

GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E. y FERRO, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*. **1994**. 18. pp. 29-36.

GLAZER, A. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine. *FASEB Journal*. **1988**. 9. pp. 2487-2491.

GLAZER, A. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods in Enzymology*. **1990**. 186. pp. 161-168.

GONZÁLEZ, M., HERNÁNDEZ, M., KITE, G. y MARTÍNEZ, M. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*. **2007**. 30. pp. 43-49.

GROTEWOLD, E. The science of flavonoids. Springer. Nueva York. **2006**. Capítulo 3. p. 71.

Guía de validación de métodos analíticos. [Sitio de internet] disponible en: www.netsalud.sa.cr/ms/drc/pciudadano/guia_01.doc. Fecha de consulta: 20 de julio de 2013.

GUTIÉRREZ, H. y SALAZAR, R. Análisis y diseño de experimentos. McGraw-Hill. Ciudad de México. **2008**. Capítulo 5. pp. 128-138.

GVOZDJÁKOVÁ, A. Mitochondrial medicine. Mitochondrial metabolism, diseases, diagnosis and therapy. Springer. Eslovaquia. **2008**. Capítulo 2. p. 23.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization, methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. **1995**. 49. pp. 1341-1348.

HALLIWELL, B. y CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **1993**. 57. pp. 715-725.

HEIM, K., TAGLIAFERRO, A. y BOBILYA, D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **2002**. 13. pp. 572-584.

HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., JOSEPH, H. y BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*. **2008**. 116. pp. 211-222.

Herbario nacional colombiano, [Sitio de internet] disponible en: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/>. Fecha de consulta: 26 de abril de 2013.

HERTOG, M., HOLLMAN, P. y VENEMA, D. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1992**. 40. pp. 1591-1598.

HUANG, D., OU, B., HAMPSCH, 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.

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, M., FLANAGAN, J. y DEEMER, E. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**. 50. pp. 1815-1821.

IVERSON, F. *In vivo* studies on butylated hydroxyanisole. *Food and Chemical Toxicology*. **1999**. 37. pp. 993-997.

JEANG, C., LIN, D. y HSIEH, S. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase of the same gene expressed from *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**. 53. pp. 6301-6304.

JIMENEZ, D., GIUFRIDA, F., GOLAY, P., COTTING, C., LARDEAU, A. y KEELY, B. Antioxidant activity of oregano, parsley, and olive mill wastewaters in bulk oils

and oil-in-water emulsions enriched in fish oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**. 56. pp. 7151-7159.

KOHEN, R. y NISKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. **2002**. 30. pp. 620-650.

KORDALI, S., CAKIR, A., OZER, H., CAKMAKCI, R., KESDEK, M. y METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. *Bioresource Technology*. **2008**. 99. pp. 8788-8795.

KUMAR, A. Antioxidants: Natural and synthetic. Amani International. Alemania. **2006**. pp. 4, 24.

LANÇAS, F. Validação de métodos cromatográficos de análise. RIMA. Rio de Janeiro **2004**. Capítulo 2. pp. 9-26.

LEOPOLDINI, M., PRIETO, I., RUSSO, N. y TOSCANO, M. Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. *Journal of Physical Chemistry*. **2004**. 108. pp. 92-96.

LIN, L., MUKHOPADHYAY, S., ROBBINS, E. y HARNLY, J. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2007**. 20. p.p. 361-369.

LIZA, M., RAHMAN, A., MANDANA, B., JINAP, S., RAHMAT, A., ZAIDUL, I. y HAMID, A. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from

Strobilanthes crispus (Pecah Kaca). *Food and Bioprocess Technology*. **2010**. 88. pp. 319-326.

LÓPEZ, M., STASHENKO, E. y FUENTES, J. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. *Genetics and Molecular Biology*. **2011**. 34. pp. 479-488.

MARTIN DEL VALLE, E. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. **2004**. 31. pp. 1033-1046.

MARTÍNEZ, A., PUGA, R., HERNÁNDEZ, L., LOARCA, G. y MENDOZA, S. Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plant Foods for Human Nutrition*. **2008**. 63. pp. 1-5.

MARTÍNEZ, M., ROSARIO, R., CASTILLO, G., FLORES, J., ALVAREZ, A. y LUGO, E. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. **2011**. 48. pp. 822-827.

MARTÍNEZ, S., GONZÁLEZ, J., CULEBRAS, J. y TUÑÓN, M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. **2002**. 6. pp. 271-278.

MASTELIĆ, J., JERKOVIĆ, E., BLAŽEVIĆ, I., POLJAK-BLAŽI, M., BOROVIĆ, S., IVANČIĆ-BAĆE, I., SMREČKI, V., ŽARKOVIĆ, N., BRČIĆ-KOSTIĆ, K., VIKIĆ-TOPIĆ, D. y MÜLLER, N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**. 56. pp. 3989-3996.

MESA-ARANGO, A., MONTIEL-RAMOS, J., ZAPATA, B., DURÁN, C., BETANCUR-GALVIS, L. y STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **2009**. 104. pp. 878-884.

MILLER, J. y MILLER, J. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. Pearson. Gosport. **2010**. Capítulo 5. pp. 119-121.

MILLER, N., RICE-EVANS, C., DAVIES, M., GOPINATHAN, V. y MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. **1993**. 84. pp. 407-412.

Ministerio de Salud. Resolución número 4124 de 1991, [Sitio de internet] disponible en: http://www.invima.gov.co/Invima/normatividad/docs_alimentos/resolucion_4124_1991.pdf. Fecha de consulta: 17 de julio de 2013.

MORATAYA, M. Caracterización farmacopéica de cuatro plantas aromáticas nativas de Guatemala: Albahaca de monte (*Ocinum micranthum*), orégano (*Lippia graveolens*), Salvia Sija (*Lippia alba*) y Salviyá (*Lippia chiapasensis*). Tesis de pregrado. Universidad San Carlos de Guatemala. **2006**. p. 14.

MOUREU, C. y DUFRAISSE, C. Catalysis and auto-oxidation. Anti-oxygenic and pro-oxygenic activity. *Chemical Reviews*. **3**. pp. 113-162.

MUÑOZ, A., CASTAÑEDA, M., BLANCO, K., CARDENAS, C., REYES, J., KOUZNETSOV, V. y STASHENKO, E. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica*. **2007**. 33. pp. 125-128.

MUÑOZ, A., KOUZNETSOV, V. y STASHENKO, E. Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, *trans*-anetol o estragol. *Revista de la Universidad Industrial de Santander, Salud*. **2009**. 41. pp. 287-294.

NAKAMURA, T., OKUYAMA, E., TSUKADA, A., YAMAZAKI, M., SATAKE, M., NISHIBE, S., DEYAMA, T., MORIYA, A., MARUNO, M. y NISHIMURA, H. Acteoside as the analgesic principle of cedron (*Lippia triphylla*), a Peruvian medicinal plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1997**. 45. pp. 499-504.

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

NOGUCHI, N., WATANABE, A. y HONGLIAN, S. Diverse functions of antioxidants. *Free Radical Research*. **2000**. 33. pp. 809-817.

NOGUEIRA, A., CARVALHO, R., SOUZA, C., CHAHOUD, I. y PAUMGARTTEN, F. Study on the embryofeto-toxicity of citral in the rat. *Toxicology*. **1995**. 96. pp. 105-113.

OLIVEIRA, D., LEITÃO, G., BIZZO, H., LOPES, D., ALVIANO, D., ALVIANO, C. y LEITÃO, S. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chemistry*. **2007**. 101. pp. 236-240.

OLIVERO, J., GUETTE, J. y STASHENKO, E. Acute 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.

OROZCO, H. Estudio comparativo de la actividad antioxidante (antirradicalaria) de aceites esenciales y extractos de orégano de monte (*Lippia origanoides*) y pronto alivio (*Lippia alba*) en un desosodorante en gel. Tesis de pregrado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2011**. pp. 75-80.

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 PharmTech Research*. **2010**. 2. pp. 232-239.

Papel de la informetría y de la cienciometría y su perspectiva nacional e internacional, [Sitio de internet] disponible en: <http://eprints.rclis.org/5162/1/sci06100.pdf>. Fecha de consulta: 17 de julio de 2013.

PARK, I., LEE, S., CHOI, D., PARK, J. y AHN, Y. Insecticidal activities of constituents in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtuse* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Stored Product Research*. **2003**. 39. pp. 375-384.

PASCUAL, M., SLOWING, K., CARRETERO, E., SÁNCHEZ, D. y VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. **2001**. 76. pp. 201-214.

PEREIRA, C. y MEIRELES, A. Evaluation of global yield, composition, antioxidant activity and cost of manufacturing of extracts from lemon verbena (*Aloysia triphylla* [L'HÉRIT.] Britton) and mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Journal of Food Process Engineering*. **2007**. 30. pp. 150-173.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. **2000**. 63. pp. 1035-1042.

PINO, J., ROSADO, A., BALUJA, R. y BORGES, P. Analysis of the essential oil of Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK). *Nahrung/Food*. **1989**. 33. pp. 289-295.

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.

PUERTAS, M., HILLEBRAND, S., STASHENKO, E. y WINTERHALTER, P. *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from Oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. **2002**. 17. pp. 380-384.

QNAIS, E., ABU-SAFIEH, K., ABU-DIEYWH, M. y ABDULLA, F. Antinociceptive effect of two flavonoids from *Aloysia triphylla* L. *Jordan Journal of Biological Sciences*. **2009**. 2. pp. 167-170.

RAGONE, M., SELLA, M., CONFORTI, P., VOLONTÉ, M. y CONSOLINI, A. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**. 113. pp. 258-266.

RAO, V. Phytochemicals as nutraceuticals-global approaches to their role in nutrition and health. InTech. Croacia **2012**. Capítulo 1. p. 3.

RASTRELLI, L., CACERES, A., MORALES, C., DE SIMONE, F. y AQUINO, R. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry*. **1998**. 49. pp. 1829-1832.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. y RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. **1999**. 26. pp. 1231-1237.

RICE-EVANS, C., MILLER, N. y PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. **1996**. 20. pp. 933-956.

ROJAS, L., MORA, D., CHATAING, B., GUERRERO, B. y USUBILLAGA, A. Chemical composition and bioactivity on bacteria and fungi of the essential oil from *Lippia micromera* Schauer. *Journal of Essential Oil Research*. **2009**. 12. pp. 69-75.

ROJAS, V. y SANTAMARÍA, M. Estudio del uso de mezclas de aceites esenciales y extractos de *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis* como antioxidantes naturales en cremas cosméticas. Tesis de pregrado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2011**. pp. 87-94.

RUBERTO, G. y BARATTA, M. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. **2000**. 69. pp. 167-174.

RUÍZ, C. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K., en tres estados fenológicos. Tesis de pregrado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2008**. p. 37.

SAHIDI, F. y ZHONG, Y. Bailey's industrial oil and fat products. John Wiley & Sons. **2005**. Capítulo 12. pp. 493-498.

SALGAR, W. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la

familia *Labiatae*. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. **2001**. pp. 48-64.

SANGWAN, N., FAROOQI, A., SHABIH, F. y SANGWAN, R. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. **2001**. 34. pp. 3-21.

SAYRE, L., ZELASKO, D., HARRIS, P., PERRY, G., SALOMON, R. y SMITH, M. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increase in alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. **1997**. 68. pp. 2092-2097.

SHAHIDI, F. Bailey's industrial oil & fat products. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. **2005**. Capítulo 11. pp. 432-433, 439, 472.

SHIBAMOTO, T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2006**. 41. pp. 12-25.

SHUKLA, R., KUMAR, A., SINGH, P. y DUBEY, N. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpetne aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. *International Journal of Food Microbiology*. **2009**. 135. pp. 165-170.

SKALTSA, H. y SHAMMAS, G. Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Medicinal*. **1988**. 54. p. 465.

SMITH, R. Supercritical fluids in separation science-the dreams, the reality and the future. *Journal of Chromatography A*. **1999**. 856. pp. 83-115.

Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation, [Sitio de internet] disponible en:

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol40/volume40.pdf>. Fecha de consulta: 18 de julio de 2013.

SRIVASTAVA, R. y CHOUDHARY, R. Species diversity and economic importance of the family Verbenaceae in arunachal Pradesh. *Bulletin of Arunachal Forest Research*. **2008**. 24. pp. 1-21.

STAPLES, G. y KRISTIANSEN, M. Ethnic culinary herbs. A guide to identification and cultivation in Hawaii. University in Hawaii Press. Hawaii. **1999**. p. 56.

STASHENKO, E. JARAMILLO, B. y MARTÍNEZ, J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*. **2004**. 1025. pp. 93-103.

STASHENKO, E., JARAMILLO, B. y MARTÍNEZ, J. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*. **2003**. 27. pp. 579-589.

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.

STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J., RUÍZ, C., ARIAS, G., DURÁN, C., SALGAR, W. y CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation base on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*. **2010**. 33. pp. 93-103.

STASHENKO, E., PUERTAS, M. y MARTÍNEZ, J. SPME determination of volatile aldehydes for evaluation on *in-vitro* antioxidant activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2002**. 373. pp. 70-74.

STASHENKO, E., PUERTAS, M., SALGAR, W., DELGADO, W. y MARTÍNEZ, J. Solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *Journal of Chromatography A*. **2000**. 886. pp. 175-181.

SU, L., YIN, J., CHARLES, D., ZHOU, K., MOORE, J. y YU, L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chemistry*. **2007**. 100. pp. 990-997.

TAVARES, E., JULIÃO, L., LOPES, D., BIZZO, H., LAGE, C. y LEITÃO, S. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2005**. 15. pp. 1-5.

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. **1997**. pp. 13-36.

TZIA, C. y LIADAKIS, G. Extraction optimization in food engineering. Marcel Dekker. Nueva York. **2003**. Capítulo 10. pp. 340-341.

VALENTÃO, P., ANDRADE, P., AREIAS, F., FERRERES, F. y SEABRA, R. Analysis of Vervain flavonoids by HPLC/Diode Array detection method. Its

application to quality control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**. 47. pp. 4579-4582.

VALENTÃO, P., FERNANDES, E., CARVALHO, F., ANDRADE, P., SEABRA, R. y BASTOS, M. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2002**. 25. pp. 1324-1327.

VENKATESH, R. y SOOD, D. A review of the physiological implications of antioxidants in food. Tesis de pregrado. Worcester Polytechnic Institute. **2011**. pp. 22, 24.

VERMERRIS, W. y NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry. Springer. Dordrecht. **2006**. Capítulo 1. pp. 2, 58.

VERNIN, G., LAGEOT, C., GAYDOU, E. y PARKANYIL, C. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K from El Salvador. *Flavour and Fragrance Journal*. **2001**. 16. pp. 219-226.

VICUÑA, G., STASHENKO, E. y FUENTES, J. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*. **2010**. 81. pp. 343-349.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2001**. 8. p.p. 303-313.

WOJDYLO, A., OSZMIANSKI, J. y CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. **2007**. 105. pp. 940-949.

YANISHLIEVA, N., MARINOVA, E. GORDON, M. y RANEVA, V. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. **1999**. 64. pp. 59-66.

ANEXOS

**ANEXO A. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS
COMPONENTES MAYORITARIOS DE LOS AE Y
EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS**

Figura 1.1. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (94-800 ppm y 940-23.500 ppm, respectivamente) del 1,8-cineol, obtenidas por GC-FID.

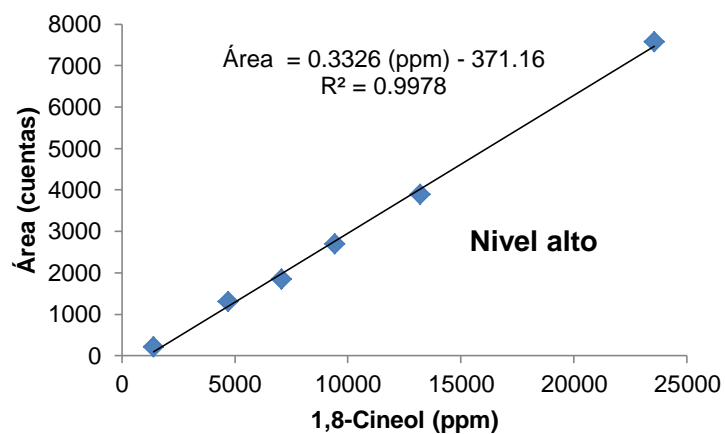
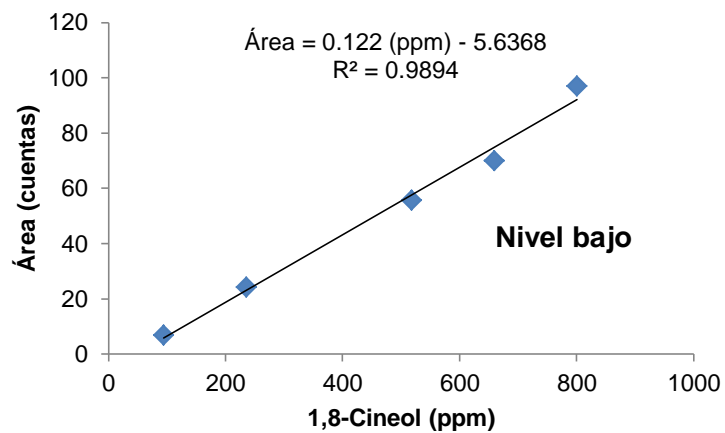


Figura 1.2. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (96-820 ppm y 970-29.400 ppm, respectivamente) del α -pineno, obtenidas por GC-FID.

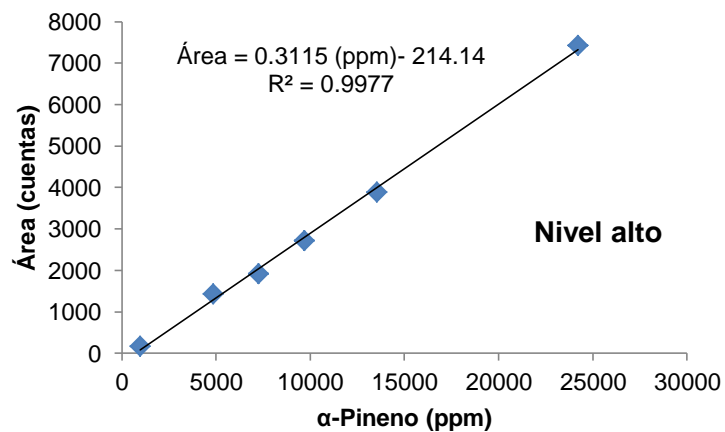
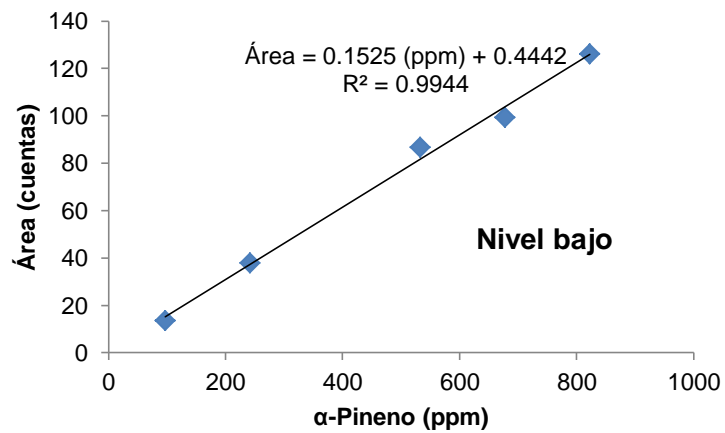


Figura 1.3. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (118-1000 ppm y 1200-29.500 ppm, respectivamente) de borneol, obtenidas por GC-FID.

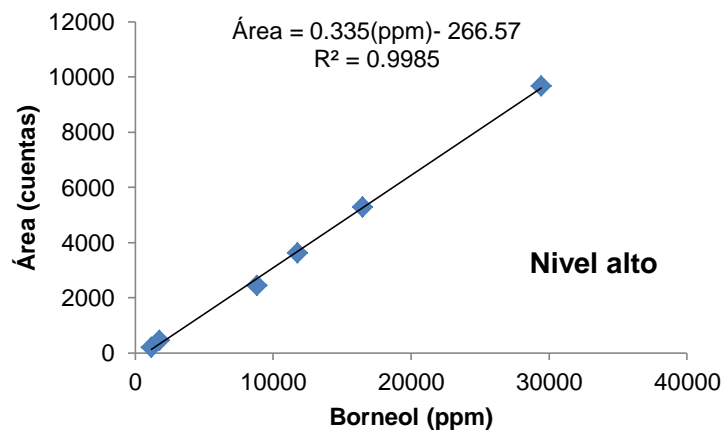
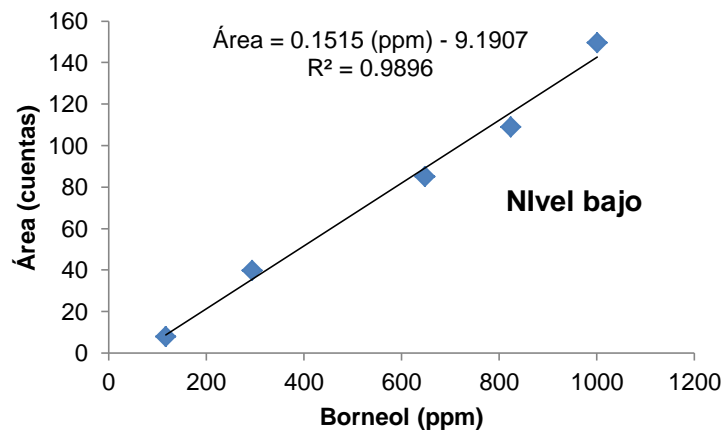


Figura 1.4. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (118-1000 ppm y 1180-29.450 ppm, respectivamente) de carvacrol, obtenidas por GC-FID.

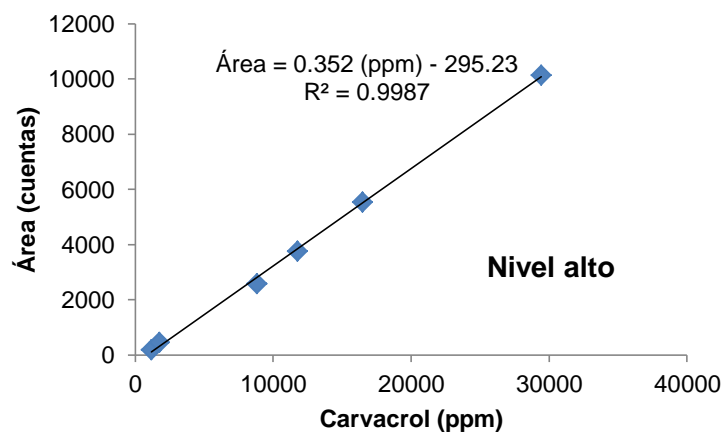
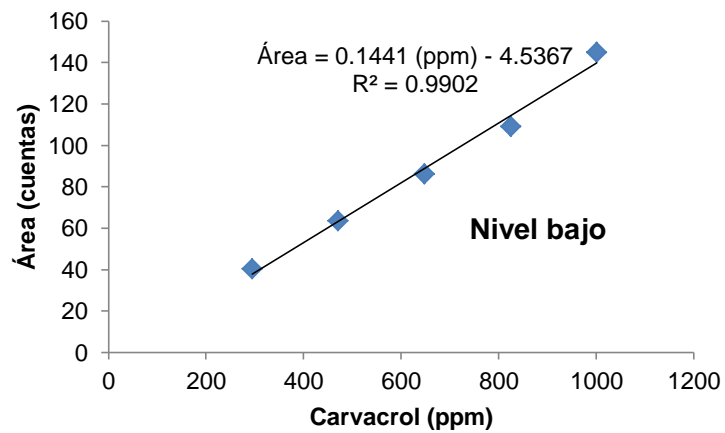


Figura 1.5. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (119-1000 ppm y 1190-29.700 ppm, respectivamente) de la carvona, obtenidas por GC-FID.

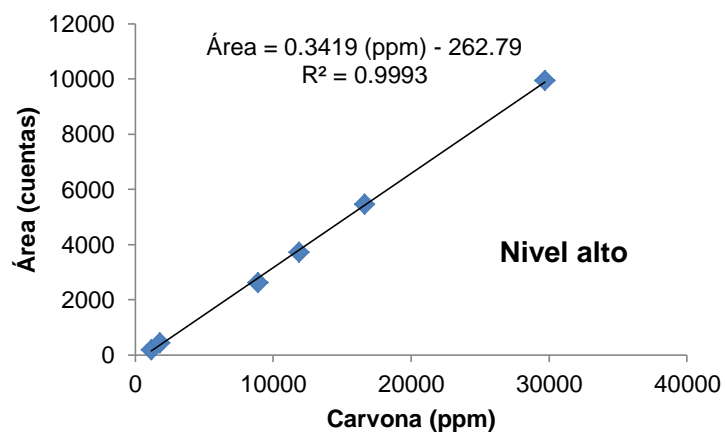
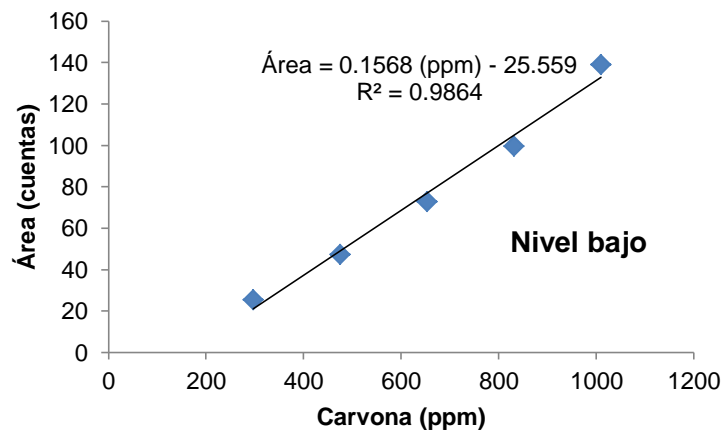


Figura 1.6. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (99-841 ppm y 990-24.750 ppm, respectivamente) del neral, obtenidas por GC-FID.

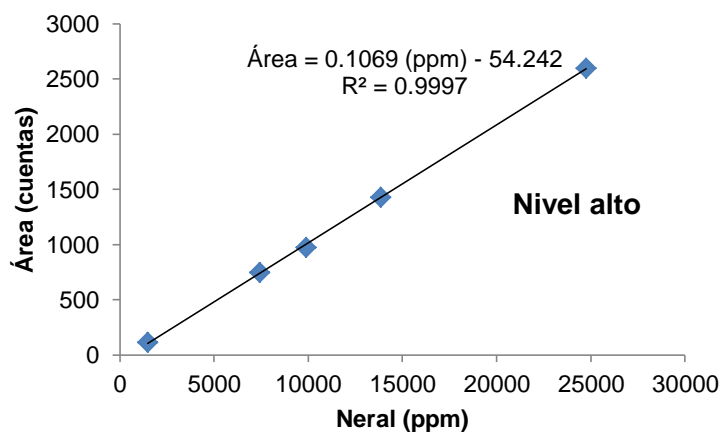
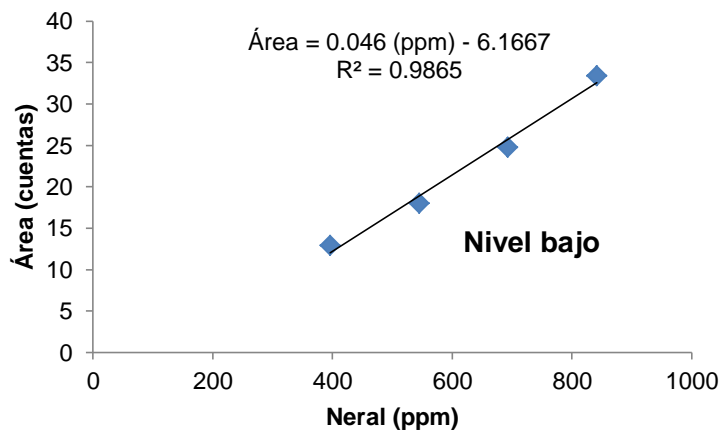


Figura 1.7. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (99-841 ppm y 990-24.750 ppm, respectivamente) del geranial, obtenidas por GC-FID.

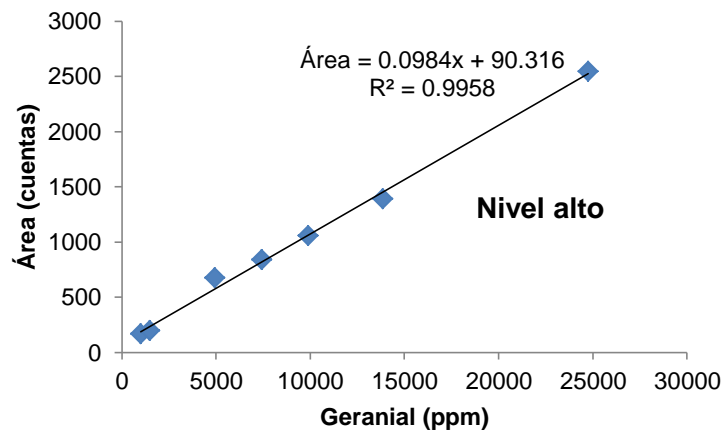
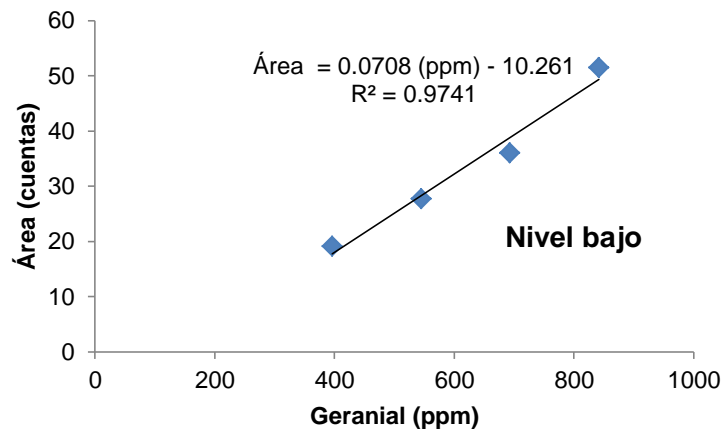


Figura 1.8. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (94-800 ppm y 940-23.500 ppm, respectivamente) del α -felandreno, obtenidas por GC-FID.

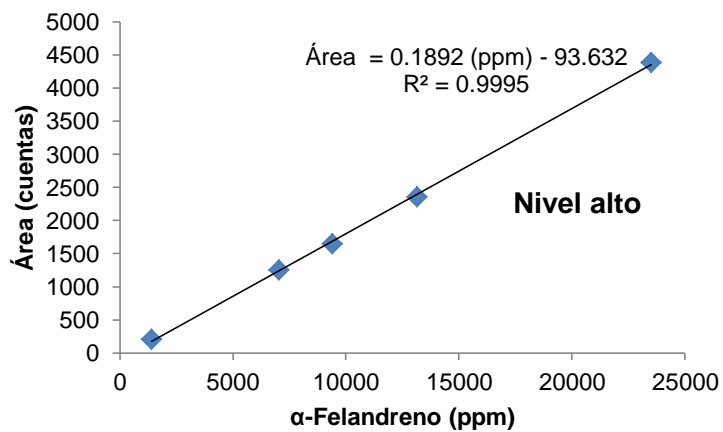
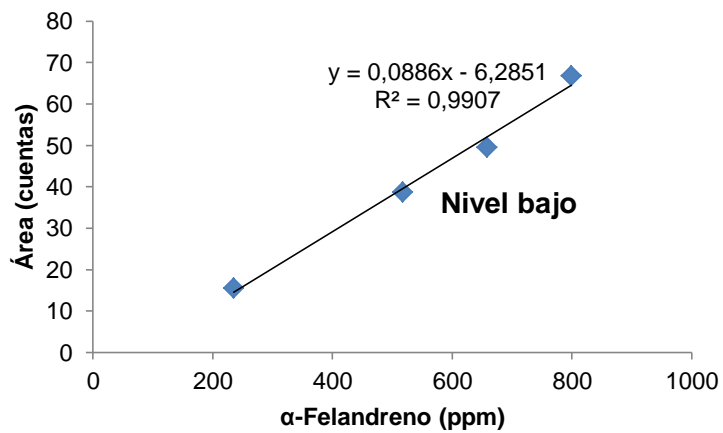


Figura 1.9. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (112-955 ppm y 1124-28100 ppm, respectivamente) del linalol, obtenidas por GC-FID.

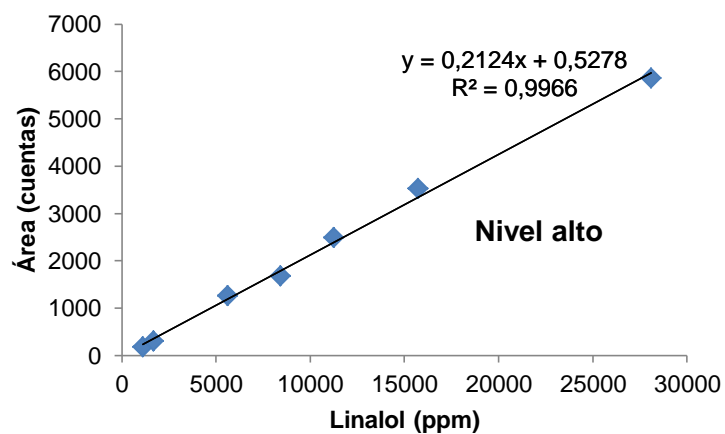
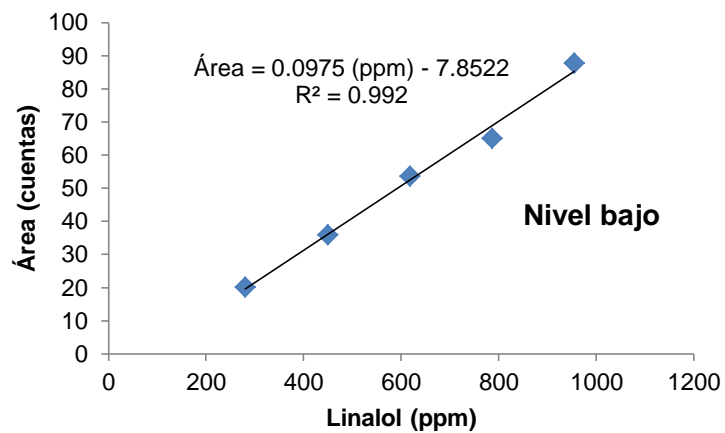


Figura 1.10. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (298-1013 ppm y 1192-29.800 ppm, respectivamente) del *p*-cimeno, obtenida por GC-FID.

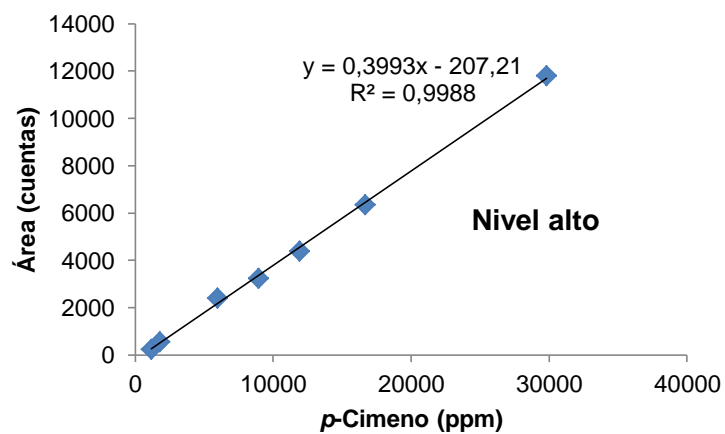
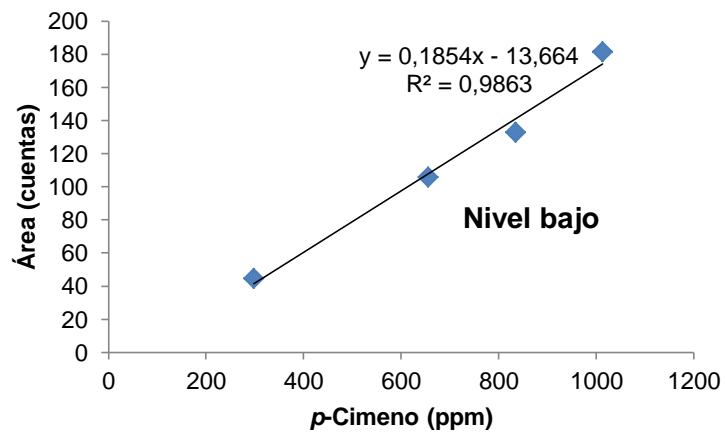


Figura 1.11. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (248-843 ppm y 992-24.800 ppm, respectivamente) del timol, obtenidas por GC-FID.

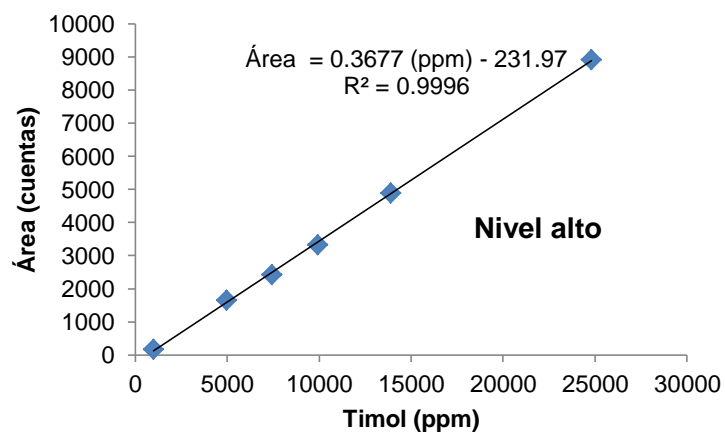
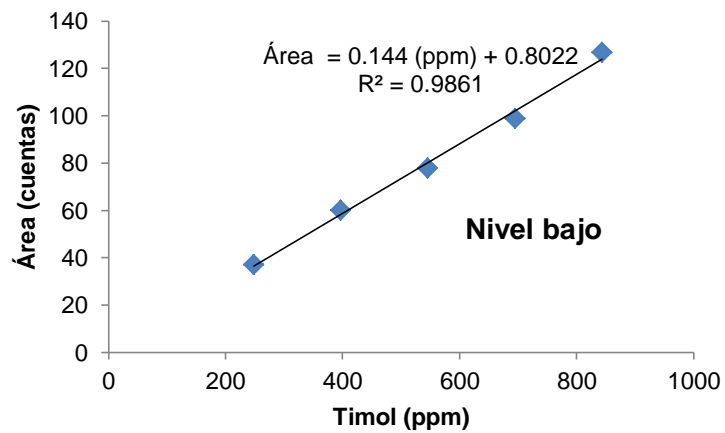
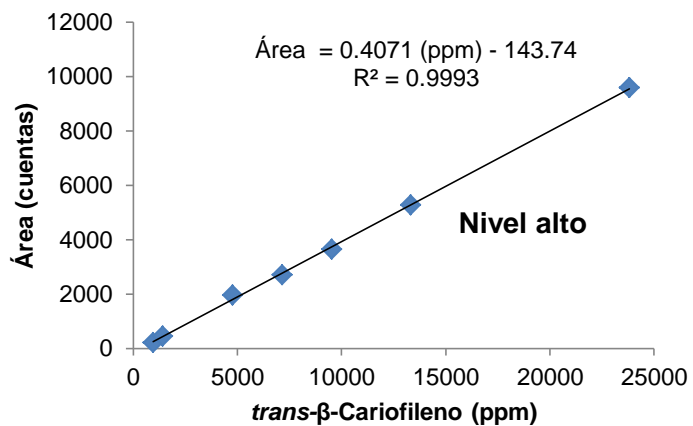
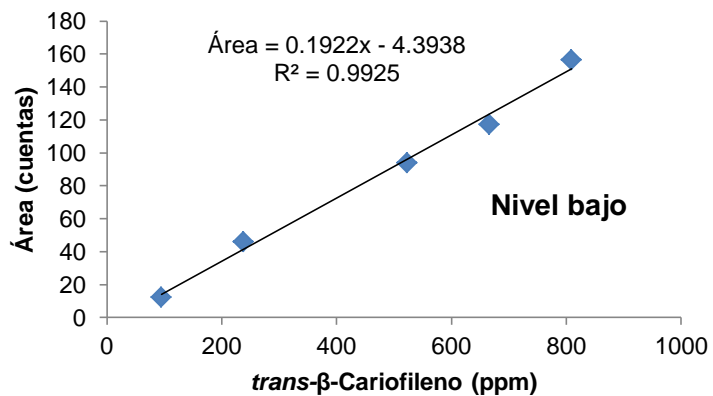


Figura 1.12. Curvas de calibración en niveles bajo y alto (95-809 ppm y 952-23.800 ppm, respectivamente) del *trans*- β -cariofileno, obtenida por GC-FID.



**ANEXO B. TABLAS DE COMPOSICIÓN DE LOS AE Y
EXTRACTOS OBTENIDOS CON CO₂ SUPERCRÍTICO
BAJO ESTUDIO**

Tabla 2.1. Composición química del AE de *L. origanoides*, quimiotipo Felandreno.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
1	α -Tujeno	HM	931	1028	0.48 \pm 0.032
2	α -Pineno	HM	937	1024	1.8 \pm 0.15
3	Camfeno	HM	955	1069	0.33 \pm 0.022
4	Sabineno	HM	975	1124	1.01 \pm 0.081
5	β -Pineno	HM	983	1112	0.50 \pm 0.042
6	β -Mirceno	HM	993	1166	1.45 \pm 0.092
7	α -Felandreno	HM	1011	1171	14.1 \pm 0.93
8	α -Terpineno	HM	1022	1184	0.46 \pm 0.033
9	<i>p</i> -Cimeno	HM	1029	1276	7.2 \pm 0.45
10	Limoneno	HM	1033	1204	7.6 \pm 0.17
11	1,8-Cineol	MO	1040	1219	12 \pm 1.3
12	<i>trans</i> - β -Ocimeno	HM	1047	1237	0.86 \pm 0.062
13	γ -Terpineno	HM	1065	1251	2.5 \pm 0.16
14	<i>cis</i> -Sabineno hidratado	MO	1073	1558	0.27 \pm 0.023
15	Terpinoleno	HM	1094	1289	0.41 \pm 0.024
16	Linalol	MO	1101	1549	0.81 \pm 0.052
17	<i>trans</i> -Sabineno hidratado	MO	1104	1472	0.34 \pm 0.014
18	<i>cis</i> - <i>p</i> -2-Mentenol	MO	1129	1573	0.31 \pm 0.024
19	<i>trans</i> - <i>p</i> -2-Mentenol	MO	1147	1635	0.18 \pm 0.012
20	δ -Terpineol	MO	1177	1630	0.39 \pm 0.011
21	Borneol	MO	1180	1713	0.03 \pm 0.013
22	Terpinen-4-ol	MO	1187	1578	1.22 \pm 0.053
23	α -Terpineol	MO	1198	1706	0.93 \pm 0.032
24	<i>cis</i> -Piperitol	MO	1204	-	0.11 \pm 0.081
25	<i>cis</i> -Sabinol	MO	1210	1679	0.16 \pm 0.025
26	<i>trans</i> -Piperitol	MO	1214	-	0.14 \pm 0.072
27	Metil timil éter	MO	1231	1600	0.03 \pm 0.093
28	Timol	MO	1294	2188	4.23 \pm 0.052
29	Carvacrol	MO	1303	2218	0.05 \pm 0.022
30	α -Copaeno	HS	1389	1505	0.09 \pm 0.023
31	<i>trans</i> - β -Cariofileno	HS	1434	1616	1.99 \pm 0.023
32	β -Copaeno	HS	1443	1609	16.02 \pm 0.063
33	Aromadendreno	HS	1454	1624	0.81 \pm 0.032
34	α -Humuleno	HS	1470	1688	0.19 \pm 0.074
35	<i>ar</i> -Curcumeno	HS	1486	1779	8.2 \pm 0.34

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
36	Germacreno D	HS	1488	1724	0.5 ± 0.37
37	α-Zingibereno	HS	1502	1710	1.21 ± 0.063
38	β-Bisaboleno	HS	1513	1733	1.49 ± 0.062
39	γ-Cadineno	HS	1522	1772	0.41 ± 0.023
40	δ-Cadineno	HS	1528	1779	0.22 ± 0.013
41	cis-Calameneno	HS	1533	1846	1.15 ± 0.062
42	Elemol	SO	1559	2089	0.09 ± 0.051
43	Espatulenol	SO	1595	2138	1.15 ± 0.031
44	Óxido de cariofileno	SO	1602	2002	0.14 ± 0.034
45	Guaiol	SO	1611	2100	0.46 ± 0.021
46	α-Cadinol	SO	1652	2198	2.86 ± 0.061

Tabla 2.2. Composición química del AE de *L. origanoides*, quimiotipo Timol.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
1	α-Tujeno	HM	931	1028	0.48 ± 0.022
2	α-Pineno	HM	937	1024	0.16 ± 0.012
3	1-Octen-3-ol		979	1452	0.13 ± 0.012
4	β-Pineno	HM	982	1112	0.04 ± 0.014
5	β-Mirceno	HM	993	1166	2.09 ± 0.012
6	α-Felandreno	HM	1011	1171	0.11 ± 0.013
7	Δ ³ -Careno	HM	1012	1153	0.08 ± 0.012
8	α-Terpineno	HM	1022	1184	0.98 ± 0.015
9	p-Cimeno	HM	1029	1276	4.03 ± 0.064
10	Limoneno	HM	1033	1204	0.22 ± 0.011
11	β-Felandreno	HM	1036	1213	0.062 ± 0.015
12	1,8-Cineol	MO	1040	1219	0.11 ± 0.014
13	trans-β-Ocimeno	HM	1047	1237	0.11 ± 0.015
14	γ-Terpineno	HM	1062	1251	3.36 ± 0.051
15	cis-Sabineno hidratado	MO	1073	1558	0.17 ± 0.012
16	Linalol	MO	1101	1549	0.23 ± 0.013
17	trans-Sabineno hidratado	MO	1104	1472	0.16 ± 0.014
18	Terpinen-4-ol	MO	1187	1578	0.8 ± 0.17
19	Umbellulona	MO	1189	1657	0.12 ± 0.017
20	Metil timil éter	MO	1231	1600	0.85 ± 0.023
21	Timol	MO	1294	2188	76.02 ± 0.063

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
22	Carvacrol	MO	1303	2218	1.95 ± 0.014
23	Eugenol	MO	1357	2074	0.61 ± 0.011
24	<i>trans</i> -β-Cariofileno	HS	1434	1616	2.22 ± 0.026
25	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	HS	1440	1595	0.37 ± 0.013
26	α-Humuleno	HS	1470	1688	1.22 ± 0.027
27	<i>ar</i> -Curcumeno	HS	1486	1779	2 ± 1.5
28	α-Zingibereno	HS	1502	1710	0.18 ± 0.015
29	<i>cis</i> -Calameneno	HS	1533	1846	0.06 ± 0.012
30	Óxido de cariofileno	SO	1602	2002	0.28 ± 0.014

Tabla 2.3. Composición química del AE de *L. origanoides*, quimiotipo Carvacrol.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
1	α-Tujeno	HM	931	1028	0.89 ± 0.093
2	α-Pineno	HM	937	1024	0.20 ± 0.022
3	β-Mirceno	HM	993	1166	2.7 ± 0.28
4	α-Felandreno	HM	1011	1171	0.17 ± 0.023
5	Δ ³ -Careno	HM	1012	1153	0.12 ± 0.011
6	α-Terpineno	HM	1022	1184	1.6 ± 0.16
7	<i>p</i> -Cimeno	HM	1029	1276	7.6 ± 0.77
8	Limoneno	HM	1033	1204	0.28 ± 0.051
9	<i>trans</i> -β-Ocimeno	HM	1047	1237	0.17 ± 0.024
10	γ-Terpineno	HM	1065	1251	9.4 ± 0.92
11	<i>cis</i> -Sabineno hidratado	MO	1073	1558	0.28 ± 0.035
12	Linalol	MO	1101	1549	0.11 ± 0.016
13	Borneol	MO	1180	1713	0.25 ± 0.047
14	Terpinen-4-ol	MO	1187	1578	0.60 ± 0.081
15	Metil timil éter		1231	1600	0.80 ± 0.082
16	Timol	MO	1294	2188	12 ± 1.9
17	Carvacrol	MO	1303	2218	54 ± 4.4
18	Acetato de carvacrilo	MO	1348		0.063 ± 0.021
19	Eugenol	MO	1357	2074	0.41 ± 0.062
20	<i>trans</i> -β-Cariofileno	HS	1434	1616	2.9 ± 0.34
21	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	HS	1440	1595	0.16 ± 0.013
22	α-Humuleno	HS	1470	1688	1.6 ± 0.19
23	β-Bisaboleno	HS	1513	1733	0.47 ± 0.062

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
24	<i>cis</i> -Calameneno	HS	1533	1846	0.14 ± 0.013
25	Óxido de cariofileno	SO	1602	2002	0.10 ± 0.013
26	Epóxido de humuleno II	SO	1627	1962	0.09 ± 0.021

Tabla 2.4. Composición química del AE de *L. alba*, quimiotipo Carvona.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
1	α-Pineno	HM	937	1024	0.05 ± 0.013
2	Camfeno	HM	955	1069	0.13 ± 0.023
3	1-Octen-3-ol		979	1452	0.18 ± 0.011
4	β-Mirceno	HM	993	1166	0.44 ± 0.042
5	α-Felandreno	HM	1011	1171	0.05 ± 0.013
6	Limoneno	HM	1033	1204	37.85 ± 0.06
7	1,8-Cineol	MO	1040	1219	0.05 ± 0.012
8	<i>trans</i> -β-Ocimeno	HM	1047	1237	0.33 ± 0.021
9	Linalol	MO	1101	1549	0.26 ± 0.015
10	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	MO	1138	1456	0.10 ± 0.013
11	Borneol	MO	1180	1713	0.34 ± 0.012
12	<i>cis</i> -Dihidro carvona	MO	1203	1517	0.08 ± 0.015
13	<i>trans</i> -Dihidro carvona	MO	1211	1539	0.09 ± 0.018
14	<i>cis</i> -Carveol	MO	1229	1873	0.23 ± 0.012
15	Carvona	MO	1259	1750	48.2 ± 0.25
16	Piperitona	MO	1265	1643	1.24 ± 0.027
17	Piperitenona	MO	1349	1838	2.15 ± 0.029
18	<i>trans</i> -β-Cariofileno	HS	1434	1616	0.12 ± 0.016
19	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	HS	1440	1595	0.07 ± 0.017
20	γ-Muroleno	HS	1463	1706	0.20 ± 0.014
21	α-Humuleno	HS	1470	1688	0.31 ± 0.015
22	Germacreno D	HS	1495	1724	0.05 ± 0.013
23	α-Zingibereno	HS	1502	1710	6.82 ± 0.026
24	δ-Amorfeno	HS	1514	1669	0.22 ± 0.029
25	<i>trans</i> -γ-Bisaboleno	HS	1536	1692	0.18 ± 0.013
26	Óxido de cariofileno	SO	1602	2002	0.14 ± 0.014

Tabla 2.5. Composición química del AE de *L. alba*, quimiotipo Citral.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
1	α -Pino	HM	937	1024	0.043 \pm 0.042
2	1-Octen-3-ol		979	1452	0.22 \pm 0.015
3	<i>p</i> -Cimeno	HM	1029	1276	0.07 \pm 0.022
4	Limoneno	HM	1033	1204	0.39 \pm 0.074
5	1,8-Cineol	MO	1040	1219	0.21 \pm 0.034
6	<i>trans</i> - β -Ocimeno	HM	1047	1237	0.05 \pm 0.021
7	Linalol	MO	1101	1549	0.6 \pm 0.11
8	Citronelal	MO	1153	1904	0.13 \pm 0.035
9	<i>cis</i> -Crisantenol	HM	1162	1439	0.13 \pm 0.081
10	Epóxido de rosefurano	MO	1171	1608	0.23 \pm 0.065
11	Borneol	MO	1180	1713	1.0 \pm 0.19
12	Nerol	MO	1227	1805	0.05 \pm 0.093
13	<i>cis</i> -Carveol	MO	1229	1873	1.7 \pm 0.29
14	Neral	MO	1244	1692	31.3 \pm 0.71
15	Geraniol	MO	1253	1854	8.8 \pm 0.33
16	Geranial	MO	1274	1740	45 \pm 1.3
17	Piperitenona	MO	1349	1838	0.17 \pm 0.043
18	α -Copaeno	HS	1389	1505	1.69 \pm 0.012
19	<i>trans</i> - β -Cariofileno	HS	1434	1616	0.71 \pm 0.035
20	<i>trans</i> - β -Farneseno	HS	1456	1668	0.29 \pm 0.016
21	α -Humuleno	HS	1470	1688	0.17 \pm 0.013
22	Biciclosesquifelandreno	HS	1493	1632	0.33 \pm 0.024
23	Germacreno D	HS	1495	1724	0.76 \pm 0.027
24	Isobutanoato de geranilo	MO	1505	1643	0.04 \pm 0.016
25	α -Bulneseno	HS	1512	1728	0.40 \pm 0.022
26	γ -Cadineno	HS	1522	1772	0.18 \pm 0.088
27	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	HS	1536	1692	0.79 \pm 0.042
28	<i>trans</i> -Nerolidol	SO	1563	1938	0.18 \pm 0.014
29	Óxido de cariofileno	SO	1602	2002	1.32 \pm 0.021
30	Epóxido de humuleno II	SO	1627	1962	0.04 \pm 0.042

Tabla 2.6. Composición química del AE de *L. graveolens*.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
1	α -Tujeno	HM	931	1028	0.38 \pm 0.022
2	α -Pino	HM	937	1024	0.11 \pm 0.051
3	1-Octen-3-ol		979	1452	0.22 \pm 0.014
4	β -Mirceno	HM	993	1166	1.94 \pm 0.065
5	α -Felandreno	HM	1011	1171	0.10 \pm 0.045
6	Δ^3 -Careno	HM	1012	1153	0.07 \pm 0.021
7	α -Terpineno	HM	1022	1184	0.86 \pm 0.024
8	<i>p</i> -Cimeno	HM	1029	1276	4.8 \pm 0.12
9	Limoneno	HM	1033	1204	0.20 \pm 0.041
10	<i>trans</i> - β -Ocimeno	HM	1047	1237	0.10 \pm 0.035
11	γ -Terpineno	HM	1065	1251	3.63 \pm 0.098
12	<i>cis</i> -Sabineno hidratado	MO	1073	1558	0.27 \pm 0.014
13	Linalol	MO	1101	1549	1.13 \pm 0.042
14	Borneol	MO	1180	1713	0.28 \pm 0.071
15	Terpinen-4-ol	MO	1187	1578	0.6 \pm 0.11
16	Metil timil éter		1231	1600	0.57 \pm 0.021
17	Geraniol	MO	1256	1854	0.30 \pm 0.014
18	Timol	MO	1294	2188	64.6 \pm 0.32
19	Carvacrol	MO	1303	2218	12.19 \pm 0.082
20	Eugenol	MO	1357	2074	0.53 \pm 0.081
21	<i>trans</i> - β -Cariofileno	HS	1434	1616	2.94 \pm 0.027
22	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	HS	1440	1595	0.40 \pm 0.033
23	Aromadendreno	HS	1454	1624	0.11 \pm 0.031
24	α -Humuleno	HS	1470	1688	1.50 \pm 0.024
25	Germacreno D	HS	1484	1724	0.28 \pm 0.012
26	α -Zingibereno	HS	1502	1710	0.07 \pm 0.024
27	β -Bisaboleno	HS	1513	1733	0.09 \pm 0.023
28	δ -Cadineno	HS	1522	1772	0.380 \pm 0.034
29	Óxido de cariofileno	SO	1602	2002	0.07 \pm 0.017
30	Epóxido de humuleno II	SO	1627	1962	0.09 \pm 0.019

Tabla 2.7. Composición química del AE de *L. micromera*.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
1	α-Pineno	HM	937	1024	0.291 ± 0.023
2	Sabineno	HM	975	1124	0.40 ± 0.031
3	β-Pineno	HM	983	1112	0.08 ± 0.019
4	β-Mirceno	HM	993	1166	2.27 ± 0.021
5	α-Felandreno	HM	1011	1171	0.23 ± 0.071
6	Δ ³ -Careno	HM	1011	1153	0.14 ± 0.018
7	α-Terpineno	HM	1022	1184	2.83 ± 0.014
8	p-Cimeno	HM	1029	1276	6.23 ± 0.053
9	Limoneno	HM	1033	1204	0.42 ± 0.072
10	1,8-Cineol	MO	1040	1219	1.45 ± 0.011
11	<i>trans</i> -β-Ocimeno	HM	1047	1237	0.12 ± 0.012
12	γ-Terpineno	HM	1065	1251	18.04 ± 0.024
13	<i>cis</i> -Sabineno hidratado	MO	1073	1558	0.25 ± 0.041
14	Terpinoleno	HM	1089	1289	0.13 ± 0.027
15	Linalol	MO	1101	1549	0.06 ± 0.059
16	<i>trans</i> -Sabineno hidratado	MO	1104	1472	0.12 ± 0.012
17	Terpinen-4-ol	MO	1187	1578	0.26 ± 0.072
18	Umbellolona	MO	1189	1657	0.19 ± 0.025
19	α-Terpineol	MO	1198	1706	0.07 ± 0.011
20	Timol	MO	1294	2188	53.55 ± 0.015
21	Carvacrol	MO	1303	2218	0.14 ± 0.017
22	Acetato de timilo	MO	1356	1859	3.04 ± 0.045
23	α-Copaeno	HS	1389	1505	0.07 ± 0.031
24	<i>trans</i> -β-Cariofileno	HS	1434	1616	5.54 ± 0.039
25	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	HS	1440	1595	0.23 ± 0.082
26	<i>allo</i> -Aromadendreno	HS	1474	1661	0.62 ± 0.026
27	Germacreno D	HS	1495	1724	2.25 ± 0.021
28	Biciclogermacreno	HS	1508	1747	0.40 ± 0.027
29	<i>cis</i> -Calameneno	HS	1533	1846	0.06 ± 0.013
30	Espatulenol	SO	1595	2138	0.05 ± 0.011
31	Óxido de cariofileno	SO	1602	2002	0.14 ± 0.038

Tabla 2.8. Composición química del AE de *L. americana*.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (\pm s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
1	α -Pinenol	HM	937	1024	0.30 \pm 0.082
2	Sabinol	HM	975	1124	5.32 \pm 0.013
3	α -Felandrenol	HM	1011	1171	0.08 \pm 0.041
4	Limonol	HM	1033	1204	0.19 \pm 0.016
5	β -Felandrenol	HM	1036	1213	0.18 \pm 0.055
6	<i>trans</i> - β -Ocimenol	HM	1047	1237	0.41 \pm 0.047
7	Terpinolol	HM	1094	1289	0.06 \pm 0.049
8	Neral	MO	1244	1692	0.18 \pm 0.054
9	Geraniol	MO	1253	1854	0.59 \pm 0.052
10	Geranial	MO	1274	1740	1.04 \pm 0.080
11	Timol	MO	1294	2188	1.54 \pm 0.061
12	α -Copaenol	HS	1389	1506	0.08 \pm 0.072
13	β -Elemol	HS	1392	1604	4.16 \pm 0.055
14	<i>trans</i> - β -cariofilol	HS	1434	1616	26.43 \pm 0.29
15	β -Copaenol	HS	1443	1729	0.44 \pm 0.024
16	<i>trans</i> - β -Farnesol	HS	1456	1668	0.14 \pm 0.011
17	γ -Muurolo	HS	1463	1706	0.97 \pm 0.026
18	α -Humulol	HS	1470	1688	2.39 \pm 0.038
19	<i>ar</i> -Curcumol	HS	1486	1779	1.14 \pm 0.085
20	Germacrenol D	HS	1495	1724	37.7 \pm 0.27
21	β -Selinol	HS	1506	1738	0.50 \pm 0.097
22	Biciclogermacrenol	HS	1508	1747	6.73 \pm 0.043
23	β -Bisabolol	HS	1515	1751	0.29 \pm 0.022
24	δ -Cadinol	HS	1528	1772	1.54 \pm 0.028
25	<i>cis</i> -Calamenol	HS	1533	1846	2.18 \pm 0.043
26	<i>trans</i> -Cadinol-1,4-dienol	HS	1545	1796	1.93 \pm 0.021
27	<i>trans</i> -Nerolidol	SO	1564	1938	0.22 \pm 0.029
28	Germacrenol B	HS	1575	1837	0.19 \pm 0.052
29	Germacrenol D-4-ol	SO	1591	2062	0.68 \pm 0.074
30	Óxido de cariofilol	SO	1602	2002	1.31 \pm 0.079
31	α -Cadinol	SO	1669	2198	0.52 \pm 0.034

Tabla 2.9. Composición química del AE de *L. citriodora*.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL		Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	DB-WAX	
1	α-Pineno	HM	937	1024	0.18 ± 0.012
2	Sabineno	HM	975	1124	0.28 ± 0.062
3	β-Mirceno	HM	993	1166	0.12 ± 0.093
4	α-Terpineno	HM	1022	1184	0.05 ± 0.034
5	p-Cimeno	HM	1029	1276	0.24 ± 0.018
6	Limoneno	HM	1033	1204	4.6 ± 0.29
7	1,8-Cineol	MO	1040	1219	1.12 ± 0.062
8	trans-β-Ocimeno	HM	1047	1237	1.61 ± 0.092
9	γ-Terpineno	HM	1065	1251	0.68 ± 0.046
10	cis-Sabineno hidratado	MO	1073	1558	0.12 ± 0.054
11	Linalol	MO	1101	1549	0.27 ± 0.027
12	cis-Óxido de limoneno	MO	1138	1456	0.05 ± 0.041
13	cis-Isocitral	MO	1160	1576	0.83 ± 0.025
14	Epóxido de rosefurano	MO	1171	1608	0.15 ± 0.066
15	trans-Isocitral	MO	1181		0.13 ± 0.072
16	Terpinen-4-ol	MO	1187	1578	0.34 ± 0.035
17	α-Terpineol	MO	1200	1706	0.41 ± 0.012
18	Nerol	MO	1228	1805	2.6 ± 0.13
19	Neral	MO	1245	1692	24.7 ± 0.72
20	Geraniol	MO	1252	1854	2.59 ± 0.063
21	Geranial	MO	1274	1740	34.1 ± 0.99
22	Timol	MO	1294	2188	3.78 ± 0.063
23	α-Copaeno	HS	1389	1505	0.51 ± 0.024
24	trans-β-cariofileno	HS	1434	1616	0.21 ± 0.041
25	trans-β-Farneseno	HS	1457	1668	0.14 ± 0.052
26	α-Humuleno	HS	1470	1688	0.44 ± 0.014
27	ar-Curcumeno	HS	1487	1779	4.03 ± 0.089
28	Germacreno D	HS	1495	1724	0.05 ± 0.026
29	α-Zingibereno	HS	1502	1710	0.33 ± 0.014
30	Biciclogermacreno	HS	1509	1747	3.95 ± 0.066
31	trans-Nerolidol	SO	1536	1692	2.39 ± 0.069
32	Espatuleno	SO	1593	2138	3.84 ± 0.056
33	Óxido de cariofileno	SO	1602	2002	2.07 ± 0.044
34	α-Cadinol	SO	1664	2198	0.43 ± 0.043

Tabla 2.10. Composición química del extracto obtenido por SFE de *L. origanoides*, quimiotipo Timol.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL	Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	
1	<i>p</i> -Cimeno	HM	1029	0.54 ± 0.023
2	Timol	MO	1294	88.75 ± 0.096
3	Carvacrol	MO	1303	1.86 ± 0.011
4	<i>trans</i> -β-Cariofileno	HS	1434	1.73 ± 0.045
5	<i>trans</i> -α- Bergamoteno	HS	1443	1.55 ± 0.027
6	α-Humuleno	HS	1470	1.07 ± 0.026
7	α-Zingibereno	HS	1502	0.26 ± 0.078
8	Óxido de cariofileno	SO	1602	0.46 ± 0.034
9	Esclareno	C ₂₀ H ₃₂	1959	3.8 ± 0.11

Tabla 2.11. Composición química del extracto obtenido por SFE de *L. origanoides*, quimiotipo Carvacrol.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL	Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	
1	<i>p</i> -Cimeno	HM	1029	4.8 ± 0.24
2	γ-Terpineno	HM	1065	4.2 ± 0.18
3	Timol	MO	1294	36.8 ± 0.16
4	Carvacrol	MO	1303	48.5 ± 0.32
5	<i>trans</i> -β-Cariofileno	HS	1434	3.88 ± 0.087
6	α-Humuleno	HS	1470	1.96 ± 0.055

Tabla 2.12. Composición química del extracto obtenido por SFE de *L. origanoides*, quimiotipo Felandreno.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL	Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	
1	α-Pineno	HM	937	1.27 ± 0.023
2	α-Felandreno	HM	1011	9.52 ± 0.078
3	<i>p</i> -Cimeno	HM	1029	7.01 ± 0.063
4	Limoneno	HM	1033	3.03 ± 0.045
5	1,8-Cineol	MO	1040	9.46 ± 0.098
6	γ-Terpineno	HM	1065	1.83 ± 0.022

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL	Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	
7	Timol	MO	1294	11.3 ± 0.14
8	<i>trans</i> -β-Cariofileno	HS	1434	25.0 ± 0.48
9	Germacreno D	HS	1457	0.96 ± 0.064
10	α-Humuleno	HS	1470	12.7 ± 0.22
11	<i>allo</i> -aromadendreno	HS	1474	0.87 ± 0.082
12	Biciclogermacreno	HS	1509	0.58 ± 0.014
13	<i>cis</i> -Calameneno	HS	1533	2.02 ± 0.065
14	Óxido de cariofileno	SO	1602	3.2 ± 0.13
15	α-Eudesmol	SO	1672	4.7 ± 0.21
16	C ₁₀ H ₁₄ O	MO	1680	4.0 ± 0.15
17	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1838	2.4 ± 0.19

Tabla 2.13. Composición química del extracto obtenido por SFE de *L. alba*, quimiotipo Citral.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL	Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	
1	Limoneno	HM	1033	1.01 ± 0.062
2	Linalol	MO	1101	0.65 ± 0.034
3	<i>cis</i> -Carveol	MO	1229	0.69 ± 0.012
4	Neral	MO	1244	28.4 ± 0.38
5	Geraniol	MO	1253	4.69 ± 0.025
6	Geranial	MO	1274	35.6 ± 0.37
7	α-Copaeno	HS	1389	1.35 ± 0.062
8	<i>trans</i> -β-Cariofileno	HS	1434	13.3 ± 0.35
9	Germacreno D	HS	1457	3.5 ± 0.14
10	α-Humuleno	HS	1470	2.67 ± 0.074
11	Biciclosesquifelandreno	HS	1493	0.44 ± 0.023
12	Biciclogermacreno	HS	1509	1.17 ± 0.022
13	<i>cis</i> -Calameneno	HS	1533	2.26 ± 0.027
14	Óxido de cariofileno	SO	1602	3.05 ± 0.038

Tabla 2.14. Composición química del extracto obtenido por SFE de *L. alba*, quimiotipo Carvona.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL DB-5	Cantidad relativa, % ($\pm s$, n=3)
1	Limoneno	HM	1033	2.7 \pm 0.19
2	Carvona	MO	1211	47.1 \pm 1.1
3	Germacreno D	HS	1457	46.9 \pm 0.59
4	<i>allo</i> -aromadendreno	HS	1474	1.41 \pm 0.034

Tabla 2.15. Composición química del extracto obtenido por SFE de *L. graveolens*.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL DB-5	Cantidad relativa, % ($\pm s$, n=3)
1	β -Mirceno	HM	993	0.82 \pm 0.023
2	<i>p</i> -Cimeno	HM	1029	3.4 \pm 0.11
3	γ -Terpineno	HM	1065	1.52 \pm 0.055
4	Timol, metil éter	MO	1231	0.67 \pm 0.046
5	Timol	MO	1294	85.9 \pm 0.15
6	<i>trans</i> - β -Cariofileno	HS	1434	3.95 \pm 0.097
7	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	HS	1440	0.57 \pm 0.011
8	α -Humuleno	HS	1470	1.88 \pm 0.053
9	Biciclogermacreno	HS	1509	0.32 \pm 0.025
10	Óxido de cariofileno	SO	1602	0.34 \pm 0.013
11	Fitol		2108	0.57 \pm 0.045

Tabla 2.16. Composición química del extracto obtenido por SFE de *L. americana*.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL DB-5	Cantidad relativa, % ($\pm s$, n=3)
1	α -Copaeno	HS	1389	7.9 \pm 0.35
2	<i>trans</i> - β -Cariofileno	HS	1434	23.6 \pm 0.71
3	Germacreno D	HS	1457	34.8 \pm 0.46
4	α -Humuleno	HS	1470	2.34 \pm 0.032
5	<i>allo</i> -aromadendreno	HS	1474	3.61 \pm 0.065
6	Biciclogermacreno	HS	1508	4.25 \pm 0.067
7	<i>cis</i> -Calameneno	HS	1533	8.1 \pm 0.29
8	δ -Amorfenol	HS	1536	2.09 \pm 0.074
9	Espatulenol	SO	1595	5.5 \pm 0.34
10	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1610	2.72 \pm 0.061

Tabla 2.17. Composición química del extracto obtenido por SFE de *L. citriodora*.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL	Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	
1	Ácido dodecanoico		1558	78.9 ± 0.88
2	Dodecanoato de etilo		1592	3.59 ± 0.092
3	Hexadodecanoato de etilo		1993	8.0 ± 0.63
4	Fitol		2108	7.59 ± 0.025
5	C ₁₈ H ₃₆		2164	1.9 ± 0.13

Tabla 2.18. Composición química del extracto obtenido por SFE de *L. micromera*.

N° Pico	Compuesto	TIPO	IRL	Cantidad relativa, % (±s, n=3)
			DB-5	
1	Mirceno	HM	993	1.04 ± 0.054
2	<i>p</i> -Cimeno	HM	1029	18.4 ± 0.77
3	1,8-Cineol	MO	1040	3.01 ± 0.056
4	Metil timil éter		1231	16.8 ± 0.23
5	Timol	MO	1294	43.8 ± 0.54
6	<i>trans</i> -β-Cariofileno	HS	1434	5.3 ± 0.18
7	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	MO	1443	8.6 ± 0.84
8	Óxido de cariofileno	SO	1602	2.26 ± 0.092

Tabla 2.19. Cuantificación por HPLC-DAD de tocoferoles encontrados en los extractos, obtenidos con CO₂ supercrítico, del género *Lippia*.

Especie	δ-Tocoferol		γ-Tocoferol		α-Tocoferol	
	Área	mg/g extracto	Área	mg/g extracto	Área	mg/g extracto
Extractos supercríticos	-	-	-	-	-	-
<i>L. origanoides</i> , Timol	259.1	-	-	-	-	-
<i>L. origanoides</i> , Felandreno	289.9	-	-	-	-	-
<i>L. origanoides</i> , Carvacrol	172.2	-	-	-	-	-
<i>L. alba</i> , Citral	149.6	-	-	-	-	-
<i>L. alba</i> ,	-	-	-	-	-	-

Especie	δ -Tocoferol		γ -Tocoferol		α -Tocoferol	
	Área	mg/g extracto	Área	mg/g extracto	Área	mg/g extracto
Carvona						
<i>L. graveolens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. americana</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. micromera</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. citriodora</i>	-	-	-	-	-	-

**ANEXO C CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS
COMPONENTES PRESENTES DE LOS EXTRACTOS
ETANÓLICOS Y SUPERCRÍTICOS**

Figura 3.1. Curva de calibración de la pinocembrina (0.13-13.5 ppm), obtenida por HPLC-DAD.

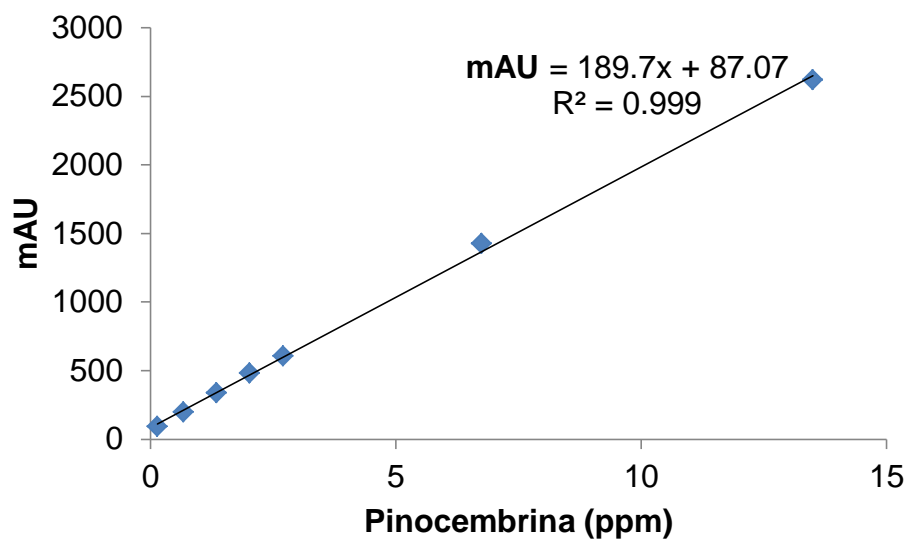


Figura 3.2. Curva de calibración de la naringenina (3.10 -62 ppm), obtenida por HPLC-DAD.

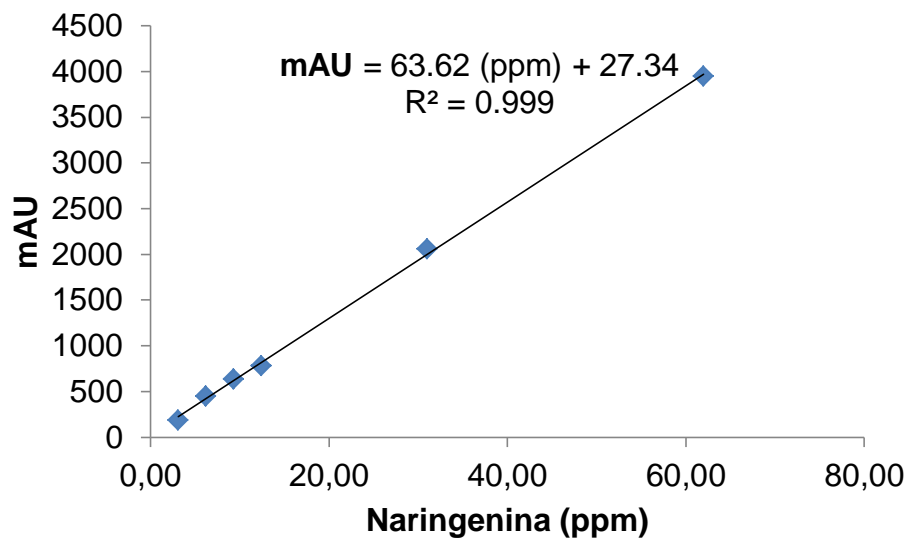


Figura 3.3. Curva de calibración de la apigenina (2.67 -53 ppm), obtenida por HPLC-DAD.

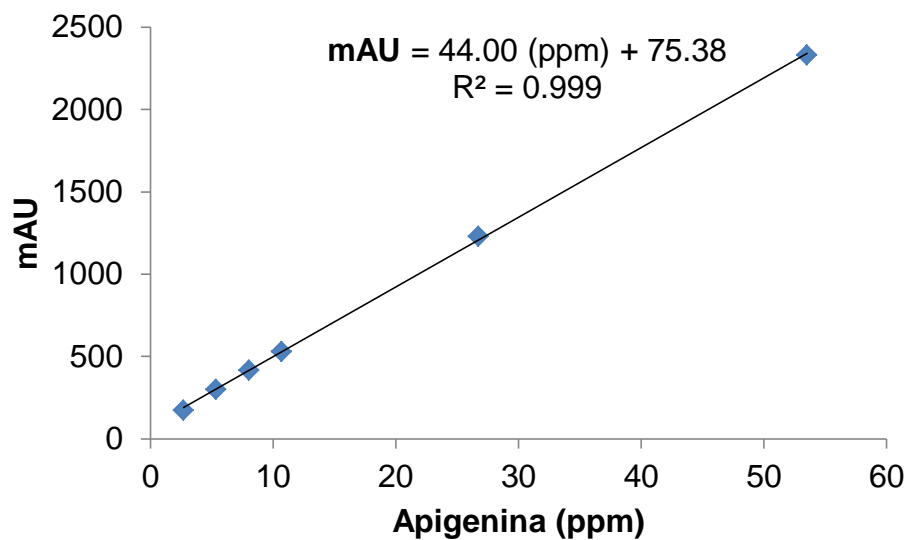
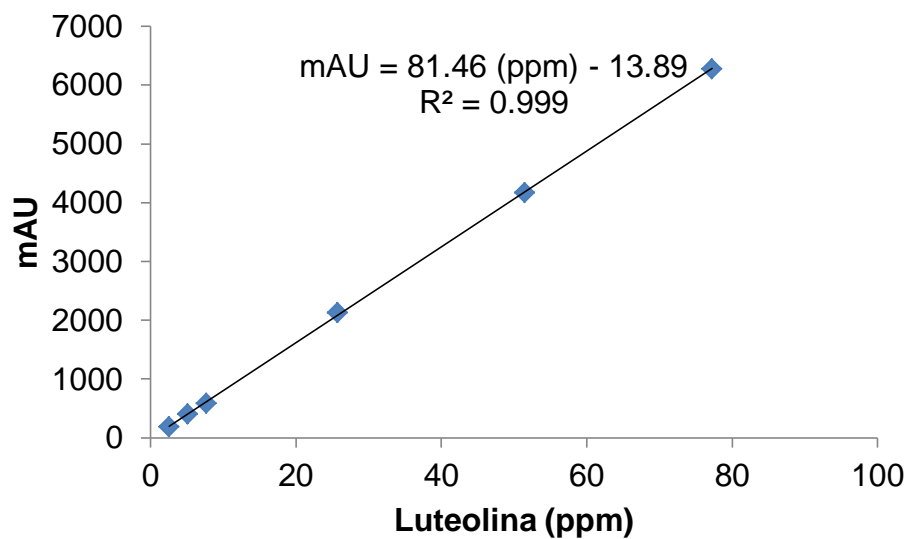
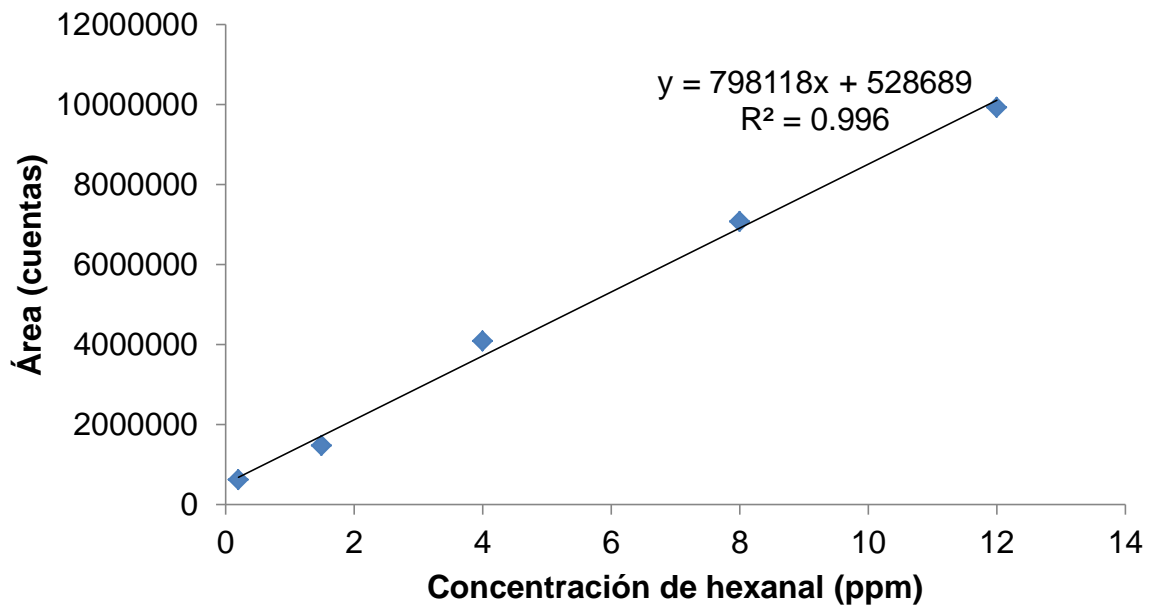


Figura 3.4. Curva de calibración de la luteolina (2.57 -77 ppm), obtenida por HPLC-DAD.



ANEXO D. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Figura 4.1. Curva de calibración del hexanal (0.2-12 ppm) derivado con PFPH, obtenida por GC-ECD.



**ANEXO E. PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LOS AE Y
EXTRACTOS OBTENIDOS CON CO₂ SUPERCRÍTICOS DE
LAS PLANTAS DEL GÉNERO *Lippia***

Figura 5.1. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del AE de *L. origanoides* (quimiotipo Carvacrol) obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

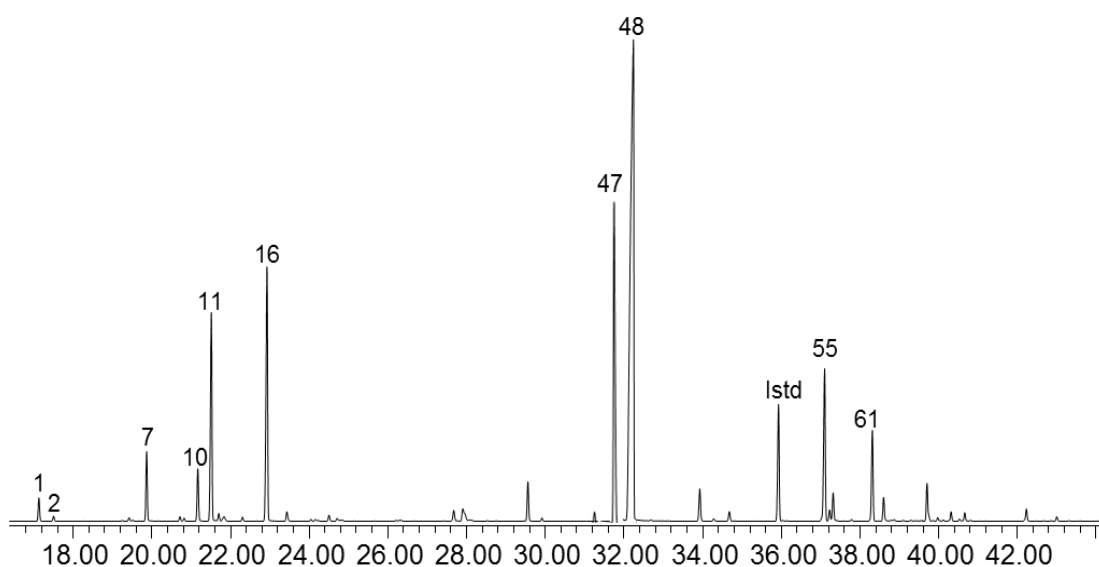


Figura 5.2. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del AE de *L. alba* (quimiotipo Citral) obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

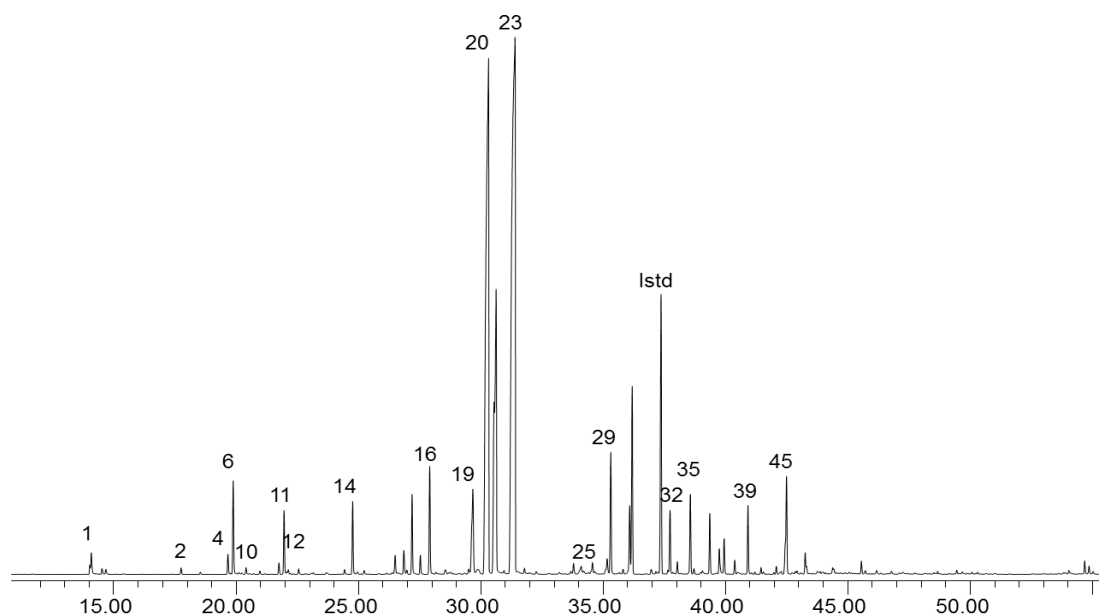


Figura 5.3. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del AE de *L. alba* (quimiotipo Carvona) obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

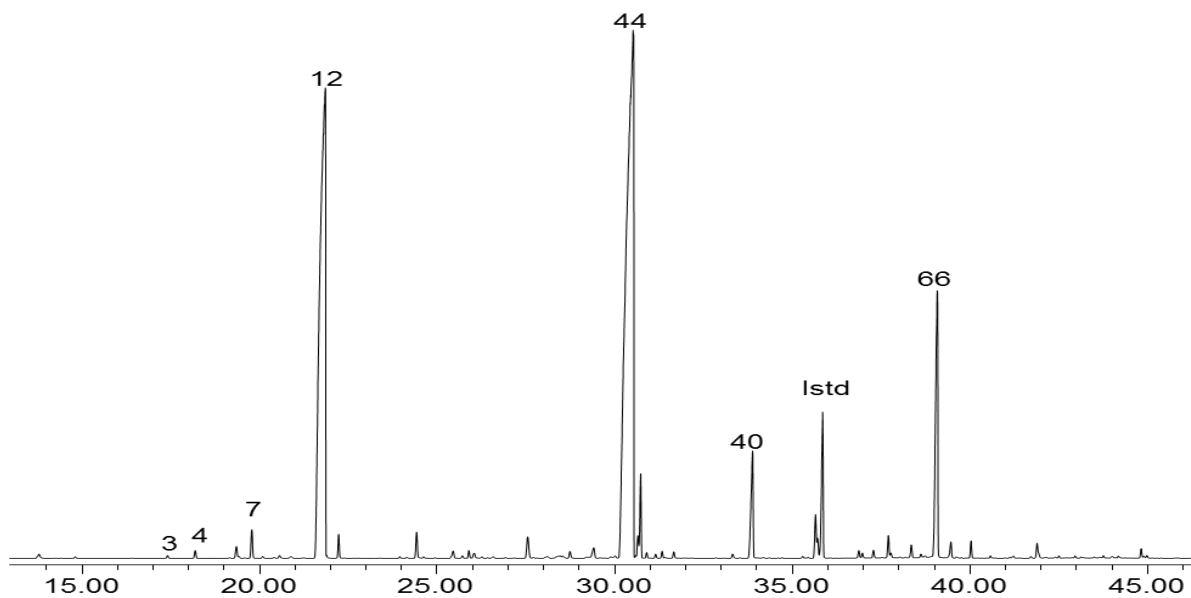


Figura 5.4. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del AE de *L. citriodora* obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

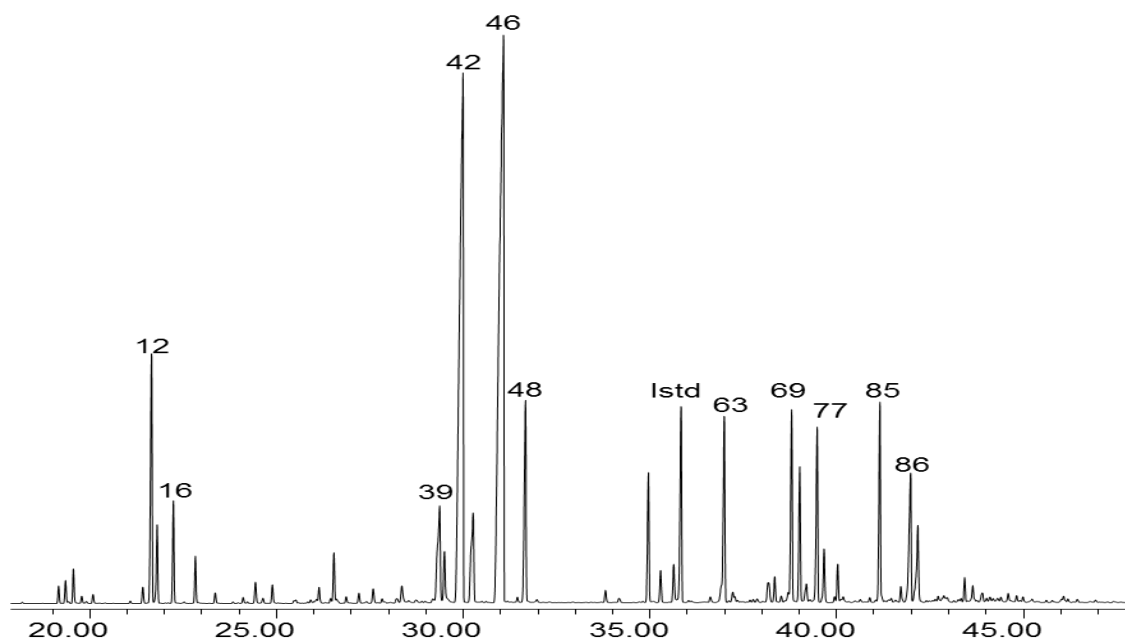


Figura 5.5. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del AE de *L. graveolens* obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

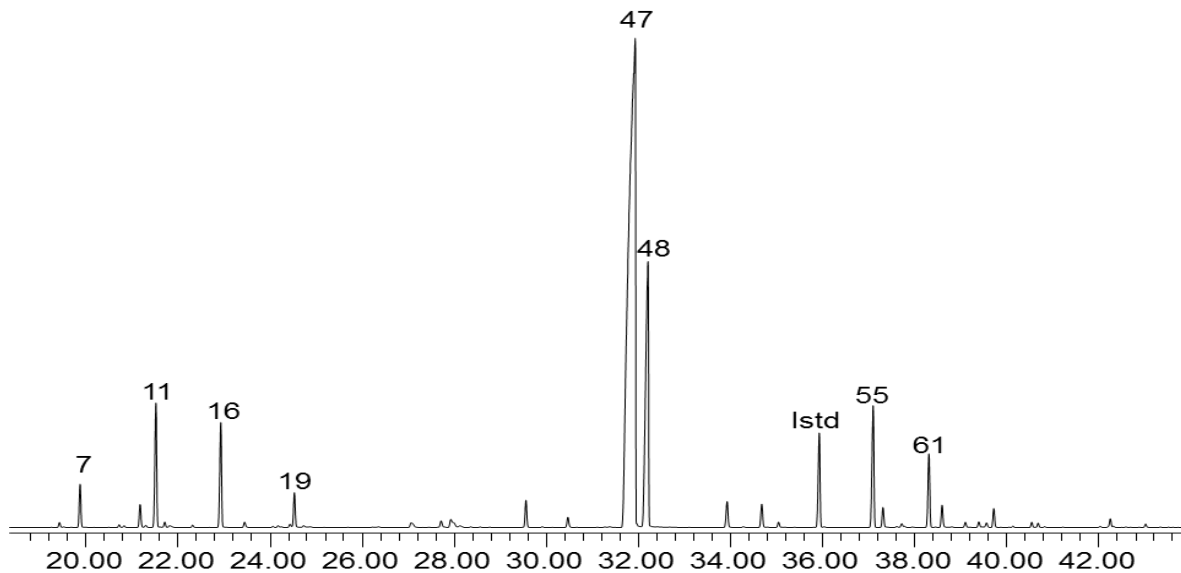


Figura 5.6. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del AE de *L. organoides* (quimiotipo Timol) obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

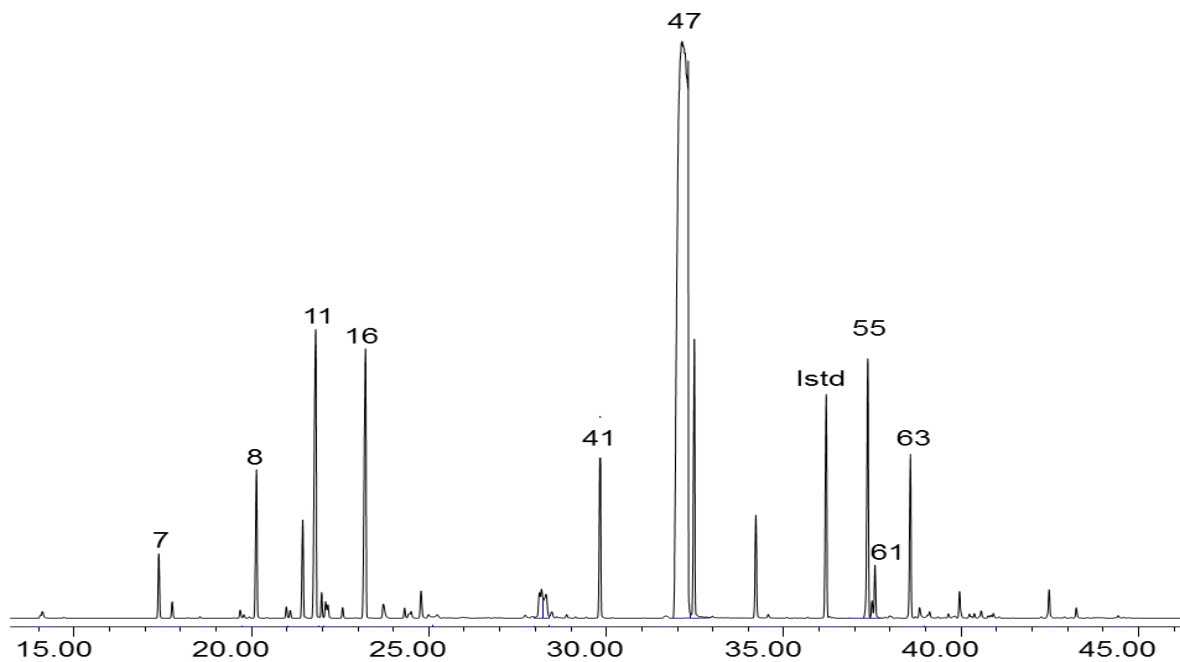


Figura 5.7. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *L. organoides* (quimiotipo Timol) obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

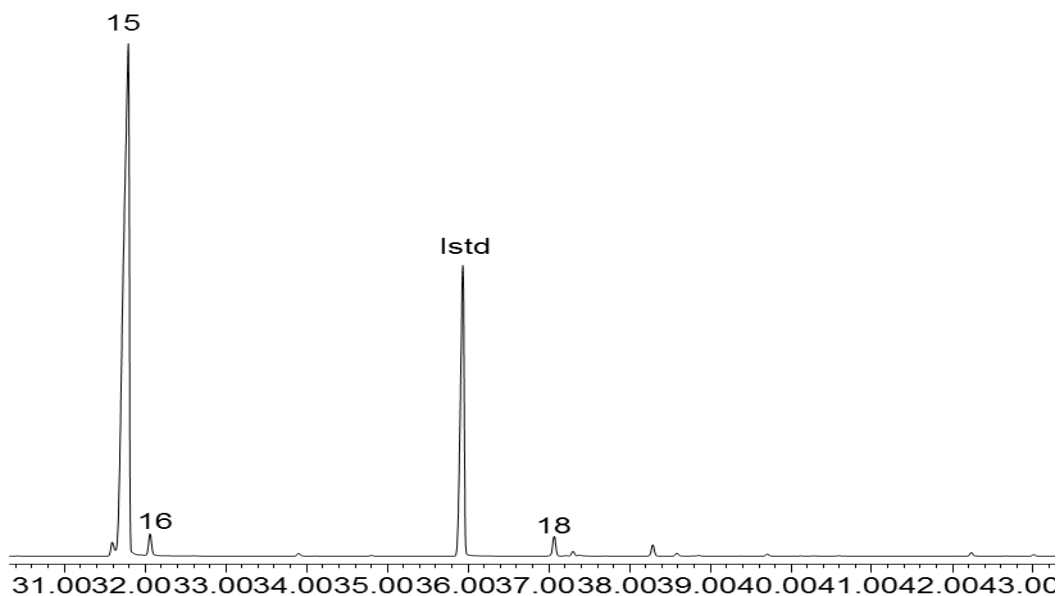


Figura 5.8. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *L. organoides* (quimiotipo Carvacrol) obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

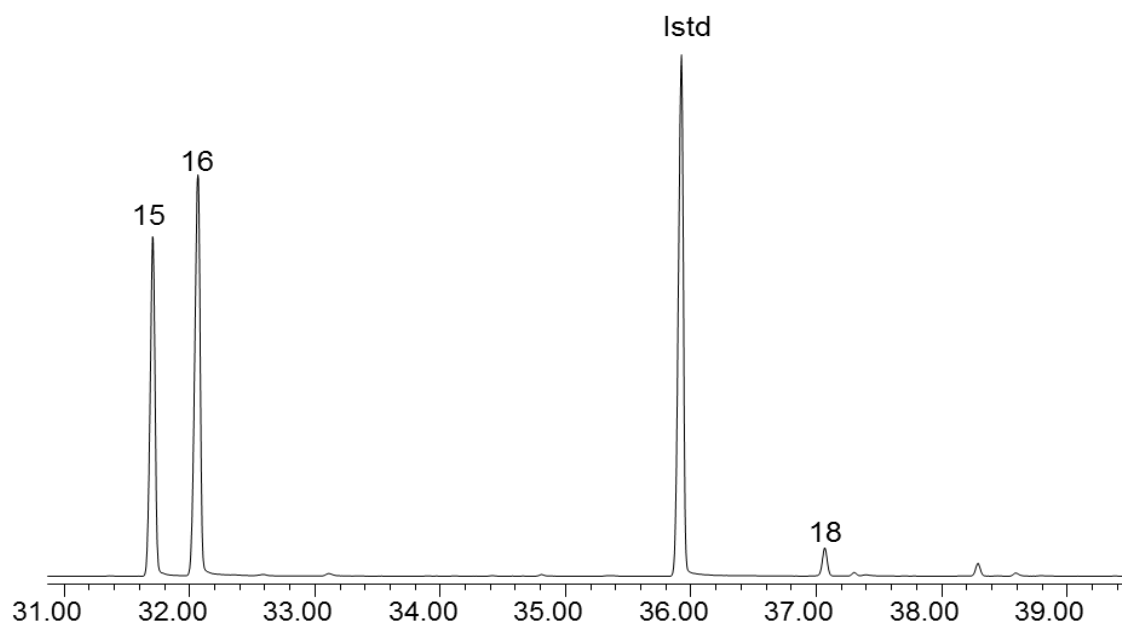


Figura 5.9. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *L. origanoides* (quimiotipo Felandreno) obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

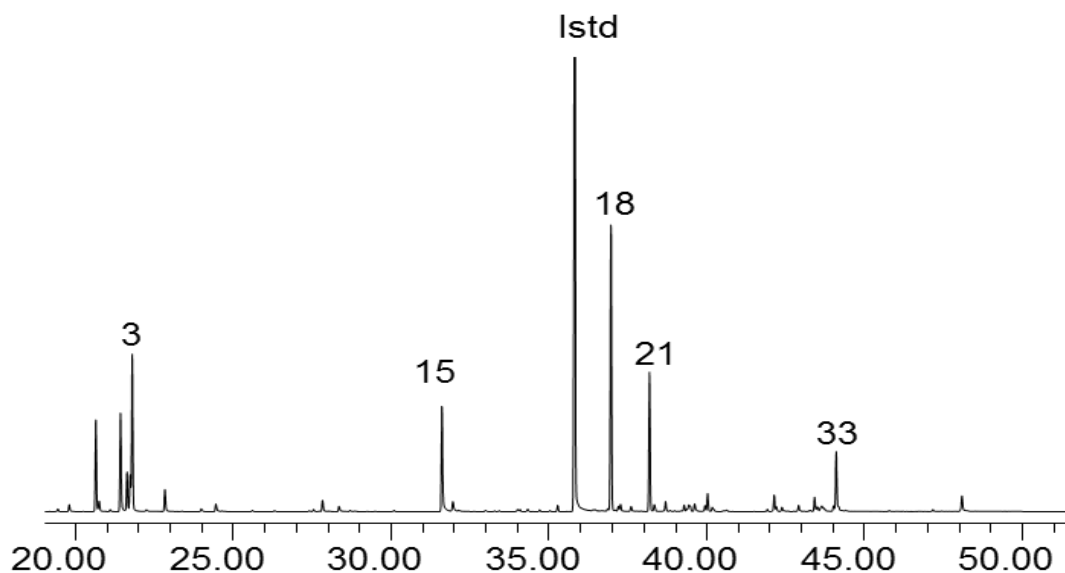


Figura 5.10. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *L. alba* (quimiotipo Citral) obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

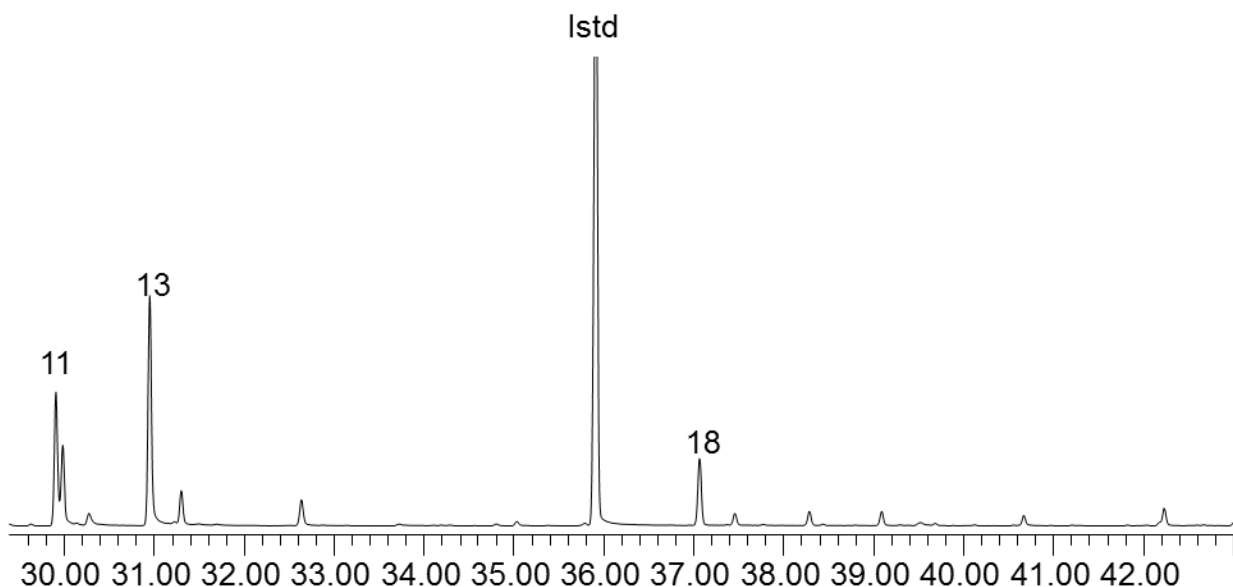


Figura 5.11. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *L. alba* (quimiotipo Carvona) obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

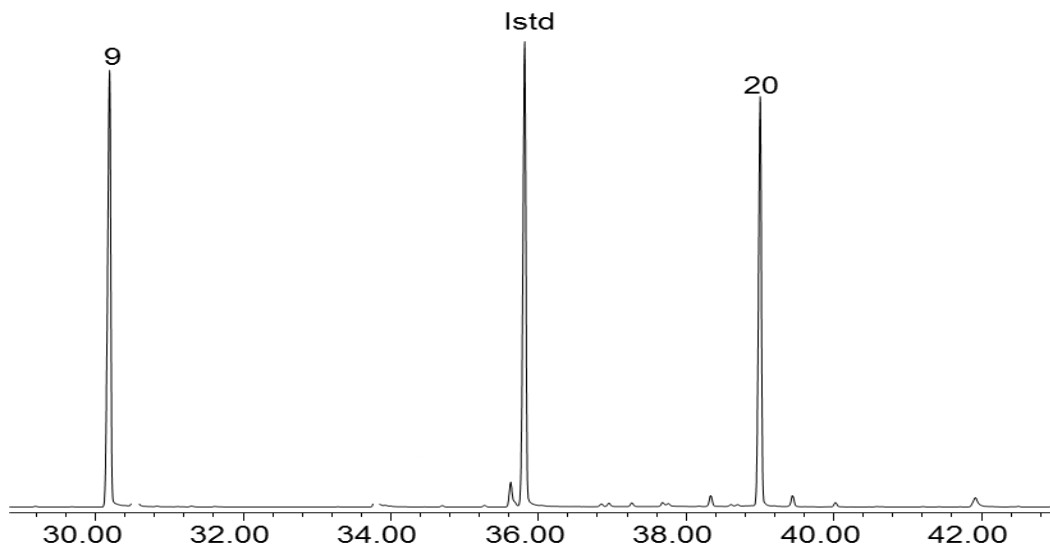


Figura 5.11. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *L. americana* obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

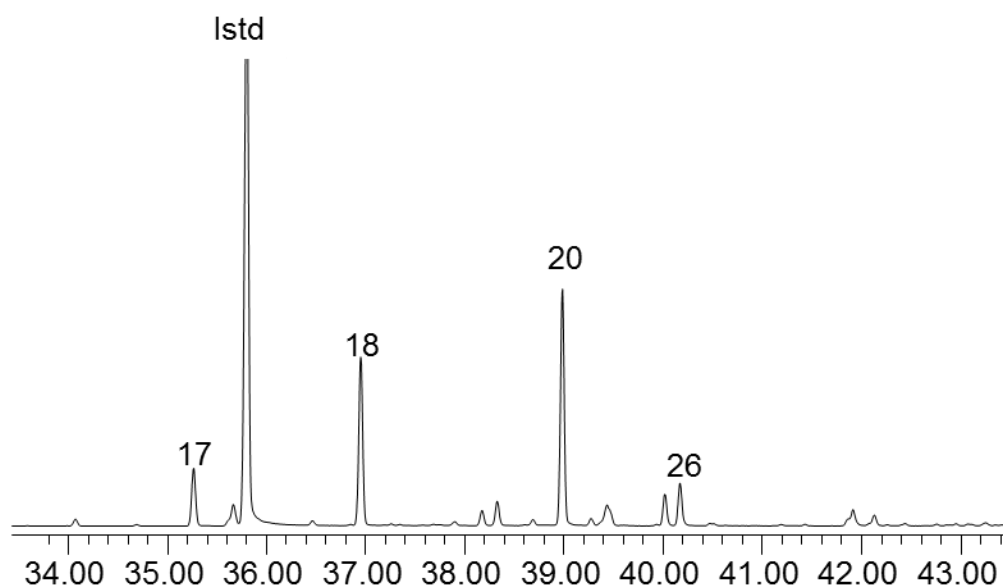


Figura 5.12. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *L. citriodora* obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

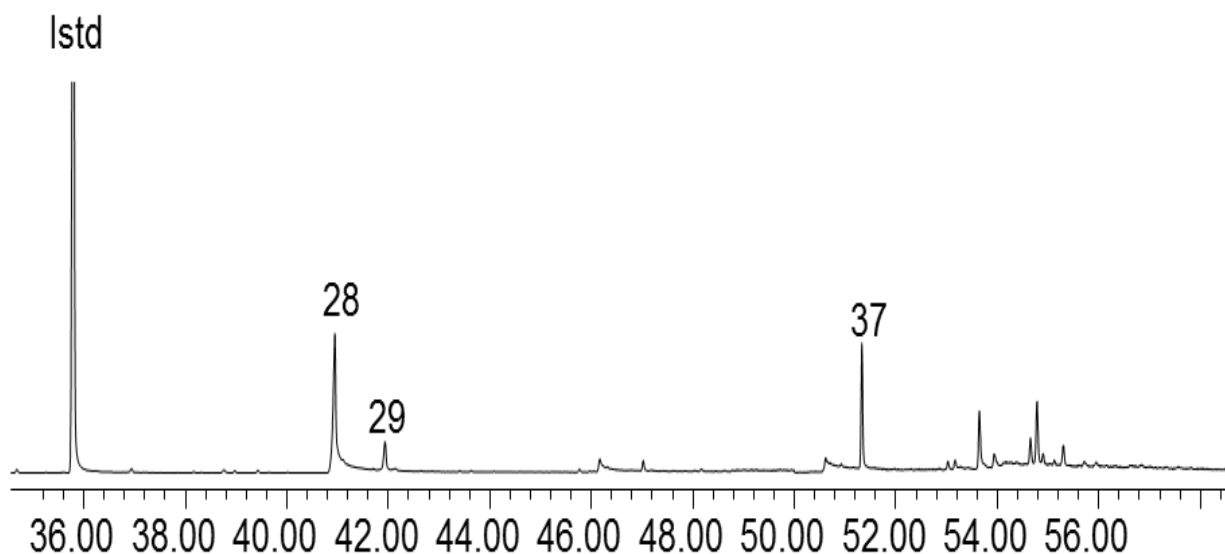
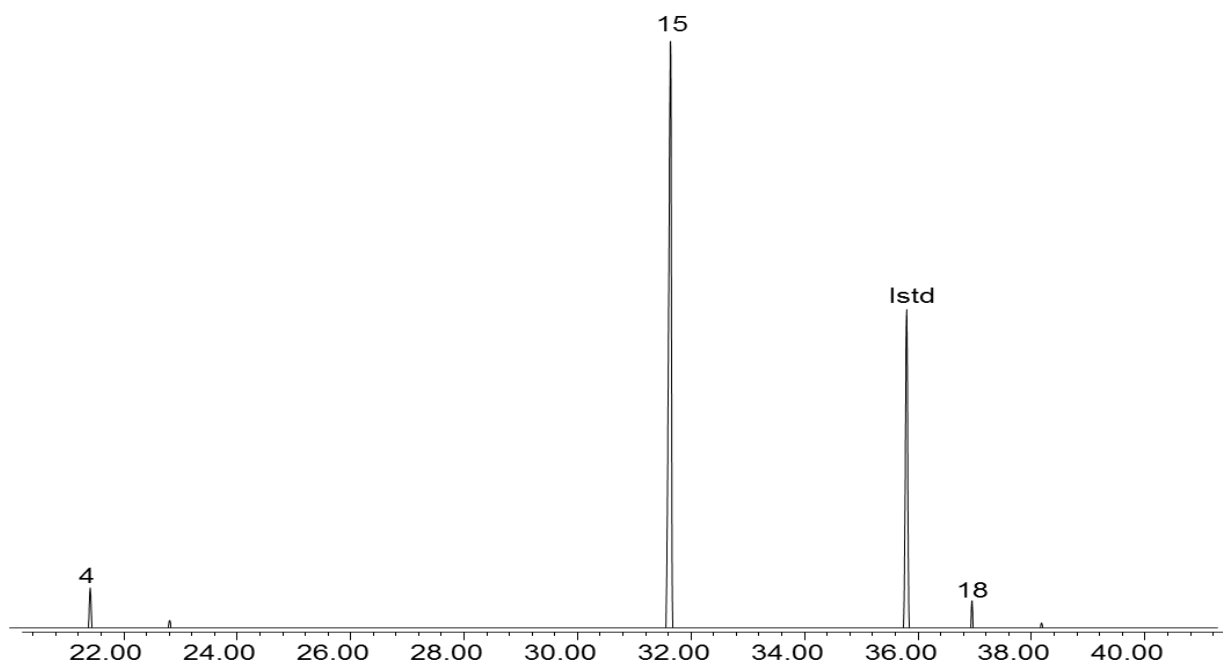


Figura 5.13. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de *L. graveolens* obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).



**ANEXO F. CONTRIBUCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE
REFERENCIA A LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS
MUESTRAS EVALUADAS**

Tabla 6.1. Contribución de los compuestos mayoritarios a la actividad antioxidante por el método ORAC de los AE de las especies de *Lippia spp.*

Compuesto	μmol Trolox [®] /g sustancia								
	<i>L. organoides</i> , Timol	<i>L. organoides</i> , Carvacrol	<i>L. organoides</i> , Felandreno	<i>L. alba</i> , Citral	<i>L. alba</i> , Carvona	<i>L. graveolens</i>	<i>L. americana</i>	<i>L. micromera</i>	<i>L. citriodora</i>
1,8-Cineol	1.28		54.70					12.00	8.02
Carvacrol	137.23	1705				540.61			
Carvona					253.93				
Neral				304.88			7.07		292.68
Geranial				260.78			9.34		236.10
α-Felandreno	6.47	8.12	507.32			6.47		9.77	
p-Cimeno	12.18	14.96	22.7			12.82		14.96	
Timol	1829.27	329.27	241.46			1756.10	98.78	1024.39	131.71
trans-β-Cariofileno	78.54		580.49	38.93	6.83	102.44	843.41	140.01	10.24

Tabla 6.2. Contribución de los compuestos mayoritarios a la actividad antioxidante por el método ABTS⁺ de los AE de las especies de *Lippia spp.*

Compuesto	μmol Trolox [®] /g sustancia								
	<i>L. origanoides</i> , Timol	<i>L. origanoides</i> , Carvacrol	<i>L. origanoides</i> , Felandreno	<i>L. alba</i> , Citral	<i>L. alba</i> , Carvona	<i>L. graveolens</i>	<i>L. americana</i>	<i>L. micromera</i>	<i>L. citriodora</i>
1,8-Cineol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvacrol	185.48	2304.50	-	-	-	730.70	-	-	-
Carvona	-	-	-	-	90.89	-	-	-	-
Neral	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geranial	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Felandreno	0.85	1.06	66.34	-	-	0.85	-	1.28	-
p-Cimeno	-	-	0	-	-	-	-	-	-
Timol	3475.61	625.61	458.78	-	-	3336.59	187.68	1946.34	250.24
trans-β-Cariofileno	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6.3. Contribución de los compuestos mayoritarios a la actividad antioxidante por el método ORAC de los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico de las especies de *Lippia spp.*

Compuesto	μmol Trolox [®] /g sustancia								
	<i>L. origanoides,</i> Timol	<i>L. origanoides,</i> Carvacrol	<i>L. origanoides,</i> Felandreno	<i>L. alba,</i> Citral	<i>L. alba,</i> Carvona	<i>L. graveolens</i>	<i>L. americana</i>	<i>L. micromera</i>	<i>L. citriodora</i>
1,8-Cineol	-	-	50.10	-	-	-	-	17.65	-
Carvacrol	129.75	1585.23	-	-	-	-	-	-	-
Carvona	-	-	-	-	150.25	-	-	-	-
Neral	-	-	-	275.55	-	-	-	-	-
Geranial	-	-	-	192.37	-	-	-	-	-
α-Felandreno	-	-	688.05	-	-	-	-	-	-
p-Cimeno	-	-	28.92	-	-	8.65	-	28.42	-
Timol	1874.30	359.27	490.61	-	-	1972.32	-	737.93	-
trans-β-Cariofileno	44.39	-	884.39	148.88	-	123.37	787.76	135.90	-

Tabla 6.4. Contribución de los compuestos mayoritarios a la actividad antioxidante por el método ABTS⁺ de los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico de las especies de *Lippia spp.*

Compuesto	μmol Trolox [®] /g sustancia								
	<i>L. organoides</i> , Timol	<i>L. organoides</i> , Carvacrol	<i>L. organoides</i> , Felandreno	<i>L. alba</i> , Citral	<i>L. alba</i> , Carvona	<i>L. graveolens</i>	<i>L. americana</i>	<i>L. micromera</i>	<i>L. citriodora</i>
1,8-Cineol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvacrol	175.37	2142.62	-	-	-	-	-	-	-
Carvona	-	-	-	-	53.78	-	-	-	-
Neral	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geranial	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Felandreno	-	-	89.98	-	-	-	-	-	-
p-Cimeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Timol	3561.11	682.61	932.16	-	-	3747.40	-	1402.06	-
trans-β-Cariofileno	-	-	-	-	-	-	-	-	-