

Estudio de los aceites esenciales y extractos de la planta de albahaca (*Ocimum gratissimum*)

Brayan Salomon VESGA PADILLA

Trabajo de grado para optar por el título de Químico

Directora

Elena E. STASHENKO

Química, *PhD.*

Universidad industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Programa de Química

Bucaramanga

2025

### **Agradecimientos**

Dedico este logro a mi familia, por su amor incondicional desde el principio. A mi madre, por su ternura; a mi padre, por su sacrificio. A mi cuñado Fabian, Sonia y Angélica, por las múltiples formas en que me apoyaron para alcanzar este objetivo.

Hago una mención especial a dos personas: a mi hermana, mi angelito que partió antes de tiempo y sé que, desde donde se encuentre, comparte esta alegría conmigo. También a mi hijo Julián, la mayor motivación que tengo para ser mejor cada día; por ti, soy y seré siempre mi mejor versión. Los amo.

A los profesores Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez, profesionales destacables no solo por sus importantes conocimientos y acompañamiento a lo largo de este proyecto sino también por la calidad humana presente en ellos, agradezco todo lo aprendido y la inspiración que pude obtener a partir de sus ejemplos. A la doctora Lady Sierra y mis compañeros del laboratorio, les agradezco su paciencia, su orientación, su tiempo, su acompañamiento y las risas en todo el proceso para desarrollar este estudio.

Al ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico – Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

Al Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM, CROM-MASS y a la Universidad Industrial de Santander, Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Facultad de Ciencias y Escuela de Química, por su apoyo.

## Tabla de contenido

Introducción.....	14
1. Estado del arte.....	17
1.1 Estudios del género y diversas aplicaciones.....	20
2. Marco teórico.....	24
2.1. Familia Lamiaceae.....	24
2.2. Género <i>Ocimum</i> .....	25
2.3. Especie <i>gratissimum</i> .....	26
2.4. Aceite esencial.....	28
2.5. Extracto vegetal.....	28
2.6. Fracciones volátiles.....	29
2.7. Metabolitos secundarios.....	29
2.7.1. Terpenos o isoprenoides.....	31
2.7.2. Compuestos fenólicos y sus derivados.....	31
2.7.3. Lípidos.....	32
2.7.4. Alcaloides.....	32
2.8. Obtención de metabolitos secundarios.....	33
2.8.1. Hidrodestilación asistida por microondas (MWHD).....	33
2.8.2. Extracción con solvente.....	35
2.9. Análisis de metabolitos secundarios.....	36
2.9.1. Cromatografía de gases.....	37
2.9.2. Cromatografía líquida.....	38
2.9.3. Cromatografía acoplada a espectrometría de masas.....	40
3. Objetivos.....	43
3.1. Objetivo general.....	43
3.2. Objetivos específicos:.....	43
4. Metodología.....	44
4.1. Reactivos y solventes.....	44
4.2. Identificación taxonómica de la planta y recolección del material vegetal.....	45
4.3. Obtención de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos.....	45
4.3.1. Hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD).....	45
4.3.2. Extracción con solvente agua-etanol.....	46
4.4 Análisis cromatográfico.....	47

4.4.1. Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....	47
4.4.2. Análisis de extractos hidroalcohólicos por cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución UHPLC/ESI <sup>+</sup> /Orbitrap-HRMS.....	50
5. Resultados y discusión.....	53
5.1. Identificación botánica.....	53
5.2. Rendimiento de las destilaciones y extracciones realizadas.....	53
5.3. Caracterización química de los compuestos presentes (metabolitos secundarios) en aceites esenciales de la planta <i>Ocimum gratissimum</i> .....	54
5.4. Caracterización química de los compuestos presentes (metabolitos secundarios) en extractos hidroalcohólicos de la planta <i>Ocimum gratissimum</i> .....	63
6. Conclusiones .....	73
Referencias bibliográficas .....	74
Anexos .....	81

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Número de publicaciones relacionadas con aceites esenciales y extractos etanólicos del género <i>Ocimum</i> y la especie <i>Ocimum gratissimum</i> .....	17
<b>Tabla 2.</b> Identificación botánica para la especie de albahaca <i>Ocimum gratissimum</i> .....	53
<b>Tabla 3.</b> Rendimientos de destilación y extracción obtenidos mediante la implementación de la técnica de hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) y extracción con solvente a partir de material fresco de la planta <i>Ocimum gratissimum</i> ..	54
<b>Tabla 4.</b> Composiciones químicas obtenidas por GC/MS de los aceites esenciales de la planta <i>Ocimum gratissimum</i> . .....	57
<b>Tabla 5.</b> Composiciones químicas encontradas mediante la técnica UHPLC/ESI <sup>+</sup> /Orbitrap-HRMS de moléculas protonadas [M+H] <sup>+</sup> y deprotonadas [M-H] <sup>-</sup> presentes en los extractos hidroalcohólicos de la planta <i>O. gratissimum</i> . .....	66

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Áreas del conocimiento relacionadas con la investigación en plantas del género <i>Ocimum</i> . Período de búsqueda: año 2000-2023. Base de datos: Science Direct, Elsevier (Scopus). Fecha de consulta: septiembre 15 del 2024. Ecuación de búsqueda: TITTLE-ABSTR-KEY “Ocimum” .....	18
<b>Figura 2.</b> Número de publicaciones por año sobre el género <i>Ocimum</i> en Colombia. Período de búsqueda: año 2000-2022. Base de datos: Science Direct, Elsevier (Scopus). Fecha de consulta: abril 26 del 2023. Ecuación de búsqueda: TITTLE-ABSTR-KEY Ocimum AND Colombia .....	19
<b>Figura 3.</b> Estructura química del ácido rosmarínico .....	25
<b>Figura 4.</b> Estructuras químicas de los compuestos metil chavicol y linalool, principales componentes presentes en plantas del género <i>Ocimum</i> .....	26
<b>Figura 5.</b> Inflorescencias y partes áreas de la planta <i>Ocimum gratissimum</i> .....	26
<b>Figura 6.</b> Montaje experimental para la aplicación de la técnica MWHD en una muestra de material vegetal. Imagen tomada de Llinás, M. (2011). .....	34
<b>Figura 7.</b> Representaciones del esquema de trabajo de la maceración (escala industrial) y la percolación. Imágenes tomadas y modificadas de (Sharapin, 2000). .....	36
<b>Figura 8.</b> Diagrama de flujo de la metodología general empleada para el estudio presente. ....	44
<b>Figura 9.</b> Cromatógrafo de gases AT 6890 Plus, equipado con un detector selectivo de masas MS 5973 Network.....	49
<b>Figura 10.</b> Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia Vanquish <sup>TM</sup> acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive.....	51
<b>Figura 11.</b> Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS de los AE de <i>Ocimum gratissimum</i> de diferentes partes en estado fresco (flores, tallos y hojas). Columna DB-	

5MS (60m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). La identificación de cada pico cromatográfico se encuentra en la **Tabla 4**. ..... 56

**Figura 12.** Espectro de masas del compuesto eugenol,  $C_{10}H_{12}O_2$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^+]$   $m/z$  164;  $[M-CH_3]^+$   $m/z$  149;  $[M-C_2H_3]^+$   $m/z$  137;  $[M-CH_3O]^+$   $m/z$  133;  $[M-CH_3CO]^+$   $m/z$  121;  $C_7H_7^+$   $m/z$  91;  $C_6H_5^+$   $m/z$  77. Ver pico cromatográfico N° 4 en la **Tabla 4**. ..... 61

**Figura 13.** Espectro de masas del compuesto (E)- $\beta$ -cariofileno,  $C_{15}H_{24}$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^+]$   $m/z$  204;  $[M-CH_3]^+$   $m/z$  189;  $[M-C_2H_5]^+$   $m/z$  175;  $[M-C_3H_7]^+$   $m/z$  161;  $[M-C_5H_{11}]^+$   $m/z$  93;  $C_3H_5^+$   $m/z$  41;  $C_4H_7^+$   $m/z$  55,  $C_5H_9^+$   $m/z$  69. Ver pico cromatográfico N° 7 en la **Tabla 4**. ..... 61

**Figura 14.** Espectro de masas del compuesto  $\alpha$ -humuleno,  $C_{15}H_{24}$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^+]$   $m/z$  204;  $[M-CH_3]^+$   $m/z$  189;  $[M-C_2H_5]^+$   $m/z$  175;  $[M-C_3H_7]^+$   $m/z$  161;  $[M-C_5H_{11}]^+$   $m/z$  93;  $C_3H_5^+$   $m/z$  41;  $C_4H_7^+$   $m/z$  55,  $C_5H_9^+$   $m/z$  69. Ver pico cromatográfico N° 8 en la **Tabla 4**. ..... 62

**Figura 15.** Espectro de masas del compuesto sesquiterpenoide no identificado  $C_{15}H_{24}$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^+]$   $m/z$  204;  $[M-CH_3]^+$   $m/z$  189;  $[M-C_2H_5]^+$   $m/z$  175;  $[M-C_3H_7]^+$   $m/z$  161;  $C_3H_5^+$   $m/z$  41;  $C_4H_7^+$   $m/z$  55,  $C_7H_9^+$   $m/z$  93. Ver pico cromatográfico N° 23 en la **Tabla 4** ..... 62

**Figura 16.** Corriente iónica extraída (EIC) de moléculas protonadas  $[M+H]^+$  y deprotonadas  $[M-H]^-$  obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo full scan Columna Zorbax Eclipse  $C_{18}$  a partir de los extractos hidroalcohólicos de *O. gratissimum*. Véase la identificación de los picos en la **Tabla 5**. ..... 65

**Figura 17.** Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto xantomicol. Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  345.09711 obtenida en el modo SIM y a A. 40 eV y B. 60 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD.

Espectros del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratisimum*..... 69

**Figura 18.** Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto cirsimaritina. Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  315.08658 obtenida en el modo SIM y a A. 40 eV y B. 60 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD.

Espectros del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratisimum*..... 70

**Figura 19.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto no identificado de fórmula química  $C_{17}H_{14}O_6$ . Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  197.11787 obtenida en el modo SIM a 40 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum*

*gratisimum*..... 72

### Anexos

- Anexo A.** Espectro de masas del compuesto sesquiterpenoide no identificado  $C_{15}H_{24}$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^{+}] m/z$  204;  $[M-C_2H_5]^{+} m/z$  175;  $[M-C_5H_{11}]^{+} m/z$  133;  $C_4H_7^{+} m/z$  55. Ver compuesto N° 11 en la **Tabla 4.** ..... 81
- Anexo B.** Espectro de masas del compuesto sesquiterpenoide oxigenado no identificado,  $C_{15}H_{24}O$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^{+}] m/z$  220;  $[M-CH_3]^{+} m/z$  205;  $[M-CH_3-H_2O]^{+} m/z$  187;  $[M-CH_3-C_5H_9]^{+} m/z$  136,  $C_5H_9^{+} m/z$  69;  $C_7H_7^{+} m/z$  91. Ver compuesto N° 17 en la **Tabla 4.** ..... 81
- Anexo C.** Espectro de masas del compuesto sesquiterpenoide no identificado,  $C_{15}H_{24}$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^{+}] m/z$  204;  $[M-CH_3]^{+} m/z$  189;  $[M-C_3H_7]^{+} m/z$  161;  $C_3H_5^{+} m/z$  41,  $C_7H_9^{+} m/z$  93. Ver compuesto N° 22 en la **Tabla 4.** ..... 82
- Anexo D.** Espectro de masas del compuesto sesquiterpenoide oxigenado no identificado  $C_{15}H_{24}O$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^{+}] m/z$  220;  $[M-CH_3]^{+} m/z$  2057;  $[M-CH_3-H_2O-C_2H_4-C_3H_5]^{+} m/z$  118;  $[M-CH_3-C_5H_9]^{+} m/z$  136;  $[M-CH_3-C_5H_9-H_2O]^{+} m/z$  118;  $C_3H_5^{+} m/z$  41;  $C_4H_7^{+} m/z$  55,  $C_5H_9^{+} m/z$  69;  $C_7H_7^{+} m/z$  91. Ver compuesto N° 26 en la **Tabla 4.** ..... 82
- Anexo E.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del ácido *p*-hidroxibenzoico. Véase la señal  $[M-H]^{-}$  en  $m/z$  137.02348 obtenida en el modo SIM a 20 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*. ..... 83
- Anexo F.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del glucósido del ácido tuberónico. Véase la señal  $[M-H]^{-}$  en  $m/z$  387.16583 obtenida en el

modo SIM a 30 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*..... 83

**Anexo G.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto vicianin 2. Véase la señal  $[M-H]^-$  en  $m/z$  593.15088 obtenida en el modo SIM a 30 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*. ..... 84

**Anexo H.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS de la luteolina. Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  287. 05576 obtenida en el modo SIM a 70 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*..... 84

**Anexo I.** Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto isómero de la himenoxina. Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  375.10831 obtenida en el modo SIM y a A. 40 eV y B. 70 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectros del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*. ..... 85

**Anexo J.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto no identificado NI #2, con fórmula molecular  $C_{21}H_{36}O_4$ . Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  353.25807 obtenida en el modo SIM a 20 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*. ..... 85

**Lista de abreviaturas, siglas, acrónimos.**

AE	Aceites esenciales
AT	<i>Agilent Technologies</i>
CA	California
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
CIBIMOL	Centro de investigación en Biomoléculas
d.i.	Diámetro interno
D <sub>f</sub>	Espesor de la fase estacionaria
EI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización electrónica)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)
<i>et al.</i>	<i>Et alli</i> (y otros)
eV	Electrón-voltio
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GC/MS	<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
HCD	<i>Higher-Energy Collision Dissociation Cell</i> (Celda de colisiones activadas de alta energía)
HRMS	<i>High-Resolution Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas de alta resolución)
IRL	Índices de retención lineales
ISTD	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno)
LC/MS	<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por microondas)
<i>O.</i>	<i>Ocimum</i>
<i>Orbitrap-MS</i>	<i>Orbitrap Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas <i>Orbitrap</i> )
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
UHPLC	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia)

## Resumen

**Título:** Estudio de los aceites esenciales y extractos de la planta de albahaca (*Ocimum gratissimum*).

**Autor:** Brayan Salomon VESGA PADILLA

**Palabras clave:** Aceites esenciales, metabolitos secundarios, Lamiaceae, Ocimum.

**Descripción:** El género *Ocimum* demuestra relevancia científica al expresar diversos tipos de propiedades biológicas como actividades antifúngica, antiviral y antibacteriana, propiedades relacionadas con los metabolitos secundarios presentes en diferentes especies pertenecientes al género, que le otorgan potencial para destacar en sectores como la medicina, el sector industrial y el sector alimentario. En este estudio se destilaron aceites esenciales de partes frescas de la planta *Ocimum gratissimum* mediante la técnica de hidrodestilación asistida por microondas y se caracterizaron por GC/MS. Los extractos de la planta se obtuvieron por extracción con solvente asistida por ultrasonido y su caracterización química se realizó mediante UHPLC/ESI<sup>+</sup>/Orbitrap-HRMS.

Los rendimientos de destilación para los AE fueron de  $0.36 \pm 0.01$  % p/p y se encontraron diferentes compuestos de la familia de terpenos del tipo sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados, monoterpenos y monoterpenos oxigenados. Los rendimientos de extracción fueron de  $2.68 \pm 0.06$  % p/p y dentro de los compuestos detectados se encontraron compuestos fenólicos como flavonoides, derivados del ácido jasmónico y derivados del ácido benzoico. Los resultados de la investigación contribuyen al estudio fitoquímico de plantas del género *Ocimum* en Colombia, resaltando la importancia de continuar realizando más estudios con el fin de descubrir nuevos compuestos naturales con aplicaciones potenciales en diferentes sectores industriales y en la medicina.

\*Trabajo de investigación

\*\*Facultad de ciencias. Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko, Química, *PhD*.

**Abstract**

**Title:** Study of the essential oils and extracts of the basil plant (*Ocimum gratissimum*).

**Author:** Brayan Salomon VESGA PADILLA

**Keywords:** Essential oils, secondary metabolites, Lamiaceae, *Ocimum*.

**Description:** The *Ocimum* genus demonstrates scientific relevance by exhibiting various biological activities such as antifungal, antiviral and antibacterial. These properties are related to the secondary metabolites present in different species within the genus, which highlight its potential in sectors as medicine, industry and food. In this investigation, essential oils from the fresh parts of the plant *Ocimum gratissimum* were distilled using the microwave-assisted hydro-distillation technique and characterized by GC/MS. The *O. gratissimum* extracts were obtained by ultrasound-assisted solvent extraction and characterized chemically by UHPLC/ESI<sup>+</sup>/Orbitrap-HRMS.

The distillation yield for essential oils was  $0.36 \pm 0.01$  % w/w, and various compounds of the terpene family, including sesquiterpenes, oxygenated sesquiterpenes, monoterpenes and oxygenated monoterpenes were found in the essential oil. The extraction yield was  $2.68 \pm 0.06$  % w/w, and inside it were detected several phenolic compounds as flavonoids, jasmonic acid and benzoic acid derivatives. The findings of this investigation contribute to the phytochemical study of *Ocimum* plants in Colombia, emphasizing the importance of continuing investigations in order to discover new natural substances with potential applications in industrial sectors and medicine.

\*Degree work

\*\*Science faculty. School of Chemistry. Director: Elena E. Stashenko, Chemist, *Ph.D.*

## Introducción

Colombia es uno de los países con mayor riqueza en biodiversidad a nivel mundial ocupando el segundo país después de Brasil con mayor expresión de capital natural renovable (Rangel, 2015). Según un estudio realizado por Rangel (2015), se registran aproximadamente 27,000 especies de plantas con flores presentes en la nación. Además, Colombia alberga una gran variedad de ecosistemas, incluidos bosques, matorrales, selvas y pastizales, con alrededor de 1,200 especies diferentes. La mayor concentración de esta riqueza natural se encuentra en la región Andina, con un total aproximado de 16,000 especies diferentes en total (Rangel, 2015). El género *Ocimum* cuenta con alrededor de 35-150 especies diferentes. Estas especies son plantas y arbustos anuales perennes extensamente distribuidos alrededor del mundo. En Colombia se han registrado especies nativas y cultivadas, como *Ocimum americanum* L, *Ocimum basilicum* L, *Ocimum campechianum* L y *Ocimum gratissimum* L. (Shasany y Kole, 2018). El estudio de las plantas y de la composición química de sus AE y extractos vegetales ha revelado una amplia gama de actividades biológicas. Estas investigaciones fomentan la continua divulgación científica y apoyan los esfuerzos por continuar desarrollando la conservación y protección de la biodiversidad, tanto cultural como genética, en las regiones donde se llevan a cabo este tipo de estudios (Forero et al., 1999). En cuanto al género *Ocimum*, diversos estudios realizados han demostrado que este tipo de plantas presentan amplia variedad de actividades biológicas, como propiedades insecticidas, antifúngicas, antimicrobianas, antioxidantes, entre otras. Estas propiedades se atribuyen principalmente a la gran diversidad de compuestos como terpenos, fenilpropanoides y algunos flavonoides presentes en los extractos y aceites esenciales de las plantas de este género (Shasany y Kole, 2018; Grayer et al., 2004).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar químicamente los aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de diferentes partes de planta de albahaca *Ocimum gratissimum*. El estudio se desarrolló en dos fases principales:

En la primera fase, se obtuvo el aceite esencial de la planta *Ocimum gratissimum* a partir de diversas partes frescas de esta, mediante la técnica de hidrodestilación asistida por microondas (MWHD). Posteriormente, los aceites esenciales obtenidos fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). En la composición química de los AE se detectaron 26 compuestos (valores de área relativa superiores al valor umbral de área relativa, 0.1%) entre los cuales destacan  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -elemeno,  $\alpha$ -humuleno, óxido de cariofileno y eugenol. Estos compuestos clasificados como sesquiterpenos y fenilpropanoides, han mostrado propiedades antimicrobianas, analgésicas, anestésicas y antitumorales en estudios previos (Modzelewska et al., 2005; González, 2002).

En la segunda fase, se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos de la planta *Ocimum gratissimum*, mediante la técnica de extracción con solventes, utilizando una solución etanol/agua en una proporción 70/30 % v/v. Los extractos obtenidos fueron analizados mediante UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS, lo que permitió detectar nueve compuestos. Sin embargo, estos no se identificaron confirmatoriamente utilizando sustancias patrón, sino mediante las bases de datos *HMDB 4.0* y *Massbank*, y a partir de los espectros obtenidos por el modo **SIM** (Monitoreo del Ion Seleccionado). A partir de este análisis, se identificaron de manera tentativa algunos compuestos presentes en la planta de estudio. Los compuestos que más destacaron en los extractos fueron xantomicrool, cirsimaritina y el compuesto no identificado (NI #1). Los dos primeros pertenecen a la familia de las flavonas, específicamente las flavonas polimetoxiladas, que contienen en su estructura por lo menos dos grupos metoxi junto a un grupo carbonilo en el carbono # 4. Este tipo

de compuestos es de especial interés debido a su amplio espectro de propiedades biológicas, que incluyen actividad antiaterogénica, antiinflamatoria y potentes propiedades anticancerígenas (Guo et al., 2018).

Los resultados parciales de este estudio se presentaron en el XI Congreso Colombiano de Cromatografía (COCOCRO), el XIX Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines (COLACRO), el III Simposio Panamericano de Aceites Esenciales (SPAEE), el XXVI *International Symposium on Advances in Extraction Technologies* (EXTECH), el XVI *Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry* (LASEAC) y el Workshop sobre avances recientes en la preparación de muestras (WARPA). Estos se presentaron en la modalidad de poster entre el 13 y el 15 de noviembre en Bucaramanga, Colombia., bajo el título *CHEMICAL CHARACTERIZATION BY GC/MS OF Ocimum gratissimum* ESSENTIAL OIL.

Este trabajo de grado hizo parte del estudio “La constelación biodiversa: confluencia de saberes en el Jardín Botánico Experimental Consentido”, financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la UIS [N° 3736] y del Programa “Bio-Reto XXI 15:50”, financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación e ICETEX. El permiso de colecta fue otorgado mediante el contrato N° 270, que permite el acceso a los recursos naturales y productos derivados con fines de bioprospección. Este fue suscrito por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, así como por la Universidad Industrial de Santander.

## 1. Estado del arte

Partiendo de una búsqueda sobre diversos estudios realizados sobre el género *Ocimum* a nivel global, introduciendo en la ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY* “*Ocimum*”, *AND* “*Essential oil*” *AND* “*Ethanollic extract*” durante el período de tiempo 2000-2023. Esta búsqueda proporciona información acerca de la cantidad de investigaciones realizadas hasta la fecha sobre este género en distintas áreas del conocimiento. Al modificar la ecuación de búsqueda a *TITLE-ABS-KEY* “*Ocimum gratissimum*”, *AND* “*Essential oil*” *AND* “*Ethanollic extract*”, enfocándose en la especie objeto de este estudio, y en el mismo período de tiempo, se observa un contraste en la cantidad de investigaciones llevadas a cabo hasta el momento sobre esta especie en específico.

### Tabla 1.

*Número de publicaciones relacionadas con aceites esenciales y extractos etanólicos del género Ocimum y la especie en concreto Ocimum gratissimum.*

<b>Género/especie</b>	<b>Número de publicaciones</b>	<b>Aceites esenciales</b>	<b>Extractos etanólicos</b>
<i>Ocimum</i>	8518	2182	282
<i>Ocimum gratissimum</i>	1131	466	51

Nota: Período de búsqueda: año 2000-2023. *Base de datos*: Science Direct, Elsevier (Scopus). *Fecha de consulta*: septiembre 15 del 2024. *Ecuación de búsqueda*: *TITLE-ABSTR-KEY* “*Ocimum*” *AND* “*essential oil*” *AND* “*ethanollic extract*”.

Del total de publicaciones encontradas sobre el género *Ocimum*, se puede observar la diversidad de contribuciones realizadas por distintas áreas del conocimiento. Entre ellas, destacan: agricultura y ciencias biológicas (25.3%); farmacología; toxicología y farmacéutica (15.3%); bioquímica, genética y biología molecular (13.1%); medicina (12.1%); química (7.4%), ciencia del medio ambiente (5.6 %) entre otras.

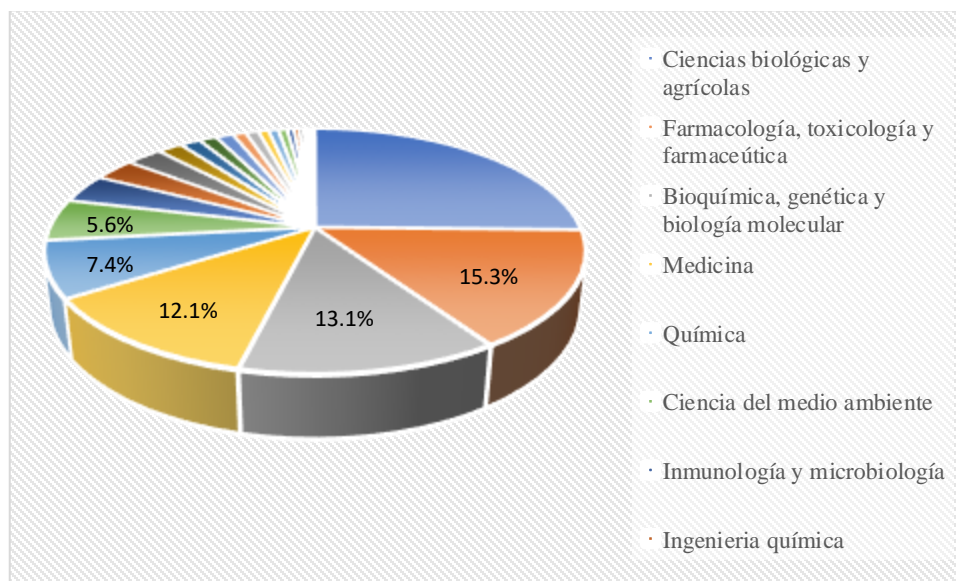
**Figura 1.**

Áreas del conocimiento relacionadas con la investigación en plantas del género *Ocimum*.

Período de búsqueda: año 2000-2023. Base de datos: *Science Direct, Elsevier (Scopus)*.

Fecha de consulta: *septiembre 15 del 2024*. Ecuación de búsqueda: *TITTLE-ABSTR-KEY*

*“Ocimum”*



La mayoría de las investigaciones se centran en el estudio fitoquímico de las diversas especies del género *Ocimum*, enfocándose en los aceites esenciales y extractos, así como en los procesos mediante los cuales se puede optimizar su obtención. Además, se analizan los diversos metabolitos secundarios inmersos en estos compuestos, con el objetivo de explorar las distintas actividades biológicas que pueden ofrecer. Estas investigaciones tienen aplicaciones potenciales en sectores clave como el sector agropecuario, industrial, alimentario, y en la medicina.

Al continuar con la búsqueda de información y restringirla únicamente a Colombia, se modifica la ecuación de búsqueda en la base de datos *SCOPUS* a *“Ocimum”* AND *“Colombia”*, obteniendo un total de 19 investigaciones realizadas en el período comprendido desde el año 2000 hasta el año 2022. En estas investigaciones, se puede observar la presencia de distintas áreas del conocimiento relacionadas con el género

*Ocimum*, las cuales ya han sido mencionadas previamente. Esta búsqueda acerca del género *Ocimum* en Colombia tiene como objetivo explorar el interés de la investigación en este género, que pertenece a la familia de plantas Lamiaceae.

**Figura 2.**

*Número de publicaciones por año sobre el género Ocimum en Colombia. Período de búsqueda: año 2000-2022. Base de datos: Science Direct, Elsevier (Scopus). Fecha de consulta: abril 26 del 2023. Ecuación de búsqueda: TITTLE-ABSTR-KEY Ocimum AND Colombia*



Al observar la **Figura 2.** no se evidencia una tendencia clara de interés en la investigación acerca de este género en el país, ya que en algunos años el número máximo de investigaciones publicadas es de solo dos artículos, mientras que en otros años no registra ninguna publicación. Esto resalta la importancia de realizar investigaciones sobre este género, ya que contribuirían al desarrollo de la ciencia y el conocimiento en la biodiversidad presente en Colombia.

Al realizar una búsqueda específica de la planta que será objeto de estudio utilizando la ecuación de búsqueda: *TITTLE-ABSTR-KEY "Ocimum gratissimum" AND Colombia*", se encuentra solo una investigación registrada hasta la fecha en Colombia. Esta fue publicada en el año 2009 por Stashenko y colaboradores (Benitez et al., 2009), con el objetivo de estudiar la composición química y el quimiotipo de dos especies del género *Ocimum*, *O. gratissimum* y *O. campechianum*, provenientes del noroeste colombiano. En los resultados obtenidos a partir del estudio del aceite esencial extraído de las hojas de ambas especies, se determinó mediante la técnica GC/MS que los compuestos mayoritarios eran monoterpenos, monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos, destacando entre ellos eugenol, 1,8-cineol, y  $\beta$ -selineno. Además, se determinó que el quimiotipo de cada planta era tipo eugenol para *O. gratissimum* y metil eugenol para *O. campechianum*.

Dado que la información y el número de investigaciones sobre esta especie en particular son limitados, es fundamental continuar promoviendo proyectos e investigaciones que contribuyan a un conocimiento más completo acerca de las diversas variedades de plantas presentes en Colombia, especialmente en lo que respecta a la especie objeto de este estudio.

### **1.1 Estudios del género y diversas aplicaciones.**

Diversos estudios acerca del género *Ocimum*, que pertenece a la familia Lamiaceae, han permitido identificar una variedad de propiedades presentes en estas plantas.

Un artículo desarrollado por las facultades de medicina, química, biología y ecología de la universidad de Novi Sad, en Serbia y Montenegro, encontró que las especies *Ocimum basilicum* L, *Origanum vulgare* L y *Thymus vulgaris* L, todas pertenecientes a la familia de plantas Lamiaceae, cuentan con características biológicas útiles para aplicaciones que van desde la conservación de alimentos hasta tratamientos farmacológicos

antimicrobianos. Además, se destacó el potente efecto antioxidante en estas plantas. El estudio analizó los aceites esenciales presentes en las tres especies de plantas mencionadas, evaluando sus actividades antioxidantes y antimicrobianos, así como sus respectivas caracterizaciones químicas. Los aceites esenciales demostraron una reducción hasta del 50% en el ensayo de actividad antioxidante DPPH y efectos protectores significativos en el ensayo de desoxirribosa, superando un 18.71 % de la actividad del control positivo utilizado (BHT). Estos resultados confirmaron que los aceites esenciales poseen una potente actividad antioxidante. En cuanto a los estudios antimicrobianos, se observó que el aceite esencial de *Ocimum basilicum* L, mostró menor efectividad frente a patógenos como bacterias gram positivas y gram negativas en comparación con las otras dos especies (Bozin et al., 2006).

Un estudio realizado por Martha y colaboradores (Beltrán et al., 2013), pertenecientes al grupo de investigación GIBIBIO de la Universitaria del Área Andina Seccional Pereira, sobre las plantas *Ocimum basilicum* L en las variedades *cinammom*, *album* y *thyriflorum*, encontró, mediante la técnica analítica GC/MS, altos contenidos de fenilpropanoides y monoterpenos oxigenados en estas plantas. Además, se llevó a cabo un estudio de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de cada una de las variedades, evaluando su acción frente a varios tipos de microorganismos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*. La variedad *cinammom* de *O. basilicum* L. presentó actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, mientras que las dos variedades restantes mostraron actividad inhibitoria solo contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. De esta manera, se demostró la capacidad de los aceites esenciales como agentes antimicrobianos y se sugiere continuar con los estudios para nuevas aplicaciones en el futuro.

Un estudio realizado por Francis y colaboradores (Matu et al., 2020), reveló que la planta *Ocimum basilicum* fue estudiada y catalogada como una especie de la familia Lamiaceae con propiedades importantes para reducir la población de moscas blancas que infestaban cultivos de tomates de manera parasitaria. En el estudio, se identificaron los componentes mayoritarios de la planta *basil*, que resultaron ser 1,8-cineol, eugenol y linalool. Se descubrió que el compuesto 1,8-cineol ejercía una fuerte atracción hacía los ejemplares de la mosca utilizados, mientras que el compuesto linalool generaba un efecto repelente. Durante el experimento, se realizaron ensayos con la planta de tomate sola y en combinación con *basil*. Los resultados mostraron que *O. basilicum* ejerció una actividad de señuelo contra la plaga, logrando atraer hasta el 72.4 % de las moscas hacía la planta de *basil*, una acción atribuida principalmente a los componentes mayoritarios mencionados. El estudio sugiere continuar con la investigación debido al gran potencial de la planta para futuras aplicaciones en la protección y preservación de cultivos agrícolas.

Un artículo publicado por Karpiński (2020), en el Departamento de Microbiología Medica de la Universidad de Ciencias Médicas de Poznań, Polonia, centró su atención en la familia de plantas Lamiaceae, donde se estudiaron las actividades antifúngicas de los aceites esenciales de más de 72 plantas diferentes, incluyendo algunas del género *Ocimum*. Los resultados obtenidos mostraron que los aceites esenciales de más de la mitad de las plantas tienen una actividad antifúngica significativa (MICs < 1000 µg/mL) contra patógenos como *Candida spp* y *Aspergillus niger*. Además, el autor mencionó el uso de varias especies en la cosmética y medicina, como *Lavandula officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, entre otras, que poseen propiedades antiinflamatorias, antisépticas y anticasca, y que podrían usarse solas o en combinación con medicamentos antifúngicos para mejorar la efectividad de los tratamientos. Este planteamiento se realizó

con la idea de que, en el futuro, los aceites esenciales puedan ser una alternativa frente a la resistencia de diversos microorganismos a los tratamientos convencionales, específicamente en el caso de las diversas variedades de hongos.

Una revisión realizada por Farías et al. (2022), y otros investigadores de diversas universidades en Chile acerca de la planta *Ocimum basilicum*, presentó las diferentes propiedades médicas de esta planta, desde sus semillas hasta sus hojas, identificando también sus componentes principales y los beneficios aplicados en la salud, tanto en modelos *in vivo* e *in vitro*. Los resultados obtenidos indicaron que la planta contiene ácidos grasos, como el ácido  $\alpha$ -linolénico (con una abundancia del 53-69% abundancia), y también compuestos fenólicos, destacando el ácido rosmarínico, que presenta la mayor abundancia (aproximadamente 16%), junto con otras moléculas con actividades biológicas, como linalool, estragol y eucaliptol, con abundancias aproximadamente del 36%, 29% y 8% respectivamente. Esta planta demostró capacidades hepatoprotectoras, cardioprotectores, antihipertensivas, hipoglucemiantes, hematoprotectoras, anticancerígenas, entre otras. Estos efectos se explican en gran medida por el potencial antioxidante y antiinflamatorio exhibido por los diferentes tipos de compuestos presentes en la planta. Este grupo de moléculas aún siguen siendo analizado en busca de evidencia emergente sobre mecanismos moleculares aún no completamente comprendidos, los cuales se traducen en procesos metabólicos beneficiosos para la salud, lo que podría justificar futuras investigaciones.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Familia Lamiaceae

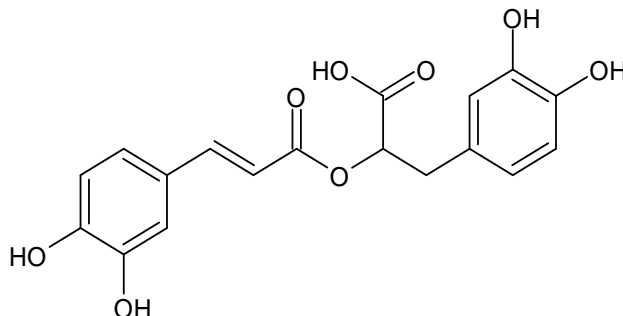
La familia de plantas Lamiaceae incluye una gran variedad de géneros y especies en todo el mundo, con registros que indican alrededor de 236 géneros y aproximadamente 7,200 especies (Martínez et al., 2017). Esta familia es conocida por dos nombres latinos: *Labiatae*, que hace referencia a la forma labial de sus flores y Lamiaceae, que proviene del género *Lamium*. Las especies de esta familia son plantas aromáticas que comparten varias características distintivas, como glándulas que secretan aceites esenciales volátiles, hojas siempre dispuestas de manera opuesta, tallos cuadrangulares e inflorescencias terminales o laterales de aspecto racemoso. Las flores presentan un cáliz bilabiado, mientras que la corola está formada por pétalos fusionados, con simetría dorsiventral: una parte tubular y otra rasgada, que incluye cinco lóbulos soldados en una sección y orientados de manera que forman dos labios (Fernández & Rivera, 2006).

Los extractos y aceites esenciales de diversas plantas de esta familia contienen algunos de los siguientes componentes químicos:

Ácido rosmarínico, ácido ascórbico, ácido cafeico,  $\beta$ -cariofileno, linalool, limoneno,  $\beta$ -pineno, 1,8-cineol, carvacrol,  $\alpha$ -pineno, p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol, siendo el ácido rosmarínico un componente que se destaca como un fuerte antioxidante y es característico de la familia Lamiaceae (Karpiński, 2020; Capecka et al., 2005).

**Figura 3.**

*Estructura química del Ácido rosmarínico*

**2.2. Género *Ocimum***

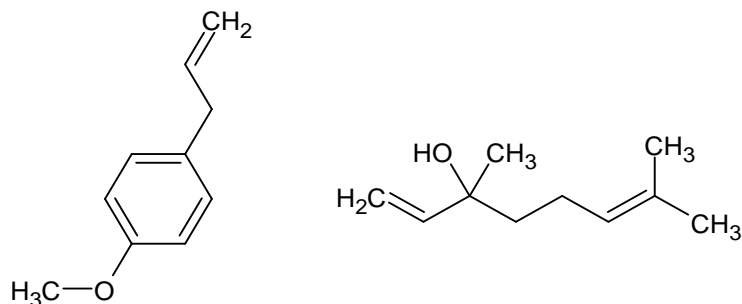
El género *Ocimum* L es un miembro de la familia Lamiaceae, comúnmente conocido como albahaca. Las características distintivas de este género incluyen un tallo en forma cuadrada, hojas dispuestas de forma opuesta y entrecruzada, que presentan numerosos puntos que se consideran glándulas. Las flores tienen dos labios prominentes y una simetría bilateral, considerada zigomorfa (Shasany y Kole, 2018). Este género incluye entre de 35-150 especies, estas son consideradas plantas o arbustos anuales y perennes, distribuidos alrededor del mundo. En Colombia se han registrado tanto especies nativas como cultivadas, entre las cuales se encuentran *Ocimum americanum* L, *Ocimum basilicum* L, *Ocimum campechianum* L y *Ocimum gratissimum* L.

Estudios han demostrado que las plantas de este tipo presentan diversas actividades biológicas, entre las cuales se incluyen propiedades insecticidas, antifúngicas, antimicrobianas, antioxidantes, entre otras. Estas propiedades se deben en gran parte a la amplia variedad de compuestos presentes, como algunas variedades de terpenos, fenilpropanoides y algunos flavonoides, los cuales se encuentran en los extractos y aceites esenciales. Entre estos compuestos destacan la luteolina, apigenina, acacetina, cirsiolol, alcanfor, eugenol, metil cinamato, metil chavicol y linalool, siendo estos últimos dos los

componentes mayoritarios en el aceite esencial de la gran mayoría de las especies del género *Ocimum* (Shasany y Kole, 2018; Grayer et al., 2004).

**Figura 4.**

*Estructuras químicas de los compuestos metil chavicol y linalool, principales componentes presentes en plantas del género Ocimum.*



**2.3. Especie *gratissimum***

**Figura 5.**

*Inflorescencias y partes áreas de la planta *Ocimum gratissimum*.*



Foto tomada por el autor Brayan Salomon VESGA PADILLA. Fecha: 17 de junio de 2024. Lugar: CENIVAM, UIS, Bucaramanga.

Esta planta, también conocida como “albahaca de clavo”, es un tipo de arbusto perenne y anual que se caracteriza por un olor aromático intenso y distintivo. Perteneciente a la familia Lamiaceae, tiene su origen en el viejo mundo, específicamente en el oeste de

África, aunque actualmente se encuentra también en Asia y algunas regiones de Sudamérica. En la antigüedad, se usaba frecuentemente como saborizante y condimento en la preparación de diversos platos tradicionales. En la medicina tradicional, se empleaba rigurosamente para tratar enfermedades como neumonía, anemia, diarrea, así como para combatir la fiebre, inflamaciones e infecciones bacterianas y fúngicas. Se han identificado varios quimiotipos en base a su aceite esencial, entre los cuales se encuentran los tipos timol, eugenol, citral, linalool, geraniol y etil cinamato (Shasany y Kole, 2018; Ugbogu et al., 2021).

Cuanto, a su morfología, se ha descrito como una planta ramificada que presenta un tallo recto y rígido, de forma circular-cuadrangular, y hojas opuestas, delgadas. También cuenta con inflorescencias terminales. En la **Figura 5**, se puede apreciar la planta de albahaca que es objeto de estudio de esta investigación.

Diferentes estudios realizados por varios investigadores han identificado una amplia variedad de propiedades biológicas de gran importancia, tales como propiedades antihiper glucémicas, antianémicas, hepaprotectoras, antihipertensivas, antibacteriales, antifúngicas, entre otras. Estas propiedades se deben en gran parte a la diversa variedad de compuestos químicos presentes en la planta. En los aceites esenciales, se ha reportado la presencia de monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados. Entre los compuestos identificados se encuentran limoneno, *p*-cimeno, terpinoleno, 1,8-cineol, linalool, citronelal, borneol, timol,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ - y  $\beta$ -selineno, espatulenol, óxido de cariofileno y epóxido de humuleno, entre otros. En los extractos, se ha reportado la presencia de polifenoles y flavonoides, como salvigenina, ácido gálico, catechinas, metil-eugenol, ácido cafeico, xantomicro, cirsimaritin, vitexin, apigenina, vicenin-2, isotimusin, entre otros (Ugbogu et al., 2021).

#### **2.4. Aceite esencial**

Los aceites esenciales son mezclas complejas de moléculas volátiles almacenadas en las células vegetales, responsables de las fragancias u olores característicos que desprenden flores, árboles, semillas, entre otros. Estos aceites se extraen de diversas partes de las plantas, como semillas, hojas y tallos. Los compuestos químicos que los conforman provienen de 3 vías biosintéticas principales: la vía del acetato-malonato, que da lugar a los ácidos grasos y policétidos; la vía del acetato-mevalonato, que produce diferentes tipos de terpenos como mono y diterpenos, así como sesquiterpenos; y la vía del ácido shikímico, que genera compuestos aromáticos, ácidos cinámicos y fenilpropanoides. Generalmente se extraen en forma líquida, aunque tienden a degradarse químicamente cuando son expuestos a la luz, altas temperaturas o sustancias ácidas (Azcón & Talón, 2008).

Debido a la necesidad de encontrar nuevas alternativas que puedan reemplazar las moléculas químicas y fármacos empleados para combatir microorganismos, el estudio de los aceites esenciales ha revelado, mediante técnicas analíticas, la presencia de compuestos que confieren propiedades medicinales de interés, tales como bactericidas, antifúngicas, antivirales, insecticidas, entre otras (Mena et al., 2020).

#### **2.5. Extracto vegetal**

Los extractos vegetales son mezclas complejas de metabolitos secundarios, obtenidos a partir de plantas frescas o secas, así como de diversas partes de las mismas, como hojas, flores, semillas, raíces y cortezas. Estos extractos se aíslan mediante diversos métodos, como la extracción con fluido supercrítico, extracción Soxhlet, extracción con solvente, entre otros (Luján et al., 2010).

Los principales componentes de estas mezclas son compuestos fenólicos clasificados en diferentes grupos, como flavonoides, tocoferoles, ácidos fenólicos, entre otros. Los diversos estudios realizados sobre los extractos vegetales han permitido identificar una amplia variedad de efectos medicinales, entre los cuales destacan propiedades antiinflamatorias, citotóxicas, antioxidantes, y anticancerígenas, así como propiedades antimicrobianas frente a varios tipos de microorganismos, como virus, bacterias y hongos (Luján et al., 2010).

## **2.6. Fracciones volátiles**

Las fracciones volátiles son un grupo de compuestos presentes en las plantas que se caracterizan por tener presiones de vapor relativamente altas, lo que les permite ser transportados por difusión al aire. Cumplen diversas funciones, entre las cuales incluyen ser compuestos de señalización o feromonas, actuando como comunicadores entre los insectos, las plantas y su entorno. Además, participan en el aroma característico de las plantas aromáticas y tienen aplicaciones en la industria de los saborizantes y las fragancias. La composición estructural de los compuestos que forman las fracciones volátiles generalmente se basa en un esqueleto hidrocarbonado, al que se suman átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre y otros heteroátomos comunes. Algunos de los compuestos más comunes en las fracciones volátiles de las plantas son el 1,8-cineol, el limoneno, el geraniol, el metanotiol, entre otros (Herrmann, 2010).

## **2.7. Metabolitos secundarios**

A lo largo de su ciclo de vida, las plantas desarrollan una serie de compuestos orgánicos que no están directamente relacionados con su crecimiento y desarrollo, pero si tienen una conexión con su biosíntesis a partir de componentes primarios. Estos compuestos se conocen como metabolitos secundarios, y aunque no están involucrados directamente en

procesos como la respiración, la fotosíntesis o la síntesis de proteínas -que forman parte del metabolismo primario de la planta-, cumplen diversas funciones ecológicas importantes. A través de estas funciones, las plantas interactúan con el medio que las rodea (Azcón & Talón, 2008).

Algunos metabolitos primarios de las plantas, como los azúcares simples, aminoácidos y proteínas, no solo son fundamentales para el crecimiento y desarrollo de la planta, sino que también proporcionan las rutas a través de las cuales se sintetizan los metabolitos secundarios. Dentro de este proceso, se destacan varias rutas biosintéticas responsables de la producción de los principales grupos de compuestos secundarios:

- El ácido siquímico, en su ruta biosintética, da lugar a la formación de varios compuestos aromáticos, entre los cuales se encuentran los aminoácidos aromáticos, los ácidos cinámicos y algunos polifenoles.
- El acetato es precursor de diversas moléculas a través de dos rutas: por la ruta del acetato-malonato, se forman principalmente los ácidos grasos y policétidos, mientras que por la ruta del acetato-mevalonato, contribuye a la síntesis de terpenos o isoprenoides.
- Los terpenos se sintetizan principalmente a partir del piruvato y el gliceraldehído-3-P.
- Los aminoácidos son esenciales para la formación de alcaloides y antibióticos peptídicos, entre los cuales destacan las cefalosporinas y penicilinas.

Los metabolitos secundarios se clasifican según su estructura en los siguientes grupos: Terpenos o isoprenoides, fenoles y sus derivados, lípidos y alcaloides (Azcón & Talón, 2008).

### **2.7.1. *Terpenos o isoprenoides***

Forman uno de los grupos más grandes de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Pertenecen al tipo de lípidos sencillos, son insolubles en agua y comprenden una amplia variedad de compuestos, como pigmentos vegetales, vitaminas, entre otros.

Todos los terpenos se sintetizan a partir del isopentenil difosfato y pueden tener ramificaciones en su esqueleto de isopentano. Su unidad básica es el isopreno, y la clasificación de los terpenos se basa en el número de unidades de isoprenos que componen su estructura. Así, dos unidades forman los monoterpenos, tres los sesquiterpenos, cuatro los diterpenos, seis triterpenos, ocho los tetraterpenos y más de ocho unidades dan lugar a los politerpenos. Cada una de estas clasificaciones posee distintas propiedades activas. Ejemplos representativos de moléculas en este grupo incluyen el limoneno, el mentol y el alcanfor, que, además de cumplir con funciones ecológicas en las plantas, presentan propiedades medicinales como antisépticos y expectorantes (Azcón & Talón, 2008).

### **2.7.2. *Compuestos fenólicos y sus derivados***

La presencia de estos compuestos en las plantas es una característica común de todos los tejidos vegetales. Su estructura se basa en un anillo aromático con uno o varios grupos hidroxilo, ya sean libres o sustituidos. La unidad básica es el fenol, aunque la mayoría se presentan como polifenoles, con más de 8,000 compuestos descritos. Dentro de ellos, destacan las quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos, los estilbenos y los flavonoides, siendo estos últimos el grupo más numeroso de esta familia. Un ejemplo común de flavonoide es la quercetina (Azcón & Talón, 2008).

En la naturaleza, desempeñan roles importantes en las plantas como agentes protectores contra depredadores, así como también funcionan como fitoalexinas y sustancias

alelopáticas. Además, actúan como señales químicas en procesos como la floración, la polinización, la simbiosis y el parasitismo vegetal. En la industria alimentaria, se les atribuyen propiedades relacionadas con el olor, sabor y aroma de los alimentos. Por ejemplo, el sabor amargo de la cerveza se debe por el contenido de humulona, mientras que el color rojo del vino es causado por la presencia de antocianinas.

### **2.7.3. Lípidos**

Además de las moléculas mencionadas anteriormente, las plantas también contienen lípidos, los cuales se derivan del acetyl-CoA y cumplen diversas funciones tanto en el metabolismo primario como el secundario. Entre ellos, destacan los ácidos grasos, que se encuentran principalmente en forma de ésteres de glicerol, y cuya función principal es el almacenamiento de energía. Algunos de los compuestos más representativos son el ácido palmítico, el ácido oleico, el ácido linoleico y el ácido araquidónico. Estas moléculas también experimentan procesos oxidativos dentro de la planta, generando aldehídos y alcoholes responsables del aroma de las hojas verdes (Azcón & Talón, 2008).

### **2.7.4. Alcaloides**

Forman el grupo de sustancias vegetales secundarias más diverso y representativo. Son moléculas orgánicas medianamente complejas, con un carácter básico debido a la presencia de uno o más átomos de nitrógeno en su estructura. Su síntesis se da partir de aminoácidos o sus derivados. Estas sustancias poseen un cierto grado de toxicidad tanto en humanos como animales, y su acción principal se ejerce sobre el sistema nervioso central. Por esta razón, se utilizan ampliamente en la medicina. Algunos de los compuestos más comunes utilizados con fines medicinales incluyen la morfina, la estricnina y la atropina (Azcón & Talón, 2008).

La importancia de estos compuestos en las plantas radica en su función como posibles reservorios de nitrógeno, además de su capacidad para actuar como sustancias alelopáticas o disuasivas alimenticias. De este modo, contribuyen a la defensa de la planta contra otras especies vegetales o plagas.

## **2.8. Obtención de metabolitos secundarios**

Las plantas y especias son consideradas hoy en día recursos invaluables, utilizadas en diversas actividades como aditivos, saborizantes, fármacos, entre otros. La obtención de los principios activos para estos fines se logra mediante la extracción de los metabolitos secundarios presentes en las diversas partes de las plantas. Por esta razón, la ciencia ha desarrollado diversas técnicas para llevar a cabo este proceso. Algunas de las técnicas más empleadas son la hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) y la extracción con solvente (Lucchesi et al., 2004; Stashenko et al., 2004).

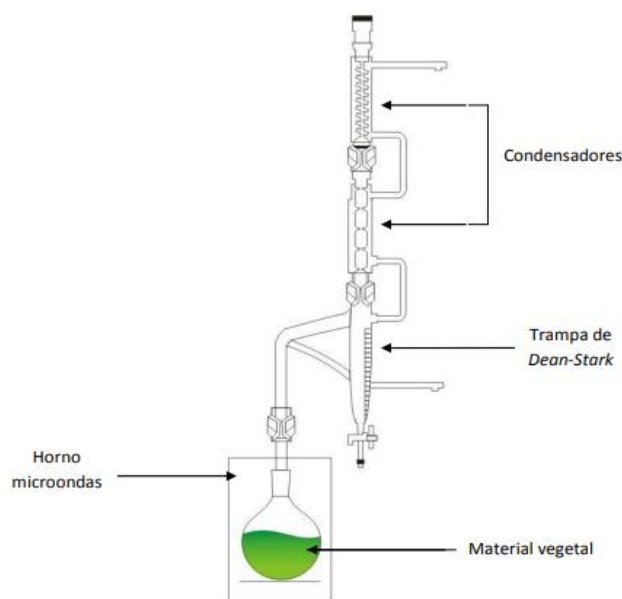
### **2.8.1. Hidrodestilación asistida por microondas (MWHD)**

Esta técnica se basa en el mismo principio que otras técnicas como la hidrodestilación simple y la hidrodestilación por arrastre con vapor.

El principio fundamental de la técnica es el calentamiento dieléctrico, mediante el cual se aprovecha la radiación de microondas. Esta radiación se convierte en energía calórica que entra en contacto con la muestra sólida (material vegetal), afectando toda la matriz simultáneamente. Como resultado, se alcanza rápidamente un punto de ebullición cercano al del agua, lo que provoca la ruptura de las estructuras celulares dentro de la planta donde se almacena la esencia. Debido a la presión de vapor, la esencia es liberada, y el vapor de agua transporta los compuestos hacia los condensadores, donde se colectan y condensan. Posteriormente, se separan por decantación y se recogen en la trampa de Dean-Stark (Camel, 2000).

**Figura 6.**

*Montaje experimental para la aplicación de la técnica MWHHD en una muestra de material vegetal. Imagen tomada de Llinás, M. (2011). Estudio de la composición química de los extractos y aceites esenciales de Hyptis sp. y Lippia alba obtenidos por diferentes técnicas de extracción. Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander. p. 50.*



Entre las ventajas de emplear esta técnica se destacan los mayores resultados en cuanto a la obtención de los componentes vegetales, lo que se traduce en un mayor porcentaje de recuperación o rendimientos de extracción, así como una menor variabilidad en comparación con los métodos de extracción convencionales. Otras ventajas incluyen tiempos de extracción considerablemente más cortos, la facilidad de aplicar la técnica y la capacidad de trabajar con grandes cantidades de material vegetal (Gomez & Witte, 2001).

### **2.8.2. Extracción con solvente**

La extracción con solvente es una de las técnicas más eficientes para la obtención de analitos. El procedimiento consiste en colocar una muestra (generalmente material vegetal) en estado seco en contacto con diferentes solventes orgánicos, como etanol o cloroformo, entre otros. La importancia del solvente radica en sus propiedades fisicoquímicas en relación con la matriz que se va a extraer. Por esta razón, existen distintos tipos de extracción, como la extracción sólido-sólido y la extracción líquido-líquido, que pueden llevarse a cabo mediante procesos continuos o por lotes (Eslava & Fajardo, 2020; Benítez et al., 2020)

Dentro de los métodos de extracción con solvente, la maceración y la percolación son los más frecuentes (Sharapin, 2000). En la maceración, el material vegetal se tritura y se sumerge en un sistema cerrado con solvente a temperatura ambiente, y se deja durante varios días hasta lograr la extracción completa de la matriz de interés. En la percolación, el material vegetal también se pone en contacto con el solvente en un sistema cerrado, pero los analitos fluyen lentamente desde el material sólido hacia la fase líquida a través de un material poroso. Al finalizar este proceso, es necesario concentrar el extracto, donde se encuentran los analitos de interés (Regino & Rengifo, 2021).

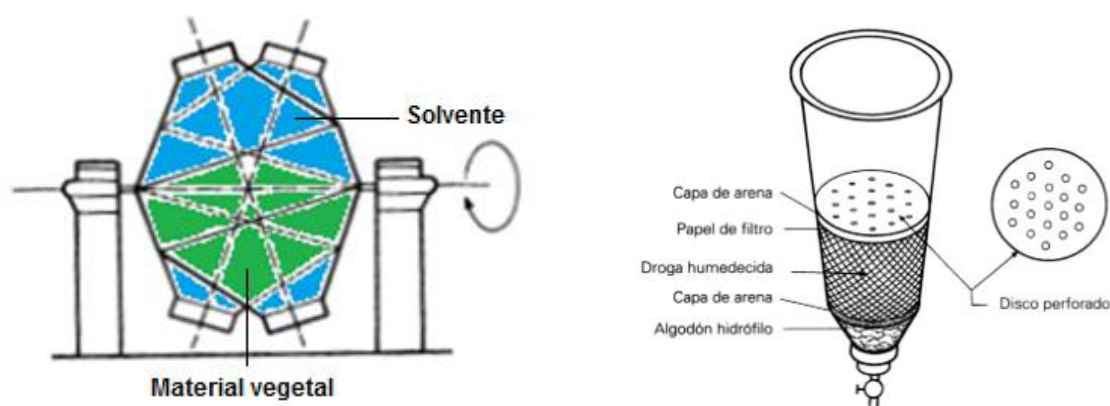
Es importante señalar que los solventes utilizados también pueden solubilizar y extraer otros componentes del material, como grasas y ceras. Por ello, al finalizar el proceso de extracción, es necesario hacer una limpieza del producto final, eliminando los componentes no deseados y el exceso de solvente (Benítez et al., 2020; Regino & Rengifo, 2021).

En las ventajas de estos procedimientos se encuentra el hecho de que no se produce destrucción térmica ni alteración química de los componentes del extracto, ya que no se

emplean temperaturas elevadas. Además, permiten la separación de componentes presentes en la matriz en pequeñas cantidades (Eslava & Fajardo, 2020).

### Figura 7.

*Representaciones del esquema de trabajo de la maceración (escala industrial) y la percolación. Imágenes tomadas y modificadas de Sharapin (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (pp. 44 y 46).*



## 2.9. Análisis de metabolitos secundarios

El análisis de aceites esenciales y extractos vegetales puede dividirse en tres etapas principales de estudio. La primera etapa, que incluye el análisis sensorial, es realizada por expertos capacitados para evaluar las características organolépticas de los productos obtenidos. La segunda etapa, que se centra en las propiedades fisicoquímicas, se lleva a cabo mediante pruebas estandarizadas, como la medición de densidad, índice de refracción, puntos de congelación, entre otras. Finalmente, la tercera etapa corresponde al estudio de la composición química, el cual se realiza utilizando técnicas avanzadas como la cromatografía líquida y la cromatografía de gases acopladas a espectrometría de masas (Stashenko et al., 2014).

### **2.9.1. Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es una técnica analítica que permite separar los componentes de una muestra y, al mismo tiempo, determinar sus concentraciones. Esta técnica se basa en operaciones de equilibrio que conducen a la separación de los componentes de una mezcla mediante fenómenos de partición entre dos fases distintas: una fase estacionaria que permanece inmóvil dentro de la columna del equipo cromatográfico y una fase móvil que fluye a través de dicha columna (Bandoni, 2000).

Las columnas utilizadas en la cromatografía de gases son generalmente columnas tubulares, abiertas o capilares, y están hechas de sílice fundida con un diámetro pequeño, que varía entre 0.20 a 0.32 mm, y una longitud de 10 a 60 metros. Estas características permiten separar los componentes de las mezclas según su polaridad y peso molecular, lo que contribuye a una alta resolución. Para el análisis de metabolitos secundarios, las columnas más comunes son las de polietilenglicol (CARBOWAX 20m), que actúan como la fase polar, y las de polidimetilsiloxano (DB-1, DB-5), que funcionan como la fase apolar (Grob & Barry, 2004; Ahuja, 2003).

En cuanto al análisis, el equipo cromatográfico consta de un sistema de inyección que introduce la muestra en la columna. Luego, la columna se coloca en un horno cuya temperatura se ajusta según la necesidad del análisis, en función principalmente del punto de ebullición de los analitos de la muestra y el grado de separación requerido. Los analitos que eluyen de la columna se encuentran con un detector que cual registra una señal proporcional a su concentración. La columna es la parte más crucial del sistema, ya que su elección, dependiendo de características como la polaridad de la fase estacionaria, el diámetro y la longitud, influye directamente en la eficiencia de la separación y la velocidad del análisis (Grob & Barry, 2004; Ahuja, 2003).

El análisis de los componentes presentes en la muestra se realiza mediante la comparación de los tiempos de retención (el tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta la aparición de la señal en el cromatograma) de los componentes con los de patrones validados. Estos tiempos dependen de variables como la técnica de inyección, la temperatura, el flujo de los gases, el tipo de columna y diseño del equipo. Por esta razón, se introducen unos parámetros adicionales como los tiempos de retención relativos y los índices de retención calculados a partir de estos tiempos y por comparación a una secuencia de sustancias a las que se les asignan valores específicos de índices de retención. Uno de los parámetros más utilizados son los índices de Kováts, que describen el comportamiento de retención de una muestra de interés en comparación con una muestra de hidrocarburos saturados (alcanos). Los índices de Kováts tienen diversas aplicaciones, como el análisis de muestras biológicas, gasolinas, pesticidas, esencias de frutas y aceites esenciales, entre otros (Grob & Barry, 2004; Ahuja, 2003). Aunque originalmente se utilizaban en la separación isotérmica, hoy en día los procesos cromatográficos suelen realizarse con temperaturas programadas, por lo que los índices de retención lineal son los más aplicados.

Los índices de retención proporcionan información sobre la identidad de los componentes en la mezcla analizada. Sin embargo, debido a que muchos compuestos presentan índices de retención similares, no se debe basar la caracterización únicamente en este parámetro. Por ello, es necesario incorporar técnicas adicionales, como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para obtener resultados más precisos y concluyentes.

### ***2.9.2. Cromatografía líquida***

La cromatografía líquida, al igual que la cromatografía de gases, se basa en el paso de una mezcla de componentes a través de una fase móvil, la cual transita por una fase

estacionaria fija dentro de una columna cromatográfica. La diferencia principal radica en la fase móvil: mientras que en la cromatografía de gases se emplea un gas de arrastre, como Helio o Nitrógeno, en la cromatografía líquida se utiliza un líquido, como el acetonitrilo. El proceso de separación de la mezcla ocurre debido a las diferencias en la velocidad de migración de los componentes (analitos) y su interacción con la fase estacionaria utilizada (Ahuja, 2003).

La cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC) es una variante avanzada de la cromatografía líquida convencional, utilizada para la separación de componentes en una muestra. Su principal ventaja es la mejora en la resolución y la velocidad de análisis, lograda mediante el uso de partículas de menor tamaño ( $\leq 2 \mu\text{m}$ ), presiones más elevadas en la bomba ( $> 1400$  bares) y columnas más pequeñas.

En esta técnica, la fase estacionaria es no polar, generalmente compuesta de sílice tratada, mientras que la fase móvil transporta la muestra a través del sistema. Durante el análisis, los componentes de la muestra se separan a medida que atraviesan la columna y, posteriormente, el sistema de detección registra su elución. La señal obtenida se convierte en un cromatograma, donde la intensidad es proporcional a la cantidad de cada componente. A partir de estos datos, es posible realizar un análisis cualitativo y cuantitativo (Kazakevich & LoBrutto, 2006).

La UHPLC es especialmente útil en el análisis de matrices complejas, como muestras biológicas, donde se requiere alta resolución para identificar múltiples compuestos. Otras ventajas con las que cuenta la técnica incluyen mayor velocidad de análisis, mejor resolución, separaciones más eficientes, mayor precisión y sensibilidad, además de un enfoque más ecológico, ya que reduce el consumo de disolventes en cada análisis (Kazakevich & LoBrutto, 2006).

Entre los detectores más comunes en UHPLC según Fekete et al. (2014), se encuentran:

Detector de Ultravioleta y de fluorescencia

Detector de ultravioleta con arreglo de diodos (UV-DAD)

Detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD)

Detector de índice de refracción (RI)

Detectores acoplados a espectrometría de masas.

Algunos de los componentes principales de un sistema UHPLC son los siguientes:

- Bombas de alta presión: pueden ser binarias, cuaternarias, isocráticas o de gradiente doble, y se encargan de forzar el flujo de la fase móvil a través del sistema.
- Manómetros, caudalímetros y desgasificadores: Garantizan un flujo estable y libre de burbujas.
- Válvulas de muestreo y muestreadores automáticos: Permiten la inyección precisa de la muestra.
- Una columna de separación: Contiene la fase estacionaria, donde ocurre la separación de los analitos.
- Detector y analizador: Identifican los analitos presentes en la fase móvil y generan el cromatograma correspondiente.

### ***2.9.3. Cromatografía acoplada a espectrometría de masas.***

El acoplamiento de la cromatografía a un espectrómetro de masas optimiza tanto el tiempo como la seguridad en el análisis de muestras complejas, permitiendo determinar, de manera simultánea, los componentes cualitativa y cuantitativamente, así como su proporción en la muestra de estudio.

El principio de funcionamiento de la espectrometría de masas consiste en generar iones moleculares cargados positivamente y fragmentos de moléculas provenientes de la columna cromatográfica mediante técnicas de ionización. Estos iones y fragmentos son enviados al analizador de masas, comúnmente un analizador de cuadrupolo o también un sistema *Orbitrap*, donde se separan según su relación masa/carga ( $m/z$ ). Posteriormente, tras la detección de las corrientes iónicas parciales mediante un electromultiplicador, se genera una corriente iónica total que se representa como el cromatograma. De este proceso, se obtiene información tanto sobre los tiempos de retención de los compuestos como sobre sus espectros de masas y patrones de fragmentación.

El método de espectrometría de masas (MS) es altamente sensible y permite trabajar con pequeñas cantidades de muestra, en un rango de 0.1 a 10 ng. Esta sensibilidad puede mejorarse utilizando el modo de monitoreo del ion seleccionado (SIM), en el cual solo se registran los iones representativos de un compuesto específico (Eran, 2006).

El sistema de ionización más comúnmente utilizado en espectrometría de masas es el impacto por electrones. Esta técnica consiste en bombardear las moléculas de una muestra con un haz de electrones de alta energía (generalmente 70 eV), generado por un filamento calentado a altas temperaturas, usualmente tungsteno. Al interactuar con la muestra, estos electrones provocan la expulsión de un electrón de la molécula, dando lugar a la formación de un ion molecular cargado positivamente. Este proceso suele generar también la fragmentación de las moléculas, lo que permite obtener un espectro de masas con un patrón característico, útil para identificar compuestos (Gross, 2006).

También se emplea otra técnica de ionización conocida como *electrospray*. Este proceso consiste en aplicar un campo eléctrico intenso a presión atmosférica sobre un líquido que circula a través de un capilar con flujo reducido. La acción del campo eléctrico provoca que la carga se acumule en la superficie del líquido en la punta de la aguja, lo que genera

su fragmentación en pequeñas gotas cargadas. Estas gotas atraviesan posteriormente una corriente de gas inerte, generalmente N<sub>2</sub>, que se encuentra a alta temperatura. Este paso permite eliminar una gran proporción de las moléculas del disolvente y favorecer la desolvatación. Finalmente, los iones del analito son conducidos a través de un capilar hacia el analizador, donde se registra una señal proporcional a su concentración y se obtiene el respectivo cromatograma (Gaskell, 1997).

Las ventajas de esta técnica son diversas, entre las cuales destacan las siguientes, según Gaitán (2010):

- Velocidad de análisis: Los espectros de muestras pueden obtenerse en tiempos muy cortos.
- Alta sensibilidad: La técnica es capaz de detectar concentraciones en niveles de ppm o ppb.
- Seguridad en el proceso de identificación: Cada molécula analizada genera su espectro característico.
- También permite obtener información acerca de la estructura e isótopos de moléculas presentes en las muestras analizadas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Realizar un estudio comparativo del perfil fitoquímico presente en aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos obtenidos de diversas partes frescas de la planta *Ocimum gratissimum*, utilizando técnicas analíticas de GC/MS y LC/MS.

#### 3.2. Objetivos específicos:

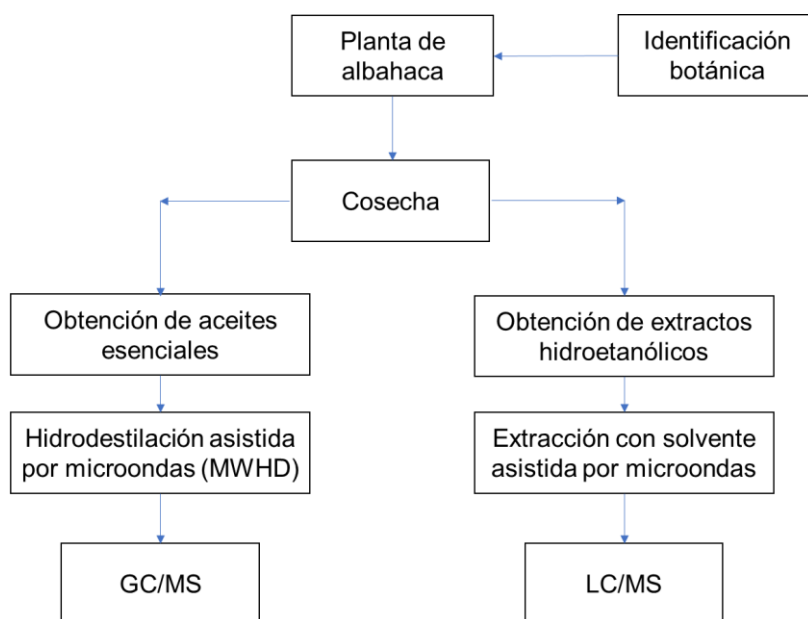
- Caracterizar químicamente los metabolitos presentes en los extractos y aceites esenciales obtenidos, utilizando técnicas analíticas GC/MS y LC/MS.
- Comparar la composición química de los aceites esenciales y extractos obtenidos a partir de la planta en estado fresco.

#### 4. METODOLOGÍA

La metodología implementada para el desarrollo completo de los objetivos planteados comprende varias etapas, que se muestran en la estructura general presentada en la **Figura 8**.

##### Figura 8.

Diagrama de flujo de la metodología general empleada para el estudio presente.



##### 4.1. Reactivos y solventes

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las siguientes sustancias: linalol (97%), 1,8-cineol (eucaliptol) (99%), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (98.5),  $\alpha$ -humuleno (96%), óxido de cariofileno (95%), todas adquiridas a *Sigma-Aldrich* (SA, St. Louis, MO, EE. UU). También se empleó etanol comercial (96%), adquirido en SUQUIN (Bucaramanga, Colombia) y sulfato de sodio anhidro (>99%), comprado a *Mallinckrodt Baker Inc.* (Phillisburg, NJ, EE. UU.). La mezcla de *n*-alcanos C<sub>6</sub>-C<sub>25</sub> y el *n*-tetradecano fueron obtenidos de *AccuStandard Inc.* (New Haven, CT, EE. UU.). Los gases hidrógeno, aire,

helio, y nitrógeno (99.995%) se adquirieron de la empresa Messer (Bucaramanga, Colombia). Finalmente, el formiato de amonio ( $\geq 99\%$ ), *iso*-propanol (98%), metanol grado LC/MS y agua tipo I (sistema de purificación Millipore DirectQ™), se obtuvieron de *Merck* (Darmstadt, Alemania)

#### **4.2. Identificación taxonómica de la planta y recolección del material vegetal**

La especie de planta objeto de estudio se propagó mediante esquejes, que posteriormente se cultivaron hasta una altura promedio de 80-100 cm en el complejo agroindustrial del CENIVAM, ubicado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Santander, Colombia, N 7° 08' 25.4" W 73° 06' 57.4"). Seguidamente, se cosechó el material vegetal que se encontraba entre los estados fenológicos de floración y maduración. La especie, perteneciente a la familia de las albahacas, fue identificada taxonómicamente por el equipo del Herbario de la Universidad Industrial de Santander y registrada con el *voucher* N° **22720** (Registrado legalmente en el registro único nacional de colecciones biológicas). Además, se designó el nombre científico *Ocimum gratissimum* el 6 de agosto del 2024. Una vez obtenido el material vegetal, se dividió en dos partes para los respectivos experimentos: una parte se destinó a la obtención del aceite esencial mediante hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) y la otra a la obtención del extracto hidroalcohólico mediante extracción con solventes.

#### **4.3. Obtención de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos**

##### **4.3.1. Hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD)**

La obtención del aceite esencial de la planta *O. gratissimum* se realizó con el fin de estudiar posteriormente los metabolitos secundarios presentes en él. Este procedimiento se llevó a cabo según lo descrito por Stashenko & Martínez (2011), adaptándose para ello un horno microondas convencional *Samsung* MS-32J5133AG de 1200W de potencia y

frecuencia de radiación de 2.4 GHz el cual se utilizó a un nivel de potencia del 60% respecto a su potencia máxima. El material vegetal destinado a la obtención del aceite esencial se hidrodestiló en un montaje experimental que consistía en un aparato tipo *Cleavenger* acoplado a una trampa *Dean-Stark* durante una hora, realizando tres ciclos de 15 minutos cada uno, con un tiempo de reposo de cinco minutos al final de cada ciclo. El material vegetal, previamente picado para homogenizar el tamaño de las partículas y optimizar la destilación, fue insertado en un balón de dos litros al que se le añadieron 200 mL de agua destilada, en una proporción 1:1 respecto a la cantidad de material vegetal a destilar (utilizándose 200 g de material vegetal por cada destilación).

El aceite esencial obtenido al finalizar todo el proceso se recogió por decantación. Posteriormente, se realizó una filtración a través de una mini columna, dentro de la cual se dispusieron algodón y sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para eliminar impurezas y el exceso de humedad presente al momento de recoger el aceite esencial. La hidrodestilación se efectuó por triplicado, y los rendimientos de cada ciclo se calcularon en relación con el peso del aceite esencial obtenido y la cantidad de material vegetal utilizado. Una vez completada la filtración, cada muestra de aceite se almacenó en frascos ámbar de 2 mL y se guardaron en refrigeración para evitar la degradación causada por la luz, con el fin de analizarlos más adelante mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Este proceso se repitió con el material vegetal en estado fresco, utilizando distintas partes de la planta, como tallos, flores y hojas.

#### **4.3.2. Extracción con solvente Agua-Etanol.**

La obtención del extracto hidroalcohólico de la planta *O. gratissimum* se llevó a cabo con el objetivo de estudiar los compuestos presentes en el mismo, siguiendo el procedimiento descrito por Borrás et al. (2015) y con algunas modificaciones adicionales. El material

vegetal fresco, previamente picado y homogenizado (25g de material vegetal que incluyó tallos, hojas y flores), se introdujo en un frasco ámbar de 1 L junto con 500mL de una solución de etanol (96%) y agua destilada en una proporción 70/30 (v/v), correspondiente a una relación 1:20 respecto a la cantidad de material vegetal utilizado. Esta mezcla se dejó reposar durante aproximadamente una hora y luego se sometió a un tratamiento en un equipo de ultrasonido *Elmasonic S15H* (Signen, Alemania) a 50 °C durante 1 hora. El extracto obtenido fue depurado de cualquier residuo vegetal mediante dos filtraciones: la primera a gravedad y la segunda por filtración al vacío. Posteriormente, el extracto resultante se concentró en un roto evaporador *Heidolph (Hei-VAP, Advantage HL*, Chicago, EE. UU) a 70 rpm y 50 °C durante 1 hora y media. Seguidamente, el extracto concentrado se secó en un liofilizador de bandeja *VirTis AdVantage Plus* (SP Scientific, Gardiner, New York, EE. UU) durante 48 horas para eliminar el agua residual y poder analizar la fracción de compuestos más pesados remanentes en el extracto. Finalmente, los extractos fueron almacenados y analizados mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

El proceso de extracción se repitió en triplicado, y los rendimientos de cada extracción se calcularon en relación con el peso del extracto obtenido y la cantidad de material vegetal utilizado inicialmente.

#### **4.4 Análisis cromatográfico**

##### **4.4.1. Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

Para el análisis, las muestras se prepararon disolviendo 10 mg del AE en una solución de n-tetradecano (1 mL, 500 ppm en diclorometano). El análisis se realizó utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Se empleó un cromatógrafo de gases modelo 6890 *Plus* (*Agilent Technologies Series*, Palo Alto, CA,

EE. UU) (**Figura 9**), acoplado a un detector selectivo de masas MSD-5973 *Network* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE. UU). El modo de inyección fue *Split* (1:30) y la temperatura del inyector se mantuvo constante a 250°C. El programa de temperatura en el horno comenzó a 50°C (manteniéndose durante cinco minutos) y aumentó a una velocidad de 5°C/min hasta llegar 150°C (mantuvo esa temperatura por dos minutos). Posteriormente, la temperatura se incrementó nuevamente hasta los 230°C (manteniendo la temperatura durante 10 min) a la misma velocidad de 5°C/min. En la columna DB-5MS, se agregó una rampa de temperatura adicional hasta alcanzar los 275 °C (manteniendo esa temperatura por 15 minutos) a una velocidad de 10°C/min. La separación de los compuestos presentes en el AE se realizó utilizando dos columnas capilares. La primera columna tenía una fase estacionaria apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), DB-5MS (*J&W Scientific*, *Folsom*, CA, EE. UU.), con dimensiones de 60m x 0,25 mm (d.i.) x 0,25 µm (d<sub>f</sub>). La segunda columna contenía una fase estacionaria polar de poli (etilenglicol), DB-WAX, (*J&W Scientific*, *Folsom*, CA, EE. UU.) con las mismas dimensiones de 60m x 0,25 mm (d.i.) x 0,25 µm (d<sub>f</sub>).

**Figura 9.**

*Cromatógrafo de gases AT 6890 Plus, equipado con un detector selectivo de masas MS 5973 Network.*



Foto tomada por el autor Brayan Salomon VESGA PADILLA. Fecha: 3 de octubre de 2024. Lugar: Laboratorio de instrumentación analítica de CROM-MASS, UIS, Bucaramanga.

Los espectros de masas se obtuvieron utilizando la técnica de ionización por electrones (EI) con una energía de 70 eV. Los datos fueron procesados mediante con el *software MSDChemstation G1701DA* (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.). Para la identificación de los compuestos presentes en el AE, el primer análisis se basó en la comparación de los espectros de masas obtenidos con los almacenados en las bases de datos de Adams (2007) y NIST (2023), utilizando un margen de coincidencia del 90% o superior como criterio para identificar los componentes presentes en el AE. Como segundo criterio de identificación, se emplearon los índices de retención lineales, (IRL) los cuales se calcularon para ambas columnas utilizando una serie análoga de hidrocarburos n-alcános C<sub>6</sub>-C<sub>25</sub> (**Ecuación 1**).

$$IRL = 100n + 100 \frac{t_{R(c)} - t_{R(a)}}{t_{R(a)} - t_{R(A)}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

- IRL = Índice de retención lineal del compuesto analizado
- a y A = Número de átomos de carbono del alcano que eluye antes (a) o después (A) del compuesto analizado
- $t_{R(c)}$  = Tiempo de retención del compuesto analizado (c)
- $t_{R(a)}$  y  $t_{R(A)}$  = Tiempos de retención para los alcanos que eluyen antes (a) o después (A) del compuesto analizado.

Como tercer criterio, que proporciona una identificación confirmatoria, se compararon los espectros de masa de los compuestos encontrados en el AE y sus índices de retención lineales con los de patrones certificados disponibles en el laboratorio de investigación.

#### **4.4.2. Análisis de extractos hidroalcohólicos por cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución UHPLC/ESI<sup>+</sup>/Orbitrap-HRMS**

Se pesó 1 mg de los extractos hidroalcohólicos de *O. gratissimum* y se disolvió en 1 mL de fase móvil metanol-agua (50:50), (5mM de formiato de amonio y 0.1% de ácido fórmico (98%)). El análisis de los extractos se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía líquida de ultra alta eficiencia *Vanquish<sup>TM</sup>* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE. UU.) UHPLC/ESI/*Orbitrap*-MS, que incluía una unidad de desgasificación, una bomba binaria de gradiente, un automuestreador (a 10°C) y un compartimiento de columna que era controlado termostáticamente a 40°C. La separación cromatográfica se realizó en una columna *Zorbax Eclipse XDB C<sub>18</sub>* (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.), con una longitud de 50 mm x 2.1 mm (d.i.) y tamaño de partícula de 1.8 µm. El caudal de la fase móvil fue de 300 µL/min y consistió en dos fases: fase A (acuosa) con agua (0.1 % ácido fórmico y 5 mM formiato de amonio) y fase B (orgánica) con metanol (0.1 % ácido fórmico y 5 mM formiato de amonio). El gradiente inicial fue de 100 % A,

cambiando linealmente a 100% B en ocho minutos, manteniéndose durante cinco minutos, regresando luego a 100% A en 1 minuto y permaneciendo así por otros cuatro minutos. El volumen de inyección fue de 2  $\mu$ L. El espectrómetro de masas *Q-Exactive Plus Orbitrap* (Thermo Scientific; Bremen, Alemania) conectado al cromatógrafo líquido, contaba con una fuente de ionización por electro nebulización con calentamiento (HESI-II) (Figura 10.). El voltaje del capilar fue de 3.25 kV, la temperatura del nebulizador se fijó en 350 °C y la del capilar en 320 °C. El gas auxiliar ( $N_2$  pureza > 99%) fue suministrado por un generador (NM32LA, *Peak Scientific*, Escocia, Reino Unido). Los iones inyectados a la celda HCD se fragmentaron con energías de colisión normalizadas, variando entre 10 eV y 70 eV. El rango de masas en el espectrómetro fue de 80 a 1000  $m/z$ .

**Figura 10.**

*Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia Vanquish™ acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive.*



Foto tomada por el autor Brayan Salomon VESGA PADILLA. Fecha: 14 de marzo de 2024. Lugar: Laboratorio Alexander MAKAROV de CROM-MASS, UIS, Bucaramanga.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software *Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS)*, versión 7.2, y el software *Thermo Xcalibur 3.1* (Thermo Scientific, San José, CA, EE. UU.). La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación de sus tiempos de retención ( $t_R$ ), espectros de masas y fórmulas moleculares exactas con los de las sustancias-patrón disponibles, así como con los datos de las bases de datos HMDB 4.0 y MassBank. Los espectros de masas fueron analizados en modo de adquisición de iones seleccionados (SIM), con energías de la cámara de colisiones que variaron entre 10 y 70 eV, y en los modos de ionización de iones positivos y negativos.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Identificación botánica

La **Tabla 2.** presenta la información relacionada con la identificación botánica de la planta de albahaca objeto de este estudio. En la tabla se incluyen detalles como la descripción de la especie, su número de *voucher* y una fotografía representativa que muestra sus inflorescencias.

**Tabla 2.**

*Identificación botánica para la especie de albahaca Ocimum gratissimum.*


Especie	Sinónimos	N° <i>voucher</i>	Nombre común	Descripción	Fotografía
<i>Ocimum gratissimum</i>	- <i>O. guineense</i> - <i>O. viride</i>	Herbario UIS 22720	Albahaca de clavo (Ugbogu et al., 2021) Árbol de albahaca (Shasany & Kole, 2018)	Arbusto que puede alcanzar 1m de altura, con inflorescencias terminales de tipo racemoso y corola bilabiada. Hojas siempre opuestas y entrecruzadas, y sus tallos son cuadrangulares.	

Foto tomada por el autor Brayan Salomon VESGA PADILLA. Fecha: 17 de junio de 2024. Lugar: CENIVAM, UIS, Bucaramanga.

### 5.2. Rendimiento de las destilaciones y extracciones realizadas

El rendimiento de las destilaciones y extracciones realizadas se calculan utilizando las **ecuaciones 2 y 3**, las cuales relacionan la cantidad de material vegetal empleado con la cantidad de AE y extractos obtenidos en cada proceso.

$$\text{Rendimiento de destilación, \%} = \frac{\text{Cantidad aceite esencial obtenido (g)}}{\text{Cantidad de material vegetal empleado}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.}$$

$$\text{Rendimiento de extracción, \%} = \frac{\text{Cantidad de extracto obtenido (g)}}{\text{Cantidad de material vegetal empleado}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.}$$

En la **Tabla 3.** se presentan los rendimientos del AE y del extracto hidroalcohólico, obtenidos a partir de la mezcla de las distintas partes frescas de la planta *Ocimum gratissimum*.

**Tabla 3.**

*Rendimientos de destilación y extracción obtenidos mediante la implementación de la técnica de hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) y extracción con solvente a partir de material fresco de la planta *Ocimum gratissimum*.*

	Material vegetal <i>Ocimum gratissimum</i>	Cantidad obtenida (g)	% p/p (x±s, n=3)
<b>Aceite esencial</b>	200 g entre hojas, tallos y flores	0.68	0.36±0.01
		0.73	
		0.73	
<b>Extracto hidroalcohólico</b>	25g entre hojas, tallos y flores	0.67	2.68±0.06
		0.69	
		0.66	

### 5.3. Caracterización química de los compuestos presentes (metabolitos secundarios) en aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*

En la **Tabla 3.** se presentan los rendimientos obtenidos para el AE de la planta *O. gratissimum*, utilizando tallos, hojas y flores. El aceite destilado tiene un color amarillento y un olor característico. Según otros estudios, los rendimientos en la obtención de AE pueden verse influenciados por factores como las condiciones climáticas, los métodos de

obtención y las variaciones entre las plantas (Lachowicz et al., 1997). En un estudio realizado por Özcan & Chalchat (2002), se reportó que los rendimientos de algunas especies del género *Ocimum* varían entre 0.15 y 1.59%, lo que sitúa los resultados obtenidos en este estudio dentro de ese rango.

En un estudio realizado por Vieira et al. (2001), en el que analizaron 12 variaciones *O. gratissimum* para determinar si los compuestos volátiles y flavonoides pueden utilizarse como biomarcadores, se reportaron rendimientos del AE para el material vegetal en estado seco entre 0.29 y 1.66 % (p/p). Al comparar estos resultados con los obtenidos en la presente investigación (**Tabla 3.**), se observa que los rendimientos están dentro del rango reportado para *O. gratissimum* en sus diversas variaciones.

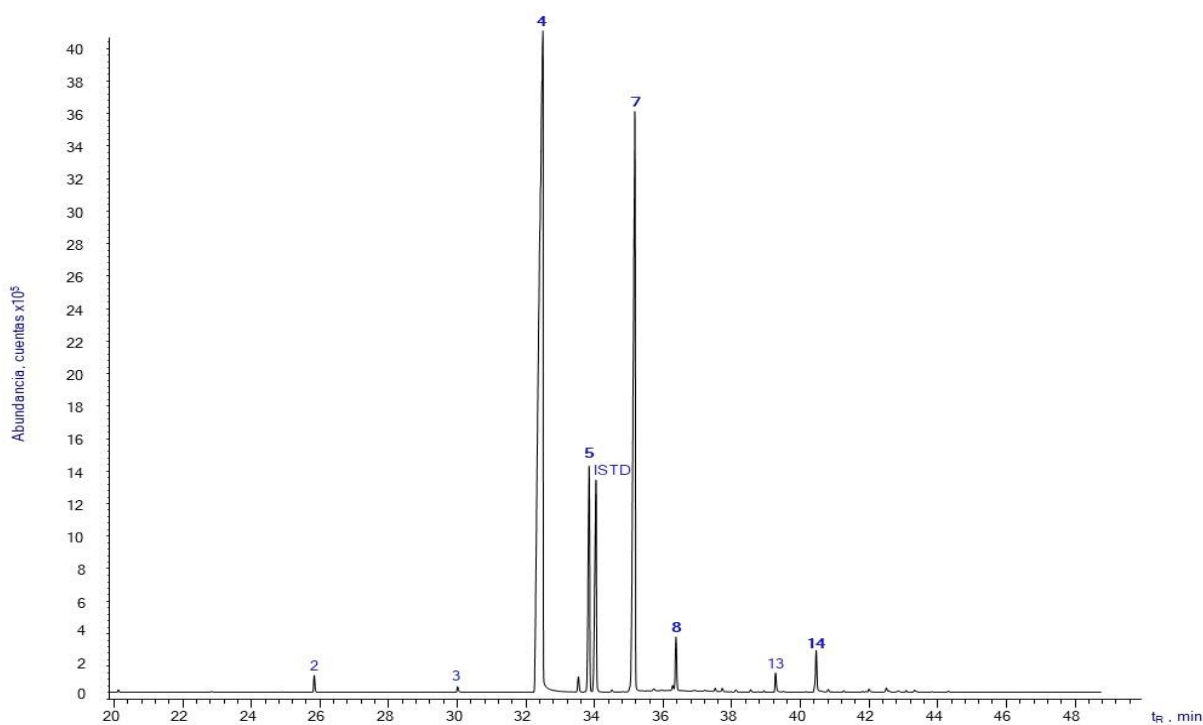
Los metabolitos secundarios presentes en los AE de *O. gratissimum* obtenidos por MWHD fueron analizados mediante GC/MS, siguiendo los parámetros de integración de los picos cromatográficos que se detallan a continuación: el área relativa mínima para considerar un pico cromatográfico fue de 0.1 % y el umbral de integración (*threshold*), fue de 15 (para la columna DB-5ms) y 16.5 (para la columna DB-WAX). Los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS en la columna apolar (DB-5MS) del AE de *O. gratissimum* se muestran en la **Figura 11.**

Se realizó una comparación de los espectros de masas de los compuestos detectados, junto con los índices de retención lineales calculados para las columnas con fase estacionaria polar y apolar, en relación con los reportados en la literatura y las bases de datos (Adams, 2007; Babushok, 2011; NIST, 2023). Esta comparación también se efectuó con las sustancias de referencia disponibles en el laboratorio, con el fin de obtener una identificación confirmatoria de los compuestos.

En la **Tabla 4.** se muestra la composición química encontrada en los AE de *O. gratissimum*. Se detectaron 26 componentes con áreas relativas superiores al 0.1 %, de los cuales el 38% son sesquiterpenos, el 31% sesquiterpenos oxigenados, el 15% son monoterpenos oxigenados y el 8% fenilpropanoides. En este grupo se observaron cinco compuestos no identificados (tres sesquiterpenos y dos sesquiterpenos oxigenados), para los cuales se confirmó, mediante sus espectros de masas, el grupo de terpenos al que pertenecían. Los espectros de masas de estos compuestos se encuentran en la sección de anexos. Entre todos los compuestos encontrados, los terpenos hidrocarbonados del tipo sesquiterpenos fueron los más variados, lo que sugiere una prevalencia en la vía biosintética del mevalonato y/o del piruvato-GA3P en la producción de metabolitos secundarios de la planta (Azcón & Talón, 2008).

### Figura 11.

*Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS de los AE de Ocimum gratissimum de diferentes partes en estado fresco (flores, tallos y hojas). Columna DB-5MS (60m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). La identificación de cada pico cromatográfico se encuentra en la **Tabla 4.***



**Tabla 4.**

*Composiciones químicas obtenidas por GC/MS de los aceites esenciales de la planta  
Ocimum gratissimum.*

N° / Figura 11.	Compuesto	Familia	Índices de retención lineal (IRL)				GC Área % DB-5MS
			DB5-MS		DB-WAX		
			Exp	Lit	Exp	Lit	
1	Eucaliptol <sup>abc</sup>	MO	1034	1031 <sup>d</sup>	1206	1211 <sup>e</sup>	0.1
2	Borneol <sup>ab</sup>	MO	1176	1169 <sup>d</sup>	1702	1700 <sup>e</sup>	0.4
3	Timol <sup>abc</sup>	MO	1290	1290 <sup>d</sup>	2180	2164 <sup>e</sup>	0.2
4	<b>Eugenol<sup>abc</sup></b>	FN	1357	1359 <sup>d</sup>	2168	2162 <sup>e</sup>	60.1
5	<b>β-Elemeno<sup>ab</sup></b>	HS	1394	1390 <sup>d</sup>	1595	1591 <sup>e</sup>	7.6
6	Isocariofileno <sup>ab</sup>	HS	1412	1408 <sup>d</sup>	-	1573 <sup>f</sup>	0.1
7	<b>(E)-β-Cariofileno<sup>abc</sup></b>	HS	1431	1427 <sup>f</sup>	1605	1596 <sup>e</sup>	26.4
8	<b>α-Humuleno<sup>abc</sup></b>	HS	1465	1468 <sup>d</sup>	1673	1667 <sup>e</sup>	1.6
9	β-Selineno <sup>ab</sup>	HS	1498	1490 <sup>d</sup>	-	1715 <sup>e</sup>	0.1
10	α-Selineno <sup>ab</sup>	HS	1504	1498 <sup>d</sup>	-	1725 <sup>e</sup>	0.1
11	Compuesto no identificado <b>NI</b>	HS	1505	-	-	-	0.1
12	(E)-γ-Bisaboleno <sup>ab</sup>	HS	1531	1531 <sup>d</sup>	-	1533 <sup>e</sup>	0.1
13	Hedycariol <sup>ab</sup>	SO	1555	1548 <sup>d</sup>	2077	2083 <sup>f</sup>	0.6
14	<b>Óxido de Cariofileno<sup>abc</sup></b>	SO	1593	1583 <sup>d</sup>	1984	1986 <sup>e</sup>	1.5
15	Viridiflorol <sup>ab</sup>	SO	1605	1592 <sup>d</sup>	2081	2090 <sup>e</sup>	0.1
16	Epóxido de humuleno II <sup>ab</sup>	SO	1623	1608 <sup>d</sup>	-	2047 <sup>e</sup>	0.1
17	Compuesto no identificado <b>NI</b>	SO	1650	-	-	-	0.2
18	α-eudesmol <sup>ab</sup>	SO	1668	1654 <sup>d</sup>	-	-	0.1
19	Octanal <sup>ab</sup>	-CHO	-	1288 <sup>d</sup>	1290	1287 <sup>e</sup>	0.1
20	Linalool <sup>abc</sup>	MO	-	1096 <sup>d</sup>	1545	1543 <sup>e</sup>	0.1
21	1-Octanol <sup>ab</sup>	ALC	-	1068 <sup>d</sup>	1555	1552 <sup>e</sup>	0.1
22	Compuesto no identificado <b>NI</b>	HS	-	-	1726	-	0.2
23	Compuesto no identificado <b>NI</b>	HS	-	-	1765	-	1.8
24	Metileugenol <sup>abc</sup>	FN	-	1403 <sup>d</sup>	2011	2006 <sup>e</sup>	0.2
25	Elemol <sup>ab</sup>	SO	-	1549 <sup>d</sup>	2077	2079 <sup>e</sup>	0.4
26	Compuesto no identificado <b>NI</b>	SO	-	-	2293	-	0.3

**HS** Hidrocarburos sesquiterpénicos  
**SO** Sesquiterpenos oxigenados  
**MO** Monoterpenos oxigenados  
**FN** Fenilpropanoides  
**ALC** Alcoholes  
**-CHO** Aldehídos

- a= Identificación tentativa basada en la coincidencia de los espectros de masas (EI, 70 eV, coincidencia > 90%)
- b= Identificación tentativa basada en los índices de retención lineal medidos en las columnas DB- 5MS y DB-WAX
- c= Identificación confirmatoria basada en sustancias de referencia (STD): Eucaliptol (1,8-cineol) (99%, IRL<sub>DB-5MS</sub>=1036, IRL<sub>DB-WAX</sub>= 1215), timol (99.5%, IRL<sub>DB-5MS</sub>= 1291, IRL<sub>DB-WAX</sub>= 2185), eugenol (99%, IRL<sub>DB-5MS</sub>=1360, IRL<sub>DB-WAX</sub>= 2166), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (98.5%, IRL<sub>DB-5MS</sub>=1431, IRL<sub>DB-WAX</sub>= 1606),  $\alpha$ -humuleno (96%, IRL<sub>DB-5MS</sub>=1470, IRL<sub>DB-WAX</sub>=1683), óxido de Cariofileno (95%, IRL<sub>DB-5MS</sub>=1598, IRL<sub>DB-WAX</sub>= 1996), linalool (99%, IRL<sub>DB-5MS</sub>=1102, IRL<sub>DB-WAX</sub>= 1551), metileugenol (98%, IRL<sub>DB-5MS</sub>=1402, IRL<sub>DB-WAX</sub>= 2006), por comparación de espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia >95%) y tiempos de retención ( $t_R$ ) por comparación de espectros de masas (MS; EI, 70 eV, >95% de concordancia) y tiempos de retención ( $t_R$ ).
- d= Adams (2007)
- e= Babushok et al. (2011)
- f= NIST (2023)

Los componentes más abundantes presentes en el AE de *O. gratissimum* son el eugenol (60.1%), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (26.4%),  $\beta$ -elemeno (7.6%), Compuesto # 23 **NI** (1.8%) (ver **Tabla 3.**),  $\alpha$ -humuleno (1.6%) y óxido de cariofileno (1.5%). Al analizar el espectro de masas del compuesto # 23 **NI** (**Figura 14.**), se observan patrones de fragmentación típicos de los compuestos sesquiterpénicos, como el ion molecular presente en 204  $m/z$  y las pérdidas de radicales  $CH_3^*$ ,  $C_2H_5^*$  y  $C_5H_{11}^*$ , que dan lugar a las señales en 189, 175 y 133  $m/z$ , respectivamente. Además, se observan señales en 41 ( $C_3H_5^+$ ) y 55 ( $C_4H_7^+$ )  $m/z$ . En el espectro de masas del eugenol (**Figura 12.**), se detectaron pérdidas características de radicales  $CH_3^*$ ,  $CH_3O^*$ ,  $C_2H_3^*$  y  $H_2O$ . Por su parte, los espectros de masas de (*E*)- $\beta$ -cariofileno y  $\alpha$ -humuleno (**Figura 13 y 14.**), presentan pérdidas de radicales  $CH_3^*$ ,  $C_2H_5^*$ ,  $C_3H_7^*$  y  $C_2H_5^*$ , propias de los compuestos sesquiterpenoides.

En un artículo de revisión sobre *O. gratissimum* realizado por Ugboogu et al. (2021), se reportan como componentes principales del aceite esencial, el eugenol, así como varios monoterpenos, entre de los cuales destacan el canfeno, sabineno,  $\alpha$ -pineno, terpinoleno, entre otros; monoterpenos oxigenados como 1,8-cineol, borneol, linalool, citronelal,  $\alpha$ -

terpineol, timol, carvacrol, entre otros; sesquiterpenos como  $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -humuleno, y  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -selineno, entre otros, además de sesquiterpenos oxigenados como óxido de cariofileno, epóxido de humuleno y espatulenol. Al comparar los resultados obtenidos en la **Tabla 4.** con los reportados en la revisión, se observa que en la planta de estudio también se identificaron confirmatoriamente compuestos como eucaliptol (1,8-cineol), (*E*)- $\beta$ -cariofileno, timol,  $\alpha$ -humuleno, óxido de cariofileno, linalool y eugenol, siendo este último el compuesto mayoritario. Asimismo, se detectaron otros compuestos cuya identificación confirmatoria no fue posible, como  $\alpha$ ,  $\beta$ -selineno, borneol, viridiflorol, entre otros.

Según los resultados de la **Tabla 4.**, los compuestos mayoritarios en el AE *O. gratissimum* pueden clasificarse en fenilpropanoides e hidrocarburos sesquiterpénicos. Los hidrocarburos sesquiterpénicos han sido ampliamente estudiados por sus diversas propiedades medicinales, entre las cuales se incluyen efectos terapéuticos en la reducción y el avance del cáncer, actuando como agentes naturales que modulan las células objetivo, las cuales, al ser modificadas, afectan la supervivencia, crecimiento y proliferación de células tumorales. Además, se han documentado efectos antimicrobianos, citotóxicos, antiinflamatorios, fungistáticos, viroestáticos y antihelmínticos. En las plantas, estos compuestos actúan como reguladores del crecimiento, compuestos antimicrobianos, inhibidores de herbívoros y en algunos hongos, como atractores sexuales de los gametos femeninos (Modzelewska et al, 2005; Rucker, 1973). Por otro lado, el eugenol, un fenilpropanoide, también ha sido ampliamente estudiado en los sectores alimentario y perfumería, donde se utiliza como saborizante, odorizante y como precursor principal para la producción de vainillina. Además, se emplea en productos dentales y preparaciones. En el ámbito medicinal, ha mostrado propiedades analgésicas y anestésicas, inhibiendo la producción de prostaglandinas. Asimismo, se han investigado

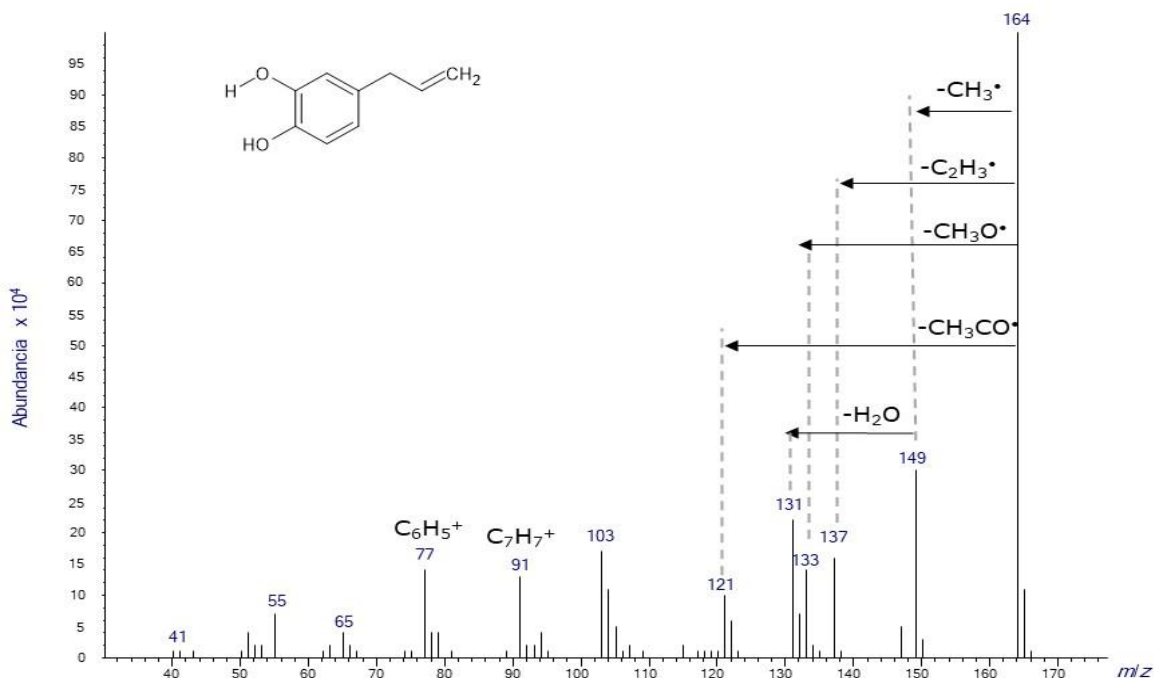
sus propiedades antimicrobianas, actuando como agente antibacteriano y antifúngico, mediante su impacto en la permeabilidad de las membranas de los microorganismos, lo que provoca su muerte (González, 2002; Yuwono et al., 2002). En las plantas, el eugenol exhibe propiedades repelentes e insecticidas cuando estas son atacadas por plagas.

Según un estudio realizado por Grayer et al. (1996), clasificar el quimiotipo de una planta proporciona información útil para desarrollar aplicaciones industriales de compuestos específicos para diversos fines. Por ello, al designar un quimiotipo, se recomienda no enfocarse únicamente en el componente mayoritario, sino también en aquellos compuestos con abundancia superior al 20%, para identificar los tres principales compuestos. Esto es relevante, ya que diversos factores, como la técnica de extracción utilizada, las condiciones climáticas y el tratamiento al que se somete el material vegetal, pueden influir en la obtención de estos metabolitos secundarios (Grayer et al., 1996).

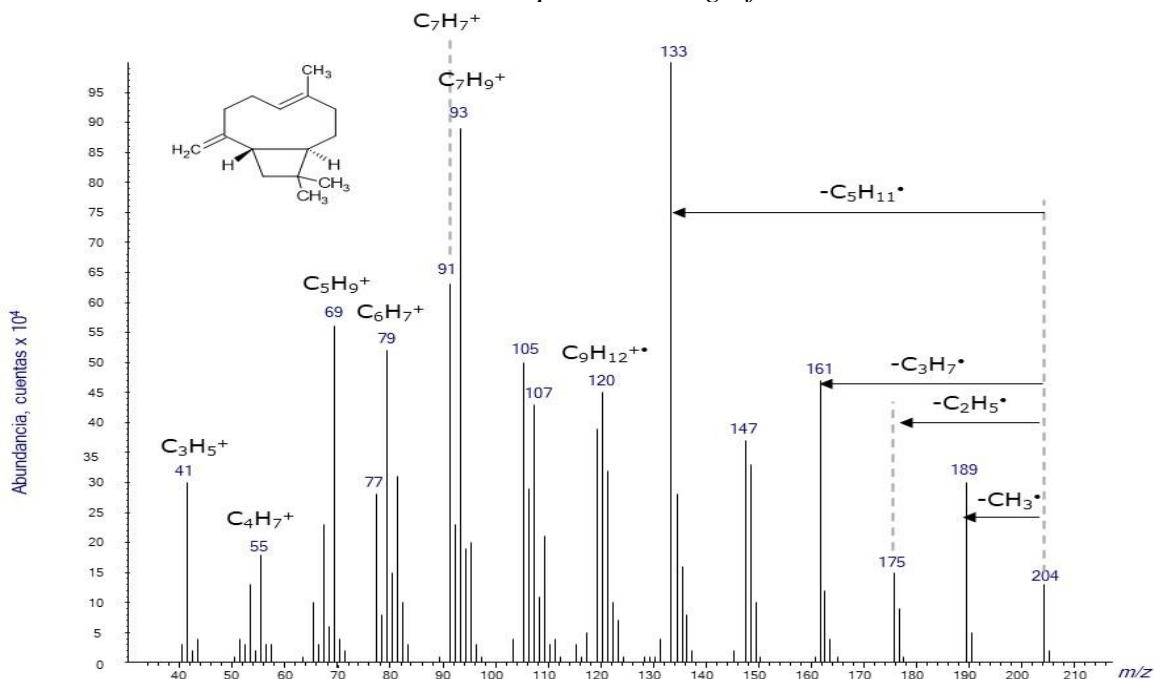
Con base en lo anterior y tras observar los datos de la **Tabla 4.**, el quimiotipo que se puede asignar a *Ocimum gratissimum* sería del tipo eugenol y (*E*)- $\beta$ -cariofileno, compuestos que constituyen los principales componentes mayoritarios, con abundancias superiores al 20% en el AE (60.1 y 26.4 % respectivamente).

**Figura 12.**

Espectro de masas del compuesto eugenol,  $C_{10}H_{12}O_2$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^{+\bullet}]$   $m/z$  164;  $[M-CH_3]^+$   $m/z$  149;  $[M-C_2H_3]^+$   $m/z$  137;  $[M-CH_3O]^+$   $m/z$  133;  $[M-CH_3CO]^+$   $m/z$  121;  $C_7H_7^+$   $m/z$  91;  $C_6H_5^+$   $m/z$  77. Ver pico cromatográfico N° 4 en la **Tabla 4**.

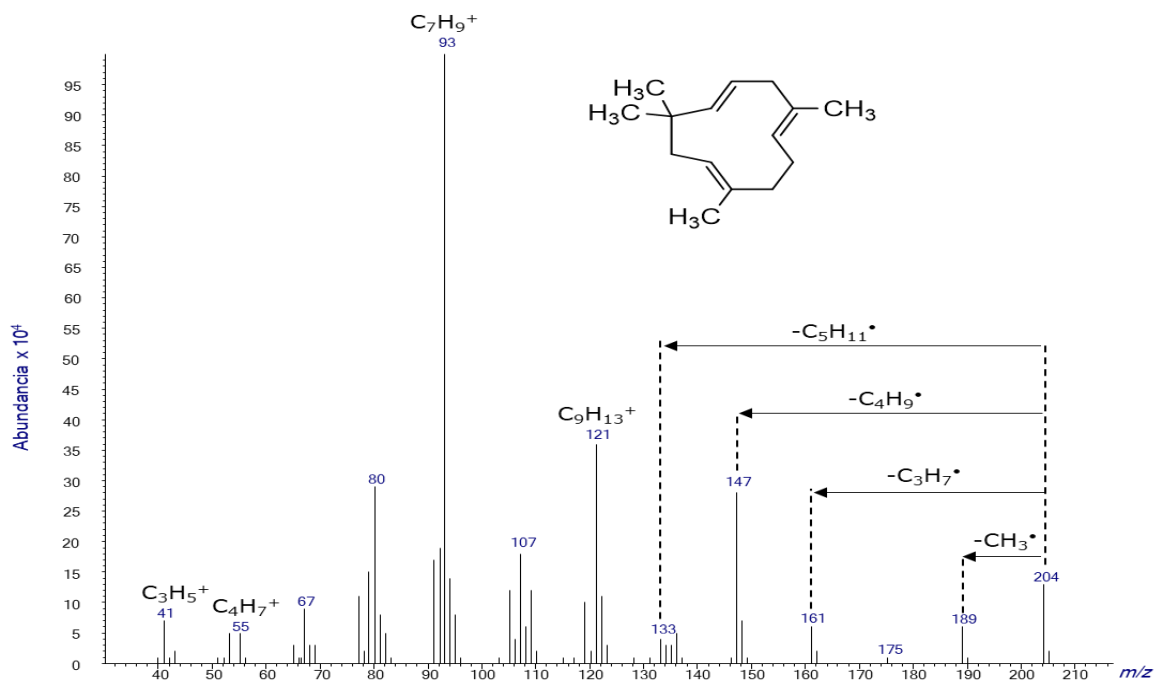
**Figura 13.**

Espectro de masas del compuesto (*E*)- $\beta$ -cariofileno,  $C_{15}H_{24}$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^{+\bullet}]$   $m/z$  204;  $[M-CH_3]^+$   $m/z$  189;  $[M-C_2H_5]^+$   $m/z$  175;  $[M-C_3H_7]^+$   $m/z$  161;  $[M-C_5H_{11}]^+$   $m/z$  93;  $C_3H_5^+$   $m/z$  41;  $C_4H_7^+$   $m/z$  55,  $C_5H_9^+$   $m/z$  69. Ver pico cromatográfico N° 7 en la **Tabla 4**.

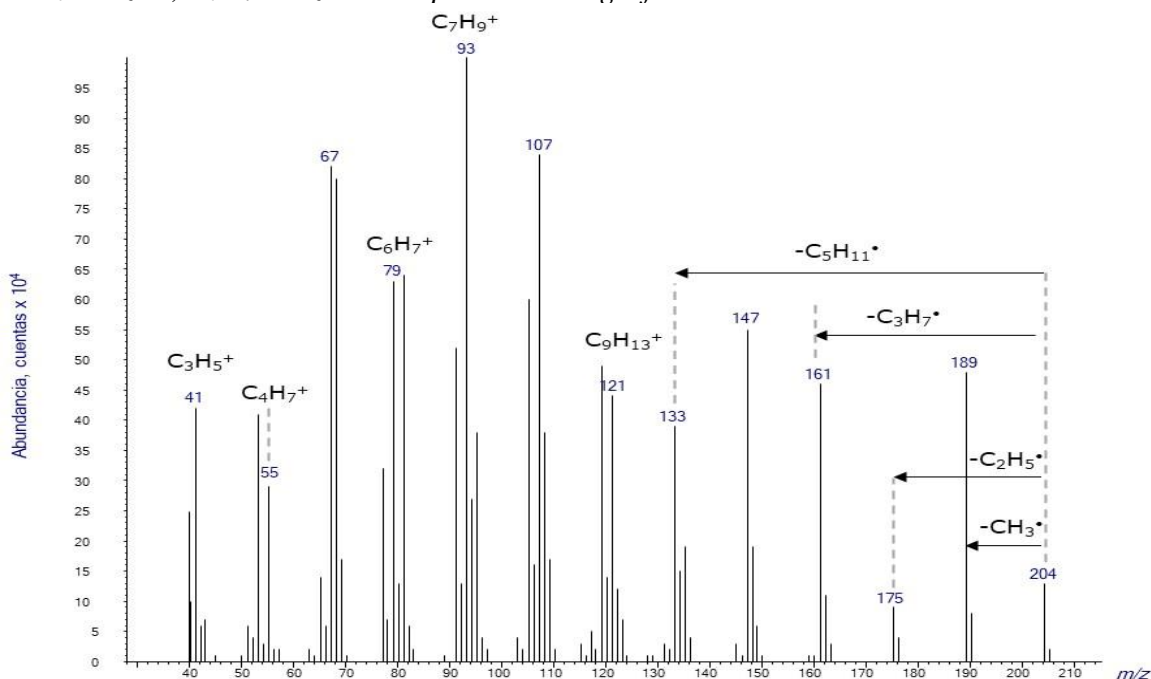


**Figura 14.**

Espectro de masas del compuesto  $\alpha$ -humuleno,  $C_{15}H_{24}$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^{+\bullet}]$   $m/z$  204;  $[M-CH_3]^+$   $m/z$  189;  $[M-C_3H_7]^+$   $m/z$  161;  $[M-C_5H_{11}]^+$   $m/z$  93;  $C_3H_5^+$   $m/z$  41;  $C_4H_7^+$   $m/z$  55,  $C_5H_9^+$   $m/z$  69. Ver pico cromatográfico N° 8 en la **Tabla 4**.

**Figura 15.**

Espectro de masas del compuesto sesquiterpenoide no identificado  $C_{15}H_{24}$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^{+\bullet}]$   $m/z$  204;  $[M-CH_3]^+$   $m/z$  189;  $[M-C_2H_5]^+$   $m/z$  175;  $[M-C_3H_7]^+$   $m/z$  161;  $C_3H_5^+$   $m/z$  41;  $C_4H_7^+$   $m/z$  55,  $C_7H_9^+$   $m/z$  93. Ver pico cromatográfico N° 23 en la **Tabla 4**.



#### 5.4. Caracterización química de los compuestos presentes (metabolitos secundarios) en extractos hidroalcohólicos de la planta *Ocimum gratissimum*

Los rendimientos de extracción, según lo reportado por Lachowicz et al. (1997), pueden verse afectados por diversas variables, como las condiciones climáticas, los métodos de extracción y las variedades de las plantas. En esa misma investigación, se observó que al emplear la técnica de extracción con CO<sub>2</sub> líquido y fluido supercrítico, se obtienen rendimientos de hasta un 1.90% en plantas del género *Ocimum* bajo ciertas condiciones. Este resultado, al compararlo con la técnica empleada en este estudio (extracción con solvente asistida por ultrasonido), muestra un rendimiento mayor en los extractos obtenidos, como se observa en los resultados de la **Tabla 3**. Además, en otro estudio realizado por Venuprasad et al. (2014), se obtuvo el extracto hidroetanólico de la especie *O. gratissimum* a partir de material vegetal seco, con rendimientos hasta de un 6.11 %. Al comparar este valor con el rendimiento obtenido en el presente estudio (2.68 %), se observa una diferencia considerable, la cual se atribuye a que en este estudio se utilizó material vegetal fresco.

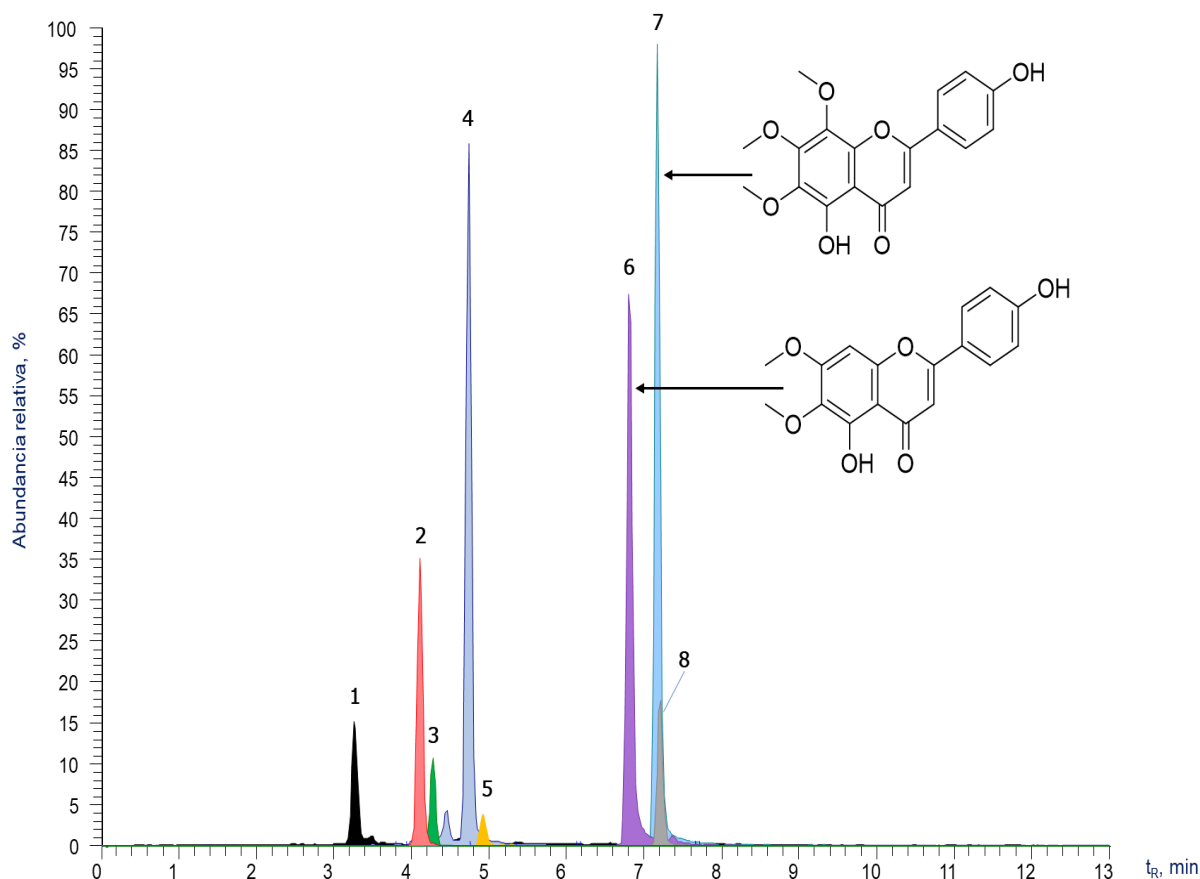
La caracterización de los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de *O. gratissimum* se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas UHPLC-ESI/*Orbitrap*-HRMS. La corriente iónica se obtuvo en los modos de iones positivos y negativos. Durante el estudio de los patrones de fragmentación de moléculas protonadas [M+H]<sup>+</sup> o deprotonadas [M-H]<sup>-</sup>, se emplearon energías de colisión de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y hasta 70 eV, en una celda de colisiones activadas HCD. La selección de la energía de colisión se basó en la capacidad de observar las moléculas en su forma protonada y deprotonada, así como en la identificación de patrones de fragmentación característicos. En la **Tabla 5**, se reportan los nueve compuestos detectados en los extractos de *O. gratissimum*, cuya identificación se realizó de forma tentativa mediante

la comparación los espectros obtenidos con bases de datos (*HDMB 4.0* y *Massbank*) y mediante la revisión de la literatura sobre la presencia de estos compuestos en el género *Ocimum*. En la sección de referencias de la tabla se incluyen las fuentes que presentan espectros de masas similares en otros estudios, así como la presencia de estos compuestos en plantas de la familia Lamiaceae o el género *Ocimum*.

La **Figura 16.** muestra la corriente iónica extraída (EIC) por UHPLC-ESI/*Orbitrap*-HRMS, obtenida en modo *full scan* de los nueve compuestos detectados. En la composición química de los extractos se encontraron moléculas del tipo flavonoides, como la luteolina, un polifenol que en las plantas desempeña un papel protector contra microorganismos, insectos e incluso contra la radiación UV. En los seres humanos, se han identificado diversas propiedades biológicas de la luteolina, que van desde actividad antioxidante hasta propiedades antimicrobianas. Recientemente, se ha investigado su posible actividad anticancerígena, relacionada con su capacidad de bloquear la transformación celular, invasión, metástasis y angiogénesis de células cancerígenas (Lin et al., 2008). Además de la luteolina, se encontraron flavonas metoxiladas, como el xantomicrool y la circimaritina, así como flavonoides glucosilados como el vicenin II y derivado del ácido benzoico y del ácido jasmónico.

**Figura 16.**

Corriente iónica extraída (EIC) de moléculas protonadas  $[M+H]^+$  y deprotonadas  $[M-H]^-$  obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo full scan Columna Zorbax Eclipse C<sub>18</sub> a partir de los extractos hidroalcohólicos de *O. gratissimum*. Véase la identificación de los picos en la **Tabla 5**.



En la **Figura 17**, se presenta el espectro de masas del xantomicrool, mostrando la molécula protonada en  $m/z$  345.09711 y sus fragmentos derivados de la pérdida de grupos metilo:  $[(M+H)-CH_3]^+$  en  $m/z$  330.07367,  $[(M+H)-CH_3-CH_3]^+$  en  $m/z$  315.05011, la deshidratación  $[(M+H)-C_2H_6-H_2O]^+$  en  $m/z$  297.03955, y la ruptura del anillo C,  $[(M+H)-C_{11}H_{12}O_5]^+$  en  $m/z$  121.02866.

Tabla 5.

Composiciones químicas encontradas mediante la técnica UHPLC/ESI<sup>+</sup>/Orbitrap-HRMS de moléculas protonadas [M+H]<sup>+</sup> y deprotonadas [M-H]<sup>-</sup> presentes en los extractos hidroalcohólicos de la planta *O. gratissimum*.

N° Fig. 16.	t <sub>R</sub> , minutos	Compuesto	Fórmula	Masa neutra	Masa experimental (I, %)	Δ ppm	HCD, eV	Iones producto	Fórmula	m/z, I (%)	Referencias
1	3.25	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico <sup>ab</sup> (Anexo E)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.03115	137.02332(23)	1.08	20	[(M-H)-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O	93.03349(100)	(Gevrenova et al., 2021) (Dharsono et al., 2022)
								[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub>	207.10157(38)	
2	4.10	Glucósido del ácido tuberónico <sup>a</sup> (Anexo F)	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	388.17278	387.16496(100)	1.63	30	[(M-H)-(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O	163.11174(11)	(Rodríguez et al., 2018) (Luca et al., 2023)
								[(M-H)-(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )-C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	101.02332(21)	
								[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> O <sub>14</sub>	575.13953(3)	
								[(M-H)-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	503.1184(24)	
								[(M-H)-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	473.10783(73)	
3	4.26	Vicenin 2 <sup>ab</sup> (Anexo G)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	594.15792	593.1501(61)	1.52	30	[(M-H)-(C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> )-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	455.09727(7)	(Keskes et al., 2017) (Grayer et al., 2000)
								[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	413.08671(8)	
								[(M-H)-C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub>	383.07614(62)	
								[(M-H)-C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	353.06558(100)	
								[(M-H)-(C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> )-CO] <sup>-</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	325.07066(4)	
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub>	179.10666(100)	
								[(M+H)-(H <sub>2</sub> O)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O	161.09609(40)	
								[(M+H)-(H <sub>2</sub> O)-CO] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O	151.11174(6)	
								[(M+H)-(H <sub>2</sub> O)-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub>	135.11683(56)	-----
								[(M+H)-(H <sub>2</sub> O)-(CO)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub>	133.10118(82)	
4	4.74	Compuesto NI #1 (Figura 19.)	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	196.1094	197.11754(26)	0.45	40	[(M+H)-(H <sub>2</sub> O)-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub>	107.08553(79)	
								[(M+H)-(H <sub>2</sub> O)-(CO)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub>	107.08553(79)	
								[(M+H)-(H <sub>2</sub> O)-(CO)-(H <sub>2</sub> O)-CH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub>	107.08553(79)	
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	269.04445(11)	
								[(M+H)-(H <sub>2</sub> O)-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	241.04954(17)	
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	161.02332(15)	
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01824(100)	
								[(M+H)-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	135.04406(38)	
								[(M+H)-(C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> )-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O	117.03349(10)	
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	161.02332(15)	(Dharsono et al., 2022)
5	4.93	Luteolina <sup>ab</sup> (Anexo H)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.04719	287.05501(38)	1.62	70	[(M+H)-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	135.04406(38)	
								[(M+H)-(C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> )-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O	117.03349(10)	

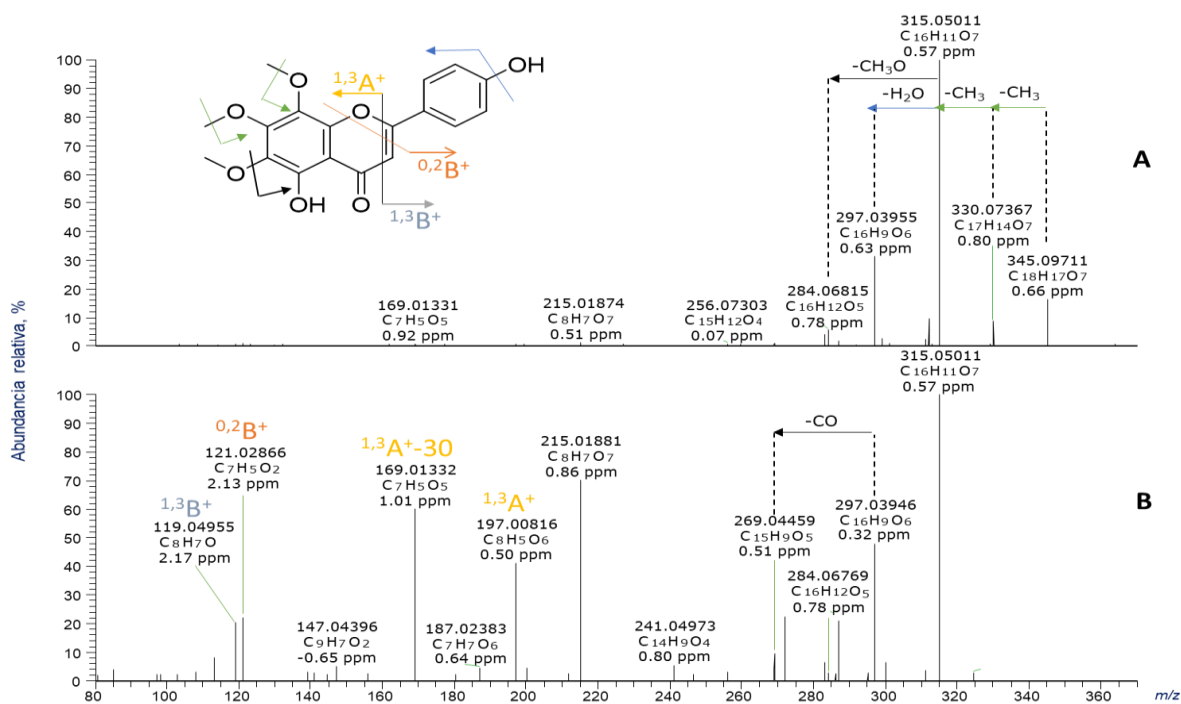
Tabla 5. Continuación

6	6.80	Cirsimaritina <sup>ab</sup> (Figura 18.)	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314.07849	315.08631(49)	0.93	40, 60	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	300.06284(28)	(Iesionek et al., 2017) (Grayer et al., 2000)
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	282.05227(100)	
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-(H <sub>2</sub> O)-CO] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	254.05736(55)	
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-(H <sub>2</sub> O)-(CO)-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	226.06244(29)	
								[(M+H)-C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154.02606(56)	
								[(M+H)-(C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> )-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	136.01550(5)	
								[(M+H)-C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	121.02841(19)	
7	7.17	Xantomicro <sup>1b</sup> (Figura 17.)	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	344.08905	345.09688(16)	0.92	40,60	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330.0734(8)	(Spring et al., 2015) (Grayer et al., 2000)
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	315.04993(100)	
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>3</sub> )-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	297.03936(32)	
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284.06793(6)	
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>3</sub> )-(H <sub>2</sub> O)-CO] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	269.04445(9)	
								[(M+H)-C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	197.00806(40)	
								[(M+H)-C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	169.01315(59)	
8	7.22	Isómero de la himenoxina (Anexo I)	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	374.09962	375.10744(15)	1.08	40, 70	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	360.08397(14)	-----
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub>	345.06049(100)	
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	342.0734(5)	
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>3</sub> )-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	327.04993(33)	
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	330.03702(26)	
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>3</sub> )-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	312.02645(10)	
								[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>3</sub> )-CO] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302.0421(26)	
[(M+H)-(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>3</sub> )-CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	284.03154(5)									
[(M+H)-C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	197.00806(50)									
[(M+H)-(C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> )-CO] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	169.01315(99)									



**Figura 17.**

Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto xantomicrool. Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  345.09711 obtenida en el modo SIM y a A. 40 eV y B. 60 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectros del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*.



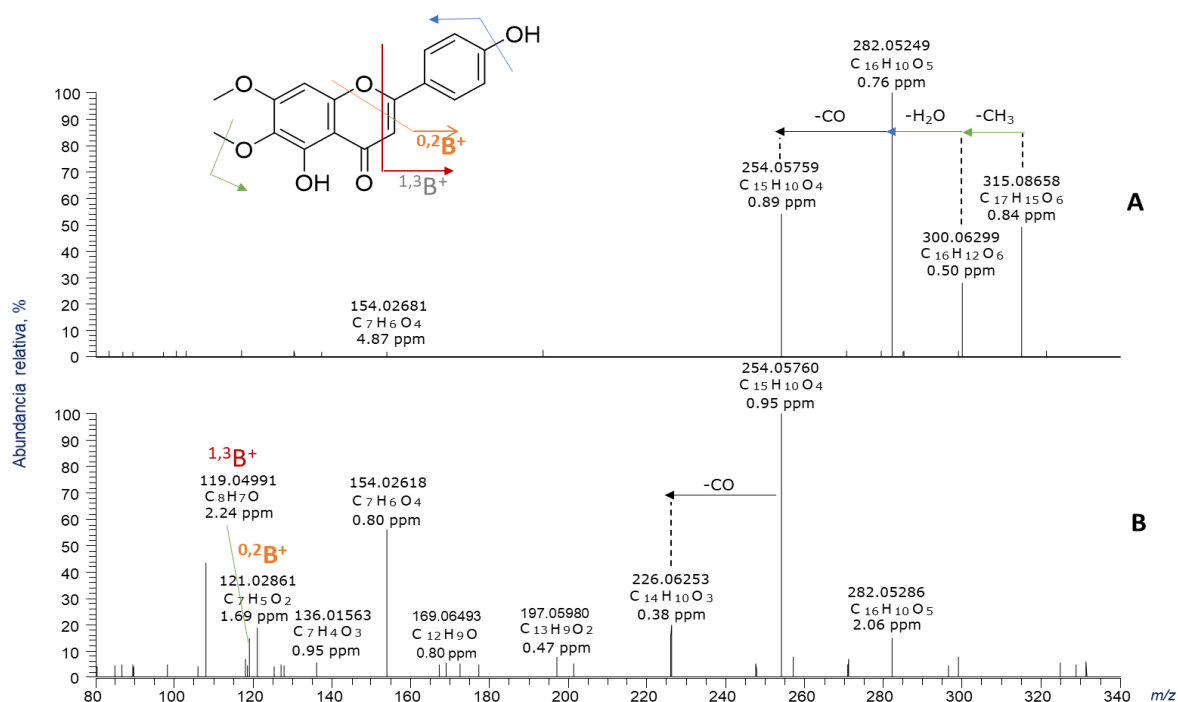
Las flavonas metoxiladas, como el xantomicrool, han demostrado en estudios, como el realizado por Guo et al. (2018), que, además de las propiedades biológicas mencionadas anteriormente, su actividad antiinflamatoria tiene efectos inhibitorios significativos en la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas E2 (PGE<sub>2</sub>). En dicho estudio, se investigó una colonia de ratones alimentados con 5-dimetiltangerentina durante un periodo determinado. Al analizar las muestras de glucosa provenientes del colón de los sujetos de prueba, se identificó el xantomicrool como el metabolito más abundante. A través de ensayos adicionales utilizando las técnicas de Western Blot y PCR, se confirmó que esta molécula tenía un potencial significativo en la reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias y proteínas tipo COX-2.

En la **Figura 18**, se presenta el espectro de masas de la cirsimarina, donde se observa la molécula protonada en  $m/z$  315.08658 y sus fragmentos generados a partir de la pérdida

de grupos metilo  $[(M+H)-CH_3]^+$  en  $m/z$  300.06299, la pérdida de agua  $[(M+H)-H_2O]^+$  en  $m/z$  282.05249, la descarboxilación  $[(M+H)-CH_5O-CO]^+$  en  $m/z$  254.05759, y la ruptura del anillo C  $[(M+H)-C_{10}H_{11}O_4]^+$  en  $m/z$  121.02861.

### Figura 18.

*Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto circimaritina. Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  315.08658 obtenida en el modo SIM y a A. 40 eV y B. 60 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectros del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*.*



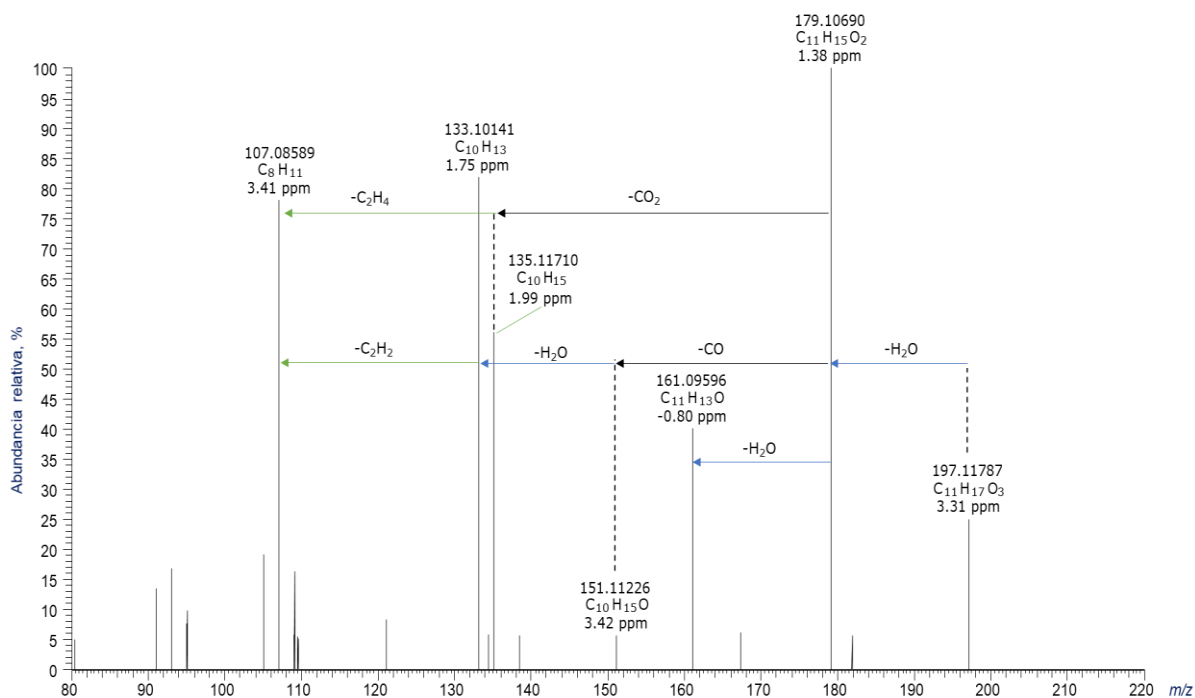
Otro tipo de flavonas metoxiladas, como la circimaritina, ha sido estudiada exhaustivamente debido a las diversas propiedades biológicas que se le atribuyen, tales como su actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, antidiabética, entre otras. En una revisión realizada por Benali et al. (2022), se discuten diversas propiedades de la circimaritina, destacando su actividad anticancerígena, ya que presenta un potencial de inhibición de la proliferación en diferentes líneas cancerígenas, como células mamarias y gástricas. Además, se aborda su actividad antidiabética, en la cual, al ser administrada vía intra-gastrointestinal, logra reducir la concentración de glucosa en sangre, mostrando

resultados más óptimo que la inyección intraperitoneal. Otra sección de la revisión destaca que la cirsimarina demuestra un alto potencial de inhibición frente a agentes parasitarios como *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* y *Tripanosoma cruzi*.

En la **Figura 19**, se presenta el espectro de masas del compuesto NI #1, donde se observa la molécula protonada en  $m/z$  197.11787 y sus fragmentos generados a partir de la pérdida de agua  $[(M+H)-H_2O]^+$  en  $m/z$  179.10690, la descarboxilación  $[(M+H)-H_2O-CO]^+$  en  $m/z$  151.11226 y las pérdidas de etileno  $[(M+H)-(H_2O)-(CO_2)-(C_2H_4)]^+$  y metileno  $[(M+H)-H_2O-CO-H_2O-CH_2]^+$  en  $m/z$  133.10141 y 107.08589 respectivamente. Según los patrones observados en el espectro de masas, se puede inferir que este compuesto contiene un grupo ácido (RCOOH) en uno de sus extremos y un grupo hidroxilo (OH) en otra sección de la molécula, lo cual se deduce a partir de las pérdidas de agua en el espectro. Igualmente, se observa la pérdida de CO a partir de  $m/z$  179.10690 y la pérdida de CO<sub>2</sub>, lo que explica las señales observadas en  $m/z$  133.10141 y 135.11710, respectivamente. Debido a las pérdidas de acetileno y etileno, también se presume que este compuesto contiene al menos un anillo aromático en su estructura.

**Figura 19.**

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto no identificado de fórmula química  $C_{17}H_{14}O_6$ . Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  197.11787 obtenida en el modo SIM a 40 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*.



## 6. Conclusiones

En este estudio se destilaron partes frescas de *Ocimum gratissimum*, incluyendo tallos, hojas y flores, obteniendo un rendimiento promedio de 0.36 % p/p. Los AE obtenidos fueron caracterizados, destacando en su composición la presencia de compuestos sesquiterpénicos y fenilpropanoides, como  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno y eugenol. El quimiotipo correspondiente a la planta estudiada, proveniente de las instalaciones del CENIVAM, se clasifica como tipo eugenol y  $\beta$ -cariofileno.

El proceso de extracción también incluyó material fresco compuesto por hojas, tallos y flores, resultando en un rendimiento promedio de 2.68 % p/p. En los extractos obtenidos, se identificaron tentativamente flavonas como la luteolina, flavonas metoxiladas (xantomicol, cirsimaritina), derivados del ácido benzoico como el ácido *p*-hidroxibenzoico, y derivados del ácido jasmónico, como el glucósido del ácido tuberónico.

Los resultados de este trabajo aportan al estudio fitoquímico de plantas del género *Ocimum* en Colombia, específicamente de *O. gratissimum*, cuya investigación ha sido limitada hasta la fecha. Este género se caracteriza por la presencia de diversos metabolitos secundarios, y la información obtenida en este estudio podría ser de gran interés y utilidad para el desarrollo de nuevas aplicaciones en la medicina.

## Referencias bibliográficas

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (4th ed.). Allured Publishing Corporation.
- Ahuja, S. (2003). *Chromatography and separation science* (4th ed., pp. 134–152). Academic Press. Elsevier Science.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal* (2a ed., pp. 340–364). McGraw-Hill Interamericana.
- Babushok, V. I., Linstrom, P. J., & Zenkevich, I. G. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40, 1-47.
- Bandoni, A. (2000). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica: Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores* (pp. 180–202). CYTED
- Beltrán Cifuentes, M. C., Cantillo Maldonado, M. P., & Vivas Castaño, A. M. (2013). Actividad antibacteriana de los aceites obtenidos de *Ocimum basilicum* L. var. *cinnamom*, *O. album*, *O. thyrsoiflorum*, para uso potencial en fitocosmética. *Investigaciones Andina*, 15(27), 798–810.
- Benali, T., Jaouadi, I., Ghchime, R., El Omari, N., Harboul, K., Hammani, K., Rebezov, M., Shariati, M. A., Mubarak, M. S., Simal-Gandara, J., Zengin, G., Park, M. N., Kim, B., Mahmud, S., Lee, L. H., & Bouyahya, A. (2022). The current state of knowledge in biological properties of cirsimaritin. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1842.
- Benítez-Benítez, R., Sarria-Villa, R. A., Gallo-Corredor, J. A., Pérez Pacheco, N. O., Álvarez Sandoval, J. H., & Giraldo Aristizabal, C. I. (2020). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(1), 31–40.
- Benitez, N. P., Melendez Leon, E. M., & Stashenko, E. E. (2009). Eugenol and methyl eugenol chemotypes of essential oil of species *Ocimum gratissimum* L. and *Ocimum campechianum* Mill. from Colombia. *Journal of Chromatographic Science*, 47(9), 800–803.

- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Román, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., & Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidins, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, *69*, 385–394.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., & Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(5), 1822–1828.
- Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *19*(4), 229–248.
- Capecka, E., Mareczek, A., & Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, *93*(2), 223–226.
- Dharsono, H. D. A., Putri, S. A., Kurnia, D., Dudi, D., & Satari, M. H. (2022). Ocimum species: A review on chemical constituents and antibacterial activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(19), 6350.
- Eran, D. P. N. (2006). *Biology of floral scent* (1st ed., pp. 14–15). Taylor & Francis.
- Eslava González, L. A., & Fajardo Romero, E. D. (2020). Obtención de un aceite esencial a partir de la semilla del mango utilizando el método de extracción con solventes. Tesis de pregrado. Fundación Universidad de América.
- Farías, C., Cisternas, C., Morales, G., Muñoz, L., & Valenzuela, R. (2022). Basil: Chemical composition and health benefits. *Revista Chilena de Nutrición*, *49*(4), 502–512.
- Fekete, S., Schappler, J., Veuthey, J.-L., & Guillarme, D. (2014). Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *63*, 2–13.
- Fernández-Alonso, J. L., & Rivera Díaz, O. (2006). Las labiadas (familia Labiatae). En G. Galeano & N. García (Eds.), *El Libro Rojo de las plantas de Colombia: Volumen 3*. (1a ed., pp. 385–672). Instituto Alexander von Humboldt – Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia – Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

- Forero, E., Sarmiento, F., Andrade, G., & Samper, C. (1999). *Agenda de investigación en sistemática siglo XXI*. Biodiversidad siglo XXI. Asociación Colombiana de Herbarios; Universidad Nacional de Colombia-Facultad de Ciencias Naturales; Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt; Colciencias; Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, 1–43.
- Gaitán, J. (2010). Estudio de metabolitos secundarios volátiles de *Salvia aratocensis*, aislados mediante diferentes técnicas de extracción. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander.
- Gaskell, S. J. (1997). Electrospray: Principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(7), 677–688.
- Gevrenova, R., Zengin, G., Sinan, K. I., Yıldıztuğay, E., Zheleva-Dimitrova, D., Picot-Allain, C., Mahomoodally, M. F., Imran, M., & Dall'Acqua, S. (2021). UHPLC-MS characterization and biological insights of different solvent extracts of two *Achillea* species (*A. aleppica* and *A. santolinoides*) from Turkey. *Antioxidants*, 10(8), 1180.
- Gomez, N., & Witte, L. (2001). A simple method to extract essential oils from tissue samples by using microwave radiation. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 2351–2359.
- González Escobar, R. (2002). Eugenol: Propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(2), 139–156.
- Grayer, R. J., Kite, G. C., Abou-Zaid, M., & Archer, L. J. (2000). The application of atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectrometry in the chemotaxonomic study of flavonoids: Characterization of flavonoids from *Ocimum gratissimum* var. *gratissimum*. *Phytochemical Analysis*, 11(4), 257–267.
- Grayer, R. J., Kite, G. C., Goldstone, F. J., Bryan, S. E., Paton, A., & Putievsky, E. (1996). Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*, 43(5), 1033–1039.

- Grayer, R. J., Vieira, R. F., Price, A. M., Kite, G. C., Simon, J. E., & Paton, A. J. (2004). Characterization of cultivars within species of *Ocimum* by exudate flavonoid profiles. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(10), 901–913.
- Grob, R. L., & Barry, E. F. (2004). *Modern practice of gas chromatography* (4th ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Gross, J. H. (2006). *Mass spectrometry: a textbook*. Springer Science & Business Media.
- Guo, S., Wu, X., Zheng, J., Charoensinphon, N., Dong, P., Qiu, P., & Xiao, H. (2018). Anti-inflammatory effect of xanthomicrol, a major colonic metabolite of 5-demethyltangeretin. *Food & Function*, 9(6), 3104–3113.
- Herrmann, K. (2010). *The chemistry and biology of volatiles* (pp. 49–93). Wiley.
- Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., Horváth, G., Móricz, Á. M., & Choma, I. M. (2017). Screening of antibacterial compounds in *Salvia officinalis* L. tincture using thin-layer chromatography—direct bioautography and liquid chromatography—tandem mass spectrometry techniques. *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 30(5), 357–362.
- Karpiński, T. M. (2020). Essential oils of Lamiaceae family plants as antifungals. *Biomolecules*, 10(1), 103.
- Kazakevich, Y., & LoBrutto, R. (Eds.). (2006). *HPLC for pharmaceutical scientists*. Wiley.
- Keskes, H., Belhadj, S., Jlalil, L., El Feki, A., Sayadi, S., & Allouche, N. (2017). LC–MS–MS and GC–MS analyses of biologically active extracts of Tunisian fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 209–220.
- Lachowicz, K. J., Jones, G. P., Briggs, D. R., Bienvenu, F. E., Palmer, M. V., Mishra, V., & Hunter, M. M. (1997). Characteristics of plants and plant extracts from five varieties of basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2660–2665.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., & Shen, H.-M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 8(7), 634–646.

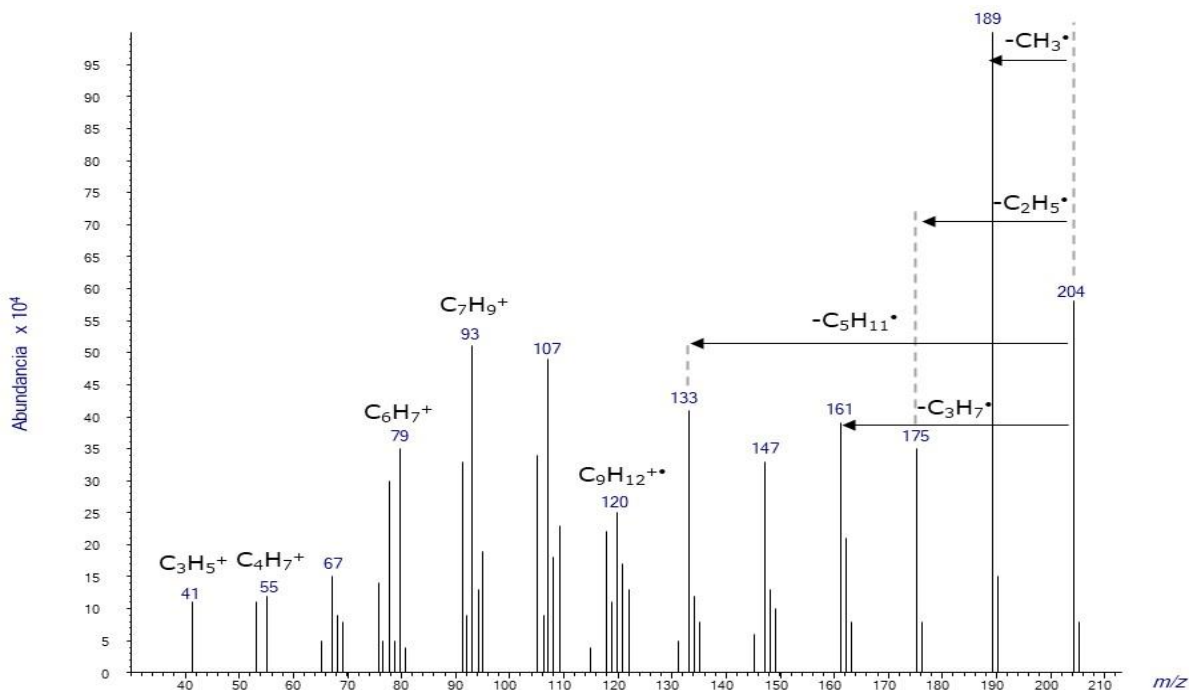
- Llinás, M. (2011). Estudio de la composición química de los extractos y aceites esenciales de *Hyptis* sp. y *Lippia alba* obtenidos por diferentes técnicas de extracción. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander.
- Luca, S. V., Zengin, G., Sinan, K. I., Skalicka-Woźniak, K., & Trifan, A. (2023). Post-distillation by-products of aromatic plants from Lamiaceae family as rich sources of antioxidants and enzyme inhibitors. *Antioxidants*, 12(1), 210.
- Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323–327.
- Luján, C. G., Martínez, A., Ortega, J. L., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2), 86–96.
- Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. del R., González-Gallegos, J. G., Lara-Cabrera, S. I., & Zamudio, S. (2017). Lamiaceae de México. *Botanical Sciences*, 95(4), 780–806.
- Matu, F. K., Murungi, L. K., Mohamed, S., & Deletre, E. (2020). Behavioral response of the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) to plant volatiles of *Ocimum basilicum* and *Tagetes minuta*. *Chemoecology*, 31(1), 47–62.
- Mena Palacios, B., Silva López, B., & Medina, A. (2020). Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de Lamiaceas, Asteraceas, Verbenaceas: Una revisión. *infoANALÍTICA*, 8(1), 48–69.
- Modzelewska, A., Sur, S., Kumar, S., & Khan, S. (2005). Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 5(5), 477–499.
- National Institute of Standards and Technology. (2023). *The NIST mass spectral libraries (3.0)*. Standard reference data program.
- Özcan, M., & Chalchat, J. C. (2002). Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. *Czech Journal of Food Sciences*, 20(6), 223–228.

- Rangel-Ch., J. O. (2015). La biodiversidad de Colombia: significado y distribución regional. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(151), 176–200.
- Regino Ramírez, A. C., & Rengifo Velandia, E. A. (2021). Evaluación de los métodos de extracción de compuestos fenólicos (antocianinas) a partir del fruto del corozo (*Bactris guineensis*). Tesis de pregrado. Fundación Universidad de América.
- Rodríguez-Pérez, C., Gómez-Caravaca, A. M., Guerra-Hernández, E., Cerretani, L., García-Villanova, B., & Verardo, V. (2018). Comprehensive metabolite profiling of *Solanum tuberosum* L. (potato) leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS. *Food Research International*, 112, 390–399.
- Rücker, G. (1973). Sesquiterpenes. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 12, 793–806.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (Vol. 78 de la Serie Ciencia y Tecnología, R. Pinzón S., Ed.). CORPOICA C.I. la Libertad. (pp. 44, 46)
- Shasany, A. K., & Kole, C. (Eds.). (2018). *The Ocimum genome*. Compendium of Plant Genomes. Springer.
- Spring, O., Pfannstiel, J., Klaiber, I., Conrad, J., Beifuß, U., Apel, L., & Zipper, R. (2015). The nonvolatile metabolome of sunflower linear glandular trichomes. *Phytochemistry*, 119, 83–89.
- Stashenko, E., Jaramillo, B., & Martínez, J. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025, 93–103.
- Stashenko, E., Martínez, J., Durán, D., Córdoba, Y., & Caballero, D. (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38, 1-17.

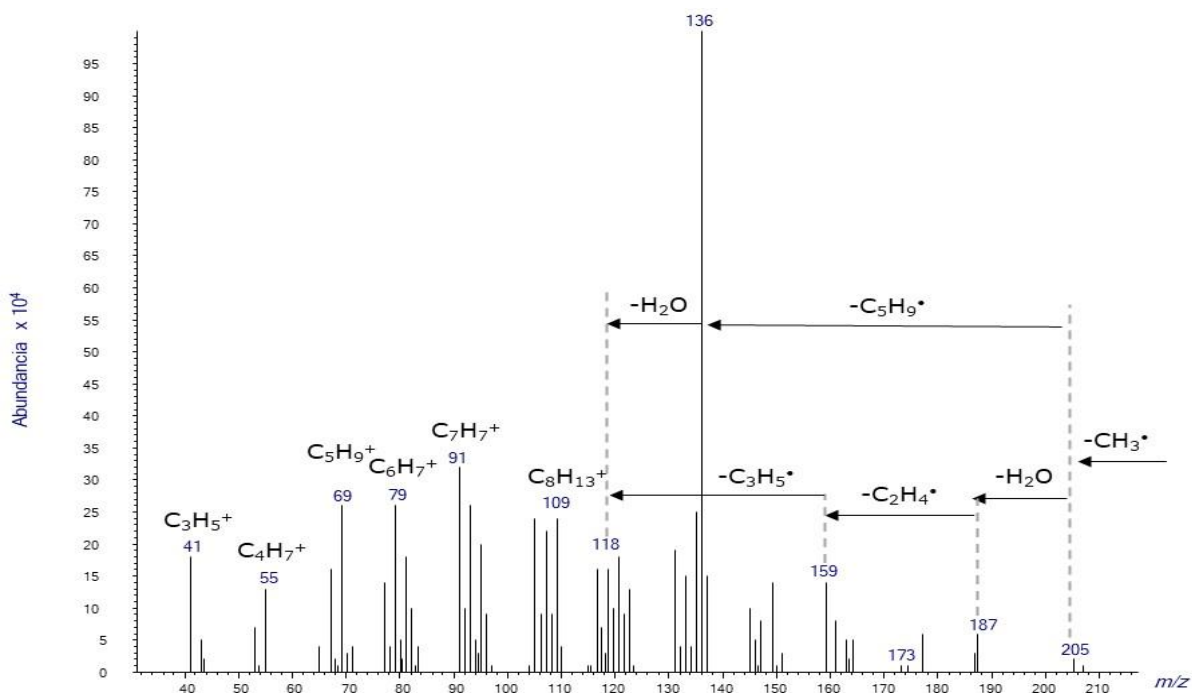
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2011). Preparación de la muestra: Un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*, 3, 25–49
- Ugbogu, O. C., Emmanuel, O., Agi, G. O., Ibe, C., Ekweogu, C. N., Ude, V. C., Uche, M. E., Nnanna, R. O., & Ugbogu, E. A. (2021). A review on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.). *Heliyon*, 7(11).
- Venuprasad, M. P., Kandikattu, H. K., Razack, S., & Khanum, F. (2014). Phytochemical analysis of *Ocimum gratissimum* by LC-ESI-MS/MS and its antioxidant and anxiolytic effects. *South African Journal of Botany*, 92, 151–158.
- Vieira, R. F., Grayer, R. J., Paton, A., & Simon, J. E. (2001). Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(3), 287–304.
- Yuwono, M., Siswandono, Hafid, A. F., Poernomo, A. T., Agil, M., Indrayanto, G., & Ebel, S. (2002). Eugenol. *Analytical profiles of drug substances and excipients*, 29. 149–177.

## Anexos

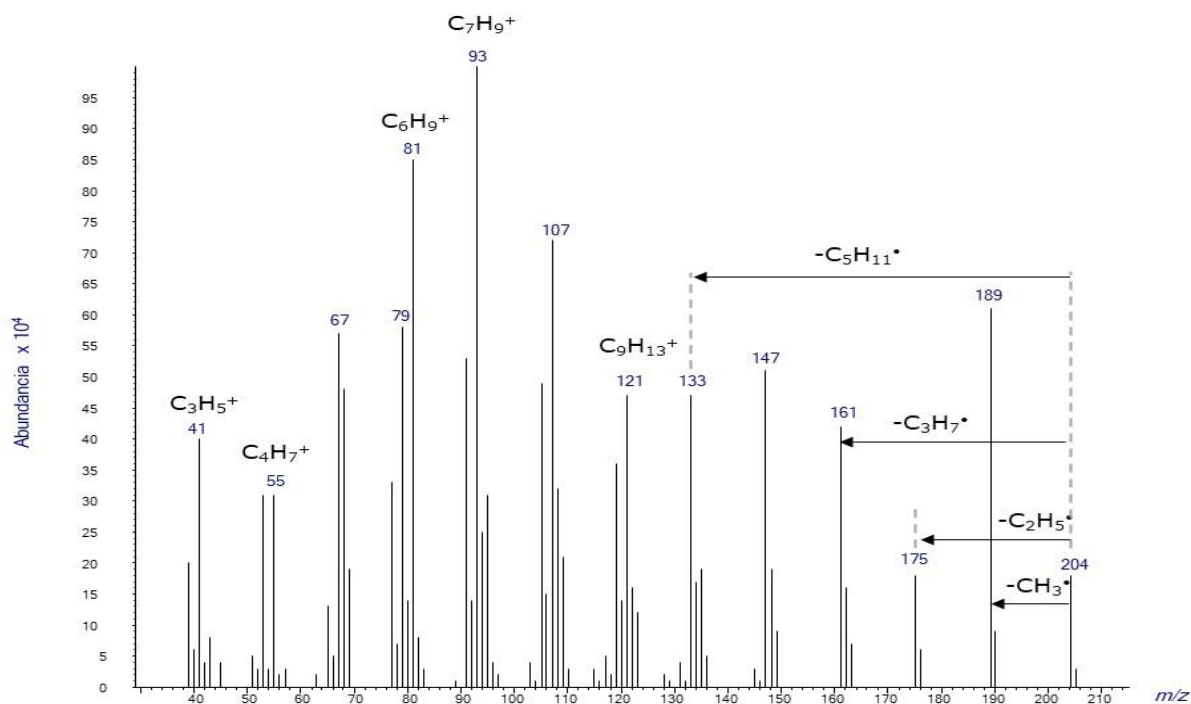
**Anexo A.** Espectro de masas del compuesto sesquiterpenoide no identificado  $C_{15}H_{24}$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^+]$   $m/z$  204;  $[M-C_2H_5]^+$   $m/z$  175;  $[M-C_5H_{11}]^+$   $m/z$  133;  $C_4H_7^+$   $m/z$  55. Ver compuesto N° 11 en la **Tabla 4**.



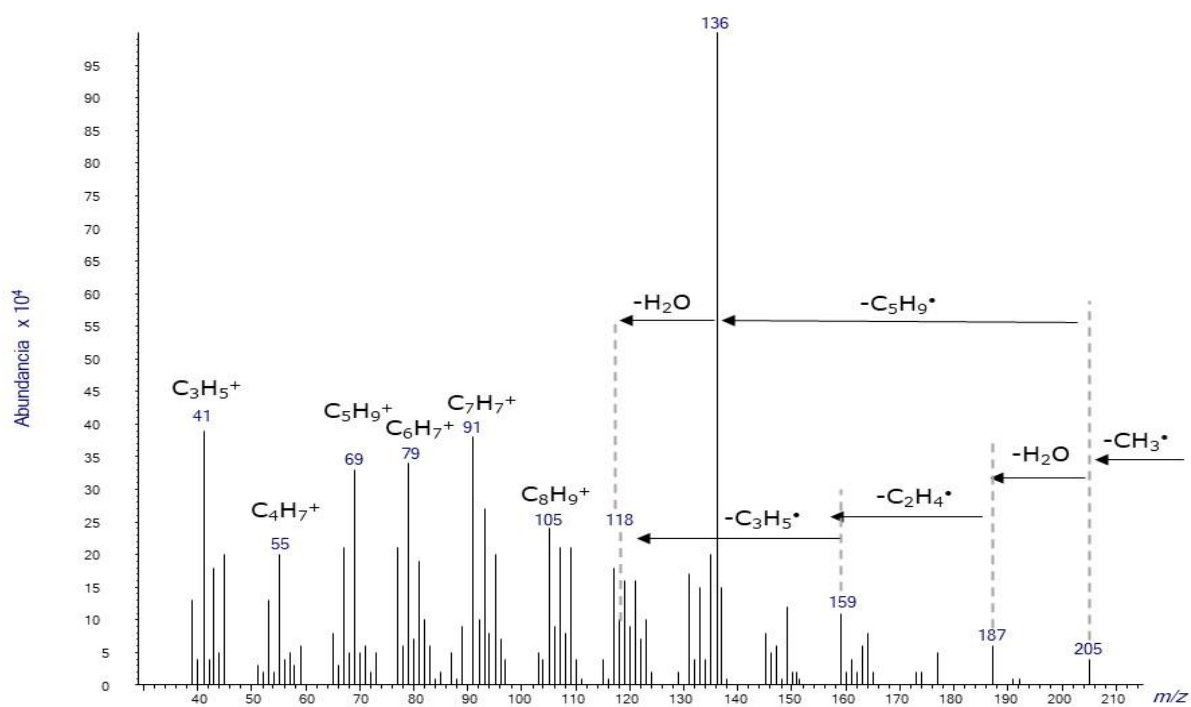
**Anexo B.** Espectro de masas del compuesto sesquiterpenoide oxigenado no identificado,  $C_{15}H_{24}O$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^+]$   $m/z$  220;  $[M-CH_3]^+$   $m/z$  205;  $[M-CH_3-H_2O]^+$   $m/z$  187;  $[M-CH_3-C_5H_9]^+$   $m/z$  136,  $C_5H_9^+$   $m/z$  69;  $C_7H_7^+$   $m/z$  91. Ver compuesto N° 17 en la **Tabla 4**.



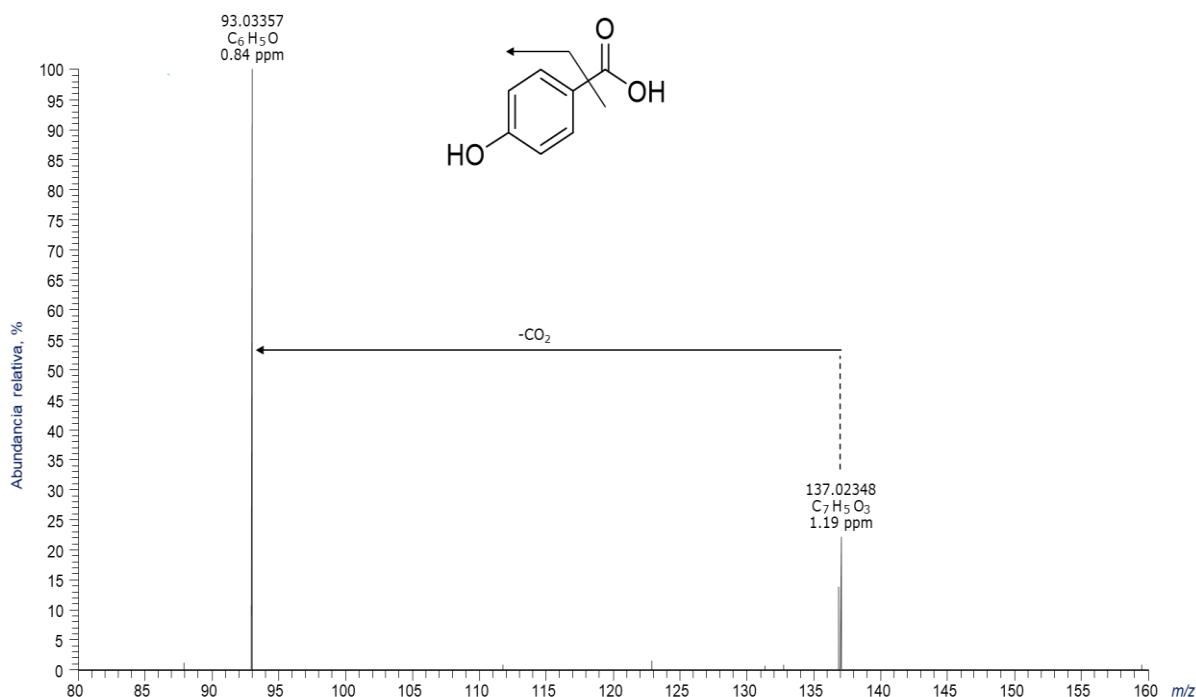
**Anexo C.** Espectro de masas del compuesto sesquiterpenoide no identificado,  $C_{15}H_{24}$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^{+\bullet}]$   $m/z$  204;  $[M-CH_3]^+$   $m/z$  189;  $[M-C_3H_7]^+$   $m/z$  161;  $C_3H_5^+$   $m/z$  41,  $C_7H_9^+$   $m/z$  93. Ver compuesto N° 22 en la **Tabla 4**.



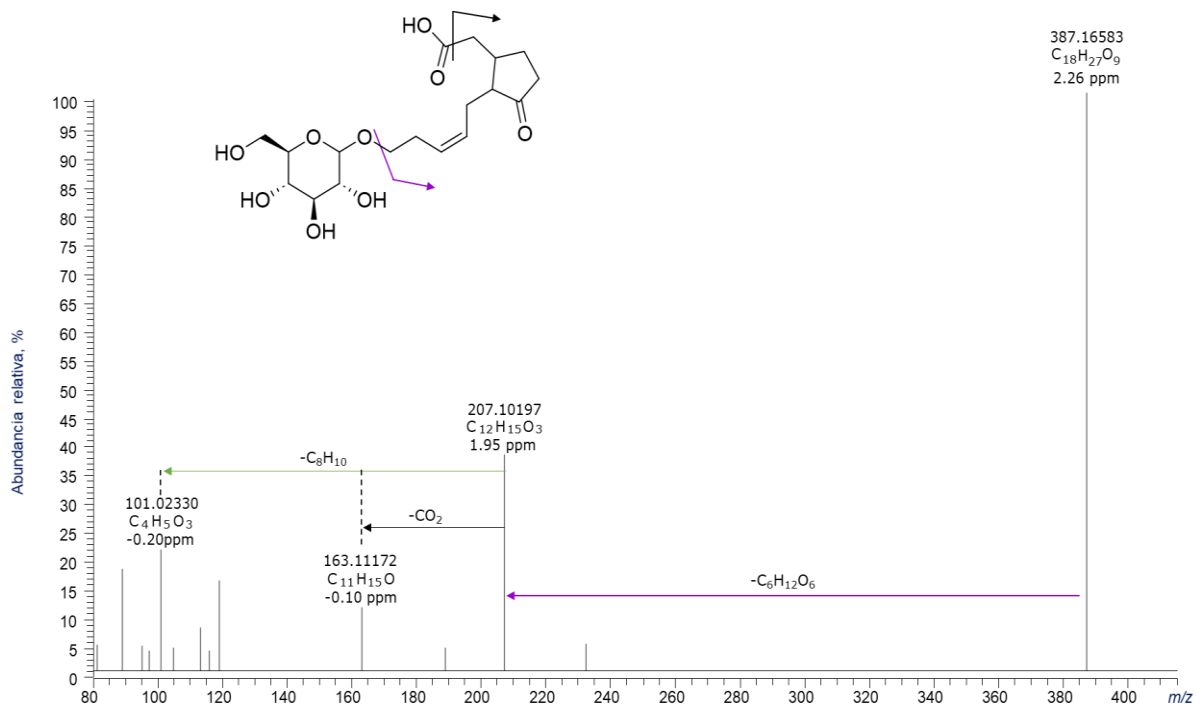
**Anexo D.** Espectro de masas del compuesto sesquiterpenoide oxigenado no identificado  $C_{15}H_{24}O$ , obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de la planta *Ocimum gratissimum*.  $[M^{+\bullet}]$   $m/z$  220;  $[M-CH_3]^+$   $m/z$  2057;  $[M-CH_3-H_2O-C_2H_4-C_3H_5]^+$   $m/z$  118;  $[M-CH_3-C_5H_9]^+$   $m/z$  136;  $[M-CH_3-C_5H_9-H_2O]^+$   $m/z$  118;  $C_3H_5^+$   $m/z$  41;  $C_4H_7^+$   $m/z$  55,  $C_5H_9^+$   $m/z$  69;  $C_7H_7^+$   $m/z$  91. Ver compuesto N° 26 en la **Tabla 4**.



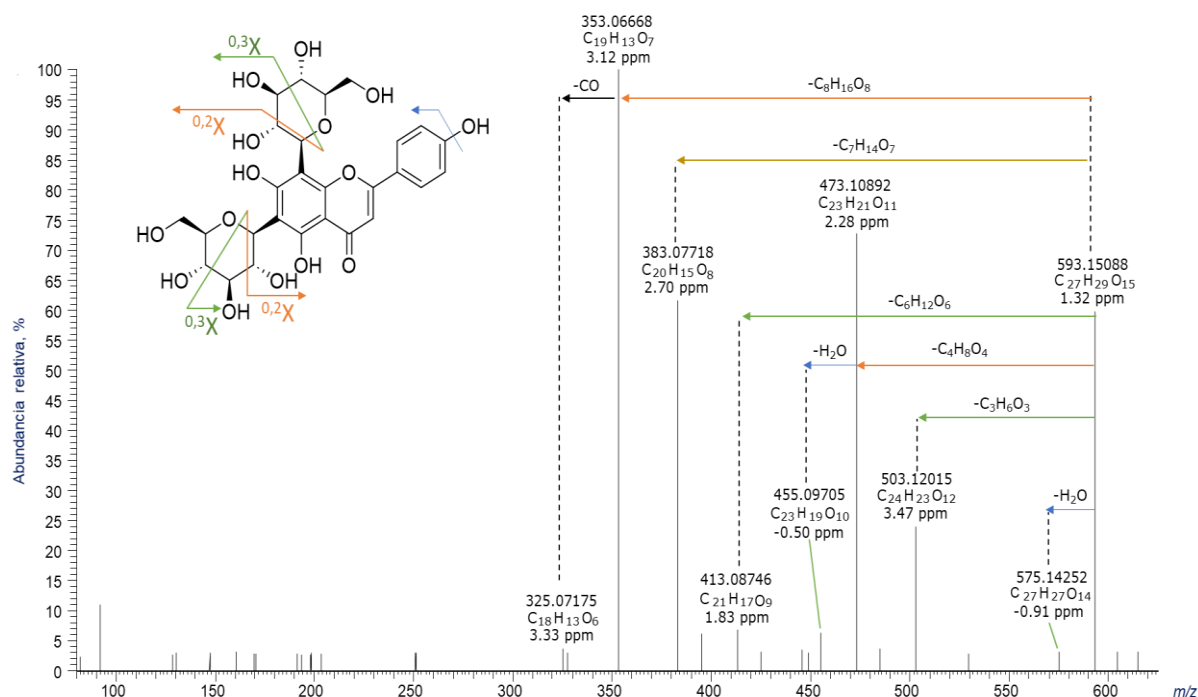
**Anexo E.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del ácido *p*-hidroxibenzoico. Véase la señal  $[M-H]^-$  en  $m/z$  137.02348 obtenida en el modo SIM a 20 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*.



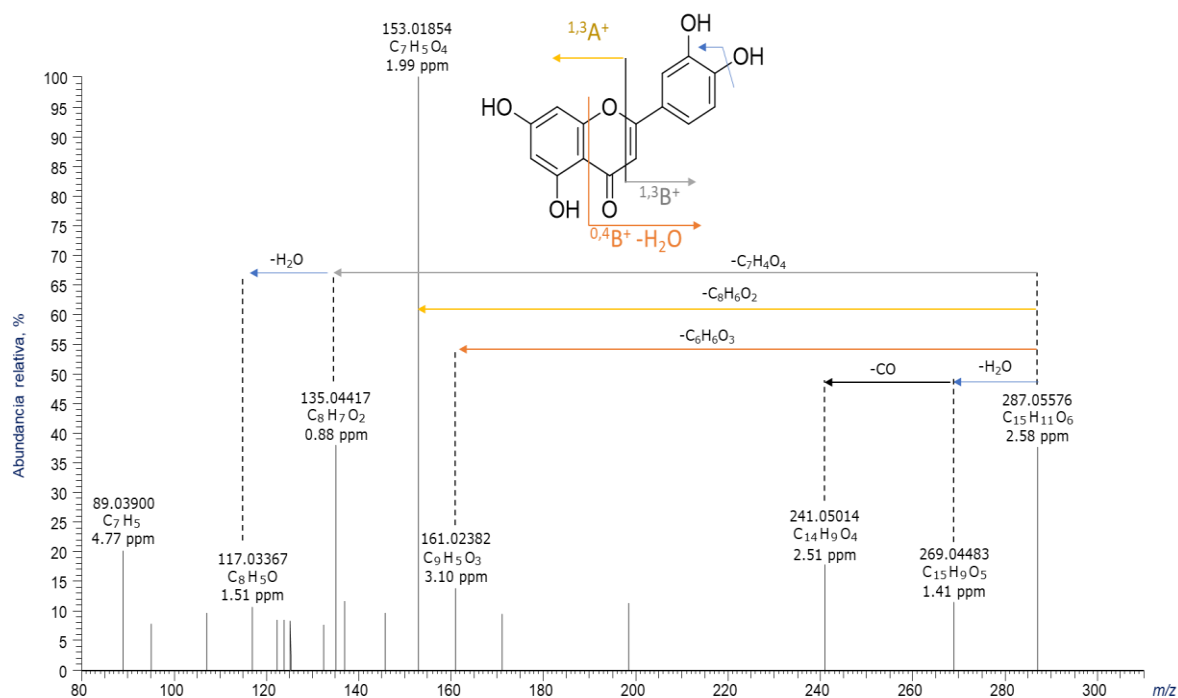
**Anexo F.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del glucósido del ácido tuberónico. Véase la señal  $[M-H]^-$  en  $m/z$  387.16583 obtenida en el modo SIM a 30 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*.



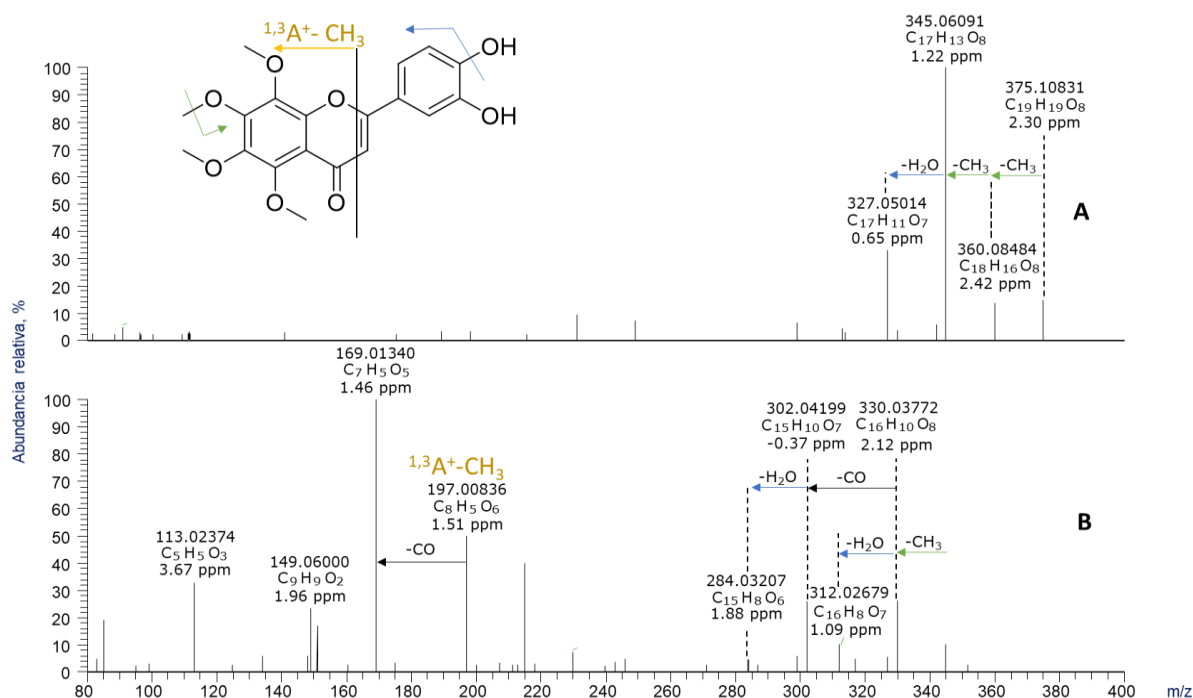
**Anexo G.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto vicenin 2. Véase la señal  $[M-H]^-$  en  $m/z$  593.15088 obtenida en el modo SIM a 30 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*.



**Anexo H.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS de la luteolina. Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  287.05576 obtenida en el modo SIM a 70 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*.



**Anexo I.** Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto isómero de la himenoxina. Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  375.10831 obtenida en el modo SIM y a A. 40 eV y B. 70 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectros del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*.



**Anexo J.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS del compuesto no identificado NI #2, con fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>. Véase la señal  $[M+H]^+$  en  $m/z$  353.25807 obtenida en el modo SIM a 20 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. Espectro del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *Ocimum gratissimum*.

