

ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE *Salvia aratocensis*, AISLADOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

JORGE LUIS GAITÁN FORERO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2010**

ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE *Salvia aratocensis*, AISLADOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

JORGE LUIS GAITÁN FORERO

**Trabajo de grado presentado como requisito
parcial para optar al título de Químico**

**Directora: ELENA STASHENKO, Química, Ph.D.
Co-director: JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2010**

DEDICATORIA

A mi padre Jorge Gaitán, de quien heredé su pasión por las ciencias, gracias por su esfuerzo y apoyo constantemente, a pesar de los malos momentos siempre creyó en mí.

A mi madre Romelia Forero, una mujer integra y consagrada a sus hijos; gracias por su esmero y entrega.

Cualquier palabra se queda corta para expresar la gratitud que les debo a mis padres por su apoyo incondicional, por los valores que me inculcaron desde la niñez, por su constante trabajo y esfuerzo para brindarme todo lo que estuviese a su alcance.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Elena E. Stashenko, un referente y ejemplo para la comunidad académica; gracias por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por la paciencia y la comprensión en los momentos difíciles y, sobre todo, por no perder la esperanza.

Al doctor Jairo René Martínez, un profesional ejemplar como docente y como persona; gracias por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por la paciencia y por sus constantes aportes, por que desde su rol como Director de la Escuela y, luego, como co-director de mi proyecto de grado siempre me aportó a mi formación personal y profesional.

Al CENIVAM, al Laboratorio de Cromatografía de la UIS, a Colciencias y a la Universidad Industrial de Santander, por el apoyo logístico, científico y económico.

A mi familia, por su apoyo en todos los aspectos, sin ellos, no hubiera sido posible culminar esta etapa de mi vida.

A Carlos Díaz, Ginna Arias y Raúl Rodríguez, por su colaboración y asesoría.

A José, Margarita, Sandra Cavanzo y las guerreras, por los servicios y la colaboración prestada que facilitaron mucho el trabajo en el laboratorio.

A mis compañeros de carrera, Viviana Rojas, Mary Andrea, Corina, Cristian, Edicson, Joaquin, Arley, Rubiela, Julián, Adela y los demás, por que en algún momento me aportaron como estudiante y como persona.

A Edwar Peña, por ser la voz que no me dejó decaer y a pesar de las adversidades estuvo ahí contagiándome de alegría.

TABLA DE CONTENIDOS

| | | Pág. |
|-------|---|------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 18 |
| 2 | ESTADO DEL ARTE | 21 |
| 2.1 | <i>Salvia aratocensis</i> | 21 |
| 2.2 | METABOLITOS SECUNDARIOS | 24 |
| 2.3 | ACEITE ESENCIAL | 26 |
| 2.4 | EXTRACTO | 28 |
| 2.5 | HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR LA RADICIÓN DE MICROONDAS | 28 |
| 2.6 | EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO | 30 |
| 2.7 | DESTILACIÓN-EXTRACCIÓN CON SOLVENTE SIMULTÁNEA | 32 |
| 2.8 | CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS | 33 |
| 3 | CIENCIOMETRÍA | 36 |
| 4 | DESARROLLO EXPERIMENTAL | 40 |
| 4.1 | MATERIAL VEGETAL | 40 |
| 4.2 | OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS | 41 |
| 4.2.1 | OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR MWHD | 41 |
| 4.2.2 | OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR SDE | 43 |
| 4.2.3 | OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR SFE | 44 |
| 4.3 | ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO | 46 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.4 | CARACTERIZACIÓN | 46 |
| 5 | ANÁLISIS DE RESULTADOS | 47 |
| 5.1 | IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE <i>Salvia aratocensis</i> , AISLADOS POR MWHD. | 47 |
| 5.2 | IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE <i>Salvia aratocensis</i> , AISLADOS POR SDE. | 50 |
| 5.3 | IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE <i>Salvia aratocensis</i> , AISLADOS POR SFE. | 53 |
| 5.4 | Comparación con los metabolitos secundarios aislados de otras especies del género <i>Salvia</i> . | 57 |
| 6 | CONCLUSIONES | 62 |
| 7 | RECOMENDACIONES | 63 |
| 8 | BIBLIOGRAFÍA | 64 |

LISTADO DE APÉNDICES

| | Pág. |
|---|------|
| Apéndice A. <i>trans</i> -Cariofileno | 75 |
| Apéndice B. <i>trans</i> -Muurola-3,5-dieno | 76 |
| Apéndice C. <i>trans</i> -Muurola-4(14),5-dieno | 76 |
| Apéndice D. Germacreno D | 77 |
| Apéndice E. γ -Cadineno | 78 |
| Apéndice F. <i>trans</i> -Calamineno | 79 |
| Apéndice G. 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol | 79 |
| Apéndice H. <i>epi</i> - α -Cadinol | 80 |
| Apéndice I. α -Cadinol | 81 |
| Apéndice J. α -Bisabolol | 81 |
| Apéndice K. Fitol | 82 |

LISTADO DE FIGURAS

| | | Pág. |
|-----------|---|------|
| Figura 1 | Ubicación geográfica de la zona de endemismo de la <i>Salvia aratocensis</i> . | 22 |
| Figura 2 | <i>Salvia aratocensis</i> , ramas con inflorescencia terminal. | 23 |
| Figura 3 | Esquema del montaje para obtención del AE de <i>Salvia aratocensis</i> por MWHD. | 29 |
| Figura 4 | Esquema del montaje para obtención del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> por SFE | 31 |
| Figura 5 | Esquema del montaje para obtención del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> por SDE | 32 |
| Figura 6 | Relación de publicaciones sobre el género <i>Salvia</i> . Periodo de observación: 1990–2010. Base de datos: Science Direct, Elsevier B.V. Fecha de consulta: junio 24 de 2010. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY(Salvia*). | 36 |
| Figura 7 | Relación de publicaciones con respecto al país de publicación. Periodo de observación: 1990–2010. Base de datos: Science Direct, Elsevier B.V. Fecha de consulta: junio 24 de 2010. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY(Salvia*). | 37 |
| Figura 8 | Relación de publicaciones con respecto al área de estudio. Periodo de observación: 1990–2010. Base de datos: Science Direct, Elsevier B.V. Fecha de consulta: junio 24 de 2010. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY(Salvia*). | 38 |
| Figura 9 | Relación de publicaciones según la modalidad. Periodo de observación: 1990–2010. Base de datos: Science Direct, Elsevier B.V. Fecha de consulta: junio 24 de 2010. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY(Salvia*). | 39 |
| Figura 10 | <i>Salvia aratocensis</i> cultivada en el CENIVAM-UIS. | 40 |
| Figura 11 | Montaje en el laboratorio para obtención del AE de <i>Salvia aratocensis</i> por MWHD. | 41 |
| Figura 12 | Montaje en el laboratorio para obtención por SDE del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> . | 43 |
| Figura 13 | Montaje en el laboratorio para obtención por SFE del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> . | 44 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 14 | Cromatograma típico del AE de <i>Salvia aratocensis</i> . Columna capilar DB-5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)(60 m). MSD (EI, 70 eV). | 45 |
| Figura 15 | Cromatograma típico del AE de <i>Salvia aratocensis</i> . Columna capilar DB-WAX con fase estacionaria de poli(etilenglicol)(60 m). MSD (EI, 70 eV). | 49 |
| Figura 16 | Cromatograma típico del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> , aislado por SDE. Columna capilar DB-5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)(60 m). MSD (EI, 70 eV). | 51 |
| Figura 17 | Cromatograma típico del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> , aislado por SDE. Columna capilar DB-WAX con fase estacionaria de poli(etilenglicol)(60 m). MSD (EI, 70 eV). | 52 |
| Figura 18 | Cromatograma típico del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> , aislado por SFE. Columna capilar DB-5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)(60 m). MSD (EI, 70 eV). | 54 |
| Figura 19 | Cromatograma típico del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> , aislado por SFE. Columna capilar DB-WAX con fase estacionaria de poli(etilenglicol)(60 m). MSD (EI, 70 eV). | 55 |

LISTADO DE TABLAS

| | Pág. |
|----------|---|
| Tabla 1 | Taxonomía de la <i>Salvia aratocensis</i> . 21 |
| Tabla 2 | Composición química del AE de <i>Salvia aratocensis</i> , obtenido por MWHD. 48 |
| Tabla 3 | Composición química del AE de <i>Salvia aratocensis</i> , obtenido por MWHD. 49 |
| Tabla 4 | Composición química del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> , obtenido por SDE. 51 |
| Tabla 5 | Composición química del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> , obtenido por SDE. 53 |
| Tabla 6 | Composición química del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> , obtenido por SFE. 54 |
| Tabla 7 | Composición química del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> , obtenido por SFE. 55 |
| Tabla 8 | Presencia de los metabolitos secundarios volátiles de <i>Salvia aratocensis</i> en otras especies del género <i>Salvia</i> . 58 |
| Tabla 9 | Comparación estructural de isómeros reportados en otras especies del género <i>Salvia</i> . 60 |
| Tabla 10 | Información general sobre el <i>trans</i> -cariofileno 75 |
| Tabla 11 | Información general sobre el <i>trans</i> -muurola-3,5-dieno 76 |
| Tabla 12 | Información general sobre el <i>trans</i> -muurola-4(14),5-dieno 76 |
| Tabla 13 | Información general sobre el germacreno D 77 |

| | | |
|----------|---|----|
| Tabla 14 | Información general sobre el γ -cadineno | 78 |
| Tabla 15 | Información general sobre el <i>trans</i> -calamineno | 79 |
| Tabla 16 | Información general sobre el 1,10-di- <i>epi</i> -cubenol | 79 |
| Tabla 17 | Información general sobre el <i>epi</i> - α -cadinol | 80 |
| Tabla 18 | Información general sobre el α -cadinol | 81 |
| Tabla 19 | Información general sobre el α -bisabolol | 81 |
| Tabla 20 | Información general sobre el fitol | 82 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|----------------|--|
| AE | Aceite esencial o aceites esenciales |
| SFE | <i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico) |
| MWHD | <i>Microwave-Assisted Hydro-Distillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas) |
| SDE | <i>Simultaneous Distillation-Extraction</i> (Destilación - extracción con solvente simultánea) |
| GC/MS | <i>Gas Chromatography-Mass spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas) |
| MS | <i>Mass spectrometry</i> (Espectrometría de masas) |
| GC | <i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases) |
| UIS | Universidad Industrial de Santander |
| UN | Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá |
| CENIVAM | Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales |
| INVIMA | Instituto Nacional de Vigilancia en Medicamentos y Alimentos |
| CINTROP | Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales |
| Ext | Extracto(s) |
| CAF | Corporación Andina de Fomento |

| | |
|----------------------|--|
| I_R | Índice(s) de retención lineal |
| MSD | <i>Mass Selective Detector</i> (Detector Selectivo de Masas) |
| msnm | Metros sobre el nivel del mar |
| PDMS | Poli(dimetilsiloxano) |
| PEG | Poli(etilenglicol) |
| ppm | Partes por millón |
| ppb | Partes por billón |
| ppt | Partes por trillón |
| mmol | Milimolar |
| DPPH | <i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl</i> (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) |
| Nº | Número |

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE *Salvia aratocensis* AISLADOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.*

Autor: Jorge Luis Gaitán Forero**

Palabras clave: *Salvia aratocensis*, metabolitos secundarios, hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), destilación – extracción con solvente simultánea (SDE), extracción con fluido supercrítico (SFE).

Desde la antigüedad se han usado las propiedades medicinales que tienen las plantas, que por su carácter autótrofo son capaces de sintetizar sustancias que emplean en su defensa. La actividad biológica que presentan estos compuestos son aprovechables por los seres humanos.

Colombia como país tropical posee una gran variedad de especies vegetales, de las cuales un alto porcentaje presenta algún tipo de actividad biológica en sus extractos y aceite esencial. La *Salvia aratocensis* es una especie descubierta recientemente y endémica de la región del río Chicamocha. En la literatura se encuentran reportes sobre propiedades antioxidante, antibacterial, antitumoral, citotóxica, antiséptica, antiespasmódica, antimicrobiana, y astringente en los aceites esenciales y extractos de especies de la familia *Labiaceae*.

En el presente trabajo se aislaron los metabolitos secundarios volátiles presentes en las hojas de la *Salvia aratocensis* mediante hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, extracción con CO₂ supercrítico y destilación-extracción simultánea con solvente. Los metabolitos secundarios obtenidos fueron identificados por GC-MS, teniendo en cuenta criterios cromatográficos (índice de retención) y espectroscópicos (comparación con los espectros de masas en las bases de datos ADAMS, NIST02 y Wiley 138). Se encontraron tres compuestos mayoritarios: 1,10-di-epi-cubenol, epi- α -cadinol y γ -cadineno. Se realizó una revisión en la literatura sobre los metabolitos encontrados para correlacionar las posibles propiedades biológicas que presentan el aceite esencial y los extractos de la *Salvia aratocensis*.

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora, Elena E. Stashenko; Co-director, Jairo René Martínez.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF VOLATILE SECONDARY METABOLITES OF *Salvia aratocensis* OBTAINED BY DIFERENT EXTRACTION METODOLOGIES.*

Authors: Jorge Luis Gaitan Forero**

Keywords: *Salvia aratocensis*, secondary metabolites, microwave-assisted hydro-distillation (MWHD), simultaneous distillation-extraction (SDE), supercritical fluid extraction (SFE).

Long time ago, people have been using the medicinal plants, because they synthesize substances that use on their defense. The biological activity these substances have been used for mankind and their for should of be studied.

Colombia is a tropical country, which possesses a great variety of plant species. A high percentage of that vegetation presents some type of biological activity in their extracts and essential oils. *Salvia aratocensis* is an endemic plant from the Chicamocha River Canyon. In the literature, there are many references about biological activity of the *Labiatae* family such as antioxidant, antibacterial, antitumoral and cytotoxic activity, besides antiseptic, anti-spasmodic, antimicrobial and astringent properties.

In this work, volatile secondary metabolites were obtained from *Salvia aratocensis* leaves by means of microwave-assisted hydro-distillation, supercritical fluid extraction with CO₂, and simultaneous distillation–solvent extraction.

Secondary metabolites identification was made by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) on the capillary columns with polar and nonpolar stationary phases. Component identification was based on chromatographic criteria (retention times and retention indices) and on interpretation and comparison of mass spectra with those of standards and databases (ADAMS, NIST02 and Wiley 138). The main components identified were *epi*- α -cadinol, 1,10-di-*epi*-cubenol and γ -cadinene.

A literature review about the main components, was used as an orientation about *Salvia aratocensis* essential oil and extracts and their possible biological activities.

* Colleague thesis

** Industrial University of Santander, Sciences Faculty, School of Chemistry. Director, Elena E. Stashenko; Co-director, Jairo René Martínez.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son utilizadas ancestralmente por sus propiedades para el tratamiento de una amplia variedad de patologías. Estas propiedades se les atribuyen gracias a su capacidad de síntesis de compuestos orgánicos a través de la cadena metabólica, que se utilizan en la defensa contra agentes externos [1]. Estas propiedades han sido aprovechadas por la industria farmacológica, que sintetiza compuestos para adicionarlos a productos comerciales; sin embargo, los gustos de los grandes y pequeños consumidores cambian; ahora, los productos farmacológicos de origen natural cautivan los principales mercados internacionales. La Corporación Andina de Fomento (CAF) calculó que para el año 2007 la producción mundial de ingredientes naturales para fármacos y cosméticos estuvo alrededor de 1.000 millones de dólares y la venta de alimentos y bebidas orgánicas fue cercana a 60.000 millones de dólares [2].

Colombia, como país tropical, posee una gran variedad de especies vegetales, de las cuales un alto porcentaje presenta algún tipo de actividad biológica en sus extractos. En el territorio nacional se reportan cerca de 50.000 especies de flora, de las cuales aproximadamente 6.000 cuentan con algún tipo de actividad biológica que le confiere uso medicinal [3]. De igual forma, solo 96 especies están reportadas en la Lista Básica del Instituto Nacional de Vigilancia en Medicamentos y Alimentos (INVIMA, 2001) y se resalta que sólo se comercializan a nivel nacional 156 plantas. A pesar de que Colombia es uno de los países con mayor diversidad florística gracias a su gran variedad de ecosistemas, entre otros factores, no tiene consolidado un mercado de plantas medicinales, como sí ocurre en China, Nepal, Sri Lanka, Bulgaria, entre otros, en donde existe un alto estatus para la medicina alternativa. Se calcula que en Colombia existen aproximadamente 100 laboratorios naturistas y 2.500 establecimientos que comercializan sus productos [3].

La familia de las *Salvias* comprende cerca de 300 especies identificadas en diferentes partes del mundo [4]. Los AE [aceite(s) esencial(es)] y extracto(s) de estas plantas presentan algún tipo de actividad biológica, de las cuales se destacan las siguientes: antioxidante [5,6], antibacterial y antimicrobial [5-7], antitumoral y citotóxica [7,8] anticáncer [6,9,10], antimutagénica [6], antiséptica [9], antiespasmódica [9], astringente [11], antiinflamatoria [9], antimalárica [8], efectos sobre el sistema nervioso central [12] y cardiovascular [6, 11].

La *Salvia aratocensis* es una especie vegetal endémica de la región del río Chicamocha [13] que pertenece a la familia de las *Labiadas*, lo que la convierte en una alternativa agroindustrial exclusiva de esta región, permitiendo ampliar la participación de la agroindustria regional en el mercado de los extractos naturales. Allí radica la importancia de establecer la composición química y la actividad biológica de los extractos de la *Salvia aratocensis*, que en estudios previos han demostrado actividad biológica contra enfermedades como la tuberculosis, mal de Chagas y Leishmaniasis, además de actividades antioxidante [14] y citotóxica.

Para poder tener una idea sobre las posibles propiedades biológicas del AE y los extractos de la *Salvia aratocensis*, es necesario identificar sus metabolitos secundarios. Con base en la información recolectada, se podría justificar la aplicación a nivel piloto o industrial de métodos de extracción de los metabolitos secundarios de interés, con miras a consolidar la participación regional en el biocomercio.

El aislamiento de los metabolitos secundarios de *Salvia aratocensis* se realizó mediante las siguientes tres técnicas: Primera, hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), que permitió extraer los componentes volátiles o AE del material vegetal. En la técnica MWHD la extracción se realiza aprovechando el calentamiento y posterior ebullición del agua presente en el recipiente de depósito y el agua presente al interior de las células del material vegetal, que arrastra los metabolitos volátiles que posteriormente son separados

por decantación. Segunda, extracción con CO₂ como fluido supercrítico (SFE), que permitió aislar los componentes menos volátiles presentes en el material vegetal; esta técnica se basa en las propiedades de fluido supercrítico, que tiene el CO₂, que al atravesar el material vegetal arrastra los metabolitos secundarios presentes en la matriz. Tercera, extracción por destilación con solvente simultánea (SDE), que permite estudiar la composición química del extracto vegetal según la solubilidad de sus componentes en diclorometano.

En el siguiente paso, se identificaron los metabolitos secundarios por cromatografía de gases (GC), con fases estacionarias polar y apolar, acoplado al análisis molecular por espectrometría de masas (MS), usando dos criterios: uno, espectroscópico mediante la comparación con los espectros de masas reportados en las bases de datos ADAMS, NIST y Wiley; y otro criterio, cromatográfico, basado en los resultados experimentales obtenidos tras la separación en la columna (tiempos e índices de retención).

La identificación de los metabolitos secundarios de la *Salvia aratocensis* permitió relacionar sus propiedades biológicas con la composición, se plantearon hipótesis sobre algunas propiedades biológicas de interés de la *Salvia aratocensis*, que pueden ser aprovechadas a nivel agroindustrial en la región.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 *Salvia aratocensis*

La familia de las *Labiadas* está conformada por aproximadamente 300 especies [13], de las cuales 17 son endémicas del Medio Oriente [5]. Se reportan especies del género *Salvia* en países como Brasil, Grecia, China, Jordania, Irán, Irak, Líbano, Tunisia, Turquía, Sudáfrica, Italia, España y Alemania. En la **Tabla 1** se encuentra la taxonomía de la *Salvia aratocensis*.

Tabla 1. Taxonomía de la *Salvia aratocensis*.

| | |
|---------------|-----------------------|
| Dominio | Eucariota |
| Reino | Vegetal |
| Subreino | Plantas verdes |
| División | Magnoliophyta Sinnott |
| Subdivisión | Spermatophytina |
| Infradivisión | Angiospermas |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Lamiidae |
| Superorden | Lamianae |
| Orden | Lamiales |
| Familia | Labiadas (Labiaceae) |
| Género | <i>Salvia</i> |
| Especie | <i>aratocensis</i> |
| Subespecie | <i>suratensis</i> |

La *Salvia aratocensis* pertenece a la familia Labiatae (**Tabla 1**); recibe el nombre común de “Velero de monte” [14] y se reportó por primera vez en 2003 por el Dr. José Luis Fernández del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Bogotá Colombia. La planta fue colectada en la cara sur del valle del Cañón del río Chicamocha [14], entre Aratóca y Pescadero (Santander, Colombia),

entre 500 y 1170 msnm [13,15] e identificada en el Herbario Nacional con el N° Vaucher 517740. En la **Figura 1** se observa la distribución de algunas especies del género *Salvia* en Colombia.

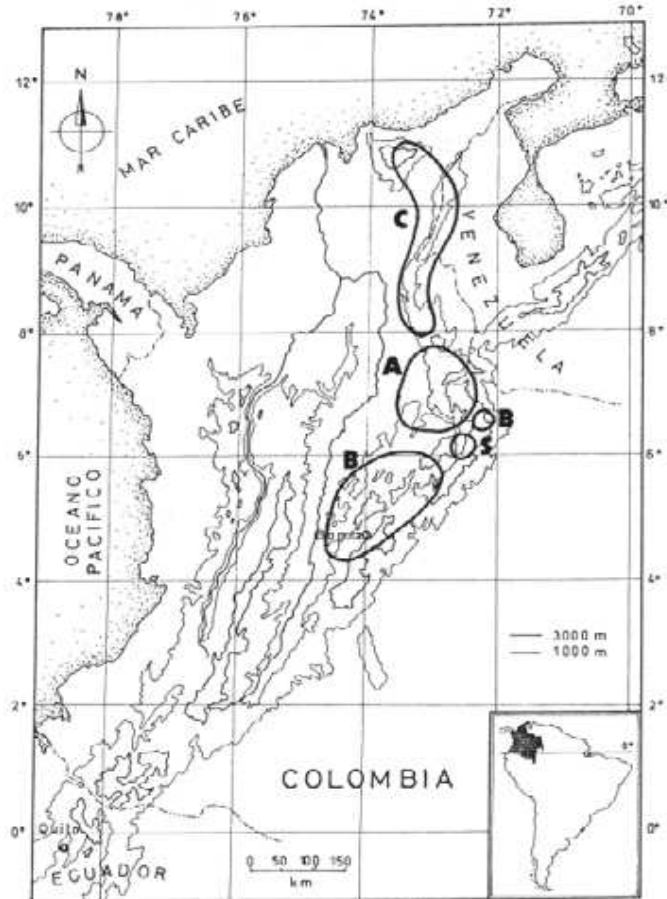


Figura 1. Ubicación geográfica de la zona de endemismo de la *Salvia aratocensis*. Tomado de Fernández J.L [13], p. 244.

- A- *Salvia aratocensis*.
- B- *Salvia bogotensis*.
- C- *Salvia cyanotropha*.
- S- *Salvia sochensis*.

En la **Figura 2** se observa la *Salvia aratocensis* con inflorescencia terminal. Sus hojas, en forma de labios, sirven como criterio para la clasificación de esta especie [13].



Figura 2. *Salvia aratocensis*, ramas con inflorescencia terminal.

Por tratarse de una especie nueva, aún no se reportan estudios sobre su actividad biológica y ninguno sobre la composición química de sus extractos, pero se pueden destacar algunos: Cala Molina, M. P. y colaboradores, en un trabajo desarrollado en la Universidad Industrial de Santander, evaluaron la actividad antioxidante, a través del ensayo de descoloramiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, DPPH, y el contenido total de fenoles mediante el método de Folin-Ciocalteu, del extracto de *Salvia aratocensis*; los valores obtenidos fueron: 0.0011 ± 0.0001 (kg Ext/mmol iniciales de DPPH) y $0,30 \pm 0.05$ (mg fenoles/100 mg de planta) [16].

Dra Patricia Escobar Rivera y colaboradores, del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) reportó al Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales, CENIVAM, la actividad citotóxica de los metabolitos secundarios volátiles de *Salvia aratocensis*, además de la actividad anti-Leishmaniasis y anti-Chagas.

Otros estudios realizados sobre diferentes especies del género *Salvia* pueden ser referentes para la especie *Salvia aratocensis*, ya que mostraron que el género *Salvia* es una fuente de polifenoles. Recientemente, se han encontrado estudios que centran su atención en metabolitos secundarios hidrosolubles, en su mayoría, derivados del ácido caféico, que presentan actividades antioxidante, antiviral y antitumoral [17].

La *Salvia aratocensis* se encuentra ocasionalmente entre las plantas que se venden en las plazas de mercado con fines medicinales; su uso más frecuente está asociado con el tratamiento de las dolencias del riñón [13].

Algunas plantas de este género contienen flavonas, flavonoles y sus glucósidos [18], además de metabolitos la mayoría derivados del ácido caféico, presentan actividad antioxidante [5,6], antibacterial y antitumoral [19], actividad citotóxica [7, 8,20], antiséptica [9], antiespasmódica [9], antimicrobiana [5-7] y astringente [5,11].

2.2 Metabolitos secundarios

Se conocen como metabolitos secundarios a los compuestos químicos sintetizados por las plantas; éstos cumplen funciones no esenciales en ellas algunas, aún desconocidas; intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, sin embargo su ausencia no es fatal para la supervivencia de la planta.

Muchas veces se pensó que los metabolitos secundarios eran productos finales de procesos metabólicos, o productos de desecho sin función específica. En general, fueron percibidos como poco importantes por los biólogos, por lo que históricamente han recibido poca atención. Muchas de las funciones de los metabolitos secundarios aún se desconocen. El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos al final del siglo XIX y a principios del siglo XX, que estaban interesados en estas sustancias por su importancia como drogas

medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria. El estudio de los metabolitos secundarios de las plantas fue un estímulo para el desarrollo de las técnicas de separación, la espectroscopía para dilucidar su estructura, y metodologías de síntesis que hoy constituyen base de la química orgánica contemporánea.

En estudios biológicos más recientes se demostró que algunos de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos, o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas [21-23]. El hecho de encontrar propiedades biológicas importantes de muchos metabolitos secundarios ha incentivado el desarrollo de este campo de investigación, para buscar nuevas drogas, antibióticos, insecticidas o herbicidas.

Con base en sus orígenes biosintéticos los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 4 grandes grupos [24]:

- **Terpenos.** Todos los terpenoides, tanto los que participan en el metabolismo primario, como los más de 25.000 metabolitos secundarios [25], son derivados del compuesto IPP (Isopentenil difosfato), que se forman por la vía del ácido mevalónico. Es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante [26,27]. Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. Unos pocos, como los que forman los AE, están restringidos a solo algunas plantas. Suelen ser insolubles en agua y se derivan químicamente de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de carbono). Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C_5), así: monoterpenos (C_{10}); sesquiterpenos (C_{15}); diterpenos (C_{20}); triterpenos (C_{30}); tetraterpenos (C_{40}) y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno.

- **Compuestos fenólicos.** Como los fenilpropanoides y sus derivados. Los más de 8.000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o bien por la vía del ácido shikímico o bien por la vía del malonato/acetato.
- **Compuestos nitrogenados o alcaloides.** Los alrededor de 12.000 alcaloides que se conocen [24], contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas [28]. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que se usan ampliamente en medicina. Ejemplos de algunos alcaloides conocidos son la morfina, la atropina, la quinina y la estricnina.
- **Glicósidos.** Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de interés particular: saponinas, glicósidos cardíacos y glicósidos cianogénicos. Se incluye una cuarta familia, los glucosinolatos, debido a su estructura similar a los glicósidos [24,29].

2.3 Aceite esencial

Los AE se encuentran almacenados en las células vegetales, son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas (metabolitos secundarios), que poseen el aroma característico de algunas flores, árboles, semillas etc. Se les llama AE porque poseen intenso olor, o sea, contienen compuestos volátiles que, por su estructura molecular, generan estímulos en el sistema olfativo del ser humano. Los aceites pueden ser muy inestables; son volátiles, frágiles, y pueden sufrir degradación química con la luz, el calor, álcalis o ácidos fuertes [30].

Las plantas elaboran los AE con el fin de protegerse de las enfermedades, comunicarse entre ellas, demarcar su territorio, competir con otras especies,

ahuyentar insectos depredadores o atraer insectos benéficos que contribuyen a la polinización [30]. Estas sustancias químicas, por necesidad, deben ser volátiles a temperatura y presión normal para el hábitat de la planta. Los metabolitos secundarios se liberan constantemente usando como mecanismo de transporte la atmósfera [31]. Esta selectividad se debe a la actividad que tiene cada una de las sustancias que componen el respectivo AE. Esta propiedad biológica puede ser aprovechada por el ser humano. Además, es una fuente natural, y por lo tanto, renovable para obtener sustancias con propiedades específicas [31].

En general, se pueden enunciar algunas propiedades físicas de los AE, entre ellos las siguientes: son líquidos a temperatura ambiente, volátiles, recién destilados son incoloros o ligeramente amarillentos, poseen densidad inferior a la del agua, alto índice de refracción, son inflamables, pero no son tóxicos (su límite de ingestión por toxicidad es muy alto), solubles en alcohol de alta concentración, en aceites fijos o grasas, pero poco solubles en solventes polares.

Se pueden diferenciar los AE de las grasas por los siguientes aspectos:

- * Los AE son más volátiles;
- * Las grasas son saponificables;
- * Las grasas dejan mancha permanente en el papel;
- * Las grasas sufren enranciamiento (formación de ácidos oxidados, cetonas, aldehídos, entre otros)
- * Los AE son solubles en alcohol.

Por lo general, los AE poseen: terpenos, derivados del fenil propano (aldehído anísico, eugenol), entre otros [30].

2.4 Extracto

Se define como extracto vegetal a la mezcla de compuestos de origen químico extraídos con un solvente a partir de plantas o de algunas de sus partes. A diferencia del AE, que solo posee compuestos volátiles, el extracto también contiene compuestos, independientes de su masa molecular más alta o presión de vapor más baja.

Actualmente, muchos extractos tienen una relevancia creciente en el mercado farmacológico, por la gran variedad de principios activos que puede poseer una misma planta, en la concentración en que se pueden obtener (alto grado de pureza) y la minimización de los efectos colaterales asociados a la contaminación del proceso de síntesis y por la similitud estructural de los compuestos sintetizados que se utilizan en la industria farmacológica tradicional.

2.5 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

Este proceso se basa en el mismo principio de métodos de extracción como la destilación por arrastre con vapor o hidrodestilación simple [30].

En principio, la hidrodestilación necesita un extractor o recipiente cerrado en donde se introduce la materia prima molida (material vegetal) sumergida en agua dentro de un horno de micro-ondas como se muestra en la **Figura 3**. El recipiente está conectado a un condensador superior y exterior. Debido al calentamiento por la acción de la radiación de microondas, la presión del vapor de agua aumenta hasta superar la resistencia hidráulica del lecho vegetal, el vapor de agua rompe las paredes celulares liberando el AE que por su volatilidad es evaporado y recolectado aparte del lecho vegetal. Los rendimientos conseguidos son similares a los que se obtienen con la hidrodestilación convencional [30-32].

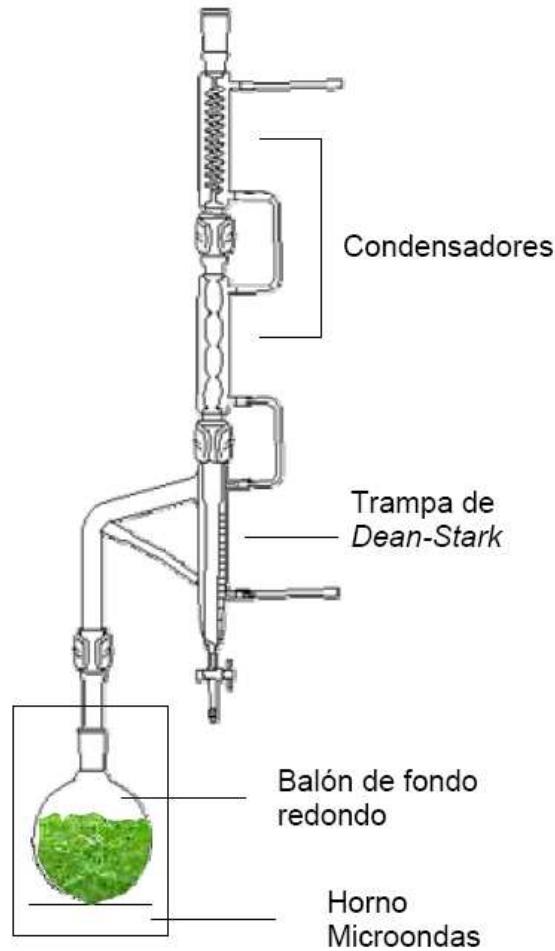


Figura 3. Esquema del montaje para obtención del AE de *Salvia aratocensis* por MWHD [36]. Imagen tomada de: [32, p. 52].

El efecto de las microondas depende forzosamente de la naturaleza de las matrices del disolvente y del sólido. Mientras mayor sea la constante dieléctrica del disolvente, el calentamiento aumentará, por lo tanto, las microondas dan el calentamiento a toda la muestra homogéneamente, característica que diferencia a este método de los existentes. Además, el contenido de humedad del material vegetal es esencial en MWHD debido a que las microondas interactúan selectivamente con las moléculas polares del agua presentes en los tricomas glandulares de la estructura vegetal, el calor produce la expansión y ruptura de las

paredes celulares y la liberación del AE y promueve la liberación de los analitos al medio circundante [30-32].

2.6 Extracción con fluido supercrítico

Este proceso de extracción usa un fluido en condiciones supercríticas como disolvente. Por lo general, se utiliza CO₂, por presentar características “ideales” para la extracción (es gaseoso a temperatura ambiente, por lo cual se separa del analito fácilmente, es económico, de fácil consecución comercial, inerte y no tóxico) [32,33].

Una de las maneras de realizar la extracción con CO₂ supercrítico a escala de laboratorio aparece en la **Figura 4**, que permite alcanzar presiones de hasta 1100 psi. La materia prima se seca por periodo de varias semanas, finalmente, es molida y acumulada en un extractor formando un lecho fijo. Luego, se hace circular una corriente de un fluido supercrítico en un extractor Soxhlet de alta presión [34], que extrae los compuestos solubles en éste. Posteriormente el fluido se evapora durante la despresurización, hasta alcanzar la temperatura y la presión ambiente. Finalmente el extracto obtenido no tiene el disolvente y, presumiblemente los componentes no experimentan cambios químicos [32].

A diferencia de la MWHD, la SFE extrae compuestos de peso molecular más alto, en la medida que se obtienen presiones mayores al interior del cilindro. El método puede hacerse selectivo para algún analito de interés al controlar la polaridad del fluido supercrítico, lo anterior se consigna con la adición de solventes como alcoholes, generalmente, metanol en pequeños porcentajes que permite extraer compuestos cada vez más polares [32-34].

Existen ventajas en el proceso de SFE con CO₂: El proceso es libre de contaminantes biológicos (microbios, hongos, etc.), tiene mínimo impacto ambiental, se obtienen extractos con una mayor “frescura” y aroma natural, se

usan de temperaturas moderadas, para evitar la degradación térmica del producto, no hay presencia del disolvente en el extracto, mientras se alcanzan mayores rendimientos por operación [32,35].

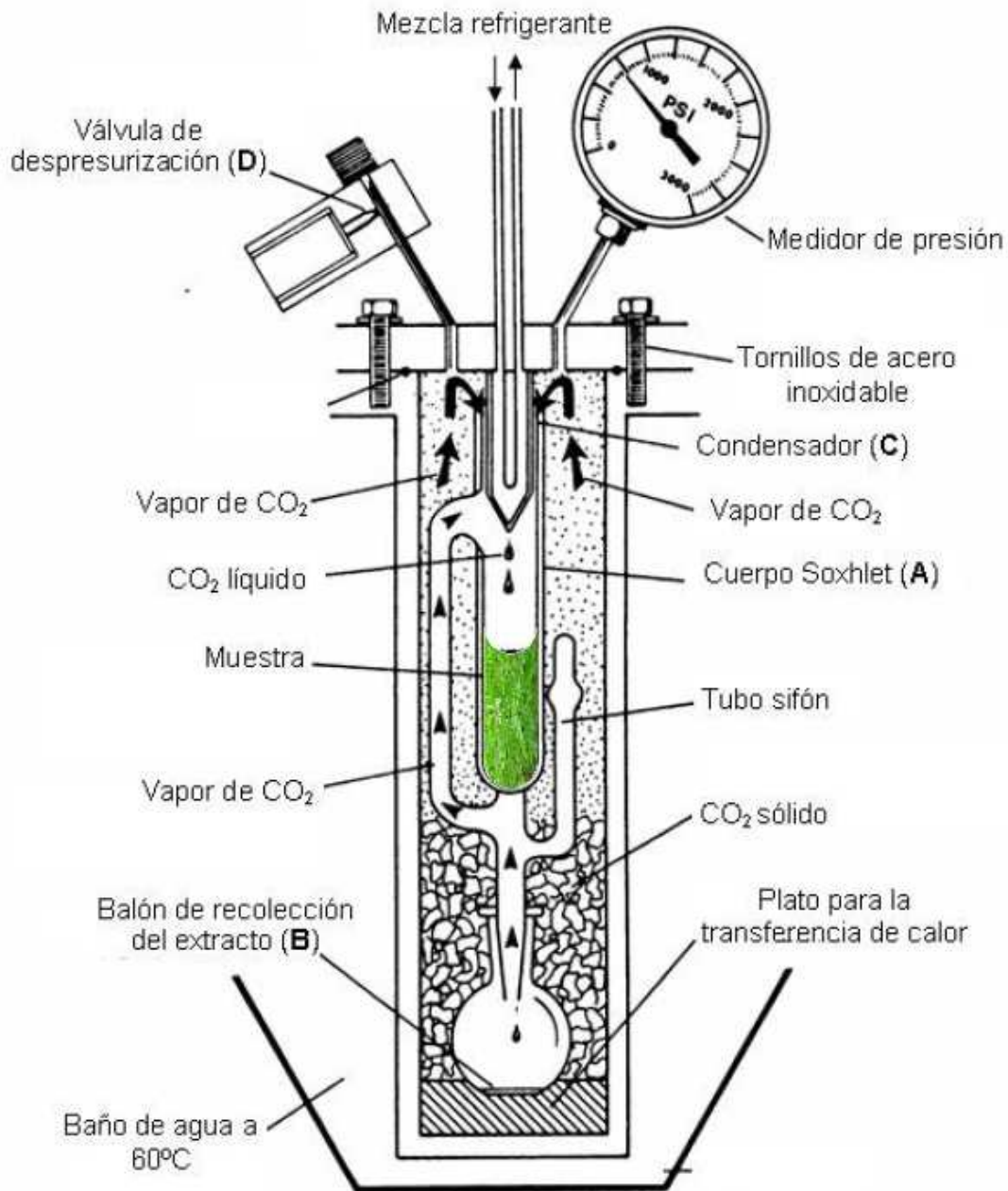


Figura 4. Esquema del montaje para obtención del extracto de *Salvia aratocensis* por SFE [35]. Imagen tomada de [32, p.54].

2.7 Destilación-extracción con solvente simultánea

Este método fue introducido por Likens y Neckerson en 1966, se basa en la combinación de la destilación por arrastre de vapor y la extracción con disolvente, ambos procesos suceden de manera simultánea [31]. El modelo original ha sido modificado hasta tener un método de extracción a microescala diseñado por Godefroot y colaboradores [36] como se observa en la **Figura 5**. Este método permite extraer los metabolitos secundarios presentes en el material vegetal usando una cantidad pequeña de solvente.

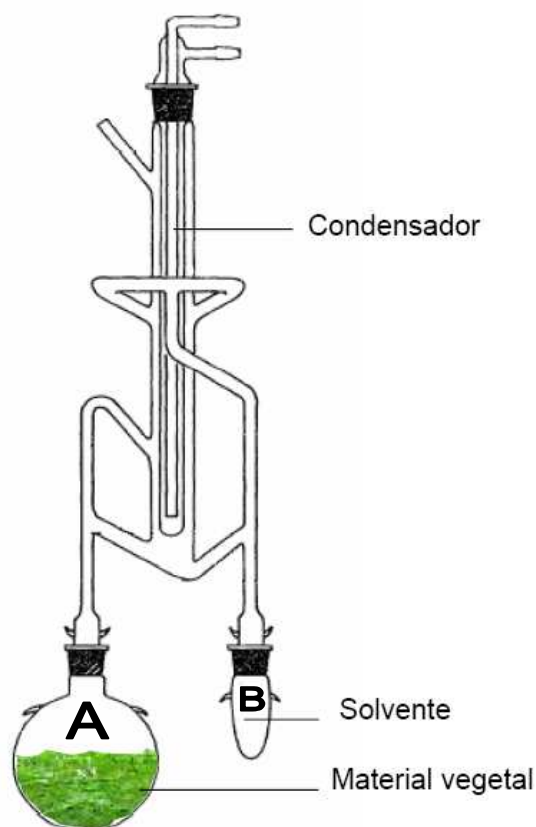


Figura 5. Esquema del montaje para obtención del extracto de *Salvia aratocensis* por SDE [36]. Imagen tomada de [32, p.53].

Los disolventes orgánicos son sustancias que pueden suspender, extraer o disolver sustancias sin reaccionar químicamente con ellas. La técnica requiere un extractor de destilación continua, que consiste en dos balones separados y conectados por vías diferentes a un condensador. Para realizar la destilación se utiliza agua junto con el material vegetal en el balón A y en el balón B (ver **Figura 5**) el solvente que realizará la extracción. Por lo general, se utiliza diclorometano que es más denso que el agua; esta técnica permite obtener variedad de compuestos del extracto de la planta [32,36].

Una de las grandes ventajas es la facilidad para el análisis cromatográfico del extracto; por estar disuelto en diclorometano sólo se requiere tomar una cantidad del extracto e inyectarlo al cromatógrafo, no requiere concentraciones previas, además disminuye costos, ya que se extrae gran variedad de compuestos con una pequeña cantidad de disolvente [32].

2.8 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía es una técnica de separación de mezclas orgánicas multicomponente, inició a principios del Siglo XX cuando se implementó en la separación de pigmentos vegetales [33].

El principio fundamental tiene sus raíces en la igualdad de potenciales entre dos fases, una móvil (gas inerte, generalmente, He, N₂, H₂, He) y una fase estacionaria (generalmente de PDMS [Poli(dimetilsiloxano)] o PEG [Poli(etilenglicol)]); los componentes de la mezcla se retienen de manera distinta a lo largo del proceso, lo que permite su separación. Este tiempo de retención es afectado por las interacciones entre las fases y los componentes de la mezcla, que dependen de la presión de vapor y la polaridad de los analitos.

En la cromatografía de gases la muestra se inyecta al equipo, luego, atraviesa la columna que se encuentra dentro de un horno, al cual se le puede programar la

temperatura. La velocidad de migración de cada componente y en consecuencia, su tiempo de retención en la columna, será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria [33].

La identificación de los componentes de una mezcla se realiza con base en los tiempos de retención, es decir, el tiempo que tarda cada componente entre la inyección y la salida de la columna. Para realizar la identificación se requiere inyectar una mezcla de hidrocarburos *n*-alcanos que permiten el cálculo de índices de retención para los componentes de la mezcla, en este caso, el AE y los extractos.

La espectrometría de masas es el análisis de los iones-fragmento provenientes de la ionización y posterior fragmentación de sustancias puras. La espectrometría de masas (MS) se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc.

Dentro de las bondades de esta técnica se pueden mencionar:

- Capacidad de identificación, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt.
- Proporciona información estructural e isotópica sobre la molécula analizada.
- Es una técnica rápida: se puede obtener un espectro en décimas de segundo, por lo que puede utilizarse para generar información sobre la composición de una mezcla de gases en tiempo real.

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto o bombardeo de las moléculas con electrones de una cierta energía (70 eV, es energía estandar), capaces de provocar la ionización y fragmentación de las moléculas. Una vez ionizadas las moléculas y se forman los iones-fragmento,

éstas se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ion dependerá de su relación masa/carga. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce su espectro de masas, que es diferente para cada compuesto [33,37].

Al acoplar la cromatografía de gases y la espectrometría de masas, se logra por un lado, separar una mezcla y, por otro, determinar la estructura molecular de cada uno de los componentes de la muestra por separado.

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada al cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica con la elución sucesiva de los componentes individuales aislados, que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas [37].

El único obstáculo que se presentaba a la hora de realizar el acoplamiento era que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que funciona a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta muy fácil, porque se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual.

3. CIENCIOMETRÍA

La bibliometría es una actividad que permite medir la actividad científica en determinada área del conocimiento, con respecto al tiempo y a la ubicación geográfica.

Con el objetivo de conocer el estado de la actividad científica alrededor del género *Salvia*, se realizó un estudio bibliométrico en la Base de Datos *Science Direct, Elsevier B.V.* La fecha de consulta fue junio 24 de 2010.

En la **Figura 6** se observa un incremento, año tras año, en el número de publicaciones referentes al género *Salvia*. La revisión cubrió los últimos 20 años y marcó una tendencia creciente de la actividad científica en este campo. Para el estudio, se utilizó la siguiente ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY(*Salvia**).

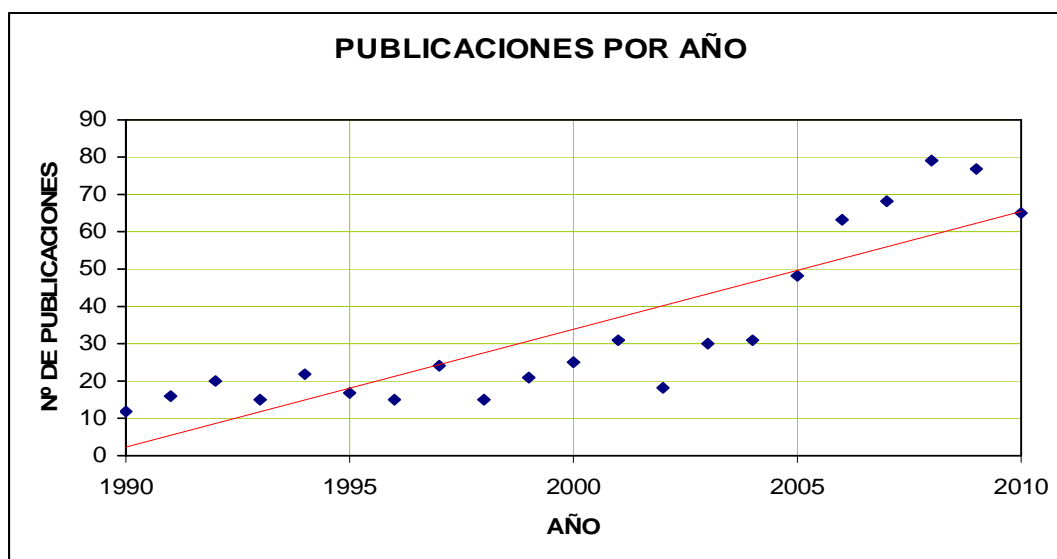


Figura 6. Relación de publicaciones sobre el género *Salvia*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elsevier B.V.* Fecha de consulta: junio 24 de 2010. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY(*Salvia**).

En la **Figura 7** se observan los países, en donde se desarrolló el mayor número de investigaciones sobre el género *Salvia*. Se encuentra un alto número de publicaciones en países del Medio Oriente, lo cual sugiere que hay una gran cantidad de especies de *Salvia* en la flora de la correspondiente región.

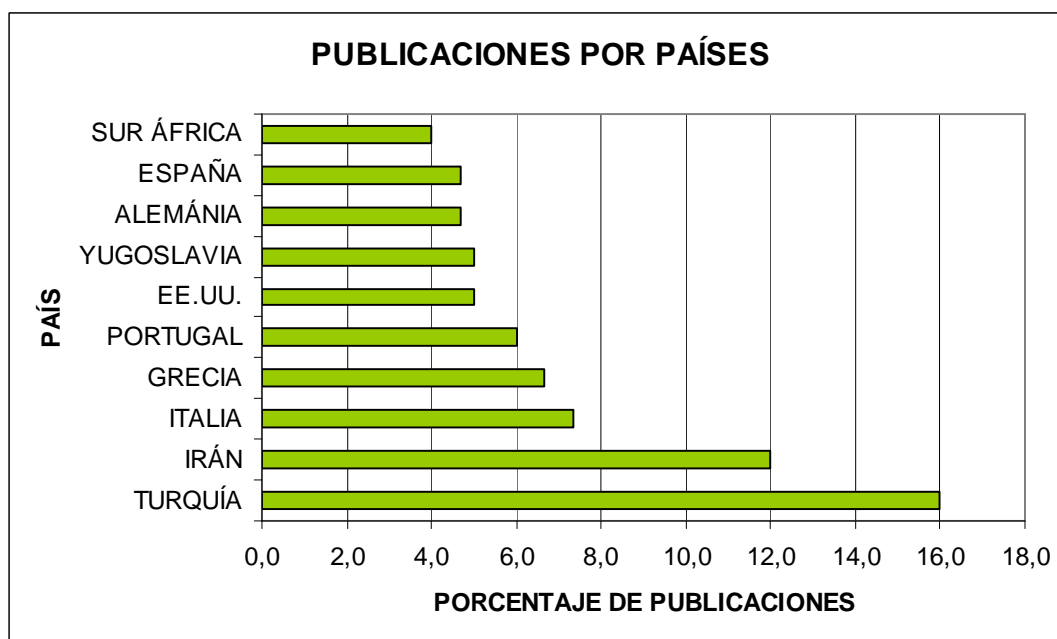


Figura 7. Relación de publicaciones con respecto al país de publicación. Periodo de observación: 1990–2010. Base de datos: *Science Direct, Elsevier B.V.* Fecha de consulta: junio 24 de 2010. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY(*Salvia**).

Los porcentajes que aparecen en la **Figura 7** corresponden al número de publicaciones encontradas con la ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY(*Salvia**).

Dentro del estudio, se localizaron publicaciones que reportan la presencia de especies de *Salvia* endémicas en países como Brasil [38], Tunisia [6], Turquía [39,40], Irán [42], Líbano [7], Isla de Creta al sur de Grecia [43,44], China [45],

Jordania [10,43], y algunos países del sur África [8,11,43] y del Medio Oriente [10,46].

En el estudio cuantitativo realizado se encontró que los autores que más estudiaron el género *Salvia* son:

BASER. KHC, TZAKOU. O, DEMIRCI. B, KAMATOU. GPP y RUSTAIYAN. A.

En la **Figura 8** se observa la relación de publicaciones en diferentes áreas de aplicación. Se observa que la mayoría de los estudios sobre el género *Salvia* se desarrollan en los campos de las esencias naturales, la farmacología, aplicaciones en química industria alimenticia y tecnología.

Los porcentajes mostrados en la **Figura 8** corresponden a los datos recolectados en la exploración inicial con la ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTRACT(KEY(*Salvia**)).

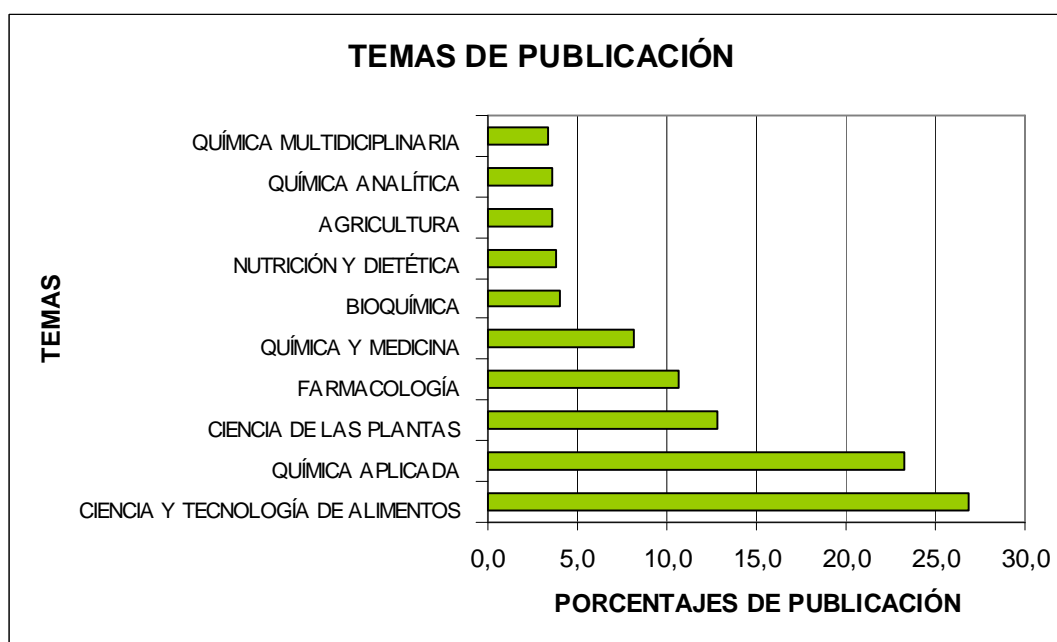


Figura 8. Relación de publicaciones con respecto al área de estudio. Periodo de observación: 1990–2010. Base de datos: *Science Direct, Elsevier B.V.*

Fecha de consulta: junio 24 de 2010. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY(Salvia*).

En la **Figura 9** se observa que el mayor porcentaje de las publicaciones sobre el género *Salvia* corresponde a publicaciones en artículos. La **Figura 9** fue elaborada con base en los datos obtenidos con la exploración inicial con la ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY(Salvia*).

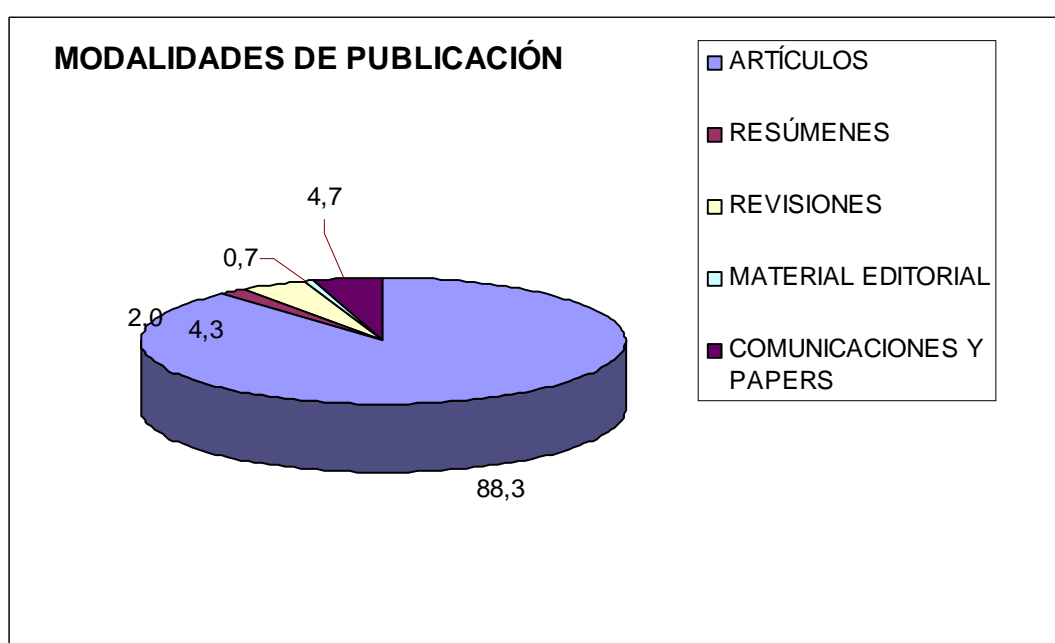


Figura 9. Relación de publicaciones según la modalidad. Periodo de observación: 1990–2010. Base de datos: *Science Direct, Elsevier B.V.* Fecha de consulta: junio 24 de 2010. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY(Salvia*).

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en el Cañón del río Chicamocha en zona rural del municipio de Soata (Boyacá), según número de colecta JLF-4.2, clasificado por el Dr. José Luis Fernández del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Bogotá Colombia (UN), y cultivado a pequeña escala para los estudios en laboratorio, como se observa en la **Figura 10**, en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM), con sede en la Universidad Industrial de Santander (UIS).



Figura 10. *Salvia aratocensis* cultivada en el CENIVAM-UIS.

4.2 OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

4.2.1 OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR MWHD

En la **Figura 11** se observa el montaje experimental utilizado para obtener el AE de la *Salvia aratocensis*.



Figura 11. Montaje en el laboratorio para obtención del AE de *Salvia aratocensis* por MWHD.

- A Condensador en espiral
- B Condensador en columna
- C Trampa Dean-Stark
- D Horno de microondas
- E Salida de la corriente refrigerante del sistema
- F Entrada de la corriente refrigerante al sistema
- G AE decantado
- H Llave de teflón
- I Cuello de ganso
- J Adaptador para el balón de destilación
- K Balón de destilación con el material vegetal

Se utilizó el montaje experimental que aparece en la **Figura 11**, se tomaron tres cantidades de material vegetal (hojas de *Salvia aratocensis*), 212, 222 y 220 g. Cada cantidad fue depositada en un balón aforado distinto con 300 mL de agua, que se acoplaron consecutivamente al mismo equipo tipo Clevenger con reservorio de destilación adaptado a un sistema de calentamiento por radiación de microondas, en un horno convencional (LG, modelo MS-1242zk, 1200 W de potencia). Cada balón fue sometido a una radiación aproximada de 720 W (3x15 min), con descansos de 1 min, entre cada intervalo. Finalizado el proceso, el AE se separó por decantación, se le eliminó la humedad presente con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se extrajo una alícuota de 50 µL que se aforó con diclorometano (grado analítico) a 1 mL, para su posterior análisis cromatográfico.

Se calculó el rendimiento del AE mediante la fórmula (1):

$$\text{Rendimiento, \%} = \left(\frac{W_{AE}}{W_{MV}} \right) \times 100 \% \quad (1)$$

Donde: W_{AE} es el peso del AE (g); W_{MV} es el peso del material vegetal (g).

4.2.2 OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR SDE

Se utilizó el montaje experimental, que aparece en la **Figura 12**. Se pesaron 5,09 g de material, vegetal previamente picado, que se depositó en un balón de destilación acoplado al equipo para destilación-extracción simultánea. En este equipo, se utilizó agua (40 mL) y diclorometano (5 mL, grado analítico). El proceso tuvo una duración de 2 h, tiempo después del cual se obtuvo el extracto, se le eliminó la humedad presente con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se tomó 1mL, para su posterior análisis cromatográfico.

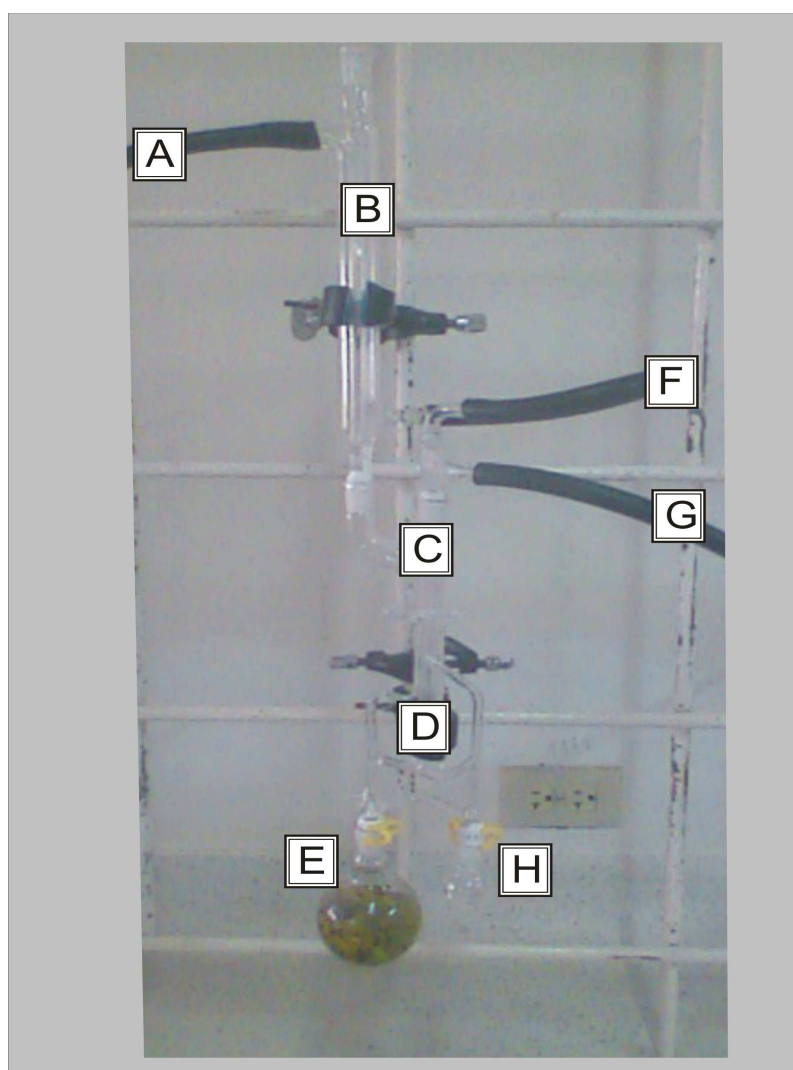


Figura 12. Montaje en el laboratorio para obtención por SDE del extracto de *Salvia aratocensis*.

- A Salida de corriente refrigerante del sistema
- B Condensador
- C Dedo frío
- D Accesorio de recirculación de solventes
- E Balón de destilación con hojas de *Salvia aratocensis*
- F Paso de corriente de refrigeración del dedo frío al condensador
- G Entrada de corriente de refrigeración al dedo frío
- H Balón de destilación con diclorometano

4.2.3 OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR SFE

Se utilizó el montaje experimental, que aparece en la **Figura 13**. Se pesó el material vegetal (5,02 g) previamente picado; se depositó en un equipo Soxhlet de alta presión (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU) para la extracción se usó hielo seco comercial (CO₂, 320 g), se ajustó la temperatura del dedo frío a -20 °C, se reguló la temperatura del baño de agua a 60 °C con una altura de 7 cm resultando una presión de 1000-1100 psi. El proceso tuvo una duración de 2 h, tiempo después del cual, se inició la despresurización del montaje experimental; el balón y el accesorio para recirculación de CO₂ se lavaron con diclorometano (grado analítico), se obtuvo el extracto, se le eliminó la humedad presente con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se tomó 1mL, para su posterior análisis cromatográfico.

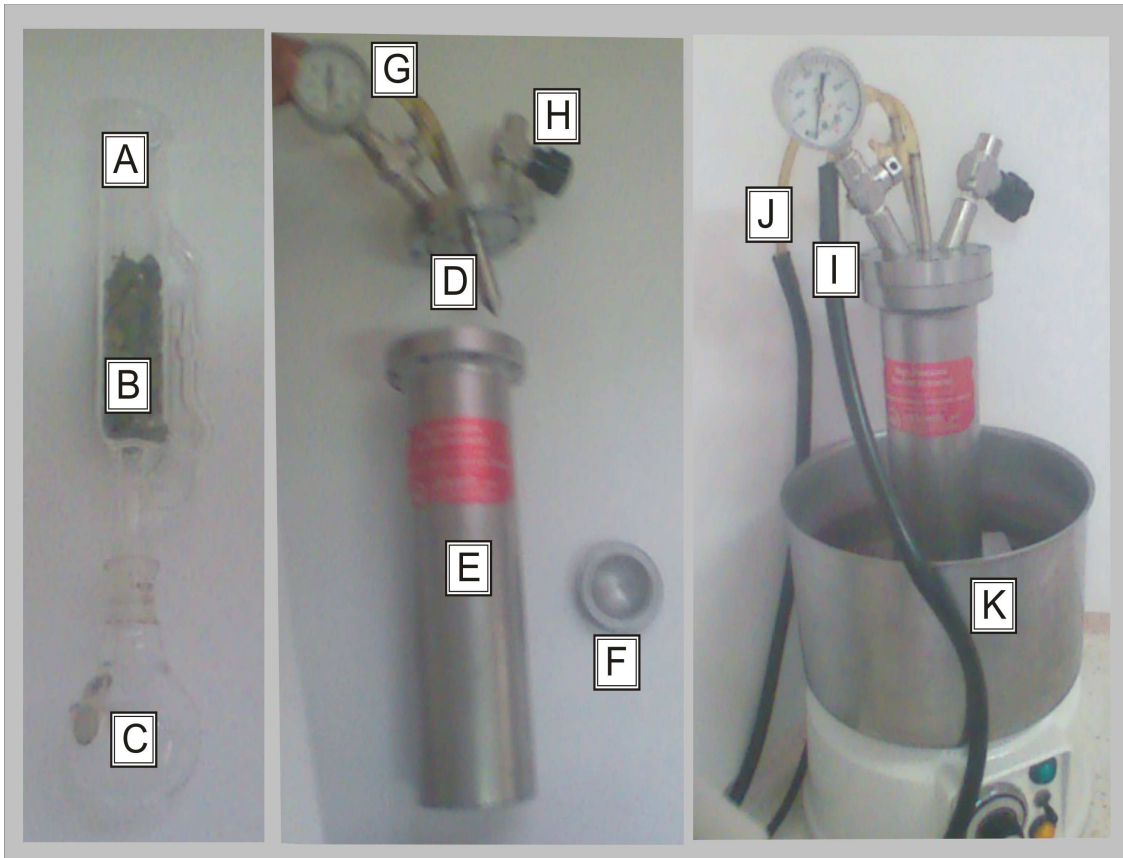


Figura 13. Montaje en el laboratorio para obtención por SFE del extracto de *Salvia aratocensis*.

- A Accesorio para recirculación de CO₂
- B Material vegetal (hojas de *Salvia aratocensis*)
- C Balón de destilación en el que se recoge el extracto
- D Dedo frío
- E Equipo Soxhlet
- F Disco de apoyo para el balón de destilación
- G Manómetro
- H Válvula de despresurización

- I Salida de corriente de refrigeración del sistema
- J Entrada de corriente de refrigeración a dedo frío
- K Baño calefactor de agua

4.3 Análisis cromatográfico

Los metabolitos secundarios fueron analizados en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* (Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5973 Plus*. Los tiempos de retención fueron determinados en una columna capilar DB-5MS 60 m x 0.25 mm x 0.25 μm con fase estacionaria apolar de 5%- fenil-poli(dimetilsiloxano) y una columna capilar DB-WAX, 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm con fase estacionaria polar de poli(etilenglicol).

La temperatura del horno fue programada desde 45° C (5 min) hasta 250° C @ 5° C min^{-1} . El gas de arrastre fue helio (99.9995%, Aga-Fano S.A), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 113.3 kPa y una velocidad lineal de 26 cm s^{-1} . El volumen de inyección del AE y extracto en diclorometano fue de 2 μL .

4.4 Caracterización

Los componentes fueron identificados con base en los criterios cromatográficos, tiempos e índices de retención, y criterios espectroscópicos, a través de la interpretación y la comparación de espectros de masas experimentales con los de las bases de datos (ADAMS, NIST02 y Wiley).

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *Salvia aratocensis*, aislados por MWHD.

En la **Figura 14** se presenta el perfil cromatográfico obtenido por GC-MS con columna capilar DB-5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)(60 m), de los metabolitos secundarios volátiles presentes en el del AE de *Salvia aratocensis*, obtenido por MWHD. En la **Tabla 2** se presenta la composición química del AE de *Salvia aratocensis*, con la respectiva comparación de índices de retención y cantidades relativas (%) para cada compuesto identificado.

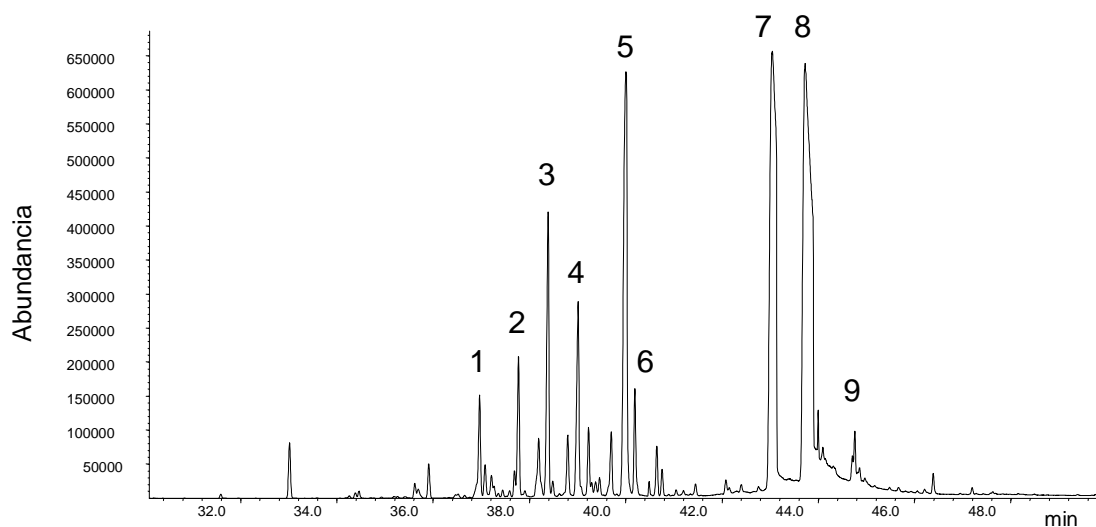


Figura 14. Cromatograma típico del AE de *Salvia aratocensis*. Columna capilar DB-5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)(60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Composición química del AE de *Salvia aratocensis*, obtenido por MWHD.

| Nº pico Fig, 14 | IR, columna apolar | | Compuesto | Cantidad relativa ^b , % |
|--------------------|--------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | Reportado [47] | Experimental ^a | | |
| 1 | 1419 | 1433 | <i>trans</i> -Cariofileno | 2,4 |
| 2 | 1453 | 1457 | <i>trans</i> -Muurolo-3,5-dieno | 2,8 |
| 3 | 1494 | 1475 | <i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno | 5,2 |
| 4 | 1485 | 1493 | Germacreno D | 3,7 |
| 5 | 1514 | 1525 | γ -Cadineno | 11,9 |
| 6 | 1529 | 1532 | <i>trans</i> -Calamineno | 1,7 |
| 7 | 1629 | 1631 | 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol | 22,4 |
| 8 | 1640 | 1657 | <i>epi</i> - α -Cadinol | 34,5 |
| 9 | 1686 | 1695 | α -Bisabolol | 3,2 |

- Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna DB-5MS.
- Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna.

Se identificaron 9 compuestos, correspondientes al 87,8% del área cromatográfica total. Dentro de estos 9 metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 3 mayoritarios a saber: *epi*- α -cadinol (34,5%), seguido del 1,10-di-*epi*-cubenol (22,4%) y γ -cadineno (11,9%), que corresponden al 68,8% del área cromatográfica total.

Los metabolitos secundarios volátiles presentes en el AE aparecen en orden de elución, según su peso molecular, lo cual es razonable para la columna capilar DB-5MS, que es apolar.

En la **Figura 15** se presenta el perfil cromatográfico obtenido por GC-MS con columna capilar DB-WAX, con fase estacionaria de poli(etilenglicol)(60 m), de los metabolitos secundarios volátiles presentes en el AE de *Salvia aratocensis* obtenido por MWHD. En la **Tabla 3** se presenta la composición química del AE de

Salvia aratocensis obtenida por GC-MS, con los índices de retención y cantidades relativas para cada compuesto identificado.

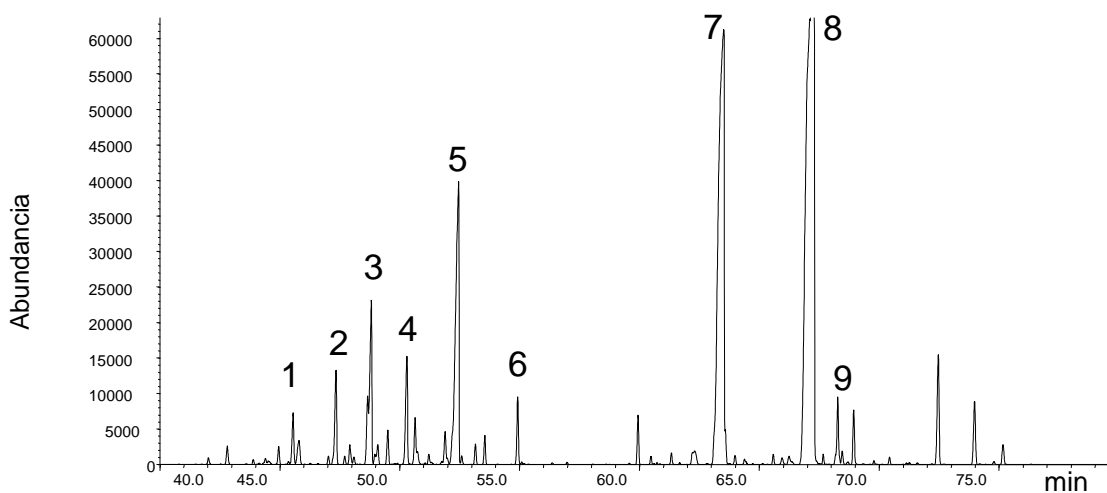


Figura 15. Cromatograma típico del AE de *Salvia aratocensis*. Columna capilar DB–WAX con fase estacionaria de poli(etilenglicol)(60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Composición química del AE de *Salvia aratocensis* obtenido por MWHD.

| Nº pico Fig. 15 | IR, columna polar | | Compuesto | Cantidad relativa ^b , % |
|--------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | Reportado [48] | Experimental ^a | | |
| 1 | 1617 | 1592 | <i>trans</i> -Cariofileno | 1,0 |
| 2 | 1626 | 1634 | <i>trans</i> -Muurolo-3,5-dieno | 1,9 |
| 3 | 1692 | 1668 | <i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno | 4,7 |
| 4 | 1712 | 1703 | Germacreno D | 2,2 |
| 5 | 1766 | 1757 | γ -Cadineno | 10,2 |
| 6 | 1837 | 1819 | <i>trans</i> -Calamineno | 1,1 |
| 7 | 2037 | 2050 | 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol | 26,3 |
| 8 | 2136 | 2159 | <i>epi</i> - α -Cadinol | 39,2 |
| 9 | 2022 | 2190 | α -Bisabolol | 1,2 |

- a. Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna DB–WAX.
- b. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna.

Se identificaron 9 compuestos, correspondientes al 87,8% del área cromatográfica total. Dentro de estos 9 metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 3 mayoritarios a saber: *epi*- α -cadinol (39,2%), 1,10-di-*epi*-cubenol (26,3%) y γ -cadineno (10,2%), que corresponden al 75,7% del área cromatográfica total.

El orden de elución de los metabolitos secundarios da una referencia sobre su polaridad. Los compuestos con grupos OH fueron los últimos en eluir, lo que corresponde al orden de polaridad de las formas moleculares de las sustancias presentes en el AE de *Salvia aratocensis*. Coincidentalmente, la secuencia según la polaridad y la secuencia según el peso molecular hicieron aparecer en igual orden a los metabolitos cuando se analizó el AE por las columnas DB–5MS y DB–WAX.

El rendimiento en porcentaje en peso de la extracción de AE con respecto al material vegetal fue del 0,1 %.

5.2 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *Salvia aratocensis*, aislados por SDE.

En la **Figura 16** se presenta el perfil cromatográfico obtenido por GC-MS con columna capilar de DB–5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)(60 m), de los metabolitos secundarios volátiles presentes en el extracto de *Salvia aratocensis* obtenido por SDE. En la **Tabla 4** se presenta la composición química del extracto de *Salvia aratocensis* obtenido por SDE, con los índices de retención y cantidades relativas para cada compuesto identificado.

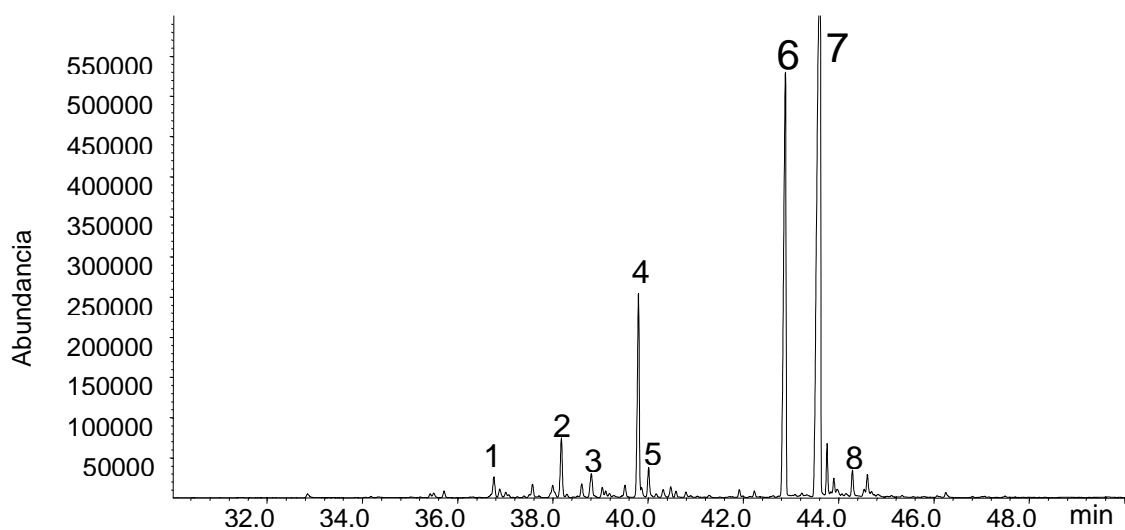


Figura 16. Cromatograma típico del extracto de *Salvia aratocensis*, aislado por SDE. Columna capilar DB-5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)(60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Composición química del extracto de *Salvia aratocensis*, obtenido por SDE.

| Nº pico Fig. 16 | IR, columna apolar | | Compuesto | Cantidad relativa ^b , % |
|--------------------|--------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | Reportado [47] | Experimental ^a | | |
| 1 | 1419 | 1433 | <i>trans</i> -Cariofileno | 2,0 |
| 2 | 1494 | 1475 | <i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno | 3,0 |
| 3 | 1485 | 1493 | Germacreno D | 1,4 |
| 4 | 1514 | 1525 | γ -Cadineno | 9,8 |
| 5 | 1529 | 1532 | <i>trans</i> -Calamineno | 1,5 |
| 6 | 1619 | 1631 | 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol | 24,9 |
| 7 | 1640 | 1658 | <i>epi</i> - α -Cadinol | 44,8 |
| 8 | 1654 | 1670 | α -Cadinol | 1,8 |

a. Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna DB-5MS.

- b. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna.

Se identificaron 8 compuestos, correspondientes al 84,2% del área cromatográfica total. Dentro de estos 8 metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 3 mayoritarios a saber: *epi*- α -cadinol (44,8%), del 1,10-di-*epi*-cubenol (24,5%) y γ -cadineno (9,8%), que corresponden al 79,1% del área cromatográfica total.

En la **Figura 17** se presenta el perfil cromatográfico obtenido por GC-MS con columna capilar DB-WAX con fase estacionaria de poli(etilenglicol)(60 m), de los metabolitos secundarios volátiles presentes en el extracto de *Salvia aratocensis* obtenido por SDE. En la **Tabla 5** se presenta la composición química del extracto de *Salvia aratocensis* obtenido por SDE, con los de índices de retención y cantidades relativas (%) para cada compuesto identificado.

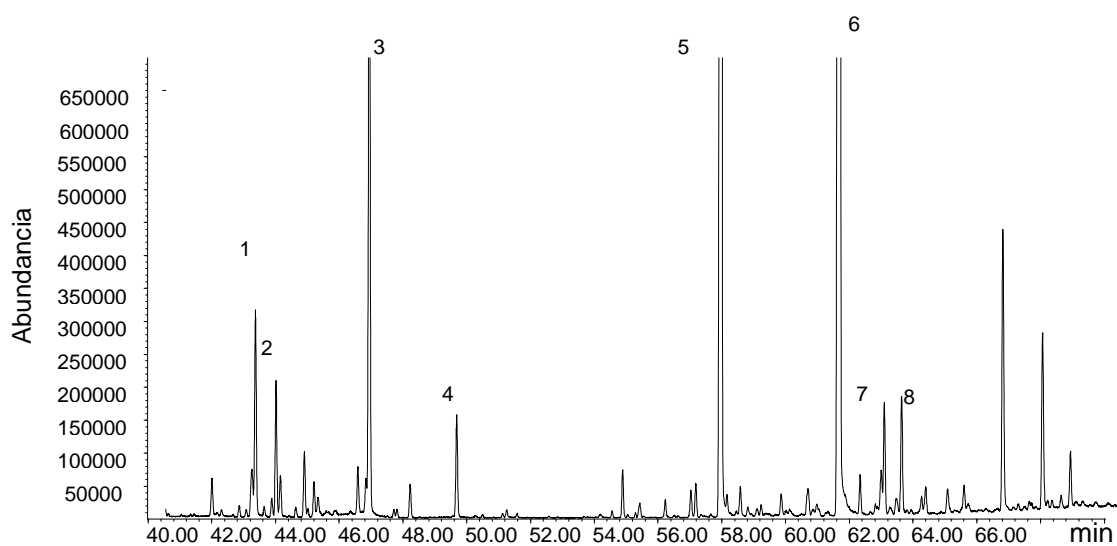


Figura 17. Cromatograma típico del extracto de *Salvia aratocensis*, aislado por SDE. Columna capilar DB-WAX con fase estacionaria de poli(etilenglicol)(60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Composición química del extracto de *Salvia aratocensis*, obtenido por SDE.

| Nº pico Fig. 17 | IR, columna polar | | Compuesto | Cantidad relativa ^b , % |
|--------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | Reportado [48] | Experimental ^a | | |
| 1 | 1692 | 1668 | <i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno | 1,2 |
| 2 | 1712 | 1703 | Germacreno D | 0,7 |
| 3 | 1766 | 1757 | γ -Cadineno | 4,8 |
| 4 | 1837 | 1819 | <i>trans</i> -Calamineno | 0,6 |
| 5 | 2037 | 2050 | 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol | 28,4 |
| 6 | 2136 | 2159 | <i>epi</i> - α -Cadinol | 61,4 |
| 7 | 2022 | 2090 | α -Bisabolol | 0,7 |
| 8 | 2150 | 2165 | α -Cadinol | 0,8 |

- Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna DB-WAX.
- Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna.

Se identificaron 8 compuestos, correspondientes al 98,6% del área cromatográfica total. Dentro de estos 8 metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 3 mayoritarios a saber: *epi*- α -cadinol (61,4%), 1,10-di-*epi*-cubenol (28,4%) y γ -cadineno (4,8%), que corresponden al 94,6% del área cromatográfica total.

5.3 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *Salvia aratocensis*, aislados por SFE.

En la **Figura 18** se presenta el perfil cromatográfico obtenido por GC-MS con columna capilar DB-5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)(60 m), de los metabolitos secundarios volátiles presentes en el extracto de *Salvia aratocensis* obtenido por SFE. En la **Tabla 6** se presenta la composición química del extracto de *Salvia aratocensis*, obtenido por SFE, con los índices de retención y cantidades relativas para cada compuesto identificado.

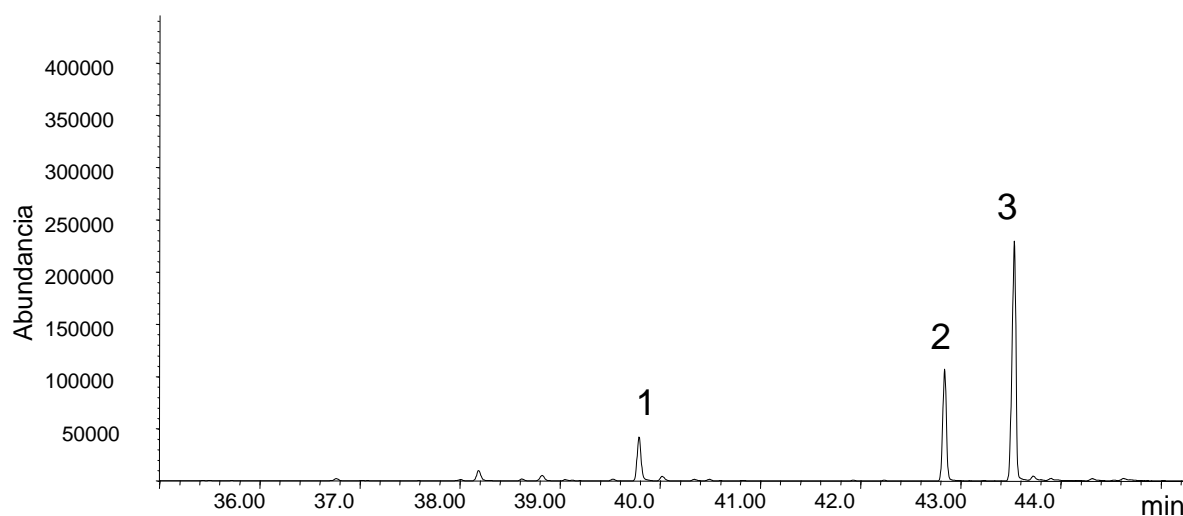


Figura 18. Cromatograma típico del extracto de *Salvia aratocensis*, aislado por SFE. Columna capilar DB–5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)(60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Composición química del extracto de *Salvia aratocensis*, obtenido por SFE.

| Nº pico Fig. 18 | IR, columna apolar | | Compuesto | Cantidad relativa ^b , % |
|--------------------|--------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| | Reportado [47] | Experimental ^a | | |
| 1 | 1514 | 1525 | γ -Cadineno | 9,8 |
| 2 | 1619 | 1630 | 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol | 24,6 |
| 3 | 1640 | 1656 | <i>epi</i> - α -Cadinol | 55,5 |

- Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna DB–5MS.
- Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna.

Se identificaron 3 compuestos, estos 3 metabolitos fueron: *epi*- α -cadinol (55,5%) seguido del 1,10-di-*epi*-cubenol (24,6%) y γ -cadineno (9,8%), que corresponden al 89,9% del área cromatográfica total.

En la **Figura 19** se presenta el perfil cromatográfico obtenido por GC-MS con columna capilar DB-WAX con fase estacionaria de poli(etilenglicol)(60 m), de los metabolitos secundarios volátiles presentes en el extractos de *Salvia aratocensis* obtenido por SFE. En la **Tabla 7** se presenta la composición química del extracto de *Salvia aratocensis* obtenido por SFE, junto con los índices de retención y cantidades relativas (%) para cada compuesto identificado.

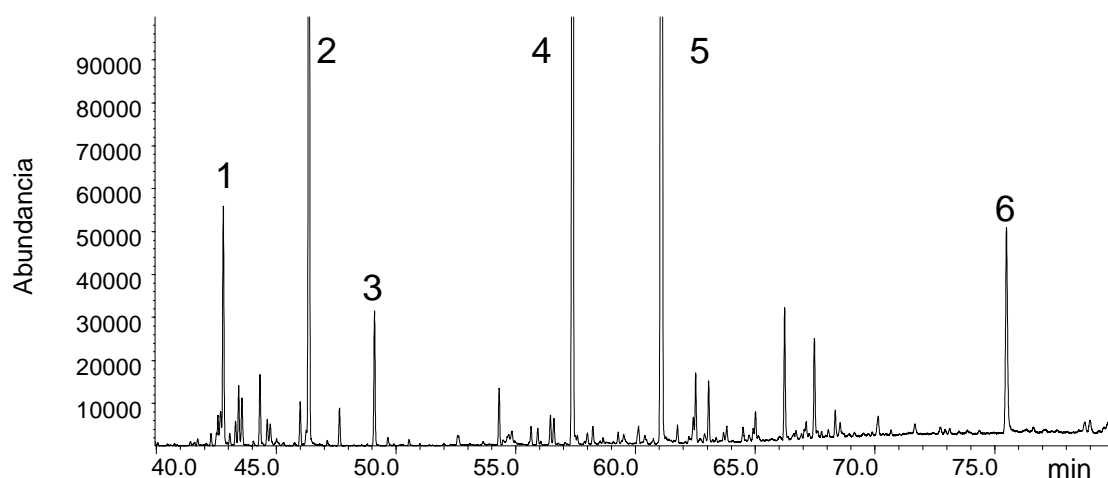


Figura 19. Cromatograma típico del extracto de *Salvia aratocensis*, aislado por SFE. Columna capilar DB-WAX con fase estacionaria de poli(etilenglicol)(60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Composición química del extracto de *Salvia aratocensis*, obtenido por SFE.

| Nº pico Fig. 19 | IR, columna polar | | Compuesto | Cantidad relativa ^b , % |
|--------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | Reportado [48] | Experimental ^a | | |
| 1 | 1692 | 1668 | <i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno | 2,4 |
| 2 | 1766 | 1757 | γ -Cadineno | 9,8 |
| 3 | 1837 | 1819 | <i>trans</i> -Calamineno | 1,3 |
| 4 | 2037 | 2050 | 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol | 24,2 |
| 5 | 2136 | 2159 | <i>epi</i> - α -Cadinol | 56,2 |
| 6 | 2620 | 2590 | Fitol | 3,1 |

- a. Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna DB–WAX.
- b. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna.

Se identificaron 6 compuestos, que componen el 97% del área cromatográfica total, los 3 metabolitos mayoritarios en el extracto fueron: *epi*- α -cadinol (56,2%), 1,10-di-*epi*-cubenol (24,2%) y γ -cadineno (9,8%), que corresponden al 90,2% del área cromatográfica total.

Los metabolitos aislados por la extracción con CO₂ supercrítico corresponden a los más pesados, entre ellos, 1,10-di-*epi*-cubenol y *epi*- α -cadinol.

Adicional a los metabolitos caracterizados en los demás extractos y el AE, en este extracto se encontró fitol, que es de mayor masa molecular (296 g/mol) que la de los otros componentes identificados, que poseen masas moleculares de 204 y 222 g/mol (ver apéndices). Las sustancias identificadas en este extracto presentan cantidades relativas mayores que las presentes en el extracto, obtenido por SDE y el AE, lo que indica que, con la técnica de extracción SFE se pueden aislar estos componentes con rendimiento más alto. No se cuenta, infortunadamente, con las sustancias patrón para determinar sus concentraciones absolutas en los diferentes extractos.

Se aprecia una diferencia en la cantidad de picos en los cromatogramas de las **Figuras 18 y 19**. Los tiempos de despresurización del SFE fueron diferentes para cada muestra. El menor tiempo de despresurización fue para el extracto analizado con columna DB–5MS (10 h aproximadamente), al ser menor el tiempo de despresurización el gradiente de presión entre el interior del cilindro y la atmósfera permite escapar fácilmente los compuestos más livianos. En efecto, los tres compuestos más pesados predominan en el cromatograma de la **Figura 18**, mostrando una presencia mínima de los metabolitos secundarios más volátiles.

Por otro lado la despresurización del extracto analizado con columna capilar DB–WAX tardó cerca de 24 h, y en el cromatograma de la **Figura 19** se aprecian 6 picos cromatograficos.

En términos generales, la mayoría de las sustancias identificadas son isómeros, presentan pesos moleculares muy similares o iguales entre sí, por esta razón no es buena la separación en columna capilar DB–5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)(60 m), que es apolar y tiene criterios de separación como el peso molecular y la presión de vapor; se aprecia una mejor separación de los componentes con la columna capilar DB–WAX con fase estacionaria de poli(etilenglicol)(60 m), que es polar, y por ende tiene como criterio de separación la polaridad de las moléculas.

Los extractos SDE y SFE pueden contener sustancias poco volátiles que no la técnica GC-MS no detecta.

5.4 Comparación con los metabolitos secundarios aislados de otras especies del género *Salvia*.

En la **Tabla 8** se hace una comparación entre los metabolitos secundarios volátiles encontrados en la *Salvia aratocensis* y los reportados en 23 especies del género *Salvia*.

Tabla 8. Presencia de los metabolitos secundarios volátiles de *Salvia aratocensis* en otras especies del género *Salvia*.

| Especie | Referencias | Metabolito | | | | | | | | | | |
|---|-------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------------|-------|
| | | <i>trans</i> -Cariofileno | <i>trans</i> -Muurolo-3,5-dieno | <i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno | Germacreno D | γ -Cadineno | <i>trans</i> -Calamineno | 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol | <i>epi</i> - α -Cadinol | α -Cadinol | α -Bisabolol | Fitol |
| <i>Salvia officinalis</i> L | [49] | X | | | X | D | | | | | X | |
| <i>Salvia bracteata</i> | [7] | X | | A | | X | C | E | | X | | |
| <i>Salvia rubifolia</i> | [7] | X | G | A | | X | X | E | T | X | | Z |
| <i>Salvia aucheri</i> var. <i>Aucheri</i> | [41] | X | G | | | D | | | | X | | |
| <i>Salvia aramiensis</i> | [41] | X | | | X | D | | | | | | |
| <i>Salvia pilifera</i> | [41] | X | | A | X | X | C | E | | X | | |
| <i>Salvia multicaulis</i> Vahl. | [50] | | | A | X | D | C | | | X | | X |
| <i>Salvia africana-caerulea</i> | [51] | X | | A | | X | X | E | T | | | |
| <i>Salvia africana-lutea</i> | [51] | X | | | X | D | X | E | T | | | |
| <i>Salvia lanceolata</i> | [51] | X | | | X | X | | E | T | | | |
| <i>Salvia miltiorrhiza</i> | [52, 53] | X | | A | X | | | | | X | | |
| <i>Salvia mirzayanii</i> | [54] | | | A | X | X | | | | | | |
| <i>Salvia microstegia</i> Boiss | [55] | X | | | X | X | C | | | X | B | X |
| <i>Salvia lanigera</i> | [56] | X | | X | X | D | | | T | | B | |
| <i>Salvia spinosa</i> [56] | [56] | X | | A | X | D | | | T | | | |
| <i>Salvia syriaca</i> [56] | [56] | X | | | | | X | | | | | |
| <i>Salvia Rosifolia</i> | [57] | X | | A | X | X | C | E | | | | |
| <i>Salvia cryptantha</i> | [58] | | | A | X | X | | | | | X | |

Tabla 8. Continuación. Presencia de los metabolitos volátiles de *Salvia aratocensis* en otras especies del género *Salvia*.

| | | | | | | | | |
|--------------------------------|------|---|---|---|---|---|---|-----|
| <i>Salvia multicaulis</i> | [50] | | A | X | D | | | X |
| <i>Salvia hydrangea</i> | [59] | X | | | D | E | X | X X |
| <i>Salvia potentillifolia</i> | [60] | X | A | X | | | T | X |
| <i>Salvia tomentosa</i> Miller | [61] | | A | X | X | | | |

- D σ -Cadineno
- E *epi*-Cubenol
- T *t*-Cadinol
- C *cis*-Calamineno
- Z *cis*-Fitol
- A α -Muuroleno
- B β -Bisaboleno
- G γ -Muuroleno

Se observa que el *trans*-cariofileno, el α -cadinol y el germacreno D son frecuentes en las especies del género *Salvia*. Por otro lado, se puede observar la presencia de compuestos con similitud estructural, como lo son los isómeros de γ -cadineno y 1,10-di-*epi*-cubenol, que se pueden presentar por estar asociados a la misma ruta metabólica.

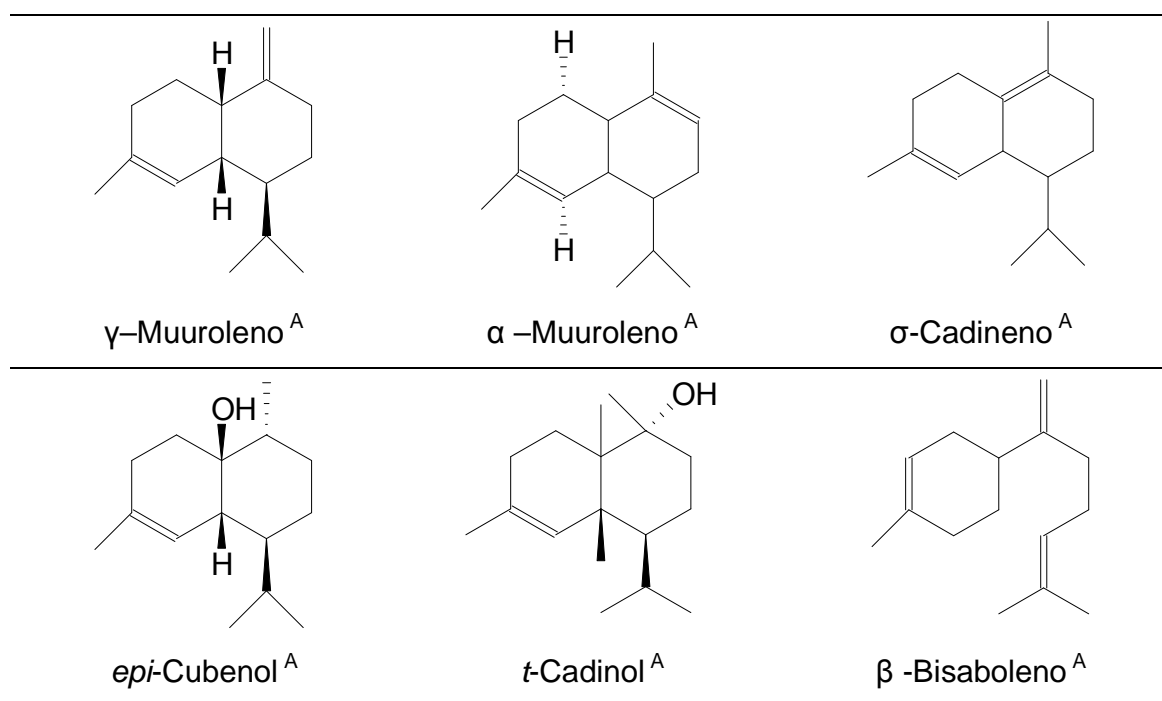
El γ -cadineno también se encontró reportado en otras especies del género *Salvia*, y en algunas ocasiones su isómero σ -cadineno. Se concluye, que los isómeros del cadineno son habituales entre el género *Salvia*.

Los isómeros *cis*- y *trans*- del calamineno también son usuales en la composición química de los metabolitos secundarios del género *Salvia*.

En lo referente al α -cadinol, aunque se encontró reportado en algunas especies del género *Salvia*, es muy común su isómero el tau-cadinol. Se puede asegurar que los isómeros del cadinol también son comunes en las especies del género *Salvia*.

Los metabolitos menos habituales en las especies del género *Salvia* con las que se comparó la composición química de los compuestos volátiles, fueron *trans*-muurolo-3,5-dieno y *trans*-muurolo-4(14),5-dieno, encontrando una presencia muy frecuente del α -muuroleno y el γ -muuroleno, que comparten similitud estructural con compuestos de la familia del cariofileno y el cadineno. En la **Tabla 9** se observan las estructuras moleculares de algunas sustancias reportadas en otras especies del género *Salvia*, y que son isómeros de los metabolitos encontrados en la *Salvia aratocensis*.

Tabla 9. Comparación estructural de isómeros reportados en otras especies del género *Salvia*.



A Nombre de la estructura molecular, Tomado de: [47].

Los metabolitos secundarios α -bisabolol y fitol fueron los menos frecuentes, reportándose muy poco en las especies del género *Salvia*, incluso sus isómeros también son poco frecuentes entre las especies comparadas. Se encontraron reportes del β -bisaboleno, un derivado del bifosfato de 2-*trans*-6-*trans*-farnesilo.

6. CONCLUSIONES

1. La *Salvia aratocensis* es una fuente natural de los siguientes sesquiterpenoides: 1,10-di-*epi*-cubenol, *epi*- α -cadinol y γ -cadineno, que constituyen más del 70% de sus aceites esenciales y extractos SDE y SFE.

2. La mayor variedad de metabolitos secundarios volátiles se obtiene en el AE aislado por MWHD, pero en los extractos, obtenidos por SDE y SFE, están presentes metabolitos secundarios menos volátiles que los que se encuentran en el aceite esencial de *Salvia aratocensis*.

3. Al comparar los metabolitos secundarios volátiles encontrados en la *Salvia aratocensis*, con los reportados en otras especies del género *Salvia*, se observa que hay similitudes en su composición química; sus aceites esenciales presentan actividades antimicrobiana y antioxidante.

Con base en lo anterior, se presume que el AE de *Salvia aratocensis* también puede exhibir las propiedades antimicrobiana y antioxidante.

4. La técnica SFE permitió aislar 1,10-di-*epi*-cubenol y *epi*- α -cadinol en mayor cantidad relativa (24,6 y 55,5 % respectivamente), por ser metabolitos volátiles relativamente pesados encontrados en la *Salvia aratocensis* (P.M. = 222 Da).

7. RECOMENDACIONES

Realizar pruebas de actividad insecticida, antimicrobial y antioxidante, a mezclas de los tres metabolitos mayoritarios presentes en la *Salvia aratocensis*, y comparar los resultados de actividad de las mezclas con los resultados que se obtengan para los extractos y AE; ello, para correlacionar las propiedades biológicas de la *Salvia aratocensis* con sus tres metabolitos mayoritarios. Lo ideal sería iniciar las pruebas insecticidas tomando como referencia los insectos más frecuentes en la zona de endemismo de la *Salvia aratocensis*.

Estudiar la composición de los metabolitos secundarios de la *Salvia aratocensis* en cultivos a mayor escala, pues la competencia interespecífica y la alelopatía son factores relevantes que inciden sobre la composición de los metabolitos secundarios volátiles que produce una planta.

Aislar los metabolitos secundarios de *Salvia aratocensis* por SFE, a presiones mayores que las utilizadas en este trabajo de investigación, con el fin de identificar componentes más pesados, como diterpenos y flavonoides..

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Castañeda Muñoz, M L; Estudio de la composición química y de la actividad biológica de diez plantas aromáticas Colombianas; Trabajo de grado; Universidad Industrial de Santander; Bucaramanga; 2007.
- [2] Quiroga Antelo, O; Biodiversidad, una joya a conservar y un potencial económico para el desarrollo que el estado Boliviano quiere estimular; Instituto Boliviano de Comercio Exterior; 2008;
- [3] Nope, C A; Melo, M M; Rodríguez, L F; Plan estratégico de mercadeo para el fomento de la producción de plantas medicinales y aromáticas de Asoplames (Nuevo Colón, Boyacá); *Agronomía Colombiana*; 2008, 26 (1), 155-164.
- [4] Cala Molina, M P; Vásquez Cardeño, A M; Estudio comparativo de por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de plantas de la familia *Labiaceae*, y determinación de su capacidad antioxidante; Trabajo de pregrado; Universidad Industrial de Santander; Bucaramanga; 2008;
- [5] Salehi, P; A. Sonboli; S. N. Ebrahimi; M. Yousefzadi; Antibacterial and antioxidante activities of the Essentials oils and various extracts of *Salvia sahendica* in diferent phenological stages; *Chemistry of Natural Compounds*; 2007, 43 (3), 274 – 275.
- [6] Bouaziz, M; Yangui, T; Sayadi, S; Dhouib, A; Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia; *Food and Chemical Toxicology*; 2008, 47 (11), 2755-2760.
- [7] Cardile, V; Russo, A; Formisano, C; Rigano, D; Senatore, F; Arnold, N. A; Piozzi, F; Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells; *Journal of Ethnopharmacology*; 2009, 126 (2), 265-272.
- [8] G.P.P. Kamatoua; R.L. Van Zyla; H. Davidsa; F.R. Van Heerdenb; A.C.U. Lourensb; A.M. Viljoen; Antimalarial and anticancer activities of selected South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. radula*; *South African Journal of Botany*; 2008, 74 (2), 238-243.
- [9] G.P.P. Kamatou; N.P. Makunga; W.P.N. Ramogola; A.M. Viljoen; South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry; *Journal of Ethnopharmacology*; 2008, 119 (3), 664-672.

- [10] Hala Gali-Muhtasib; Anticancer and medicinal properties of essential oil and extracts of East Mediterranean sage (*Salvia triloba*); *Advances in Phytomedicine*; 2006, 2 (3), 169-180.
- [11] G.P.P. Viljoen A. M; Gono-Bwalya, A. B; van Zyl, R. L; van Vuuren, S. F; Lourens, A. C; Başer, K. H; Demirci, B; Lindsey, K. L; van Staden, J; Steenkamp, P; The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species; *Journal of Ethnopharmacology*; 2005, 102 (3), 382-390.
- [12] M. H. Al-Yousuf, A. K. Bashir, B. H. Ali, M. O. M. Tanira, G. Blunden; Some effects of *Salvia aegyptiaca* L. on the central nervous system in mice; *Journal of Ethnopharmacology*; 2002, 81 (1), 121-127.
- [13] Fernandez Alonso, J L; Estudios en *Labiatae* de Colombia IV. Novedades en *Salvia* y sinopsis de las secciones angulatae y purpureae. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia; Bogotá; 2003, 25(2), 235-281.
- [14] Fernandez Alonso, J L; Rivera Diaz, O; Libro rojo de plantas de Colombia, parte dos, Las *Labiadas*; Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia; Bogotá; 2003, 387-679.
- [15] Albesiano, S; Rangel Ch, J O; Estructura de la vegetación del río Chicamocha, 500-1200 msnm, Santander-Colombia, una herramienta para la conservación; Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia; Bogotá; 2006, 28(2), 307-325.
- [16] Cala Molina, M. P; Vásquez Cardeño, A. V; Miranda, I; Tafur, G; Martínez, J. R; Stashenko, E. E; Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia Sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*; *Scientia et Technica*; 2007, XIII, (33), 205-207.
- [17] Hatice, A; Atalay, A; Munewer, S; Moschos, P; Julia. S; Bioactivities of the various extracts and essential oils of *Salvia limbata* C.A.Mey. and *Salvia sclarea* L; *Turkish Journal of Biology*; 2008, 32 (4), 181-192.
- [18] Prokonenko, S.A; Tuzlaci, E; Flavonoids and triterpenoids from *Salvia euphratica* and *Salvia longipedicellata*; *Phytotherapy*; 1990, 59(2), 117-140.
- [19] Yinrong, L C; L. Yeap Foo; Polyphenolics of *Salvia* – a Review; *Phytochemistry*; 2002, 59 (2), 117-140.
- [20] Badisa, R.B; Tzakou, M. O;. Couladis; E. Pilarinou; Cytotoxic Activities of *Salvia* Plants of the *Labiatae* Family; *Pharmaceut. Biol.*; 2004, 42 (8), 640-645.
- [21] Swain, T; Chemistry in evolution and systematics. Butterworth, Londres. 1973, 353-672.

- [22] Levin, DA; The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Ann. Rev. Ecol*; 1976, 7 (1), 121-159.
- [23] Cronquist A; On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms. *Plant. Syst Evol.*, Supl; 1977, 1, 179-189.
- [24] Ávalos García, A; Pérez-Urria Carril, E; Metabolismo secundario de plantas; Universidad complutense; *R. educa (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2009, 2 (3), 119-145.
- [25] Lincoln, T; Zeiger, E; Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant Physiology*; 4^o Edition; Sinauer Associates; 2006, cap13.
- [26] Goodwin TW; Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry; Academic Press; Londres; 1971.
- [27] R. Croteau, T. M; Kutchan, N. G ; Lewis. Natural Products (Secondary Metabolites). En: Buchanan, Grisse, Jones (editores). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists*. Rockville, Maryland, Estados Unidos. 2000. Capítulo 24.
- [28] Judd, W. S; Campbell, C. S; Kellogg, E. A; Stevens, P. F; Donoghue, M. J; Secondary Plant Compounds. *Plant systematics: a phylogenetic approach, Plant Systematics and Evolution*; 2002, 239(3-4), 292-294.
- [29] Yinrong Lu L; Yeap Foo; Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*; *Phytochemistry*; 2000, 55 (3), 263-267.
- [30] Cerpa Chávez, M G; Hidrodestilación de aceites esenciales, modelado y caracterización; Memoria, Doctorado en Ing. Química; Universidad de Valladolid; Valladolid España; 2007.
- [31] Cárdenas Melgarejo, C. Y; Duarte Rueda, S; Estudio del ciclo circadiano de la Carvona en las hojas de *Lippia alba* (Fam. *Verbenaceae*); Trabajo de pregrado; Universidad Industrial de Santander; Bucaramanga Colombia; 2007.
- [32] Reyes Barajas, J. A; Patiño Porras, J. G; Comparación de los metabolitos secundarios volátiles de dos especies de *Ocimum sp.* (Labiatae), en función del método de extracción y estudio de las actividades antioxidante, citotóxica y antifúngica; Trabajo de pregrado; Universidad Industrial de Santander; Bucaramanga Colombia; 2007.
- [33] Skoog, Douglas A; Holler F. James; Nieman Timothy A; Principios de análisis instrumental; 5^a Edición; Mc-Graw Hill; Madrid, España; 2003; Cap 29.

- [34] Chacon Quintero A; González N; Stashenko, E. E; Aceite esencial de hojas de *Hyptis umbrosa* salzm extraído por diferentes técnicas; Universidad Nacional Experimental de Táchira & Universidad Industrial de Santander; 2004;
- [35] Stashenko, E. E; Acosta, R; Martínez, J. R; High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.); *J. Biochem. Biophys. Methods*; 2000, 43 (1-3), 379–390.
- [36] Godefroot, M.; Sandra, P; Verzele, M; New method for quantitative Essentials oil analysis; *J. Chromatography.*, 1983, 203 (9), 325 – 335.
- [37] Gutiérrez, M. C; M. Droguet; La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. Identificación de compuestos volátiles por GC-MS; *Boletín Intexter (U.P.C)*; 2002, 122 (1), 35-41
- [38] Longaray Delamare, A. P; Moschen-Pistorello, I. T; Artico, L; Atti-Serafini, L; Echeverrigaray, S; Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil; *Food Chemistry*; 2007, 100 (2), 603-608.
- [39] Tepe, O. Eminagaoglu, H.A. Akpulat and E. Aydin; Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Bentham) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey; *Bioresource Technology*; 2008, 99 (6), 1584-1588.
- [40] Bektas Tepe, Munevver Sokmen, H. Askin Akpulat, Atalay Sokmen; Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey; *Food Chemistry*; 2006, 95 (2), 200-204.
- [41] Mustafa Kelen, Bektas Tepe; Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora; *Bioresource Technology*; 2008, 99 (10), 4096-4104.
- [42] Fatemeh Nejad; Habibvash, Mohammad Ali Ramajand; Reza Heidari, Siavash hosseini Sarghein; Mahnaz Heidari R; Chemical analysis of some *Salvia* species native to west azarbaijan (iran); Departmen of biology, Faculty of science, Urmia University; Urmia West Azarbaijan Iran; *Pakistan Journal of Biological Sciences*; 2007, 10 (20), 3516-3524.
- [43] LU, Y; FOO, L. Y; Polyphenolics of *Salvia* – a review, *Phytochemistry*; 2002, 55 (2000), 263–267.
- [44] Regina Karousou, Despina Vokou, Stella Kokkini ; Distribution and essential oils of *Salvia pomifera* subsp. pomifera (Labiatae) on the island of Crete (S Greece); *Biochemical Systematics and Ecology*; 1998, 26 (8), 889-897.

- [45] Li Min-hui, Chen Jian-min, Peng Yong, Xiao Pei-gen; Distribution of Phenolic Acids in Chinese *Salvia* Plants; *World Science and Technology*; 2008, 10 (5), 46-52.
- [46] G. N. Farhat, N. I. Affara, H. U. Gali-Muhtasib; Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of East Mediterranean sage (*Salvia libanotica*) and its toxicity in mice; *Toxicol*; 2001, 39 (10), 1601-1605
- [47] ADAMS. Robert P; Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry; 4^a Ed; Carol Stream, IL, 2007.
- [48] N. W. DAVIES; Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases; Review; *J. Chromatography.*, 1990, 503 (1), 1-24.
- [49] Mouna Ben Taarit, Kamel Msaada, Karim Hosni, Brahim Marzouk; Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress; *Food Chemistry*; 2010, 119 (3), 951-956.
- [50] Felice, S; Nelly Apostolides, A; Franco, P; Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon; *Journal of Chromatography*; 2004, 1052 (1-2), 15, 237-240.
- [51] G.P.P. Kamatoua; R.L. Van Zyla, S.F; Van Vuurena, A.C; Figueiredob, J.G; Barrosob, L.G; Pedrob, A.M; Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* species; *South African Journal of Botany*; 2008, 74 (2), 230-237.
- [52] Qian Liang, Zong-Suo Liang, Jun-Ru Wang, Wen-Hui Xu; Essential oil composition of *Salvia miltiorrhiza* flower; *Food Chemistry*; 2009, 113 (2), 592-594.
- [53] Ming-Jaw Don; Chien-Chang Shen; Wan-Jr Syu; Yi-Huei Ding; Chang-Ming Sun; Cytotoxic and aromatic constituents from *Salvia miltiorrhiza*; *Phytochemistry*; 2006, 67 (5), 497-503.
- [54] Yadollah Yaminia; Mostafa Khajehb; Ensieh Ghasemia; Mehdi Mirzac; Katayon Javidnia; Comparison of essential oil compositions of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods; *Food Chemistry*; 2008, 108 (1), 341-346.
- [55] Felice Senatore, Nelly Apostolides Arnold, Franco Piozzi, Carmen Formisano; Chemical composition of the essential oil of *Salvia microstegia* Boiss. et Balansa growing wild in Lebanon; *Journal of Chromatography A*; 2006,1108 (2), 276-278.
- [56] Guido, F; Pier, L C; Ivano Morelli, A B; Essential oils of the aerial parts of three *Salvia* species from Jordan: *Salvia lanigera*, *S. spinosa* and *S. syriaca*; *Food Chemistry*; 2007, 100 (2), 732-735.

- [57] Ozek, G; Demirci, F; Ozek, T; Tabanca, N; Wedge, D. E; Khan, S. I; Bařer, K. H; Duran, A; Hamzaoglu, E; Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity; *Journal of Chromatography A*; 2010, 1217 (5), 741-748.
- [58] Bektas Tepe; Erol Donmeza; Mehmet Unlub; Ferda Candanc; Dimitra Dafererad; Gülhan Vardar-Unlub; Moschos Polissioud; Atalay Sokmen; Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl); *Food Chemistry*; 2004, 84 (4), 519-525.
- [59] Recep Kotan; Memis Kesdeka; Yusuf Kayac; Hamdullah Kilic; Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth; *Biochemical Systematics and Ecology*; 2008, 36 (5-6), 360-368.
- [60] İbrahim Kivrak; Mehmet Emin Duru; Mehmet Öztürk; Nazime Mercan; Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*; *Food Chemistry*; 2009, 116 (2), 470-479.
- [61] Bektas, T; Dimitra Dafererab; Atalay Sokmena; Munevver Sokmenc; Moschos Polissiou; Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (*Lamiaceae*); *Food Chemistry*; 2005, 90 (3), 333-340.
- [62] Theo M. Malingré, Henk Maarse; Composition of the essential oil of *Mentha aquatica*; *Phytochemistry*; 1974, 13 (8), 1531-1535.
- [63] Montiel, J; Mesa Arango, A. C; Durán García, D. C; Bueno, J. G; Betancur Galvis, L. A; Stashenko, E. E; Evaluación de la actividad anti-candida y anti-aspergillus de aceites esenciales de *Lippia alba* (miller) n.e brown quimiotipo carvonalimoneno y su asociación con sus componentes mayoritarios; *Scientia et Technica*; 2007, Año XIII, 33, 243- 245.
- [64] Pedro N; Bailac, A; Dellacasa, D; Composicion del aceite esencial y actividad antimicrobiana de *Eupatorium patens*; *Bol. Soc. Chil. Quím*; 2000, 45 (2), 207–221.
- [65] Cristina,R. T; J. Cosoroabă, Alexandra Trif, D. Pârvu, Nicoleta Hădărugă, Eugenia Dumitrescu, Diana Argherie, Corina Costesc; Investigation on cypress spurge (*Euphorbia cyparissias* L.) and its activity in the veterinary therapeutics; *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*; 2008, 65 (1), 359 – 363.
- [66] Chang HT, Cheng YH, Wu CL, Chang ST, Chang TT, Su YC; Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. formosana Florin leaf against plant pathogenic fungi. School of Forestry and

Resource Conservation, National Taiwan University; *Bioresour Technol*; 2008, 99 (62), 66-70.

[67] Beraca launches range of rainforest-sourced actives; Jun/2005; <http://www.cosmeticsdesign-europe.com/Formulation-Science/Beraca-launches-range-of-rainforest-sourced-actives>

[68] Castañeda. M. Muñoz, A; Martínez, J. R; Stashenko, E. E; Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas Colombianas; *Scientia et Technica*; 2007, Año XIII, 33, 165-166.

[69] J.P. Mevy, J.M. Bessiere, M. Dherbomez, J. Millogo, J. Viano; Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke; *Food Chemistry*; 2007, 101 (2), 682-685.

[70] D. Runyoro, O. O. Ngassapaa, K; Vagionasb, N; Aligiannisb, K; Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania; *Food Chemistry*; 2010, 119 (1-1), 311-316.

[71] Mehdi Rahimmalek; Badraddin Ebrahim; Sayed Tabatabaeib; Nematolah Etemadic; Sayed Amir Hossein Golid; Ahmad Arzania; Hossein Zeinail; Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions Industrial; *Crops and Products*; 2009, 29 (3), 348-355.

[72] Vasiliki Saroglou; Petar Marin; Ana Rancic; Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species; from Serbia; *Biochemical Systematics and Ecology*; 2007, 35 (3), 146-152.

[73] Milosavljević S; Tesević V; Vucković I; Jadranin M; Composition and antifungal activity of the essential oil of *Seseli annuum* wild-growing in Serbia; *Fitoteraphy*; 2007, 78 (4), 319-322.

[74] F. Şahin, M. Güllüce; Dafererad, A; Sökmene, M; Sökmenf, M; Polissioud, G; Agarc H; Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey; *Food Control*; 2004, 15 (7), 549-557.

[75] Danute Mockute, Genovaite Bernotiene, Asta Judzentiene; The β -ocimene chemotype of essential oils of the inflorescences and the leaves with stems from *Origanum vulgare* ssp. vulgare growing wild in Lithuania; *Biochemical Systematics and Ecology*; 2003, 1 (3), 269-278.

[76] Sarah Picaud, Maria Brodelius, Peter E. Brodelius; Expression, purification and characterization of recombinant (E)- β -farnesene synthase from *Artemisia annua*; *Phytochemistry*; 2005, 66 (9), 961-967.

- [77] Bektas Tepe, Munevver Sokmen, H. Askin Akpulat, Dimitra Daferera, Moschos Polissiou, Atalay Sokmen; Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*; *Journal of Food Engineering*; 2005, 66 (4), 447-454.
- [78] Betül Demirci; Masao Toyotab ; Fatih Demircia ; Mehmet Y ; Dadandic K ; Hüsnü Can Baser ; Anticandidal pimaradiene diterpene from *Phlomis* essential oils; *Comptes Rendus Chimie*; 2009, 12 (5), 612-621.
- [79] Claudia Giuliani, Roberto Pellegrino, Bruno Tirillini, Laura Maleci Bini; Micromorphological and chemical characterisation of *Stachys recta* L. subsp. *serpentini* (Fiori) Arrigoni in comparison to *Stachys recta* L. subsp. *recta* (Lamiaceae) ; *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*; 2008, 203 (5), 376-385.
- [80] Jolita Radusiene, Asta Judzentiene, Genovaite Bernotiene ; Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania; *Biochemical Systematics and Ecology*; 2005, 33 (2), 113-124.
- [81] Yoshihara, K; O. Yoshimoto, T. Sakai; Y. Hirose; Germacrene D, a key intermediate of cadinene group compounds and bourbonenes; *Tetrahedron Letters*; 1969, 10(27), 2263-2264.
- [82] Ricciardi, Gabriela A. L; Examen de los Aceites Esenciales de Especies de *Aloysia* (*Verbenaceae*) del Nordeste; Lab. Dr. Gustavo A. Fester, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura - U.N.N.E; Corrientes – Argentina; 1999.
- [83] Birkett M. A; Abassi S. A; Kröber T; Chamberlain K; Antiectoparasitic activity of the gum resin, gum haggar, from the East African plant, *Commiphora Holtziana*; *Phytochemistry*; 2008, 69 (8) 1710-1715.
- [84] Saïdana, D; Mahjoub, M. A; Boussaada, O; Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae) *Microbiological Research*; 2008, 163 (4), 445-455.
- [85] Jiménez Medina, D; Cordero Gallardo, A; Rojas, L; Rodríguez Arredondo, M; Estudio de los componentes volátiles de las hojas y flores de *Magnolia grandiflora* L., que crece en el Estado Mérida, Venezuela; *Rev Fac Farma*; 2007, 49 (1), 2-4.
- [86] K. Yoshihara; Y. Hirose; Terpenes from *Aralia* species; *Phytochemistry*; 1973, 12 (2), 468-469.
- [87] Ulrike, Volker S, Karl-Heinz K; The essential oil composition of fruits from *Smyrniium perfoliatum*; *Phytochemistry*; 1998, 47 (6), 1079-1083.

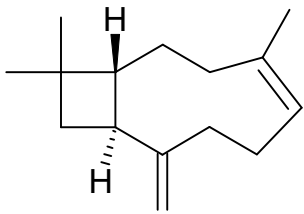
- [88] M. Maffei, M. Mucciarelli, S. Scannerini; Essential oils from *Achillea* species of different geographic origin; *Biochemical Systematics and Ecology*; 1994, 22 (7), 679-687.
- [89] Abdolrasoul H. Ebrahimabadi; Ebrahim H; Ebrahimabadia, Zahra; Djafari-Bidgolia; Fereshteh Jookar Kashia; Asma Mazoochia; Hossein Batoolib; Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata Benth* from Iran; *Food Chemistry*; 2010, 119 (2), 452-458.
- [90] Ahmet Cakir, Saban Kordali, Hamdullah Kilic, Ercan Kaya; Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides*; *Biochemical Systematics and Ecology*; 2005, 33 (3), 245-256.
- [91] Queiroz Santos. D; Potencial herbicida e caracterização química do extrato metanólico da raiz e caule do *Cenchrus echinatus* (TIMBETE); Electronic Thesis or Dissertation - Tese ou Dissertacao Eletronica; 2008.
- [92] Chang, S T; Chen, P F : Wang, S Y : Wu, H H; Antimite activity of essential oils and their constituents from *Taiwania cryptomerioides*; *Journal of Medical Entomology*; 2001, 38 (3), 455-7.
- [93] Alejandro M Urzúa; Gastón J Sotes; Essential oil composition of *Aristolochia chilensis* a host plant of *battus polydamas*; *Journal of the Chilean Chemical Society*; 2008, 53 (1), 1372-1374.
- [94] <http://spanish.alibaba.com/product-gs/bisabolol-natural-252279480.html>
CITED: marzo 30 de 2010
- [95] Marlene Brey, Jane Fournier; The Structure of the Crystalline Cadinol from Citronella Oil; Milton D. Soffer; *Journal of the American Chemical Society*; 1959, 81 (7), 1678–1680.
- [96] N, Demirci B, Crockett SL, Başer KH, Wedge DE ; Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. USDA, ARS, NPURU, National Center for Natural Products Research, the University of Mississippi; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 2007, 55 (84), 30-35.
- [97] Jean-François Rontani, Patricia C. Bonin; Aerobic bacterial metabolism of phytol in seawater: effect of particle association on an abiotic intermediate step and its biogeochemical consequences; *Organic Geochemistry*; 2000, 31 (6), 489-496.
- [98] W. J. pudelkiewicz, G. olson, L. D. matterson, andjoan R. Saden; Influence of Dietary Phytol, Isophytol, and Squalene on the Tocopherol Content of Liver Tissue; Poultry Science Department, Starrs Agricultural Experiment Station, University of Connecticut, Starrs, Connecticut; 2010, 111-114.

- [99] Kenneth D. Massey, Karen P. Burton; Free radical damage in neonatal rat cardiac myocyte cultures: Effects of α -Tocopherol, Trolox, and Phytol; *Free Radical Biology and Medicine*; 1990, 8 (5), 449-458.
- [100] Muralidharan Florentina N., Muralidharan V.B.; In vitro conversion of Phytol to phytanic acid in rat liver: subcellular distribution of activity and chemical characterization of intermediates using a new bromination technique; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*; 1985, 835 (1), 36-40.
- [101] Dharmendra Saikia, A; Swati Parihar, A. D; Chanda, A. S; Ojha, A. J.K; Kumar, A; Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of Phytol; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 2010, 20 (2), 508-512.
- [102] Robinson T; The biochemistry of alkaloids; 2^o ed; Springer, Nueva York, 1981.
- [103] Sandra Glisic; Jasna Ivanovica; Mihajlo Risticb; Dejan Skalaa; Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes; The Journal of Supercritical Fluids, In Press, *Corrected Proof*; 2010, 52 (1), 62-70.
- [104] Hudaib, M; Bellardi, MG; Rubies-Autonell, C; Fiori, J; Chromatographic (GC-MS, HPLC) and virological evaluations of *Salvia sclarea* infected by BBWV-I; *Farmaco*; 2003, 56 (3), 219-227.
- [105] Torres, A. M; Ricciardi, G. A; Camargo, F. J; Ricciardi, A. I; Dellacassa, E. S; Evaluación de la influencia del ambiente ecológico en la composición química del aceite esencial de *Aloysia citriodora Palau*; UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE Uruguay; Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006.
- [106] Per Claeson, Peter Rådström, Ola Sköld, Åsa Nilsson, Stefan Höglund; Bactericidal effect of the sesquiterpene T-cadinol on *Staphylococcus aureus*; *Phytotherapy Research*; 2006, 6 (2), 94 – 98.
- [107] Wang, Chi-Hsin Hsu, Chang-Feng Dai, Chang-Yih Duh; Novel sesquiterpenes and norergosterol from the soft corals *Nephthea erecta* and *Nephthea chabroli*; *Tetrahedron Letters* ; 2009, 50 (7), 802-806.
- [108] Genovaite Bernotiene; Ona Nivinskiene; Rita Butkiene; Danute Mockute; Essential oil composition variability in sage (*Salvia officinalis* L.); Institute of Chemistry; Lithuania; *Journal Chemijha*; 2007, 18 (4), 38-43. CITED: Marzo 10/2010

APÉNDICES

Apéndice A. *trans*-Cariofileno

Tabla 10. Información general del *trans*-cariofileno.

| <i>trans</i> -Cariofileno | |
|---------------------------------|--|
| Fórmula condensada: | Estructura molecular [47] |
| C ₁₅ H ₂₄ |  |
| Masa molecular: | |
| 204 g/mol | |

Es un sesquiterpeno también conocido como β -cariofileno, se encuentra presente en el AE de plantas como la menta [62], *Euphorbia cyparissias* y *Lippia alba* [63] que presentan actividad antimicrobiana contra *acillus subtilis* [64], entre otros, y antimicótica [63]; también es común encontrarlo como óxido u epóxido de cariofileno [65,66].

Se encuentra en medicamentos para el tratamiento de acné [67]. Actualmente la fuente natural de esta sustancia es la andiroba, planta amazónica que se cultiva en Brasil. También se encuentra como componente mayoritario en el AE de *Lippia origanoides* [68], quimiotipos de *Lippia chevalieri* [69], especies del genero *Ocimum* de la familia *Labiaceae* como *O. basilicum*, *O. kilimandscharicum*, *O. lamiifolium*, *O. suave* [70], especies del género *Achillea* [71] e *Hypericum* [72]. La presencia de este metabolito generalmente implica la presencia de germacreno-D [62,69-75], isómeros del cadineno [70-75] y α -cadinol [70-75]. Se encuentra en AE que presentan actividad antifúngica [66]. Algunas publicaciones sugieren que junto con el *trans*-muurola-4(14),5-dieno, γ -cadineno, y germacreno D pueden originarse en la misma ruta metabólica [9], sugiriendo como metabolito de partida el farnesil difosfato [76].

Apéndice B. *trans*-Muurola-3,5-dieno

Tabla 11. Información general sobre el *trans*-muurola-3,5-dieno

| <i>trans</i> -Muurola-3,5-dieno | |
|---------------------------------|---------------------------|
| Fórmula condensada: | Estructura molecular [47] |
| $C_{15}H_{24}$ | |
| Masa molecular: 204 g/mol | |

Es un sesquiterpeno poco común con respecto a su isómero *cis*-, se le encuentra en AE con actividad antioxidante [77]

Apéndice C. *trans*-Muurola-4(14),5-dieno

Tabla 12. Información general sobre el *trans*-muurola-4(14),5-dieno

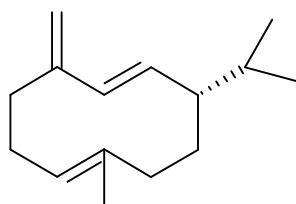
| <i>trans</i> -Muurola-4(14),5-dieno | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| Fórmula condensada: | Estructura molecular [47] |
| $C_{15}H_{24}$ | |
| Masa molecular: 204 g/mol | |

Es un sesquiterpeno que se encuentra presente en AE en los que coexiste con metabolitos como germacreno D, γ -cadineno, *trans*-cariofileno y *trans*-muurola-3,5-dieno [77]. Aunque es más común encontrar su isómero *cis*- [77-79].

Algunas publicaciones sugieren que junto con el *trans*-cariofileno, el γ -cadineno, y el germacreno D pueden originarse en la misma ruta metabólica [9], sugiriendo como metabolito de partida el farnesil difosfato [76]. En algunos AE que presentan actividad antioxidante y antibacteriana, el *trans*-muurolo-4(14),5-dieno se encuentra con metabolitos como germacreno D, γ -cadineno y α -cadinol [52]. Se encuentra en los AE de especies del género *Phlomis* [78] e *Hypericum* [80] coexistiendo con metabolitos como *trans*-cariofileno, germacreno D, *trans*-muurolo-4(14),5-dieno, γ -cadineno, α -cadinol y fitol.

Apéndice D. Germacreno D

Tabla 13. Información general sobre el germacreno D

| Germacreno D | |
|---------------------|--|
| Fórmula condensada: | Estructura molecular [47] |
| $C_{15}H_{24}$ |  |
| Masa molecular: | |
| 204 g/mol | |

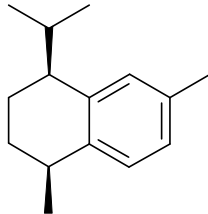
Es un sesquiterpeno utilizado como precursor de sustancias como el cadineno y otras de interés farmacológico [81]. La presencia del germacreno D permite pensar en una actividad tóxica cuya estructura da origen, por oxidación, a una serie de compuestos de tipo lactónico que producen reacciones citotóxicas o alérgicas en la piel [82]. Estudios han demostrado la acción antiparasitaria [83], antifúngica, antimicrobiana [84], analgésica y tóxica [85] de AE en los cuales se encuentra el germacreno-D como componente mayoritario.

Algunas fuentes naturales relevantes de esta sustancia son la *Aralia* [86], *Smyrniium perfoliatum* [87], la menta [62], la *Lippia alba*, quimiotipo citral, en donde

el germacreno D es el componente mayoritario [63], *Lippia organiodes* [68], quimiotipos de *Lippia chevalieri* [69] y varias especies del genero *Ocimum* de la familia *Labiaceae* como *O. basilicum*, *O. kilimandscharicum*, *O. lamiifolium*, *O. suave* [70] y especies del genero *Achillea* [88,89] e *Hypericum* [72]. Algunas publicaciones sugieren que junto con el *trans*-muurola-4(14),5-dieno, el γ -cadineno, y el *trans*-cariofileno pueden originarse en la misma ruta metabólica [9], sugiriendo como metabolito de partida el farnesil difosfato [76]. En algunos AE que presentan actividad antioxidante y antibacterial, el germacreno D se encuentra con metabòlitos como *trans*-muurola-4(14),5-dineno, γ -cadineno y α -cadinol [89].

Apéndice E. γ -Cadineno

Tabla 14. Información general sobre el γ -cadineno

| γ -Cadineno | |
|------------------------------|--|
| Fórmula condensada: | Estructura molecular [47] |
| $C_{15}H_{24}$ |  |
| Masa molecular: 204 g/mol | |

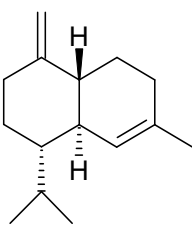
La presencia de este sesquiterpeno sugiere la presencia de otros como germacreno-D [62,69,71-75,90], *trans*-cariofileno [70-75,90] y α -cadinol [70-75,90]. Algunas publicaciones sugieren que junto con el *trans*-muurola-4(14),5-dieno, el germacreno D, y el *trans*-cariofileno pueden originarse en la misma ruta metabólica [9], sugiriendo como metabolito de partida el farnesil difosfato [76].

Se encuentra presente en AE con actividad antimicrobial [70,72] y antifúngica [90]. En algunos AE que presentan actividad antioxidante y antibacterial, el γ -cadineno

se encuentra con metabolitos como germacreno D, α -cadinol y *trans*-muurola-4(14),5-dieno [89].

Apéndice F. *trans*-Calamineno

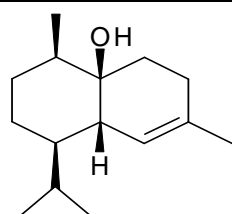
Tabla 15. Información general sobre el *trans*-calamineno

| <i>trans</i> -Calamineno | |
|---------------------------------|---|
| Fórmula condensada: | Estructura molecular [47] |
| C ₁₅ H ₂₄ |  |
| Masa molecular: 204 g/mol | |

Sesquiterpeno que se encuentra presente en AE con actividad antiinflamatoria y antibacterial [79] contra *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048), *Serratia marcescens* (ATCC25419), *Salmonella enteritidis* (ATCC13076), *Yersinia enterocolitica* (ATCC23715) y *Shigella sonnei* (ATCC11060).

Apéndice G. 1,10-di-*epi*-Cubenol

Tabla 16. Información general sobre el 1,10-di-*epi*-cubenol

| 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol | |
|-----------------------------------|--|
| Fórmula condensada: | Estructura molecular [47] |
| C ₁₅ H ₂₆ O |  |
| Masa molecular: 222 g/mol | |

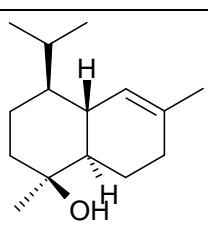
Se encuentra que el extracto metanólico de raíz de *Caule* (TIMBETE) es usado como herbicida natural [91], y contiene germacreno D, γ -cadineno, 1,10,di-*epi*-cubenol, *epi*- α -cadinol. Estos metabolitos se encuentran presentes en el AE y extracto de la *Salvia aratocensis*, lo que permite pensar que el AE de la *Salvia aratocensis* puede ser utilizado como un herbicida natural.

Es uno de los estereoisómeros del cubenol, junto con compuestos como 1-*epi*-cubenol, 10-*epi*-cubenol, α -cubenol, *epi*- α -cubenol, 1-cubenol y *epi*- β -cubenol, los cuales se encuentran frecuentemente en AE que presentan actividad antioxidante [7,50] y antimicrobiana [7,49,50,59,60], de donde se les asocia capacidad antirradicalaria.

Algunos estereoisómeros del cariofileno y el cadineno se han reportado junto con 10-*epi*-cubenol, α -cubenol, *epi*- α -cubenol y 1-cubenol en los AE de *Ocimum tenuiflorum*, *Ocimum gratissimu* y *Piper auritum*, que presentan actividad antidermatofílica [70].

Apéndice H. *epi*- α -Cadinol

Tabla 17. Información general sobre el *epi*- α -cadinol

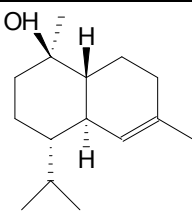
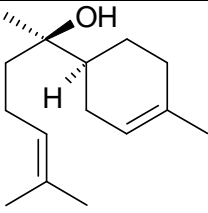
| <i>epi</i> - α -Cadinol | |
|-----------------------------------|--|
| Fórmula condensada: | Estructura molecular [47] |
| C ₁₅ H ₂₆ O |  |
| Masa molecular: 222 g/mol | |

Se encuentra presente en AE con propiedades herbicidas [91] y por lo general su presencia indica la coexistencia de metabolitos como germacreno D, γ -cadineno,

1,10,di-epi-cubenol, α -cadinol y *trans*-cariofileno [92]. Es mucho más frecuente encontrar el isómero tau-cadinol.

Apéndice I. α -Cadinol

Tabla 18. Información general sobre el α -cadinol

| α -Cadinol | |
|---|--|
| Fórmula condensada: | Estructura molecular [47] |
| $C_{15}H_{26}O$ |  |
| Masa molecular: 222 g/mol | |
| <p>Suele encontrarse en compañía de metabolitos como el γ-cadineno, germacreno-D y el <i>trans</i>-cariofileno [91,93]. Se encuentra presente en AE con actividad acaricida [92] y antifúngica [66]. Estudios previos con este metabolito han demostrado actividad antibacteriana de este compuesto [94]. Se encuentra en el AE de citronella [95].</p> <p>En algunos AE que presentan actividad antioxidante y antibacterial, el α-cadinol se encuentra con metabolitos como germacreno D, γ-cadineno y <i>trans</i>-muurola-4(14),5-dieno [89].</p> | |
| α -Bisabolol | |
| Fórmula condensada: | Estructura molecular [47] |
| $C_{15}H_{26}O$ |  |
| Masa molecular: 222 g/mol | |

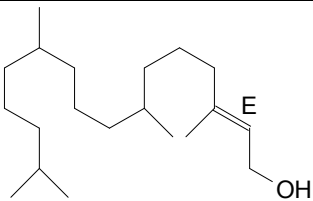
Apéndice J. α -Bisabolol

Tabla 19. Información general sobre el α -bisabolol

Es un sesquiterpeno floral ópticamente activo. Es el activo principal del AE de la flor de manzanilla, reconocido por sus propiedades antiinflamatoria, antimalárica [96], antimicrobiana y antimicótica [97]. Su acción suavizante y emoliente hace que sea fácilmente tolerable por todas las pieles, de donde derivan sus aplicaciones en la industria cosmética como: Productos para la protección solar, preparaciones para después de sol, productos para bebé y del cuidado de niños, acondicionadores del pelo y aftershaves, productos para después de la depilación, preparaciones de la protección de piel y del cuidado de piel (lociones y ungüentos) etc. Comercialmente se encuentran preparados con un 95% de contenido del principio activo [78].

Apéndice K. Fitol

Tabla 20. Información general sobre el fitol

| Fitol | |
|-----------------------------------|--|
| Fórmula condensada: | Estructura molecular [47] |
| C ₂₀ H ₄₀ O |  |
| Masa molecular: 296 g/mol | |

Es un diterpeno [24] alcohólico floral. Se cataloga como un precursor de las vitaminas E y K1 [98]. Este metabolito se encuentra involucrado en la biosíntesis de la clorofila [97] en las especies vegetales. Se utiliza en la obtención de ácido fitánico. Se ha utilizado en estudios sobre capacidad antirradicalaria [99,100] junto con compuestos de referencia como α -Tocoferol y Trolox®.

Estructuras análogas al fitol presentan actividad antituberculosa [101].