

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HERNANDULCINA
EN EL EXTRACTO DE *Lippia dulcis* TREVIR., OBTENIDO POR EXTRACCIÓN
CON FLUIDO SUPERCRÍTICO**

FRANCI NATHALIE GÓMEZ JAIMES

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

2012

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HERNANDULCINA
EN EL EXTRACTO DE *Lippia dulcis* TREVIR., OBTENIDO POR EXTRACCIÓN
CON FLUIDO SUPERCRÍTICO**

FRANCI NATHALIE GÓMEZ JAIMES

Tesis de grado para optar al título de
Química

Directores

**ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.
JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2012**

La pasión tiñe con sus propios colores todo lo que toca.

Baltasar Gracián

DEDICATORIA

A quien debo todo lo que soy y a quien amo
por encima de todos los amores:
Lorena, mi madre.

A ti, que no quisiste soñar mil veces las mismas cosas,
ni contemplarlas sabiamente.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Álvaro Gómez y Lorena Jaimes, por brindarme todo su amor y apoyo, por educarme con paciencia y perseverancia.

A los Doctores Elena Stashenko y Jairo René Martínez, por transmitirnos sus conocimientos, por fomentar la constancia como parte fundamental de la investigación científica, y por permitirme formar parte del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM.

Especialmente al Químico, MSc Arvind Kumar, investigador del Instituto de Recursos Forestales de Dehradun (India), quien nos acompañó y contribuyó con su conocimiento en el desarrollo de esta investigación.

A todos los integrantes del Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, especialmente a Andrés González, por su incondicionalidad.

A mis compañeros y amigos, Diana Manrique, Verónica Chaparro, Laura Castellanos, Sergio Guerrero, Eduardo Ravelo, Andrés Ramírez, David Jaimes, Marcela Domínguez, Yuri Córdoba, Corina Bernal, Julián Arias, Laura Castrillón, Carlos Ruiz, Néstor Marín y Vanessa Díaz, por acompañarme con risas y momentos de alegría durante este camino.

Al Ingeniero Edwin Ramírez, por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	23
1 MARCO DE ANTECEDENTES	28
1.1 TEORÍA MOLECULAR DEL SABOR DULCE	28
1.1.1 Teoría AH-B.	28
1.1.2 Teoría AH-B, X.	29
1.1.3 Teoría MPA.	30
1.2 <i>Lippia dulcis</i> TREVIR.	30
1.2.1 Composición química de la planta.	35
1.3 METABOLISMO SECUNDARIO VEGETAL	37
1.3.1 Aceites esenciales.	38
1.3.2 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.	39
1.3.3 Extractos.	40
1.3.4 Extracción con fluido supercrítico.	40
1.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS	41
1.5 ANÁLISIS INSTRUMENTAL	42
1.5.1 Cromatografía de gases.	42

1.5.2	Cromatografía de gases - espectrometría de masas.	43
1.5.3	Identificación confirmatoria de un compuesto orgánico.	44
1.6	DERIVACIÓN QUÍMICA	44
1.6.1	Reacción de sililación.	45
1.7	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	46
1.7.1	Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC).	46
1.7.2	Ensayo de decoloración del catión radical ABTS ⁺ .	48
2	CIENCIOMETRÍA	50
3	DESARROLLO EXPERIMENTAL	54
3.1	RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	54
3.2	TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	54
3.3	OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	55
3.4	EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO	57
3.5	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	58
3.5.1	Análisis por GC-MS. Columna apolar.	59
3.5.3	Sistema de adquisición de datos.	61
3.5.4	Identificación.	61
3.5.5	Cuantificación.	62
3.6	AISLAMIENTO DE LA HERNANDULCINA	64

3.6.1	Selección de las condiciones de elución y de revelado.	64
3.6.2	Cromatografía en columna.	64
3.6.3	Caracterización química del compuesto.	64
3.7	CUANTIFICACIÓN DE LA HERNANDULCINA	66
3.8	DERIVACIÓN QUÍMICA	68
3.8.1	Derivación de la hernandulcina.	68
3.8.2	Derivación del AE y el extracto.	69
3.9	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTI-RADICALARIA	69
3.9.1	Capacidad de absorción de radicales libre de oxígeno ORAC.	70
3.9.2	Ensayo de decoloración del catión radical ABTS ⁺ .	71
4	ANÁLISIS DE RESULTADOS	73
4.1	IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE	73
4.2	SECADO DEL MATERIAL VEGETAL	74
4.3	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE Y DEL EXTRACTO DE <i>Lippia dulcis</i> TREVIR.	75
4.4	AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LA HERNANDULCINA	81
4.4.1	Análisis por GC-MS.	83
4.4.2	Análisis por HPLC-DAD.	86
4.4.3	Análisis por espectroscopía UV-vis.	87

4.4.4	Análisis por espectroscopía de infrarrojo.	89
4.4.5	Análisis por Resonancia Magnética Nuclear.	90
4.5	CUANTIFICACIÓN DE LA HERNANDULCINA	98
4.6	DERIVACIÓN QUÍMICA	101
4.7	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	108
5	CONCLUSIONES	114
6	RECOMENDACIONES	116
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Variación de la composición química de los metabolitos secundarios de <i>L. dulcis</i> , según su ubicación geográfica.	36
Tabla 2. Condiciones del proceso de extracción SFE.	58
Tabla 3. Identificación taxonómica de <i>Lippia dulcis</i> Trevir. Tomado de [25].	73
Tabla 4. Identificación, cantidad relativa (%) y algunas notas odoríferas de los componentes principales del AE y del extracto de <i>Lippia dulcis</i> Trevir.	77
Tabla 5. Análisis por HPLC-DAD de la hernandulcina aislada.	87
Tabla 6. Grupos funcionales cromóforos presentes en la hernandulcina y su valor de absorbancia teórico, según Woodward [80].	88
Tabla 7. Valores de λ , LOD y LOQ, obtenidos por HPLC-DAD de la hernandulcina.	100
Tabla 8. Concentración de la hernandulcina en el AE y en el extracto de <i>L. dulcis</i> .	100
Tabla 9. Valores de TAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia), para la hernandulcina, AE y extracto de <i>L. dulcis</i> , obtenidos por los métodos ORAC, ABTS ⁺ .	110

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Modelo AH-B de la teoría molecular del sabor dulce. Con base en [2]	29
Figura 2. Modelo AH-B, X de la teoría molecular del sabor dulce. Con base en [3]	30
Figura 3. <i>Lippia dulcis</i> Trevir. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM. Fecha: septiembre de 2012.	31
Figura 4. Estructuras químicas de A. Hernandulcina y B. Su epímero, la <i>epi</i> -hernandulcina [15].	33
Figura 5. Reacción de descomposición térmica de la hernandulcina en A. 3-Metil-2-ciclohexen-1-ona y B. 6-Metil-5-hepten-2-ona [15].	33
Figura 6. Estructura química del producto de biotransformación de la hernandulcina, llamado 'Metabolito 1' [17].	34
Figura 7. Estructura química de la 4 β -hidroxihernandulcina [23].	35
Figura 8. Reacción general del proceso de sililación. Tomado de [25].	45
Figura 9. Estructuras químicas de: A. Fluoresceína; B. Radical AAPH.	47
Figura 10. Estructuras químicas: A. Trolox® y B. Vitamina E.	48

Figura 11. Generación del catión-radical ABTS+•. 49

Figura 12. Relación de los años y el número de publicaciones sobre *Lippia dulcis* y hernandulcina. Base de datos: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 1980-2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY “*Lippia dulcis*”, “hernandulcin”. Fecha de consulta: septiembre de 2012. 51

Figura 13. Relación del área de estudio y el número de publicaciones sobre *Lippia dulcis*. Base de datos: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 1980-2012. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (*Lippia dulcis*). Fecha de consulta: septiembre de 2012. 52

Figura 14. Relación del área de estudio y el número de publicaciones sobre la hernandulcina. Base de datos: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 1980-2012. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (hernandulcin). Fecha de consulta: septiembre de 2012. 53

Figura 15. Montaje MWHD. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Antoine Lavoisier, CENIVAM, UIS. Fecha: Abril del 2012. 56

Figura 16. Equipo de extracción con fluido supercrítico *Thar SFE-2000*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: octubre de 2012. 57

Figura 17. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network GC System*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CENIVAM, UIS. Fecha: junio de 2012. 60

Figura 18. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890A GC System*. Fotografía tomada por La autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CENIVM, UIS. Fecha: junio de 2012. 60

- Figura 19.** Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890A Network GC System*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CENIVAM, UIS. Fecha: junio de 2012. 63
- Figura 20.** Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent 1200 Series*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CENIVAM, UIS. Fecha: junio de 2012. 66
- Figura 21.** Equipo lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Fichas técnicas, CENIVAM, UIS. Fecha: junio de 2012. 70
- Figura 22.** Curva de secado a temperatura ambiente para *Lippia dulcis* Trevir. 74
- Figura 23.** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS de los metabolitos secundarios aislados de: **A.** AE y **B.** Extracto de *Lippia dulcis* Trevir. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). 76
- Figura 24.** Clasificación por familias de compuestos químicos presentes en el AE y en el extracto de *L. dulcis*. **HC:** Hidrocarburos producto de descomposición de la hernandulcina. **MT:** Monoterpenos. **MO:** Monoterpenos oxigenados. **HS:** Hidrocarburos sesquiterpénicos. **SO:** Sesquiterpenos oxigenados. 78
- Figura 25.** Estructuras químicas de los componentes mayoritarios del AE y extracto de *L. dulcis* Trevir. 79
- Figura 26.** Principales rutas metabólicas de *L. dulcis*. Generación de estructuras químicas tipo bisaboleno. 81

Figura 27. Sistemas de disolventes de elución evaluados en el extracto SFE de <i>L. dulcis</i> , para el aislamiento de la hernandulcina por CC y TLC. Revelado: Solución de H ₂ SO ₄ al 5%.	82
Figura 28. Placa cromatográfica del extracto y de la hernandulcina aislada, bajo tres sistemas de revelado: A. Solución de H ₂ SO ₄ al 5%; B. Vapor de yodo, I ₂ y C. Luz ultravioleta, λ = 366 nm.	82
Figura 29. Perfil cromatográfico por GC-MS de la hernandulcina. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30, MSD (EI, 70 eV).	83
Figura 30. Espectro de masas (EI, 70 eV) de la 6-metil-5-hepten-2-ona.	84
Figura 31. Principales rutas de fragmentación de la 6-metil-5-hepten-2-ona.	84
Figura 32. Espectro de masas (EI, 70 eV) de la 3-metil-2-ciclohexen-1-ona.	85
Figura 33. Principales rutas de fragmentación de la 3-metil-2-ciclohexen-1-ona.	86
Figura 34. Perfil cromatográfico por HPLC-DAD y espectro UV-Vis de la hernandulcina aislada.	87
Figura 35. Espectro infrarrojo experimental de la hernandulcina.	89
Figura 36. Espectro de RMN- ¹ H de la hernandulcina.	91
Figura 37. Configuración estereoquímica de la hernandulcina en C-6.	92
Figura 38. Experimento de RMN de acoplamiento homonuclear ¹ H- ¹ H-COSY.	94

Figura 39. Experimento de RMN de acoplamiento heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC.	95
Figura 40. Superposición de los experimentos de RMN C^{13} y DEPT-135°.	96
Figura 41. Experimento de RMN de acoplamiento heteronuclear HMBC ^1H - ^{13}C .	97
Figura 42. Cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD ($\lambda_{\text{máx}} = 236 \text{ nm}$) de: A. Hernandulcina aislada (patrón de referencia); B. AE y C. Extracto SFE de <i>L. dulcis</i> .	98
Figura 43. Curva de calibración de la hernandulcina.	99
Figura 44. Reacción de sililación de la hernandulcina.	101
Figura 45. Espectro IR de la masa de reacción de sililación de la hernandulcina.	102
Figura 46. Cromatograma de la masa de reacción de sililación de la hernandulcina.	103
Figura 47. Espectro de masas de la TMS-hernandulcina, $t_{\text{R}} = 50,1 \text{ min}$.	104
Figura 48. Posibles rutas de fragmentación y formación de iones característicos en el espectro de masas de la TMS-hernandulcina.	105
Figura 49. Perfiles cromatográficos de la reacción de sililación de A. AE y B. Extracto SFE de <i>Lippia dulcis</i> .	107
Figura 50. Ampliación de la Figura 50 (B), en $t_{\text{R}} = 50,01 \text{ min}$, correspondiente al producto de sililación del extracto de la planta.	108

- Figura 51.** Curva de calibración del Trolox[®] para el ensayo ORAC. 109
- Figura 52.** Curva de calibración del Trolox[®] para el ensayo ORAC. 109
- Figura 53.** Modelo de Foti e Ingold [82] para la actividad antioxidante de γ -terpineno. 111
- Figura 54.** Mecanismo propuesto, con base en el modelo de Foti e Ingold [82], para explicar la actividad antioxidante de la hernandulcina, por el método ORAC: **A.** Mecanismo que describe la actividad antioxidante de la hernandulcina en presencia de especies oxidantes (ROO[•]) y **B.** Estabilización de la especie **la** por efectos de resonancia. 113

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ABC	Área bajo la curva
AE	Aceite esencial
AO	Antioxidante
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
BSA	<i>Bis</i> -sililacetamida
BSTFA	<i>N,O-bis</i> -(trimetilsililo)-trifluoroacetamida
Ca.	<i>Circa</i> (Alrededor de)
CC	<i>Column Chromatography</i> (Cromatografía en columna)
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> (Espectroscopía de correlación)
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos)
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (Mejora sin distorsión por transferencia de polarización)
<i>E.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
EI	<i>Electron Impact</i> (Impacto de electrón)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
FL	Fluoresceína
SF	Supercritical fluid (Fluido supercrítico)
GC	<i>Gas chromatography</i> (Cromatografía de gases)
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer Assay</i> (Transferencia de átomo de hidrógeno)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Correlación heteronuclear de múltiple enlace)
HMDS	Hexametildisiloxano
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> (Correlación

	heteronuclear de un cuanto)
IRL	Índice de Retención Lineal
<i>Istd</i>	<i>Internal standart</i> (Estándar interno)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección)
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Límite de cuantificación)
MPA	<i>Multi-Point Attachment</i> (Enlace multipunto)
MEP	<i>Methyl Erythritol Phosphate</i> (Fosfato de metil eritritol)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
MSD	<i>Mass selective detector</i> (Detector selectivo de masas)
MSTFA	<i>N</i> -metil-(trimetilsililo)-trifluoroacetamida
MTBSTFA	<i>N</i> -(<i>t</i> -butildimetilsililo)- <i>N</i> -metiltrifluoroacetamida
MWHD	<i>Microwave-assited Hidrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas)
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i> (Efecto nuclear Overhauser)
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno)
PDS	Persulfato de potasio
RDA	Retro Diels-Alder
R_f	<i>Retention factor</i> (Factor de retención)
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAR	<i>Structure-Activity Relationship</i> (Relación estructura-actividad)
SET	<i>Single Electron Transfer</i> (Transferencia de un solo electrón)
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
TAC	<i>Total Antioxidant Capacity</i> (Capacidad antioxidante total)
TBHQ	<i>Ter</i> -butil hidroquinona
TEAC	Trolox [®] <i>Equivalent Antioxidant Capacity</i> (Capacidad antioxidante equivalente en Trolox [®])
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía en capa fina)
TMS	Trimetilclorosilano

t_R

Tiempo de retención

RESUMEN:

TÍTULO: AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HERNANDULCINA EN EL EXTRACTO DE *Lippia dulcis* TREVIR., OBTENIDO POR EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO*

Autor: Franci Nathalie Gómez Jaimes**

Palabras clave: Hernandulcina, *Lippia dulcis*, extracto, fluido supercrítico.

Lippia dulcis Trevir., es una planta utilizada tradicionalmente para tratar afecciones respiratorias y digestivas; sin embargo, su principal atractivo es su sabor dulce, al ser la fuente de la hernandulcina, compuesto químico 1200 veces más dulce que la sacarosa. La constante investigación científica enfocada a la búsqueda de productos naturales, sucedáneos de los compuestos sintéticos, y el potencial de *L. dulcis* como edulcorante, motivó a realizar el aislamiento de la hernandulcina y su análisis químico.

Se obtuvieron el aceite esencial y extracto supercrítico de *Lippia dulcis*, por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y la extracción con fluido supercrítico (SFE), respectivamente. Los compuestos mayoritarios en el aceite y en el extracto, correspondieron al α -bisabolol, δ -cadineno, *trans*- β -cariofileno, biciclogermacreno y α -copaeno. La hernandulcina no fue detectada, debido a las condiciones analíticas. En vez de esto, se observaron sus productos de descomposición térmica: la 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona.

El aislamiento de la hernandulcina se realizó por cromatografía en columna y cromatografía en capa delgada. La caracterización estructural se realizó por medio de diferentes técnicas instrumentales: Espectroscopía de infrarrojo (IR), espectroscopía ultravioleta (UV-Vis) y resonancia magnética nuclear (RMN uni y bidimensional). La cuantificación de la hernandulcina en el aceite esencial y en el extracto se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Debido a la labilidad térmica de la molécula, no es posible realizar su análisis espectroscópico por medio de técnicas que empleen altas temperaturas. Para superar esta condición, se realizó la derivación química de la hernandulcina, empleando la sililación, que permitió realizar su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y confirmar su identidad química como su derivado.

El aceite esencial, el extracto supercrítico y la hernandulcina presentaron también actividad antirradicalaria, superior a los antioxidantes sintéticos de referencia evaluados (BHT y α -Tocoferol), medida por el ensayo ORAC.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez.

ABSTRACT:

TITLE: ISOLATION, IDENTIFICATION AND QUANTITATION OF HERNANDULCIN IN THE EXTRACT OF *Lippia dulcis* TREVIR., OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION *

Author: Franci Nathalie Gómez Jaimes**

Key words: Hernandulcin, *Lippia dulcis*, extract, supercritical fluid.

Lippia dulcis Trevir., is a traditional plant used to treat respiratory and digestive diseases, but its main attraction is its sweet taste for being the natural source of the hernandulcin, a chemical compound rated to be 1200 times sweeter than sucrose. The constant scientific research focused on natural products to replace artificial synthetic compounds, and the potential of *L. dulcis* as sweetener, led us to the isolation of hernandulcin and its chemical analysis.

Essential oil and supercritical extract of *Lippia dulcis* were obtained by hydrodistillation assisted by microwave radiation (MWH) and supercritical fluid extraction (SFE), respectively. The main compounds in the oil and extract corresponded to α -bisabolol, δ -cadinene, trans- β -caryophyllene, and α -copaene bicyclogermacrene. Hernandulcin was not detected, due to the analytical conditions. Instead, we observed its thermal decomposition products: 6-methyl-5-hepten-2-one and 3-methyl-2-cyclohexen-1-one.

Isolation of hernandulcin was performed by column chromatography (CC) and thin layer chromatography (TLC). The structural characterization was performed by different instrumental techniques: infrared spectroscopy (IR), ultraviolet spectroscopy (UV-Vis) and nuclear magnetic resonance (NMR uni and bidimensional). Hernandulcin quantification of the essential oil and the extract was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). Due to the thermal lability of the molecule, it's not possible to perform spectroscopic analysis techniques by employing high temperatures. To overcome this condition, hernandulcin was derivated using silylation reaction, wich allowed us to do the analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and confirm its identity.

The essential oil, supercritical extract and hernandulcin showed antiradical activity, higher than reference synthetic antioxidants evaluated (BHT and α -tocopherol), as measured by ORAC assay.

* College thesis

** Science Faculty, School of Chemistry. Directed by Elena E. Stashenko and Jairo René Martínez.

INTRODUCCIÓN

El sabor dulce ha sido una sensación muy importante en la vida humana. El hombre siempre ha mostrado su inclinación hacia los alimentos en los cuales reconoce este efecto y, así mismo, ha desarrollado diferentes maneras de emplear otras sustancias en reemplazo del azúcar y de la miel, que han sido las primeras fuentes de dulzor, ya sean naturales o sintéticas [1].

Juntamente, el creciente interés del hombre por el consumo preferencial de productos naturales, así como la tendencia global por reducir el uso de sustancias sintéticas, han llevado a la necesidad de desarrollar la agroindustria de productos naturales en Colombia. Entre los principales productos empleados por el sector empresarial, las plantas aromáticas constituyen un elemento de primordial importancia, bien sea por su empleo en la elaboración de productos culinarios, o cuando se obtienen de ellas, diversas mezclas de compuestos, de amplia aplicación en diferentes ramas de la industria, e.g. perfumería, farmacéutica, alimentos.

La especie *Lippia dulcis* Trevir., popularmente conocida como “orozuz”, es una hierba arrastradera, perenne y fuertemente aromática. Esta especie se reconoce en la medicina tradicional, por sus propiedades contra afecciones respiratorias y digestivas [2]. Sin embargo, la característica principal de esta planta, radica en que es la fuente natural de la hernandulcina, un sesquiterpenoide, tipo bisabolano, sustancia más de 1000 veces más dulce que la sacarosa [3].

Con el fin de impulsar el desarrollo en la investigación de productos naturales, el objetivo principal de este trabajo de investigación fue el aislamiento de la hernandulcina, su caracterización estructural y la determinación de su concentración en el aceite esencial y extracto de *Lippia dulcis* Trevir., cultivada en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM. Debido a la labilidad térmica de la molécula, no es posible realizar su análisis espectroscópico por medio de técnicas que empleen altas temperaturas. Para superar esta condición, se realizó la derivación química de la hernandulcina, empleando la sililación, que permitió realizar su análisis por GC-MS y confirmar su identidad química.

En el trabajo, se caracterizaron los metabolitos secundarios presentes del aceite esencial y del extracto de las partes aéreas de la especie *L. dulcis*, aislados por la hidrodestilación asistida por la radiación con microondas y la extracción con CO₂ supercrítico, respectivamente; se evaluó por medio de los ensayos ORAC y ABTS^{•+} su actividad antirradicalaria, así como de la hernandulcina aislada.

Es importante resaltar que, en este trabajo de investigación se determinó que la hernandulcina, un compuesto de origen natural, además de ser un potente edulcorante, no tóxico [4], presenta también una alta actividad antirradicalaria, superior a los antioxidantes sintéticos de referencia evaluados (BHT y α -Tocoferol), medida por el ensayo ORAC, método de evaluación de la capacidad antioxidante de gran relevancia en sistemas biológicos y en alimentos [5].

Los resultados, parciales y finales, de esta investigación, se presentaron en dos eventos científicos: (1) XI Congreso Colombiano de Fitoquímica, realizado en Medellín, los días 5-7 de octubre de 2011. Modalidad: **póster**; y (2) VIII Congreso Internacional de Química, Ingeniería Química y Bioquímica, realizado los días 9-12

de octubre de 2012, en La Habana, Cuba. Modalidad: **presentación oral y póster.**

1 MARCO DE ANTECEDENTES

1.1 TEORÍA MOLECULAR DEL SABOR DULCE

La transducción del sabor dulce es objeto de estudio de diversos centros de investigación en el mundo. Se conoce que este proceso nace de la interacción de una molécula con una proteína-G (denominada T1R3), acoplada al receptor del gusto en las células gustativas, que generan una sensación de dulzura placentera [1]. Pese a la publicación de los residuos de la secuencia proteica de T1R3, su estructura tridimensional detallada no ha sido determinada. Mientras tanto, las investigaciones se han enfocado en estudiar moléculas con propiedades gustativas particulares, responsables del sabor dulce, entre otros.

Estudios previos de relación 'estructura-sabor dulce' se han caracterizado por plantear la existencia de un modelo 'glucóforo', nombre que recibe el fragmento estructural responsable del dulzor. Actualmente, existen tres teorías modelo que describen el dulzor de una molécula, como resultado de las propiedades fisicoquímicas específicas de sus grupos funcionales presentes y sus arreglos geométricos, a saber: teoría AH-B; AH-B, X; y MPA (*Multipoint Attachment Theory*, por sus siglas en inglés).

1.1.1 Teoría AH-B. Descrita por Shallenberger y Acree [6], esta teoría sugiere que todos los compuestos con sabor dulce, contienen un enlace con un hidrógeno ácido, AH, y un enlace correspondiente a un átomo electronegativo, B, separados por una distancia que va de 2.5 a 4.0 Å, y los cuales interaccionan con un sistema AH-B análogo del receptor, formando dos puentes de hidrógeno e interrumpiendo enlaces de hidrógeno intramoleculares en el receptor (Véase **Figura 1**) [6].

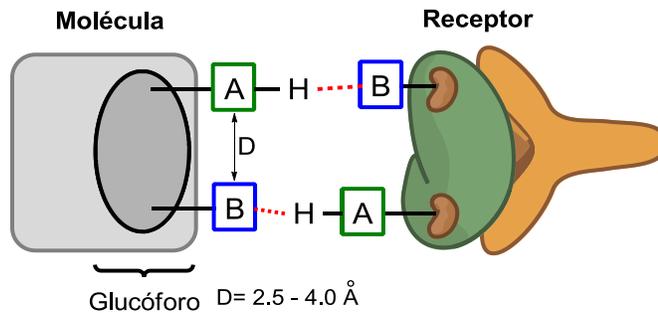


Figura 1. Modelo AH-B de la teoría molecular del sabor dulce. Fuente: La autora¹

Para lograr adaptar el modelo AH-B a la variación en el dulzor en diversas moléculas, *e.g.*, algunos enantiómeros de L-aminoácidos, Shallenberger y Acree [6] propusieron una barrera espacial de 3Å, medida perpendicularmente desde el receptor. Este hecho explica la enantioespecificidad del receptor gustativo, en el cual el grado de dulzor depende de la fortaleza de la interacción molécula-receptor, es decir, cuanto mayor sea la interacción, mayor será la sensación de dulzor.

1.1.2 Teoría AH-B, X. Esta propuesta, descrita por Kier [7], es análoga a la teoría AH-B, y explica la estereoespecificidad del receptor, a través de la presencia de un tercer componente en la unidad glucofórica, designado como X (Véase **Figura 2**). Este último elemento debe tener interacciones de dispersión (fuerzas de van der Waals) o hidrofóbicas con el receptor, hecho que le permite potenciar el sabor dulce, actuando como un modulador debido a efectos inductivos, pese a no ser un punto de interacción vital para el anclaje.

¹La figura se elaboró con base en el modelo descrito en [6]

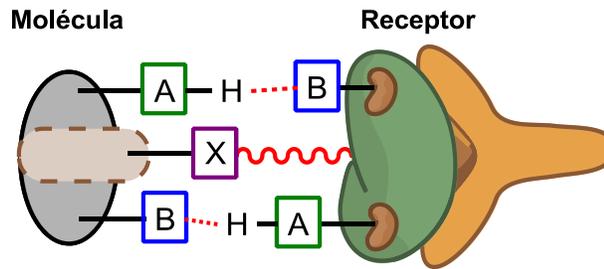


Figura 2. Modelo AH-B, X de la teoría molecular del sabor dulce. Fuente: La autora²

1.1.3 Teoría MPA. La teoría MPA (*Multipoint Attachment*, por sus siglas en inglés), fue desarrollada por Tini y Nofre en 1996. Este es el modelo más detallado y complejo de los receptores de dulzor, realizado a partir del análisis SAR (*Structure-Activity Relationship*, por sus siglas en inglés), de todas las sustancias de sabor dulce conocidas. Esta teoría sugiere la existencia al menos de ocho categorías funcionales que contribuyen al dulzor, que están agrupadas dentro de la afinidad alta y los sitios secundarios. En este caso, los receptores de dulzor se encuentran en un estado de reposo inicialmente (conocido como estado R), como resultado de las interacciones iónicas y puentes de hidrógeno de carácter intramolecular, que ocurren entre varios sitios de reconocimiento. Cuando el edulcorante interactúa con los receptores, este dispersa las interacciones intramoleculares, provocando marcados cambios conformacionales que permiten su expansión. Presuntamente, este efecto alostérico es el que inicia la transducción del sabor dulce [8].

1.2 *Lippia dulcis* TREVIR.

Lippia dulcis Trevir., (familia *Verbenaceae*), es una hierba rastrera, perenne, aromática e intensamente dulce (Véase **Figura 3**). Posee tallos estrigosos o

²La figura se elaboró con base en el modelo descrito en [7]

glabros y alcanza una altura entre 40-60 cm. Sus hojas, con una longitud de 1-6 cm, son opuestas en pecíolos de 0,5–1,5 cm; ampliamente cuneadas en la base, rugosas en la superficie y ásperas al tacto. Sus flores son ovoide-globosas al inicio, después cilíndricas; usualmente son cortas, pero pueden alcanzar hasta 3 cm de longitud; son cuneado-aovadas, con cáliz diminuto y corola blanca entre 1 - 1,5 mm de largo [9, 10].



Figura 3. *Lippia dulcis* Trevir. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM. Fecha: septiembre de 2012.

L. dulcis es endémica de América Tropical, su hábitat se extiende desde el sur de México hasta Panamá y Colombia, a altitudes que alcanzan los 1800 msnm [9, 11]. Se encuentra también en Puerto Rico, Cuba, La Española y otras islas caribeñas, y ha sido introducida en países como Estados Unidos, Inglaterra y

Alemania [2]. Crece principalmente en climas cálidos húmedos a orillas de bosques húmedos subtropicales o en bordes boscosos de ríos y lagunas [11].

La especie es conocida por los siguientes sinónimos científicos: *Phyla dulcis* Moldenke, *Phyla scaberrima* (Juss.) Moldenke y *Zapania scaberrima* Juss. exPers [12]. Entre sus nombres coloquiales se encuentran: “orozuz” (México, Cuba, El Salvador, Nicaragua, Guatemala), “hierba dulce” (México), “orozuz de la tierra” (Cuba), “corronchoncho” (El Salvador), “orosul” (Nicaragua), “*Fog fruit*”, “*Lippia Mexicana*” y “*Mexican Lippia*” (Estados Unidos e Inglaterra) [2].

L. dulcis ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional. El cocimiento de la planta se usa para el tratamiento de afecciones digestivas y respiratorias. Sus hojas y tallos presentan propiedades emolientes, diaforéticas, diuréticas, balsámicas, estimulantes, expectorantes, sedantes, sudoríficas, tónicas y abortivas [2, 12]. En Cuba, el jugo de la planta se utilizaba para teñir el papel de una clase particular de cigarrillo, llamado ‘pectoral de orozuz’ [13].

Además de las propiedades mencionadas, la planta es particularmente llamativa por ser la fuente natural de la hernandulcina; sesquiterpenol con esqueleto de bisaboleno, reconocido como el principio dulce de la especie y considerado, en una base molar, más de 1000 veces superior en dulzor a la sacarosa (Véase **Figura 4a**) [3, 14,15].

El nombre de la molécula fue dado en honor al conquistador, médico e historiador español, Francisco Hernández, quien luego de realizar una expedición botánica en América Central, escribió una monografía titulada ‘Historia Natural de la Nueva España’, entre 1570 y 1576. En ella, describía una planta intensamente dulce, conocida con el nombre azteca de ‘*Tzonpelic xihuitl*’, que significa ‘hierba dulce’, y posteriormente fue registrada como *Lippia dulcis* Trevir. [2, 16].

La hernandulcina, junto con su epímero estructural (no dulce) *epi*-hernandulcina (**Figura 4b**), fue aislada y caracterizada por Compadre y colaboradores, en 1985 [4], del extracto de éter de petróleo de la planta cultivada en México (0,004% p/p). Los autores, además, determinaron que la molécula se descompone a 140 °C, produciendo la 3-metil-2-ciclohexen-1-ona y la 6-metil-5-hepten-2-ona (Véase **Figura 5**).

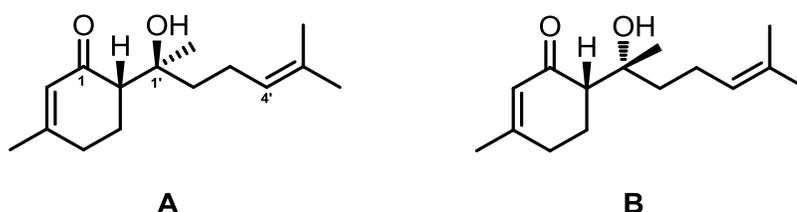


Figura 4. Estructuras químicas de **A.** Hernandulcina y **B.** Su epímero estructural, la *epi*-hernandulcina [4].

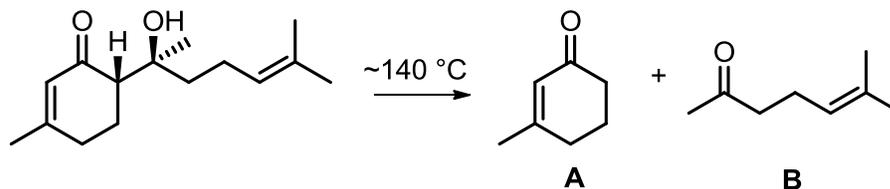


Figura 5. Reacción de descomposición térmica de la hernandulcina en **A.** 3-Metil-2-ciclohexen-1-ona y **B.** 6-Metil-5-hepten-2-ona [4].

La propiedad edulcorante de la hernandulcina, se atribuye a los grupos carbonilo en C1, hidroxilo en C1' y la olefina en C4', funciones esenciales para la mediación de su sabor, que pueden atribuirse a la teoría AH-B, X del sabor dulce [4]. La molécula ha sido patentada como un potencial edulcorante y recomendada en la

preparación de productos dentífricos [17]. En diversos ensayos biológicos realizados sobre esta molécula, se determinó que no posee actividad mutagénica significativa, lo que se evaluó en cepas de *Salmonella typhimurium*. Así mismo, el compuesto no presentó toxicidad al ser administrado en ratones, en dosis de hasta 2g por 1 kg de peso corporal [4].

Yang y colaboradores [18] realizaron la biotransformación de la molécula, por medio de su fermentación, empleando cepas fúngicas de *Glomerella cingulata*. El resultado de este procedimiento fue un compuesto con mayor solubilidad en agua, el cual fue denominado 'Metabolito 1' (Véase **Figura 6**).

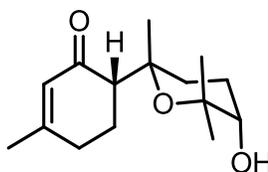


Figura 6. Estructura química del producto de biotransformación de la hernandulcina, llamado 'Metabolito 1' [18].

Por medio de la síntesis de la molécula, a partir del (R)-(+)-limoneno, Mori y Kato [19] demostraron que la (6S, 1'S)-hernandulcina es el único compuesto, de los cuatro diastereoisómeros posibles (6S, 1'R; 6R, 1'R; y 6R, 1'S), que presenta sabor dulce. Adicionalmente, la hernandulcina y sus isómeros estructurales han sido sintetizados por medio de diferentes procedimientos [20-23]: (1) por condensación aldólica de sus productos de descomposición térmica; (2) a partir del (-)-isopulegol, empleando ácido *m*-cloroperbenzoico; (3) partiendo de ciclohexadieno y usando enolatos de boro y silicio; (4) por la ruta de cicloadición de un óxido de nitrilo, utilizando (2Z,6E)-farnesal y (5) por la generación de *E*-dienil carbamato, empleando TiCl_3 como catalizador.

Kaneda y colaboradores [24], además de aislar la hernandulcina (0,154% p/p) y la *epi*-hernandulcina (0,040% p/p), a partir del extracto etéreo de la planta, obtuvieron un nuevo compuesto sesquiterpénico, también dulce, denominado 4 β -hidroxihernandulcina (9,5 mg; 0,0008% p/p) (Véase **Figura 7**).

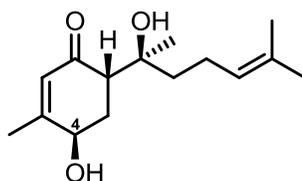


Figura 7. Estructura química de la 4 β -hidroxihernandulcina [24].

1.2.1 Composición química de la planta. En estudios realizados en México [2], se reportó que el aceite esencial se componía principalmente por monoterpenos (86%) y, en menor proporción de compuestos sesquiterpénicos (14%). El monoterpeno oxigenado alcanfor, fue identificado en alta concentración (53%) en el aceite. La hernandulcina no fue detectada; en vez de ello, se identificó uno de sus productos de degradación térmica, la 6-metil-5-hepten-2-ona, pero solo en bajas concentraciones (0,51%) [2].

Souto y colaboradores [11], en Puerto Rico, sugirieron que la dificultad en la detección de la molécula (por su labilidad térmica), podría obedecer a las condiciones operativas durante el proceso cromatográfico. Para esto, emplearon bajas temperaturas a la hora del análisis del extracto de la planta, encontrando que, aunque la hernandulcina se conserva térmicamente estable, la volatilización de la muestra es incompleta y se dificulta su cuantificación.

En disimilitud con los resultados reportados en México [2], la composición química del aceite esencial y extracto de la planta determinada en diferentes países: Puerto Rico [11], Guatemala [25], Colombia (investigaciones desarrolladas en el Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM [26-28]) y Brasil [29]; se caracteriza por su alto contenido de compuestos sesquiterpénicos (>60%) y por la presencia de los productos de descomposición de la hernandulcina. Por esta razón, se propone la existencia de dos quimiotipos de la planta: Hernandulcina y alcanfor. En la **Tabla 1**, se resume la variación en la composición química de la especie, dependiendo de su ubicación geográfica.

Tabla 1. Variación de la composición química de los metabolitos secundarios de *L. dulcis*, según su ubicación geográfica.

País	Compuestos mayoritarios
Puerto Rico	Hernandulcina (36,0%), <i>epi</i> -hernandulcina (22,0%), 6-metil-5-hepten-2-ona (2,70%), 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (2,80%), α -bisabolol (2,9%) [11].
México	Alcanfor (53,2%), canfeno (15,9%), limoneno (7,40%), <i>trans</i> - β -cariofileno (3%), α -copaeno (1,60%), 6-metil-5-hepten-2-ona (0,51%) [2].
Guatemala	6-Metil-5-hepten-2-ona (16,8-20,5%), 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (12,7-15,7%), α -copaeno (3,40-6,70%), <i>trans</i> - β -cariofileno (6,10-7,60%), α -bisabolol (8,0-14,6%), δ -cadineno (5,3-5,6%) [25].
Colombia	<i>trans</i> - β -Cariofileno (9,40-10,3%), δ -cadieno (7,80-8,80%), α -copaeno (8,3-8,9%), biciclogermacreno (7,9%), 6-metil-5-hepten-2-ona (2,0-3,9%), 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (1,4-3,30%) [26-28].
Brasil	<i>trans</i> - β -Cariofileno (13,8-16,8%), α -copaeno (11,5-13,9%), δ -cadineno (12,0-15,0%), α -bisabolol (7,7-9,9%), 6-metil-5-hepten-2-ona (8,0-11,4%), 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (2,1-5,4%) [29].

El aceite esencial de la planta presenta actividad antihistamínica y anticolinérgica [30]. También presenta actividad biológica contra *T. cruzi* y *L. chagasi*, y toxicidad en células Vero. Ensayos contra *V. cholera*, *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* resultaron negativos [26, 31]. Los extractos metanólicos, mostraron actividad antiinflamatoria [32].

Diversos compuestos, con marcada actividad biológica, han sido aislados del extracto metanólico de la planta, a saber: sesquiterpenos tipo bisabolano, hernandulcina, *epi*-hernandulcina, 4 β -hidroxihernandulcina, lippidulcina A, *epi*-lippidulcina A, peroxilippidulcinas A-C, peroxi-*epi*-lippidulcina B y *epi*-lippidulcinas B y C; flavonoides, sakuranetina, cirsimaritina, pectolinarigenina, salvigenina, eupatorina, eupatilina, y 5,3'-dihidroxi-6,7,4',5'-tetrametoxiflavona; glicósidos, acteósido, *iso*-acteósido, martinósida; y flavonas, eupafolina, 6-hidroxiluteolina. Algunos de estos compuestos mostraron actividad antiproliferativa y antioxidante [33, 34].

1.3 METABOLISMO SECUNDARIO VEGETAL

Se conoce como metabolismo primario a la serie de reacciones químicas que conducen a la biosíntesis de compuestos como azúcares simples, aminoácidos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, entre otros; estos compuestos desempeñan un papel esencial en el metabolismo básico de los organismos [35, 36]. En las plantas, además de estos metabolitos, existe una gran cantidad de compuestos orgánicos, que parecen no estar implicados directamente en su crecimiento y desarrollo. Estos compuestos se conocen como metabolitos secundarios [37]. Su función generalmente está relacionada con el sistema de defensa, la comunicación con otras especies (alelopatía) y la excreción de las plantas. En términos generales, son los responsables de las características organolépticas de las plantas y de su actividad biológica [36].

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden dividirse en tres grupos, a saber: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados. En general, la ruta de síntesis de estas sustancias parte del metabolismo primario y se deriva en tres rutas, principalmente, la ruta de los ácidos malónico, mevalónico y siquímico [36, 38]. Los terpenos constituyen el mayor grupo de metabolitos secundarios producidos por las plantas y típicamente son los constituyentes de sus aceites esenciales y extractos. Por lo general, son compuestos poco solubles en agua y se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos que contienen (unidades isoprénicas), en monoterpenos, C₁₀; sesquiterpenos, C₁₅; diterpenos, C₂₀; triterpenos, C₃₀; entre otros [38].

1.3.1 Aceites esenciales. Los aceites esenciales, AE, son mezclas de metabolitos secundarios volátiles; son generalmente compuestos con masa molecular menor de 300 Da, obtenidos por técnicas destilativas y que, en general, son responsables del olor de las mismas [39]. Se les llama 'aceites' por su apariencia física, que es bastante parecida a los aceites vegetales o aceites de cocina, y 'esenciales', puesto que se considera que representan la esencia de la planta de origen.

Los AE son generalmente líquidos a temperatura ambiente, pueden tener o no coloración; algunos son inestables frente a la luz, oxígeno, a la presencia de agentes oxidantes, reductores o cambios de pH [40]. Típicamente, difieren en su composición química, pero tienen algunas propiedades físicas comunes, como alto índice de refracción, actividad óptica, densidad menor que la del agua e inmiscibilidad con ella. Sin embargo, los AE son solubles en la mayoría de solventes orgánicos.

Debido a sus diversas propiedades, los AE han sido ampliamente utilizados a lo largo de la historia en diversas industrias, entre las cuales figuran: cosmética

(elaboración de perfumes, pastas dentífricas, cremas); alimenticia (preparación de aditivos, saborizantes, condimentos); licorera (en refrescos y licores), química fina (precursores químicos para la síntesis de nuevos compuestos).

1.3.2 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Con el fin de extraer el AE de una planta, esta debe ser sometida a un proceso de destilación, e.g., hidrodestilación [41]. Si en lugar de los métodos convencionales de calentamiento, se utiliza la radiación de microondas como fuente de energía, el proceso se conoce como hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, MWHD (*Microwave-Assisted Hydrodistillation*, por sus siglas en inglés).

Esta técnica fue descrita inicialmente por Paré y colaboradores [42, 43], y consistía en la extracción de la esencia a través del calentamiento por microondas, empleando un solvente “transparente”, que no absorbe la radiación de las microondas. A través de numerosas investigaciones, en el Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM se han optimizado las condiciones operativas de este proceso, para obtener mejores rendimientos, como lo describen Stashenko y colaboradores [44] y Tsarkova [45].

En el proceso de extracción, la muestra se sumerge al disolvente, en este caso, agua, en un equipo de destilación tipo *Clevenger*. La calefacción resultante, junto con la alta presión de vapor, conducen a la ruptura de las paredes celulares de la planta, seguida de la liberación del aceite esencial en una mezcla azeotrópica, que al ser condensada, forma dos capas, una, rica en aceite y otra, rica en agua. Dichas capas se almacenan en un reservorio *Dean-Stark* y, seguidamente, se separan por decantación.

1.3.3 Extractos. Los extractos de las plantas, son mezclas de compuestos químicos producto del metabolismo secundario vegetal. Se diferencian de los AE, en muchas de sus propiedades físicas y químicas: normalmente son mezclas viscosas, están formados por compuestos de mayor peso molecular, *e.g.*, diterpenoides, fitoesteroles y, en la mayoría de los casos, son de menor volatilidad.

Normalmente, estos compuestos corresponden a la fracción semi-volátil o no volátil de la planta, es decir, aquellos analitos que por no ser volatilizables o ser inestables térmicamente, *e.g.*, lactonas sesquiterpénicas, no se pueden aislar mediante métodos destilativos. En vez de ello, para su obtención se emplean distintos procesos, que forman el grupo de las técnicas extractivas, y cuyo principio de operación radica en la extracción mediante un disolvente; se aprovechan las propiedades de solubilidad y polaridad de los analitos de la matriz y su afinidad con un disolvente dado o sus mezclas [41].

Los extractos, al igual que los AE, se encuentran en una amplia aplicación en diversos campos, dentro de los cuales se destacan: industria cosmética, *e.g.*, compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos) aplicados en bases cosméticas; alimentos, *e.g.*, pigmentos y condimentos; química farmacéutica, *e.g.*, compuestos con bioactividad (vitaminas, esteroides, polisacáridos), entre otros.

1.3.4 Extracción con fluido supercrítico. Un fluido supercrítico, SF, es una sustancia cuyas condiciones de presión y temperatura se encuentran por encima de su punto crítico; región en la cual coexisten dos fases: líquida y gaseosa [46]. Esto le confiere propiedades características de ambos estados: densidad similar a la de los líquidos; difusividad propia de los gases, junto con valores de viscosidad y tensión superficial bajos, lo cual permite una extracción más rápida y eficiente [47].

El proceso SFE (*Supercritical Fluid Extraction*, por sus siglas en inglés), consiste en una extracción sólido-líquido, llevada a cabo dentro de una cámara, a través de la cual se hace circular el fluido, y el cual, al entrar en contacto con la matriz, solubiliza y arrastra los compuestos presentes en ésta. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, la mezcla 'soluto-solvente' obtenida, se separa en un recipiente colector, en donde se almacenan los solutos extraídos y, posteriormente, se separa el solvente de extracción, por evaporación, en la mayoría de los casos.

El dióxido de carbono, CO₂, es el solvente más empleado en la SFE de productos naturales [47, 48]. El atractivo que posee este compuesto, se debe a varias características, a saber: es químicamente inerte, económico y apto para la obtención de compuestos termolábiles, puesto que su temperatura crítica es relativamente baja (31,1°C) [49]. Además, en el proceso de extracción se prescinde de una etapa adicional de separación del solvente, puesto que en condiciones ambientales este se encuentra en estado gaseoso.

1.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS

Muchas de las técnicas disponibles para la separación y purificación de metabolitos secundarios de las plantas -que usualmente se encuentran en mezclas complejas-, están relacionadas con la cromatografía [50]. De hecho, los métodos de separación se pueden clasificar en dos grupos: Cromatográficos y no cromatográficos. El primer grupo comprende, entre otros, métodos preliminares como la cromatografía en columna, CC (*Column Chromatography*, por sus siglas en inglés) y la cromatografía en capa fina, TLC (*Thin Layer Chromatography*, por sus siglas en inglés), las cuales, complementadas, constituyen los métodos más empleados para aislar y purificar compuestos químicos en matrices sólidas o líquidas, durante experimentos a pequeña-mediana escala (≤ 20 g)[51-53]. Es

importante resaltar, que la elección de la técnica de aislamiento dependerá exclusivamente de las características fisicoquímicas de los analitos a separar.

1.5 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

La caracterización química de los metabolitos secundarios aislados de una matriz vegetal, e.g., aceite esencial, extracto, es fundamental para tener un amplio conocimiento sobre sus propiedades organolépticas, biológicas, fisicoquímicas, etc. Para llevar a cabo esta tarea, existen diversas herramientas instrumentales, la escogencia de una u otra, o de varias, depende exclusivamente de las características u 'hoja de vida' de los analitos y de la disponibilidad de los equipos para realizar su análisis.

1.5.1 Cromatografía de gases. La GC (*Gas Chromatography*, por sus siglas en inglés), es uno de los métodos de separación, en el cual los componentes de una muestra, previamente volatilizada, se reparten o distribuyen, asimétricamente, entre dos fases: una estacionaria, que puede ser sólida o líquida, contenida en una columna capilar de sílice fundida; y una móvil, de naturaleza gaseosa (generalmente helio), que transporta la muestra a través de la fase estacionaria [54-56]. La columna cromatográfica se coloca dentro de un horno con calentamiento programable, factor de gran influencia en la separación de la mezcla.

El proceso cromatográfico ocurre como resultado de repetidos actos de absorción/desorción, durante el movimiento de los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria; la separación de los analitos tiene lugar de acuerdo con su constante de distribución K_D entre las dos fases [55]. Una vez han terminado su recorrido a través de la columna cromatográfica, los analitos pasan a

un detector, que registra las diferentes sustancias y genera una señal proporcional a su cantidad.

La identificación de los componentes se realiza por comparación de sus índices de retención lineales, IRL, que se calculan con base en los tiempos de retención de los analitos y los de una serie análoga de hidrocarburos lineales, con los de sustancias de referencia, en dos fases estacionarias de distinta naturaleza: polar y apolar [57].

1.5.2 Cromatografía de gases - espectrometría de masas. La espectrometría de masas, MS (*Mass Spectrometry*, por sus siglas en inglés), con ionización por impacto de electrones, EI (*Electron Impact*, por sus siglas en inglés), puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura. Su principio consiste en la generación de iones en fase gaseosa, producto de la fragmentación de las moléculas presentes en una mezcla, seguido de la separación de dichos iones y su detección [54, 55]. Los fragmentos producidos se separan de acuerdo con su relación masa-carga (m/z), y el espectro de masas resulta único para cada compuesto químico [58].

En la actualidad, el detector espectrométrico de masas acoplado al cromatógrafo de gases constituye la GC-MS (*Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*, por sus siglas en inglés), una herramienta indispensable para determinar la composición química de una mezcla compleja de analitos volatilizables.

De esta manera, la identificación de un compuesto, por GC-MS, se realiza por: (1) comparación de sus IRL con los de una sustancia de referencia o los reportados en las bases de datos y (2) con base en espectros de masas experimentales,

comparándolos con los espectros de masas de bibliotecas de espectros, a saber: Adams, NIST, Wiley [58, 59].

1.5.3 Identificación confirmatoria de un compuesto orgánico. En la actualidad, la GC-MS ha sido la técnica con mayor aplicación para caracterizar químicamente un compuesto determinado. Sin embargo, la coincidencia de los distintos parámetros cromatográficos permite realizar un reconocimiento de la estructura molecular, más no su identificación absoluta [59]. Por esta razón, para lograr la identificación confirmatoria de un analito de interés, se hace necesario el uso de más de una técnica de análisis, cuya elección dependerá exclusivamente de las características del analito, objeto de estudio.

Existen diversas herramientas instrumentales para llevar a cabo la elucidación estructural de un compuesto orgánico, dentro de las cuales se encuentran: (1) Espectroscopía de infrarrojo, IR, basada en la absorción de la radiación electromagnética, a frecuencias que corresponden a las energías vibracionales de un conjunto específico de enlaces químicos dentro de una molécula [60]; (2) Espectroscopía UV-Vis, cuyos valores de energía corresponden a la diferencia energética entre los estados electrónicos de las moléculas [61] y (3) Resonancia magnética nuclear, RMN, un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos de las moléculas presentes en una muestra[62].

1.6 DERIVACIÓN QUÍMICA

La derivación es un método químico que consiste en la transformación de uno o varios grupos funcionales dentro de una molécula. Típicamente, estas reacciones se emplean para reemplazar o 'enmascarar' un átomo de hidrógeno lábil, unido a un heteroátomo (grupos $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}$ y $-\text{SH}$), con una especie química de

menor polaridad [63]. En la cromatografía de gases este proceso se lleva a cabo con el fin de aumentar la volatilidad y estabilidad térmica de los compuestos, disminuir el nivel mínimo de detección y obtener una mayor simetría en sus picos cromatográficos [55].

1.6.1 Reacción de sililación. El proceso consiste en el cambio o reemplazo químico de un grupo prótico de una molécula orgánica por un grupo trimetilsililo (Véase **Figura 8**). Esta reacción se lleva a cabo a través de una sustitución nucleofílica aromática de segundo grado, SN_2 [64, 65].

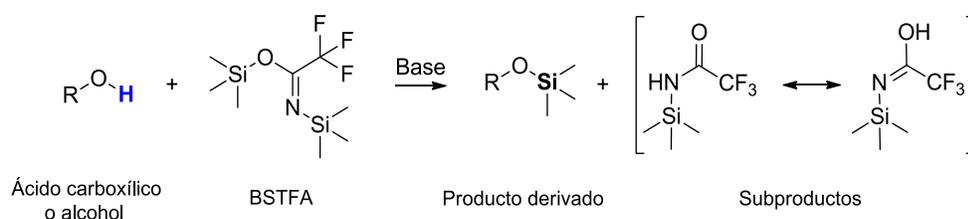


Figura 8. Reacción general del proceso de sililación. Tomado de [26].

Existen diversos agentes sililantes, entre los cuales figuran: trimetilclorosilano, TMCS; hexametildisiloxano, HMDS; *bis*-sililacetamida, BSA; *N*-metil-(trimetilsililo)-trifluoroacetamida, MSTFA; *N,O*-*bis*-(trimetilsililo)-trifluoroacetamida, BSTFA; y *N*-(*t*-butildimetilsililo)-*N*-metiltrifluoroacetamida, MTBSTFA; estos dos últimos son más utilizados. La piridina se emplea en la mayoría de los casos, como solvente/catalizador de la reacción [65-67].

La sililación ha sido la técnica de derivación prevaleciente, con una amplia aplicación en el análisis de compuestos fenólicos, esteroides, azúcares [64, 68], drogas farmacéuticas [64]. A diferencia de otros métodos, normalmente, la

sililación no requiere una etapa de purificación, previa al análisis, y sus derivados pueden ser inyectados directamente al cromatógrafo de gases.

1.7 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Según Halliwell y Gutteridge [69], un antioxidante, AO, se define como “cualquier sustancia que, al estar presente en bajas concentraciones, inhibe o previene la oxidación de un sustrato”. Según su origen, los AO se clasifican en sintéticos y naturales. Los antioxidantes de origen natural más representativos, son los compuestos fenólicos [68, 70]. Los antioxidantes sintéticos (también fenólicos), contienen en su esqueleto grupos alquílicos, que los hacen aptos para solubilizarse en grasas y aceites, y así poder ser utilizados como aditivos. A pesar de la controversia generada por los efectos adversos que pueden presentar, los antioxidantes sintéticos más empleados son el butilhidroxianisol, BHA; butilhidroxitolueno, BHT; y *ter*-butil hidroquinona, TBHQ [71].

1.7.1 Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC). El ensayo ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) fue desarrollado por Cao y colaboradores [72], y actualmente es el más utilizado en la determinación de la capacidad antioxidante de diversos productos alimenticios [5].

El ensayo consiste en la interacción química de una molécula fluorescente, fluoresceína, FL (Véase **Figura 9a**), con un azocompuesto generador de radicales peroxilo, generalmente el AAPH [2,2'-azo-bis(2-amidino-propano)dihidrocloreuro] (Véase **Figura 9b**), por acción térmica (37°C), en presencia de un compuesto con actividad antirradicalaria [73].

Los radicales peroxilo promueven la oxidación de la FL, causando un decrecimiento en la intensidad de la fluorescencia del medio. Los antioxidantes 'atrapan' los radicales, a través del mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno, HAT (*Hydrogen Atom Transfer Assay*, por sus siglas en inglés) y protegen así la molécula de FL e inhiben la caída de la fluorescencia [74]. La intensidad relativa de la fluorescencia se mide a través del tiempo y, se obtiene el área bajo la curva, ABC, de cada ensayo.

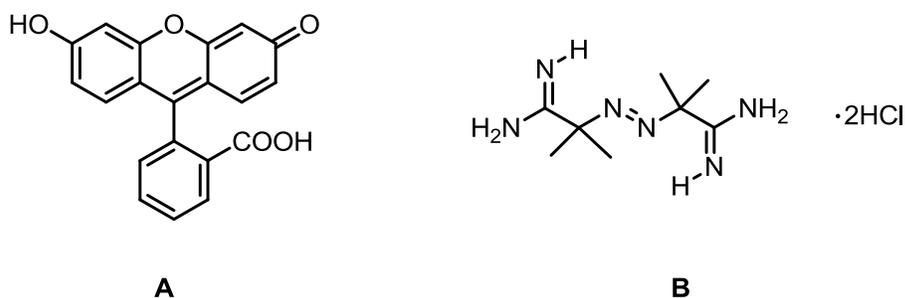


Figura 9. Estructuras químicas de: **A.** Fluoresceína; **B.** Radical AAPH.

Finalmente, la capacidad antioxidante se cuantifica usando una curva de calibración del compuesto de referencia Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un homólogo hidrosoluble de la vitamina E (Véase **Figura 10**). De esta manera, el valor ORAC de una sustancia o mezcla de sustancias, se expresa como micro-moles equivalentes de Trolox[®] por gramo o litro de muestra ($\mu\text{mol TE/g}$ o $\mu\text{mol TE/L}$) [74].

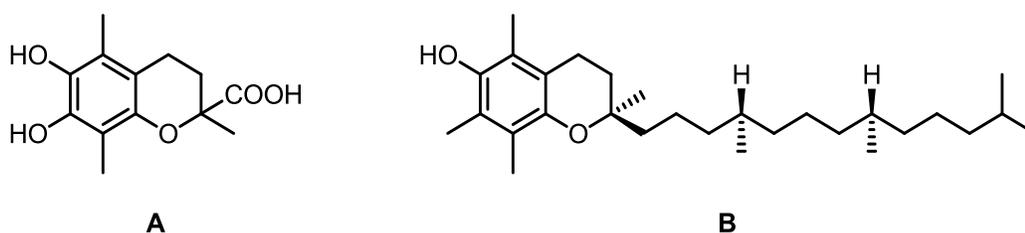


Figura 10. Estructuras químicas: **A.** Trolox® y **B.** Vitamina E.

La ventaja principal que presenta este método, radica en que su mecanismo de acción se basa en la reacción de los radicales peroxilo, los cuales son los radicales libres predominantes encontrados en procesos de oxidación lipídica de alimentos y sistemas biológicos.

1.7.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}. El ensayo de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox®, TEAC (*Trolox® Equivalent Antioxidant Capacity*), fue descrito por primera vez por Re y colaboradores [75]. Dentro de las ventajas que presenta se encuentra la capacidad de ‘secuestrar’ radicales y su funcionalidad para ser aplicado tanto en compuestos hidrosolubles, como liposolubles.

El ensayo se basa en la capacidad de los compuestos AO de estabilizar el catión-radical ABTS^{•+} (catión radical del ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), por medio del mecanismo de transferencia de un electrón, SET (*Single Electron Transfer*, por sus siglas en inglés). El catión-radical, se genera por la reacción del ABTS con una especie química oxidante, el persulfato de potasio, PDS (Véase **Figura 11**), el cual es de color azul-verdoso en solución y presenta una absorbancia máxima en 734nm [76].

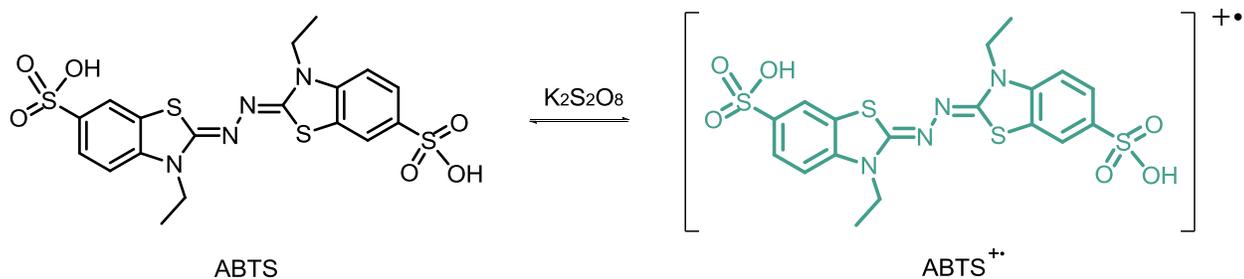


Figura11. Generación del catión-radical ABTS+•.

Cuando se agrega el AO a la mezcla reactante, el radical experimenta una reducción, la cual es proporcional a la concentración y capacidad antirradicalaria del compuesto, que resulta en la decoloración del catión-radical, lo que se mide espectroscópicamente, en función de su absorbancia. Esta variación se calcula con respecto al compuesto de referencia Trolox[®] y se expresa como equivalentes de Trolox[®].

2 CIENCIOMETRÍA

La comunidad científica evalúa constantemente la calidad y la confiabilidad de su producción. Dicha valoración se puede utilizar para direccionar y planificar las investigaciones. Los estudios cuantitativos permiten analizar la ciencia como una disciplina, dando a conocer la investigación desarrollada por distintos países y sus resultados, desde una perspectiva económica y social. Las diferentes bases de datos son los recursos más utilizados para llevar a cabo estudios cuantitativos.

Para el presente trabajo de investigación, el análisis cuantitativo consistió en una búsqueda en la base de datos *Scopus (Elsevier)*, disponible en la Universidad Industrial de Santander, para fines académicos, para observar los avances científicos y los estudios desarrollados sobre *Lippia dulcis* y hernandulcina, en el periodo de 1980-2012.

Las investigaciones sobre la especie *Lippia dulcis* Trevir., se han enfocado principalmente en la evaluación de sus propiedades de dulzor atribuidas a la hernandulcina [14, 15]. Además de esto, diversos estudios también se han encaminado en la actividad biológica de esta planta, e.g., actividad antiinflamatoria [32], antiespasmódica [30], contra afecciones respiratorias y digestivas [2, 12]. Lo anterior se refleja en las publicaciones científicas sobre el aislamiento de metabolitos secundarios presentes en esta especie y su actividad biológica (años 2002-2008) (Véase **Figura 12**) [30, 32-34]; las áreas de interés son farmacología, toxicología y farmacéutica, lo que refleja el interés que despierta la actividad bioquímica de esta planta (Véase **Figura 14**).

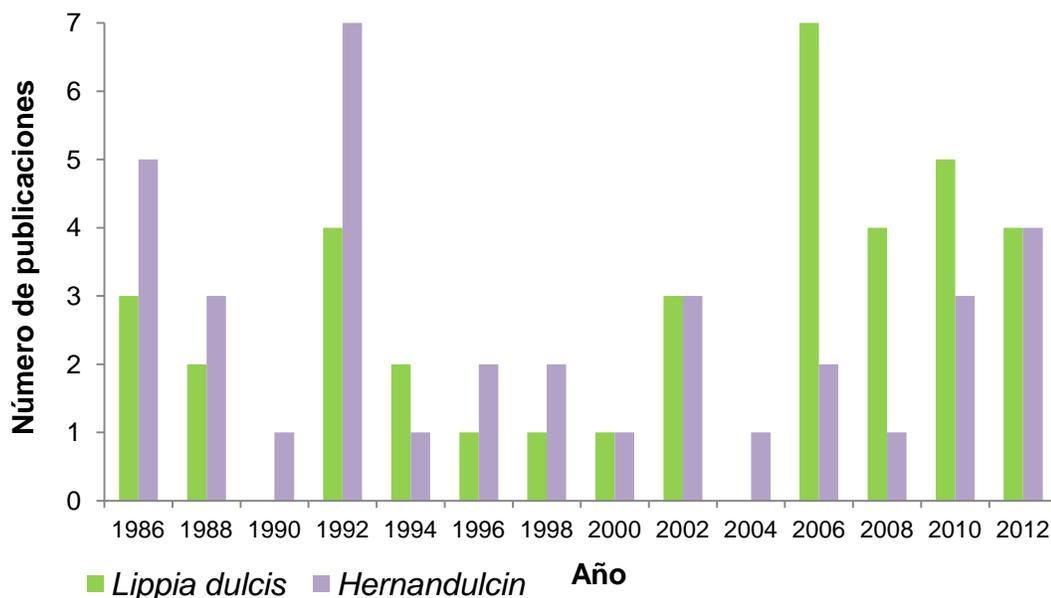


Figura 12. Relación de los años y el número de publicaciones sobre *Lippia dulcis* y hernandulcina. Base de datos: *Scopus* (*Elsevier*). Periodo de observación: 1980-2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY “*Lippia dulcis*”, “hernandulcin”. Fecha de consulta: septiembre de 2012.

Las investigaciones sobre la hernandulcina comenzaron en los años 1985-1987 cuando por primera vez fue elucidada su estructura química y sus propiedades de dulzor [3, 4]. Posteriormente, los estudios sobre la molécula se enfocaron en el aislamiento, caracterización y la evaluación no solo de las propiedades edulcorantes de la molécula, sino también de sus propiedades biológicas. Entre los años 1985 y 2004, las investigaciones sobre hernandulcina superaron en número los estudios sobre *Lippia dulcis*, debido al interés que despierta la investigación y desarrollo sobre la viabilidad de la síntesis y purificación de este compuesto por diferentes métodos de reacción [20-23].

Dentro de las áreas de investigación, en las cuales se encuentra nuestro objeto de estudio, sobresalen los campos de farmacología, biología, medicina y química (Véanse **Figuras 13** y **14**). Sin embargo, en el área de estudio en Química, las investigaciones sobre la hernandulcina tienen una mayor aplicación, debido a los estudios realizados sobre la síntesis del compuesto y sus estereoisómeros, y al interés que genera este compuesto natural, para sustituir la sacarosa.

En la base de datos *Scopus (Elsevier)*, se encontró una investigación publicada en el mes de marzo del presente año, sobre la extracción de hernandulcina con fluido supercrítico, a partir de *Lippia dulcis*. El estudio se publicó en *Journal of Supercritical Fluids*, y se muestra un análisis del efecto de la presión y la temperatura sobre el proceso de extracción. La caracterización de los extractos se realizó por los métodos analíticos instrumentales GC-MS, LC-MS y HPLC.

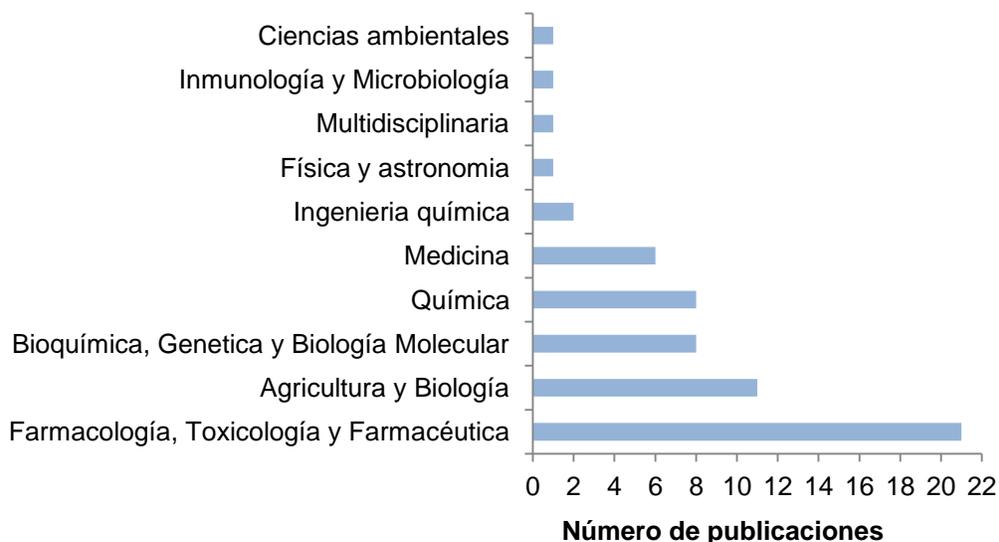


Figura 13. Relación del área de estudio y el número de publicaciones sobre *Lippia dulcis*. Base de datos: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 1980-2012. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (*Lippia dulcis*). Fecha de consulta: septiembre de 2012.

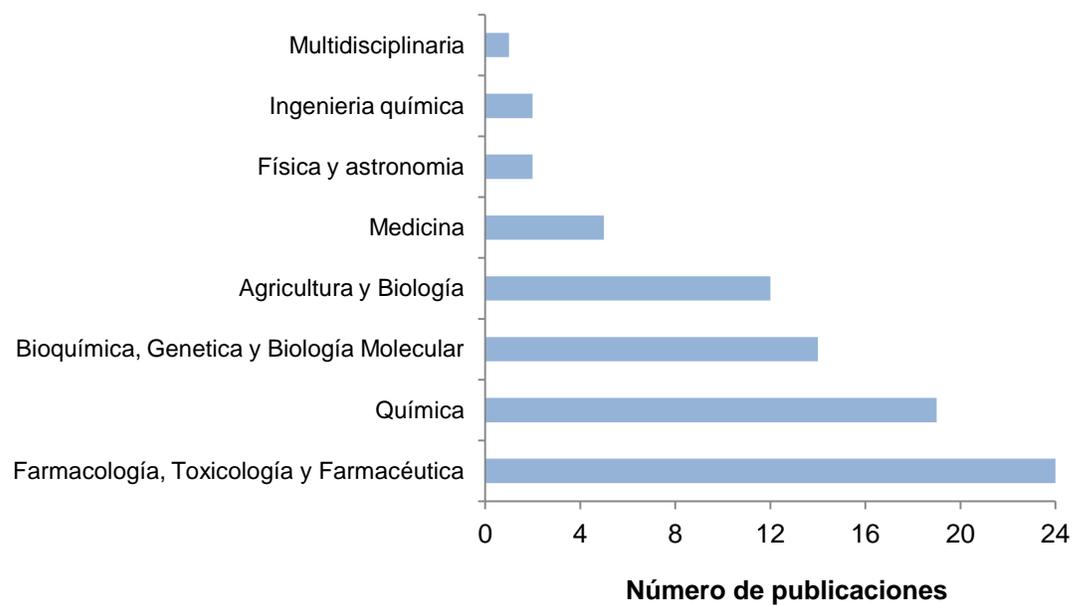


Figura 14. Relación del área de estudio y el número de publicaciones sobre la hernandulcina. Base de datos: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 1980-2012. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (hernandulcin). Fecha de consulta: septiembre de 2012.

3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se recolectó durante los meses de septiembre y octubre del 2011, en parcelas experimentales ubicadas en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM, ubicado en el Campus principal de la Universidad Industrial de Santander.

La identificación botánica de la especie se realizó en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá), por el doctor José Luis Fernández, en el año 2007.

3.2 TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se sometió a un proceso de secado a temperatura ambiente, a la sombra. Las plantas se colocaron sobre bandejas, dando paso a la circulación del aire en todas las direcciones. Se tomó registro del cambio en el peso de la planta, en función del tiempo, cada 12 h, hasta alcanzar el equilibrio. Finalmente, se calculó la pérdida de peso porcentual y con base en esto, se construyó la curva de secado para la especie.

La disminución de la humedad de la planta durante el secado, se calculó mediante la **Ecuación 1**, bajo la presunción de que la pérdida de peso corresponde exclusivamente al contenido de agua del material.

Ecuación 1

Antes de realizar los procesos de obtención del aceite esencial y extracto de la planta, el material vegetal se ubicó en una estufa de secado de bandejas, por 12 h a 40°C, con el fin de obtener un porcentaje de humedad menor del 10%.

El picado de la planta se realizó en un picador/triturador forrajero TRF 300 (Metalúrgica TRAPP Ltda. Jaraguá do sul, Brasil), acondicionado con un tamiz de 0.8 mm.

3.3 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

El aceite esencial se obtuvo de las partes aéreas (hojas, tallos e inflorescencias) de *Lippia dulcis* Trev., por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, MWHD. La extracción se llevó a cabo en un equipo de destilación tipo *Clevenger* (Véase **Figura 15**), con adaptación para calentamiento por radiación de microondas a través de un horno doméstico Samsung AMW 8113ST (Selangor, Malasia), con potencia de salida de 1600 W y frecuencia de radiación de 2,4 GHz.

Las condiciones operativas del procedimiento se desarrollaron según lo descrito por Stashenko y colaboradores [44]. Se emplearon 230 g de material vegetal previamente tratado (**Sección 3.2**) y ca. 350 mL de agua. El proceso de extracción se realizó por un tiempo total de 45 min, dividido en 3 intervalos de 15 min cada uno. Experimentalmente, se empleó el 50% de la potencia del horno (800 W).

La esencia se retiró del reservorio *Dean-Stark* por decantación y, con el fin de evitar el deterioro debido a la presencia de agua en la muestra, se adicionó sulfato de sodio anhidro como agente secante.



Figura 15. Montaje MWHD. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio Antoine Lavoisier, CENIVAM, UIS. Fecha: Abril del 2012.

La obtención del AE se realizó por triplicado para obtener los datos de reproducibilidad del proceso. El rendimiento de la extracción se determinó con base en el peso inicial del material vegetal empleado, según la **Ecuación 2**.

— **Ecuación 2**

En donde:

W_{AE} = Peso del aceite esencial extraído;

W_{MV} = Peso inicial del material vegetal.

Los valores determinados para cada extracción se promediaron; la variación en el contenido de aceite corresponde a la desviación estándar de los datos. Finalmente, se tomaron 50 μL del aceite esencial y se depositaron en un vial de reacción, al cual se añadió 1 μL de *Istd* (patrón interno, *n*-tetradecano). La mezcla

anterior se aforó a 1 mL con diclorometano y se inyectó al GC-MS, para su posterior análisis.

3.4 EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO

La obtención del extracto de la planta se realizó en un equipo de extracción con fluido supercrítico a escala piloto *Thar SFE-2000-2-FMC50* (*Thar Instruments, Inc*, Pittsburgh, PA, EE.UU.) (Véase **Figura 16**), equipado con un porta-muestra en acero inoxidable con capacidad para $2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$; un sistema de separación y colección de los extractos tipo ciclón, con capacidad para $5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$; un regulador automático e independiente de temperatura y presión; bombas de alta presión *P-200A*, para el CO_2 ; y un medidor de flujo *Sitrans FC Massflo* tipo *MASS6000* (*Siemens AG*, Berlín, Alemania).



Figura 16. Equipo de extracción con fluido supercrítico *Thar SFE-2000*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: octubre de 2012.

Las condiciones de operación empleadas durante el proceso de extracción con fluido supercrítico, se encuentran reportadas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Condiciones del proceso de extracción SFE.

Parámetro	Cantidad
Material vegetal	0,4kg
Presión	30MPa
Temperatura	313 K
Flujo de CO ₂	40 kg/h
Densidad de la carga	400 kg/m ³
Tiempo	2 h

El experimento se realizó por triplicado para obtener los datos de la reproducibilidad del proceso; la variación en la cantidad del extracto corresponde a la desviación estándar de los datos.

El rendimiento de la extracción se determinó con base en el peso inicial del material vegetal empleado y el peso del extracto obtenido, según la **Ecuación 2**.

3.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Con el fin de realizar la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial y el extracto de *Lippia dulcis* Trev., las muestras se sometieron un proceso de separación cromatográfico, empleando dos columnas de diferente polaridad. Se usó un detector de masas, MSD (*Mass Selective Detector*, por sus siglas en inglés).

La cuantificación de los compuestos presentes en el AE y extracto de la planta, se realizó por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama, FID (*Flame Ionization Detector*, por sus siglas en inglés).

3.5.1 Análisis por GC-MS. Columna apolar. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un equipo *Agilent Technologies 6890N Network GC System* (Véase **Figura 17**) (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975 Inert XL*, con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 30:1) y un inyector automático *Agilent 7683B*. La separación de los analitos de la mezcla se realizó en una columna capilar con fase estacionaria apolar DB5-MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) con dimensiones de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 µm, d_f, con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). El gas de arrastre empleado fue helio (He, 99,9995%, LINDE S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi, y una velocidad de flujo constante de 1 mL/min. La programación de temperatura en el horno fue de 45 °C (5 min), 150 °C (2 min) @ 4 °C/min, 250 °C (5 min) @ 5 °C/min, 275 °C (15 min) @ 10 °C/min.

3.5.2 Análisis por GC-MS. Columna polar. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un equipo *Agilent Technologies 7890A GC System* (Véase **Figura 18**) (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent 5975C Triple Axis Detector*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación de *split* 30:1) y un inyector automático *Agilent 64513A*. La separación de los analitos de la mezcla se realizó en una columna capilar polar DB-WAX (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*), con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol), de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 µm, d_f. El gas de arrastre fue helio (He, 99,9995%, LINDE S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y una velocidad

de flujo constante de 1 mL min^{-1} y programación de temperatura del horno de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (5 min), $150 \text{ }^\circ\text{C}$ (3 min) @ $3 \text{ }^\circ\text{C/min}$, $220 \text{ }^\circ\text{C}$ (5 min) @ $4 \text{ }^\circ\text{C/min}$.



Figura 17. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network GC System*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CENIVAM, UIS. Fecha: junio de 2012.



Figura 18. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890A GC System*. Fotografía tomada por La autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CENIVM, UIS. Fecha: junio de 2012.

3.5.3 Sistema de adquisición de datos. Los espectros de masas se obtuvieron empleando el método de ionización EI, con energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia permanecieron a 230 y 280°C para los análisis en columnas polar y apolar, respectivamente (Véanse **Secciones 3.5.1** y **3.5.2**). Los espectros de masas y las corrientes iónicas reconstruidas, TIC (*Total Ion Current*, por sus siglas en inglés) se obtuvieron mediante un analizador cuadrupolar, operado en modo de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*) a $4,75 \text{ scan s}^{-1}$, en el rango de masas de m/z 40-350 Da. Los datos cromatográficos y espectrométricos se obtuvieron y se procesaron con el sistema de datos *Chemstation* (G1701DA MSD).

3.5.4 Identificación. La identificación cualitativa de los compuestos en el AE y en el extracto, se realizó por comparación de los índices de retención lineales, IRL, y los espectros de masas experimentales, con los reportados en las librerías de compuestos Adams, NIST y Wiley [58, 59].

Los IRL se calcularon con base en los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos lineales desde C_6 hasta C_{25} , que se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas que se usaron para el AE y el extracto de la planta. Su determinación se realizó empleando la **Ecuación 3**.

————— **Ecuación 3**

En donde:

I_R = Índice de retención lineal del compuesto de interés;

n = Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés;

N = Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye después del compuesto de interés;

t_{RX} = Tiempo de retención del compuesto de interés;

t_{Rn} y t_{RN} = Tiempos de retención de n -alcanos que eluyen antes y después del compuesto de interés, respectivamente.

3.5.5 Cuantificación. La cuantificación de los compuestos presentes en las matrices se realizó por medio de la cromatografía de gases acoplada a un detector FID.

El análisis cuantitativo del AE y el extracto, se llevó a cabo en un equipo *Agilent Technologies 6890A Network GC System (Figura 19)* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU), acoplado a un detector FID (250°C), con un puerto de inyección *split/splitless* (250° C, relación de *split* 30:1) y un inyector automático *Agilent 7683B*. La separación de los analitos de las mezclas se realizó en una columna capilar de naturaleza apolar DB5-MS (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) con dimensiones de 60 m x 0,25 mm, 0,25 μm , d_i , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). El gas de arrastre empleado fue helio (He, 99,995%, LINDE S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi, y una velocidad de flujo constante de 1 mL min⁻¹. Las velocidades de flujos de gases de combustión en el detector de ionización en llama, FID, (aire e hidrógeno), se mantuvieron a 300 y 30 mL min⁻¹, respectivamente; el gas auxiliar fue nitrógeno(N₂, 99,995%, LINDE S.A.), a 30 mL·min⁻¹. Los datos obtenidos fueron procesados por medio del *software GC ChemStation Rev. B.01.03 (204)*.

La temperatura del horno del cromatógrafo de gases se programó de la misma manera que se describe en la **Sección 3.5.1**.

La cuantificación de los metabolitos se realizó mediante el método de estandarización interna, empleando como patrón interno, *Istd*, *n*-tetradecano, según la **Ecuación 4**.

Ecuación 4

En donde:

C_x = Concentración (g/L) del analito en la muestra;

C_{Istd} = Concentración (g/L) del *Istd*;

A_x = Área (cuentas) del pico cromatográfico del analito;

A_{Istd} = Área (cuentas) del pico cromatográfico del *Istd*.



Figura 19. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890A Network GC System*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CENIVAM, UIS. Fecha: junio de 2012.

3.6 AISLAMIENTO DE LA HERNANDULCINA

El aislamiento de la hernandulcina se realizó a partir del extracto SFE de *L. dulcis*. Para ello, el desarrollo del proceso se dividió en tres etapas, a saber: (1) Selección de las condiciones elución y de revelado; (2) Separación en columna y (3) Caracterización química del compuesto.

3.6.1 Selección de las condiciones de elución y de revelado. El primer paso fue la selección del sistema de elución y de revelado para extracto SFE por TLC, sobre placas cubiertas de gel de sílice 60 F₂₄₅. Se probaron diferentes mezclas de *n*-hexano:acetona, en diferentes proporciones (v/v).

Las placas cromatográficas se examinaron por medio de una cámara de luz UV a 254 y 366 nm, y fueron reveladas empleando vapores de yodo, I₂, y solución acuosa de H₂SO₄ al 5%.

3.6.2 Cromatografía en columna. La separación se llevó a cabo en una columna cromatográfica, la cual se cargó con ca. 8 g del extracto de la planta. La fase estacionaria fue gel de sílice 60 F₂₄₅. La fase móvil correspondió a una mezcla de solventes *n*-hexano:acetona, utilizando un aumento gradual de la polaridad.

3.6.3 Caracterización química del compuesto. La elucidación estructural del compuesto aislado se determinó mediante las siguientes técnicas instrumentales, a saber:

- ✓ **Espectroscopía de infrarrojo (IR):** el espectro infrarrojo se obtuvo en un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de *Fourier Bruker Tensor 27*, en ventanas de KBr, para muestras líquidas.

- ✓ **Resonancia magnética nuclear (RMN):** la toma de los espectros de resonancia magnética nuclear en los experimentos ^1H , ^{13}C , DEPT 135°, y los espectros bidimensionales de correlación homonuclear (COSY) y heteronuclear (HSQC y HMBC), se realizó en un espectrómetro *Bruker Avance-400* con un campo magnético de 9,4 T. El solvente fue cloroformo deuterado (CDCl_3 , estándar interno TMS 0,03% v/v).

- ✓ **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS):** el análisis cualitativo de la hernandulcina se realizó con base en el procedimiento descrito en la **Sección 3.5.1**.

- ✓ **Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-UV-DAD):** el análisis se realizó en un cromatógrafo líquido *Agilent Technologies 1200* (Véase **Figura 20**) (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU), equipado con una bomba cuaternaria *Agilent Technologies G1354A*, un inyector manual *Agilent Technologies Series 1200 G1328B* y un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD, *Diode Array Detector*, por sus siglas en inglés) *G1315B*. La separación se realizó en una columna apolar *Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18* (4,6 x 150 mm, 5 μm). Como fase móvil, se empleó una mezcla metanol-agua (80:20 v/v) en régimen isocrático (1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). La temperatura de la columna se mantuvo en 25 °C. Los datos obtenidos fueron procesados por medio del *software Agilent Chem Station LC version B.04.03-SP1* (87).

3.7 CUANTIFICACIÓN DE LA HERNANDULCINA

Debido a su labilidad térmica, la cromatografía líquida de alta eficiencia fue la técnica empleada para determinar la concentración de este compuesto en el AE y el extracto de la planta. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia con un detector UV-vis-DAD. Las condiciones del proceso de separación se reportan en la **Sección 3.6.3**.

La cuantificación se realizó empleando el método de estándar externo. La curva de calibración se realizó con concentraciones diferentes (0,5; 1; 2,5; 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 ppm) del compuesto aislado y purificado, que se empleó como compuesto de referencia.



Figura 20. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent 1200 Series*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica, CENIVAM, UIS. Fecha: junio de 2012.

Los límites de detección, LOD (*Limit of Detection*, por sus siglas en inglés) y de cuantificación, LOQ (*Limit of Quantification*, por sus siglas en inglés) se determinaron de acuerdo con la mínima señal analítica distinguible, y_L , que pueda ser medida y que no corresponda a una fluctuación estadística de la señal del blanco, según la **Ecuación 5**:

Ecuación 5.

Donde:

y_B = Promedio de las medidas del blanco;

S_B = Desviación estándar calculada para la curva de calibración;

K = Valor que se obtiene de acuerdo con el nivel de confianza que se escoja, (generalmente 3).

De esta manera, el LOD se determinó según la **Ecuación 6**:

Ecuación 6.

Donde m es la pendiente obtenida por regresión lineal de la curva de calibración. Sustituyendo la **Ecuación (5)** en la **(6)**, se obtiene que:

—

Ecuación 7.

El nivel mínimo de cuantificación, LOQ, se definió para un valor de $k=6$, según la **Ecuación 8**.

—

Ecuación 8.

3.8 DERIVACIÓN QUÍMICA

Con el fin de realizar el último paso confirmatorio de la estructura química de la hernandulcina y, a su vez, verificar su presencia en el AE y extracto de *L. dulcis*, se procedió a realizar la derivación química del compuesto aislado, así como del AE y extracto, para obtener un producto con mayor estabilidad térmica y realizar su análisis por GC-MS.

La técnica de derivación empleada fue la sililación. El desarrollo de este proceso se realizó con base en una modificación de la metodología descrita por Celis [26], en donde se empleaba BSTFA como agente sililante, en un medio de reacción de tolueno, a una temperatura de 50°C, por una hora. En este estudio, se utilizó la piridina como solvente/catalizador de la reacción, y la temperatura empleada fue de 55°C, por dos horas.

3.8.1 Derivación de la hernandulcina. La reacción de sililación se llevó a cabo de la siguiente manera: en un vial de reacción se colocó 1 mg ($4,23 \times 10^{-3}$ mmol) de hernandulcina y se adicionaron (0,63 mmol) μ L de BSTFA, respectivamente, junto con 168 μ L de piridina. El tubo de reacción fue sometido a calentamiento a una temperatura de 55°C y con agitación constante. El tiempo de reacción del proceso fue monitoreado y determinado por TLC, sobre placas de gel de sílice 60 F₂₄₅.

Finalmente, a la masa de reacción se adicionaron 2 mL de agua. Posteriormente, se realizó una extracción por lotes, empleando diclorometano (3 x 1mL). La fase orgánica se separó; la mezcla se llevó a sequedad bajo un flujo de nitrógeno. La muestra se preparó para el análisis cromatográfico, aforando a 1 mL con diclorometano.

Para corroborar la estructura química de los productos de la reacción de sililación del analito objeto de estudio, se realizó la identificación correspondiente, por medio de distintas técnicas instrumentales, a saber: espectroscopía infrarrojo (**Sección 3.6.3.**) y espectrometría de masas (**Sección 3.5.1.**).

3.8.2 Derivación del AE y el extracto. Una vez obtenido el derivado de la hernandulcina aislada, se procedió a realizar la misma metodología descrita en la **Sección 3.8.1** para el AE y extracto. El análisis de los derivados en el AE y en el extracto, se llevó a cabo mediante la GC-MS (**Sección3.6.3.**).

3.9 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA

La determinación de la capacidad antirradicalaria del extracto, el AE y la hernandulcina, se midió en un equipo lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., ModulusTM II Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, CA, EE.UU.), con placas de poli(estireno) de 96 pozos y equipado con módulos de absorbancia (UV-Vis) y fluorescencia (Véase **Figura 21**).



Figura 21. Equipo lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*. Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Fichas técnicas, CENIVAM, UIS. Fecha: junio de 2012.

Los resultados de los ensayos se compararon con los obtenidos de patrones certificados de antioxidantes sintéticos: el BHT y el α -tocoferol, y con los de un compuesto sesquiterpénico: el *trans*- β -cariofileno.

3.9.1 Capacidad de absorción de radicales libre de oxígeno ORAC. Para el desarrollo de este ensayo, se empleó el equipo lector de microplacas en el módulo de fluorescencia, con filtros que manejan longitudes de onda de $\lambda = 490$ nm de excitación y $\lambda = 510-570$ nm de emisión. La capacidad antioxidante del AE, extracto y la hernandulcina se midió por la inhibición en la disminución de la fluorescencia según la metodología reportada por Ou y colaboradores [74]; para este propósito, se utilizó la fluoresceína como indicador molecular y el blanco de ataque de los radicales peroxilo generados por el AAPH. La respuesta se da en términos del área bajo la curva (ABC), la cual es directamente proporcional al valor

ORAC expresado en mmol de Trolox[®] /peso de muestra. El cálculo se realizó con base en la **Ecuación 9**.

Ecuación 9.

En donde:

F_i = Fluorescencia en el tiempo i ;

F_0 = Fluorescencia en el tiempo inicial (0 min).

El valor neto de ABC se obtuvo restando el ABC blanco de la reacción al ABC de cada una de las mediciones, según la **Ecuación 10**.

Ecuación 10.

Los ensayos se realizaron por triplicado ($n=3$).

3.9.2 Ensayo de decoloración del catión radical ABTS^{•+}. El ensayo se realizó empleando espectroscopía VIS a una longitud de onda de $\lambda= 750$ nm; con base en el procedimiento descrito por Re y colaboradores [75]. Se preparó una solución *stock* del catión-radical ABTS^{•+}, mezclando una solución de ABTS (7mM) con persulfato de potasio, PDS (2,45mM). La mezcla se dejó reaccionar por 24 h, a 4°C, en ausencia de luz. Para el ensayo, la absorbancia del equipo se ajustó a $0,700 \pm 0,003$.

La respuesta de las muestras se determinó como el porcentaje de absorbancia del catión-radical ABTS^{•+}, según la **Ecuación 11**.

En donde:

A_0 = Absorbancia del catión-radical ABTS^{•+} sin inhibir;

A_f =Absorbancia del catión-radical ABTS^{•+} determinada después de la adición del posible antioxidante.

Se prepararon soluciones del AE, extracto y hernandulcina, de tal manera, que la inhibición de la solución del catión-radical ABTS^{•+} resultara entre el 10-80% del blanco de la absorbancia. Posteriormente, se determinó la capacidad antioxidante equivalente al Trolox[®] (TAC – μmol de Trolox[®] / g de sustancia) (n=3) del AE, extracto y hernandulcina aislados de *L. dulcis*.

4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El desarrollo experimental de este trabajo se dividió en 3 etapas: la primera, consistió en el aislamiento y caracterización química del aceite esencial y extracto de la planta; en la segunda, se realizó el aislamiento y elucidación estructural de la hernandulcina, seguido de su derivación química; en la tercera etapa, se evaluó la actividad antirradicalaria del AE, extracto y la hernandulcina. A continuación, se presenta la discusión de los resultados obtenidos de esta investigación.

4.1 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE

Al realizar estudios sobre especies vegetales, es importante tener certeza de la identidad botánica de la especie objeto de estudio. Para el presente trabajo de investigación, la especie *L. dulcis* Trevir., cultivada en parcelas experimentales en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, previamente se identificó en el Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad de Colombia, por el doctor José Luis Fernández, en el año 2007. Los resultados de la caracterización botánica de la planta se registran a continuación, en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Identificación taxonómica de *Lippia dulcis* Trevir. Tomado de [26].

Especie	Autor	Familia	No. COL
<i>Phyla (Lippia) dulcis</i>	(Trevir.) Moldenke	<i>Verbenaceae</i>	512079

4.2 SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

En la **Figura 22**, se presenta la curva de equilibrio, construida con los datos experimentales durante el secado a temperatura ambiente, correspondiente a la especie *Lippia dulcis* Trevir.

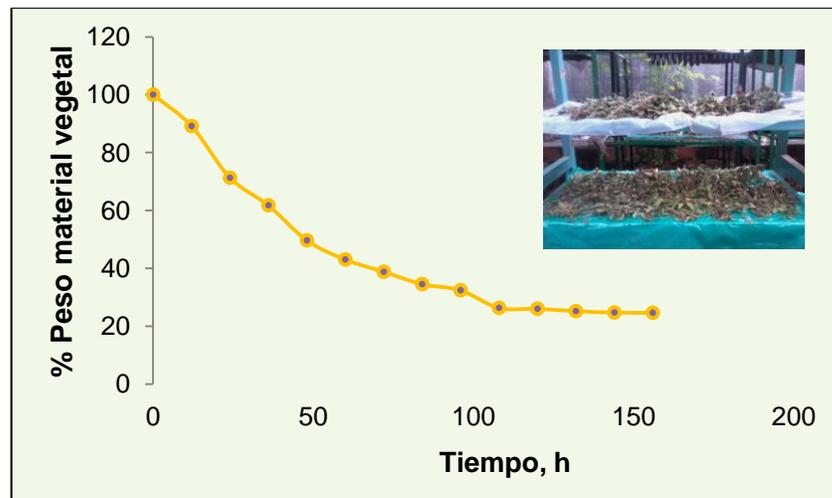


Figura 22. Curva de secado a temperatura ambiente para *Lippia dulcis* Trevir.

La gráfica representa el cambio del peso durante el proceso de secado de la planta, con respecto al tiempo. Como se puede observar, transcurridas aproximadamente 160 horas (ca. 7 días), se alcanzó la humedad de equilibrio, definida como la humedad más baja que puede conservar un material, en función de la humedad relativa del aire que lo envuelve. Se supone, entonces que el 78% en peso que perdió la planta, correspondía exclusivamente al agua contenida en esta. El 22% restante se compone de la masa del material vegetal y el agua remanente en equilibrio con la humedad relativa. Es importante resaltar que, al tratarse de un espacio abierto, el contenido de humedad final está sujeto a las variaciones en la humedad relativa del ambiente.

4.3 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE Y DEL EXTRACTO DE *Lippia dulcis* TREVIR.

El aceite esencial de *L. dulcis* Trevir., obtenido por MWHD, presenta un olor y sabor intensamente dulces y es de color amarillo. El rendimiento del proceso de la MWHD (n= 3), fue de $0,18 \pm 0,01\%$. A pesar de ser un rendimiento bajo, este valor es similar a otros reportados en la literatura [26-28]. El extracto de la planta también presenta un olor y sabor intensamente dulce; es de consistencia viscosa y de color anaranjado. El rendimiento del proceso SFE (n= 3), bajo las condiciones operativas empleadas (30 MPa, 313 K), fue de $1,41 \pm 0,2\%$.

Según Reverchon y De Marco [77], generalmente, en el proceso de extracción con fluido supercrítico, el aumento de la presión de extracción, a una temperatura constante, conduce a un mayor rendimiento, debido al aumento de la densidad del solvente. Sin embargo, las extracciones realizadas a 30 MPa y 313 K, presentaron un rendimiento menor, en comparación con los experimentos realizados por De Oliveira y colaboradores (12 MPa, 308 K, 3,4%) [29]. Este fenómeno se debe principalmente al tamaño del equipo usado en esta investigación, lo cual es sustentado por Meireles y colaboradores [78], quienes en estudios sobre el escalamiento del proceso SFE, determinaron que el principal inconveniente en los equipos a escala piloto, es la pérdida de extracto en las paredes de las tuberías.

Los metabolitos presentes en ambas matrices (AE y extracto), se identificaron por GC-MS. El análisis de los espectros de masas (EI, 70 eV), se realizó empleando los siguientes parámetros de integración de los picos cromatográficos: área de rechazo del pico en la base igual a 0,1 y un umbral de integración, *thshd*= 18. Con base en estas condiciones, en el AE y extracto de la planta se detectaron 40 y 28 compuestos, respectivamente; con cantidades relativas mayores de 0,1%, de los cuales se identificaron 30 compuestos (89,3%) en el AE, y 20 compuestos (90,3%), en el extracto. En la **Figura 23**, se muestran los perfiles cromatográficos,

obtenidos por GC-MS, de los metabolitos secundarios presentes en el AE y en el extracto SFE de la planta. La identificación de los picos cromatográficos, se reporta en la **Tabla 4**.

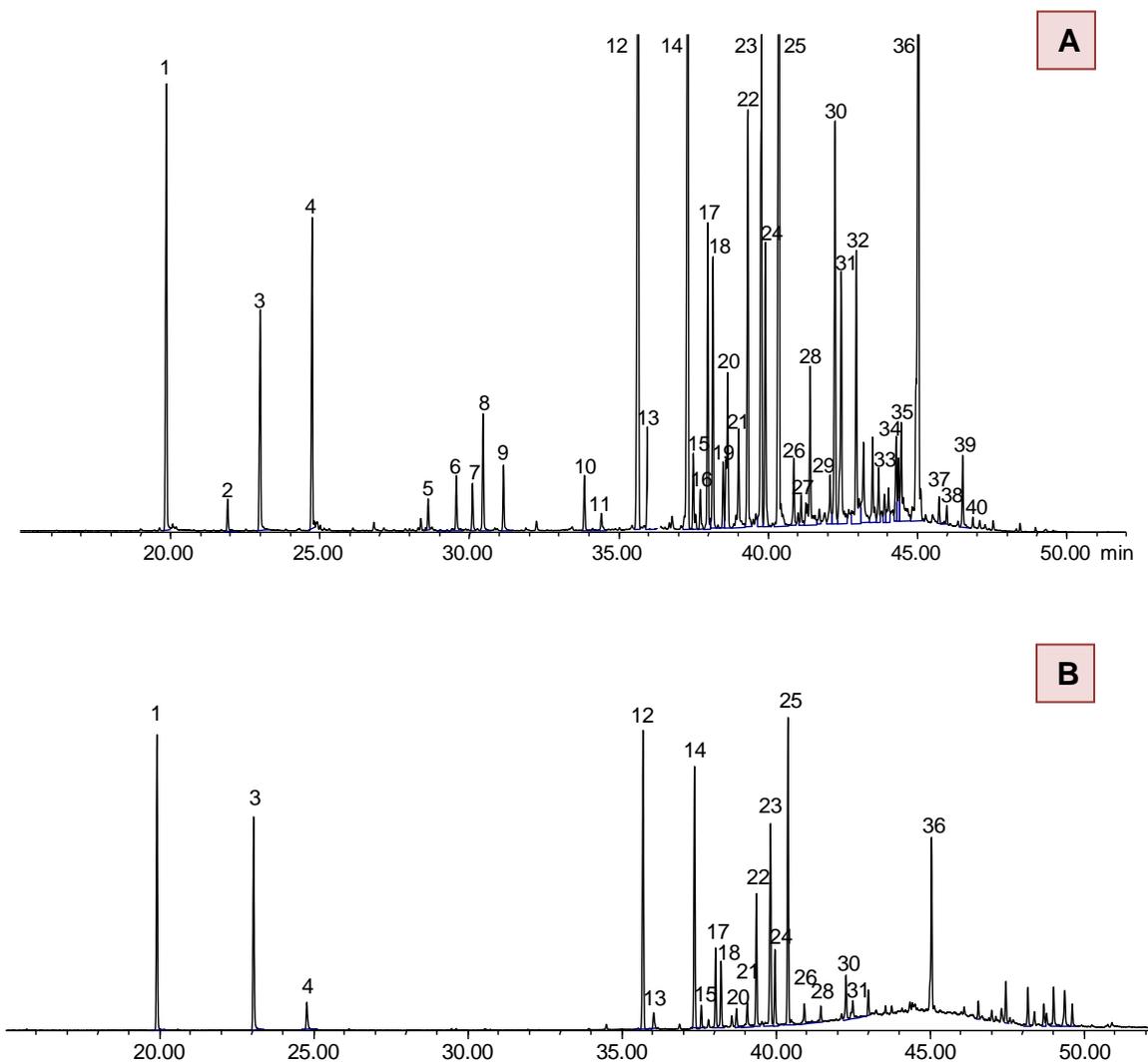


Figura 23. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS de los metabolitos secundarios aislados de: **A.** AE y **B.** Extracto de *Lippia dulcis* Trevir. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

Tabla 4. Identificación, cantidad relativa (%) y algunas notas odoríferas de los componentes principales del AE y del extracto de *Lippia dulcis* Trevir.

N° pico ^a	Compuesto	IRL		Cantidad relativa, %		Nota odorífera ^b
		DB-5	DB-WAX	AE	Extracto	
1	6-Metil-5-hepten-2-ona	984	1326	4,9	10,6	Picante
2	Limoneno	1032	1189	0,3	-	Limón
3	3-Metil-2-ciclohexen-1-ona	1058	1610	3,0	8,2	Floral
4	Linalol	1100	1540	2,5	1,3	Floral
5	N.I.	1199	1539	0,3	-	-
6	Citronelol	1225	1570	0,6	-	Rosa
7	Neral	1240	1691	0,5	-	Floral
8	Carvona	1249	1749	1,2	-	A menta
9	Geranial	1268	1735	0,8	-	A limón
10	δ-Elemeno	1340	1492	0,8	-	A madera
11	α-Cubebeno	1354	1462	0,4	-	Herbácea
12	α-Copaeno	1386	1500	8,3	11,7	A madera
13	β-Burbuneno	1395	1531	1,2	0,8	Herbácea
14	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1434	1617	9,9	9,8	A madera
15	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	1440	1592	0,9	0,9	A madera
16	<i>cis</i> -β-Farneseno	1447	1656	0,4	-	Dulce
17	<i>trans</i> -β-Farneseno	1454	1670	2,9	2,8	Dulce
18	Sesquisabineno	1459	1647	2,7	2,5	-
19	α-Humuleno	1469	1683	0,7	-	A madera
20	<i>allo</i> -Aromadrendeno	1475	1700	2,1	0,7	A madera
21	γ-Muroleno	1484	1491	1,2	1,1	Herbácea
22	<i>trans</i> -Murolo-4(15), 5-dieno	1493	1609	4,3	5,0	-
23	Biciclogermacreno	1508	1752	8,0	9,1	A madera
24	β-Bisaboleno	1513	1734	3,0	2,8	Dulce
25	δ-Cadineno	1528	1773	8,9	11,4	A tomillo
26	α-Bisaboleno	1544	1785	0,7	0,8	Balsámica
27	α-Calacoreno	1553	1931	0,3	-	A madera
28	<i>trans</i> -Nerolidol	1563	2037	2,1	0,7	Dulce
29	N.I.	1569	2019	0,4	-	-
30	Espatuleno	1591	2133	4,5	1,8	Herbácea

Continuación Tabla 4.

31	Óxido de cariofileno	1598	2015	3,4	1,0	Herbácea
32	N.I.	1617	2032	3,0	-	-
33	C ₁₅ H ₂₄ O	1645	2021	0,7	-	-
34	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	1670	2007	0,4	-	-
35	N.I.	1674	2096	1,7	-	-
36	α-Bisabolol	1695	2229	9,1	7,2	Floral
37	N.I.	1724	2271	0,2	-	-
38	N.I.	1757	2342	0,7	-	-
39	N.I.	1658	2151	1,8	-	-
40	N.I.	1667	2468	1,0	-	-

a Número de pico en la **Figura 23**; **b** Tomado de [79]; **N.I.** No identificado.

La composición del AE y el extracto de *L. dulcis* se caracteriza principalmente por la presencia de sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados. Las distintas familias de compuestos químicos se representan en la **Figura 24**.

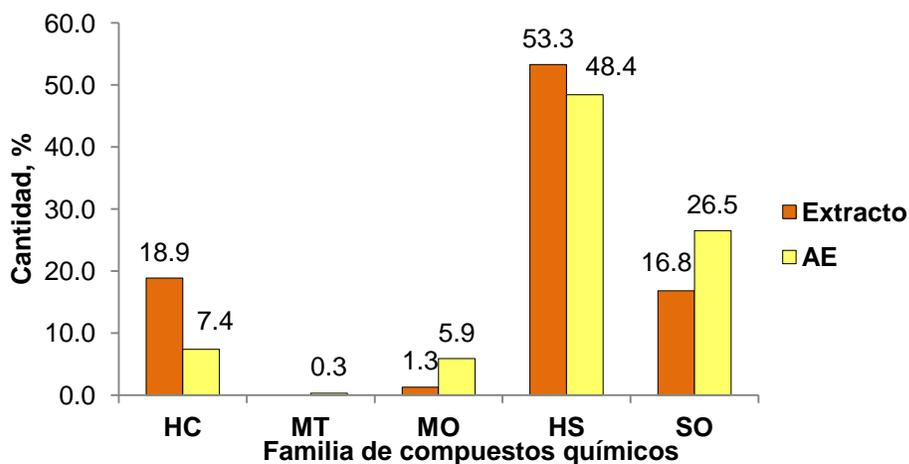


Figura 24. Clasificación por familias de compuestos químicos presentes en el AE y en el extracto de *L. dulcis*. **HC**: Hidrocarburos producto de descomposición de la hernandulcina. **MT**: Monoterpenos. **MO**: Monoterpenos oxigenados. **HS**: Hidrocarburos sesquiterpénicos. **SO**: Sesquiterpenos oxigenados.

Del total de las muestras del AE y extracto, el 48,4 y 53,3% respectivamente, corresponden a hidrocarburos sesquiterpénicos, representados por el α -copaeno (8,3 y 11,7%), *trans*- β -cariofileno (9,9 y 9,8%), δ -cadineno (8,9 y 11,4%), bicilogermacreno (8,0 y 9,1%) y β -bisaboleno (3,0 y 2,8%). En menor proporción se encuentran algunos sesquiterpenos oxigenados (26,5 y 16,8%, respectivamente), representados por el α -bisabolol (9,1 y 7,2%) (Véase **Figura 25**).

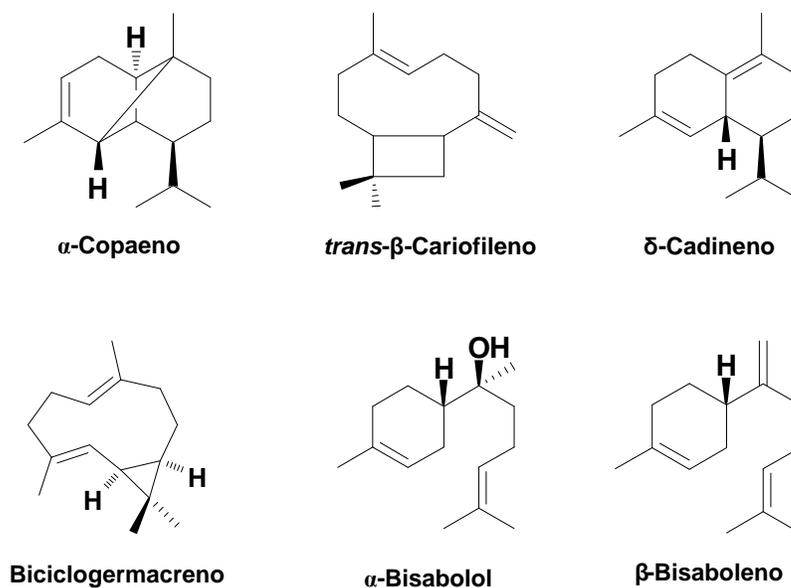


Figura 25. Estructuras químicas de los componentes mayoritarios del AE y extracto de *L. dulcis* Trevir.

En el AE se encuentra en baja proporción el monoterpeno limoneno (0,3%) y algunos monoterpenoides (5,3% del total de la muestra), dentro de los cuales se encuentran el linalol, (2,5%), citronelol (0,6%), neral (0,5%), carvona (1,2%) y geranial (0,8%). Cabe destacar, que aplicando al perfil cromatográfico los

parámetros de integración especificados, en el extracto SFE solo se detectó un monoterpeno oxigenado, correspondiente al linalol (1,3%). La razón por la cual ocurre esto, se debe a la técnica de extracción, puesto que MWHD, es una técnica para el aislamiento de sustancias de bajo peso molecular y alta volatilidad; contrario de la SFE, que se encarga principalmente de extraer compuestos de peso molecular mayor y volatilidad menor que la de los constituyentes de los AE.

La hernandulcina y su análogo, la *epi*-hernandulcina, no se registraron en el cromatograma del AE y del extracto, debido a su conocida termolabilidad. En vez de ello, se detectaron los productos de su degradación térmica, correspondientes a la 6-metil-5-hepten-2-ona (4,9 y 10,6%) y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (3,0 y 8,2%), respectivamente. El alcanfor, reportado como componente mayoritario en el AE de la planta, cultivada en México [4], tampoco fue detectado en las matrices estudiadas, lo cual indica que la planta cultivada en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, corresponde al quimiotipo hernandulcina

De acuerdo con la composición química del AE y del extracto, dentro de los componentes mayoritarios, incluida la hernandulcina, se encuentran compuestos tipo bisaboleno (α -bisabolol, β -bisaboleno, α -bisaboleno). Por lo tanto, se puede deducir, que las rutas metabólicas principales de la planta corresponden a las del ácido mevalónico y MEP (Véase **Figura 26**).

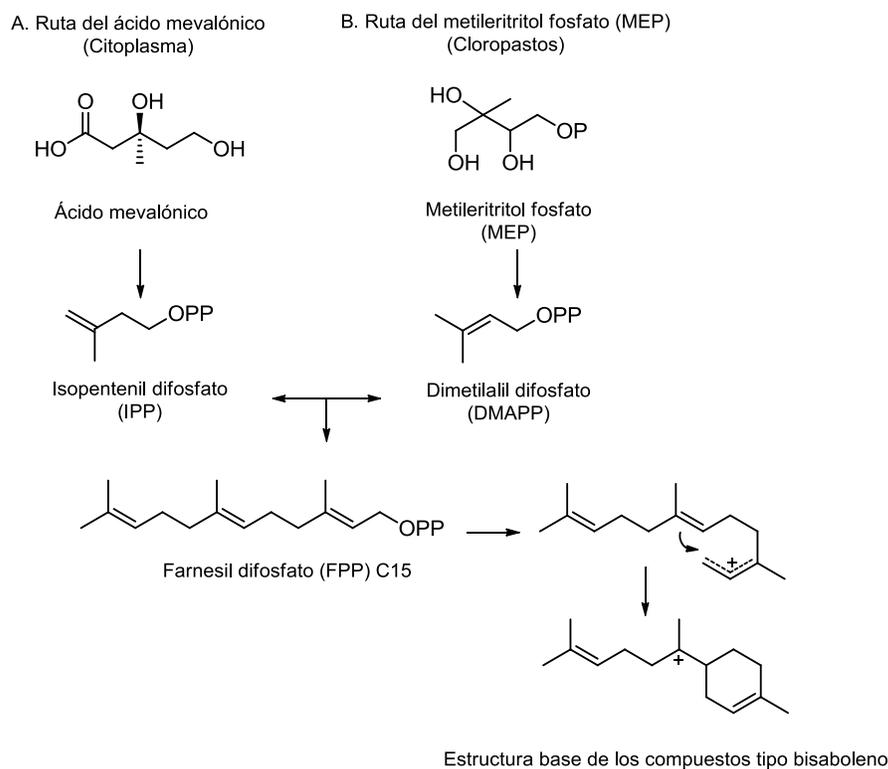


Figura 26. Principales rutas metabólicas de *L. dulcis*. Generación de estructuras químicas tipo bisaboleno.

4.4 AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LA HERNANDULCINA

Con base en los resultados de rendimiento obtenidos de los procesos de MWHD y SFE (**Sección 4.3**), se optó por aislar la hernandulcina del extracto de la planta. El primer paso para este procedimiento consistió en la escogencia de las condiciones operativas en CC y TLC. Para esto, se probaron, como fase móvil mezclas de *n*-hexano:acetona, en distintas proporciones v/v (Véase **Figura 27**). El resultado de dichos experimentos condujo a la selección de un sistema de elución con *n*-hexano:acetona 85:15% v/v, que permitió la mayor separación de los compuestos del extracto SFE en la placa cromatográfica.

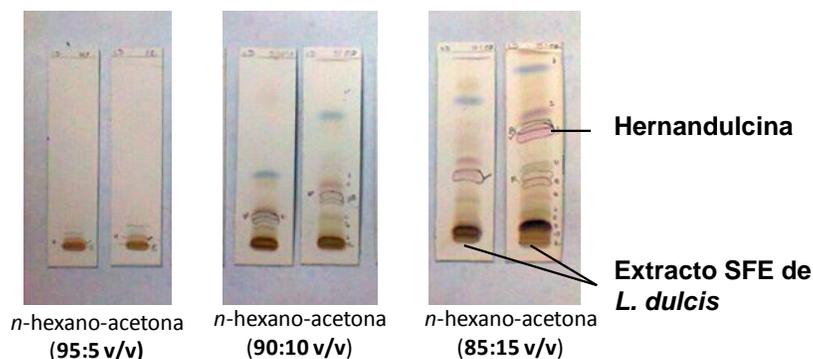


Figura 27. Sistemas de disolventes de elución evaluados en el extracto SFE de *L. dulcis*, para el aislamiento de la hernandulcina por CC y TLC. Revelado: Solución de H₂SO₄ al 5%.

La fracción obtenida por CC correspondió a un aceite de coloración ligeramente amarilla y con un marcado sabor dulce. El monitoreo de dicha fracción, por TLC, dio como resultado una mancha con un valor R_f de 0,51 (Véase **Figura 28**).

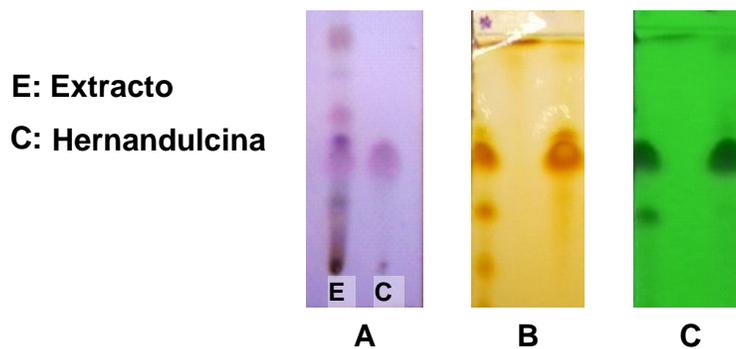


Figura 28. Placa cromatográfica del extracto y de la hernandulcina aislada, bajo tres sistemas de revelado: **A.** Solución de H₂SO₄ al 5%; **B.** Vapor de yodo, I₂ y **C.** Luz ultravioleta, λ = 366 nm.

4.4.1 Análisis por GC-MS. En la **Figura 29**, se muestra el perfil cromatográfico, correspondiente al análisis por GC-MS del compuesto aislado. De acuerdo con lo anteriormente descrito, para la hernandulcina se observan los productos de su degradación térmica, correspondientes a **1.** 6-Metil-5-hepten-2-ona y **2.** 3-Metil-2-ciclohexen-1-ona.

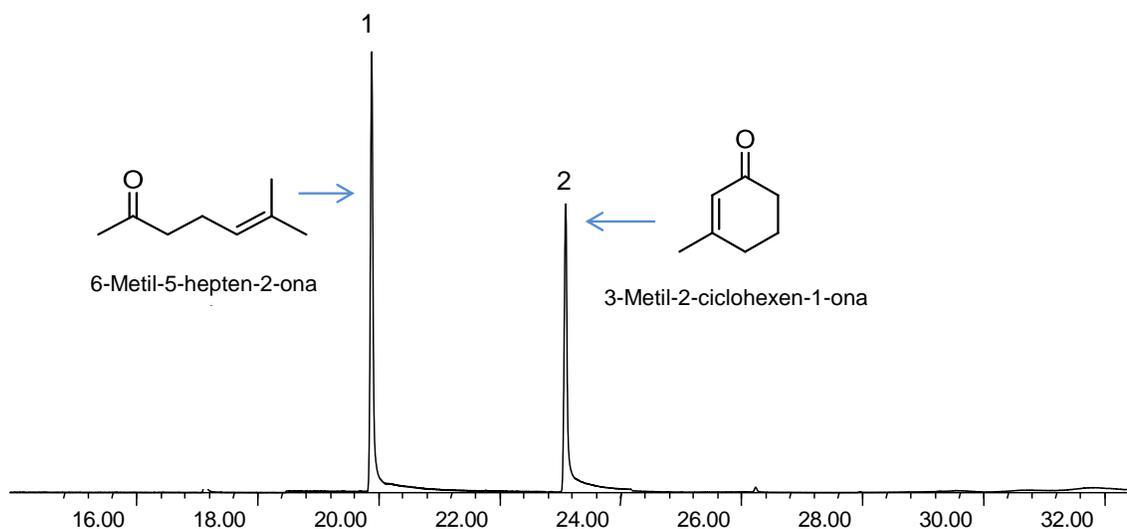


Figura 29. Perfil cromatográfico por GC-MS de la hernandulcina. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

El espectro de masas de la 6-metil-5-hepten-2-ona (Véase **Figura 30**), presenta su ion molecular (M^{+}) en m/z 126 (8%). El patrón de fragmentación propuesto para esta estructura química se ilustra en la **Figura 31**.

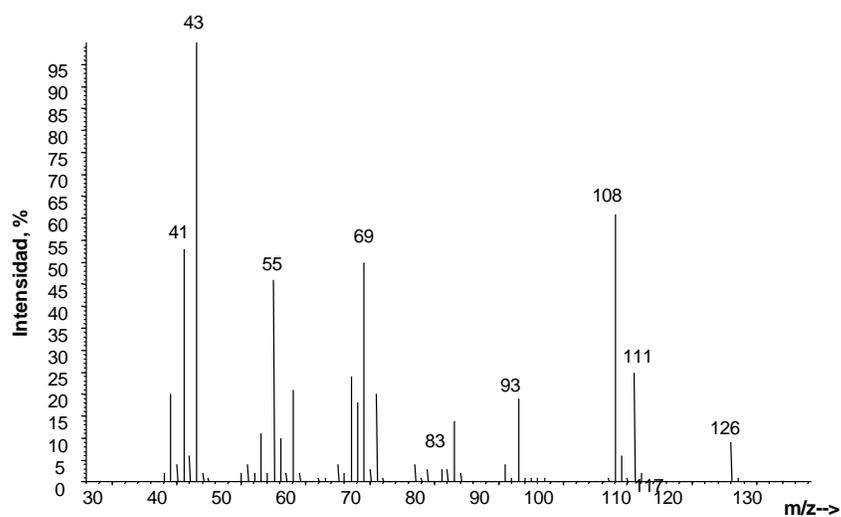


Figura 30. Espectro de masas (EI, 70 eV) de la 6-metil-5-hepten-2-ona.

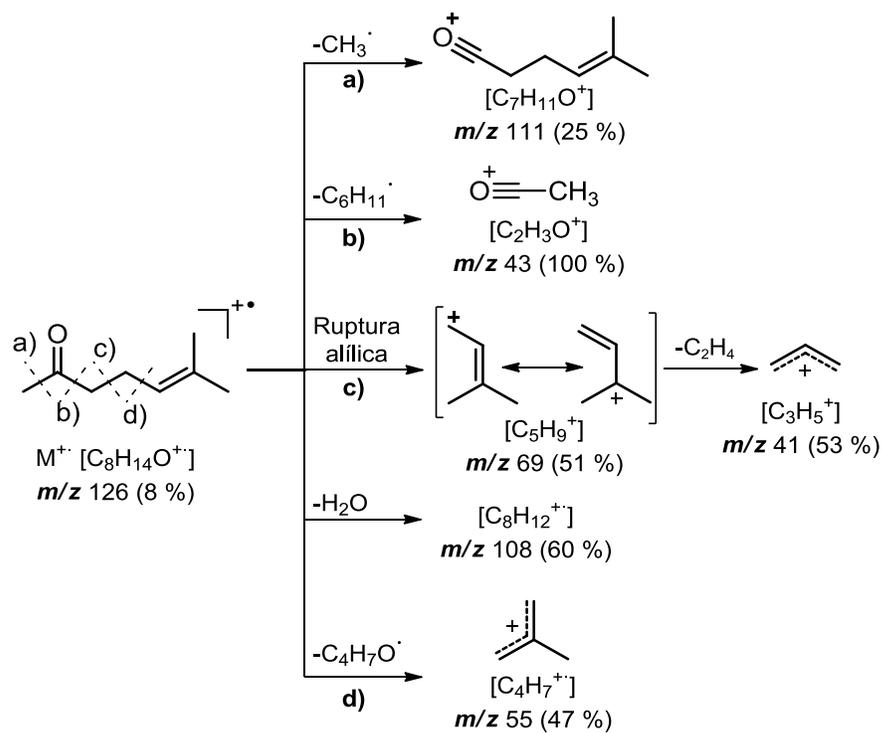


Figura 31. Principales rutas de fragmentación de la 6-metil-5-hepten-2-ona.

En la ruta de fragmentación propuesta, ocurre inicialmente la pérdida de 15 u, típica de la ruptura α en metilcetonas, y se da el fragmento en m/z 111 (25%). La formación del ion pico de base, surge a través de la ruptura α , fragmentación típica de la metilcetona; se genera el catión CH_3CO^+ en m/z 43 (100%). Dada la insaturación en la cadena alquílica, es posible que ocurra una ruptura alílica, a partir de la escisión del enlace β con respecto al doble enlace, generando el fragmento en m/z 69 (51%); este a su vez, decae por pérdida de un fragmento C_2H_4 y provee el catión alílico en m/z 41 (53%). Es característico de los iones moleculares, provenientes de cetonas con largas cadenas alifáticas, la presencia del fragmento $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, formado a partir de un reordenamiento que involucra intermediarios cíclicos. Este hecho se evidencia en la aparición del fragmento en m/z 108 (60%), que corresponde a la pérdida de 18 u del M^+ . Se observa también la ruptura α con respecto al doble enlace en el ion M^+ y se genera el catión alquílico en m/z 55 (47%).

Se presenta el espectro de masas de la 3-metil-2-ciclohexen-1-ona en la **Figura 32**; el ion molecular se observa en m/z 110 (45%).

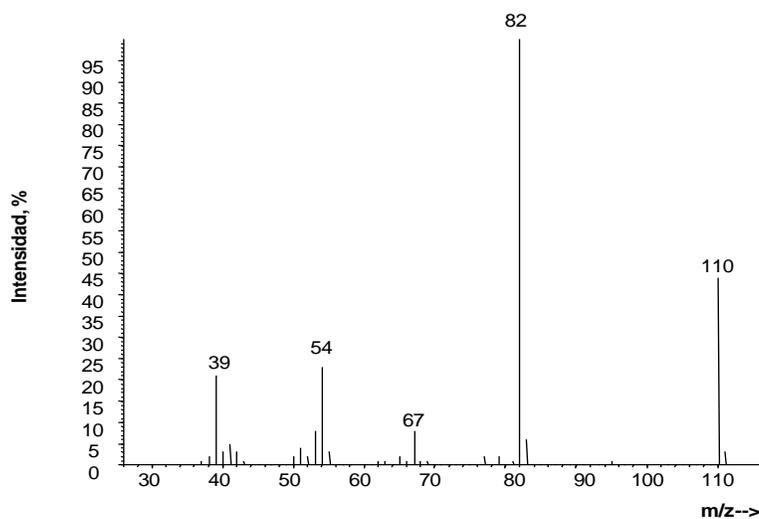


Figura 32. Espectro de masas (EI, 70 eV) de la 3-metil-2-ciclohexen-1-ona.

La ruta de fragmentación propuesta para este compuesto se detalla en la **Figura 33**.

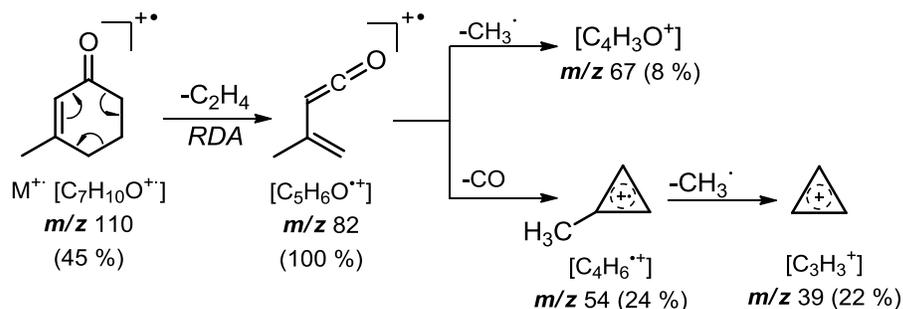


Figura 33. Principales rutas de fragmentación de la 3-metil-2-ciclohexen-1-ona.

La fragmentación propuesta para la 3-metil-2-ciclohexen-1-ona ocurre inicialmente con una ruptura retro-Diels-Alder, RDA, del sistema α,β -insaturado de la ciclohexenona, que consta de la escisión simple de dos enlaces alílicos en el ciclo de seis miembros con un enlace doble. Como resultado de la ruptura RDA, se produce el fragmento en m/z 82 (100%), el ion pico de base. Este, a su vez, genera los fragmentos en m/z 67 (8%) y 54 (24%), por la pérdida del radical metilo y una molécula de CO, respectivamente.

4.4.2 Análisis por HPLC-DAD. En la **Figura 34** se presenta el perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD de la hernandulcina, aislada del extracto SFE de *L. dulcis*. Se observa un pico cromatográfico, intenso (98% de pureza), junto con una pequeña impureza correspondiente a la *epi*-hernandulcina [29], pero que no representa un inconveniente para continuar con la caracterización espectroscópica, ni para la cuantificación del analito de interés, al tratarse de su epímero estructural.

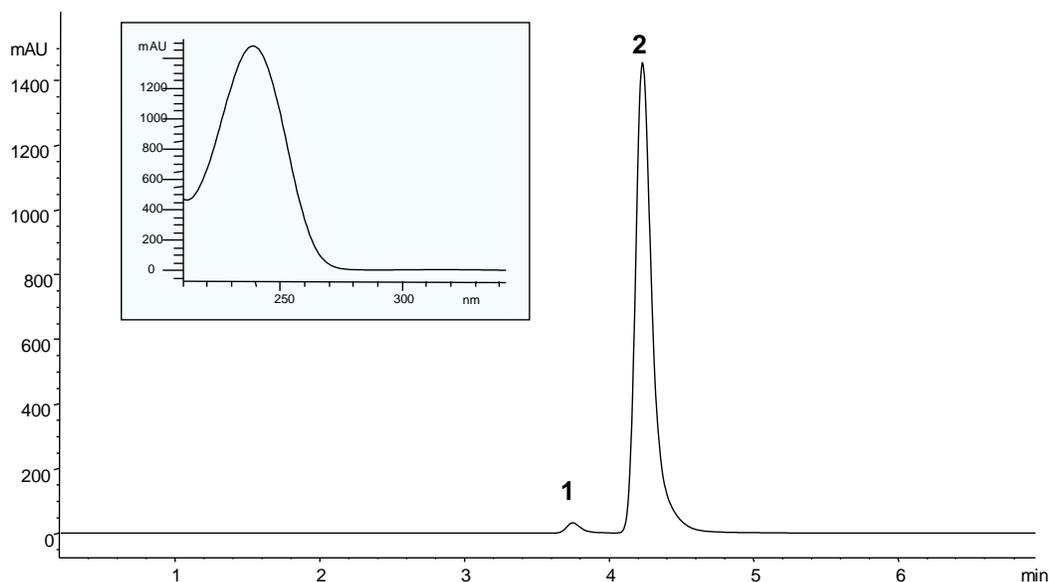


Figura 34. Perfil cromatográfico por HPLC-DAD y espectro UV-Vis de la hernandulcina aislada.

En la **Tabla 5** se reportan los tiempos de retención, la cantidad relativa y la longitud de onda máxima determinada por HPLC-DAD, para el análisis de la hernandulcina aislada.

Tabla 5. Análisis por HPLC-DAD de la hernandulcina aislada.

N° pico	Compuesto	t_R , min (n=3)	CV, %	Cantidad relativa, %	$\lambda_{m\acute{a}x}$, nm
1	<i>epi</i> -Hernandulcina	3,78 ± 0,01	0,18	1,9	236
2	Hernandulcina	4,27 ± 0,03	0,67	98,1	

4.4.3 Análisis por espectroscopía UV-Vis. Con base en el espectro UV-Vis (Véase **Figura 34**), es posible dar una estimación de los grupos cromóforos de

mayor contribución presentes en la molécula. La máxima banda de absorción, observada en 236 nm ($\lambda_{\text{máx}}$, $\log \epsilon \approx 3$), corresponde principalmente a la señal generada por las transiciones $\pi\text{-}\pi^*$, propias del sistema carbonílico α,β -insaturado.

En la **Tabla 6**, se muestra la relación del valor experimental de $\lambda_{\text{máx}}$, observado para la hernandulcina, con una aproximación calculada a partir de la regla de Woodward [80, 81]; sumatoria que permite estimar, de modo teórico, la absorción de la transición $\pi\text{-}\pi^*$, de acuerdo con los grupos funcionales presentes en una molécula orgánica ($\lambda_{\text{máx}}$ en nm).

Tabla 6. Grupos funcionales cromóforos presentes en la hernandulcina y su valor de absorbancia teórico, según Woodward [80].

				Total estimado, nm ↓
	Valor base	Sustituyente en C- β	Doble enlace exocíclico	
	215	+12	+5	231
Valor experimental 236 nm				

De esta manera, se puede concluir que, con base en las transiciones electrónicas, reportadas en la literatura para distintos grupos cromóforos y el cálculo estimado, según la regla de Woodward para la $\lambda_{\text{máx}}$, la cetona cíclica, el metilo sustituyente en C3 (posición β) y el doble enlace exocíclico entre C4' y C5' son los principales grupos funcionales, responsables de la máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}}=236$ nm) de la hernandulcina en el espectro UV-Vis.

4.4.4 Análisis por espectroscopía de infrarrojo. El análisis IR, permitió de manera preliminar, corroborar los principales rasgos estructurales de los grupos funcionales de la molécula (Véase **Figura 35**).

La inspección del espectro permite observar la banda de absorción propia del grupo hidroxilo (-OH) en 3475 cm^{-1} , que corresponde a la vibración de tensión (Vib. T.) del enlace O-H en C1. En la región de 2971 a 2859 cm^{-1} , aparece una serie de bandas intensas correspondientes a los enlaces C-H y C=C (Vib. T.), característicos de los alquenos cíclicos. La aparición de la banda intensa y definida del grupo carbonilo α,β -insaturado en 1648 cm^{-1} , sumada a las bandas de los diferentes grupos $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2-$ presentes en la región de 1453 a 1125 cm^{-1} constituyen una evidencia de la presencia del fragmento ciclohexanoico α,β -insaturado y de la cadena alifática exocíclica, enlazada al carbono C-6.

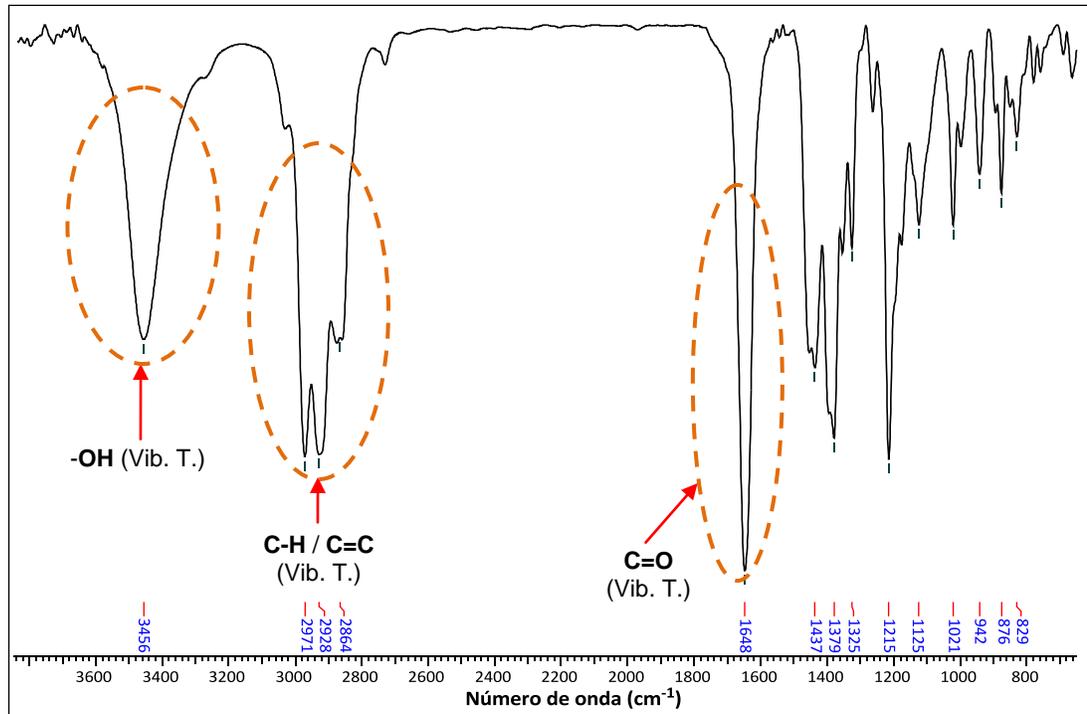


Figura 35. Espectro infrarrojo experimental de la hernandulcina.

4.4.5 Análisis por resonancia magnética nuclear. Finalmente, la estructura de la (6S, 1'S)-hernandulcina fue confirmada mediante el uso de RMN monodimensional (^1H , ^{13}C , DEPT-135°) y experimentos bidimensionales de correlación homonuclear (COSY ^1H - ^1H) y heteronuclear (HSQC ^1H - ^{13}C y HMBC ^1H - ^{13}C). El análisis permitió adjudicar de forma acertada la totalidad de las señales en los espectros, acorde con la estructura molecular propuesta.

En el espectro de RMN- ^1H (Véase **Figura 36**), es posible apreciar las señales correspondientes a los diversos grupos de protones presentes en la molécula. Iniciando desde campos bajos hasta campos altos, se ubican las señales a 5.85, 5.29 y 5.09 ppm correspondientes a los protones 2-H, -OH y 4'-H, respectivamente. Esta última señal corresponde al protón vinílico enlazado a C-4', que aparece como un triplete (t, $J = 7.1$ Hz) dada la presencia de los protones metilénicos enlazados a C-3', que aparecen como multipletes (m) en 2.00-1.96 Hz para 3'-H_a y 2.08-2.18 para 3'-H_b.

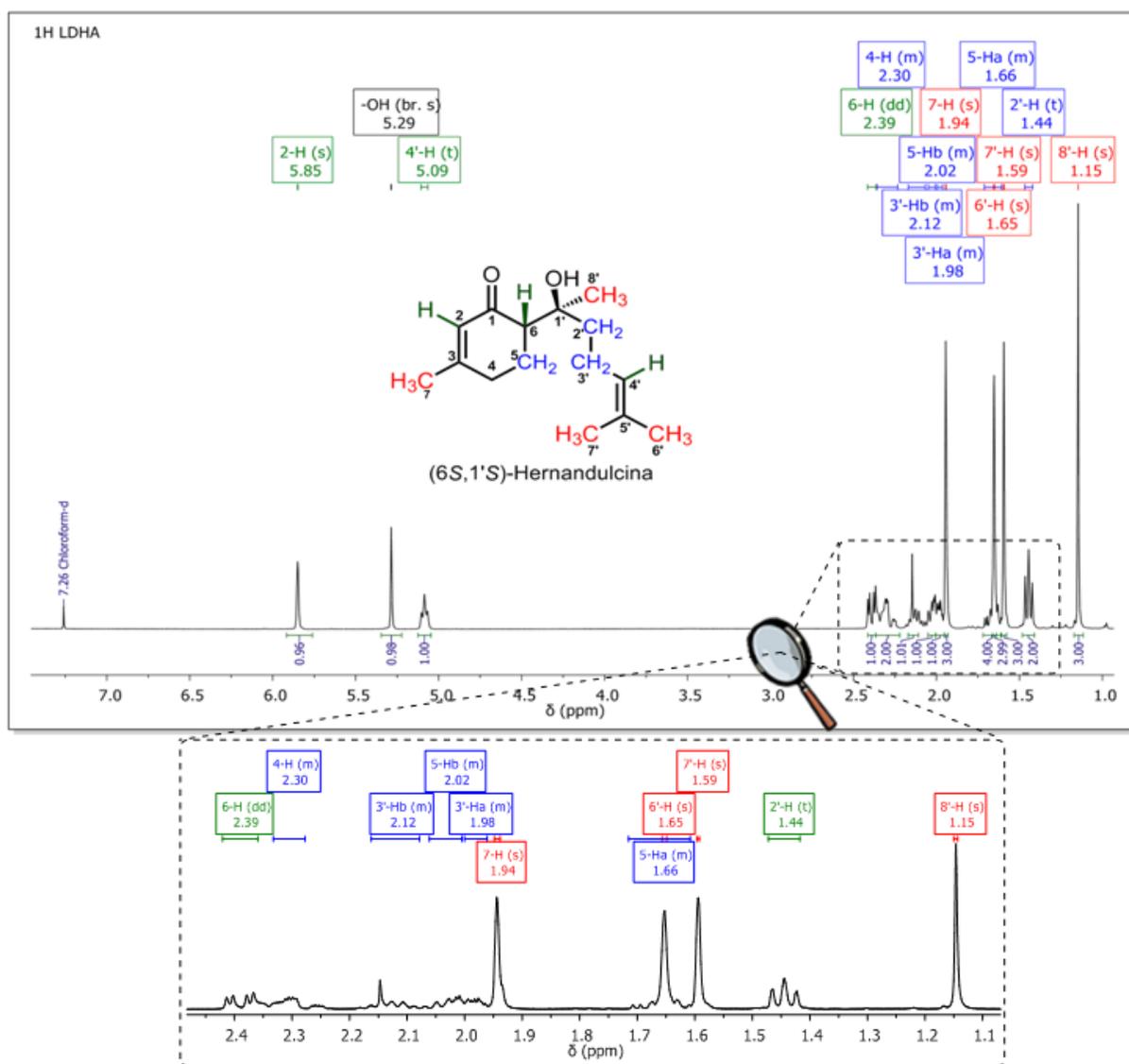


Figura 36. Espectro de RMN-¹H de la hernandulcina.

Dada la configuración espacial que adquiere el núcleo cíclico de la hernandulcina, es factible el estudio de la estereoquímica de misma. La **Figura 37a** muestra la disposición de los protones enlazados a los carbonos C-5 y C-6. Si la disposición del protón metínico 6-H es axial, tal como lo establece su configuración absoluta (6S), este debería aparecer como un doblete de dobletes (dd), dado que tiene dos protones vecinales (5-H_{ax} y 5H_{eq}), con constantes de acoplamiento en un rango de

11-13 Hz y de 2-5 Hz; características de las interacciones axial-axial (ax/ax) y axial/ecuatorial (ax/eq), respectivamente.

Este hecho es observado, dado que la señal correspondiente al protón metínico 6-H, aparece en la región de campos altos en 2.39 ppm como un dd con constantes de acoplamiento de 14.1 y 4.6 Hz, valores que confirman la orientación espacial del protón en mención, como axial, asignándole así la configuración absoluta 6S (Véase **Figura 37b**).

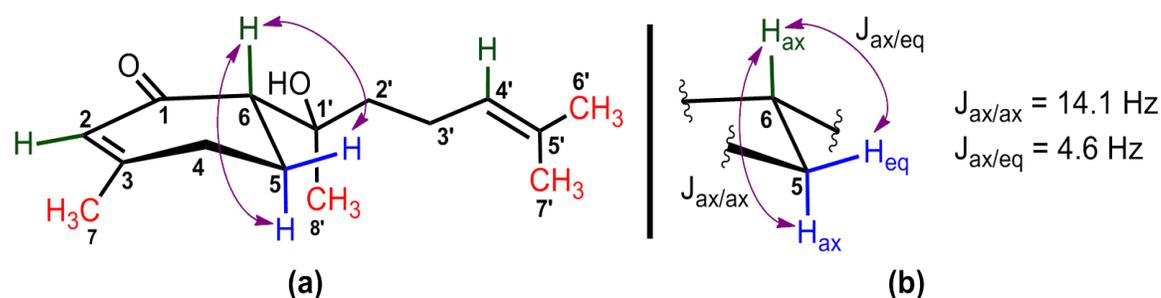


Figura 37. Configuración estereoquímica de la hernandulcina en C-6.

No es posible asignar la orientación espacial del estereocentro en C-1' a partir de las constantes de acoplamiento observadas, dado que este es un carbono cuaternario. Compadre y colaboradores [3], realizaron el análisis de la estereoquímica de C-1' a través del experimento NOE (*Nuclear Overhauser Effect*, por sus siglas en inglés). En nuestro caso, dado que corresponde a un compuesto de origen natural, es posible afirmar que la estereoquímica de este carbono tiene la configuración absoluta 1'S. Este hecho es validado por Mori y Kato [19], quienes determinaron que de los cuatro posibles isómeros, la (6S, 1'S)-hernandulcina es la única responsable del marcado sabor dulce, característica que fue evidenciada en el proceso de aislamiento. Los protones metilénicos en C-5

aparecen como multipletes en 1.63-1.71 y 2.05-2.01 para 5-H_a y 5-H_b, respectivamente.

Del mismo modo aparecen como un multiplete los protones metilénicos enlazados en C-4 en 2.24-2.36 ppm, y como un triplete (t) en 1.44 ppm ($J = 8.4$ Hz) los protones metilénicos enlazados a C-2'. En la región de campos altos aparecen las cuatro señales que corresponden a los grupos metilo presentes en la molécula como singuletes (s) en 1.94, 1.65, 1.59 y 1.15 ppm para los protones 7-H, 6'-H, 7'-H y 8'-H, respectivamente.

Los experimentos de acoplamiento homonuclear ^1H - ^1H -COSY (*Correlation Spectroscopy*, por sus siglas en inglés) y heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*, por sus siglas en inglés) permitieron confirmar la asignación realizada. El primero de ellos ratificó los acoplamientos entre protones geminales (J^2) y vecinos (J^3) a través de la inspección del respectivo pico entre las señales que interactúan (Véase **Figura 38**).

El segundo experimento determina la conectividad entre los protones presentes en la molécula y el carbono al cual está enlazado. Debido a la naturaleza del protón del grupo-OH en el carbono C-1', no se registró interacción alguna con ninguno de los carbonos. Igualmente, se realizó la asignación del respectivo carbono a la señal de ^1H de acuerdo con el acoplamiento observado, señalando el corrimiento químico de los cuatro carbonos cuaternarios ya que no exhiben interacción alguna (Véase **Figura 39**).

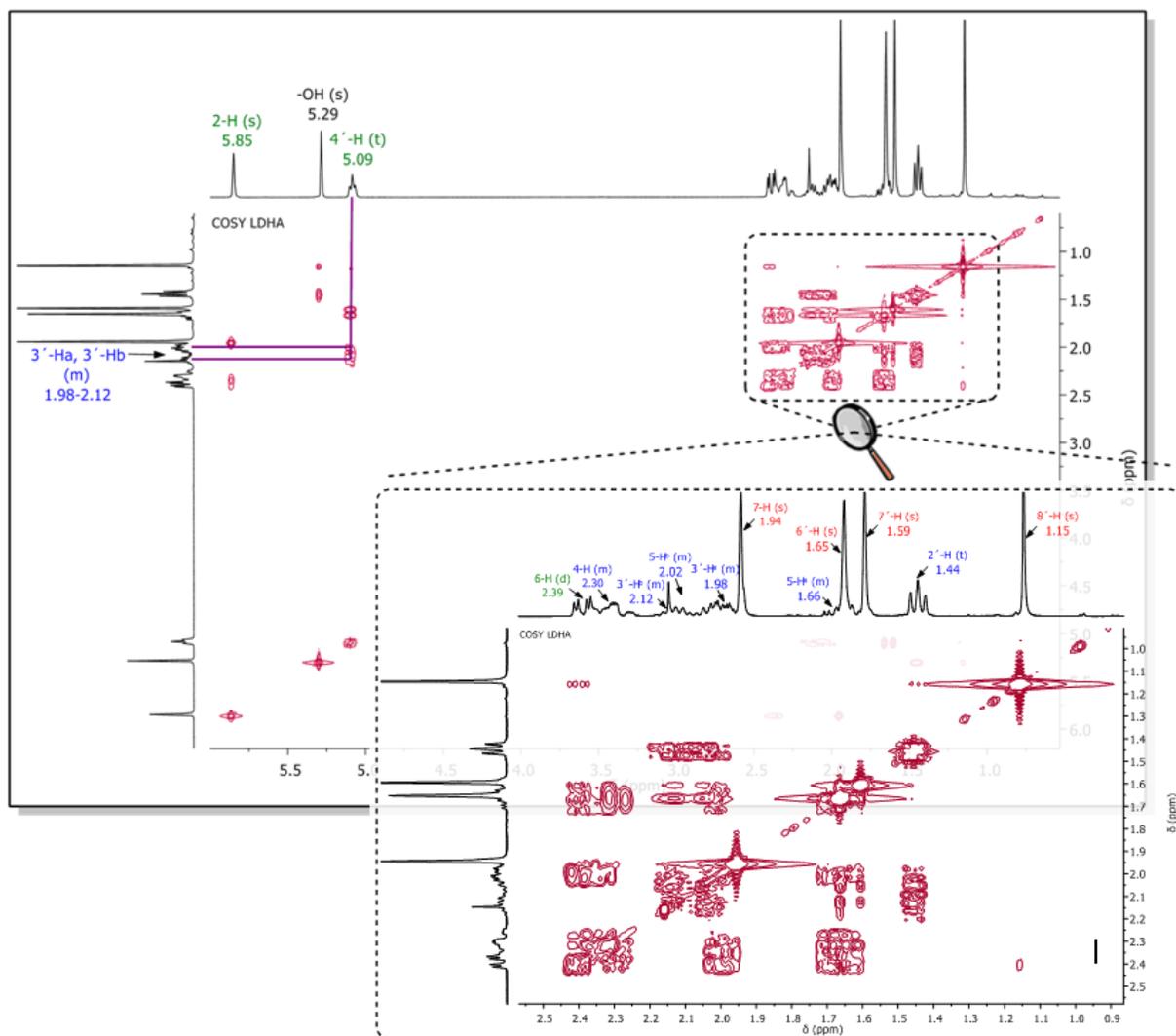


Figura 38. Experimento de RMN de acoplamiento homonuclear ^1H - ^1H -COSY.

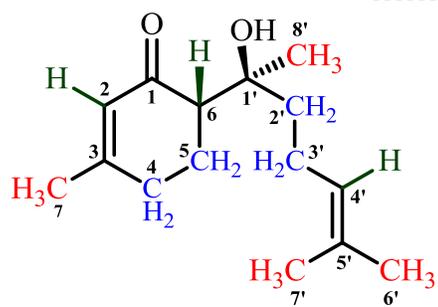
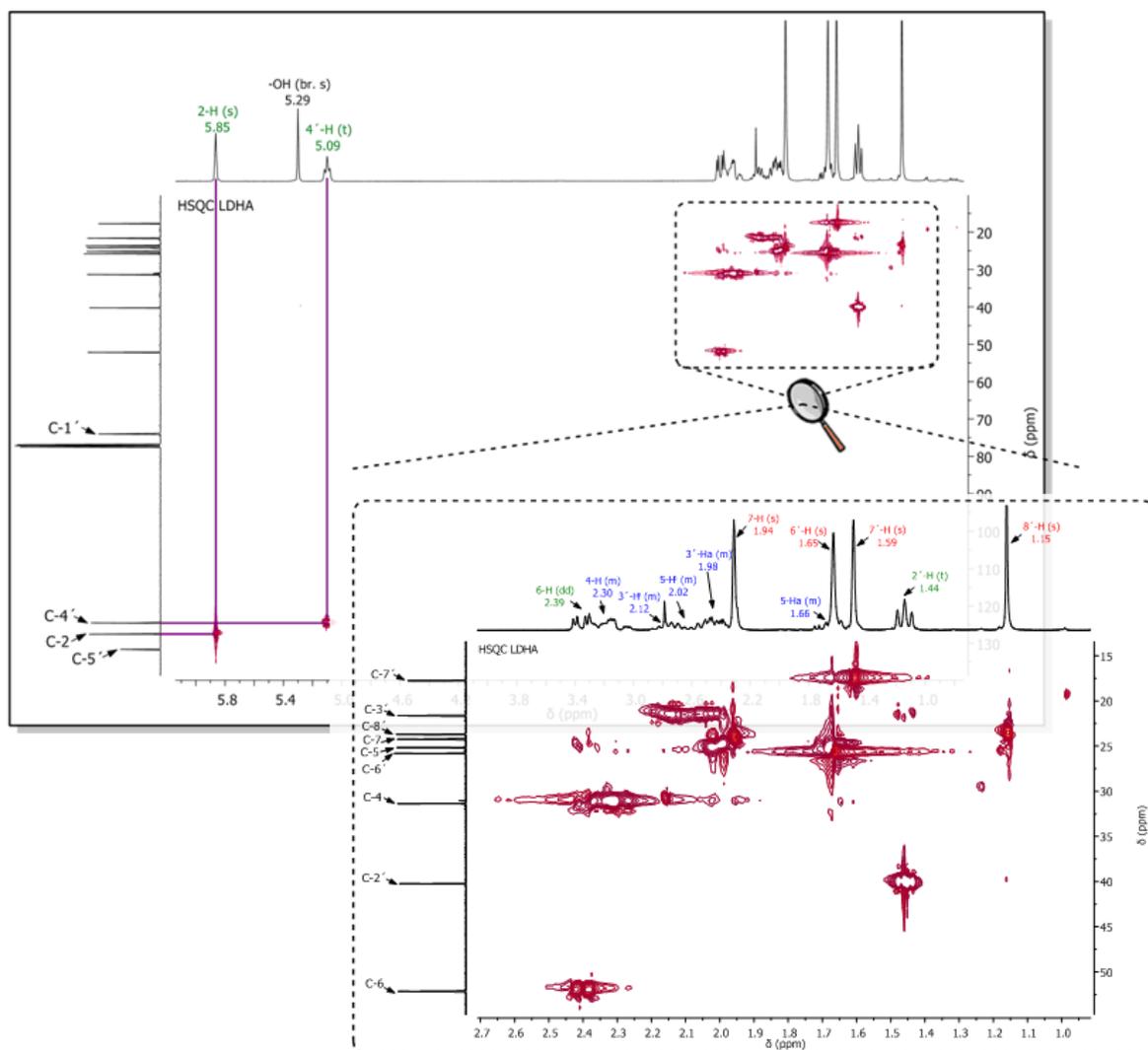


Figura 39. Experimento de RMN de acoplamiento heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC.

El análisis del espectro de RMN- ^{13}C de la (6S, 1'S)-hernandulcina indicó el número de carbonos presentes en la molécula. La naturaleza de cada carbono es revelada por su ubicación en las distintas regiones del espectro, demostrando coherencia con la estructura de la molécula en estudio. Se resalta la presencia del carbono carbonílico C-1 en 204.25 ppm, los carbonos pertenecientes a los enlaces dobles en la región de 163 a 124 ppm y los carbonos metilénicos y metílicos en la región de 75 a 16 ppm. La superposición del espectro DEPT-135° sobre el de ^{13}C permitió distinguir las señales que pertenecen a los cuatro carbonos metilénicos, ya que aparece la señal de estos con fase negativa; del mismo modo, se distinguieron los cuatro carbonos cuaternarios, al no registrar señal alguna en DEPT-135° (Véase **Figura 40**).

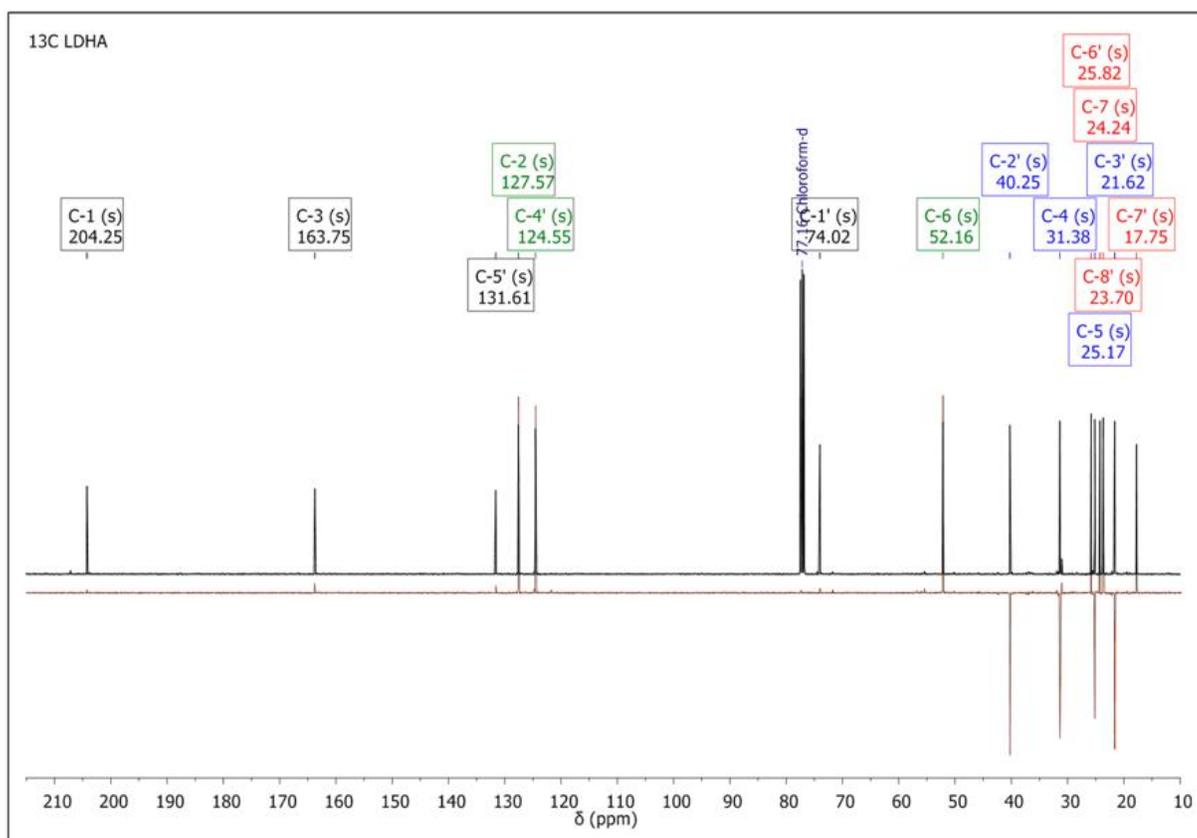


Figura 40. Superposición de los experimentos de RMN C^{13} y DEPT-135°.

En último lugar, la elucidación estructural culminó con el análisis del espectro ^1H - ^{13}C HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, por sus siglas en inglés). Dada la capacidad del experimento de revelar las interacciones entre los núcleos ^1H - ^{13}C a través de dos o más enlaces, fue posible ratificar la coherencia en la asignación realizada, observando en el espectro los principales acoplamientos a largo alcance (Véase **Figura 41**).

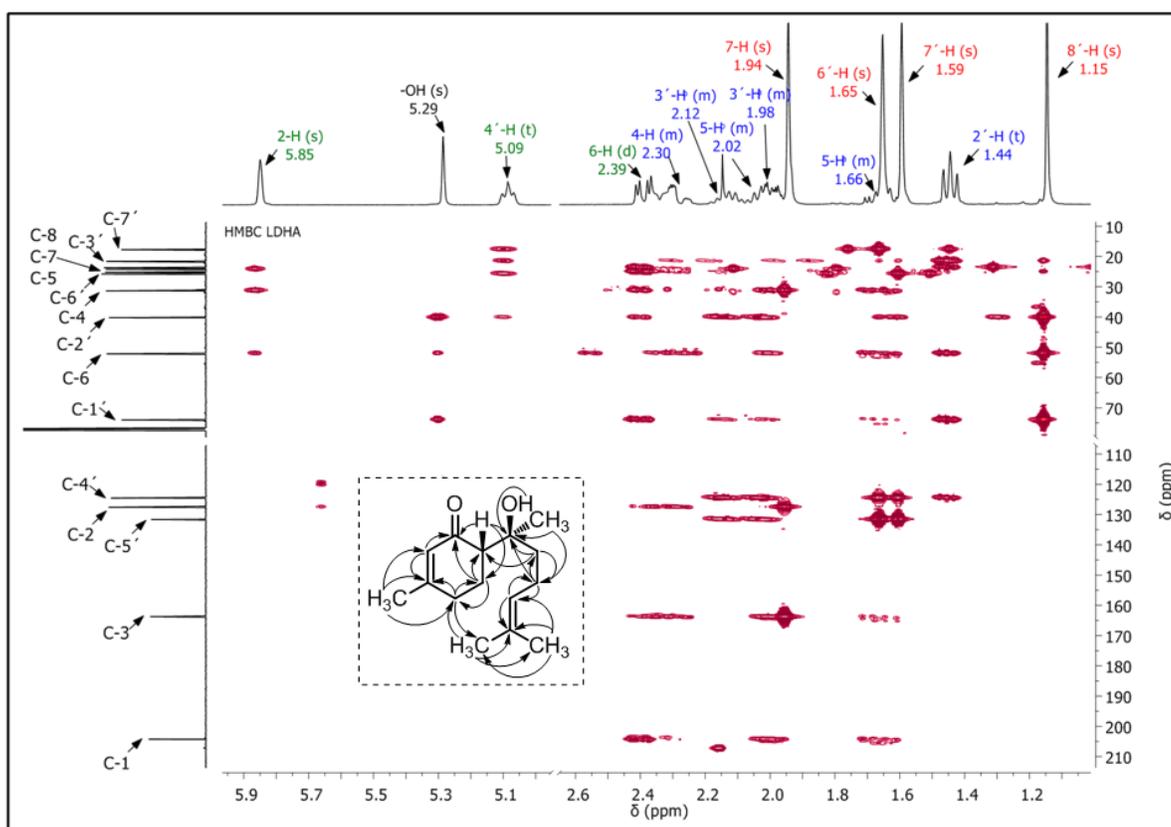


Figura 41. Experimento de RMN de acoplamiento heteronuclear HMBC ^1H - ^{13}C .

4.5 CUANTIFICACIÓN DE LA HERNANDULCINA

Una vez realizada la elucidación estructural de la Hernandulcina (Véase **Sección 4.4**), se procedió a determinar por HPLC-DAD su concentración en el AE y en el extracto SFE de la planta. Como patrón de referencia se empleó la hernandulcina aislada y purificada previamente (Véase **Figura 42**).

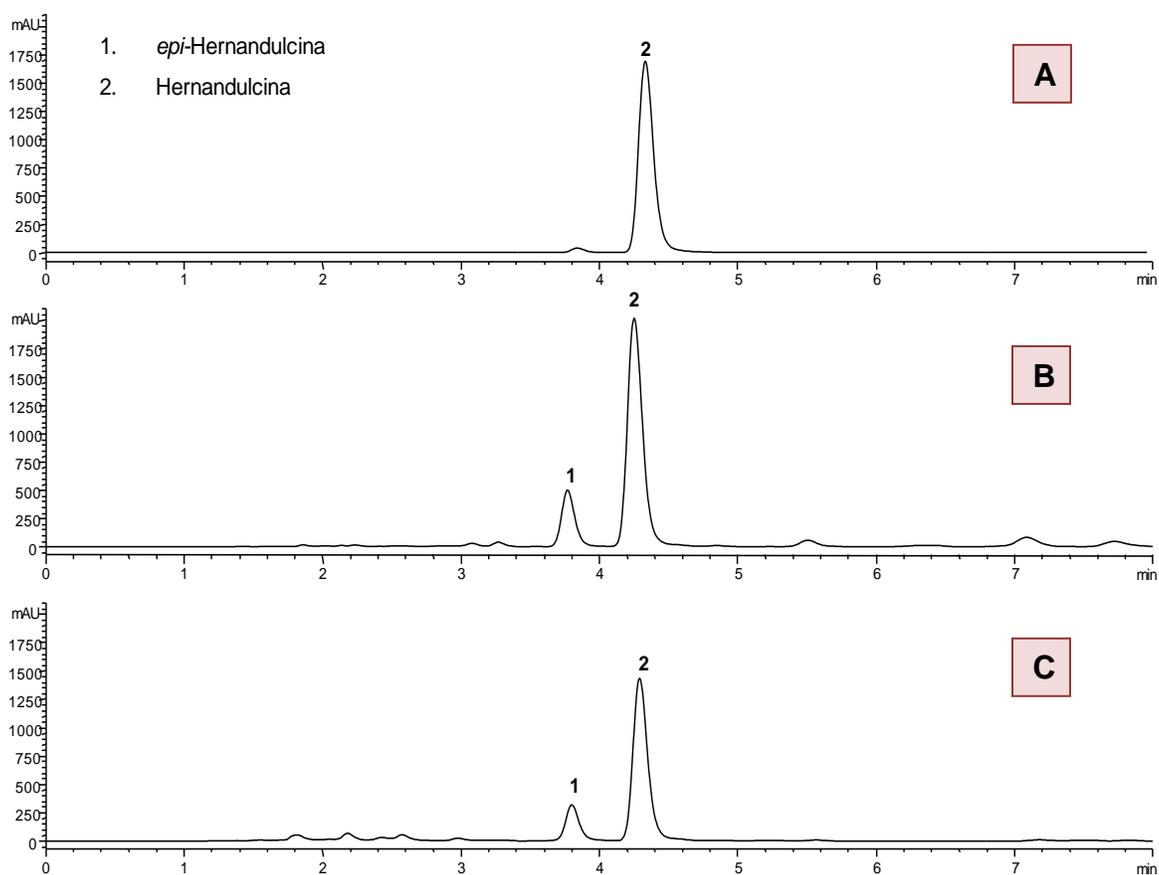


Figura 42. Cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD ($\lambda_{\text{máx}} = 236 \text{ nm}$) de: **A.** Hernandulcina aislada (patrón de referencia); **B.** AE y **C.** Extracto SFE de *L. dulcis*.

Usando diferentes concentraciones del compuesto aislado, se construyó la curva de calibración del método de cuantificación y se realizó la validación de la misma (Véase **Figura 43**).

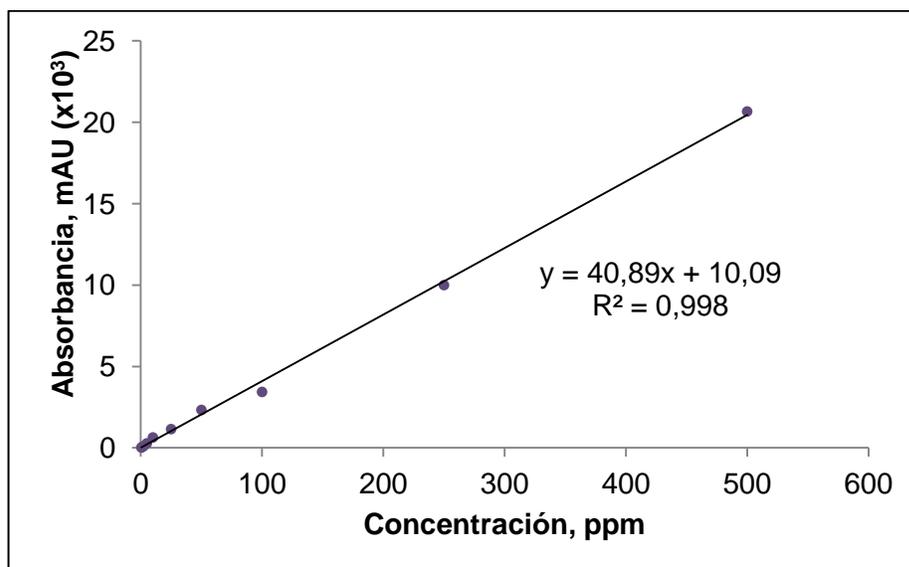


Figura 43. Curva de calibración de la hernandulcina.

Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método. Por medio de la curva de calibración, se evaluaron la linealidad y la sensibilidad del método de cuantificación. En el rango de concentraciones evaluadas, 0,5-500 ppm, se confirmó la linealidad del método, establecida por el coeficiente de determinación, R^2 , con un valor de 0,998. La sensibilidad se determinó con base en la pendiente de la curva de calibración, b , la con un valor de 40,9.

Determinación de los límites de detección y cuantificación. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), se determinaron con base en la metodología descrita en la **Sección 3.7**. En la **Tabla 7** se observan los valores de λ , LOD y LOQ del método de cuantificación de la hernandulcina.

Tabla 7. Valores de λ , LOD y LOQ, obtenidos por HPLC-DAD de la hernandulcina.

Parámetro	Valor
λ , nm	236
LOD, ppm	0,2
LOQ, ppm	0,4

Cuantificación. A continuación, en la **Tabla 8** se reporta la concentración, en % p/p de la hernandulcina, en el AE y en el extracto de la planta.

Tabla 8. Concentración de la hernandulcina en el AE y en el extracto de *L. dulcis*.

Determinación	AE	Extracto
Concentración, ppm	366 \pm 4	256 \pm 5
Concentración % p/p*	36,6 \pm 0,4	25,6 \pm 0,5
CV, %	1,1	2,0

* Masa (mg) de hernandulcina / masa (mg) de aceite o extracto

La concentración de la hernandulcina en el aceite esencial fue de 36,6% (0,66 mg de hernandulcina / g de planta seca); estos resultados concuerdan con los encontrados por Souto y colaboradores [11] en el aceite esencial de la planta cultivada en Puerto Rico (36%); por lo cual se puede inferir que, a pesar de estar sometida a diferentes condiciones geográficas, la planta conserva una alta proporción de este compuesto en su fracción volátil. Sin embargo, a causa del bajo rendimiento del AE en la planta (0,18%), resulta poco viable emplear esta matriz como fuente industrial de la hernandulcina.

Por otra parte, el extracto SFE (40 MPa, 313 K), contiene un 25,6% de hernandulcina (3,6 mg de hernandulcina / g de planta seca). Este resultado difiere del estudio realizado por De Oliveira y colaboradores [29], quienes encontraron el compuesto en un 41,9% del extracto SFE (12 MPa, 308 K) obtenido de plantas cultivadas en Brasil. Pereira y colaboradores [49] argumentan que empero un aumento en la presión (>250 MPa) incrementa el rendimiento, también conduce a la extracción de compuestos de mayor masa molecular, e.g, ceras cuticulares. Por esta razón, probablemente que en este trabajo la hernandulcina se encontró en menor concentración en comparación con la del estudio previo [29].

4.6 DERIVACIÓN QUÍMICA

Como último paso confirmatorio de la estructura química de la hernandulcina, y para poder realizar su análisis por GC-MS, se realizó la derivación química, utilizando BSTFA (Véase **Figura 44**), de la molécula aislada, así como del AE y del extracto de la planta. Las condiciones empleadas para llevar a cabo dicho proceso, se reportan en la **Sección 3.8**.

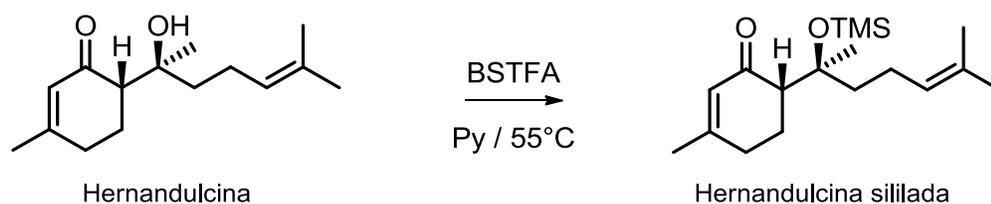


Figura 44. Reacción de sililación de la hernandulcina.

La reacción del compuesto aislado, AE y extracto SFE fue monitoreada por TLC; las placas se revelaron con una solución de H₂SO₄ al 5%, cada 30 min durante dos horas, tiempo en el cual se observó la máxima disminución de la señal

correspondiente a la hernandulcina en las placas cromatográficas. Por esta razón, se tomaron 2 horas como el tiempo global de la reacción.

Derivación de la Hernandulcina. La **Figura 45** muestra el espectro IR de la masa de reacción, al finalizar la reacción de sililación de la hernandulcina, en el cual es posible verificar las bandas características de la molécula (sustrato de partida) y también aquellas adicionales, por la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo OH, enlazado a C-1', por el grupo trimetilsililo (TMS).

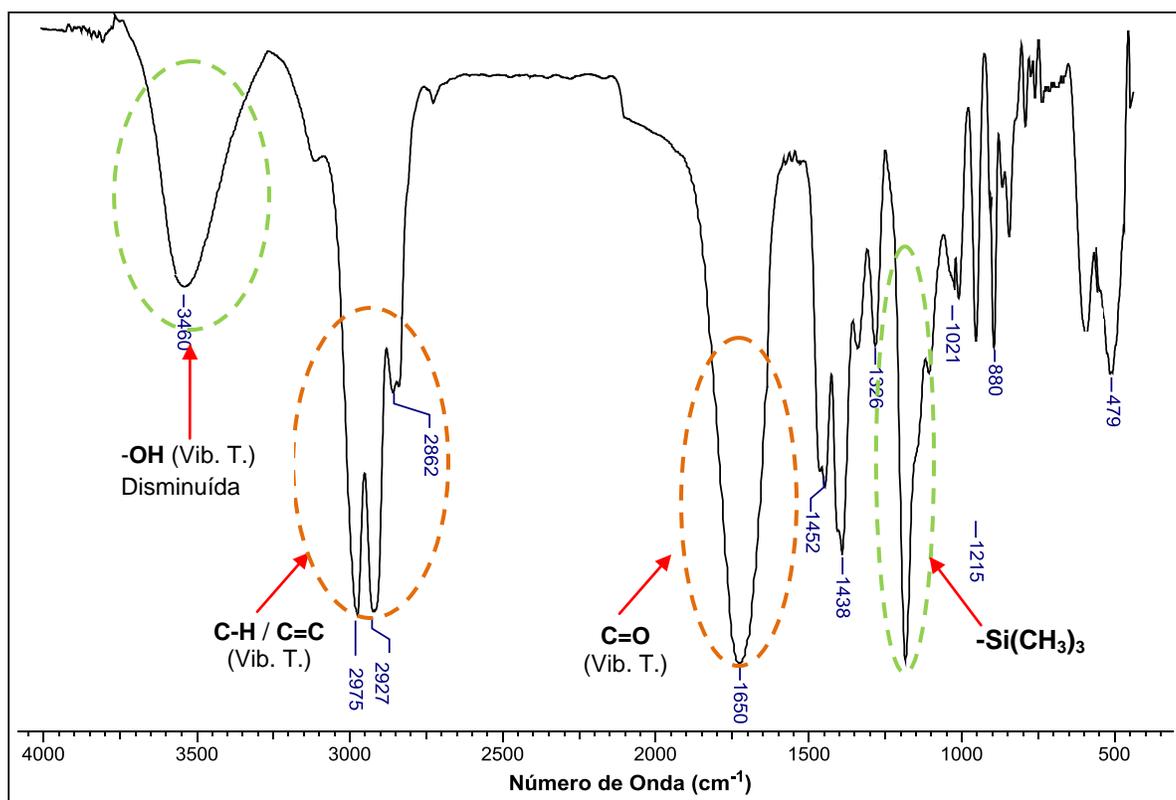


Figura 45. Espectro IR de la masa de reacción de sililación de la hernandulcina.

Como prueba material de la ocurrencia de la reacción de sililación, se observó la disminución parcial de la banda característica del grupo -OH (alcoholes terciarios $3500\text{-}3430\text{ cm}^{-1}$), sumada a la superposición de las bandas propias de la hernandulcina y las del grupo $\text{-Si(CH}_3\text{)}_3$ en la región de $1275\text{ a }1260\text{ cm}^{-1}$. Asimismo, se observó la banda propia de la vibración de tensión del sistema C-O-Si en 862 cm^{-1} . De este modo, se confirman los rasgos estructurales preliminares de la hernandulcina *O*-trimetilsililada o TMS-hernandulcina.

El análisis por GC-MS permitió identificar de manera más detallada, el producto de la reacción de derivación. La corriente iónica total, TIC, de la masa de reacción resultante de la reacción de derivación se ilustra en la **Figura 46**.

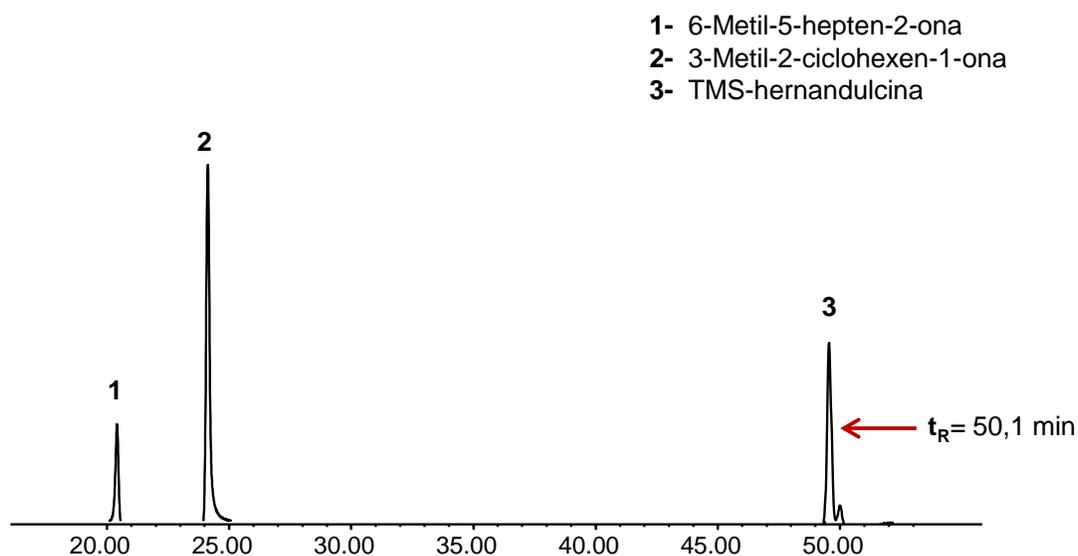


Figura 46. Cromatograma de la masa de reacción de sililación de la hernandulcina.

En el cromatograma, se observan los productos de degradación térmica de la Hernandulcina (picos cromatográficos 1 y 2) y un pico cromatográfico, correspondiente al producto de la reacción de derivación, TMS-hernandulcina, con

un tiempo de retención $t_R = 50,1$ min. El espectro de masas de dicho compuesto, se ilustra en la **Figura 47**.

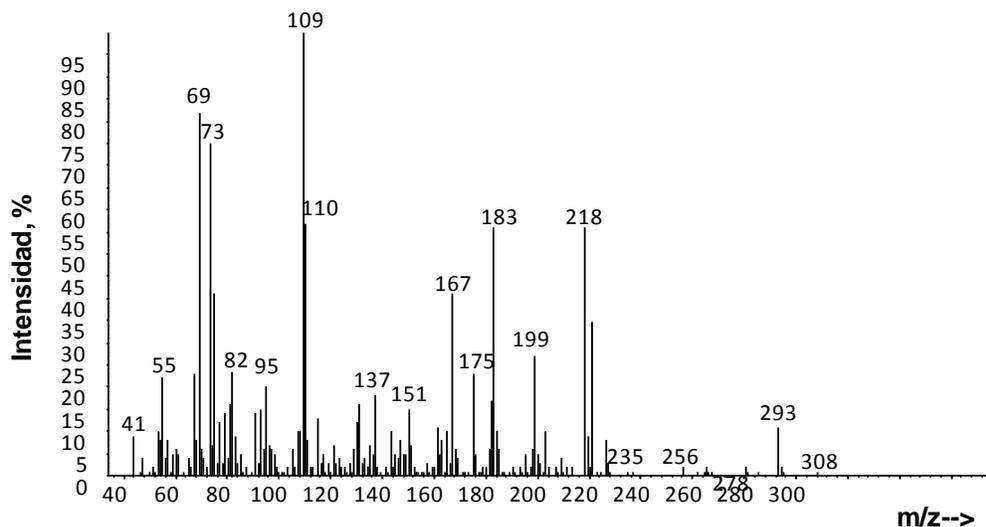


Figura 47. Espectro de masas de la TMS-hernandulcina, $t_R = 50,1$ min.

En el espectro de masas del compuesto derivado, se identifica el ion molecular en m/z 308 (M^+ , 1%), valor que corresponde a la masa nominal de su fórmula molecular condensada.

La **Figura 48** describe la ruta de fragmentación propuesta para el derivado y se plantea el posible origen de las señales más representativas.

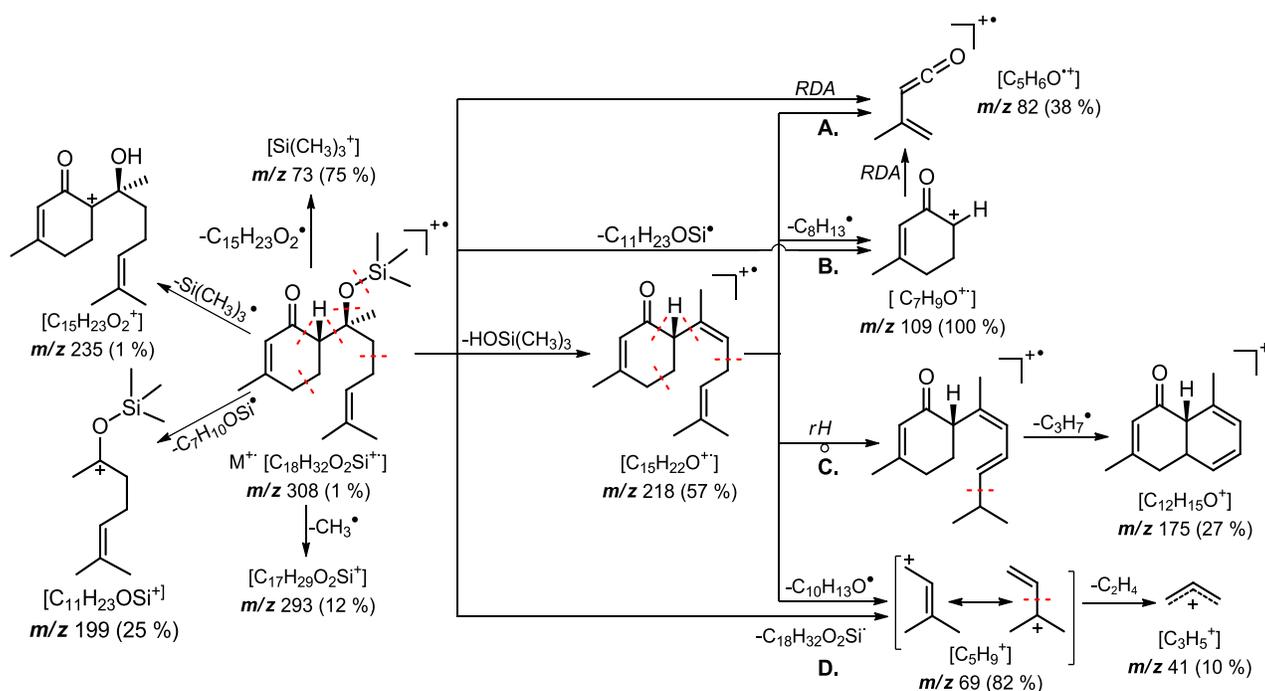


Figura 48. Posibles rutas de fragmentación y formación de iones característicos en el espectro de masas de la TMS-hermandulcina.

A partir del M^{+} se genera el fragmento en m/z 82 (38%) a través de una reacción RDA (A), hecho que soporta la presencia del ciclo insaturado de seis miembros (ciclohexen-2-ona). Cabe mencionar que potencialmente las especies que conserven el ciclo de seis miembros y la respectiva insaturación, pueden llevar a cabo una reacción RDA y formar el ion fragmento en m/z 82, antes mencionado. El fragmento en m/z 218 (57%), se formaría por la eliminación de $\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3$ a partir del ion molecular, y es desde este fragmento que se generan la mayoría de las señales observadas en el espectro. La escisión del enlace β con respecto al carbono carbonílico en C-1 genera el ion pico de base en m/z 109 (100%) (B), y se observa también el ion complementario en m/z 199 (25%). Ocurre también un rearrreglo a partir de la especie en m/z 218 seguido de la eliminación del radical isopropilo (C), generando así el fragmento en m/z 175 (27%), un catión cíclico

estable. La ruptura β con respecto al enlace doble del sustituyente prenilo en el M^+ genera el fragmento en m/z 69 (82%), el cual sufre la pérdida de una molécula de C_2H_4 generando el respectivo catión isopropilo en m/z 41 (10%) (**D**). El fragmento en m/z 73 (75%) corresponde al catión $[Si(CH_3)_3]^+$, especie característica generada en las reacciones de sililación que sirve que como señal diagnóstica en las reacciones de O-sililación; del mismo modo aparece su ion complementario en m/z 235 (1%) correspondiente a la pérdida del radical trimetilsililo ($-Si(CH_3)_3\cdot$) a partir del M^+ . Finalmente, aparece el ion fragmento en m/z 293 (12%) que se genera por la pérdida de 15 u del radical metilo desde el M^+ .

Derivación del AE y el extracto de *L. dulcis*. Una vez caracterizado el producto de la sililación de la hernandulcina, la TMS-hernandulcina, se realizó la derivación del AE y del extracto SFE.

En la **Figura 49** se presentan los perfiles cromatográficos obtenidos de las reacciones de sililación.

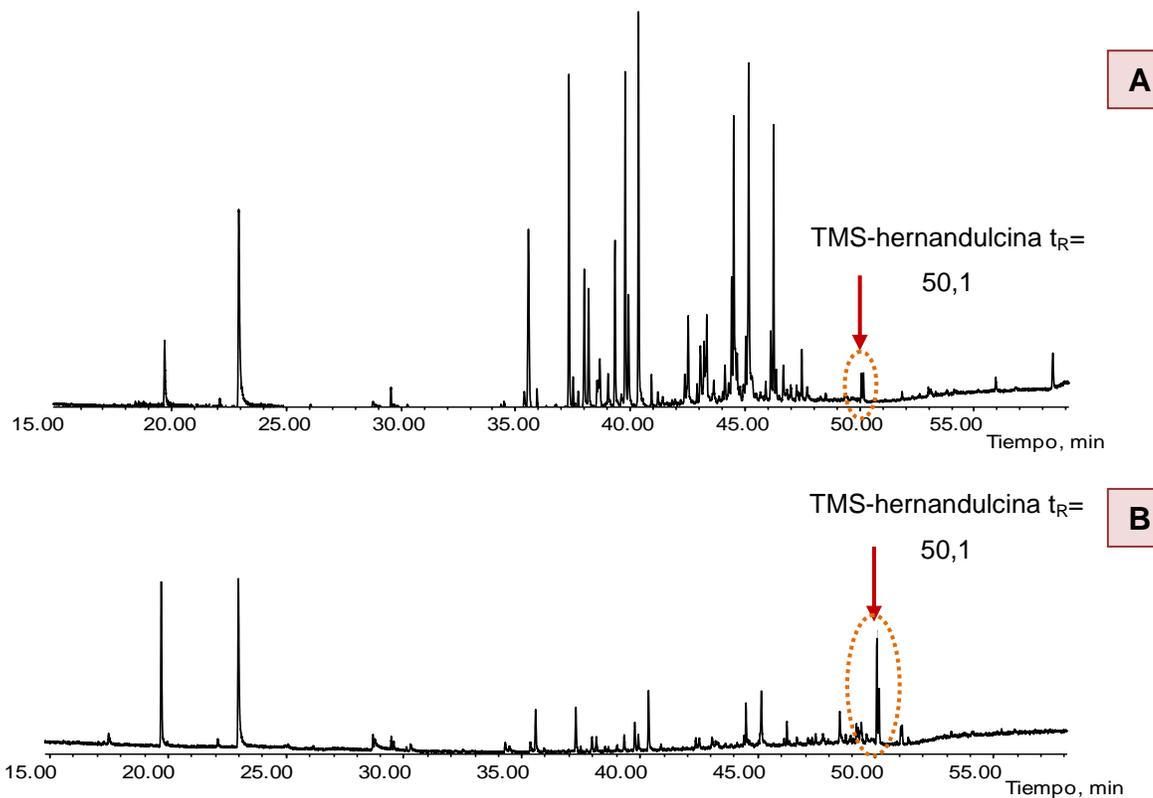


Figura 49. Perfiles cromatográficos de la reacción de silylación de **A.** AE y **B.** Extracto SFE de *Lippia dulcis*.

Adicionalmente, en los cromatogramas del AE y del extracto derivado, se observó un pico cromatográfico en $t_R = 50,2$ min (Véase **Figura 50**), con el mismo patrón de fragmentación de TMS-hernandulcina. Debido a esto ya las características cromatográficas de la señal, podemos concluir que se trata de la TMS-*epi*-hernandulcina.

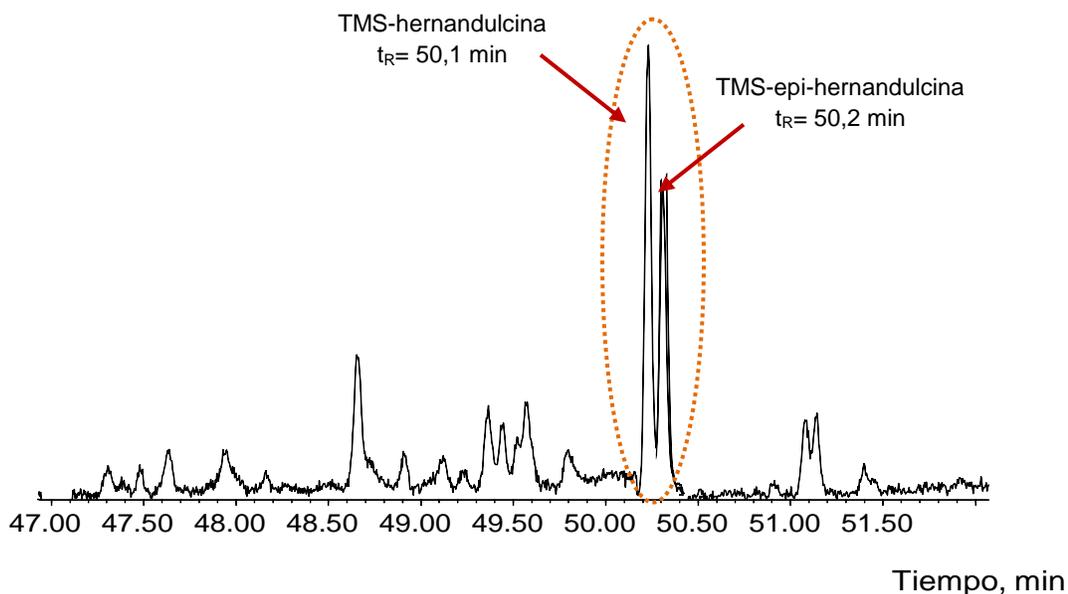


Figura 50. Ampliación de la Figura 50 (B), en $t_R = 50,01$ min, correspondiente al producto de sililación del extracto de la planta.

4.7 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante, expresada en equivalentes de $\mu\text{Trolox}^{\text{®}}$ /g de sustancia, por los métodos ORAC y ABTS⁺ se determinó para la hermandulcina, AE y extracto de *L. dulcis*, caracterizados previamente. Además, se emplearon como compuestos antioxidantes de referencia el BHT y α -tocoferol, y como patrón de sesquiterpeno uno de los compuestos mayoritarios del AE y extracto de la planta, el *trans*- β -cariofileno.

En las **Figuras 51** y **52**, se muestran las curvas de calibración del Trolox[®], con base en las cuales se realizó la cuantificación.

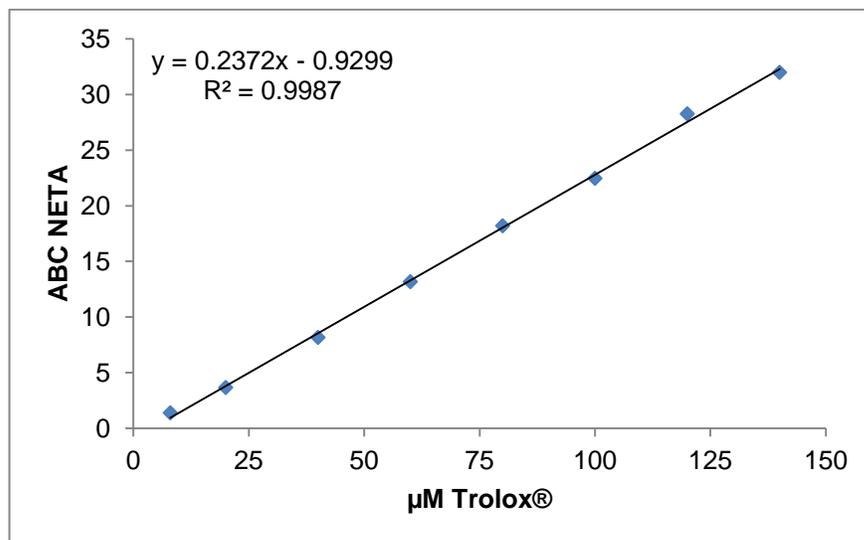


Figura 51. Curva de calibración del Trolox® para el ensayo ORAC.

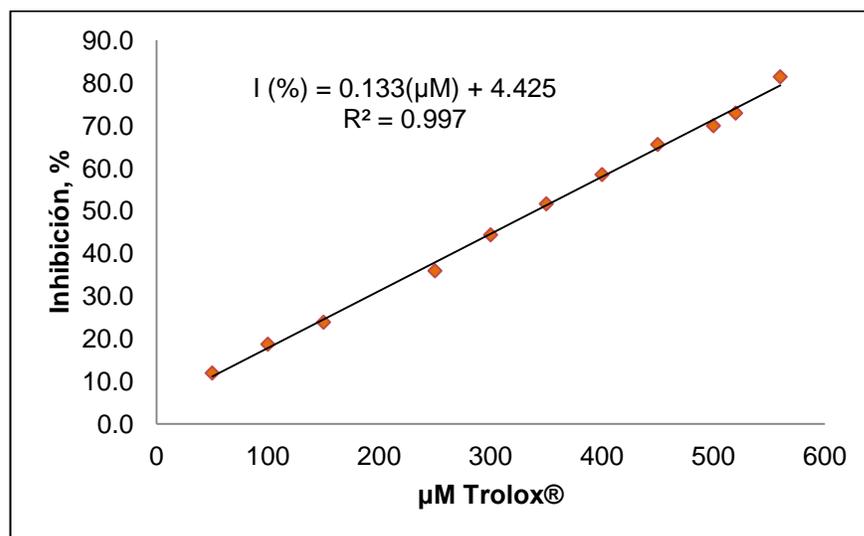


Figura 52. Curva de calibración del Trolox® para el ensayo ORAC.

En la **Tabla 9** se presentan los resultados de la actividad antioxidante, medida por los ensayos ORAC y ABTS⁺, de la hernandulcina, AE y extracto de la planta, junto con los antioxidantes de referencia.

Tabla 9. Valores de TAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia), para la hernandulcina, AE y extracto de *L. dulcis*, obtenidos por los métodos ORAC, ABTS^{**}.

Sustancia evaluada	Método de medición(\pm s, n=3)	
	ORAC	ABTS ^{**}
	($\mu\text{Trolox}^{\text{®}}$ /g de sustancia)	($\mu\text{Trolox}^{\text{®}}$ /g de sustancia)
BHT	3100 \pm 36	4760 \pm 22
α -Tocoferol	1450 \pm 17	2429 \pm 7
<i>trans</i> - β -Cariofileno	-	N.D.
Hernandulcina	4500 \pm 141	N.D.
Aceite esencial	5650 \pm 49	260 \pm 10
Extracto	2230 \pm 60	16,0 \pm 0,5

N.D. No se observó disminución en la coloración (Véase **Sección 3.9.2.**)

Los valores obtenidos por el ensayo ABTS^{**}, para el AE y el extracto de *L. dulcis*, fueron más bajos, en comparación con las sustancias de referencia BHT y α -tocoferol. Esto se evidencia en los resultados obtenidos para el *trans*- β -cariofileno y la hernandulcina, componentes mayoritarios en el AE y extracto, en los cuales no se observó disminución en la coloración al realizar este ensayo. Por lo tanto, podemos establecer que el mecanismo de transferencia de electrón, SET, no es el mecanismo de acción apropiado para explicar la actividad antirradicalaria de las matrices estudiadas.

Complemento a estos resultados, se observó que la hernandulcina, el AE y el extracto de la planta, presentaron mayor capacidad antirradicalaria, medida por el ensayo ORAC (mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno, HAT), incluso superior en comparación con las sustancias sintéticas de referencia evaluadas, BHT y α -Tocoferol.

Es importante destacar que la actividad antioxidante de algunas moléculas que no poseen enlaces X-H lo suficientemente débiles, no puede ser descrita a través de la donación de dicho átomo de H. Algunos compuestos antioxidantes (no fenólicos), tienen la capacidad de formar radicales centrados en átomos de carbono (preferiblemente terciarios), que pueden ser estabilizados por resonancia, hecho que aumenta de manera considerable su tiempo de vida media. Un ejemplo de ello, descrito por Foti e Ingold [82], es la actividad antioxidante del γ -terpineno (Véase **Figura 53**).

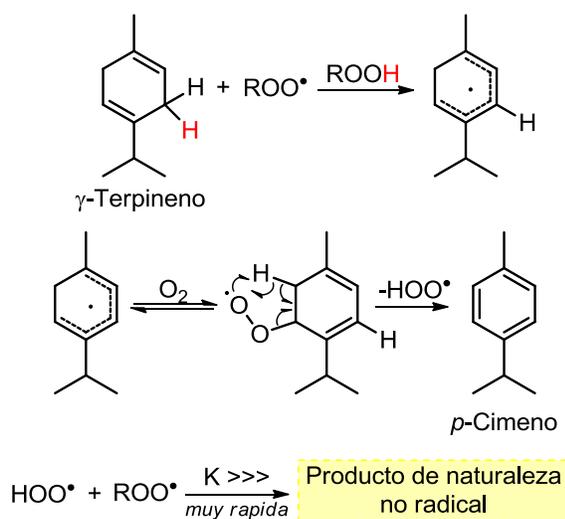


Figura 53. Modelo de Foti e Ingold [82] para la actividad antioxidante de γ -terpineno.

Según el modelo, el γ -terpineno se oxida a p -cimeno, a través de una reacción en cadena en donde el HOO^\bullet actúa como propagador. Cabe destacar la favorabilidad de la reacción de terminación cruzada entre HOO^\bullet y ROO^\bullet , en comparación a la reacción de terminación propia $ROO^\bullet + ROO^\bullet$.

A partir de este hecho, es posible realizar una propuesta que describa las propiedades antioxidantes de la hernandulcina, y que pueda resultar análoga a

algunos otros compuestos químicos presentes en el AE y extracto de la planta, los cuales por efectos sinérgicos, proveen a las matrices su actividad antioxidante, evidenciada a través del método ORAC.

Dadas las características estructurales de la molécula, los mecanismos que explicarían su actividad antioxidante consisten en la donación del átomo de H del grupo hidroxilo enlazado al carbono C-1'; o la oxidación del compuesto, mediante la donación de un átomo de H de un enlace C-H al radical reactivo peroxilo, generando un radical estabilizado por resonancia.

El pKa del grupo hidroxilo en la hernandulcina se calculó por medio del *software* libre *ACD/I-LabWeb* (v7.04) [83], se obtuvo que el pKa= $15,2 \pm 0,2$, valor que se correlaciona con el pKa promedio de los alcoholes alifáticos terciarios (pKa= 15-18) y duplica el pKa promedio de compuestos fenólicos. Este valor describe un protón no lábil, que no se dona a un aceptor de hidrógeno fácilmente; hecho que elimina la posibilidad del mecanismo de donación de H a partir del enlace X-H. Así, el mecanismo que describiría la actividad antioxidante de la hernandulcina, puede ser expresado de manera similar al que explica la actividad inhibitoria de γ -terpineno.

En la **Figura 54a**, se expone el mecanismo propuesto, en el cual el radical peroxilo toma uno de los protones enlazados al carbono C-4 para generar la especie **la**, que se estabiliza por resonancia en el sistema cíclico α,β -insaturado (Véase **Figura 54b**).

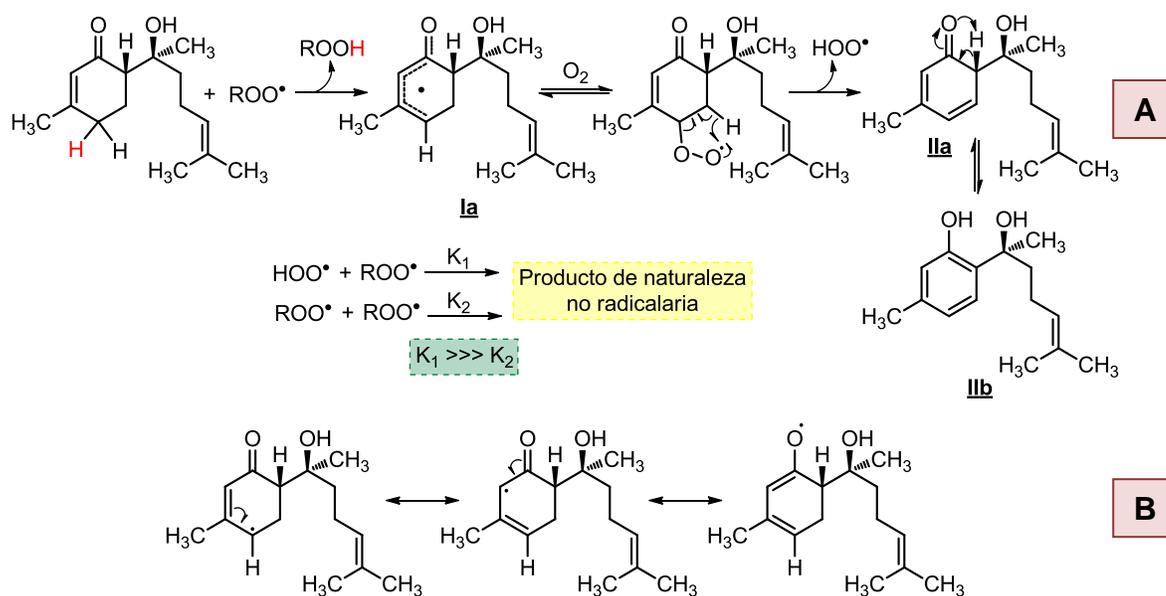


Figura 54. Mecanismo propuesto, con base en el modelo de Foti e Ingold [82], para explicar la actividad antioxidante de la hernandulcina, por el método ORAC: **A.** Mecanismo que describe la actividad antioxidante de la hernandulcina en presencia de especies oxidantes (ROO[•]) y **B.** Estabilización de la especie **la** por efectos de resonancia.

Tal como ocurre con el γ -terpineno, la especie radical **la** reaccionaría con una molécula de O₂, para generara la especie HOO[•] que actúa como propagador de la reacción en cadena de terminación cruzada convirtiendo a la hernandulcina en el compuesto **IIa**. Este último, puede realizar una rápida interconversión tautomérica, generando el tautómero **IIb**, compuesto aromático de alta estabilidad (fenol-3,6-dialquil sustituido).

5 CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación, se obtuvieron el aceite esencial ($0,18 \pm 0,01\%$) y el extracto supercrítico ($1,41 \pm 0,2\%$) de *L. dulcis* Trevir (Familia *Verbenaceae*), empleando la hidrodestilación asistida con la radiación de microondas y la extracción con fluido supercrítico, respectivamente. El aceite y el extracto contienen hidrocarburos sesquiterpénicos y sus análogos oxigenados, representados por el α -copaeno, *trans*- β -cariofileno, δ -cadineno, biciclogermacreno y el α -bisabolol. En el aceite, gracias al método de su extracción, fue posible observar la presencia de algunos monoterpenos oxigenados como la carvona, neral y geranial, que no se registraron en el extracto supercrítico de la planta, debido a su alta volatilidad.

La hernandulcina, debido a su termoinestabilidad, no fue detectada por GC-MS. Sin embargo, su aislamiento (98% de pureza) del extracto supercrítico, fue posible por medio de cromatografía en columna, así mismo, se realizó su caracterización química empleando técnicas espectroscópicas, a saber: Resonancia magnética nuclear, espectroscopía de infrarrojo y ultravioleta visible.

Por medio de la técnica HPLC-DAD, se determinó la concentración de la hernandulcina en el AE ($36,6 \pm 0,4\%$; 3,6 mg de hernandulcina / g de planta seca) y en el extracto ($25,6 \pm 0,5\%$; 0,66 mg de hernandulcina / g de planta seca). A pesar de que el aceite esencial contiene mayor cantidad de la hernandulcina, el rendimiento de extracción del aceite fue bajo ($0,18 \pm 0,01\%$), razón por la cual la hernandulcina se aisló del extracto supercrítico de la planta y no del aceite.

Por medio de la derivación química de la molécula, el aceite esencial y el extracto supercrítico de la planta, a través de la reacción de sililación (sistema BSTFA en piridina), fue posible realizar el registro por GC-MS de la hernandulcina como su derivado sililado, y así confirmar su presencia tanto en el aceite, como en el extracto.

Los valores obtenidos del ensayo ABTS⁺, para el aceite y el extracto de *L. dulcis*, fueron lejanos de los obtenidos para los antioxidantes de referencia, BHT y α -tocoferol. Dado que durante el ensayo para la hernandulcina no se observó disminución de la coloración del ABTS⁺, se puede concluir, que el mecanismo de transferencia de electrón no es apropiado para determinar la actividad antirradicalaria de la molécula. Por otra parte, la hernandulcina, el aceite y el extracto, presentaron capacidad antirradicalaria, medida por el ensayo ORAC, incluso superior a la de los antioxidantes de referencia, BHT y α -tocoferol.

6 RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar diferentes parámetros en el tratamiento de la especie *L. dulcis*, e.g., temperatura de secado, edad de corte, previo a su extracción por hidrodestilación con microondas, con el fin de determinar su influencia sobre el rendimiento del aceite esencial y de la hernandulcina presente en él. Este compuesto se encuentra en un 36% del aceite, pero debido al rendimiento tan bajo de la esencia ($0,18 \pm 0,01\%$), resulta poco viable emplearlo como una fuente para la obtención industrial de la hernandulcina.

Se recomienda, durante la extracción con fluido supercrítico, emplear presiones por debajo de los 20 MPa, con el fin de evitar la extracción de compuestos de mayor peso molecular, e.g., ceras cuticulares de la planta, e incrementar así el rendimiento del proceso y de la cantidad de hernandulcina, presente en el extracto.

Se recomienda realizar diferentes estudios de actividad biológica sobre la hernandulcina, con el fin de evaluar su potencial biológico y la viabilidad de su uso como edulcorante, en productos que no sean sometidos a calentamiento, e.g., productos dentífricos. Al ser una sustancia de origen natural, producida a través de *L. dulcis*, podría convertirse en un beneficio para el sector agrícola.

Se recomienda emplear reacciones de derivación química, distintas a la silylación, y utilizar agentes derivantes acordes con los lineamientos de la química verde, e.g. anhídrido acético (reacción de acetilación), con el fin de evitar la generación de residuos contaminantes. También se recomienda evaluar la posibilidad de obtener un derivado de la hernandulcina igualmente que provea dulzor y que tenga mayor estabilidad térmica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 EGGERS, S.C., ACREE, T.E., and SHALLENBERGER, R.S. Sweetness chemoreception theory and sweetness transduction. *Food Chem.*, **2000**, 68, p.p. 45-49.
- 2 COMPADRE, C.M., ROBBINS, E.F., and KINGHORN, A.D. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: Historical uses, field inquiries, and constituents. *J. Ethnopharmacol.*, **1986**, 15, p.p. 89-106.
- 3 COMPADRE, C., PEZZUTO, J., KINGHORN, D., and KAMATH, S. Hernandulcin: An intensely Sweet Compound Discovered by Review of Ancient Literature. *Science*, **1985**, 227, p.p. 417-419.
- 4 COMPADRE, C., HUSSAIN, R., PEZZUTO, J., and KINGHORN, D. The intensely Sweet Sesquiterpene Hernandulcin: Isolation, Synthesis, Characterization, and Preliminary Safety Evaluation. *J. Agric. Food Chem.*, **1987**, 35, p.p. 273-276.
- 5 DÁVALOS, A., GÓMEZ-CORDOVÉS, C. and BARTOLOMÉ B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC–Fluorescein) Assay. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, p.p. 48–54.
- 6 SHALLENBERGER, R.S., and ACREE, T.S. Molecular structure and sweet taste. *Nature*, **1969**, 17, p.p. 701-703.
- 7 KIER, L.B. A molecular theory of sweet taste. *J. Pharm. Sci.*, **1972**, 61, p.p. 1394-1397.
- 8 TINTI, J.M., and NOFRE, C. Sweetness reception in man: the multipoint attachment theory. *Food Chem.*, **1996**, 56, p.p. 263-274.
- 9 STANDLEY, P.C., and WILLIAMS, L.O. Flora of Guatemala. Chicago, US, Field Museum of Natural History. Fieldyana: Botany v. 24, parte. 9, No. 1 y 2, **1970**, p.p. 210-211.

- 10 TERBLANCHÉ, F.C., and KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (*Verbenaceae*) - a literature review. *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8, p.p. 471-485.
- 11 SOUTO, F., ECHEVARRÍA, M., CÁRDENAS, O., ACUÑA, M., and MELÉNDEZ, P. Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. *Phytochemistry*, **1997**, 44, p.p. 1077-1086.
- 12 PASCUAL, M.E., SLOWING, K., CARRETERO, E., SÁNCHEZ MATA, D., and VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharmacol.*, **2001**, 76, p.p. 201-214.
- 13 ROIGY MESA, J.T. Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba, Parte 1. Ministerio de Agricultura, Servicio de Publicidad y Divulgacion, Habana, **1945**, p.p. 508-509.
- 14 KINGHORN, A.D., and SOEJARTO, D.D. Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. *Pure Appl. Chem.*, **2002**, 74, p.p. 1169-1179.
- 15 KINGHORN, A.D., and KENNELLY, E.J. Discovery of Highly Sweet Compounds from Natural Sources. *J. Chem. Educ.*, **1995**, 72, p.p. 676-680.
- 16 Historia de las plantas de nueva España. Sitio en internet. Disponible en: <http://www.ibiologia.unam.mx/plantasnuevaespana/prologo.html>. Fecha de consulta: 5 de agosto de **2012**.
- 17 KINGHORN, A.D., COMPADRE, C.M., and PEZZUTO, J.M. U.S. Patent No. 4, 808, 409, Feb. 28, **1989**.
- 18 YANG, H.J., KIM, H.J., WHANG, Y.A., CHOI, J.K., and LEE, I.S. Microbial transformation of the sweet sesquiterpene (+)-hernandulcin. *Nat. Prod. Sci.*, **1999**, 5, p.p. 151-153.
- 19 MORI, K., and KATO, M. Synthesis and absolute configuration of (+)-hernandulcin, a new sesquiterpene with intensely sweet taste. *Tetrahedron Lett*, **1986**, 27, p.p. 981-982.
- 20 GATTI, F.G. Enantiospecific synthesis of (+)-hernandulcin. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, p.p. 4997-4998.

- 21 KIM, J.H., LIM, H.J., and CHEON, S.H. Synthesis of (+)-hernandulcin and (-)-epihernandulcin. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, p.p. 4721-4722.
- 22 KIM, J.H., LIM, H.J., and CHEON, S.H. A facile synthesis of (6S,1'S)-(+)-hernandulcin and (6S, 1'R)-(+)-epihernandulcin. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 59, p.p. 7501-7507.
- 23 DE CUSATI, P.F., and OLOFSON, R.A. O-1-(1, 3-butadienyl) Carbamates as Diels-Alder dienes: Stereospecific synthesis of (\pm)-Hernandulcin and congeners. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, p.p. 1409-1410.
- 24 KANEDA, N., LEE, I.S., GUPTA, M.P., SOEJARTO, D.D., and KINGHORN, D. (+)-4 β -hydroxyhernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55, p.p. 1136-1141.
- 25 PÉREZ, J.F. Investigação química de  leos essenciais de plantas da Guatemala, Tese de Doutorado (Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, **2008**. p.p. 162-166.
- 26 CELIS, C.N. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia *Verbenaceae*, Tesis de grado (Química), Universidad Industrial de Santander, **2007**, p.p. 91-94.
- 27 VARGAS, A., and BOTTIA, E. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y El Peón – Santander, Colombia, Tesis de grado (Química), Universidad Industrial de Santander, **2008**, p.p. 149-153.
- 28 MIRANDA, I.J. Aislamiento y determinación estructural de un sesquiterpeno mayoritario del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br, Tesis de maestría (Química), Universidad Industrial de Santander, **2008**. p.p. 100-103.
- 29 DE OLIVEIRA, P.F., FRANCISCO, R.A., BOLZAN, A., and BARTH, D. Supercritical fluid extraction of hernandulcin from *Lippia dulcis* Trev. *J. Supercrit. Fluid.*, (Article in press, **2012**). ISSN 0896-8446.

- 30 GÖRNEMANN, T., NAYAL, R., PERTZ, H.H., and MELZIG, M.F. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, 117, p.p. 166-169.
- 31 GUEVARA, J.M., CHUMPITAZ, J., and VALENCIA, E. The *in vitro* activity of plants on *Vibro cholera*. *Rev. de Gastroenter.*, **1992**, 14, p.p. 27-31.
- 32 PÉREZ, S., MECKES, M., PÉREZ, C., SUSUNAGA, A., and ZAVALA, M.A. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 102, p.p. 1-4.
- 33 FUMIKO, A., NAGAO, T., and OKABE, H. Antiproliferative Constituents in Plants 9. Aerial Parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. *Biol. Pharm. Bull.*, **2002**, 25, p.p. 920-922.
- 34 ONO, M., TSURU, T., ABE, H., ETO, M., OKAWA, M., ABE, F., KINJO, J., IKEDA, T., and NOHARA, T. Bisabolane-type Sesquiterpenes from the Aerial Parts of *Lippia dulcis*. *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, p.p. 1417-1420.
- 35 CASTILLO, E. and MARTÍNEZ, I. Manual de fitoterapia, **2007**, Elsevier Masson, Barcelona, España, p. 513.
- 36 TAIZ, L., and ZEIGER, E. Plant Physiology, **2002**, 3^a ed., Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, EE.UU, p.p.283-307.
- 37 PICHERSKY, E., and GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant. Sci.*, **2000**, 5, p.p. 439-444.
- 38 AZCÓN, J., and TALÓN, M. Fundamentos de fisiología vegetal, **2000**, 1^a Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, p. 261.
- 39 BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores, **2000** 1^a edición, Argentina, La Plata, p. 410.
- 40 GÜENTER, E. The Essential Oils. Volume I: History-Origin in plants production-Analysis, **1948**, Litton Educational, New York, p.p. 240-244.

- 41 STASHENKO, E., and MARTÍNEZ, J. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*, **2011**, 3, p.p. 25-44.
- 42 PARÉ, J.R.J., and BEANGER, J.M.R., Microwave-assisted process (MAPTM): A new tool for the analytical laboratory. *TrAC.*, **1993**, 13, p.p.176-184.
- 43 PARÉ, J.R.J., Microwave extraction of volatile oil and apparatus therefore, U.S. Patent Ep 0485668 A1, 1992.
- 44 STASHENKO, E., JARAMILLO, B., and MARTÍNEZ, J. Comparison of Different Extraction Methods for the analysis of Volatile Secondary Metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, Grown in Colombia and Evaluation of its *in vitro* Antioxidant Activity. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1025, p.p. 93-103.
- 45 TSARKOVA, T. Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas. Tesis de maestría. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander, **1997**, p.p. 27-31.
- 46 ROSA, P.T.V., PARAJÓ, J.C., DOMÍNGUEZ, H., MOURE, A., DÍAZ, B., SMITH, R.L. Jr., TOYOMIZU, M., FLORUSSE, L.J., PETERS, C.J., GOTO, M., and MEIRELES, M. Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. En: MEIRELES, M. Extracting bioactive compounds for food products: Theory and applications. Boca Raton, FL. CRC PRESS LLC. **2009**. p.p. 269-288.
- 47 LUQUE, M., VALCARCEL, M., and TENA, M. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. Barcelona, **1993**, Editorial REVERTÉ, S.A., p. 480.
- 48 BOCEVSKA, M., and SOVOVÁ, H. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow. *J. Supercrit. Fluid.*, **2007**, 40, p.p. 360-367.
- 49 PEREIRA, C., and MEIRELES, A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food Bioprocess. Technol.*, **2010**, 3, p.p. 340-372.

- 50 VALCÁRCEL, M., and GÓMEZ, A. Técnicas analíticas de separación, **1998**, Ed. Reverté, Barcelona, España, p.779.
- 51 DICKSON H., KITTREDGE, K.W., and SARQUIS, A.M. Thin-Layer Chromatography: The “Eyes” of the Organic Chemist. *J. Chem. Educ.*, **2004**, 81, p.p. 1023-1025.
- 52 WALL, P. E. “Thin-layer Chromatography: A Modern Practical Approach”, **2005**; Cambridge: RSC, p.p. 65-72.
- 53 ROUESSAC, F., and ROUESSAC, A. “Chemical Analysis”, **2007**, England: John Wiley & Sons, p.p. 117-125.
- 54 BRAITWAITE, A., and SMITH, F. J. “Chromatographic Methods”, **1999**, Boston: 5^a Edition, Kluwer Publishers, p.p. 117-130.
- 55 STASHENKO, E., and MARTÍNEZ, J. GC Y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica*, **2010**, 2, p. 27.
- 56 POOLE, C., and POOLE, S. Chromatography Today, **1991**, Amsterdam: Elsevier, 92, p. 2.
- 57 SANDRA, P., and BICCHI, C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis, **1987**, Ed. Huethig Verlag: New York, p. 435.
- 58 STASHENKO, E., and MARTÍNEZ, J. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica.*, **2010**, 2, p.p. 29-47.
- 59 STASHENKO, E., and MARTÍNEZ, J. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*, **2009**, 1(2), p.p. 29-45.
- 60 COATES, J. “Interpretation of Infrared Spectra, a Practical Approach”, **2000**, Chichester: John Wiley & Sons, p.p. 1-7.
- 61 SUMMERFIELD, S. “Introduction to Molecular Spectroscopy”, **2010**, United Kingdom: England & Wales License, p.p. 6-12.
- 62 BRIEITMAIER, E. “Structure elucidation by NMR in organic chemistry: a practical guide”, **2002**, England: John Wiley & Sons, p.p. 45-50.

- 63 WELLS R.J. Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **1999**, 843, p.p.1-18.
- 64 CLAUDE, S., DELHOMME, O., APPENZELLER, B.M.R., WENNIG, R., and MILLET, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*, **2009**, 77, p.p. 1473-1482.
- 65 FIELD, J. A. Coupling chemical derivatization reactions with supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 785, p.p 239-249.
- 66 BLAU, K., and HALKET, J.; Handbook of derivates for chromatography. John Wiley & Sons, Chichester, England, **1993**, p. 57.
- 67 DRUZD, J. Chemical derivatization in gas chromatography; John Wiley Sons, **1981**, NewYork, EE.UU., p. 223.
- 68 Proestos, D., and Sereli, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS C. *Food Chem.*, **2006**, 95, p.p. 44-52.
- 69 HALIWELL, B., and GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Meth. Enzymol.*, **1990**, 186, p.p. 1-85.
- 70 PROESTOS, C., CHORIANOPOULOS, N., NYCHAS, G. J. E., and KOMAITIS, M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, p.p. 1190-1195.
- 71 MOURE, A., CRUZ, J.M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J.M., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M.J. and PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, **2001**, 72, p.p. 145-171.
- 72 CAO, G., ALESSIO, H. M., and CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med.*, **1993**, 14, p.p. 303-311.
- 73 OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., and PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, p.p. 4619-4626.

- 74 OU, B., HUANG, D., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J.A. and DEEMER, E.K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, p.p. 3122–3128.
- 75 RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A. YANG, M., and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 26, p.p. 1231-1237.
- 76 EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.*, **2004**, 37, p.p. 277 – 285.
- 77 REVERCHON, E. and DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Supercrit. Fluids*, **2006**, 38, p.p. 146-166.
- 78 MEIRELES, A., CARVALHO Jr, R., MOURA, L., ROSA, P. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. En: *J. Supercrit. Fluids*. **2005**, 35, p.p. 197-204.
- 79 Flavornet and human odor space. [Sitio en internet]. Disponible en: http://www.flavornet.org/f_kovats.html. Fecha de consulta: 11 de septiembre de 2012.
- 80 PRETSCH, E., BUHLMANN, P., and AFFOLTER, C. Structure Determination of Organic Compounds. Ed. Springer: New York, 3^aEdicion, **2000**, p.p. 388-390.
- 81 PAVIA, L.D., LAMPMAN, M.G., and KRIZ, S.G. Introduccion to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry. Ed. Thomson Learning, Inc.: Australia, 3^a Edicion, **2001**, p.p. 372-374.
- 82 FOTI, M.C., and INGOLD, K.U. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by γ -terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, p.p. 2758-2765.

83 Software libre *ACD/I-LabWeb (v7.04)* Sitio en internet. Disponible en:(<https://ilab.acdlabs.com/iLab2/index.php>). Fecha de consulta: agosto de 2012.