

Análisis cromatográfico de los metabolitos secundarios de *Varronia curassavica* Jacq.
(Boraginaceae) obtenidos por diferentes métodos de extracción

Laisha Dally Burgos Diaz

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Directora
Elena E. Stashenko
Química, Ph.D.

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Bucaramanga
2022

Dedicatoria

A mi mamá Otilia, por su amor y apoyo, por forjarme como una mujer con carácter fuerte, resiliente. Gracias mamita por ser mi motor y mi ejemplo de vida, siempre valoraré inmensamente todo tu sacrificio, te amo, aunque no te lo diga siempre.

A mi papá Rodolfo, que, desde el cielo, ha sido mi luz en los días oscuros, mi amor eterno, mi mejor amigo, daría todo por que hoy pudieses ver lo lejos que he podido llegar. Tengo la certeza que donde estés, te sientes orgulloso de tu hija. Espero que siempre seas la guía de mi camino y que no me abandones nunca.

A mis hermanas Diana y Lina, que siempre estuvieron a mi lado durante este camino, espero poder ayudarlas siempre.

Agradecimientos

A la Dra. Elena Stashenko, mi maestra de vida y de sueños, que siempre me inculcó que la inteligencia, la disciplina, el sacrificio, la tenacidad y la generosidad son los mejores valores más importantes de cualquier persona. Gracias por siempre creer en mí, y ser una voz de aliento en las etapas más difíciles de mi vida. Siempre estará en mi corazón.

Al Dr. Jairo René Martínez, por ser un ejemplo de nobleza y bondad, y por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Fausto Prada, mi compañero, amigo y ejemplo, inmensas gracias por todas las enseñanzas brindadas, por los consejos para el desarrollo de mi trabajo, mi vida personal y profesional.

A mis mejores amigos de universidad, Bleidy, Felipe, Stephanny y Óscar, quienes siempre me alentaron y me motivaron para el cumplimiento de mis propósitos. Espero verlos crecer de igual manera, y que siempre estemos juntos.

A mis amigos del grupo de investigación, Andrés, Silvia, Félix, Jessica, Lady, David, al laboratorio CROM-MASS y a todos mis compañeros, por hacerme sentir siempre una persona muy querida y especial. Sus consejos y todo el apoyo recibido son parte fundamental de esta primera etapa que concluye hoy para mí.

A Dautmer, quien ha sido mi apoyo y compañía en la finalización de este trabajo de grado, gracias por devolverme la confianza en mí misma, y por todo el amor que me ha brindado, pues ha sido la mejor cura para superar dificultades.

Al programa “Bio-Reto XXI - 15:50: Desarrollo de bioproductos para los sectores salud, agropecuario y cosmético, como resultado del estudio de la biodiversidad colombiana”, del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Minciencias (contrato RC-FP44842-212-2018) por la financiación para la ejecución de este trabajo.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Marco teórico	17
1.1 Metabolitos secundarios en las plantas	17
1.1.1 Terpenoides.....	17
1.1.2 Compuestos fenólicos y sus derivados	21
1.2 El género <i>Varronia</i>	24
1.3 <i>Varronia curassavica</i>	25
1.4 Aceite esencial	26
1.4.1 Aspectos generales.....	26
1.4.2 Métodos de obtención de aceites esenciales	27
1.4.3 Análisis de aceites esenciales.....	27
1.5 Fracción volátil	28
1.5.1 Aspectos generales.....	28
1.5.2 Método de monitoreo de compuestos volátiles.....	29
1.5.3 Análisis cromatográfico de fracción volátil.....	29
1.6 Extractos	30
1.6.1 Aspectos generales.....	30
1.6.2 Métodos de obtención de extractos.....	30
1.6.3. Análisis cromatográfico de extractos.....	31
2. Estado del arte.....	32
3. Objetivos	39
3.1 Objetivo General.....	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. Metodología	40
4.1 Reactivos y solventes.....	40
4.2 Material vegetal	41
4.3 Obtención de metabolitos secundarios volátiles	41
4.3.1 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas	41
4.3.2 Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza	42

4.4 Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios volátiles.....	42
4.4.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	42
4.4.2 Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama.....	44
4.4.2.1 Determinación de las figuras analíticas de mérito por GC/FID.....	45
4.5 Obtención de metabolitos secundarios semi-volátiles y no volátiles.....	47
4.5.1 Extracción con solvente asistida por ultrasonido.....	48
4.5.2 Dispersión de la matriz en fase sólida.....	48
4.6 Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios semi-volátiles y no volátiles	48
4.6.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia con un detector de arreglo de diodos.....	48
4.6.2 Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución <i>Q-Exactive</i>	50
5. Resultados y discusión de resultados	51
5.1 Identificación botánica.....	51
5.2 Obtención, caracterización y cuantificación del aceite esencial	52
5.3 Secado y tratamiento del material vegetal	62
5.4 Caracterización química de la fracción volátil de hojas y flores de <i>V. curassavica</i>	64
5.5 Caracterización química y cuantificación de los extractos SE y MSPD de <i>V. curassavica</i> por cromatografía líquida.....	68
6. Conclusiones.....	83
7. Divulgación de resultados en eventos científicos	84
8. Recomendaciones	85
Referencias Bibliográficas	86
Anexos	86

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Resumen comparativo del estudio cuantitativo sobre <i>V. curassavica</i> y sus sinonimias. Base de datos: <i>Scopus</i> (<i>Elsevier</i>), ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“ <i>Varronia curassavica</i> ”, “ <i>Cordia curassavica</i> ” y “ <i>Cordia verbenacea</i> ”). Periodo de observación: 1980-2020, fecha de consulta: agosto de 2022.	32
Tabla 2. Estudios sobre <i>V. curassavica</i> y sus sinonimias. Base de datos: <i>Scopus</i> (<i>Elsevier</i>).	35
Tabla 3. Composición química por GC/MS del AE de partes aéreas de <i>V. curassavica</i> . El orden de elución de los compuestos esta dado por la columna DB-5MS.	54
Tabla 4. Cuantificación por GC/FID, del AE de <i>V. curassavica</i> , obtenido por MWHF mediante curvas de calibración externas con el uso de sustancias patrón.	60
Tabla 5. Actividades biológicas comprobadas del AE de <i>V. curassavica</i>	62
Tabla 6. Resultados de la pérdida de humedad del material vegetal de <i>V. curassavica</i> , después de la destilación, en función del tiempo.	64
Tabla 7. Áreas cromatográficas totales de las fracciones volátiles de hojas y flores, obtenidas por HS-SPME / GC/FID. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30.	65
Tabla 8. Relación de entre familias en función del tiempo para los compuestos volátiles en flores de <i>V. curassavica</i> y el estándar interno ($\Sigma A_i / A_{ISTD}$)	67
Tabla 9. Rendimiento de los extractos obtenidos de partes aéreas de <i>V. curassavica</i>	68
Tabla 10. Masas exactas de iones o moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, identificadas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS operado en modo SIM, de compuestos presentes extractos vegetales de <i>V. curassavica</i>	73
Tabla 11. Cuantificación por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo SIM, de los extractos vegetales bajo estudio de <i>V. curassavica</i> , de materiales vegetales antes y después de su destilación.	78

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1. Biosíntesis de los bloques de construcción de los terpenos mediante la ruta del mevalonato. (Dewick, 2002). <i>Mevalonate pathway</i> . Tomado y traducido de <i>Medicinal Natural Biosynthetic Approach</i> . 2 nd Edition.....	18
Figura 2. Biosíntesis del 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato para la producción de los bloques de construcción de los terpenos mediante la ruta del fosfato de metileritrilo. (Dewick, 2002). <i>Mevalonate pathway</i> . Tomado y traducido de <i>Medicinal Natural Biosynthetic Approach</i> . 2 nd Edition.....	20
Figura 3. Biosíntesis de los bloques de construcción de los terpenos mediante la ruta del fosfato de metileritrilo. (Dewick, 2002). <i>Methylerythritol Phosphate pathway</i> . Tomado y traducido de <i>Medicinal Natural Biosynthetic Approach</i> . 2 nd Edition.....	21
Figura 4. Estructura general de los flavonoides. (Van Acker et al., 1996). <i>Flavonoids</i> . Tomado de <i>Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids</i> . <i>Free Radical Biology & Medicine</i>	22
Figura 5. Biosíntesis de compuestos fenólicos a través de las rutas metabólicas del ácido shikímico y del ácido malónico. (Havsteen, 2002). Tomado y traducido de <i>Biochemistry and medical significance of the flavonoids</i> . 1st Edition.	23
Figura 6. Biosíntesis de los flavonoides. (Petrussa et al., 2013). Tomado de <i>Plant flavonoids: Biosynthesis, transport, and involvement in stress responses</i> . <i>International Journal of Molecular Sciences</i>	24
Figura 7. Algunas especies del género <i>Varronia</i> . A. Anacahuita (<i>V. boissiere</i>). B. Sebestén de las Antillas (<i>V. sebestena</i>). C. Muyuyo (<i>V. lutea</i>). D. Mulato (<i>V. curassavica</i>). Fuente: Imágenes tomadas de Google, julio del 2022.	25
Figura 8. <i>Varronia curassavica</i> . A. Cultivo experimental. B. Inflorescencias. C. Frutos. Fuente: Laisha Dally Burgos Díaz, Parcelas experimentales complejo CENIVAM-UIS, Bucaramanga, mayo de 2022.....	26
Figura 9. Procedimiento general propuesto.	40
Figura 10. Cromatógrafo de gases AT 6890 Plus, equipado con un detector selectivo de masas MS 5973 Network. Fuente: Laisha Dally Burgos Díaz, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, julio de 2022.	43
Figura 11. Cromatógrafo de gases AT 6890N, acoplado a un detector de ionización en llama FID. Fuente: Laisha Dally Burgos Díaz, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, mayo de 2022.	45

- Figura 12. Cromatógrafo líquido AT 1260, equipado con una bomba cuaternaria, y detectores UV-VIS y detectores de arreglo de diodos, DAD. Fuente: Laisha Dally Burgos Díaz, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, mayo de 2022..... 49
- Figura 13. Cromatógrafo líquido de ultra-alta resolución *Vanquish*TM equipado con una unidad de desgasificación, una bomba binaria de gradiente, un auto muestreador y un compartimento de columna controlado termostáticamente. Fuente: Laisha Dally Burgos Díaz, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, mayo de 2022..... 50
- Figura 14. Pliego testigo de la especie identificada *Varronia curassavica*. Fuente: Laisha Dally Burgos Díaz. UIS, Bucaramanga, mayo de 2022. 52
- Figura 15. Cromatograma (TIC) del aceite esencial de *V. curassavica* obtenido por MWHD. GC/MS, columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30. *ISTD* (*n*-tetradecano, 500 mg/L). 53
- Figura 16. Espectro de masas del monoterpeno α -pineno. GC/MS, columna DB-5MS. 59
- Figura 17. Cromatograma (TIC) del aceite esencial de *V. curassavica* obtenido por MWHD. GC/FID, columna DB-5 (60 m), *split* 1:30. *ISTD* (*n*-tetradecano, 500 mg/L). 60
- Figura 18. Comparación cuantitativa (relación $\Sigma A_i / A_{ISTD}$, *ISTD* = *n*-tetradecano, 500 mg/L) de las principales familias de sustancias extraídas por MWHD del AE de *V. curassavica*. GC/FID, columna DB-5 (60 m), *split* 1:30. 61
- Figura 19. Curva de secado del material vegetal de *V. curassavica* después de su destilación por hidrodesilación asistida, realizada del 15 al 30 de octubre de 2021 (28 ± 1 °C; $46 \pm 0.4\%$ humedad relativa). Lugar de almacenamiento: vivero número dos del Complejo Piloto Agroindustrial CENIVAM, UIS. 63
- Figura 20. Perfiles de saturación de la exposición entre la fibra y las A. Hojas y B. Flores de *V. curassavica*, en función del tiempo, obtenidas por HS-SPME / GC/FID. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30..... 65
- Figura 21. Cromatograma (TIC) de la fracción volátil de hojas de *V. curassavica*, obtenida por HS-SPME. Columna DB-5MS, 60 m. Fibra: PDMS/DVB, 65 μ m..... 66
- Figura 22. Cromatograma (TIC) de la fracción volátil de flores de *V. curassavica*, obtenida por HS-SPME. Columna DB-5MS, 60 m. Fibra: PDMS/DVB, 65 μ m..... 66
- Figura 23. Distribución de familias en función del tiempo para los compuestos volátiles en flores de *V. curassavica*. obtenidas por HS-SPME / GC/FID. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30. 67
- Figura 24. Perfiles cromatográficos del extracto hidroetanólico de *V. curassavica*, antes de su destilación. HPLC/DAD, Columna C₁₈, 250 mm x 4.6 mm (d.i.) x 5 μ m..... 69
- Figura 25. Perfiles cromatográficos de los extractos SE de partes aéreas de material vegetal antes y después de la destilación de *V. curassavica*. HPLC/DAD, Columna C₁₈, 250 mm de longitud x 4.6 mm (d.i.) x 5 μ m, $\lambda=270$ nm. 70

Figura 26. Perfiles cromatográficos de los extractos MSPD de partes aéreas de material vegetal antes y después de la destilación de <i>V. curassavica</i> . HPLC/DAD, Columna C ₁₈ , 250 mm de longitud x 4.6 mm (d.i.) x 5 µm, λ=270 nm.....	71
Figura 28. Corrientes iónicas extraídas (EIC) en modo SIM de los extractos SE de <i>V. curassavica</i> , de material vegetal antes y después de su destilación	72
Figura 29. Patrón de fragmentación típico para los flavonoles.	80
Figura 30. Espectro de masas artemetina, <i>m/z</i> 389.12268, presente en extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, modo SIM.....	80
Figura 31. Espectro de masas hidroxí-artemetina, <i>m/z</i> 405.11743, presente en extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, modo SIM.....	80

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Anexo 1.....	93

Abreviaturas, acrónimos y siglas

AE	Aceite(s) esencial(es).
AF	Ácido fórmico.
AT	<i>Agilent Technologies</i> .
ca.	<i>Circa</i> (Alrededor o cerca de).
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas.
d.i.	Diámetro interno de la columna cromatográfica.
df	Grosor de la fase estacionaria.
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo).
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización).
et al.	<i>Et alii</i> (Y otros).
eV	Electrón-voltio.
EI	<i>Electronic Ionization</i> (Ionización electronica o Impacto de electrones).
FA	Formiato de amonio.
GC/FID	<i>Gas Chromatography Coupled to Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases con detector de ionización en llama).
GC/MS	<i>Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
HD	Hidrodestilación.
HPLC/DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography Coupled to Diode-Array Detector</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos).
HS-SPME	<i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza).
i.e.	<i>Id est</i> (Es decir).
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección).
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Límite de cuantificación).
MSD	<i>Mass selective detector</i> (Detector selectivo de masas).

MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de la matriz en fase sólida).
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por radiación de microondas).
<i>m/z</i>	Relación masa-carga.
SE	Solvent Extraction (Extracción con solvente).
<i>Syn</i>	<i>Synonymía</i> (Sinonimia).
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total).
<i>t_R</i>	Tiempo de retención (min).
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia).

Resumen

Título: Análisis cromatográfico de los metabolitos secundarios de *Varronia curassavica* Jacq. (Boraginaceae) obtenidos por diferentes métodos de extracción*

Autor: Laisha Dally BURGOS DÍAZ**

Palabras Clave: *Varronia curassavica*, aceite esencial, fracción volátil, extractos, GC/MS, LC/MS.

Descripción: *Varronia curassavica* Jacq. (Boraginaceae) es un subarbusto aromático que crece de forma silvestre en Colombia. Sus metabolitos secundarios son de interés por su actividad fitoterapéutica contra enfermedades inflamatorias. En este trabajo, se emplearon los métodos de extracción, a saber: hidrodestilación asistida por radiación microondas (MWHd) para la obtención del aceite esencial; microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) para la obtención de las fracciones volátiles de hojas y flores; extracción con solvente (SE) y dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) para la obtención de extractos a partir de material vegetal antes y después de su destilación. La identificación de los compuestos, según la naturaleza del analito, se realizó por GC/MS y UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-HRMS y se basó en criterios cromatográficos (tiempos de retención, índices de retención y compuestos estándar) y de espectros de masas (patrones de fragmentación, masas exactas, relación isotópica y comparación con bases de datos). Los terpenoides α -pineno (180 ± 2 mg/g AE) y (*E*)- β -cariofileno (99.0 ± 0.4 mg/g AE) fueron los principales compuestos encontrados en el AE. Las fragancias de hojas y flores de *V. curassavica* están dadas principalmente por el α -pineno (24.0-10.8%) y el (*E*)- β -cariofileno (23.0-31.0%), respectivamente. Los extractos SE y MSPD obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación mostraron principalmente ácido rosmarínico (4.40-32.0 mg/g extracto), artemetina (8.0-16.0 mg/g extracto) e hidroxí-artemetina (5.00-10.0 mg/g extracto), respectivamente. Después de los procesos de destilación, el ácido rosmarínico (14.3 mg/g de extracto), y los flavonoles *O*-metoxilados artemetina (15.0 mg/g de extracto) e hidroxí-artemetina (9.0 mg/g de extracto) aumentaron su concentración en el extracto hidroetanólico. La información estructural encontrada podría ser útil para las industrias farmacéutica, cosmética, de sabores y fragancias, y una alternativa de uso a la biomasa residual generada por la destilación de plantas aromáticas.

* Proyecto de Grado

** Facultad de ciencias. Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.

Introducción

Varronia curassavica Jacq. Roem & Schult (Syn. *Cordia curassavica* y *Cordia verbenacea*), es un subarbusto aromático nativo de Centroamérica y Sudamérica (Trópicos, 2022), empleado en medicina natural contra resfriados, gripe, neumonía y como emoliente en casos de heridas o golpes (Barriga, 1992; Gupta, 1995). El aceite esencial de esta planta se produce a gran escala, debido a su potencial analgésico y antiinflamatorio, lo que representa un valor comercial en la industria farmacéutica (Matias *et al.*, 2013a; Pianowski *et al.*, 2018). Sin embargo, durante este proceso, se genera una gran cantidad de biomasa residual (material vegetal después de la destilación), debido a los bajos rendimientos del AE (< 1%).

En la búsqueda de nuevos métodos y tecnologías que permitan el aprovechamiento de este subproducto, se demostró que el material vegetal después de la destilación representa aún, una fuente de compuestos bioactivos. A partir de la biomasa residual obtenida, de la destilación de plantas aromáticas y medicinales, *e.g.*, *Salvia rosmarinus*, *Ocimum basilicum* y *L. origanoides*, se han logrado extraer ácidos fenólicos y flavonoides, con propiedades antioxidantes (Santana-Méridas *et al.*, 2014; Pagano *et al.*, 2018; Arias *et al.*, 2020). Estos resultados llevaron a la hipótesis de que la biomasa residual de otras especies de plantas aromáticas puede ser transformada en productos de valor agregado. Dar valor a los residuos impacta positivamente, no solo en ganancias económicas para los cultivadores, sino también, contribuye al problema de eliminación de material vegetal después del proceso de destilación (*ca.* 6 millones de toneladas al año). Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue analizar la composición química por cromatografía de gases del AE y la fracción volátil de *V. curassavica*; y la obtención de extractos a partir de material vegetal antes y después de la destilación, para su caracterización por cromatografía líquida.

El proyecto de grado se dividió en tres (3) etapas, a saber: En la **Etapla 1**, se realizó la obtención del aceite esencial (AE) por hidrodestilación asistida por microondas, y su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) y cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (GC/FID). Se identificaron 52 compuestos en el AE de partes aéreas de *V. curassavica*, se destacan, el α -pineno (180×10^3 mg/kg AE), el (E)- β -cariofileno (99×10^3 mg/kg AE) y el α -humuleno (15×10^3 mg/kg AE). Estos dos últimos, se

consideran los marcadores químicos del AE, por sus propiedades antiinflamatorias (Fernandes *et al.*, 2007; Gilbert & Favoreto, 2012).

En la **Etapa 2**, se estudió la composición química de las fracciones volátiles de hojas y flores de *V. curassavica*, obtenidas por microextracción en fase sólida de espacio de cabeza, y su análisis por GC/MS y GC/FID. Se determinó el perfil de saturación para las diferentes familias de compuestos presentes en las fracciones volátiles, en función del tiempo. Se encontró que la fragancia de las hojas y las flores está dada principalmente por el α -pineno (24.0-10.8%) y el (*E*)- β -cariofileno (23.0-31.0%), respectivamente. Estos resultados son coherentes comparados con los encontrados en el AE.

En la **Etapa 3**, se comparó la composición química de los extractos de material vegetal antes y después de la destilación de *V. curassavica*, obtenidos por extracción con solvente (SE) y dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y su análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD) y cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución-cuadrupolo Q-*Orbitrap* (UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS). Los extractos SE y MSPD obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación mostraron principalmente ácido rosmarínico (4.40-32.0 mg/g extracto), artemetina (8.0-16.0 mg/g extracto) e hidroxí-artemetina (5.00-10.0 mg/g extracto), respectivamente. Los procesos de destilación favorecieron el aumento de la concentración en el extracto SE, del ácido rosmarínico (14.3 mg/g de extracto), y de los flavonoles *O*-metoxilados artemetina (15.0 mg/g de extracto) e hidroxí-artemetina (9.0 mg/g de extracto).

La especie *V. curassavica* es una planta aromática que puede ser aprovechada integralmente no solo por la composición química de su AE. A partir de la biomasa residual, producto de su destilación, es posible obtener e identificar compuestos con propiedades bioactivas que son de interés para los sectores cosmético y farmacéutico. En el estudio de la biomasa residual de *V. curassavica*, la aplicación de métodos extractivos para obtener metabolitos secundarios bioactivos, y el uso de instrumentación analítica de alta resolución, permitió reportar por primera vez el rendimiento y la composición química de extractos MSPD, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación; los espectros de masas y los iones-producto de la artemetina, la

hidroxi-artemetina por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS en modo de monitoreo de iones seleccionados (SIM, por sus siglas en inglés). Se espera que los resultados de esta investigación incentiven el desarrollo de nuevas tecnologías para el aprovechamiento sostenible de plantas aromáticas medicinales, a escala industrial, y optimicen el uso de la tierra con cultivos promisorios en Colombia.

Este proyecto de grado se enmarcó en la ejecución del programa “Bio-Reto XXI - 15:50: Desarrollo de bioproductos para los sectores salud, agropecuario y cosmético, como resultado del estudio de la biodiversidad colombiana”, financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Minciencias, que incluye grupos de investigación nacionales e internacionales, y es liderado por el Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL (contrato RC-FP44842-212-2018). El material vegetal fue suministrado a través del “Contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados con fines de bioprospección” N° 270, suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Santander, Colombia).

1. Marco teórico

1.1 Metabolitos secundarios en las plantas

Son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas, de bajo y mediano peso molecular, que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo, a diferencia de los metabolitos primarios (Croteau *et al.*, 2000). Aunque no se conoce completamente el rol que desempeñan los metabolitos secundarios, están involucrados en procesos de polinización, reproducción, defensa química contra diferentes tipos de plagas y son responsables de las características organolépticas de las plantas y de su actividad biológica (Rhodes, 1994).

Los metabolitos secundarios de las plantas presentan una amplia diversidad química de compuestos, pueden clasificarse en tres grandes grupos: **1.** Terpenoides; **2.** Compuestos fenólicos y **3.** Compuestos nitrogenados (Taiz & Zeiger, 2003).

1.1.1 Terpenoides

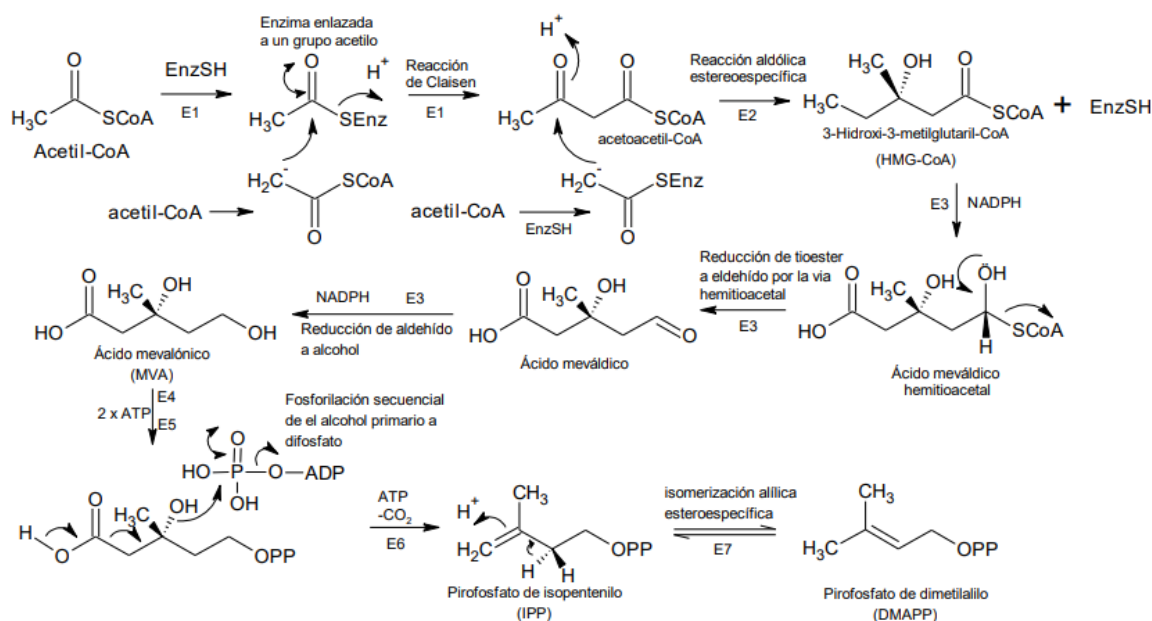
Estos compuestos orgánicos, conformados por unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), son los metabolitos más abundantes en el mundo de los productos naturales (Croteau *et al.*, 2000). El número de unidades isoprenicas (C_5) presentes en su estructura, permite clasificarlos como: monoterpenoides (C_{10}), sesquiterpenoides (C_{15}), diterpenoides (C_{20}), sesquiterpenoides (C_{25}), triterpenoides (C_{30}), entre otros. Los terpenoides de las plantas son extensamente usados por sus cualidades aromáticas. Juegan un rol importante en la medicina tradicional y en la actualidad, son ingredientes activos en las industrias farmacéutica, cosmética, y de sabores y fragancias, por su alto potencial biológico (Gershenzon & Dudareva, 2007; Bergman *et al.*, 2019).

La biosíntesis de los terpenoides parte de la formación de dos bloques de construcción: el pirofosfato de isopentenilo (IPP, por sus siglas en inglés), y su isómero el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP, por sus siglas en inglés). Éstos se producen por medio de dos rutas metabólicas: **1.** Ruta del ácido mevalónico y **2.** Ruta del fosfato de metileritrilo. La ruta del ácido mevalónico (Véase Figura 1) parte de dos unidades de acetil coenzima A (Ac-CoA), que se condensan por medio de una reacción tipo *Claisen* para dar acetoacetil-CoA (AcAcCoA). Paso seguido, se da la incorporación de una tercera unidad de AcCoA, a través de una adición aldólica estereoespecífica, para dar como producto el éster 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). El

tioéster de la coenzima A se reduce para formar el aldehído correspondiente, el mevaldehído (MVA, por sus siglas en inglés), el cual se reduce a ácido mevalónico (MEV, por sus siglas en inglés). Por acción de dos moléculas de adenosín trifosfato (ATP) el mevalonato se fosforila (MEV-P y MEV-PP) y descarboxila para dar como productos los precursores de los terpenos, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero, el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Por esta ruta, que se lleva a cabo en el citosol, se sintetizan principalmente sesquiterpenoides, triterpenoides y politerpenoides (Goldstein & Brown, 1990; Dewick, 2002; Holstein & Hohl, 2004).

Figura 1.

Biosíntesis de los bloques de construcción de los terpenos mediante la ruta del mevalonato. (Dewick, 2002). Mevalonate pathway.



E1: Acetoacetyl-CoA sintetasa

E2: 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintetasa (HMG-CoA sintetasa)

E3: 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa)

E4: Mevalonato quinasa

E5: Fosfomevalonato quinasa

E6: Mevalonato 5-difosfato descarboxilasa

E7: Difosfato de isopentenilo isomerasa (IPP isomerasa)

Nota. Tomado y traducido de Medicinal Natural Biosynthetic Approach. 2nd Edition.

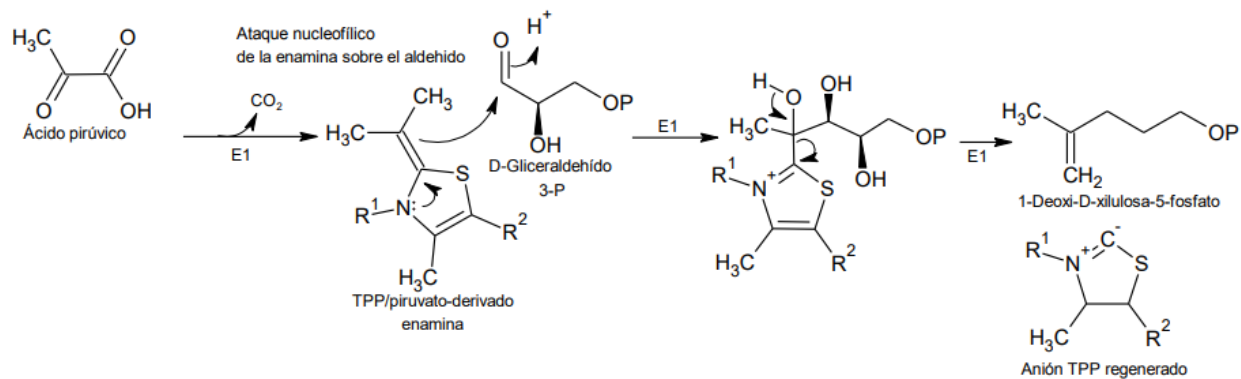
La segunda ruta del fosfato de metileritrilo (MEP, por sus siglas en inglés), ocurre en los cloroplastos de la planta, cuando el ácido pirúvico y el gliceraldehído-3-fosfato, producen el MEP. Inicialmente, sucede la pérdida del carboxilo del piruvato con la mediación del difosfato de tiamina para producir un equivalente de acetaldehído enlazado a una enamina (Veáse

Figura 2). La enamina formada, se une al gliceraldehído-4-fosfato mediante una reacción nucleofílica; el intermediario formado pierde pirofosfato de tiamina, y de este modo, se genera el 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato, que se transforma al MEP mediante un rearrreglo por una reacción aldol-aldol inversa, seguida de una reducción (Dewick, 2002; Munos *et al.*, 2009). El producto formado, contiene el sistema de cadena ramificada, equivalente a la unidad de isopreno (Véase

Figura 3). La adición sucesiva de unidades precursoras a las uniones “cabeza-cola”, enlaces de una unidad IPP con una unidad DMAPP, producen las moléculas precursoras de los terpenoides de cadenas más largas, como el geranil difosfato (GPP, por sus siglas en inglés), el farnesil difosfato (FPP, por sus siglas en inglés) y el geranilgeranil difosfato (GGPP, por sus siglas en inglés) (Lichtenthaler *et al.*, 1997).

Figura 2.

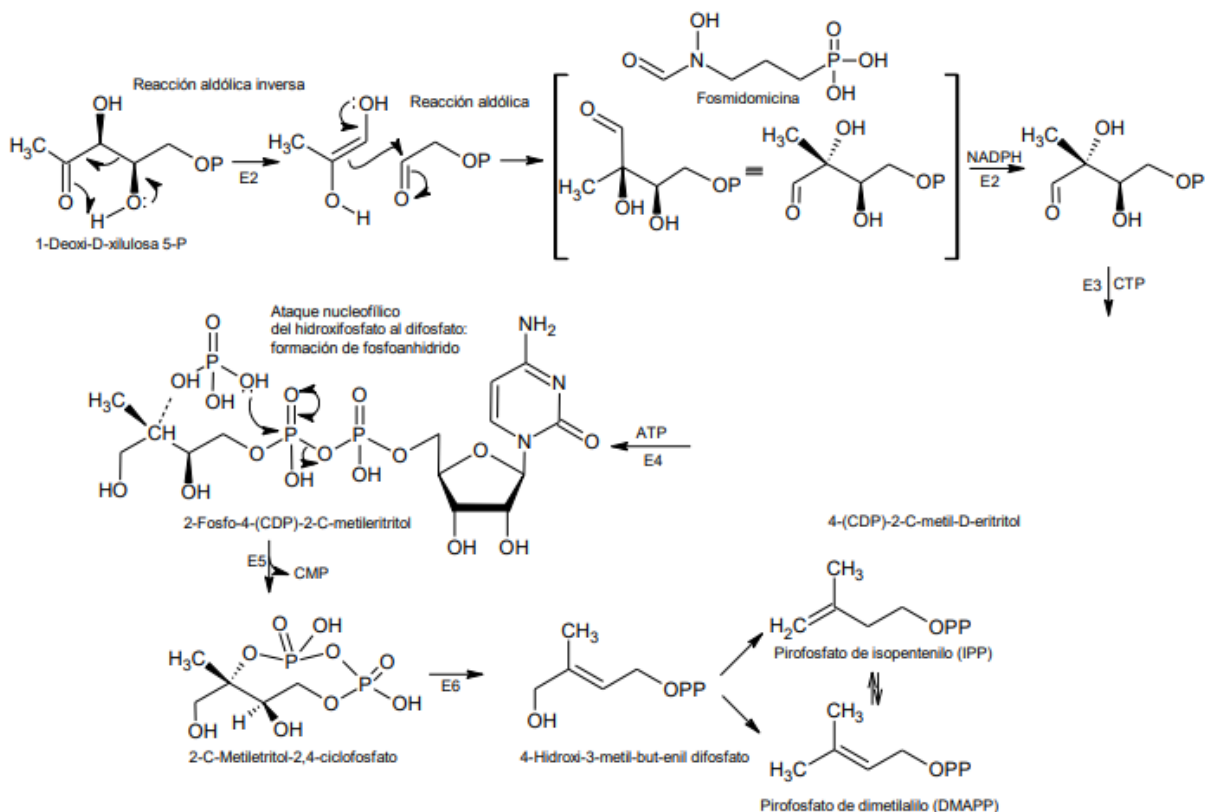
Biosíntesis del 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato para la producción de los bloques de construcción de los terpenos mediante la ruta del fosfato de metileritrilo. (Dewick, 2002). Mevalonate pathway.



Nota. Tomado y traducido de Medicinal Natural Biosynthetic Approach. 2nd Edition.

Figura 3.

Biosíntesis de los bloques de construcción de los terpenos mediante la ruta del fosfato de metileritrilo. (Dewick, 2002). Methylerythritol Phosphate pathway.



E1: 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXP sintasa)

E2: 2-C-metil-eritritol-4-fosfato sintada (IspC)

E3: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa (IspD)

E4: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa (IspE)

E5: 4-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa (IspE)

E6: 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato sintasa (IspG)

Nota. Tomado y traducido de Medicinal Natural Biosynthetic Approach. 2nd Edition

1.1.2 Compuestos fenólicos y sus derivados

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo (Bhat *et al.*, 2005). Pueden clasificarse, según la base de su esqueleto químico, en ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbencenos, lignanos, entre otros (Vermeris & Nicholson, 2008a).

Los polifenoles están presentes en las plantas como una mezcla y no como componentes aislados. Al igual que los terpenoides, este grupo de compuestos desempeña roles de defensa química, protección ante herbívoros y patógenos; y algunos de ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes antioxidantes, manteniendo el estado de óxido-reducción de

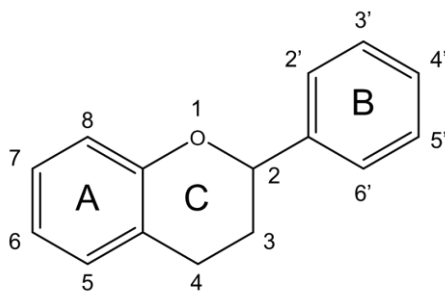
las células en las plantas, por su facilidad de ceder un átomo de hidrógeno (Taiz & Zeiger, 2003; Vermerris & Nicholson, 2008b).

La biosíntesis de compuestos fenólicos se da principalmente por dos rutas: **1.** La ruta del ácido shikímico y **2.** La ruta del ácido malónico (Veáse **Figura 5**). En las plantas superiores, la mayoría de los polifenoles, se sintetizan a través del ácido shikímico, por la reacción entre la eritrosa-4-fosfato y el ácido fosfoenolpirúvico, produciendo la fenilalanina, que al perder el grupo amino ($-NH_2$), catalizada por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés), se convierte en ácido (*E*)-cinámico, a partir del cual se sintetiza la coenzima *p*-coumaroil-CoA, precursor de los flavonoides (Havsteen, 2002; Andersen & Markham, 2005).

Los flavonoides, son la familia de compuestos más abundantes de los polifenoles, se encuentran como mezclas complejas en los tallos, hojas y flores de muchas plantas (Winkel-Shirley, 2001). Estos compuestos están formados por dos anillos aromáticos (A y B), unidos con un anillo heterociclo C, de tres carbonos. Su estructura base es un esqueleto $C_6-C_3-C_6$ (Véase **Figura 4**).

Figura 4.

Estructura general de los flavonoides. (Van Acker et al., 1996). Flavonoids.



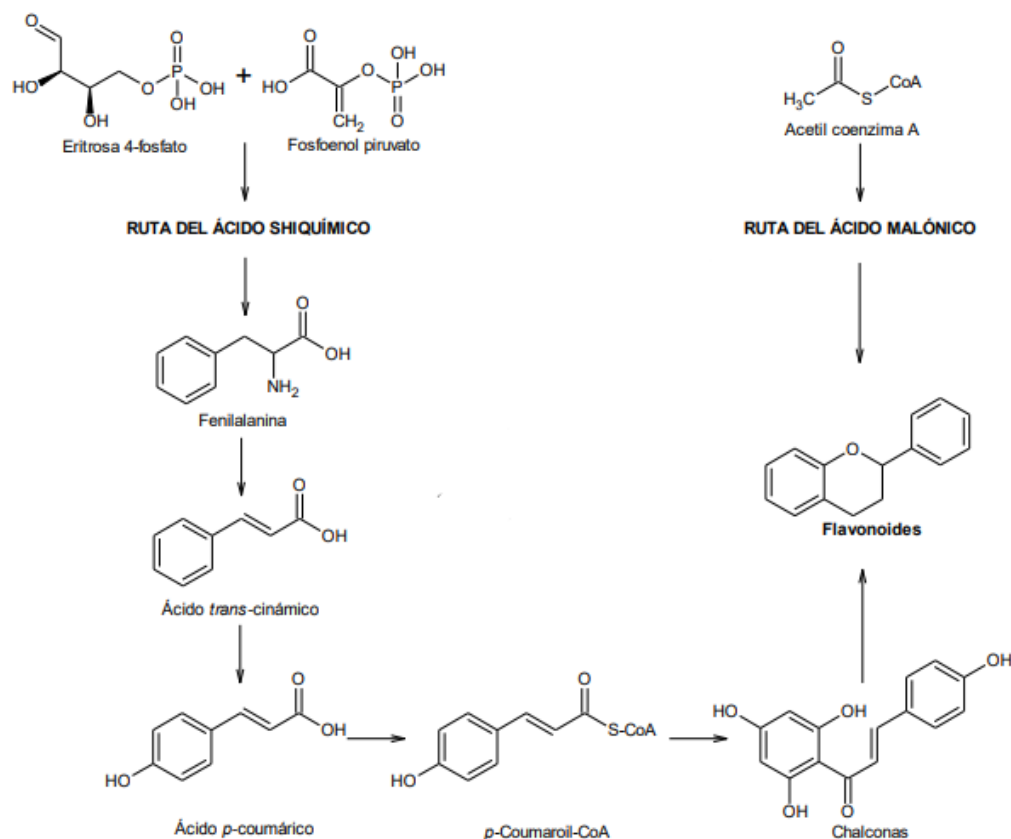
Nota. Tomado de Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology & Medicine.

Según el tipo de sustituyente y la posición en la que se encuentran, los flavonoides se clasifican en cinco grupos, a saber: **1.** Flavonoles: un doble enlace en la posición dos-tres, un hidroxilo en la posición tres y un grupo cetona en la posición cuatro; **2.** Dihidroflavonoles: dos hidroxilos, uno en la posición tres y otro en la posición cuatro; **3.** Flavonas: doble enlace entre las posiciones dos-tres y un grupo cetona en la posición cuatro; **4.** Flavanonas: un grupo cetona en la posición cuatro y **5.** Flavanoles: tres grupos hidroxilo (Havsteen, 2002; Andersen & Markham,

2005). En las plantas, los flavonoides actúan como reguladores de crecimiento e inhibidores del estrés oxidativo; la eficiencia de los flavonoides como neutralizadores de radicales libres depende de los sustituyentes presentes en sus anillos aromáticos (Van Acker *et al.*, 1996). Otra función importante de estos compuestos es la atracción de los animales polinizadores, a través del color de la planta o de sus flores (Winkel-Shirley, 2001).

Figura 5.

Biosíntesis de compuestos fenólicos a través de las rutas metabólicas del ácido shikímico y del ácido malónico. (Havsteen, 2002).



Nota. Tomado y traducido de Biochemistry and medical significance of the flavonoids. 1st Edition.

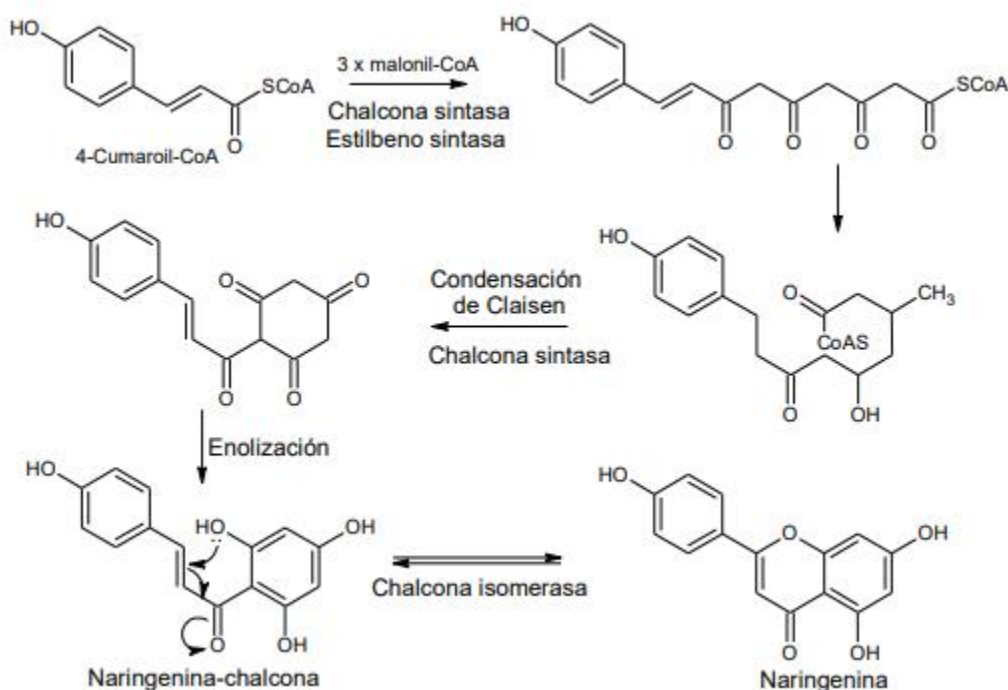
Los flavonoides son sintetizados mediante la ruta del ácido shikímico, en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares (Véase

Figura 6). Este proceso comienza cuando la fenilalanina, se transforma a *p*-coumaroil-CoA, que se condensa con tres moléculas de malonil-CoA, bajo la acción de las enzimas chalcona sintasa (CHS, por sus siglas en inglés) y chalcona isomerasa (CHI, por sus siglas en inglés). El

producto de este proceso es la flavanona llamada naringenina (Falcone-Ferreira *et al.*, 2012). La acción de oxidasas, reductasas e isomerasas sobre esta flavanona y sus derivados permite la formación de distintos flavonoides (Petrussa *et al.*, 2013).

Figura 6.

Biosíntesis de los flavonoides. (Petrussa et al., 2013).



Nota. Tomado de Plant flavonoids: Biosynthesis, transport, and involvement in stress responses. International Journal of Molecular Sciences.

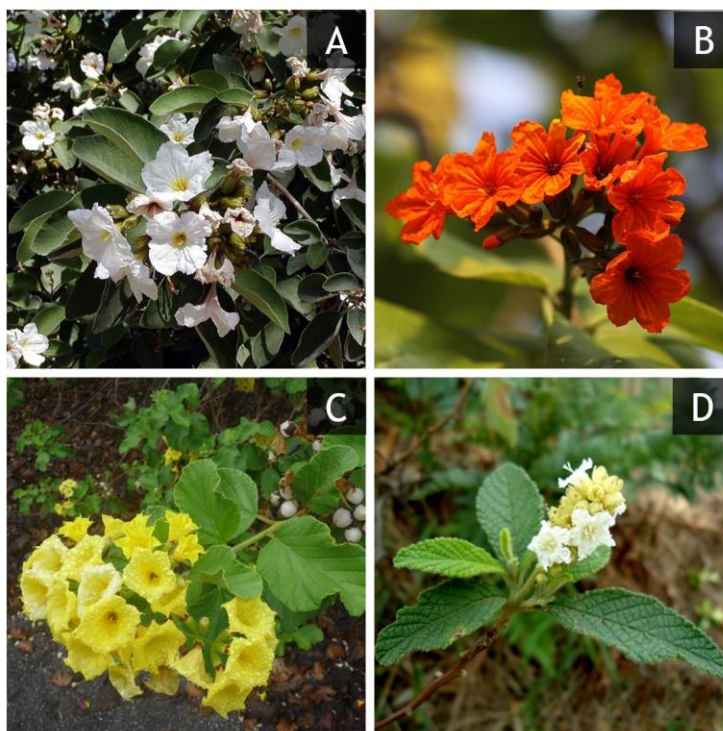
1.2 El género *Varronia*

Las plantas del género *Varronia* (Familia Boraginaceae) son árboles o arbustos, principalmente, aromáticos, de tallo múltiple con inflorescencias poliflorales. Es un género conformado por ca. 125 especies ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de América, Asia y África (Miller, 2013). En Colombia, se reportan más de 26 especies, que son comunes en linderos y corrales (Pérez, 1956).

Muchas especies del género *Varronia* se utilizan como plantas ornamentales (*V. boissiere*), como fuente de madera en diferentes trabajos de ebanistería (*V. sebestena*, *V. lutea*), en medicina popular (*V. curassavica*) y en repoblaciones forestales (Véase **Figura 7**). Se han identificado y aislado diversos compuestos químicos de especies del género, particularmente, metabolitos secundarios de la clase de terpenoides, flavonoides y taninos (Thirupathi *et al.*, 2008).

Figura 7.

Algunas especies del género Varronia. A. Anacahuita (V. boissiere). B. Sebestén de las Antillas (V. sebestena). C. Muyuyo (V. lutea). D. Mulato (V. curassavica).



Nota. Imágenes tomadas de Google, julio del 2022.

1.3 *Varronia curassavica*

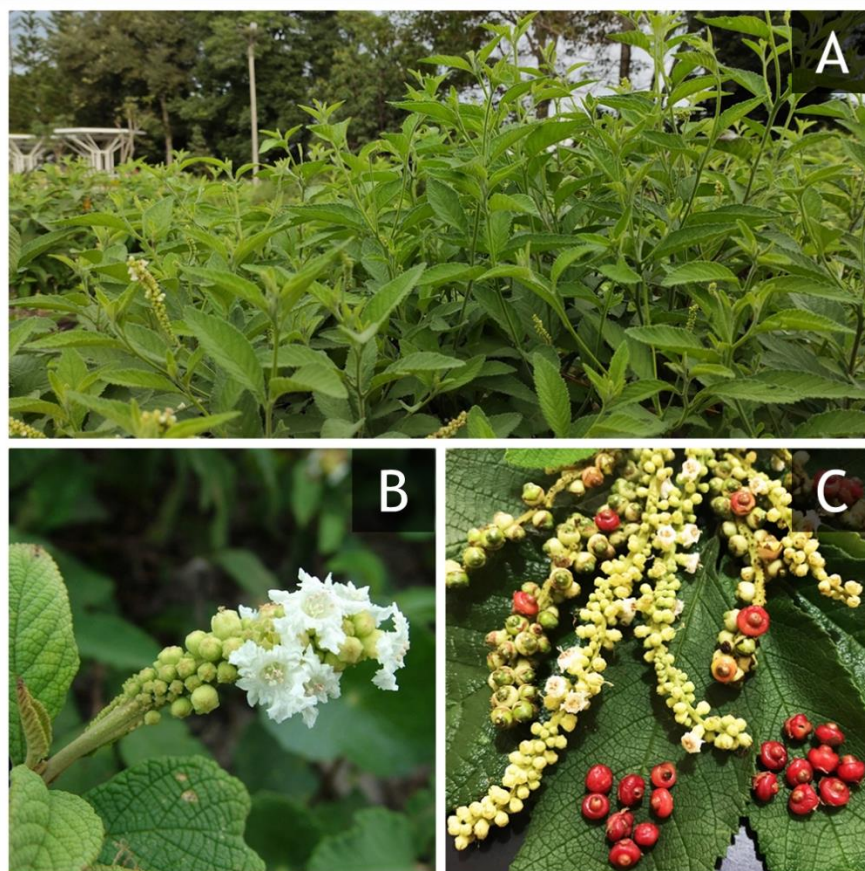
Es un subarbusto aromático originario del Neotrópico, reportado por primera vez en 1819 por Jacquin, Roemer y Schult (Trópicos, 2022). Esta planta alcanza hasta 2.5 m de altura, sus hojas de 40–100 mm de largo y 15–60 mm de ancho son de forma lanceolada, posee flores blancas pequeñas y frutos de color rojo de 4-6 mm de largo que crecen juntos en racimos en la parte terminal de las ramas (Véase **Figura 8**) (Estrada, 1994).

V. curassavica crece y se desarrolla en un rango altitudinal que varía desde el nivel del mar hasta los 2000 m, se encuentra como vegetación secundaria en muchos bosques. En Colombia, la

planta se conoce popularmente como “mulato” y se utiliza en la medicina natural para tratamientos de diversa índole. La infusión de sus hojas se emplea en el tratamiento de resfriados, gripe, neumonía y como emoliente en casos de heridas o golpes; las flores son utilizadas como sudorífico y los frutos como expectorante para combatir la tos espasmódica (Barriga, 1992; Gupta, 1995).

Figura 8.

Varronia curassavica. A. Cultivo experimental. B. Inflorescencias. C. Frutos.



Nota. Laisha Dally Burgos Díaz, Parcelas experimentales complejo CENIVAM-UIS, Bucaramanga, mayo de 2022.

1.4 Aceite esencial

1.4.1 Aspectos generales

Es una mezcla odorífera compleja de compuestos orgánicos volátiles de bajo peso molecular, producto del metabolismo secundario de las plantas (Stashenko *et al.*, 1998). Su composición química es diversa, los AE están formados en su mayoría por terpenoides, junto con otros compuestos, generalmente, oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, fenoles y

ácidos) que evocan el olor y el sabor, en forma muy concentrada, de la planta de donde proceden (Stashenko & Martínez, 2012).

Los aceites esenciales se pueden encontrar en diferentes partes de la planta, en las flores (la lavanda), en todo el árbol (el eucalipto), en las hojas (la citronela), en la madera (el sándalo), en la raíz (el vetiver), en la resina que exudan (el incienso, la mirra y el benjuí) y en la cáscara de los frutos (el limón y la naranja). Dentro de los tejidos vegetativos, se encuentran en células esféricas o diferentes cavidades en el parénquima, y cuando dan el olor a las flores, se encuentran en las glándulas odoríferas, desde donde son liberados (Pichersky & Dudareva, 2006). Los aceites esenciales se emplean, principalmente, en cuatro industrias, de alimentos, de sabores y fragancias, farmacéutica, y en la industria cosmética; gracias a sus propiedades organolépticas y biológicas (Bandoni, 2000).

1.4.2 Métodos de obtención de aceites esenciales

Para la obtención de los aceites esenciales se emplean diferentes métodos destilativos, a saber: arrastre con vapor, destilación con agua-vapor e hidrodestilación. Todos ellos, tienen la ventaja de separar fácilmente los metabolitos secundarios volátiles de los no volátiles (Stashenko *et al.*, 1998). En la presente investigación, se empleó la técnica de hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHHD, por sus siglas en inglés). En el proceso de obtención del aceite esencial por MWHHD, el material vegetal se suspende en agua, que se calienta hasta ebullición en un horno de microondas, a una determinada potencia. El vapor de agua rompe las células o canales oleíferos de la planta y arrastra la mezcla volátil, que luego se condensa para su separación por decantación, en una trampa *Dean-Stark* (Golmakani & Rezaei, 2008).

1.4.3 Análisis de aceites esenciales

La técnica que se emplea, para el análisis químico de los aceites esenciales es la cromatografía de gases, debido a que los constituyentes son sustancias volátiles, con alta termoestabilidad y cuyas masas moleculares no exceden los 250-300 Da (Stashenko & Martínez, 2012).

La cromatografía es una técnica de separación de los componentes presentes en una mezcla, que se distribuyen entre dos fases, una estacionaria, que puede ser sólida, líquida o en gel (en este caso, empacada en una columna) que se encuentra en reposo, y la fase móvil, que puede

ser gas, líquido o fluido supercrítico. La separación se debe a la diferencia en los coeficientes de distribución de los componentes individuales de la muestra entre las dos fases (Stashenko & Martínez, 2010). En GC, los componentes que hacen parte de la matriz interactúan sólo con la fase estacionaria, que puede ser de carácter polar o apolar. La capacidad para separar los componentes está relacionada con la temperatura, la longitud de la columna, el diámetro interno (d.i.), el grosor (d_f), la naturaleza química de la fase estacionaria y el analito (Stashenko & Martínez, 2010).

Para la identificación de estos compuestos, se emplean detectores espectroscópicos. El más usado, es el de espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés). En este detector, los iones se separan según su relación masa-carga; y a partir de las corrientes iónicas se reconstruye una señal gráfica denominada espectro de masas (Gross, 2011). Además de la identificación, es importante conocer en qué concentración se encuentran los compuestos en la mezcla, la cuantificación se lleva a cabo con el acople del detector de ionización en llama (FID, por sus siglas en inglés) al equipo cromatográfico. El principio de éste se basa en la detección de los productos de descomposición de los compuestos en una llama de hidrógeno y aire, los iones formados por la combustión del compuesto migran desde la llama hacia un electrodo colector que amplifica su corriente y produce la correspondiente señal cromatográfica (Skoog *et al.*, 2015).

1.5 Fracción volátil

1.5.1 Aspectos generales

La fracción volátil de las plantas comprende una serie de compuestos, predominantemente, lipofílicos, con pesos moleculares menores de 250-300 Da y con una presión de vapor suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente, lo que permite percibirlos fácilmente con el olfato. Su composición química, al igual que los AE, está constituida principalmente por fenilpropanoides / bencenoides, terpenoides y derivados de ácidos grasos (Stashenko & Martínez, 2013). La fracción volátil es una mezcla de compuestos volátiles presentes en las plantas, que cumplen diversas funciones biológicas como la defensa química de peligros presentes en el entorno, repelencia directa de invasores o atracción de depredadores naturales que ataquen a estos herbívoros, entre otros (Tholl *et al.*, 2006)

El estudio de la fracción volátil de una planta permite monitorear los cambios que tienen lugar en su metabolismo. Entender estos fenómenos resulta importante en muchas áreas de las

ciencias biológicas y químicas, en agricultura, en ciencias analíticas, en industrias farmacéuticas, de sabores y fragancias, entre otras (Stashenko & Martínez, 2007).

1.5.2 Método de monitoreo de compuestos volátiles

El análisis de estos compuestos involucra una variedad de métodos de monitoreo estáticos y dinámicos en materiales adsorbentes, que atrapan los compuestos volátiles emitidos por la planta (Tholl *et al.*, 2006). Una de las técnicas analíticas más promisoras para el monitoreo de la fracción volátil de las plantas es la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), que emplea una fibra hecha de sílice fundida, recubierta con un polímero, que puede actuar como fase de extracción adsorbente, a la que se unen las moléculas para analizar (dependiendo de su afinidad química), por desorción térmica en un equipo cromatográfico (Arthur & Pawliszyn, 1990).

Esta técnica se puede llevar a cabo en diferentes modos de extracción, *e.g.*, extracción directa, extracción con membrana y extracción en *headspace*, que pueden ser aplicadas al monitoreo *in vivo* o *ex vivo* de los compuestos volátiles presentes en alimentos, cosméticos, fármacos y una gran variedad de plantas (Knudsen *et al.*, 1993). Para este proyecto, se utilizó el modo de extracción *headspace*, donde los analitos, en fase gaseosa, se mueven por el espacio de cabeza, debido al equilibrio dinámico, y, una vez ahí, pueden alcanzar el recubrimiento de la fibra del dispositivo SPME.

1.5.3 Análisis cromatográfico de fracción volátil

La forma más habitual para analizar los componentes presentes en la fracción volátil es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS, por sus siglas en inglés) esta técnica permite desorber los analitos retenidos por la fibra en el puerto de inyección del equipo cromatográfico, para su posterior separación e identificación (Stashenko & Martínez, 2008). El sistema de detección más utilizado para la cuantificación de estos compuestos es el detector de ionización en llama. Otros detectores como el detector de nitrógeno y fósforo y el detector fotométrico de llama son herramientas útiles para la detección selectiva de compuestos nitrogenados y azufrados, muy frecuentes en las fragancias florales (Stashenko & Martínez, 2013).

1.6 Extractos

1.6.1 Aspectos generales

Los extractos son una mezcla de compuestos químicos semi-volátiles o no volátiles, que, a diferencia de los AE, se encuentran constituidos por metabolitos secundarios de pesos moleculares mayores de 300 Da, *e.g.*, diterpenoides, fitoesteroles, alcaloides, flavonoides, grasas, entre otros. Algunos de estos compuestos no son estables térmicamente, razón por la cual, no se pueden obtener por métodos destilativos (Stashenko & Martínez, 2011).

Los extractos poseen numerosas aplicaciones en la industria, *e.g.*, mezclas de compuestos con actividad antioxidante aplicados en formulaciones cosméticas, aditivos en la industria de alimentos, compuestos con bioactividad en la industria farmacéutica, pigmentos en la industria textil, entre otros (Gupta *et al.*, 2015).

1.6.2 Métodos de obtención de extractos

Para la obtención de los extractos se emplean distintos procesos, que forman el grupo de las técnicas extractivas, y cuyo principio de operación radica en la extracción, mediante un solvente orgánico, aprovechando las propiedades de solubilidad, la polaridad de los analitos de la matriz y su afinidad con un solvente dado o sus mezclas (Stashenko & Martínez, 2011). En este proyecto de investigación, se emplearon las siguientes técnicas de extracción, a saber: extracción con solvente y dispersión de la matriz en fase sólida.

La extracción con solvente (SE, por sus siglas en inglés), como su nombre lo indica, es una técnica de extracción que emplea una fase líquida para extraer los analitos de una matriz (Mitra, 2003). Los compuestos se separan mediante una transferencia selectiva de los analitos a un disolvente orgánico capaz de solvatar a las moléculas de interés (Bucić-Kojić *et al.*, 2007). En esta técnica, se pueden extraer compuestos de polaridad alta, media o baja según la naturaleza del solvente de extracción (Stashenko & Martínez, 2011).

El método de la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés), se reportó por primera vez por Barker, Long y Short (1989) como método de extracción de residuos de drogas en tejidos animales. El principio de operación de MSPD consiste en la mezcla del material para extraer con un soporte sólido adsorbente (florisil, gel de sílice, arena) que actúa como medio dispersante. La mezcla, después de la trituration mecánica, se transfiere en forma

dispersada a una columna, donde se eluye con una pequeña cantidad de un solvente orgánico, cuya polaridad debe ser afín con los analitos de interés (Barker, 2007).

1.6.3. Análisis cromatográfico de extractos

La técnica que se emplea para separar, identificar y cuantificar los componentes presentes en los extractos de matrices vegetales es la cromatografía líquida. Esta técnica permite analizar moléculas de pesos moleculares mayores de 400 Da, moléculas polares, no volátiles y termolábiles (Rubinson & Rubinson, 2000). En cromatografía líquida, los componentes de la matriz interactúan con la fase móvil, que puede ser un solvente de alta pureza o una mezcla, y la fase estacionaria que rellena la columna cromatográfica. El orden de salida de los compuestos de la columna cromatográfica dependerá de la interacción que presenten los analitos con ambas fases (LaCourse, 2002).

Existen diferentes modos de operación en cromatografía líquida, que se clasifican según el tipo de interacción, entre ellas, las fases normal y reversa (Rubinson & Rubinson, 2000). Para el análisis de los metabolitos secundarios, se utiliza, principalmente, el modo de fase reversa, en donde la polaridad de la fase estacionaria es menor que la polaridad de la fase móvil, lo que permite separar más fácilmente las moléculas de naturaleza polar, en comparación con las de carácter apolar (Mata-Bilbao *et al.*, 2007).

Para la identificación de los componentes, se emplean diferentes detectores que pueden acoplarse al equipo cromatográfico, *e.g.*, detector de ultravioleta visible, detector de arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés), detector selectivo de masas (MSD, por sus siglas en inglés), detector *Orbitrap*, entre otros. En la actualidad, los acoplamientos más empleados en el estudio de los metabolitos secundarios de especies vegetales son la cromatografía líquida acoplada a sistemas de detección de masas de alta resolución como tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) o espectrometría de masas con *Orbitrap*, debido a su alta sensibilidad, porque permite lograr límites de detección (LOD, por sus siglas en inglés) del orden de las partes por trillón (ppt), facilitando la identificación y elucidación de componentes (Moco *et al.*, 2007). La interfaz de ionización es la electronebulización (ESI, por sus siglas en inglés), que contiene moléculas suavemente ionizadas, que resultan ser moléculas protonadas o deprotonadas, según el modo de ionización, *i.e.*, positivo $[M+H]^+$ o negativo $[M-H]^-$ (Fenn *et al.*, 1989). En esta investigación las moléculas se analizaron

en modo dual, con una fase móvil capaz de protonar o deprotonar los analitos de interés según su pK_a .

2. Estado del arte

Con el objetivo de analizar el estado actual de las investigaciones sobre *V. curassavica*, los métodos de extracción y el análisis de sus metabolitos secundarios, se realizó un estudio cuantitativo de la producción científica existente con la base de datos *Scopus* (*Elsevier*). *V. curassavica*, es conocida también como *Cordia curassavica* y *Cordia verbenacea* (Trópicos, 2022). Por esta razón, se emplearon las sinonimias botánicas en la ecuación de búsqueda, con un periodo de observación desde 1980 hasta la actualidad.

Se reportan 52 publicaciones usando la palabra-clave “*Varronia curassavica*”, 37 publicaciones con “*Cordia curassavica*” y 98 publicaciones con “*Cordia verbenacea*”, para un total de 187 publicaciones científicas. Los estudios sobre *V. curassavica* se han desarrollado principalmente en Brasil, México, Estados Unidos y Panamá, con aplicaciones en las áreas de farmacología, agricultura, medicina y bioquímica. Los resultados se encuentran publicados en revistas especializadas como *Industrial Crops and Products*, *Journal of Ethnopharmacology*, *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, *Journal of Biosciences*, *Journal of Chemical Ecology* e *Interciencia* (Véase **Tabla 1**). Colombia solo cuenta con dos (2) *reviews* que presentan claves, nomenclatura actualizada e información sobre distribución geográfica y altitudinal de la planta y otras especies del género *Varronia*.

Tabla 1.

Resumen comparativo del estudio cuantitativo sobre V. curassavica y sus sinonimias. Base de datos: Scopus (Elsevier), ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“Varronia curassavica”,

“*Cordia curassavica*” y “*Cordia verbenacea*”). *Periodo de observación: 1980-2020, fecha de consulta: agosto de 2022.*

Parámetros	<i>Varronia curassavica</i>	<i>Cordia curassavica</i>	<i>Cordia verbenacea</i>
Países	Brasil (51)	Brasil (13)	Brasil (91)
	China (1)	México (4)	Estados Unidos (4)
	Italia (1)	Panamá (4)	India (3)
Áreas de publicación	Agricultura (29)	Farmacología (18)	Farmacología (44)
	Farmacología (13)	Agricultura (17)	Agricultura (28)
	Medicina (9)	Bioquímica (8)	Medicina (24)
Revistas científicas	<i>Ind. Crops. Prod.</i> (5)	<i>J. Ethnopharm.</i> (6)	<i>J. Ethnopharm.</i> (8)
	<i>Rev. Bras. Pl. Med.</i> (4)	<i>J. Chem. Ecol.</i> (3)	<i>Rev. Bras. Pl. Med.</i> (6)
	<i>Bioscience</i> (4)	<i>Interciencia</i> (2)	<i>Ind. Crops. Prod.</i> (4)
Número total de publicaciones	52	37	98

Los reportes etnobotánicos sobre *V. curassavica*, muestran que la planta ha sido empleada en diferentes comunidades para tratar la inflamación, el reumatismo, enfermedades gastrointestinales, enfermedades de la piel, y para el control de ectoparásitos en medicina veterinaria (Merétika *et al.*, 2010). Es por esto, que la mayoría de las investigaciones actuales sobre la planta se centran en brindar soporte experimental de los usos de la planta en la medicina popular, mediante la obtención, caracterización y evaluación de propiedades biológicas de los metabolitos secundarios presentes en el AE y los extractos de *V. curassavica*, para su posterior aplicación en diferentes campos de la industria.

Las primeras publicaciones sobre el análisis de los metabolitos secundarios presentes en *V. curassavica*, se reportan a comienzos de los años 80. Velde *et al.*, (1982) aislaron e identificaron cuatro compuestos a partir de extractos de hojas secas, se destaca la artemetina, un flavonol *O*-metoxilado con propiedades antiedematogénicas y antitumorales en líneas celulares de cáncer de mamá y ovario (Bayeux *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2022). Sertié *et al.*, (1988) demostraron la actividad antiinflamatoria de los extractos etanólicos de hojas de la planta, y años más tarde, identificaron flavonoides, taninos, cordialinas; y comprobaron el efecto protector de los extractos sobre la mucosa gástrica de ratas (Sertié *et al.*, 1991).

En Panamá, reportaron por primera vez el AE de hojas secas de tres quimiotipos de *V. curassavica*. Gomez *et al.*, (1999) evaluaron el comportamiento planta-insecto por herbivoría de *Cassidinae* sp. (escarabajo), demostrando que los monoterpenoides α -pineno y β -pineno son emanados por la planta como repelencia química. De Carvalho *et al.*, (2004) determinaron la composición química y la actividad antimicrobiana del AE de partes aéreas de *V. curassavica*, en Brasil. Los principales constituyentes del AE, identificados por GC/MS, fueron α -pineno (29.6%), (*E*)- β -cariofileno (25.2%) y aloaromadendreno (9.99%). Las bacterias *Gram positivas* analizadas fueron sensibles al AE. En la **Tabla 2**, se muestran otros estudios relevantes, durante los últimos 20 años, sobre la planta y sus sinonimias botánicas.

Pese a que los estudios de *V. curassavica* evidencian la presencia de compuestos bioactivos importantes, la producción científica actual carece de información sobre la composición química de los metabolitos secundarios, obtenidos por otros métodos destilativos y extractivos complementarios. Las investigaciones sobre la obtención del AE de *V. curassavica* están enfocados en la optimización del rendimiento y la composición química de los metabolitos secundarios de interés, pero no, en dar un uso alternativo para la biomasa residual, subproducto del proceso de destilación, que aún contiene compuestos semi-volátiles o no volátiles con potencial biológico.

No se reportan estudios sobre la fracción volátil de la planta, por microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HS-SPME), ni de los extractos, que se aíslan por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD). La identificación de estos compuestos, por diferentes

Tabla 2.

Estudios sobre V. curassavica y sus sinonimias. Base de datos: Scopus (Elsevier).

Objeto del estudio	Metodología	Resultados	Referencia
Comparar la actividad antifúngica del AE de <i>V. curassavica</i> obtenido por diferentes técnicas, frente al hongo <i>Colletotrichum musae</i>	Métodos de extracción HD, en dos tiempos (100 y 140 min) y en dos volúmenes de agua. MWHD en dos tiempos (20 y 40 min) y en dos potencias (500 y 700 W) con volumen de agua constante. Técnicas de caracterización GC/MS y GC/FID, columna apolar.	Los compuestos más abundantes detectados el AE fueron: shiobunol, germacreno D-4-ol, (<i>E</i>)- β -cariofileno, biciclogermacreno y α -cadinol. Las cuatro muestras de AE analizadas presentaron un efecto inhibitor sobre <i>C. musae</i> .	(Nizio <i>et al.</i> , 2020)
Aumentar el rendimiento del AE de <i>V. curassavica</i>	Pretratamiento Hojas frescas fueron sometidas a ultrasonido por 0, 3, 5, 10, 15, 20 y 30 min. Métodos de extracción Hidrodestilación (HD) Técnicas de caracterización GC/MS y GC/FID, columna apolar.	El mayor rendimiento del AE (0.83%), se obtuvo con el pretratamiento de ultrasonido por 20 min. El AE contenía principalmente α -pineno (24.5%), (<i>E</i>)- β -cariofileno (18.9%), acetato de (<i>Z</i>)-epi- β -santalilo (5.23%), β -bisaboleno (4.55%) y acetato de (<i>Z,E</i>)- α -bergamotilo (3.14%).	(Zotti-Sperotto <i>et al.</i> , 2020)
Comparar el rendimiento y la composición química del AE de <i>V. curassavica</i> por dos métodos de extracción.	Métodos de extracción HD, en tres tiempos (100, 120 y 140 min) y tres volúmenes de agua (1.0, 1.5 y 2.0 L por matraz). MWHD, en tres potencias (500, 600 y 700 W), tres tiempos de extracción (20, 30 y 40 min) y tres volúmenes de agua (0, 25 y 50 mL). Técnicas de caracterización GC/MS y GC/FID, columna apolar.	Los rendimientos más altos de los AE (3.34% para HD y 3.28% para MWHD) se obtuvieron bajo las siguientes condiciones: 120 min de HD y 2 L de agua; 40 min de MWHD y potencia de 700 W. Los componentes principales del AE obtenido por HD fueron shyobunol (24.0%) y germacreno D-4-ol (10.2%) y por MWHD, shyobunol (26.5%) y biciclogermacreno (4.96%).	(Nizio <i>et al.</i> , 2009)

Profundizar en la caracterización de los metabolitos secundarios del AE de <i>C. verbenácea</i>	Métodos de extracción HD. Técnicas de caracterización GC/MS y GC/FID, columna: apolar. GC/MS, columna: quiral. Cromatografía multidimensional preparativa acoplada a MS, columnas: polar y apolar. Resonancia magnética nuclear (RMN).	Los componentes principales del AE fueron α -pineno (25.3%) y α -santaleno (17.9%). Los datos de cromatografía de gases quiral, muestran distribución enantiomérica de siete componentes diferentes, se destacan (+) α -pineno y (-) α -pineno, (+) limoneno y (-) limoneno y (+) sabineno y (-) sabineno.	(Sciarrone <i>et al.</i> , 2017)
Determinar la composición química del AE de <i>V. curassavica</i> , en función de la hora de colecta.	Métodos de extracción HD de hojas frescas recolectadas a las 6:00, 9:00, 12:00, 15:00 y 18:00 h. Técnicas de caracterización GC/MS, columna apolar.	La hora de colecta no influyó sobre el rendimiento del AE, pero sí en su composición química. Los compuestos principales en todos los tiempos de recolección fueron (<i>E</i>)- β -cariofileno (22.6-27.4%), γ -muuroleno (9.1-9.8%), α -pineno (7.1-9.5%) y α -humuleno (3.3-4.8%).	(Queiroz <i>et al.</i> , 2016)
Determinar la composición química y la actividad antibacteriana de extractos de <i>V. curassavica</i> .	Métodos de extracción SE, solvente: metanol. Técnicas de caracterización HPLC/DAD.	Se identificaron ácido cafeico (3.85%), ácido clorogénico (1.59%), ácido gálico (1.14%), quercetina (1.09%) y rutina (0.38%) en los extractos metanólicos. La actividad antibacteriana del extracto no fue clínicamente relevante, sin embargo, cuando se combina con un antibiótico muestra sinergismo.	(Matias <i>et al.</i> , 2013a)
Estudiar la composición química de los extractos de <i>C. verbenacea</i> obtenidos por diferentes métodos de extracción y evaluación de su actividad antibacteriana.	Métodos de extracción Extracción Soxhlet, solventes: agua, acetona, etanol, acetato de etilo, diclorometano y hexano). Extracción con fluido supercrítico. Técnicas de caracterización GC/MS, columna: apolar.	Los principales componentes identificados en los extractos fueron: α -curcumeno (0.41-7.47%), calameneno (2.36-7.82%) y aromadendreno (2.70-11.8%). Todos los extractos mostraron actividades antibacterianas, contra bacterias <i>Gram</i> -positivas y <i>Gram</i> -negativas, independiente del método de extracción.	(Michielin <i>et al.</i> , 2009)

Evaluar la actividad antimicrobiana del AE y extractos de partes aéreas de <i>C. curassavica</i>	Métodos de extracción HD. SE, solventes: hexano, cloroformo y metanol. Técnicas de caracterización GC/MS, columna: polar para el AE. Reacciones colorimétricas (análisis fitoquímico preliminar) para los extractos.	El AE y los extractos mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias <i>Gram</i>-positivas y <i>Gram</i>-negativas. Los componentes mayoritarios del AE fueron 4-metil,4-etenil-3-(1-metil etenill)-1-(1 metilmetanol)ciclohexano (37.3%), β-eudesmol (19.2%) y espatulenol (11.3%). El análisis fitoquímico de todos los extractos mostró resultados positivos para triterpenos y flavonoides. (Hernandez <i>et al.</i>, 2007)
Determinar la composición química del AE de <i>C. curassavica</i> y evaluar su actividad larvicida.	Métodos de extracción HD. Técnicas de caracterización GC/MS y GC/FID, columna: apolar.	Los componentes principales del AE fueron α-pineno (20.5%), biciclogermacreno (13.8%), β-pineno (13.1%) y (<i>E</i>)-β-cariofileno (12.4%). El AE de <i>C. curassavica</i> mostró propiedades larvicidas contra las larvas del mosquito transmisor de la fiebre amarilla, <i>Aedes aegypti</i>. (Santos <i>et al.</i>, 2006)
Aislar y caracterizar los extractos de <i>C. curassavica</i> y evaluar su actividad antifúngica y larvicida.	Métodos de extracción SE, solvente: diclorometano. Método de aislamiento Cromatografía en columna de gel de sílice. Técnicas de caracterización HPLC/DAD para los extractos. Espectrometría de masas Resonancia magnética nuclear	Las cordiaquinonas A, B, J y K, fueron aisladas e identificadas en los extractos. Demostraron propiedades antifúngicas contra los hongos <i>Cladosporium cucumerinum</i>, <i>Candida albicans</i>; y propiedades larvicidas contra las larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i>. (Ioset <i>et al.</i>, 2000)

técnicas cromatográficas, requiere un análisis más detallado, bajo diferentes configuraciones operacionales, *e.g.*, el tipo y la polaridad de la columna cromatográfica, diferentes sistemas de detección y el uso de material de referencia certificado como criterio de identificación confirmatorio de algunos compuestos.

En este proyecto de grado, se buscó aprovechar el conocimiento ya existente, para profundizar, a través de la química analítica, en el análisis de la composición química de los metabolitos secundarios presentes en *V. curassavica*. La obtención de estos compuestos se llevó a cabo por diferentes métodos de extracción, a saber: MWHD para el aceite esencial, HS-SPME para la fracción volátil, SE y MSPD para los extractos, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. La caracterización se realizó por diferentes técnicas cromatográficas como GC/MS, GC/FID, HPLC/DAD y UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, según la naturaleza de los analitos aislados.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar la composición química de los metabolitos secundarios de *Varronia curassavica* Jacq. (Boraginaceae), obtenidos por diferentes métodos de extracción, a través del uso de técnicas cromatográficas acopladas a diferentes sistemas de detección.

3.2 Objetivos específicos

Identificar y cuantificar los metabolitos secundarios del aceite esencial de *V. curassavica*, obtenidos por hidrodestilación asistida por radiación de microondas, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama.

Caracterizar por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama, la fracción volátil de hojas y flores de *V. curassavica*, obtenidas por microextracción en fase sólida de espacio de cabeza.

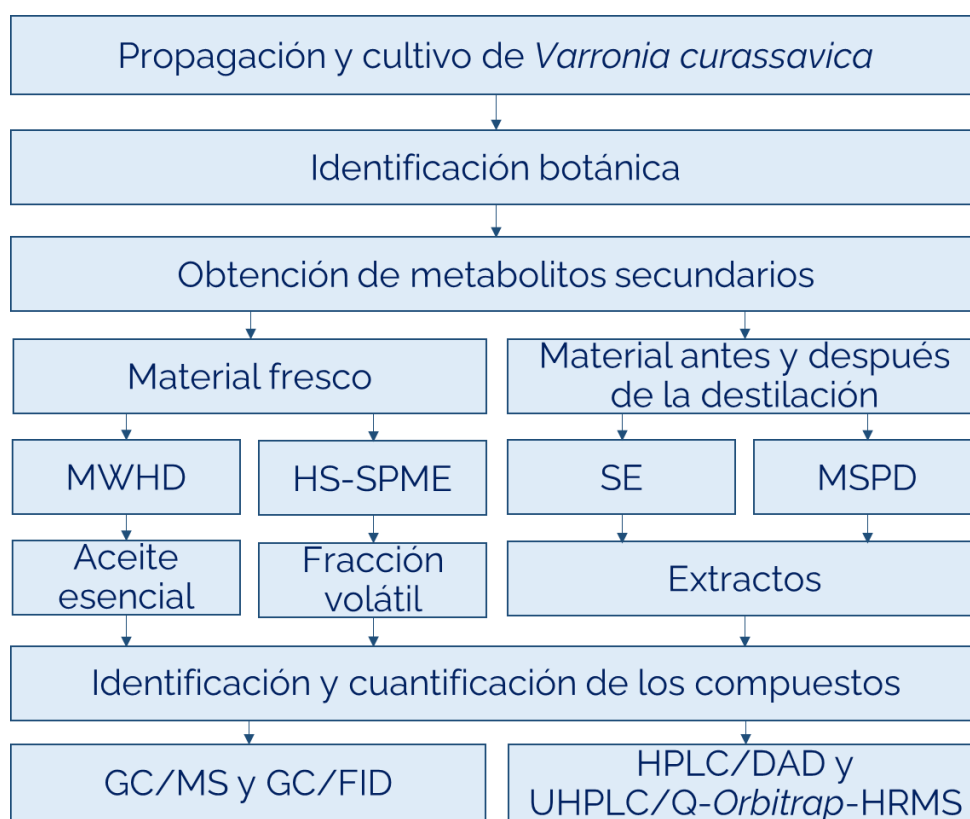
Comparar las composiciones químicas de los extractos del material vegetal sin destilar y destilado de *V. curassavica*, obtenidos por extracción con solvente y dispersión de la matriz en fase sólida, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos y cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución *Q-Exactive*.

4. Metodología

Este proyecto de grado tiene como objetivo estudiar el aceite esencial, la fracción volátil y los extractos de *V. curassavica*, obtenidos por diferentes métodos de extracción, a través del uso de técnicas cromatográficas. Se contempla el uso integral de la planta, mediante el aprovechamiento de la biomasa residual, material después de la destilación, para la obtención de los extractos. El procedimiento general se muestra en la **Figura 9**.

Figura 9.

Procedimiento general propuesto.



4.1 Reactivos y solventes

Para el desarrollo de este trabajo, se emplearon ácido cafeico ($\geq 98\%$), ácido rosmarínico ($\geq 97\%$), ácido ursólico ($\geq 90\%$), (*E*)- β -cariofileno (98.5%), α -humuleno (96%), linalol (97%), limoneno (97%), β -mirceno (95%), óxido de cariofileno (96%), α -pineno (98%), rutina ($\geq 94\%$) y sabineno (96%), canfeno (95%), *p*-cimeno (99%), 1,8-cineol (99%), terpinen-4-ol (95%), α -terpineol (90%), (*E*)-nerolidol (96%), todos adquiridos a *Sigma-Aldrich* (SA, St. Louis, MO,

USA). Eriodictiol-7-*O*-glucósido ($\geq 98\%$), kaempferol-3-*O*-galactósido ($\geq 98\%$), pachipodol ($\geq 98\%$) y salvigenina ($\geq 98\%$) se obtuvieron de *Chemfaces* (Wuhan, Ubei, China). Artemetina ($\geq 98\%$) se compró a *Phytolab* (Vestenbergsgreuth, Baviera, Alemania). Acetonitrilo grado HPLC, ácido fórmico grado HPLC, iso-propanol (98%), gel de sílice modificada con C₁₈, formiato de amonio ($\geq 99\%$), metanol grado LC/MS, y agua Tipo I (sistema de purificación Millipore Direct-QTM) se obtuvieron de *Merck* (Darmstadt, Alemania). El sulfato de sodio anhidro ($>99\%$) se obtuvo de *Mallinckrodt Baker Inc.* (Phillisburg, NJ, USA) La mezcla de *n*-alcanos C₆-C₂₅ y el *n*-tetradecano fueron obtenidos de *AccuStandard Inc.* (New Haven, CT, USA). Los gases helio, aire, hidrógeno y nitrógeno (99.995%) fueron adquiridos a Messer (Bucaramanga, Colombia).

4.2 Material vegetal

Las plantas de *Varronia curassavica* se cultivaron y recolectaron en parcelas experimentales ubicadas en el Complejo Agroindustrial Piloto del CENIVAM (N 07°08,442; WO 73°06,960; 960; 977 msnm), en el Campus Principal de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Santander, Colombia). La identificación botánica fue realizada por el botánico, Dr. Andrés Felipe Castaño Moreno, del Herbario de la Universidad Industrial de Santander. Una copia del pliego-testigo, con su número de *voucher*, se registró en este herbario.

4.3 Obtención de metabolitos secundarios volátiles

4.3.1 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas

La obtención del aceite esencial se realizó según lo indicado por Stashenko *et al.*, (2010). Partes aéreas de *V. curassavica* (300 g) suspendidas en agua (300 mL) se colocaron en un balón de 2 L, que se conectó a un equipo de destilación tipo *Clevenger*, con un reservorio de destilación *Dean-Stark*, adaptado a un sistema de calentamiento, en un horno de microondas doméstico, con potencia de salida de 1600 W y frecuencia de radiación de 2.4 GHz. El horno se operó a un 60% de la potencia total. La muestra vegetal se calentó durante 45 min, en tres sesiones de 15 min.

El AE obtenido se secó con Na₂SO₄ anhidro, para evitar su daño por humedad, se filtró, se pesó y se almacenó hasta su análisis por cromatografía de gases. Las destilaciones se realizaron por triplicado, los pesos se promediaron, y el rendimiento del AE se calculó con base en el peso inicial del material vegetal utilizado.

4.3.2 Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza

El método HS-SPME *ex vivo* de hojas y flores, se realizó, según la metodología descrita por Stashenko *et al.*, (2013) con una fibra de poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno, PDMS/DVB (65 µm de espesor; SA, Milwaukee, Wisconsin, USA). El material vegetal recién cortado (100 mg), se depositó en un vial de 5 mL con tapa y se acondicionó durante 10 min a 60 °C. El estándar interno, *n*-tetradecano (*ca.* 2 mg), se incorporó al recubrimiento de la fibra SPME, por su exposición al hidrocarburo a 60 °C durante 5 s. Después de ello, la fibra se expuso durante 30 min al interior del recipiente que contenía el material vegetal. La selección de este tiempo se basó en experimentos preliminares y estudios previos.

La fibra se retiró después de este tiempo y los compuestos volátiles se desorbieron térmicamente en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases, a 250 °C, durante 5 min. Todas las extracciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como valor promedio ± desviación estándar de área cromatográfica relativa (%).

La cuantificación de los compuestos presentes en la fracción volátil de hojas y flores de *V. curassavica*, se realizó por el método de estandarización interna. Para ello, se empleó *n*-tetradecano, como sustancia de referencia, según la **Ecuación 1**.

$$C_{(x)} = \frac{C_{(ISTD)} \times A_{(x)}}{A_{(ISTD)}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$C_{(x)}$ = Concentración (mg/L) del analito en la muestra.

$A_{(x)}$ = Área del pico cromatográfico del analito (en cuentas).

$C_{(ISTD)}$ = Concentración (mg/L) del patrón interno.

$A_{(ISTD)}$ = Área del pico cromatográfico del patrón interno (en cuentas).

4.4 Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios volátiles

4.4.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El AE y la fracción volátil de *V. curassavica* se analizaron en un cromatógrafo de gases, GC 6890 Plus (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado con un detector selectivo de masas MSD 5973 Network (AT, Palo Alto, CA, USA), con ionización con electrones (EI, 70 eV).

El modo de inyección fue *split* (30:1) y la temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C. La temperatura del horno cromatográfico se programó de 50 °C (5 min) de 150 °C (2 min) a 5 °C/min, luego, hasta 230 °C (10 min), a 5 °C/min. Cuando se utilizó la columna DB-5MS, se adicionó una rampa con calentamiento hasta 275 °C (15 min), a 10°C/min (Véase **Figura 10**).

Los metabolitos secundarios volátiles se identificaron tentativamente por índices de retención lineales (Véase **Ecuación 2**) en dos columnas, polar y apolar, calculados con base en la serie homóloga de *n*-alcanos C₆-C₂₅ (Van den Dool & Kratz, 1963), en conjunto con espectros de masas experimentales y por su comparación con diferentes bases de datos (Adams, 2007; Wiley, 2008; NIST, 2017) y literatura científica. Para la identificación confirmatoria se emplearon sustancias patrón. El AE se inyectó en una concentración de 10 mg/L con ISTD *n*-tetradecano (500 mg/L).

Figura 10.

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



Nota. Laisha Dally Burgos Díaz, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, julio de 2022.

$$IRL_x = 100n + 100 \left[\frac{t_{R(x)} - t_{R(n)}}{t_{R(N)} - t_{R(n)}} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

IRL_x : Índice de retención lineal del compuesto de interés (x).

n: Número de carbonos del *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés (x).

$t_{R(x)}$: Tiempo de retención del compuesto de interés (x).

$t_{R(n)}$: Tiempo de retención del *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés (x).

$t_{R(N)}$: Tiempo de retención del *n*-alcano que eluye después del compuesto de interés (x).

4.4.2 Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama

La cuantificación de los compuestos presentes en el AE de *V. curassavica* se realizó en un cromatógrafo de gases AT 6890N (AT, Palo Alto, CA, USA), acoplado a un detector de ionización en llama FID. La separación de componentes se llevó a cabo en columna capilar con una fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), 5%-Ph-PDMS, de características idénticas a las descritas para el análisis por GC/MS, así como el gas de arrastre, su flujo, y la programación de temperatura del horno (Véase

Figura 11). El AE se inyectó bajo la misma concentración que GC/MS. La cuantificación se realizó usando el método del estándar externo con sustancias de referencia de α -pineno, sabineno, β -mirceno, linalol, (*E*)- β -cariofileno, α -humuleno y óxido de cariofileno.

Figura 11.

Cromatógrafo de gases AT 6890N, acoplado a un detector de ionización en llama FID.



Nota. Laisha Dally Burgos Díaz, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, mayo de 2022.

4.4.2.1 Determinación de las figuras analíticas de mérito por GC/FID

La precisión, entendida como la repetibilidad y la reproducibilidad de tiempos de retención y áreas cromatográficas; la linealidad, la sensibilidad, el límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) y el límite de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés) se determinaron usando sustancias de referencia, *e.g.*, α -pineno, sabineno, β -mirceno, linalol, (*E*)- β -cariofileno, α -humuleno y óxido de cariofileno. Cada compuesto se pesó (300 mg), se aforó con diclorometano (1 mL) y a partir de esta solución, se realizaron diluciones en un rango de concentración bajo (5-100 mg/L), medio (150-2800 mg/L) y alto (3100-30000 mg/L). Los datos se procesaron con el software *MSDCHEMSTATION* G1701DA, y el análisis estadístico se realizó por el método de mínimos cuadrados.

La repetibilidad y la reproducibilidad del método se evaluaron, según las **Ecuaciones 3-5**. Se tomaron como referentes los coeficientes de variación (CV, %) de tiempo de retención (t_R) y área de cada compuesto.

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

Ecuación 3

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}|^2}$$

Ecuación 4

$$\text{Coeficiente de variación, \%} = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Ecuación 5

Donde $\bar{x}$ es el promedio de los datos, X_i los datos, n el número de datos y S la desviación estándar.

El coeficiente de determinación (R^2) de la curva de calibración se empleó como indicador de linealidad. La sensibilidad se determinó con base en la pendiente de la recta, con un nivel de confianza del 95%. La **Ecuación 6**, representa una recta ajustada, donde A es la ordenada de origen y B la pendiente. Los valores de A y B se determinaron, según Miller, (1991) (Véase **Ecuación 7**).

$$y = A + Bx$$

Ecuación 6

$$B = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^m |x_i - \bar{x}| |y_i - \bar{y}|}{\sum_{i=1}^m |x_i - \bar{x}|^2}$$

Ecuación 7

Donde:

x_i : Concentración de cada patrón; $\bar{x}$: Promedio de las concentraciones

y_i : Respuesta en cada punto; $\bar{y}$: Promedio de respuestas de patrones

La incertidumbre en los valores de la pendiente y del corte en el eje Y (**Ecuación 8-10**) se expresaron, según Miller, (1991):

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n |y_i - \hat{y}_i|^2}{n-2}}$$

Ecuación 8

$$S_B = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}|^2}}$$

Ecuación 9

Ecuación 10

$$S_A = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{m \sum_i |x_i - \hat{x}_i|^2}}$$

Donde:

y_i : Respuesta experimental de cada patrón.

$\hat{y}_i$: Promedio estimado en cada punto, según la ecuación de la recta.

m: Número total de puntos de la curva de calibración.

$S_{y/x}$: Desviación estándar de la regresión lineal

S_A : Incertidumbre en los valores de la ordenada, o corte con el eje Y (A).

S_B : Incertidumbre en los valores de pendiente (B).

El LOD y el LOQ para los compuestos presentes en el AE, se calcularon, según Shrivastava & Gupta, (2011), empleando las **Ecuaciones 11-12**.

$$\text{LOD, mg/L} = 3 \frac{S_{y/x}}{A} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$\text{LOQ, mg/L} = 10 \frac{S_{y/x}}{A} \quad \text{Ecuación 12}$$

4.5 Obtención de metabolitos secundarios semi-volátiles y no volátiles

Para la obtención de extractos de material vegetal antes y después de la destilación, el material vegetal se sometió a un proceso de secado, a sombra, en el vivero número 2 de CENIVAM (Bucaramanga, Santander, Colombia, N 07°08,422' W 073°06,960'). Se registró el peso inicial de una muestra de *V. curassavica* (1 kg) y se documentaron los cambios de su peso, durante varios días consecutivos, hasta encontrar un peso constante. El procedimiento se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como valor promedio $\pm$ desviación estándar ($n=3$). La temperatura y la humedad relativa del ambiente se registraron con un termohigrómetro, cada media hora, durante el día. El material vegetal seco, se picó en un molino de cuchillas con un tamiz de 1 mm, y se almacenó en frascos de vidrio hasta su extracción.

4.5.1 Extracción con solvente asistida por ultrasonido

La obtención de los extractos SE se realizó, según las metodologías descritas por Borrás-Linares *et al.*, (2015) y Pico-Hernández *et al.*, (2020) con algunas modificaciones. El material vegetal (100 g) se mezcló con una solución de EtOH (95%):H₂O (2 L, 70:30%, v/v). La mezcla se llevó a un baño de ultrasonido (*Elmasonic S15H*, Singen, Alemania) durante 1 h a 50 °C, con una frecuencia de 37 kHz. La mezcla se filtró al vacío con un embudo *Büchner* (papel filtro *Whatman* N° 1), un matraz *Kitasato* y una bomba de vacío (*Vacuubrand*, Wertheim, Alemania). Los extractos obtenidos se rotaevaporaron en el equipo *Heidolph (Hei-VAP, Advantage HL*, Chicago, USA), se secaron en un liofilizador de bandejas *VirTis AdVantage Plus (SP Scientific*, Gardiner, New York, USA) y se almacenaron a 4 °C, en ausencia de luz, hasta su análisis por cromatografía líquida. Todas las extracciones se realizaron por triplicado, los pesos se promediaron, y el rendimiento de los extractos obtenidos, se calculó con base en el peso inicial del material vegetal utilizado.

4.5.2 Dispersión de la matriz en fase sólida

La obtención de los extractos por MSPD se llevó a cabo, según la metodología descrita por Xiao *et al.*, (2004), con algunas modificaciones, *e.g.*, la relación entre la muestra y el soporte sólido, 1:4. El material vegetal (0.5 g) se mezcló con el soporte sólido, gel de sílice modificada con C₁₈ (2 g), e *isopropanol* (2 mL) como agente dispersante. La mezcla se maceró durante 15 min, hasta su completa homogeneización, y se transfirió a un cartucho casero de SPE sin fase estacionaria. Se empleó una solución de EtOH (95%):H₂O (2 L, 70:30%, v/v) para la elución de los componentes. Los extractos se concentraron hasta sequedad, mediante corriente de nitrógeno, se llevaron a liofilización, se pesaron, para obtener los rendimientos de extracción; y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis por cromatografía líquida.

4.6 Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios semi-volátiles y no volátiles

4.6.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia con un detector de arreglo de diodos

El análisis se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC 1260 *Infinity* (AT, Palo Alto, CA, USA) con columna cromatográfica *GEMINI C₁₈* (*Phenomenex*, Torrance, CA, USA) de 250 mm de longitud x 4.6 mm d.i. x 5 µm tamaño de partícula, con detector de arreglo de diodos AT G1315D, bomba cuaternaria AT G1311C e inyector automático AT G1329B (Véase

Figura 12). La inyección se realizó en modo automático, el volumen de inyección fue 10 μ L, a un flujo en la columna de 1 mL/min, y temperatura de 35 °C. La fase móvil del método fue la mezcla de una solución acuosa de ácido fórmico al 0.5% v/v (A) y acetonitrilo grado HPLC (B), con un flujo de 1 mL/min y gradiente de elución programado así: 98% A (0 min), 88% A (15 min), 88% A (15-23 min), 60% A (46 min), 10% A (71 min), 10% A (71-75 min), 98% A (80 min), 98% A (80-85 min).

La detección de los compuestos se realizó a λ =245 nm, 270 nm, 290 nm y 515 nm. La identificación de los compuestos se realizó por la comparación de sus tiempos de retención y espectros ultravioleta-visible, con los de patrones de referencia adquiridos. El procesamiento de los datos se realizó usando el *software AT Chemstation B.04.02 SP1*.

Figura 12.

Cromatógrafo líquido AT 1260, equipado con una bomba cuaternaria, y detectores UV-VIS y detectores de arreglo de diodos, DAD.



Nota. Laisha Dally Burgos Díaz, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, mayo de 2022.

4.6.2 Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución *Q-Exactive*

La metodología se realizó según lo descrito por Prada *et al.*, (2020), con algunas modificaciones. El análisis de metabolitos secundarios se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de ultra alta resolución *Vanquish™* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), equipado con una unidad de desgasificación, una bomba binaria de gradiente, un automuestreador (10 °C) y un compartimento de columna controlado termostáticamente (40 °C). La separación cromatográfica se realizó en una columna *Zorbax Eclipse XDB C₁₈* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 50 mm de longitud x 2.1 mm d.i., tamaño de partícula de 1.8 µm. El caudal de la fase móvil que contenía agua (0.1% AF + 5 mM FA) (A) y MeOH (0.1% AF + 5 mM FA) (B) fue de 300 µL/min. El volumen de inyección fue de 2 µL (Véase **Figura 13**).

Figura 13.

Cromatógrafo líquido de ultra-alta resolución Vanquish™ equipado con una unidad de desgasificación, una bomba binaria de gradiente, un auto muestreador y un compartimento de columna controlado termostáticamente.



Nota. Laisha Dally Burgos Díaz, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, mayo de 2022.

El cromatógrafo líquido se conectó a un espectrómetro de masas *Q-Exactive Plus Orbitrap* (Thermo Scientific, Bremen, Alemania) con una fuente de ionización por electronebulización

(HESI-II), intercambiadores de polaridad en tiempos < 500 mseg con fragmentación HCD. El voltaje de pulverización (V_{spray}) fue de ± 3.5 kV. La temperatura del nebulizador se fijó en 350 °C; la temperatura del capilar fue de 320 °C; el gas envolvente y el gas auxiliar (N_2) se ajustaron a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. El nitrógeno, se obtuvo de un generador NM32LA (*Peak Scientific*, Escocia, Reino Unido). Durante el barrido completo del MS, la resolución de masas se estableció en 70000 (ancho total a la mitad del máximo, en m/z 200) con objetivo de control automático de ganancia, 3×10^6 , tiempo máximo de inyección del *C-trap* de 200 ms y un rango de exploración de m/z 80–1000. Los iones inyectados a la celda HCD a través del *C-trap* se fragmentaron con energías de colisión normalizadas por pasos de 10 a 70 eV. Los espectros de masas se registraron en modo SIM (monitoreo de iones seleccionados), según la masa exacta de los analitos de interés. Los datos se obtuvieron y analizaron con el software *Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ Chromatography Data System* (CDS), versión 7.2, y el software *Thermo Xcalibur 3.1* (TS, San José, CA, USA), respectivamente. Los datos se procesaron con el software *MSDChemStation G1701DA*, y el análisis estadístico se realizó por el método de mínimos cuadrados. La identificación tentativa de los compuestos se realizó por comparación de los espectros de masas y iones-producto con bases de datos (FoodB, 2020; NIST, 2017), ion molecular, masas exactas, formula elemental, relación isotópica del carbono y compuestos reportados en la literatura para especies del género *Varronia*. Para la identificación confirmatoria se usaron sustancias patrón. La cuantificación de los compuestos se realizó por el método de estandarización externa empleando sustancias patrón. Las figuras analíticas de mérito por LC/MS, se calcularon bajo las mismas ecuaciones de la **Sección 4.4.2.1**. Los extractos se analizaron en una concentración de 100 mg/L.

5. Resultados y discusión de resultados

5.1 Identificación botánica

En la **Figura 14** se muestra la identificación botánica, descripción, nombre común, número de voucher y sinonimias de la especie bajo estudio.

Figura 14.

Pliego testigo de la especie identificada Varronia curassavica.



Nota. Laisha Dally Burgos Díaz. UIS, Bucaramanga, mayo de 2022.

5.2 Obtención, caracterización y cuantificación del aceite esencial

El aceite esencial de *V. curassavica*, obtenido por MWHD, es un líquido viscoso, con olor característico especiado, de color amarillo oscuro. El rendimiento del AE de partes aéreas frescas fue de $0.16 \pm 0.04\%$ p/p. Nizio *et al.*, (2020) obtuvieron los rendimientos más altos para el AE, 3.43% p/p por MWHD, en comparación, con el obtenido experimentalmente y los reportados por otros autores en la literatura.

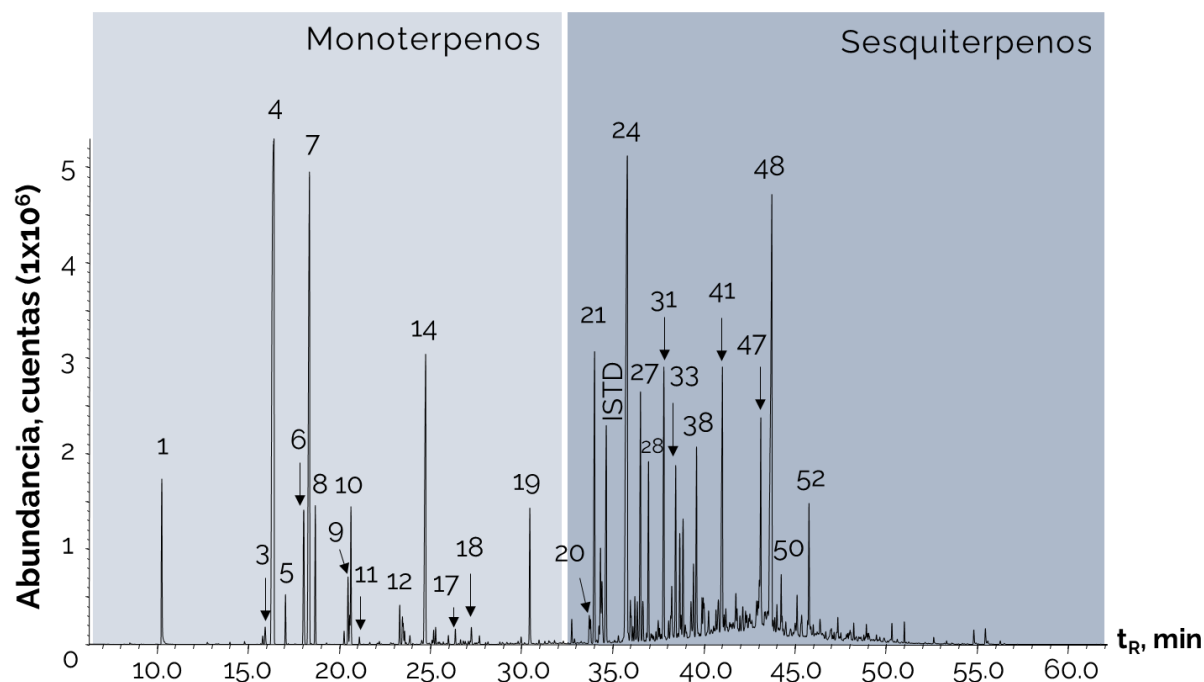
Los procesos de obtención del AE de *V. curassavica* han sido ampliamente estudiados con el fin de optimizar la producción de metabolitos secundarios volátiles, útiles en la industria farmacéutica de productos naturales (Nascimento *et al.*, 2020; Zotti-Sperotto *et al.*, 2020). Se ha demostrado que los mayores rendimientos del AE se obtienen a partir de hojas secas de la planta por el método de hidrodestilación.

Los metabolitos secundarios volátiles presentes en el AE de *V. curassavica*, obtenido por MWHD, se analizaron por GC/MS, empleando los siguientes parámetros de integración de los picos cromatográficos: área de rechazo del pico igual a 0.1 y umbral de integración, *threshold*: 17.5. El perfil cromatográfico, por columna apolar, se muestra en la **Figura 15**. En la **Tabla 3**, se

registran los compuestos identificados en el AE, obtenido de partes aéreas frescas, junto con sus cantidades relativas (% promedio, $n = 3$), y los índices de retención lineales (LRI), obtenidos en ambas columnas, polar y apolar.

Figura 15.

Cromatograma (TIC) del aceite esencial de V. curassavica obtenido por MWHD. GC/MS, columna DB-5MS (60 m), split 1:30. ISTD (n-tetradecano, 500 mg/L).



*Nota. Véase la identificación de los picos cromatográficos y sus cantidades relativas (%) en la **Tabla 3**.*

Tabla 3.

Composición química por GC/MS del AE de partes aéreas de V. curassavica. El orden de elución de los compuestos esta dado por la columna DB-5MS.

N° pico Fig. 15	Compuesto	Tipo	Índices de retención lineales (LRI)				Área relativa GC (%, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
			DB-5MS		DB-WAX		
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.	
1	Óxido de mesitilo ^{a,b}	CO	797	798 ^d	1148	1152 ^e	1.60 ± 0.10
2	Triciclono ^{a,b}	MH	924	923 ^f	1100	1112 ^f	0.10 ± 0.10
3	α -Tujeno ^{a,b}	MH	927	926 ^f	1022	1026 ^f	0.20 ± 0.10
4	α -Pineno ^{a,b,c}	MH	938	936 ^f	1030	1025 ^f	12.0 ± 0.10
5	Canfeno ^{a,b,c}	MH	952	950 ^f	1070	1068 ^f	0.40 ± 0.10
6	Sabineno ^{a,b,c}	MH	975	976 ^f	1127	1122 ^f	1.50 ± 0.07
7	β -Pineno ^{a,b}	MH	982	977 ^f	1116	1110 ^f	6.60 ± 0.07
8	β -Mirceno ^{a,b,c}	MH	988	989 ^f	1164	1161 ^f	1.10 ± 0.03
9	<i>p</i> -Cimeno ^{a,b,c}	MH	1026	1024 ^f	1266	1270 ^f	0.10 ± 0.10
10	1,8-Cineol ^{a,b,c}	MO	1035	1032 ^f	1219	1211 ^f	1.90 ± 0.10
11	(<i>E</i>)- β -Ocimeno ^{a,b}	MH	1047	1048 ^f	1257	1250 ^f	0.10 ± 0.04
12	Linalol ^{a,b,c}	MO	1100	1099 ^f	1532	1543 ^f	0.30 ± 0.10
13	Nonanal ^{a,b}	CO	1105	1103 ^f	1398	1391 ^f	0.40 ± 0.06
14	4-Acetil-1-metilciclohexeno ^{a,b}	CO	1136	1137 ^g	1569	1568 ^g	4.20 ± 0.30
15	Pinocarveol ^{a,b}	MO	1147	1140 ^f	1663	1661 ^f	0.20 ± 0.10
16	Borneol ^{a,b}	MO	1160	1166 ^f	1717	1699 ^f	0.10 ± 0.10
17	Terpinen-4-ol ^{a,b,c}	MO	1178	1177 ^f	1608	1601 ^f	0.10 ± 0.10
18	α -Terpineol ^{a,b}	MO	1201	1189 ^f	1680	1694 ^f	0.20 ± 0.10
19	Acetato de bornilo ^{a,b}	CO	1289	1284 ^f	1596	1579 ^f	1.13 ± 0.02

20	α -Ylangeno ^{a,b}	SH	1377	1370 ^f	1497	1484 ^f	0.52 $\pm$ 0.04
21	α -Copaeno ^{a,b}	SH	1385	1376 ^f	1511	1491 ^f	3.20 $\pm$ 0.07
22	β -Elemeno ^{a,b}	SH	1396	1390 ^f	1600	1591 ^f	2.00 $\pm$ 0.20
23	(Z)- α -Bergamoteno ^{a,b}	SH	1422	1414 ^f	1542	1559 ^f	0.10 $\pm$ 0.10
24	(E)- β -Cariofileno ^{a,b,c}	SH	1436	1420 ^f	1620	1598 ^f	11.0 $\pm$ 0.90
25	(E)- α -Bergamoteno ^{a,b}	SH	1441	1434 ^f	1590	1576 ^f	0.72 $\pm$ 0.03
26	(Z)- β -Farneseno ^{a,b}	SH	1448	1440 ^f	1656	1651 ^f	0.70 $\pm$ 0.20
27	(E)- β -Farneseno ^{a,b}	SH	1457	1456 ^f	1673	1664 ^f	3.00 $\pm$ 0.50
28	α -Humuleno ^{a,b,c}	SH	1469	1460 ^f	1680	1666 ^f	2.00 $\pm$ 0.10
29	γ -Gurjuneno ^{a,b}	SH	1475	1475 ^f	1660	1668 ^f	0.30 $\pm$ 0.02
30	γ -Muroleno ^{a,b}	SH	1481	1478 ^f	1707	1690 ^f	0.20 $\pm$ 0.02
31	Germacreno D ^{a,b,c}	SH	1494	1481 ^f	1722	1708 ^f	6.00 $\pm$ 1.00
32	Biciclogermacreno ^{a,b}	SH	1507	1500 ^f	1749	1734 ^f	1.30 $\pm$ 0.10
33	Cubebol ^{a,b}	SO	1514	1514 ^f	1955	1941 ^f	3.00 $\pm$ 0.80
34	(Z)-Calameneno ^{a,b}	SH	1522	1522 ^f	1842	1834 ^f	1.12 $\pm$ 0.03
35	δ -Cadineno ^{a,b}	SH	1528	1523 ^f	1771	1755 ^f	1.70 $\pm$ 0.30
36	(E)-Calameneno ^{a,b}	SH	1542	1528 ^f	1842	1823 ^f	0.60 $\pm$ 0.10
37	(E)- α -Bisaboleno ^{a,b}	SH	1546	1540 ^f	1779	1775 ^f	1.20 $\pm$ 0.20
38	Germacreno B ^{a,b}	SH	1552	1551 ^f	1834	1824 ^f	2.02 $\pm$ 0.05
39	(E)-Nerolidol ^{a,b,c}	SO	1561	1561 ^f	2046	2036 ^f	1.30 $\pm$ 0.10
40	Espatuleno ^{a,b}	SO	1590	1577 ^f	2141	2126 ^f	1.20 $\pm$ 0.20
41	Óxido de cariofileno ^{a,b,c}	SO	1597	1598 ^f	2000	1986 ^f	3.50 $\pm$ 0.10
42	Epóxido II de humuleno ^{a,b}	SO	1613	1608 ^f	2063	2047 ^f	0.80 $\pm$ 0.20
43	C ₁₅ H ₂₄ O (N.I.)	SO	1626	-	1901	-	0.80 $\pm$ 0.10
44	τ -Cadinol ^{a,b}	SO	1633	1636 ^f	2149	2169 ^f	0.80 $\pm$ 0.30
45	C ₁₅ H ₂₄ O (N.I.)	SO	1646	-	2187	-	0.60 $\pm$ 0.20

46	Cubenol ^{a,b}	SO	1654	1646 ^f	2072	2067 ^f	0.80 ± 0.10
47	α -Cadinol ^{a,b}	SO	1676	1666 ^f	2237	2227 ^f	4.00 ± 0.30
48	α -Bisabolol ^{a,b}	SO	1698	1683 ^f	2231	2214 ^f	9.30 ± 0.40
49	(Z)- α -Atlantona ^{a,b}	SO	1710	1713 ^h	2228	2235 ⁱ	0.55 ± 0.09
50	(Z)- β -Santalol ^{a,b}	SO	1720	1716 ^j	2441	2442 ^k	0.80 ± 0.20
51	(E)- β -Santalol ^{a,b}	SO	1730	1738 ^j	2441	2474 ^k	0.30 ± 0.10
52	(E)- α -Atlantona ^{a,b}	SO	1783	1781 ^h	2339	2328 ⁱ	1.50 ± 0.20
Monoterpenos hidrocarbonados (MH)							22.1 ± 0.05
Monoterpenos oxigenados (MO)							2.80 ± 0.02
Sesquiterpenos hidrocarbonados (SH)							37.0 ± 0.27
Sesquiterpenos oxigenados (SO)							29.0 ± 0.33
Otros compuestos oxigenados (CO)							7.30 ± 0.13
Total de compuestos identificados (%)							98.3

^a Identificación tentativa basada en tiempos de retención (t_R) e índices de retención lineal (LRI) de columnas DB-5MS (no polar) y DB-WAX (polar).

^b Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS; EI, 70 eV, coincidencia > 95%), estudio del patrón de fragmentación (EI, 70 eV), y con consulta de las bases de datos espectrales (Adams, 2007; Wiley, 2008; NIST, 2017).

^c Identificación confirmatoria basada en sustancias de referencia (STD), *i.e.*, α -pineno (98%, LRI_{DB-5MS}= 937, LRI_{DB-WAX}=1024), canfeno (95%, LRI_{DB-5MS}= 964, LRI_{DB-WAX}= 1068), sabineno (95%, LRI_{DB-5MS}= 976, LRI_{DB-WAX}= 1124), β -mirceno (94%, LRI_{DB-5MS}= 989, LRI_{DB-WAX}= 1165), *p*-cimeno (99%, LRI_{DB-5MS}= 1028, LRI_{DB-WAX}= 1274), 1,8-cineol (99%, LRI_{DB-5MS}= 1036, LRI_{DB-WAX}= 1215), linalol (97%, LRI_{DB-5MS}= 1102, LRI_{DB-WAX}= 1151), terpinen-4-ol (95%, LRI_{DB-5MS}= 1187, LRI_{DB-WAX}= 1611), α -terpineol (90%, LRI_{DB-5MS}= 1202, LRI_{DB-WAX}= 1704), (E)- β -cariofileno (98.5%, LRI_{DB-5MS}= 1434, LRI_{DB-WAX}= 1611), α -humuleno (96%, LRI_{DB-5MS}= 1470, LRI_{DB-WAX}= 1683), germacreno D (90%, LRI_{DB-5MS}= 1490, LRI_{DB-WAX}= 1716), (E)-nerolidol (96%, LRI_{DB-5MS}= 1534, LRI_{DB-WAX}= 2261) y óxido de cariofileno (95%, LRI_{DB-5MS}= 1598, LRI_{DB-WAX}= 1996) comparación de espectros de masas (MS; EI, 70 eV, >95% de concordancia) y tiempo de retención (t_R). N.I. Compuestos no identificados.

^d Lazarević *et al.*, (2010).

^e Shimoda *et al.*, (1995).

^f Babushok *et al.*, (2011).

^g Takaku *et al.*, (2007).

^h Adams, (2007).

ⁱPaoli *et al.*, (2011).

^jFacanali *et al.*, (2020).

^kBraun *et al.*, (2007).

Se identificaron 52 compuestos (cantidades relativas >0.1%), en el AE de partes aéreas de *V. curassavica*, obtenido por MWH. Los compuestos mayoritarios presentes en el AE fueron el α -pineno ($12.0 \pm 0.10\%$), el (*E*)- β -cariofileno ($11.0 \pm 0.90\%$), el α -bisabolol ($9.30 \pm 0.40\%$), el β -pineno ($6.60 \pm 0.07\%$) y el germacreno D ($6.00 \pm 1.00\%$). Nizio *et al.*, (2015) reportaron cantidades de α -pineno (17.39%), (*E*)- β -cariofileno (12.52%), α -gurjuneno (11.74%), β -pineno (5.55%) y germacreno D (4.63%), en el AE de *V. curassavica* hojas secas, quimiotipo VAC-425, cultivado en Brasil. Por otra parte, Sciarrone *et al.*, (2017) observaron que el AE obtenido también de plantas de origen brasileño, presenta como compuestos principales al α -pineno (25.32%), el (*E*)- β -cariofileno (7.66%), el α -humuleno (2.21%), el sabineno (0.66%), y el β -mirceno (0.13%). Los resultados de este trabajo, en cuanto a los componentes mayoritarios del aceite, son más parecidos a los obtenidos por Nizio *et al.*, (2015), aunque difieren muy poco de los encontrados por Sciarrone *et al.*, (2017). La variabilidad de compuestos en el AE de *V. curassavica*, depende de las condiciones geobotánicas del medio, el estado fenológico, edad, época de recolección, parte de la planta de donde se extraen y método de obtención, entre otros factores (Figueiredo *et al.*, 2008). De igual manera, puede estar relacionada con la capacidad de las enzimas terpeno-sintasa de convertir el sustrato prenil-difosfato en varios productos durante los diversos ciclos de reacción (Degenhardt *et al.*, 2009). Los hidrocarburos sesquiterpénicos fueron la familia predominante en el AE de *V. curassavica*. Tonial *et al.*, (2020) reportan contenidos similares de sesquiterpenos (38-48%) en el AE de plantas cultivadas en Brasil. Dado que los constituyentes más abundantes pertenecen a la familia de los sesquiterpenoides, es probable que la ruta biosintética del ácido mevalónico en la planta sea muy activa.

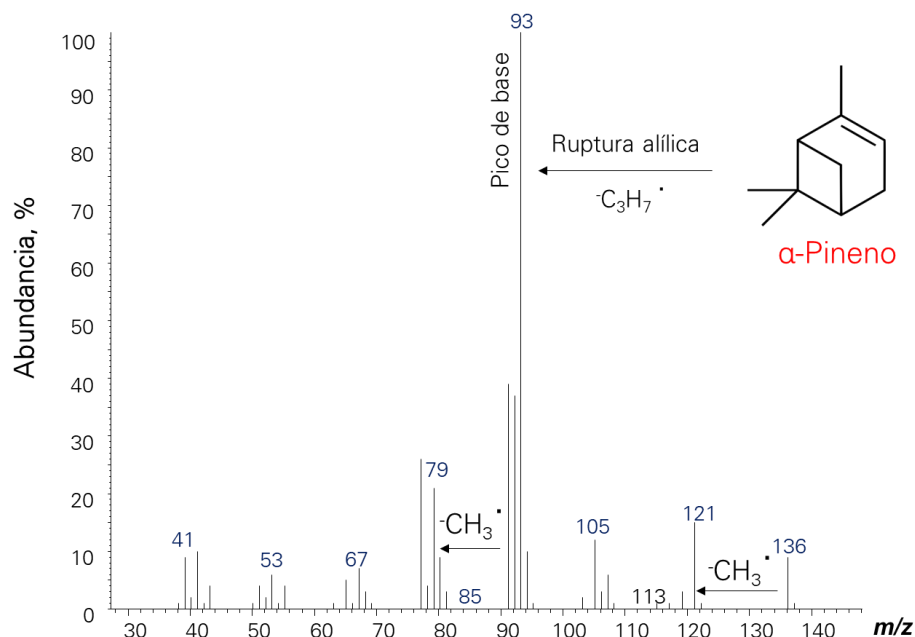
Los parámetros cromatográficos empleados permitieron la separación en la columna DB-5MS (60 m) y elucidación tentativa de cinco pares de isómeros geométricos, debido a la diferencia en sus temperaturas de ebullición (Stashenko & Martínez, 2010), *e.g.*, (*Z*/*E*)- α -bergamoteno, (*Z*/*E*)- β -farneseno, (*Z*/*E*)-calameneno, (*Z*/*E*)- β -santalol y (*Z*/*E*)- α -atlantona. Estos resultados son acordes con los reportados por Facanali *et al.*, (2020), usando cromatografía de gases bidimensional completa (GC $\times$ GC/FID/MS).

El espectro de masas del compuesto mayoritario del AE, el monoterpeno α -pineno y obtenido por GC/MS, se presenta en la **Figura 16**. Este monoterpeno monocíclico presenta en el

ion m/z 93 (100%) como pico de base o de alta intensidad, producido por una ruptura alílica en la molécula, acompañada de la eliminación del radical $C_3H_7^\bullet$. El ion molecular $M^{+\bullet}$ (m/z 136) es de intensidad baja (>10%) y se descompone eliminando sucesivamente los radicales $CH_3^\bullet$ y $C_3H_7^\bullet$, con formación de los iones m/z 121 y 93, respectivamente. El ion $[M - C_3H_7]^\bullet$ posteriormente pierde $CH_3^\bullet$ para generar el fragmento $[M - C_3H_7 - CH_3]^\bullet$ en m/z 79.

Figura 16.

Espectro de masas del monoterpeno α -pineno. GC/MS, columna DB-5MS.



En el espectro de masas del monoterpeno se observan picos muy débiles en la región de masas $< m/z$ 79, lo que indica cierta estabilidad inherente del sistema cíclico al impacto de electrones. La similitud “cualitativa” de los espectros de masas de monoterpenos en el AE de *V. curassavica*, se atribuye a la isomerización de sus iones moleculares debido a la migración de los enlaces dobles bajo el modo de ionización, que conduce a la formación de iones $M^{+\bullet}$ isomerizados, de estructura común. Por consiguiente, estos iones poseen el mismo patrón de fragmentación y las diferencias entre las intensidades de los fragmentos característicos (m/z 121, 93, 91, 79 y 77) se deben solamente a las “desigualdades” en las energías conformacionales de los monoterpenos (Stashenko *et al.*, 1998).

En la **Figura 17**, se muestra el perfil cromatográfico por GC/FID del AE de *V. curassavica*, columna apolar. La cuantificación de los compuestos, identificados confirmatoriamente, por GC/FID en el AE de *V. curassavica* y las figuras de mérito, a partir de las áreas cromatográficas de cada sustancia patrón se describen en la **Tabla 4**. Los resultados se reportan como mg de sustancia de interés $\times 10^3$ / kg de AE $\pm$ desviación estándar. Las curvas de calibración de las sustancias patrón utilizadas para este estudio, se presentan en el **Anexo 1**.

Figura 17.

Cromatograma (TIC) del aceite esencial de *V. curassavica* obtenido por MWHD. GC/FID, columna DB-5 (60 m), split 1:30. ISTD (*n*-tetradecano, 500 mg/L).

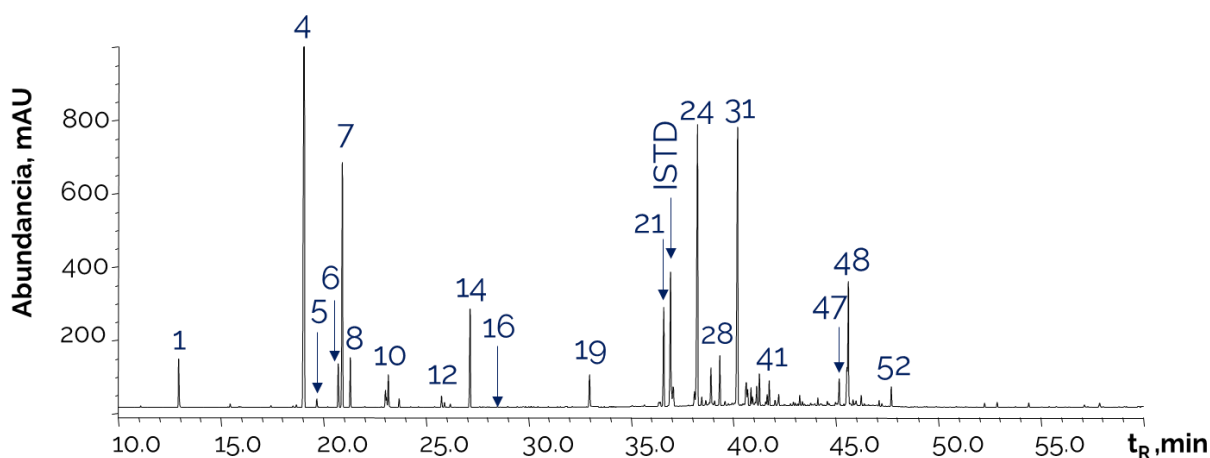


Tabla 4.

Cuantificación por GC/FID, del AE de *V. curassavica*, obtenido por MWHD mediante curvas de calibración externas con el uso de sustancias patrón.

Compuesto	Rango dinámico lineal, mg / kg	Ecuación lineal ^a	R ²	LOD mg / kg	LOQ mg / kg	mg $\times 10^3$ / kg AE, ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
						MWHD
α -Pino	2930-22560	$y = 0.69x - 458.1$	0.998	10	30	180 ± 2.00
Sabineno	10-450	$y = 0.64x - 6.27$	0.992	45	150	15.1 ± 0.70
β -Mirceno	370-2370	$y = 0.59x - 23.3$	0.990	10	30	16.6 ± 0.20
Linalol	10-70	$y = 0.61x + 0.85$	0.995	5	20	4.60 ± 0.30
(<i>E</i>)- β -Cariofileno	115-2090	$y = 0.86x - 10.0$	0.996	10	20	99.0 ± 0.40
α -Humuleno	115-1500	$y = 0.62x + 35.5$	0.995	5	10	15.0 ± 0.10
Óxido de cariofileno	30-260	$y = 0.87x - 7.66$	0.995	20	50	16.2 ± 0.10

*Las sustancias de referencia (300 mg) se disolvieron en diclorometano (1 mL).

^aCurvas de calibración realizadas por el método de estandarización externa.

La cuantificación mostró que el AE de *V. curassavica* presenta un alto contenido de α -pineno (180 g/kg AE), utilizado como precursor de moléculas en síntesis orgánica (Brown & Ramachandran, 1995) y en la industria de sabores y fragancias (Castellanos *et al.*, 2007). También, contiene 99 g/kg AE de (*E*)- β -cariofileno, 16.6 g/kg AE de β -mirceno, 15.1 g/kg AE de sabineno y 15 g/kg AE de α -humuleno. Sciarrone *et al.*, (2017), reportaron cantidades absolutas menores que las encontradas en este estudio para sabineno (6.4 g/kg AE), β -mirceno (6.4 g/kg AE) y (*E*)- β -cariofileno (74 g/kg AE). El AE de *V. curassavica*, de plantas cultivadas en Brasil, presentó mayor contenido de α -pineno (244.8 g/kg AE) y α -humuleno (21.3 g/kg AE).

Con el fin de comparar las familias de compuestos principales presentes en el AE de *V. curassavica*, obtenido por MWHD, con ISTD *n*-tetradecano (500 mg/L), en la

Figura 18 se presenta gráficamente la relación de áreas cromatográficas entre los analitos de interés y el estándar interno ($\Sigma A_i / A_{ISTD}$). Se puede observar que el AE de *V. curassavica* que se encuentra en los tricomas glandulares globulares de las hojas (Santos *et al.*, 2013) es rico en compuestos de tipo sesquiterpenoide. La información encontrada del AE de *V. curassavica*, que crece en Colombia, es útil para el desarrollo de formulaciones en la industria farmacéutica, debido a las propiedades biológicas atribuidas al AE, particularmente a los sesquiterpenos (*E*)- β -cariofileno y α -humuleno (Véase **Tabla 5**).

Figura 18.

Comparación cuantitativa (relación $\Sigma A_i / A_{ISTD}$, ISTD = *n*-tetradecano, 500 mg/L) de las principales familias de sustancias extraídas por MWHD del AE de *V. curassavica*. GC/FID, columna DB-5 (60 m), split 1:30.

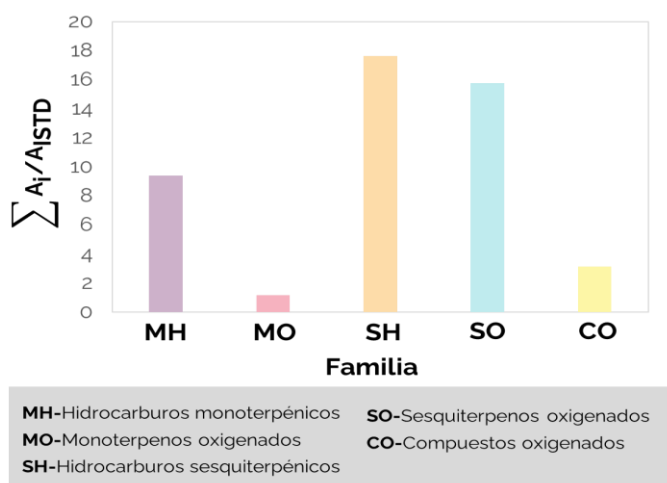


Tabla 5.Actividades biológicas comprobadas del AE de *V. curassavica*.

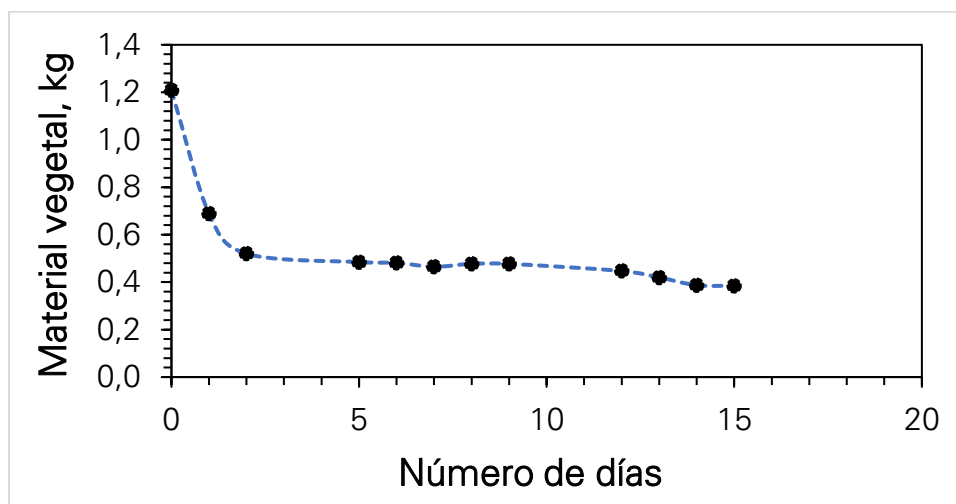
Actividad evaluada	Especie evaluada	Resultado	Referencias
Anti-inflamatoria <i>in vivo</i>	Ratas y ratones	El (<i>E</i>)- β -cariofileno y el α -humuleno presentan efectos inhibitorios sobre el edema inducido por carragenina en las patas de ratones y ratas.	(Fernandes <i>et al.</i> , 2007; Medeiros <i>et al.</i> , 2007; Pimentel <i>et al.</i> , 2012)
Anti-fúngica <i>in vitro</i>	<i>Colletotrichum truncatum</i>	El AE inhibió el efecto del hongo <i>C. truncatum</i> , que infecta a las semillas de soja.	(Silva <i>et al.</i> , 2012)
Anti-fúngica <i>in vitro</i>	<i>Pseudocercospora griseola</i>	El AE mostró efectos inhibitorios sobre <i>P. griseola</i> , el agente etiológico de la mancha de la hoja del frijol común.	(Hoyos <i>et al.</i> , 2012)
Anti-fúngica <i>in vitro</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	El AE inhibió ca. 75% del crecimiento micelial de <i>L. theobromae</i> , el hongo que afecta los cultivos de cacao.	(Nizio <i>et al.</i> , 2015)
Anti-parasitaria <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	El AE causó el 100% de mortalidad al parásito que causa la enfermedad del punto blanco en los peces. El α -pineno es el compuesto que más contribuyó en esta actividad.	(Nizio <i>et al.</i> , 2018)
Antibacteriana <i>in vitro</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Bacillus subtilis</i> .	Las bacterias <i>Gram-positivas</i> analizadas fueron sensibles al AE de <i>C. verbenacea</i> .	(De Carvalho <i>et al.</i> , 2004)

5.3 Secado y tratamiento del material vegetal

Para la obtención de extractos, a partir la biomasa residual, subproducto de la destilación, el material vegetal se sometió a un proceso de secado, a sombra. En la **Figura 19**, se muestra la curva de secado del material vegetal de *V. curassavica* después de su destilación. Para efectos del experimento, se recolectó material de tres destilaciones continuas (ca. 400 g) por triplicado. En la **Tabla 6**, se muestran los resultados de la pérdida de peso de material vegetal destilado en función del tiempo.

Figura 19.

Curva de secado del material vegetal de *V. curassavica* después de su destilación por hidrodesilación asistida, realizada del 15 al 30 de octubre de 2021 (28 ± 1 °C; $46 \pm 0.4\%$ humedad relativa).



Nota. Lugar de almacenamiento; vivero número dos del Complejo Piloto Agroindustrial CENIVAM, UIS.

Tabla 6.

Resultados de la pérdida de humedad del material vegetal de V. curassavica, después de la destilación, en función del tiempo.

Día	Peso del material, kg ($\pm s$, $n = 3$)			Temperatura, °C ($\pm s$, $n = 36$)*			Humedad relativa, % ($\pm s$, $n = 36$)*		
0	1.20	$\pm$	0.10	28.0	$\pm$	1.0	51.0	$\pm$	2.0
1	0.60	$\pm$	0.30	28.0	$\pm$	1.0	47.0	$\pm$	5.0
2	0.50	$\pm$	0.70	27.0	$\pm$	1.0	47.0	$\pm$	2.0
5	0.40	$\pm$	0.50	29.2	$\pm$	0.5	47.0	$\pm$	2.0
6	0.40	$\pm$	0.60	28.3	$\pm$	0.3	46.0	$\pm$	3.0
7	0.40	$\pm$	0.20	29.0	$\pm$	2.0	46.0	$\pm$	2.0
8	0.47	$\pm$	0.01	29.0	$\pm$	1.0	48.3	$\pm$	0.6
9	0.47	$\pm$	0.01	28.4	$\pm$	0.7	49.0	$\pm$	2.0
12	0.40	$\pm$	0.10	29.0	$\pm$	1.0	49.0	$\pm$	1.0
13	0.40	$\pm$	0.60	28.0	$\pm$	2.0	46.0	$\pm$	1.0
14	0.30	$\pm$	0.30	27.0	$\pm$	2.0	46.0	$\pm$	3.0
15	0.30	$\pm$	0.10	28.0	$\pm$	1.0	46.0	$\pm$	1.0

*La temperatura y la humedad del ambiente se registraron con un termohigrómetro, cada media hora, durante el día.

Después de 15 días de secado del material vegetal destilado de *V. curassavica*, bajo la sombra, se alcanzó la humedad de equilibrio ($68.1 \pm 0.10\%$) del material vegetal *versus* la humedad del medio ambiente.

5.4 Caracterización química de la fracción volátil de hojas y flores de *V. curassavica*

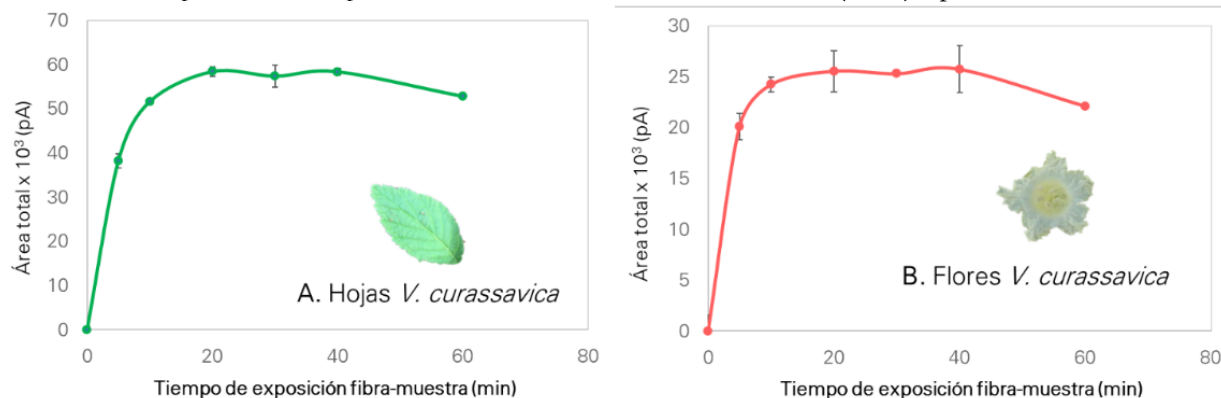
HS-SPME es un proceso de equilibrio donde se consideran tres (3) fases: el recubrimiento de la fibra, la fase gaseosa o *headspace*, y una fase condensada estimada homogénea. Durante la extracción los analitos migran entre las fases hasta que se alcanza el equilibrio. El tiempo de exposición de la fibra ideal para el monitoreo de la fracción volátil, es aquel donde la cantidad de analito adsorbido por la fibra permanece constante (Alonso *et al.*, 2003).

En la

Figura 20, se muestran los perfiles de saturación de las exposiciones entre la fibra y matrices evaluadas (hojas y flores de *V. curassavica*), en función del tiempo. Se evaluaron seis tiempos de exposición (5, 10, 20, 30, 40 y 60 min) con el objetivo de seleccionar el tiempo de exposición de la fibra con la muestra (Véase **Tabla 7**).

Figura 20.

Perfiles de saturación de la exposición entre la fibra y las **A. Hojas** y **B. Flores** de *V. curassavica*, en función del tiempo, obtenidas por HS-SPME / GC/FID. Columna DB-5 (60 m), split 1:30.

**Tabla 7.**

Áreas cromatográficas totales de las fracciones volátiles de hojas y flores, obtenidas por HS-SPME / GC/FID. Columna DB-5 (60 m), split 1:30.

Tiempo (min)	Área cromatográfica total x 10 ³ (% , valor ± SD, n = 3)						
	Hojas				Flores		
	Promedio	Desviación	CV, %		Promedio	Desviación	CV, %
5	38.2	± 0.80	2		20.0	± 1.50	8
10	52.0	± 1.60	3		24.0	± 1.30	5
20	58.4	± 0.60	1		25.6	± 0.80	3
30	57.0	± 1.00	2		25.0	± 2.00	8
40	58.0	± 2.60	4		25.8	± 0.20	1
60	52.8	± 0.70	1		22.0	± 2.30	10

En la

Figura 20, se observó que, entre los 20 y 30 min de exposición, las áreas cromatográficas totales de las fracciones volátiles de hojas y de flores de *V. curassavica* presentan un comportamiento constante. Los equilibrios de absorción en ambas fibras se completan a los 30 min, pese a ser evaluadas en concentraciones diferentes. La concentración del analito influye directamente en el área cromatográfica, y no en el tiempo de equilibrio, por las saturaciones de la fibra con el analito, resultado de los dos equilibrios presentados en este tipo de sistemas, líquido-gas y gas-sólido (Héthelyi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2021).

Los metabolitos secundarios volátiles presentes en las fracciones volátiles de hojas y flores de *V. curassavica*, obtenidas por HS-SPME, se analizaron por GC/MS, empleando los mismos parámetros de integración de los picos cromatográficos del AE: área de rechazo del pico igual a 0.1 y umbral de integración, *threshold*: 17.5. El perfil cromatográfico de la fracción volátil de hojas de *V. curassavica*, obtenida por HS-SPME se presenta en la **Figura 21**. De igual manera, el perfil cromatográfico de la fracción volátil de flores de *V. curassavica*, se presenta en la **Figura 22**. En la **Tabla 8**, se registran los compuestos identificados, junto con sus cantidades relativas (% promedio, $n = 3$), y los índices de retención lineales (LRI), obtenidos en ambas columnas, polar y apolar.

Figura 21.

Cromatograma (TIC) de la fracción volátil de hojas de V. curassavica, obtenida por HS-SPME. Columna DB-5MS, 60 m. Fibra: PDMS/DVB, 65 μ m.

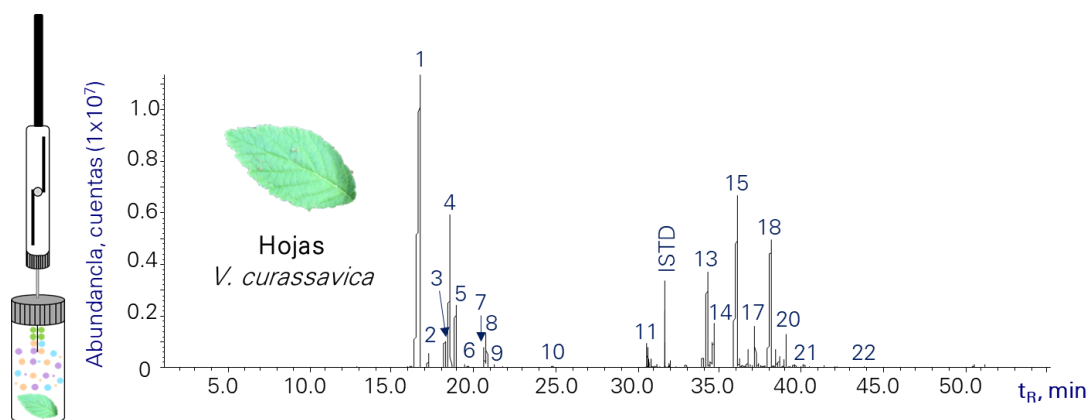


Figura 22.

Cromatograma (TIC) de la fracción volátil de flores de V. curassavica, obtenida por HS-SPME. Columna DB-5MS, 60 m. Fibra: PDMS/DVB, 65 μ m.

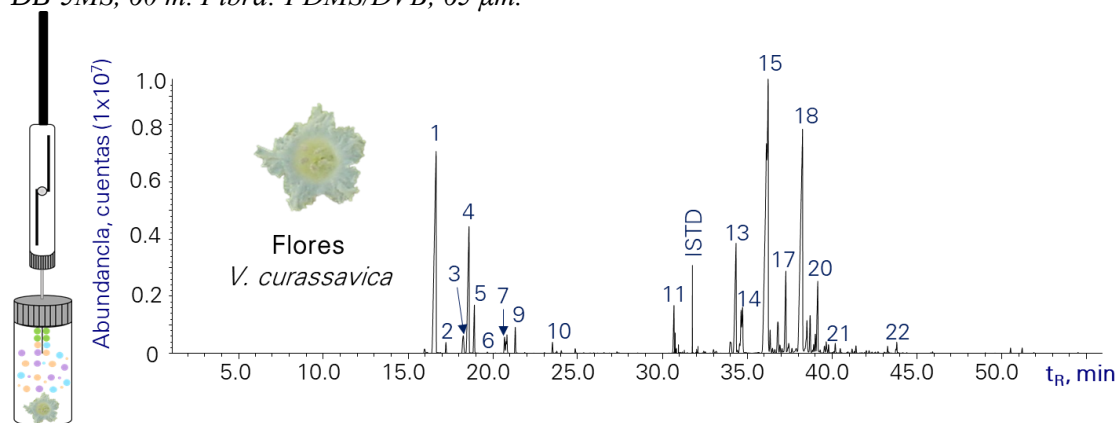
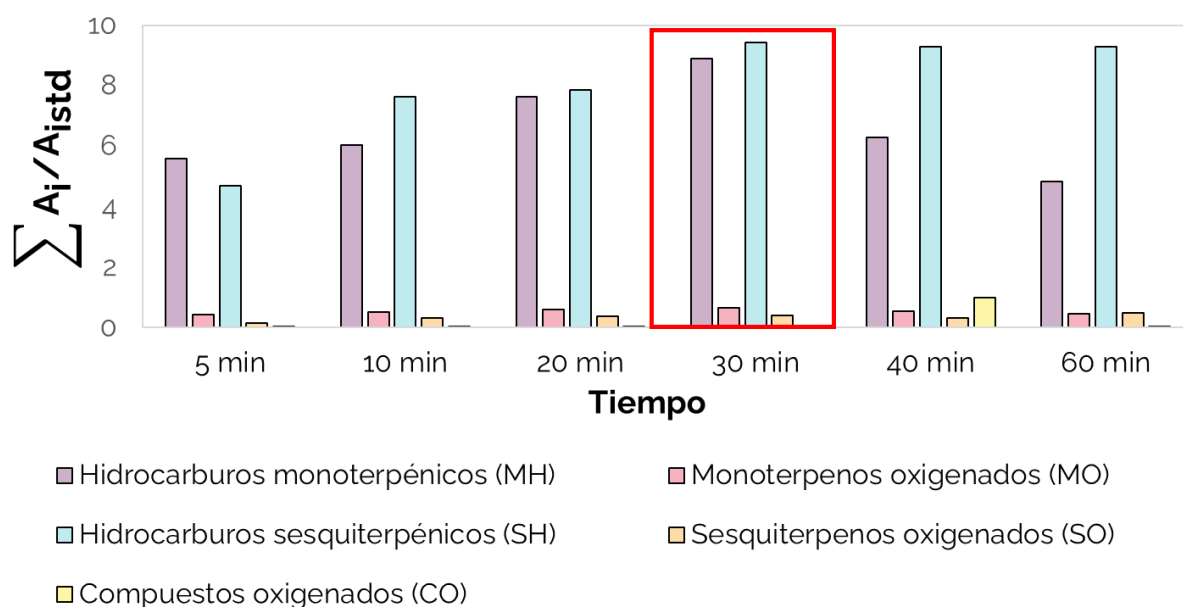


Figura 23.

Distribución de familias en función del tiempo para los compuestos volátiles en flores de *V. curassavica*. obtenidas por HS-SPME / GC/FID. Columna DB-5 (60 m), split 1:30.

**Tabla 8.**

Relación de entre familias en función del tiempo para los compuestos volátiles en flores de *V. curassavica* y el estándar interno ($\Sigma A_i / A_{ISTD}$).

Familia/Tiempo	5 min	10 min	20 min	30 min	40 min	60 min
Hidrocarburos monoterpénicos (MH)	5.58	6.03	7.64	8.89	6.30.	4.82
Monoterpenos oxigenados (MO)	0.44	0.52	0.59	0.67	0.54	0.46
Hidrocarburos sesquiterpénicos (SH)	4.70	7.64	7.85	9.44	9.30	9.29
Sesquiterpenos oxigenados (SO)	0.16	0.33	0.39	0.40	0.31	0.48
Compuestos oxigenados (CO)	0.05	0.05	0.05	0.05	100	0.05

El tiempo de equilibrio fibra-muestra, donde se alcanzó el máx. de adsorción, para todas las familias de compuestos presentes en la fracción volátil fue de 30 min. Se encontró que la fragancia de las hojas y las flores está dada principalmente por el α -pineno (24.0-10.8%) y el (*E*)- β -cariofileno (23.0-31.2%), respectivamente. Estos resultados son coherentes comparados con los encontrados en el AE. El perfil de compuestos volátiles emitidos por las hojas y las flores depende también de la hora del día; los insectos que la polinizan, que pueden ser diurnos o nocturnos, y, de ello, dependerá también la cinética de emanación de compuestos fragantes y el tipo de los volátiles emitidos, que varían, para la mayoría de las plantas, con la hora del día (ritmo circadiano) y según la función biológica que cumplen (Stashenko & Martínez, 2013).

5.5 Caracterización química y cuantificación de los extractos SE y MSPD de *V. curassavica* por cromatografía líquida

En la **Tabla 9**, se presentan los rendimientos de extracción por las técnicas SE y MSPD para material vegetal antes y después de la destilación de partes aéreas de *V. curassavica*.

Tabla 9.
Rendimiento de los extractos obtenidos de partes aéreas de V. curassavica

Rendimientos, % p/p ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)			
Antes de la destilación		Después de la destilación	
SE	MSPD	SE	MSPD
11.7 $\pm$ 0.1	15.3 $\pm$ 0.4	6.2 $\pm$ 0.6	10.1 $\pm$ 0.6

Los extractos MSPD, de material vegetal antes y después de su destilación, tuvieron los mayores rendimientos de extracción (15.3% p/p y 10.1% p/p, respectivamente), en comparación con los extractos SE. Los rendimientos de extracción para SE reportados en la literatura varían desde el 8.13% p/p hasta el 14.2% p/p, este último, cercano al obtenido experimentalmente (Hernandez *et al.*, 2007; Michielin *et al.*, 2009)

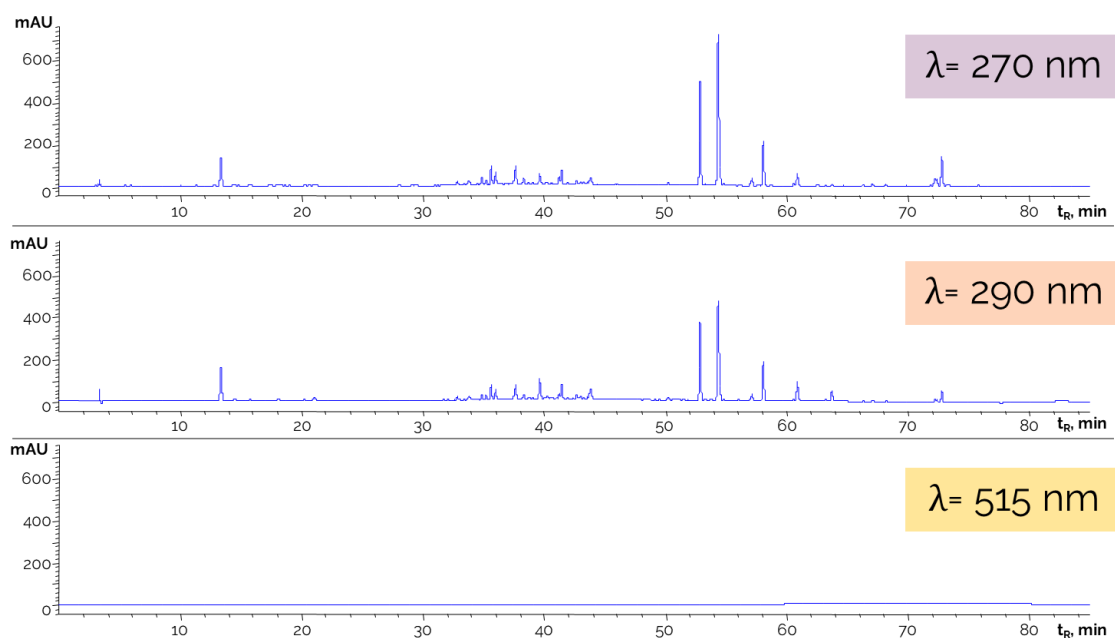
El proceso destilativo por MWHD tuvo un efecto negativo sobre los rendimientos de extracción. Los rendimientos obtenidos por SE y MSPD de material vegetal después de su destilación, fueron menores, en comparación, con los extractos obtenidos de material vegetal antes de su destilación (Véase **Tabla 9**). Es posible que algunos polifenoles presentes en el material

vegetal se degraden por acción de la temperatura (Ioannou *et al.*, 2019) ,o se solubilicen, debido a la condensación del vapor de agua dentro del alambique (Ferreira & Pinho, 2012).

Los metabolitos secundarios semi-volátiles y no volátiles presentes en los extractos SE y MSPD de material vegetal antes y después de la destilación de *V. curassavica*, se analizaron por HPLC/DAD, empleando los siguientes parámetros de integración de los picos cromatográficos: área de rechazo del pico igual a 10, ancho de pico de 0.01, altura de rechazo del pico igual a 5 y sensibilidad de la pendiente de 2. Los perfiles cromatográficos a diferentes longitudes de onda, por columna C₁₈ en fase reversa, se muestran en la **Figura 24**.

Figura 24.

Perfiles cromatográficos del extracto hidroetanólico de V. curassavica, antes de su destilación. HPLC/DAD, Columna C₁₈, 250 mm x 4.6 mm (d.i.) x 5 µm.



Las señales cromatográficas obtenidas a diferentes longitudes de onda presentan el mismo comportamiento para todos los extractos, de material vegetal antes y después de la destilación. Se observa que a longitudes de onda ($\lambda=270$ y 290 nm) el perfil cromatográfico muestra señales características de compuestos fenólicos. La ausencia de picos cromatográficos en la $\lambda=515$ nm, indica que los extractos de *V. curassavica*, obtenidos por SE y MSPD, a partir de material vegetal

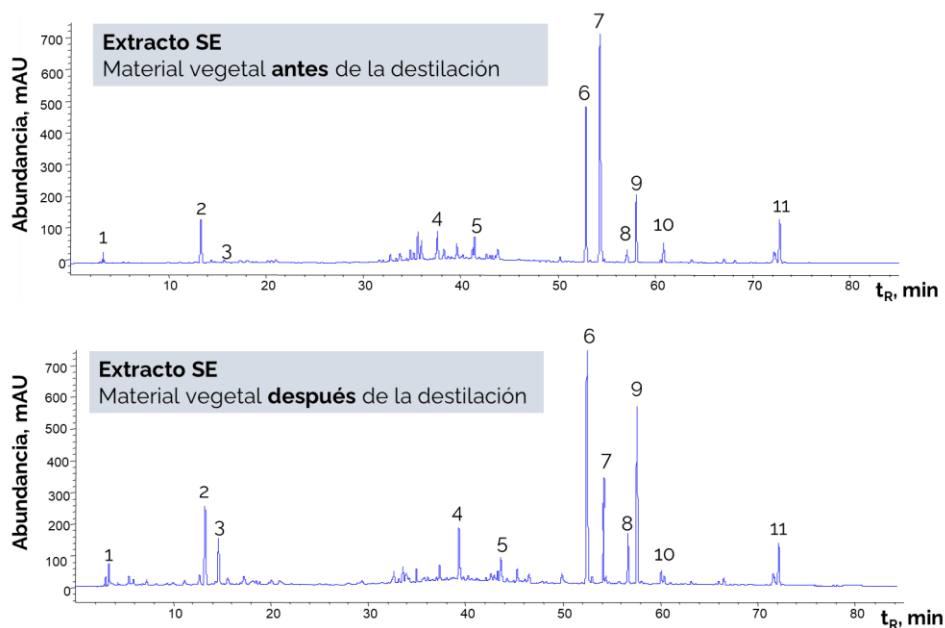
antes y después de la destilación, no contienen antocianinas, debido a que sus espectros UV-Vis muestran picos de absorción entre 505-535 nm (Saha *et al.*, 2020).

En la **Figura 25** se muestran los perfiles cromatográficos, a $\lambda=270$ nm, de los extractos obtenido por SE, de material vegetal antes y después de la destilación de *V. curassavica*. De igual manera, en la

Figura 26 se muestran los perfiles cromatográficos de los extractos obtenidos por MSPD. La identificación de los compuestos presentes en todos los extractos se presenta en la **Tabla 10**.

Figura 25.

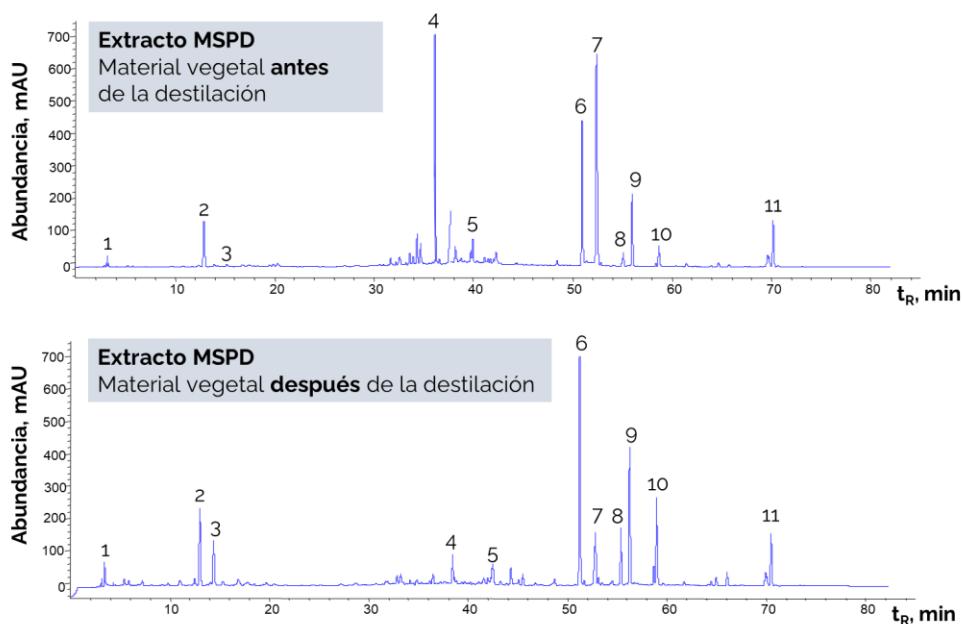
Perfiles cromatográficos de los extractos SE de partes aéreas de material vegetal antes y después de la destilación de V. curassavica. HPLC/DAD, Columna C₁₈, 250 mm de longitud x 4.6 mm (d.i.) x 5 μ m, $\lambda=270$ nm.



Nota. Véase la identificación de los picos cromatográficos en la Tabla 10.

Figura 26.

Perfiles cromatográficos de los extractos MSPD de partes aéreas de material vegetal antes y después de la destilación de *V. curassavica*. HPLC/DAD, Columna C_{18} , 250 mm de longitud x 4.6 mm (d.i.) x 5 μ m, $\lambda=270$ nm.

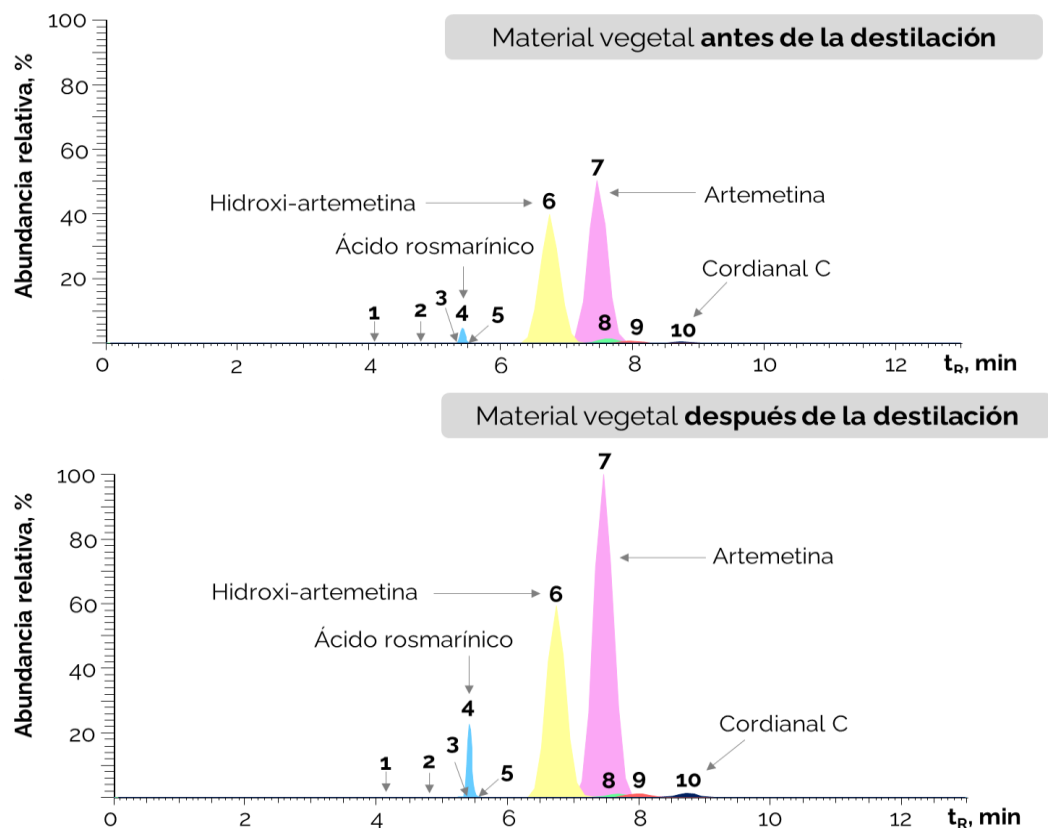


Nota. Véase la identificación de los picos cromatográficos en la **Tabla 10**.

Con el fin de elucidar e identificar inequívocamente los metabolitos secundarios semi-volátiles y no volátiles presentes en los extractos SE y MSPD de material vegetal antes y después de la destilación de *V. curassavica*, éstos se analizaron también por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, empleando los siguientes parámetros de procesamiento de los picos cromatográficos: *smoothing* tipo *Gaussian*, 15 puntos; tolerancia de masa de 5.0 ppm y precisión de masa de cinco (5) decimales. Las corrientes iónicas extraídas (EIC) de los extractos SE, de *V. curassavica*, antes y después de su destilación, se muestran en la **Figura 27**.

Figura 27.

Corrientes iónicas extraídas (EIC) en modo SIM de los extractos SE de *V. curassavica*, de material vegetal antes y después de su destilación.



Nota. Véase la identificación de los componentes en la **Tabla 10**.

La cuantificación de los compuestos presentes en los extractos de *V. curassavica*, se realizó por el método de estandarización externa empleando sustancias patrón (Véase **Tabla 11**). La hidroxi-artemetina y la retusina, compuestos identificados tentativamente, se cuantificaron con las curvas de calibración de la artemetina y el pachipodol, respectivamente, por sus estructuras químicas similares. Los cordianales B y C no se cuantificaron. No se disponía de una sustancia patrón analoga. La identificación por espectrometría de masas se realizó con base en estudio de patrones de fragmentación de espectros de masas obtenidos, relación isotópica de carbono y por comparación de bases de datos (FoodB, 2022; NIST, 2017).

Tabla 10.

Masas exactas de iones o moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, identificadas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS operado en modo SIM, de compuestos presentes extractos vegetales de *V. curassavica*.

N° pico, Fig. 28	Compuesto	Fórmula	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	Δ ppm	HCD, eV	Iones-producto			Ref.
							Pérdida	Fórmula (ppm)	m/z, %	
1	Ácido cafeico ^{a,b,c}	C ₉ H ₈ O ₄	-	179.03404	5.42	20	$[M-H]^-$ -CO ₂	C ₈ H ₇ O ₂ (8.37)	135.04402 (100)	d
2	Eriodictiol-7- O- glucósido ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	-	449.10818	1.66	20	$[M-H]^-$ -C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ (1.23)	287.05576 (100)	e
							$[M-H]^-$ -C ₆ H ₁₀ O ₅ - C ₈ H ₈ O ₂	C ₇ H ₃ O ₄ (7.20)	151.00259 (16)	
3	Rutina ^{a,b,c}	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-	609.14545	1.08	20	$[M-H]^-$ -C ₆ H ₁₀ O ₄	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ (5.74)	463.08554 (1)	f
							$[M-H]^-$ -C ₆ H ₁₀ O ₄ - C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₁₅ H ₉ O ₇ (1.23)	301.03500 (12)	
							$[M-H]^-$ -C ₆ H ₁₀ O ₄ - C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₈ H ₆ O ₃	C ₇ H ₃ O ₄ (7.10)	151.00261 (1)	
4	Ácido rosmarínico ^{a,b,c}	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	-	359.07678	1.27	10	$[M-H]^-$ -C ₉ H ₇ O ₃	C ₉ H ₈ O ₅ (4.33)	197.04469 (35)	g
							$[M-H]^-$ -C ₉ H ₈ O ₄	C ₉ H ₇ O ₄ (5.67)	179.03397 (6)	
							$[M-H]^-$ -C ₉ H ₈ O ₄ -H ₂ O	C ₉ H ₅ O ₃ (6.65)	161.02335 (100)	
							$[M-H]^-$ -C ₉ H ₈ O ₄ -CO ₂	C ₈ H ₇ O ₂ (8.71)	135.04398 (4)	
5	Kaempferol-3- O- galactósido ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-	447.09265	1.41	20	$[M+H]^+$ -C ₆ H ₁₁ O ₅	C ₁₅ H ₈ O ₆ (1.44)	284.03262 (21)	h
							$[M+H]^+$ -C ₆ H ₁₁ O ₅ - C ₈ H ₅ O ₂	C ₇ H ₃ O ₄ (7.50)	151.00278 (1)	

6	Hidroxi- artemetina ^{b,c}	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	405.11743	-	1.42	40	[M+H] ⁺ -CH ₃	C ₁₉ H ₁₈ O ₉ (1.77)	390.09384 (14)	i
							[M+H] ⁺ -CH ₃ -CH ₃	C ₁₈ H ₁₅ O ₉ (1.50)	375.07050 (100)	
							[M+H] ⁺ -CH ₃ -H ₂ O	C ₁₉ H ₁₆ O ₈ (2.17)	372.08316 (4)	
							[M+H] ⁺ -(CH ₃) ₂ -H ₂ O	C ₁₈ H ₁₃ O ₈ (1.56)	357.05994 (21)	
							[M+H] ⁺ -(CH ₃) ₂ - H ₂ O-CO	C ₁₇ H ₁₃ O ₇ (2.03)	329.06668 (1)	
							[M+H] ⁺ -C ₁₁ H ₁₂ O ₄	C ₉ H ₉ O ₅ (0.77)	197.04430 (30)	

Tabla 12. Continuación

7	Artemetina ^{a,b,c}	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389.12283	-	0.67	30	[M+H] ⁺ -CH ₃	C ₁₉ H ₁₈ O ₈ (0.59)	374.09940 (14)	i
							[M+H] ⁺ -CH ₃ -CH ₃	C ₁₈ H ₁₅ O ₈ (0.68)	359.07590 (12)	
							[M+H] ⁺ -CH ₃ -H ₂ O	C ₁₉ H ₁₆ O ₇ (0.52)	356.08887 (21)	
							[M+H] ⁺ -(CH ₃) ₂ -H ₂ O	C ₁₈ H ₁₃ O ₇ (0.52)	341.06550 (2)	
							[M+H] ⁺ -CH ₃ -H ₂ O-CO	C ₁₈ H ₁₆ O ₆ (0.44)	328.09399 (2)	
							[M+H] ⁺ -(CH ₃) ₂ -H ₂ O-CO	C ₁₇ H ₁₃ O ₆ (0.44)	313.07053 (2)	
							[M+H] ⁺ -C ₁₁ H ₁₂ O ₃	C ₉ H ₉ O ₅ (0.77)	197.04430 (1)	
8	Pachipodol ^{a,b}	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	345.09631	-	1.63	30	[M+H] ⁺ -CH ₃	C ₁₇ H ₁₄ O ₇ (1.69)	330.07285 (100)	j
							[M+H] ⁺ -CH ₃ -CH ₃	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ (1.55)	315.04944 (42)	
							[M+H] ⁺ -(CH ₃) ₂ -CO	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ (1.57)	287.05453 (6)	
							[M+H] ⁺ -(CH ₃) ₂ -(CO) ₂	C ₁₄ H ₁₁ O ₅ (1.57)	259.05969 (3)	
							[M+H] ⁺ -C ₁₀ H ₁₀ O ₄	C ₈ H ₇ O ₃ (0.90)	151.03883 (1)	
9	Retusina ^{a,b}	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.11209	-	1.22	50	[M+H] ⁺ -CH ₃	C ₁₈ H ₁₆ O ₇ (1.25)	344.08862 (63)	j
							[M+H] ⁺ -CH ₃ -CH ₃	C ₁₇ H ₁₃ O ₇ (1.28)	329.06516 (71)	
							[M+H] ⁺ -(CH ₃) ₂ -CO	C ₁₆ H ₁₃ O ₆ (1.27)	301.07028 (100)	

10	Cordianal C ^{a,b}	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	473.36194	-	1.26	20	[M+H] ⁺ -(CH ₃) ₂ -CO-H ₂ O	C ₁₆ H ₁₁ O ₅ (1.22)	283.05975 (13)	j
							[M+H] ⁺ -(CH ₃) ₂ -CO-H ₂ O-CO	C ₁₅ H ₁₁ O ₄ (0.95)	255.06494 (4)	
							[M+H] ⁺ -C ₁₁ H ₁₂ O ₃	C ₈ H ₇ O ₄ (0.61)	167.03378 (6)	
							[M+H] ⁺ -H ₂ O	C ₃₀ H ₄₇ O ₃ (0.83)	455.35159 (79)	
							[M+H] ⁺ -H ₂ O-H ₂ O	C ₃₀ H ₄₅ O ₂ (0.92)	437.34100 (100)	
							[M+H] ⁺ -H ₂ O-CO	C ₂₉ H ₄₇ O ₂ (0.71)	427.35675 (5)	
							[M+H] ⁺ -(H ₂ O) ₂ -H ₂ O	C ₃₀ H ₄₃ O (0.73)	419.33054 (29)	
							[M+H] ⁺ -H ₂ O-CO-H ₂ O	C ₂₉ H ₄₅ O (0.66)	409.34622 (15)	
							[M+H] ⁺ -H ₂ O-CO-(H ₂ O) ₂	C ₂₉ H ₄₃ (2.86)	391.33481 (4)	

Tabla 12. Continuación

11	Cordianal B ^{a,b}	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	471.34616	-	1.53	10	[M+H] ⁺ -H ₂ O	C ₃₀ H ₄₅ O ₃ (0.91)	453.33591 (50)	j
							[M+H] ⁺ -H ₂ O-H ₂ O	C ₃₀ H ₄₃ O ₂ (1.15)	435.32541 (17)	
							[M+H] ⁺ -H ₂ O-CH ₂ O	C ₂₉ H ₄₃ O ₂ (1.15)	423.32525 (100)	
							[M+H] ⁺ -H ₂ O-CH ₂ O-H ₂ O	C ₂₉ H ₄₁ O (1.20)	405.31476 (16)	

^aIdentificación tentativa basada en moléculas [M+H]⁺ protonadas o [M-H]⁻ deprotonadas, reportadas en la literatura científica para especies del género *Varronia*.

^bIdentificación tentativa basada en el estudio de patrones de fragmentación de espectros de masas obtenidos, relación isotópica de carbono y por comparación de bases de datos (FoodB, 2022; NIST, 2017).

^cIdentificación confirmatoria basada en la comparación de t_R y espectro de masas con sustancias estándar, es decir, ácido cafeico (≥98%), eriodictiol-7-*O*-glucósido (≥98%), rutina (≥94%), ácido rosmarínico (≥97%), kaempferol-3-*O*-galactósido (≥98%), artemetina (≥98%) y pachipodol (≥98%).

^dEl-Sayed *et al.*, (1998); ^eFoodB, (2020b); ^fMatias *et al.*, (2013b); ^gTicli *et al.*, (2005); ^hFoodB, (2019); ⁱVelde *et al.*, (1982);

^jKuroyanagui *et al.*, (2001).

Tabla 11.

Cuantificación por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo SIM, de los extractos vegetales bajo estudio de V. curassavica, de materiales vegetales antes y después de su destilación.

N° pico Fig. 23	Compuesto	Rango dinámico lineal, mg/L	Ecuación lineal ^a	LOD, mg/L	LOQ, mg/L	Cantidad de compuesto, mg/g extracto ($\bar{x} \pm s, n=3$)			
						Material vegetal			
						Antes de la destilación		Después de la destilación	
						SE	MSPD	SE	MSPD
1	Ácido cafeico	0.01 - 0.80	$y = 3.7 \times 10^7 x + 7.1 \times 10^5$	0.07	0.23	<LOQ	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	<LOQ
2	Eriodictiol-7-O-glucósido	0.01 - 0.80	$y = 6.3 \times 10^6 x - 1.7 \times 10^3$	0.04	0.15	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	<LOQ
3	Rutina	0.01 - 0.80	$y = 8.0 \times 10^6 x + 1 \times 10^5$	0.09	0.30	0.30 ± 0.03	1.10 ± 0.04	0.10 ± 0.01	<LOQ
4	Ácido rosmarínico	1.00 - 10.0	$y = 4.2 \times 10^7 x - 7.2 \times 10^6$	0.55	1.84	4.40 ± 0.10	32.0 ± 0.04	14.3 ± 0.01	4.00 ± 0.10
5	Kaempferol-3-O-galactósido	0.10 - 0.80	$y = 4.1 \times 10^6 x + 9.4 \times 10^4$	0.06	0.20	1.00 ± 0.10	2.30 ± 0.10	0.11 ± 0.01	<LOD
6	Hidroxi-artemetina	1.00 - 10.0	$y = 5.8 \times 10^8 x + 2.7 \times 10^7$	0.97	3.22	5.00 ± 1.00	10.0 ± 1.00	9.00 ± 1.00	8.00 ± 0.40
7	Artemetina					8.00 ± 1.00	16.0 ± 1.00	15.0 ± 1.00	15.0 ± 1.30
8	Pachipodol	0.01 - 0.80	$y = 1.6 \times 10^8 x + 2.0 \times 10^7$	0.06	0.20	0.03 ± 0.01	<LOQ	<LOQ	2.00 ± 1.00
9	Retusina					<LOQ	<LOQ	1.00 ± 0.20	<LOQ

*Las sustancias de referencia (1 mg) se disolvieron en MeOH grado LC/MS (1 mL).

^aCurvas de calibración realizadas por el método de estandarización externa. Los extractos se cuantificaron a 100 mg/L.

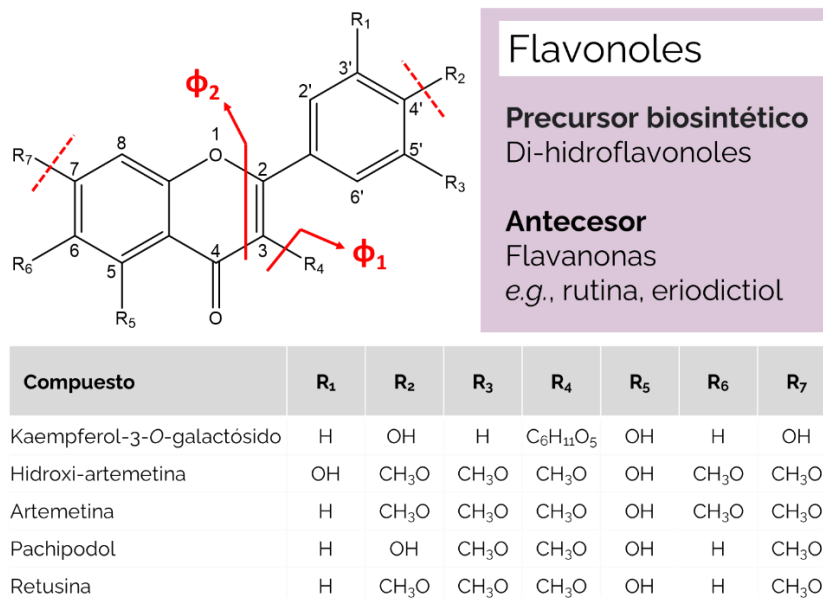
La caracterización química de los extractos bajo estudio permitió identificar 11 compuestos polifenólicos, entre ellos derivados de ácidos hidroxycinámicos, flavonoides *O*-glucosilados, triterpenos y derivados de flavonoles *O*-metilados (Véase **Tabla 10**). Los metabolitos secundarios fueron separados en la columna cromatográfica según su polaridad, eluyeron primero compuestos polares como el ácido cafeico, derivados glucosilados y el ácido rosmarínico; mientras que, las agliconas, compuestos más apolares, eluyeron posteriormente. La composición química en los extractos SE y MSPD, se encuentra relacionada con la afinidad de los analitos con el disolvente orgánico usado.

Fue posible estudiar los patrones de fragmentación de los compuestos identificados en extractos de *V. curassavica*. Compuestos como el ácido cafeico, el eriodictiol-7-*O*-glucósido, la rutina, el ácido rosmarínico, y el kaempferol-3-*O*-galactósido, mostraron espectros de masas típicos en modo de adquisición de iones negativos. Compuestos como la hidroxi-artemetina, artemetina, pachipodol, retusina, cordianal B y cordianal C, mostraron espectros de masas típicos en modo de adquisición de iones positivos. Aunque se empleó ácido fórmico para disminuir el pH y pre-formar iones, los flavonoides tienden a ionizarse más fácilmente en iones negativos debido a sus sitios ácidos (grupos hidroxilo). Compuestos como la rutina, eriodictiol-7-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-galactósido, poseen mayor número de grupos hidroxilos disponibles en sus estructuras, en comparación con la artemetina, la hidroxi-artemetina, el pachipodol, la retusina y los cordianales B y C.

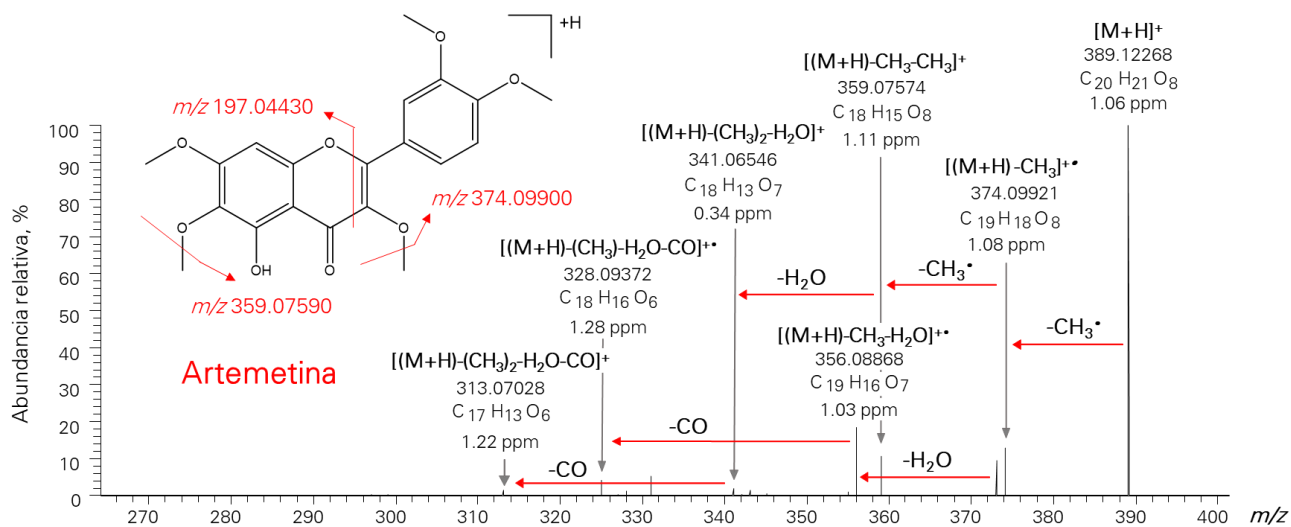
La muestra el patrón de fragmentación de los flavonoles, la familia más abundante, presente en los extractos de *V. curassavica*. A partir de este modelo, es posible elucidar las rupturas características de este tipo de moléculas, *e.g.*, el espectro de masas de la artemetina, flavonol *O*-metilado, que se ha identificado principalmente en especies de los géneros *Artemisia* y *Varronia*. En el espectro de masas (Véase **Figura 29**) se observaron pérdidas consecutivas de $-CH_3^{\bullet}$ (m/z 374.09940 y 359.07590), $-H_2O$ (m/z 356.08887 y 341.06540) y $-CO$ (m/z 328.09399 y 313.07053). Además, mostró una ruptura, en el anillo C entre los carbonos C_2-C_3 , que generó el ion-producto $[M+H]^+-C_{11}H_{12}O_4$ de m/z 197.04430, con una abundancia menor que el 1%. De igual manera, el espectro de masas de la hidroxi-artemetina, presentó iones-producto y rupturas similares que la artemetina, y la formación del ión de m/z 197 con abundancia del 30 % (Véase

Figura 30)**Figura 28.**

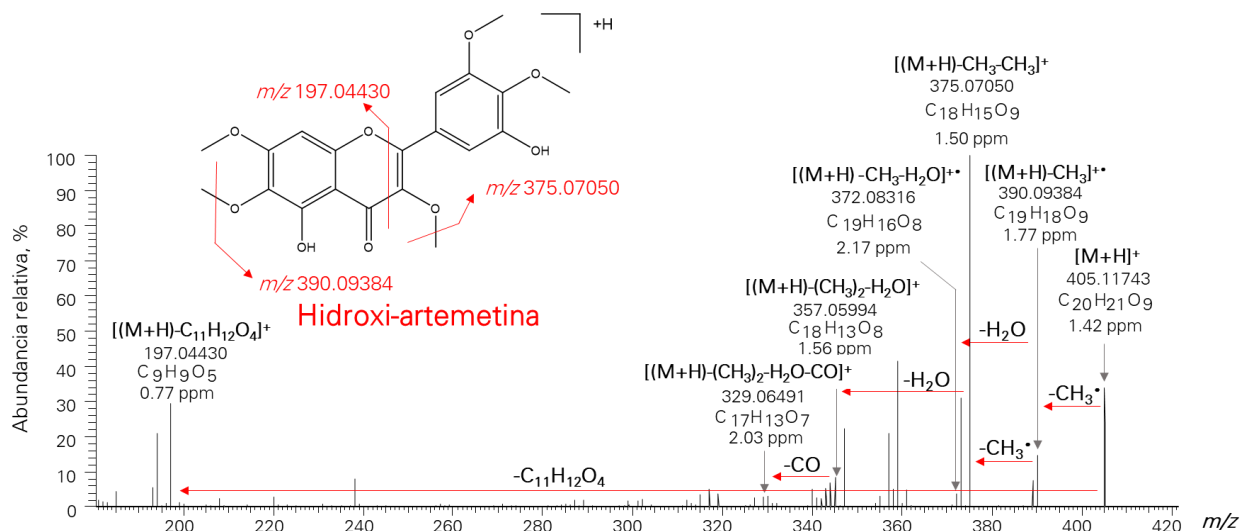
Patrón de fragmentación típico para los flavonoles (Tsimogiannis et al., 2007).

**Figura 29.**

Espectro de masas artemetina, m/z 389.12268, presente en extractos de V. curassavica, obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, modo SIM.

**Figura 30.**

Espectro de masas hidroxi-artemetina, m/z 405.11743, presente en extractos de *V. curassavica*, obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, modo SIM.



La corriente iónica extraída (EIC) del extracto SE de *V. curassavica*, obtenido de material vegetal después de su destilación, mostró mayores abundancias relativas de sus compuestos, en comparación, con el extracto SE obtenido de material vegetal antes de su destilación (Véase **Figura 27**). Los compuestos mayoritarios cuantificados en los extractos SE y MSPD, de material vegetal antes y después de la destilación fueron la artemetina (8.0-16.0 mg/g extracto), la hidroxi-artemetina (5.0-10.0 mg/g extracto) y el ácido rosmarínico (4.0-32.0 mg/g extracto). Es interesante discutir que en el extracto hidroetanólico, a partir de la biomasa residual, aumentaron las concentraciones del ácido rosmarínico (14.3 mg/g de extracto), los flavonoles *O*-metoxilados artemetina (15.0 mg/g de extracto) y la hidroxi-artemetina (9.0 mg/g de extracto). Se cree que las altas temperaturas en los procesos de destilación, conducen a la hidrólisis de estos compuestos, o generan procesos de transformación que aumentan su concentración en los extractos hidroetanólicos.

La especie *V. curassavica* es una planta aromática que puede ser aprovechada integralmente no solo por la composición química de su AE de tipo sesquiterpenoide. A partir de la biomasa residual, producto de su destilación, es posible obtener e identificar compuestos con propiedades bioactivas que son de interés para los sectores cosmético y farmacéutico. En el estudio de la biomasa residual de *V. curassavica*, la aplicación de métodos extractivos para obtener

metabolitos secundarios bioactivos, y el uso de instrumentación analítica de alta resolución, permitió reportar por primera vez el rendimiento y la composición química de extractos MSPD, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación; los espectros de masas y los iones-producto de la artemetina, la hidroxí-artemetina por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS en modo de monitoreo de iones seleccionados (SIM). Se espera que los resultados de esta investigación incentiven el desarrollo de nuevas tecnologías para el aprovechamiento sostenible de plantas aromáticas medicinales, a escala industrial, y optimicen el uso de la tierra con cultivos promisorios en Colombia.

6. Conclusiones

Se identificaron 52 compuestos en el AE de partes aéreas de *V. curassavica*, se destacan, el α -pineno (180 x103 mg/kg AE), el (*E*)- β -cariofileno (99 x103 mg/kg AE) y el α -humuleno (15 x103 mg/kg AE). Estos dos últimos, se consideran los marcadores químicos del AE, por sus propiedades antiinflamatorias.

Se determinó el perfil de saturación para las diferentes familias de compuestos presentes en las fracciones volátiles, en función del tiempo. El tiempo de equilibrio fibra-muestra, donde se alcanzó el máx. de adsorción, para todas las familias de compuestos presentes en la fracción volátil fue de 30 min. Se encontró que la fragancia de las hojas y las flores está dada principalmente por el α -pineno (24.0-10.8%) y el (*E*)- β -cariofileno (23.0-31.2%), respectivamente. Estos resultados son coherentes comparados con los encontrados en el AE.

Los extractos SE y MSPD obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación mostraron principalmente ácido rosmarínico (4.40-32.0 mg/g extracto), artemetina (8.0-16.0 mg/g extracto) e hidroxi-artemetina (5.00-10.0 mg/g extracto), respectivamente. Los procesos de destilación favorecieron el aumento de la concentración en el extracto SE, del ácido rosmarínico (14.3 mg/g de extracto), y de los flavonoles *O*-metoxilados artemetina (15.0 mg/g de extracto) e hidroxi-artemetina (9.0 mg/g de extracto).

7. Divulgación de resultados en eventos científicos

Los resultados de este proyecto de grado se presentaron en cuatro eventos internacionales en modalidad póster, un congreso nacional y uno internacional en modalidad oral.

16ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Tipo de evento: Congreso. Ámbito: Internacional. Realizado del 19/05/2021 al 21/05/2021 en Zacatecas, México.

- Póster: Análisis por HS-SPME de la composición química de las fragancias de hojas de *Varronia curassavica* Jacq y *Satureja viminea* L. Laisha Burgos Díaz, Diana Manrique López, Jairo René Martínez, Dora Gutiérrez Avella y Elena E. Stashenko.

ExTech XXIII: 23rd *International Symposium on Advances in Extraction Technologies*. Tipo de evento: Simposio. Ámbito: Internacional. Realizado del 30/06/2021 al 02/07/2021 en Alicante, España.

- Póster: *Extraction of volatile secondary metabolites by different methods from Varronia curassavica Jacq. and their GC/FID and GC/MS analysis*. Laisha Burgos Díaz, Jairo René Martínez y Elena E. Stashenko.

CLAQ 2020: 34º Congreso Latinoamericano de Química. Tipo de evento: Congreso. Ámbito: Nacional. Realizado del 11/09/2021 al 15/09/2021 en Cartagena, Colombia.

- Ponencia oral: Análisis de la composición química por GC/FID y GC/MS del aceite esencial de *Varronia curassavica* Jacq., cultivada en Colombia. Laisha Burgos Díaz, Jairo René Martínez y Elena E. Stashenko.

ISEO 2021: *International Symposium of Essential Oil*. Tipo de evento: Simposio. Ámbito: Internacional. Realizado del 12/11/2021 al 14/11/2021 en Ankara, Turquía.

- Póster: *HS-SPME-GC/MS analysis of volatile secondary metabolites of Varronia curassavica Jacq. and Satureja viminea L. leaves*. Laisha Burgos Díaz, Diana Manrique López, Jairo René Martínez, Dora Gutiérrez Avella y Elena E. Stashenko.

8. Recomendaciones

Se recomienda realizar ensayos de actividad biológica, *i.e.*, antioxidante, citotóxica, antitumoral, antiviral, entre otras; del aceite esencial y los extractos de *V. curassavica*, para ampliar el alcance del estudio realizado, y explorar sus posibles aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, y de sabores y fragancias.

Se sugiere monitorear *in-vivo* por HS-SPME la fracción volátil de hojas y flores de *V. curassavica*, y comparar los resultados con los obtenidos en este estudio por HS-SPME *ex vivo*.

Se recomienda emplear otras técnicas de análisis instrumental, *e.g.*, resonancia magnética nuclear (RMN), que complementen la información encontrada por cromatografía líquida, para separar, detectar, cuantificar o identificar inequívocamente los analitos presentes en los extractos de *V. curassavica*.

Referencias Bibliográficas

- Adams, R. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (Cuarta edición). Allured Publishing Corporation.
- Alonso, A., Fernández-Torroba, M., Tena, M., & Pons, B. (2003). Development and validation of a solid-phase microextraction method for the analysis of volatile organic compounds in groundwater samples. *Chromatographia*, 57(5–6), 369–378.
- Andersen, O., & Markham, K. (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications* (Primera edición). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420039443>
- Arias, J., Mejía, J., Córdoba, Y., Martínez, J., Stashenko, E., & del Valle, J. (2020). Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO₂ after steam distillation. *Industrial Crops and Products*, 146, 112170.
- Arthur, C., & Pawliszyn, J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145–2148.
- Babushok, V., Linstrom, P., & Zenkevich, I. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4).
- Bandoni, A. (2000). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. (Primera edición). Universidad Nacional de La Plata.
- Barker, S. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.06.005>
- Barker, S., Long, A., & Short, C. (1989). Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography*, 475, 353–361.
- Barriga, H. (1992). *Flora medicinal de Colombia: botánica médica. Tomo III*. (Primera edición). Tercer Mundo.

- Bayeux, M., Fernandes, A., Foglio, M., & Carvalho, J. (2002). Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. *Braz J Med Biol Res*, 35(10), 1229–1232.
- Bergman, M., Davis, B., & Phillips, M. (2019). Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Molecules*, 24(21), 3961.
- Bhat, S., Nagasampagi, B., & Sivakumar, M. (2005). *Chemistry of Natural Products*. (Primera Edición, Vol. 6). Springer.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J. F., & Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385–394.
- Braun, N., Butaud, J., Bianchini, J., Kohlenberg, B., Hammerschmidt, F., Meier, M., & Raharivelomanana, P. (2007). Eastern polynesian sandalwood oil (*Santalum insulare* Bertero ex A. DC.) – a detailed investigation. *Natural Product Communications*, 2(6), 695–699.
- Brown, H., & Veeraraghavan Ramachandran, P. (1995). Versatile α -pinene-based borane reagents for asymmetric syntheses. *Journal of Organometallic Chemistry*, 500(1–2), 1–19.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., & Velić, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236–242.
- Castellanos, F., Villamil, A., & Ortíz, C. (2007). Biotransformación de α -pineno empleando *Aspergillus niger*. *Scientia et Technica*, 13(33), 71–74.
- Croteau, R., Kutchan, T., & Lewis, N. (2000). Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Primera edición, 1250–1319). American Society of Plant Physiologists.
- de Carvalho, P., Rodrigues, R., Sawaya, A., Marques, M., & Shimizu, M. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2–3), 297–301.

- Degenhardt, J., Köllner, T., & Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70(15–16), 1621–1637.
- Dewick, P. (2002). *Medicinal natural products : a biosynthetic approach* (Segunda edición). Wiley.
- El-Sayed, N., Aboutabl, S., Moharram, F., Allim, M., & Mabry, T. (1998). Phenolics and flavonoids of *Cordia macleodii*. *Revista Latinoamericana de Química*, 26, 30–35.
- Estrada, J. (1994). *Revisión taxonómica del género Cordia L. subgénero Varronia (P. Browne) Cham. (Boraginaceae) en Colombia*. 99-104. [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid].
- Facanali, R., Marques, M., & Hantao, L. (2020). Metabolic profiling of *Varronia curassavica* Jacq. terpenoids by flow modulated two-dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Separations*, 7(1), 18.
- Falcone-Ferreira, M., Rius, S., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, 1–10.
- Fenn, J., Mann, M., Meng, C., Wong, S., & Whitehouse, C. (1989). Electrospray Ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926), 64–71.
- Fernandes, E., Passos, G., Medeiros, R., da Cunha, F., Ferreira, J., Campos, M., Pianowski, L., & Calixto, J. (2007). Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)(E)-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, 569(3), 228–236.
- Ferreira, O., & Pinho, S. (2012). Solubility of flavonoids in pure solvents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(18), 6586–6590.
- Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., & Scheffer, J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213–226.
- FoodB. (2019). *Food constituents, chemistry and biology database*. Compound Kaempferol 3-galactoside (FDB002824). [Www.Foodb.ca](http://www.Foodb.ca).

- FoodB. (2020a). *Food constituents, chemistry and biology database*. Wwww.Foodb.Ca .
- FoodB. (2020b). *Food constituents, chemistry and biology database*. Compound Eriodictyol 7-glucoside (FDB000689). Wwww.Foodb.Ca .
- Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 408–414.
- Gilbert, B., & Favoreto, R. (2012). *Cordia verbenacea* DC Boraginaceae. *Fitos*, 7, 17–25.
- Goldstein, J., & Brown, M. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343(6257), 425–430.
- Golmakani, M., & Rezaei, K. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*, 109(4), 925–930.
- Gomez, N., Witte, L., & Hartmann, T. (1999). Chemical defense in larval tortoise beetles: essential oil composition of fecal shields of *Eurypedus nigrosignata* and foliage of its host plant, *Cordia curassavica*. *Journal of Chemical Ecology*, 25(5).
- Gross, J. H. (2011). Mass spectrometry: A textbook: Second edition. In *Mass Spectrometry: A Textbook: Second Edition*. Springer Berlin Heidelberg.
- Gupta, M. (1995). *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Convenio Andrés Bello (Primera edición). Presencia Ltda, Bogotá.
- Gupta, V., Tuohy, M., O'Donovan, A., & Lohani, M. (2015). *Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications* (Primera edición). Wiley Blackwell.
- Havsteen, B. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2–3), 67–202.
- Hernandez, T., Canales, M., Teran, B., Avila, O., Duran, A., Garcia, A., Hernandez, H., Angeles-Lopez, O., Fernandez-Araiza, M., & Avila, G. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 137–141.

- Héthelyi, É., Szarka, S., Lemberkovics, É., & Szőke, É. (2010). SPME-GC/MS identification of aroma compounds in rose flowers. *Acta Agronomica Hungarica*, 58(3), 283–287.
- Holstein, S., & Hohl, R. (2004). Isoprenoids: Remarkable diversity of form and function. *Lipids*, 39(4), 293–309.
- Hoyos, J., Alves, E., Rozwalka, L., Souza, E., & Zeviani, W. (2012). Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. *Ciência e Agrotecnologia*, 36(3), 270–284.
- Ioannou, I., Kriznik, A., Chekir, L., & Ghoul, M. (2019). Effect of the processing temperature on the degradation of food flavonoids: Kinetic and calorimetric studies on model solutions. *Journal of Food Engineering and Technology*, 8(2), 91–102.
- Ioset, J., Marston, A., Gupta, M., & Hostettmann, K. (2000). Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. *Phytochemistry*, 53, 613–617.
- Knudsen, J., Tollsten, L., & Gunnar-Bergstrom, L. (1993). Floral scents: a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*, 33(2), 253–280.
- Kuroyanagui, M., Seki, T., Hayashi, T., Nagashima, Y., Kawahara, N., Sekita, S., & Satake, M. (2001). Anti-androgenic triterpenoids from the brazilian medicinal plant, *Cordia multispicata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49(8), 954–957.
- LaCourse, W. (2002). Column liquid chromatography: Equipment and instrumentation. In *Analytical Chemistry* (74, 12, pp. 2813–2831).
- Lazarević, J., Radulović, N., Palić, R., & Zlatković, B. (2010). Chemical analysis of volatile constituents of *Berula erecta* (Hudson) *coville subsp. erecta* (Apiaceae) from serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(2), 153–156.
- Lichtenthaler, H., Rohmer, M., & Schwender, J. (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 101(3), 643–652.
- Linstrom, P., & Mallard, W. (2017). *NIST Database Chemistry Webbook*. <https://Webbook.Nist.Gov/Chemistry>.

- Mata-Bilbao, M., Andrés-Lacueva, C., Jáuregui, O., & Lamuela-Raventós, R. (2007). Determination of flavonoids in a citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS. *Food Chemistry*, 101(4), 1742–1747.
- Matias, E., Alves, E., Santos, B., Sobral De Souza, C., Alencar Ferreira, J., Santos De Lavor, A., Figueredo, F., Ferreira De Lima, L., Vieira Dos Santos, F., Neves Peixoto, F., Viana Colares, A., Augusti Boligon, A., Saraiva, R., Athayde, M., da Rocha, J., Alencar Menezes, I., Douglas Melo, H., & da Costa, J. (2013a). Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbenacea* DC. as tool to validate the ethnobiological usage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- McLafferty, F., Stauffer, D., Stenhagen, E., & Heller, S. (2008). *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*. John Wiley & Sons.
- Medeiros, R., Passos, G., Vitor, C., Koepp, J., Mazzuco, T., Pianowski, L., Campos, M., & Calixto, J. (2007). Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology*, 151(5), 618–627.
- Merétika, A., Peroni, N., & Hanazaki, N. (2010). Local knowledge of medicinal plants in three artisanal fishing communities (Itapoá, Southern Brazil), according to gender, age, and urbanization. *Acta Botanica Brasilica*, 24(2), 386–394.
- Michielin, E., Salvador, A., Riehl, C., Smânia, A., Smânia, E., & Ferreira, S. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. *Bioresource Technology*, 100(24), 6615–6623.
- Miller, J. (1991). Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review. *The Analyst*, 116(1), 3–14.
- Miller, J. S. (2013). New Boraginales from tropical America 8: Nomenclatural notes on *Varronia* (Cordiaceae: Boraginales). *Brittonia*, 65(3), 342–344.
- Mitra, S. (2003). *Sample preparation techniques in analytical chemistry* (Primera edición). Wiley.
- Moco, S., Vervoort, J., Moco, S., Bino, R., de Vos, R., & Bino, R. (2007). Metabolomics technologies and metabolite identification. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(9), 855–866.

- Munos, J., Pu, X., Mansoorabadi, S., Kim, H., & Liu, H. (2009). A secondary kinetic isotope effect study of the 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase-catalyzed reaction: evidence for a retroaldol-aldol rearrangement. *Journal of the American Chemical Society*, 131(6), 2048–2049.
- Nascimento, R., Alves, M., Pinto, T., de Souza Menezes, R., Damasceno Junior, P., Chaves, D. S., & de Souza, M. (2020). Hydrodistillation extraction kinetics of volatile oils from *Varronia curassavica* and *Laurus nobilis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30(4), 503–509.
- Nizio, D., Fitzgerald, A., Sampaio, T., Brito, A., Andrade, T., de Fátima, M., & Maria, A. (2009). Distillation methods affect the chemical composition of *Varronia curassavica* Jacq. essential oil? *Bioscience Journal*, 3, 629–639.
- Nizio, D., Blank, A., Brito, F., Gagliardi, P., Alves, E., & Arrigoni-Blank, M. (2020). A comparative study of the antifungal activity of essential oils of *Varronia curassavica* Jacq. Obtained by different distillation methods. *Bioscience Journal*, 36(6), 1951–1960.
- Nizio, D., Brito, F., Sampaio, T., Melo, J., Silva, F., Gagliardi, P., Arrigoni-Blank, M., Anjos, C., Alves, P., Wisniewski Junior, A., & Blank, A. (2015). Chemical diversity of native populations of *Varronia curassavica* Jacq. and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. *Industrial Crops and Products*, 76, 437–448.
- Nizio, D., Fujimoto, R., Maria, A., Carneiro, P., França, C., da Costa, N., de Andrade, F., Sampaio, T., de Fátima, M., & Blank, A. (2018). Essential oils of *Varronia curassavica* accessions have different activity against white spot disease in freshwater fish. *Parasitology Research*, 117(1), 97–105.
- Pagano, I., Sánchez-Camargo, A., Mendiola, J., Campone, L., Cifuentes, A., Rastrelli, L., & Ibañez, E. (2018). Selective extraction of high-value phenolic compounds from distillation wastewater of basil (*Ocimum basilicum* L.) by pressurized liquid extraction. *Electrophoresis*, 39(15), 1884–1891.
- Paoli, M., Nam, A., Castola, V., Casanova, J., & Bighelli, A. (2011). Chemical variability of the wood essential oil of *Cedrus atlantica* Manetti from Corsica. *Chemistry & Biodiversity*, 8(2), 344–351.
- Pérez, E. (1956). *Plantas útiles Colombia* (Primera edición). Imprenta Nacional. Bogotá

- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., & Vianello, A. (2013). Plant flavonoids: Biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14950–14973.
- Pianowski, L., Batista, J., & de Castro, D. (2018). *Processo de obtenção de óleo essencial partir da Cordia curassavica* (Patent No. PI 0203067-5 B1). Aché Laboratorios Farmacéuticos S.A.
- Pichersky, E., & Dudareva, N. (2006). *Biology of plant volatiles* (Taylor & Francis Group, Ed.; Primera edición). CRC Press.
- Pico-Hernández, S., Murillo-Méndez, C., & López-Giraldo, L. (2020). Extraction, separation, and evaluation of antioxidant effect of the different fractions of polyphenols from cocoa beans. *Revista Colombiana de Química*, 49(3), 19–27.
- Pimentel, S., Barrella, G., Casarin, R., Cirano, F., Casati, M., Foglio, M., Figueira, G., & Ribeiro, F. (2012). Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 224–234.
- Prada, F., Stashenko, E., & Martínez, J. (2020). LC/MS study of the diversity and distribution of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* species growing in Colombia. *Journal of Separation Science*, 43(23), 4322–4337.
- Queiroz, T., Mendes, A., Silva, J., Fonseca, F., & Martins, E. (2016). Teor e composição química do óleo essencial de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) em função dos horários de coleta. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18(1), 356–362.
- Rhodes, M. (1994). Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology*, 24(1), 1–20.
- Rosa, A., Isola, R., Pollastro, F., & Nieddu, M. (2022). Effect of the natural polymethoxylated flavone artemetin on lipid oxidation and its impact on cancer cell viability and lipids. *Fitoterapia*, 156, 105102.
- Rubinson, K., & Robinson, J. (2000). *Análisis instrumental* (Primera edición). Pearson Education.
- Saha, S., Singh, J., Paul, A., Sarkar, R., Khan, Z., & Banerjee, K. (2020). Anthocyanin profiling using UV-Vis spectroscopy and liquid chromatography mass spectrometry. *AOAC International*, 103(1), 23–39.

- Santana-Méridas, O., Polissiou, M., Izquierdo-Melero, M., Astraka, K., Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., & Sánchez-Vioque, R. (2014). Polyphenol composition, antioxidant and bioplaguicide activities of the solid residue from hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 59, 125–134.
- Santos, A., Antunes, A., Bizzo, H., Aguiar I, R., & Sato, A. (2013). In vitro propagation, histochemistry, and analysis of essential oil from conventionally propagated and in vitro-propagated plants of *Varronia curassavica* Jacq. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 49(4), 405–413.
- Santos, R., Nunes, E., Nascimento, R., Gilvandete, C., Santiago, M., Henrique, G., Menezes, A., Silveira, E., Deusdênia, O., & Pessoa, L. (2006). chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. *Jorunal of Brazilian Chemical Society*, 17(5), 1027–1030.
- Sciarrone, D., Giuffrida, D., Rotondo, A., Micalizzi, G., Zoccali, M., Pantò, S., Donato, P., Rodrigues-das-Dores, R., & Mondello, L. (2017). Quali-quantitative characterization of the volatile constituents in *Cordia verbenacea* D.C. essential oil exploiting advanced chromatographic approaches and nuclear magnetic resonance analysis. *Journal of Chromatography A*, 1524, 246–253.
- Sertié, J., Basile, A., Panizza, S., Matida, A., & Zelnik, R. (1988). *Pharmacological assay of Cordia verbenacea; Part 1. Anti-Inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves.*
- Sertié, J., Basile, A., Panizza, S., Oshiro, T., Azzolini, C., & Penna, S. (1991). Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: Oral and topical antiinflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 31(2), 239–247.
- Shimoda, M., Shigematsu, H., Shiratsuchi, H., & Osajima, Y. (1995). Comparison of the odor concentrates by SDE and adsorptive column method from green tea infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(6), 1616–1620.
- Shrivastava, A., & Gupta, V. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21–25.

- Silva, A., Souza, P., Machado, J., Silva, B., & Pinto, J. (2012). Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum*-infected soybean seeds. *Tropical Plant Pathology*, 37(5), 305–313.
- Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S., & Mora Lugo, E. de la. (2015). *Fundamentos de química analítica* (Novena edición). Cengage Learning.
- Stashenko, E., Combariza, Y., & Puertas, M. (1998). *Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis*. Publicaciones UIS, Universidad Industrial de Santander.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2007). Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 235–242.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2008). Sampling flower scent for chromatographic analysis. In *Journal of Separation Science*. 31(11), 2022–2031.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2010). GC y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica*, 2, 23–46.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2011). Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*, 3, 25–48.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2012). *Plantas aromáticas y aceites esenciales: estudio y aplicaciones*. Publicaciones UIS, Universidad Industrial de Santander.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2013). Análisis de fragancias florales por GC-MS. *Scientia Chromatographica*, 5(1), 1–19.
- Stashenko, E., Martínez, J., Cárdenas-Vargas, S., Saavedra-Barrera, R., & Durán, D. (2013). GC-MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques. *Journal of Separation Science*, 36(17), 2901–2914.
- Stashenko, E., Martínez, J., Ruíz, C., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93–103.

- Taiz, L., & Zeiger, E. (2003). Plant physiology. In *Annals of Botany* (Tercera edición, Vol. 91, Issue 6). Oxford University Press (OUP).
- Takaku, S., Haber, W., & Setzer, W. (2007). Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(8), 525–532.
- Thirupathi, K., Sathesh, S., Raju, V., Ravikumar, B., Krishna, D., & Mohan, G. (2008). A review of medicinal plants of the genus *Cordia*: Their chemistry and pharmacological uses. *Journal of Natural Remedies*, 8, 1–10.
- Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, Ur., & Schnitzler, J. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant Journal*, 45(4), 540–560.
- Ticli, F., Hage, L., Cambraia, R., Pereira, P., Magro, Â., Fontes, M., Stábeli, R., Giglio, J., França, S., Soares, A., & Sampaio, S. (2005). Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicology*, 46(3), 318–327.
- Tonial, C., Rodrigues, M., Bosse, M., Sousa, I., de Lima, J., Cunha, M., Foglio, M., Marques, M., & Marchese, J. (2020). Technical and economic evaluation of cultivation and obtaining of *Varronia curassavica* Jacq. essential oil. *Industrial Crops and Products*, 154.
- Trópicos. (2022). *Trópicos.org*. <https://Www.Tropicos.Org/Home>.
- Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., & Oreopoulou, V. (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 12(3), 593–606.
- van Acker, S., van den Berg, D., Tromp, M., Griffioen, D., van Bennekom, W., van der Vijgh, W., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331–342.
- van den Dool, H., & Dec. Kratz, P. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463–471.
- Velde, V., Lavie, D., Zelnik', R., & Matida, A. (1982). Cordialin A and B, Two New Triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. *Journal of the Chemical Society*, 2697–2700.

- Velde, V., Lavie, D., Zelnik, R., Matida, A., & Panizza, S. (1982). Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. *Journal of the Chemical Society*, 1, 2697–2700.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2008a). Chemical properties of phenolic compounds. In *Phenolic compound biochemistry* (Primera edición, pp. 35–62). Springer.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2008b). Families of phenolic compounds and means of classification. In *Phenolic compound biochemistry* (Primera edición, pp. 1–34). Springer.
- Wang, H., Zhang, W., Dong, J., Wu, H., Wang, Y., & Xiao, H. (2021). Optimization of SPME–GC–MS and characterization of floral scents from *Aquilegia japonica* and *A. amurensis* flowers. *BMC Chemistry*, 15(1), 26–40.
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis: A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126(2), 485–493.
- Xiao, H., Krucker, M., Albert, K., & Liang, X. (2004). Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1032(1–2), 117–124.
- Zotti-Sperotto, N., Melo, E., de Souza, M., Fonseca, M., Gonzaga, D., de Ávila, M., Demuner, A., Ventrella, M., & Lelis, A. (2020). Effect of drying with ultrasonic pretreatment on the yield and quality of the essential oil of *Varronia curassavica* Jacq. and *Ocimum gratissimum* Linn. *Industrial Crops and Products*, 147, 1–8.

Anexos

Anexo 1. Curvas de calibración, obtenidas por GC/FID, para las sustancias patrón: **A.** α -pineno; **B.** sabineno; **C.** β -mirceno; **D.** linalol; **E.** (*E*)- β -cariofileno; **F.** α -humuleno y **G.** óxido de cariofileno.

