

**AISLAMIENTO POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS DE FLORES DE *Petrea volubilis* L.
(Fam. Verbenaceae) Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE *in-vitro***

Leyde Katerine Gualteros Montaña

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Bucaramanga
2017**

**AISLAMIENTO POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS DE FLORES DE *Petrea volubilis* L.
(Fam. Verbenaceae) Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE *in-vitro***

Leyde Katerine Gualteros Montaña

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Química

Directora:

Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.

Co-directores:

Jairo R. Martínez, Químico, Ph.D.

Lady J. Sierra, Química.

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Bucaramanga
2017**

DEDICATORIA

Mamá con todo mi amor esto es para ti.

Con sabiduría y dulzura lograste que esto fuera posible.

Te amo vida de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme existir en este espacio, tiempo y enviarme ángeles en forma de amigos.

A mis amados padres Angelmira y Herneley por su dedicación, esfuerzo y apoyo. Por enseñarnos a mi hermano y a mí que el amor todo lo puede.

A mi amado hermano Carlos, por enseñarme que los sentimientos trascienden las palabras, es mi luz y alegría.

A la profesora Elena Stashenko y el profesor Jairo René Martínez, por darme la oportunidad de trabajar en el centro de investigación CENIVAM y por las enseñanzas que no se olvidarán.

A todo el equipo de trabajo de los grupos de investigación CENIVAM, CIBIMOL y CROMMASS, por su colaboración y contribución al desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Industrial de Santander.

A COLCIENCIAS, Francisco José de Caldas (RC-0572-2012).

A Tía Chela, Jorge, María Angélica, María Stephanie y Jorge Andrés por inspirarme a ser cada día mejor.

A mis amados abuelos, Humberto y Mariela, por ser fuente de sabiduría y respeto, por amarme y tenerme siempre en sus oraciones.

A Rex, por acompañarme en las largas jornadas de estudio, por el cariño y dulzura que me brinda cada día.

A Don Mario, que ahora forma parte del finamento. Gracias por todo el apoyo que me brindó, agradezco por sus enseñanzas que aún están presentes.

A los grandes amigos, compañeros y profesores que estuvieron presentes en cada etapa de este proceso de formación, para ustedes mil gracias.

A Jazne y Andrea, niñas las quiero muchísimo, gracias por mostrarme que la amistad viene en muchas formas de expresión.

A Geraldine, Lady, Miguel, Gerardo, Cristán, Erika y Liliana, mil gracias por todo.

A Roger, por ser un modelo de hombre, por apoyarme, ser amor, paz y tranquilidad en todo momento, por ser un hermano en mi vida.

A Jesica por su amor, una amiga maravillosa en todo su esplendor, con ella todo ha sido mágico, entró en mi corazón y se quedó a vivir en él.

A Fausto, por ser el mejor consejero de todos, gracias por su cariño e incondicionalidad.

A Karol, solo puedo decirle que desde que la vi, sentí que nuestros caminos siempre iban a estar cerca, ha sido una luz en los momentos de oscuridad, la risa en los momentos de tristeza, su amistad es incomparable. Amiga de mi alma vendrán momentos inigualables.

A todos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|---|-------------|
| INTRODUCCIÓN | 20 |
| 1. MARCO REFERENCIAL | 22 |
| 1.1 Marco de antecedentes | 22 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 26 |
| 2.1 Generalidades | 26 |
| 2.1.1 Familia Verbenaceae | 26 |
| 2.1.1.1 Género <i>Petrea</i> | 26 |
| 2.1.1.2 <i>Petrea volubilis</i> L. | 26 |
| 2.1.1.2.1 Flor de <i>Petrea volubilis</i> L. | 27 |
| 2.1.1.2.2 Identificación taxonómica | 28 |
| 2.2 Tratamiento y recolección de flores | 28 |
| 2.3 Liofilización | 29 |
| 2.4 Microextracción en fase sólida | 29 |
| 2.5 Metabolitos secundarios vegetales | 30 |
| 2.5.1 Polifenoles | 31 |
| 2.5.1.1 Flavonoides | 32 |
| 2.5.1.2 Antocianinas | 34 |
| 2.6 Obtención de extractos | 34 |
| 2.6.1 Extracción con fluido supercrítico | 35 |
| 2.6.2 Dispersión de la matriz en fase sólida | 36 |
| 2.6.3 Extracción con solvente | 36 |
| 2.7 Antocianinas monoméricas totales | 37 |
| 2.8 Capacidad antioxidante | 38 |
| 2.8.1 Capacidad de absorción de radicales de oxígeno | 39 |
| 2.8.2 Medición de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu | 39 |
| 2.8.3 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS+• | 39 |
| 2.9 Caracterización química | 40 |
| 2.9.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas | 40 |
| 2.9.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas | 41 |
| 3. METODOLOGÍA | 42 |
| 3.1 Materiales, reactivos y equipos utilizados | 42 |
| 3.1.1 Reactivos | 42 |
| 3.1.2 Material | 43 |
| 3.1.3 Equipos menores | 43 |
| 3.2 Recolección del material vegetal | 43 |
| 3.3 Identificación taxonómica del material vegetal | 43 |
| 3.4 Liofilización de flores de <i>Petrea volubilis</i> L. | 44 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.5 | Determinación de la fracción volátil de flores de <i>Petrea volubilis</i> L. | 44 |
| 3.5.1 | Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza | 44 |
| 3.6 | Obtención de extractos | 45 |
| 3.6.1 | Extracción con fluido supercrítico | 45 |
| 3.6.2 | Dispersión de la matriz en fase sólida | 45 |
| 3.6.3 | Extracción con solvente | 46 |
| 3.7 | Antocianinas monoméricas totales | 47 |
| 3.8 | Capacidad antioxidante | 48 |
| 3.8.1 | Capacidad de absorción de radicales de oxígeno | 48 |
| 3.8.2 | Medición de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu | 49 |
| 3.8.3 | Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS+• | 49 |
| 3.9 | Caracterización de metabolitos y técnicas instrumentales | 50 |
| 3.9.1 | Condiciones de operación cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas | 50 |
| 3.9.2 | Condiciones de operación de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas | 51 |
| 4. | ANÁLISIS DE RESULTADOS | 53 |
| 4.1 | Identificación taxonómica de <i>P. volubilis</i> L. | 53 |
| 4.2 | Identificación de metabolitos volátiles de flores de <i>Petrea volubilis</i> L. | 53 |
| 4.2.1 | Extracción por HS-SPME de la fracción volátil de flores de <i>P. volubilis</i> L. con fibras de SPME con diferentes recubrimientos poliméricos | 53 |
| 4.2.2 | Extracción por HS-SPME (CAR/PDMS) de la fracción volátil de flores de <i>P. volubilis</i> L., a diferentes horas del día | 57 |
| 4.3 | Análisis por UV-vis del contenido de antocianinas monoméricas totales presentes en extractos obtenidos por SE | 65 |
| 4.4 | Identificación de metabolitos secundarios en flores de <i>P. volubilis</i> L., aislados por SFE y su caracterización por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas | 69 |
| 4.4.1 | Rendimiento de extracción por SFE de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 69 |
| 4.4.2 | Caracterización de metabolitos secundarios extraídos por SFE de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 69 |
| 4.5 | Análisis por LC-MS-ESI (+)-TOF de metabolitos secundarios aislados por MSPD, SFE y SE de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 71 |
| 4.5.1 | Análisis por LC-MS del extracto obtenido por MSPD de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 71 |
| 4.5.2 | Análisis por LC-MS del extracto obtenido por SFE de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 73 |
| 4.5.3 | Análisis por LC-MS del extracto obtenido por SE de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 74 |
| 4.6 | Resultados de Actividad antioxidante y el contenido total de fenoles en extractos de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 77 |
| 5. | CONCLUSIONES | 79 |
| 6. | RECOMENDACIONES | 80 |
| 7. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 81 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 94 |
| | ANEXOS | 107 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Número de publicaciones por año sobre <i>P. volubilis</i> L. Fecha de consulta: 11 de enero de 2017. Fuente: <i>Scopus (Elsevier)</i> . Período de observación: (1968-2017). Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("Petrea") AND TITLE-ABS-KEY ("volubilis"). | 22 |
| Figura 2. Resultados de búsqueda, que relaciona el número de publicaciones sobre <i>P. volubilis</i> L., según país el de investigación. Fecha de consulta: 11 de enero de 2017. Fuente: <i>Scopus (Elsevier)</i> . Período de observación: 1968-2017. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("Petrea"). | 23 |
| Figura 3. Compuestos aislados de extractos hidro-alcohólicos de hojas y tallos de <i>P. volubilis</i> L. [10]. | 25 |
| Figura 4. Descripción de una inflorescencia de <i>P. volubilis</i> L. [5,20] | 27 |
| Figura 5. Flores de <i>P. volubilis</i> L., fotografía tomada por la autora el 1 de noviembre de 2015, en CENIVAM, Bucaramanga-Colombia. | 28 |
| Figura 6. Ejemplos de compuestos fenólicos encontrados en plantas. Tomado de: R. Ross (2014), <i>Polyphenols in Plants Isolation, Purification and Extract Preparation</i> [43]. | 31 |
| Figura 7. Estructura básica de algunos flavonoides. | 32 |
| Figura 8. Estructura de algunas antocianidinas. Tomado de: Aqil <i>et al.</i> (2014) [54]. | 34 |
| Figura 9. Influencia del pH en la estabilidad y el color de las antocianinas. | 37 |
| Figura 10. Espectro UV–Visible de antocianinas en soluciones <i>buffer</i> a pH 1.0 y 4.5 [67]. | 37 |
| Figura 11. Procedimiento de extracción por HS-SPME [100]. A. Perforación del <i>septum</i> ; B. Exposición de la fibra al espacio de cabeza; C. Retracción de la fibra del vial; D. Perforación del <i>septum</i> del puerto de inyección del cromatógrafo de gases; E. Desorción de la fibra dentro del puerto de inyección; F. Retiro de la fibra del puerto de inyección. | 44 |
| Figura 12. Esquema para la extracción en MSPD: A. Muestra, soporte sólido y agente dispersante. B. Transferencia de la muestra | 46 |

homogeneizada a la columna. C. Compresión de la muestra en la columna. D. Elución de analitos. Tomado, con modificaciones, de Xiao *et al.* (2004) [63].

Figura 13. Cromatógrafo de gases GC *Agilent Technologies 7890 Series* (AT, Palo Alto, California, EE.UU. Fotografía tomada por autora el 1 de agosto de 2016. Lugar, CROMMASS-UIS, Bucaramanga, Colombia. 51

Figura 14. Cromatógrafo líquido, HPLC *1200 Series* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.). Lugar: Laboratorio CROMMASS, CENIVAM, Bucaramanga, Colombia. 52

Figura 15. Perfil cromatográfico de la fracción volátil aislada por HS-SPME de flores de *P. volubilis* L., utilizando fibras con diferentes recubrimientos poliméricos (PDMS; PDMS/DVB; CAR/PDMS). Columna DB-WAX (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.), de 60 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 μ m, d_f , detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*. 56

Figura 16. Selección del recubrimiento polimérico de la fibra de SPME: $\Sigma A_{total}/A_{std}$, aislamiento por HS-SPME, de flores de *P. volubilis* L. 57

Figura 17. Perfiles cromatográficos de volátiles de flores de *P. volubilis* L., aislados por HS-SPME, utilizando fibra de CAR/PDMS; monitoreos 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m. 58

Figura 18. Relación $\Sigma A_{total}/A_{std}$, de la fracción volátil aislada por HS-SPME, de flores de *P. volubilis* L., a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m. 61

Figura 19. Relación $\Sigma A_{total}/A_{std}$, según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de flores de *P. volubilis* L. 61

Figura 20. Perfil cromatográfico de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR/PDMS) de flores de *P. volubilis* L., monitoreadas a las 6:00 a.m. Columna DB-WAX de 60 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 μ m, d_f , detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*. 63

Figura 21. Relación $\Sigma A_{total}/A_{std}$, compuestos mayoritarios presentes en las fracciones volátiles de flores de *P. volubilis* L., monitoreadas *in-vitro* por HS-SPME a diferentes horas del día. 64

Figura 22. Gráfica de Pareto para la extracción de antocianinas monoméricas de flores de *P. volubilis* L. 67

Figura 23. Gráfica de superficie de respuesta estimada para la relación EtOH:H₂O y HCl (%), en el nivel inferior de temperatura 30 °C. 68

| | |
|---|----|
| Figura 24. Superficie de respuesta estimada para la relación EtOH:H ₂ O y HCl (%) en el nivel superior de temperatura, 50 °C. | 68 |
| Figura 25. Resultados del diseño experimental 2 ³ y coordenadas experimentales. | 68 |
| Figura 26. Perfil cromatográfico por GC-MS del extracto de flores de <i>P. volubilis</i> L., obtenido con CO ₂ supercrítico. | 70 |
| Figura 27. Perfil cromatográfico por LC-ESI(+)-TOF-MS del extracto obtenido por SE de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 72 |
| Figura 28. Perfil cromatográfico por LC-ESI(+)-TOF-MS del extracto obtenido por SFE de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 73 |
| Figura 29. Perfil cromatográfico por LC-ESI(+)-TOF-MS del extracto obtenido por MSPD de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 75 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Ejemplos de flavonas, flavanoles, flavanonas e isoflavonoles. | 33 |
| Tabla 2. Condiciones del proceso de extracción de flavonoides por SFE. | 45 |
| Tabla 3. Variables y condiciones de extracción estudiadas en el diseño experimental. | 46 |
| Tabla 4. Condiciones de extracción con solvente, de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 47 |
| Tabla 5. Identificación taxonómica del material vegetal. | 53 |
| Tabla 6. Análisis por GC-MS del perfil volátil obtenido por HS-SPME (Fibras: PDMS, PDMS/DVB y CARPDMS) de flores de <i>Petrea volubilis</i> L. | 54 |
| Tabla 7. Variación en el contenido de volátiles aislados por HS-SPME (CAR/PDMS) de flores de <i>P. volubilis</i> L., a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m. | 59 |
| Tabla 8. Absorbancias obtenidas a las longitudes de onda de 520 y 700 nm, para los extractos obtenidos por SE de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 65 |
| Tabla 9. Contenido total de antocianinas monoméricas presentes en los extractos obtenidos por SE de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 66 |
| Tabla 10. Resultados del ANOVA aplicado al diseño experimental 2 ³ , con los efectos de las variables de estudio y combinaciones; A: EtOH:H ₂ O, B: HCl, % y C: temperatura, °C. | 66 |
| Tabla 11. Porcentaje de rendimiento de la extracción con fluido supercrítico. | 69 |
| Tabla 12. Identificación del extracto de flores de <i>P. volubilis</i> L. obtenido por SFE. | 70 |
| Tabla 13. Metabolitos secundarios aislados por SE de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 72 |
| Tabla 14. Metabolitos secundarios aislados por SFE de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 74 |
| Tabla 15. Metabolitos secundarios aislados por MSPD de flores de <i>P. volubilis</i> L. | 74 |

Tabla 16. Compuestos mayoritarios identificados por LC-MS y GC-MS, presentes en extractos y en la fracción volátil de flores de *P. volubilis* L. 76

Tabla 17. Resultados de actividad antioxidante y fenoles totales para los extractos obtenidos por MSPD, SFE y SE. 77

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|--|------|
| ANEXO A. Perfil cromatográfico de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR/PDMS) de flores de <i>P. volubilis</i> L., monitoreada a las 12:00 m. Columna DB-WAX de 60 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 µm, d _f , detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: <i>splitless</i> . | 107 |
| ANEXO B. Perfil cromatográfico de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR/PDMS) de flores de <i>P. volubilis</i> L., monitoreada a las 6:00 p.m. Columna DB-WAX de 60 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 µm, d _f , detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: <i>splitless</i> . | 108 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|-----------|--|
| ABTS | <i>2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i> (Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) |
| AG | Ácido gálico |
| ABTS+• | Catión-radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) |
| ANOVA | <i>Analysis of Variance</i> (Análisis de la varianza) |
| APPH | <i>2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane dihydrochol) dihydrochloride</i> (Hidrocloruro de 2,2'-azo-bis-amidinopropano) |
| BHT | <i>Butylated hydroxytoluene</i> (2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol) |
| CAR/PDMS | <i>Carboxen®/Polydimethylsiloxane</i> (Carboxen polidimetilxilosano) |
| CENIVAM | Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales |
| CROM-MASS | Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas |
| Cv | Coefficiente de variación |
| d.i | Diámetro interno de la columna cromatográfica (mm) |
| df. | Espesor fase estacionaria |
| DAD | <i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos) |
| eV | Electrón voltio |
| GC | <i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases) |
| GC-MS | <i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas) |
| FC | Folin-Ciocalteu |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia) |
| HS-SPME | <i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza) |

| | |
|---------------------|--|
| <i>i.e.</i> , | Es decir |
| LC | <i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida) |
| LC-MS | <i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas) |
| LRI | <i>Linear retention indices</i> (Índices de retención lineal) |
| MSPD | <i>Matrix solid-phase dispersion</i> (Dispersión de la matriz en fase sólida) |
| ORAC | <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno) |
| PDMS | <i>Polydimethylsiloxane</i> (Polidimetilsiloxano) |
| PDMS/DVB | <i>Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene</i> (Polidimetilsiloxano divinil benceno) |
| ROO [·] | Radical peróxido |
| ROOH | Hidroperóxido |
| SE | <i>Solvent extraction</i> (Extracción con solvente) |
| SFE | <i>Supercritical fluid extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico) |
| SPME | <i>Solid-phase microextraction</i> (Microextracción en fase sólida) |
| t _R | <i>Retention time</i> (Tiempo de retención) |
| Trolox [®] | <i>6-Hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid</i> (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) |
| Uv-Vis | Ultravioleta visible |

RESUMEN

TÍTULO: AISLAMIENTO POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE FLORES DE *Petrea volubilis* L. (Fam. Verbenaceae) Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *in-vitro**

AUTORA: Leyde Katerine Gualteros Montaña**

Palabras clave: *Petrea volubilis* L., MSPD, SFE, SE, antocianinas, ORAC, Folin-Ciocalteu, ABTS⁺, GC-MS, LC-MS.

DESCRIPCIÓN:

Petrea volubilis L. (Fam. Verbenaceae), es un arbusto que posee llamativas inflorescencias con flores de color lila-azul; se encuentra ampliamente distribuido en Colombia, debido a que se adapta a climas tropicales y secos. Esta especie es originaria de México y el principal uso que se le da en la actualidad es ornamental.

En el estudio, se caracterizó por GC-MS, la fracción volátil aislada por HS-SPME de flores de *P. volubilis* L., a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m. Se presentó la mayor emisión de compuestos volátiles y semi-volátiles a las 6:00 a.m., se encontraron linalol, oct-1-en-3-ol y *trans*- β -ocimeno como compuestos mayoritarios. Se identificaron metabolitos secundarios por LC-MS en los extractos obtenidos por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), extracción con solvente (SE) y extracción con fluido supercrítico (SFE). Se les evaluó la actividad antioxidante por medio de los ensayos ORAC, ABTS⁺ y el contenido total de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu (FC). En los extractos de flores de *P. volubilis* L., se encontraron flavonoides (apigenina, luteolina y apigenina 7-*o*-glucorónido), antocianinas (delfinidina 3-glucósido y cianidina-3-glucorónido) y compuestos de naturaleza lipídica como fitoesteroles (γ -sitosterol, fucosterol, sitostenona y estigmasterol) y ácidos grasos (ácidos palmítico y linolénico).

El extracto obtenido por SE, presentó actividad antioxidante (3500 \pm 100 μ mol Trolox[®]/g), mayor en comparación con las sustancias de referencia BHT (660 \pm 4 μ mol Trolox[®]/g) y α -tocoferol (550 \pm 13 μ mol Trolox[®]/g).

Se determinó el contenido de antocianinas monoméricas totales en los extractos hidro-alcohólicos a través de un diseño experimental 2³. Las variables evaluadas fueron: etanol: agua (7:1), acidez (HCl, 1%) y temperatura (30 °C). Todas las variables y sus interacciones tuvieron un efecto significativo sobre la concentración antocianina final.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directora: Elena E. Stashenko Química Ph.D.
Co-directores: Jairo R. Martínez Químico Ph.D., Lady J. Sierra Química.

ABSTRACT

TITLE: ISOLATION BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS OF SECONDARY METABOLITES OF *Petrea volubilis* L. (Fam. Verbenaceae) FLOWERS AND *in vitro* ANTIOXIDANT CAPACITY EVALUATION*

AUTHOR: Leyde Katerine Gualteros Montaña**

KEYS WORDS: *Petrea volubilis* L., MSPD, SFE, SE, anthocyanins, ORAC, Folin-Ciocalteu, ABTS⁺, GC-MS, LC-MS.

Petrea volubilis L. is a beautiful shrub with inflorescences of lilac-blue flowers. *P. volubilis* is native to Mexico but widely distributed in Colombia as an ornamental plant. This species easily adapts to tropical and dry climates. The aim of this work was to characterize and evaluate the antioxidant activity of extracts obtained with different methods.

The volatile fraction isolated by HS-SPME from *P. volubilis* flowers was characterized by GC-MS. Samples were taken at 6:00 a.m., 12:00 m. and 6:00 p.m. The highest emission of volatile and semi-volatile compounds was at 6:00 a.m., linalool, oct-1-en-3-ol and *trans*- β -ocimene were main components. Extracts obtained by matrix solid-phase dispersion (MSPD), solvent extraction (SE), and supercritical fluid extraction (SFE) were analyzed by GC-MS and total phenol content was quantified by the Folin-Ciocalteu method. The extracts were evaluated for antioxidant activity by ORAC and ABTS⁺ assays. The *P. volubilis* flower extracts contained flavonoids (apigenin, luteolin and apigenin 7-*o*-glucoronide), anthocyanins (delphinidin 3-glucoside and cyanidin-3-glucoronide), and lipid compounds, such as phytosterols (γ -sitosterol, fucosterol, sitostenone and estigmasterol) and fatty acids (palmitic and linolenic acids).

The SE extract showed greater antioxidant activity ($3500 \pm 100 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$), than the reference substances BHT ($660 \pm 4 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$) and α -tocopherol ($550 \pm 13 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$).

The highest content of total monomeric anthocyanins was optimized in a hydro-alcoholic extraction performed in a 2³ experimental design. The variables evaluated were ethanol:water ratio (7:1), acidity (HCl, 1%), and temperature (30 °C). All variables and their interactions had a significant effect on the final anthocyanic concentration.

*Proyect to degree

**Faculty of Science, School of Chemistry, Director: Elena E. Stashenko, Chemist, Ph.D.
Co-directors: Jairo R. Martínez, Chemist, Ph.D. and Lady J. Sierra, Chemist.

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país con extensa flora tropical, distribuida a lo largo de su territorio, que podría ser aprovechada como materia prima de nuevas sustancias con diversa actividad biológica. Las plantas desempeñan un papel fundamental en vida del hombre para cubrir las necesidades básicas como alimentación, salud, vivienda y vestido [1]. Otro uso que se les da es ornamental, porque se utilizan en la jardinería para adornar, de manera única, nuestro entorno. Estudios han reportado que Colombia contribuye con aproximadamente el 15% de las exportaciones mundiales de flores [2].

Las especies florales se encuentran distribuidas a lo largo del planeta adaptadas a diferentes zonas climáticas; pese a que es tan común encontrarlas, la investigación sobre los procesos metabólicos de las flores son escasos en comparación con la de otras partes de la planta. Si bien el hallazgo de nuevas especies de flores ha sido reportado en Colombia [3,4], la mayoría de las publicaciones realizadas sobre las flores se limitan a identificaciones botánicas, como la realizada por Drewes *et al.* (1999) [5].

En las flores, se encuentran presentes metabolitos secundarios que desempeñan importantes funciones para la supervivencia de la planta, son agentes en la defensa química, se encargan de atraer o repeler insectos, entre otros roles fundamentales [6]. También, se ha reportado [7] que en flores los metabolitos secundarios varían según su estado fenológico; como es el caso de la flor de *Lochrominae* (Fam. Solanaceae), en ella, la cantidad de diferentes compuestos cambia según el estado en el que se recolecte el material vegetal, debido a la presencia de enzimas, que pueden afectar la composición química de la flor y, en algunos casos, se manifiestan con cambios de color. Nascimento *et al.* (2015) [8], reportaron la presencia de flavonoides, antocianinas y algunos compuestos antioxidantes en flores de *Bidens segetum* (Fam. Asteraceae). Yin *et al.* (2015) [9], identificaron 16 flavonoides y 29 compuestos volátiles en infusiones de té de pétalos de flores de loto (Fam. Nymphaeaceae).

El objetivo del trabajo de investigación, consistió en estudiar los metabolitos secundarios de la flor de *Petrea volubilis* L. (Fam. Verbenaceae), que es una especie ornamental de flores color lila-azul, de amplia distribución en Colombia [5]. Esta especie se adapta a diversos tipos de clima, especialmente, cálidos y tropicales, que favorecen su crecimiento. A pesar de que es fácil encontrarla, no se han reportado estudios de sus metabolitos secundarios, que podrían tener aplicaciones en industrias farmacéutica y cosmética, entre otras. Se han encontrado reportes

sobre la composición química de metabolitos secundarios de hojas y tallos de *P. volubilis* L. [10] y sus actividades antioxidante y anticancerígena [11].

Las flores de *P. volubilis* L. se colectaron en los cultivos experimentales del Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM) y, posteriormente, se liofilizaron. Los extractos se obtuvieron por extracción con solvente (SE), dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y por extracción con fluido supercrítico (SFE). La actividad antioxidante de los extractos se midió usando ensayos ORAC (capacidad de absorción del radical oxígeno) y ABTS* [catión-radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)], el contenido total de fenoles se determinó por el método Folin-Ciocalteu. Para el estudio de la fracción volátil, se utilizaron flores frescas de *P. volubilis* L., que se muestrearon por medio de microextracción en fase sólida (SPME) en modo *head-space* (HS). Los compuestos volátiles y semivolátiles se caracterizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y los metabolitos no volátiles, por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

El desarrollo de este proyecto estuvo enmarcado en la línea de investigación de Productos Naturales, que busca caracterizar químicamente los extractos obtenidos de flores de *P. volubilis* L., al igual que su fracción volátil. Esto forma parte de la búsqueda de matrices naturales que contengan moléculas que puedan ser usadas como principios activos de diferentes productos y que, a su vez, puedan reemplazar antioxidantes de origen sintético, utilizados como preservantes para productos de consumo humano o de aplicación directa sobre la piel, entre otros usos. El proyecto es financiado por el Centro de Investigación en Biomoléculas CIBIMOL, y la parte experimental se realizó en las instalaciones del CENIVAM y en laboratorios CROM-MASS, que se encuentran en el campus central de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia).

Los resultados parciales de este trabajo se presentaron en los siguientes eventos académicos: IV Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales (**COLAPLAMED-2016**), V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales (**CIPNat-2016**), 40 Simposio Internacional de Cromatografía Capilar (**ISCC-2016**), 21 Simposio Latinoamericano de Biotecnología, Biomédica, Biofarmacéutica y Aplicaciones industriales de Electroforesis Capilar y Tecnología Microchip (**LACE-2015**), 1^{er} Encuentro Científico de la Facultad de Ciencias UIS (**UIS-2015**), 8 Simposio Brasileiro Internacional de Aceites Esenciales (**SBOE-2015**), Congreso Nacional de Ciencias Biológicas (**ACCB-2015**), 63 Congreso Internacional y Reunión Anual de la Sociedad para la Investigación de Plantas Medicinales y Productos Naturales (**GA-2015**) y en el 42 Simposio Internacional de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia y Técnicas Afines (**HPLC-2015**).

1 MARCO REFERENCIAL

1.1 Marco de antecedentes

Para obtener una mayor información sobre la producción científica, que se ha realizado sobre la especie *Petrea volubilis* L., se utilizó, como recurso de búsqueda, la base de datos *Scopus* (*Elsevier*), y se obtuvieron los siguientes resultados:

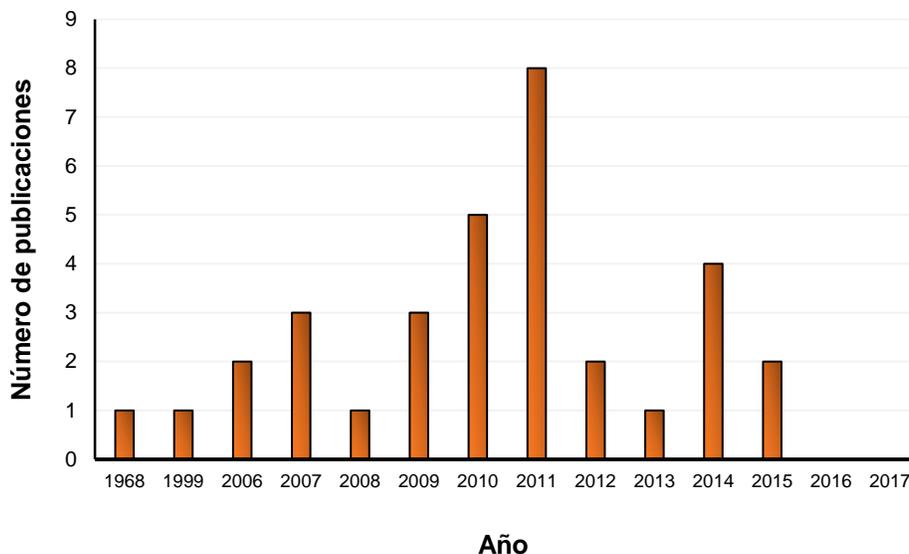


Figura 1. Número de publicaciones por año sobre *P. volubilis* L. Fecha de consulta: 11 de enero de 2017. Fuente: *Scopus* (*Elsevier*). Período de observación: (1968-2017). Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("Petrea") AND TITLE-ABS-KEY ("volubilis").

En la **Figura 1**, se presenta el número de publicaciones por año sobre *P. volubilis* L., durante el período de 1968-2017. Se utilizó como ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("Petrea") AND TITLE-ABS-KEY ("volubilis"). Se encontraron 33 artículos relacionados con esta especie; de estos, sólo dos poseen información con respecto a la composición de la variedad *P. volubilis* L. y dos, sobre los estudios de tipo botánico de la planta, lo que evidencia una baja investigación al respecto. Se presentó el número de publicaciones más alto en el año 2011, ocho en total. A partir del 2011, el número de reportes por año ha disminuido.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se evidencia por tanto la falta de investigación en el campo de las flores, en particular de la *P. volubilis* L., y, aún más, la falta del estudio y caracterización de sus metabolitos secundarios.

Las siguientes son las áreas de estudio en las que se encuentran reportes: agricultura y ciencias biológicas (23), bioquímica, genética y biología molecular (6), ingeniería (5) y medicina (5).

También, se realizó la búsqueda para conocer, cuáles son los países que han publicado más sobre esta especie, aparecen en la **Figura 2**.

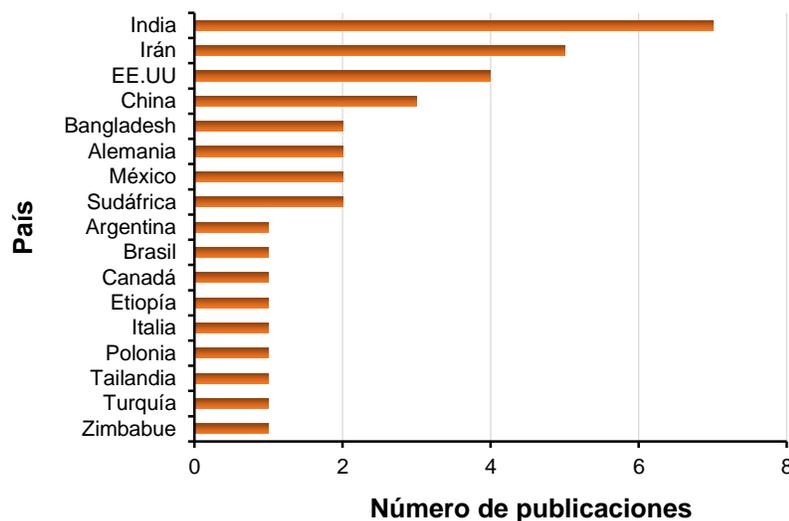


Figura 2. Resultados de búsqueda, que relaciona el número de publicaciones sobre *P. volubilis* L., según el país de investigación. Fecha de consulta: 11 de enero del 2017. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Período de observación: 1968-2017. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("Petrea").

En la **Figura 2** se evidencia, que la mayor cantidad de reportes sobre esta especie, se encuentra principalmente en India, Irán y Estados Unidos. También, se observa que el continente americano, cuenta con un número de publicaciones bajo, siendo India el país en que se ha realizado más investigación sobre esta planta, con siete artículos en total. México, el país de donde es originaria esta especie, cuenta con dos reportes en total; Argentina, Brasil y Canadá, un artículo cada uno. Sin embargo, Colombia, a pesar de ser un país de flora tropical, en el que la *P. volubilis* L., se encuentra ampliamente distribuida, no ha contado con ninguna investigación.

Shah y Unnikrishnan (1968) [12] realizaron el estudio de las conexiones de yemas axilares de cinco especies de plantas pertenecientes al orden de las Lamiales: *P. volubilis* L. (Fam. Verbenaceae), *Clerodendrum* sp. (Fam. Lamiaceae), *Leucas aspera* (Fam. Lamiaceae), *Anisomeles ovata* (Fam. Lamiaceae) y *Ocimum americanum* (Fam. Lamiaceae). Encontraron, que las cinco especies presentaban conexiones axilares diferentes; en el caso de la *P. volubilis* L., el trazo de

crecimiento está relacionado con la hebra vascular, es decir, que está conectado directamente a la zona por la cual se transportan el agua y los nutrientes.

Drewes y Martínez (1999) [5] interpretaron y describieron tipológicamente las inflorescencias de los géneros pertenecientes a la tribu *Petreae* Briq.: *Petrea* L., *Xolocotzia miranda* y *Recordia moldenke*. En este reporte, los autores describieron la inflorescencia de *P. volubilis* L. con gran detalle.

Rahman *et al.* (2010) [13] realizaron un estudio para determinar, si las especies *P. volubilis* L., y *Excoecaria agallocha*, poseían actividad antihiperlipidémica. Para ello, trabajaron con extractos hidro-alcohólicos de hojas de *P. volubilis* L. y de tallos de *E. agallocha*. Las especies se identificaron taxonómicamente en el Herbario Nacional de Bangladesh, en Dhaka. Para realizar la evaluación de la actividad antihiperlipidémica, usaron ratones albinos, a ellos suministraron el extracto hidro-alcohólico; se encontró, que los extractos hidro-alcohólicos de las hojas de *P. volubilis* L. disminuían los niveles de glucosa en la sangre del ratón, al igual que los extractos hidro-alcohólicos de *E. agallocha*. Los autores concluyeron, que las dos especies podrían tener un uso potencial como medicamentos para diabéticos.

A las hojas de *P. volubilis* L., se les han atribuido propiedades farmacológicas. Abdel *et al.* (2011) [11] determinaron los fenoles totales, flavonoides, feniletanol, glucósidos y contenido de iridoides presentes en las hojas de 23 plantas medicinales en Egipto, entre ellas, la *P. volubilis* L., con el fin de mostrar el potencial anticancerígeno, actividad antioxidante y efectos antileishmania de las especies bajo estudio. Como resultado, se encontraron compuestos fenólicos, entre ellos, flavonoides, a los que se les atribuyeron los efectos antioxidante y anticancerígeno [11].

Palacios *et al.* (2014) [14] realizaron un inventario florístico en el centro de Veracruz, México, mediante el muestreo de 67 parcelas de 100 m²; en total, encontraron 230 especies de plantas vasculares, distribuidas en 174 géneros y 68 familias. Las familias Fabaceae, Euphorbiaceae, Verbenaceae, Rubiaceae y Acanthaceae fueron más abundantes. También, reportaron que una de las especies que se encontraba en mayor cantidad era la *P. volubilis* L.

Abdelwahab *et al.* (2011) [10] realizaron una investigación de hojas y tallos de *P. volubilis* L. El material utilizado se recolectó antes de la etapa de floración en El Cairo (Egipto). La planta se identificó taxonómicamente. Los autores estudiaron, principalmente, los metabolitos secundarios y su actividad biológica. De los extractos provenientes de tallos y hojas se aislaron siete compuestos, a saber: la apigenina, la quercetina, la 4',6-dimetilscutellareina, el ácido *p*-hidroxibenzoico, el

ácido *trans*-cafeíco, el ácido vanílico y el acteósido. En la **Figura 3**, se muestran las estructuras químicas de los compuestos aislados

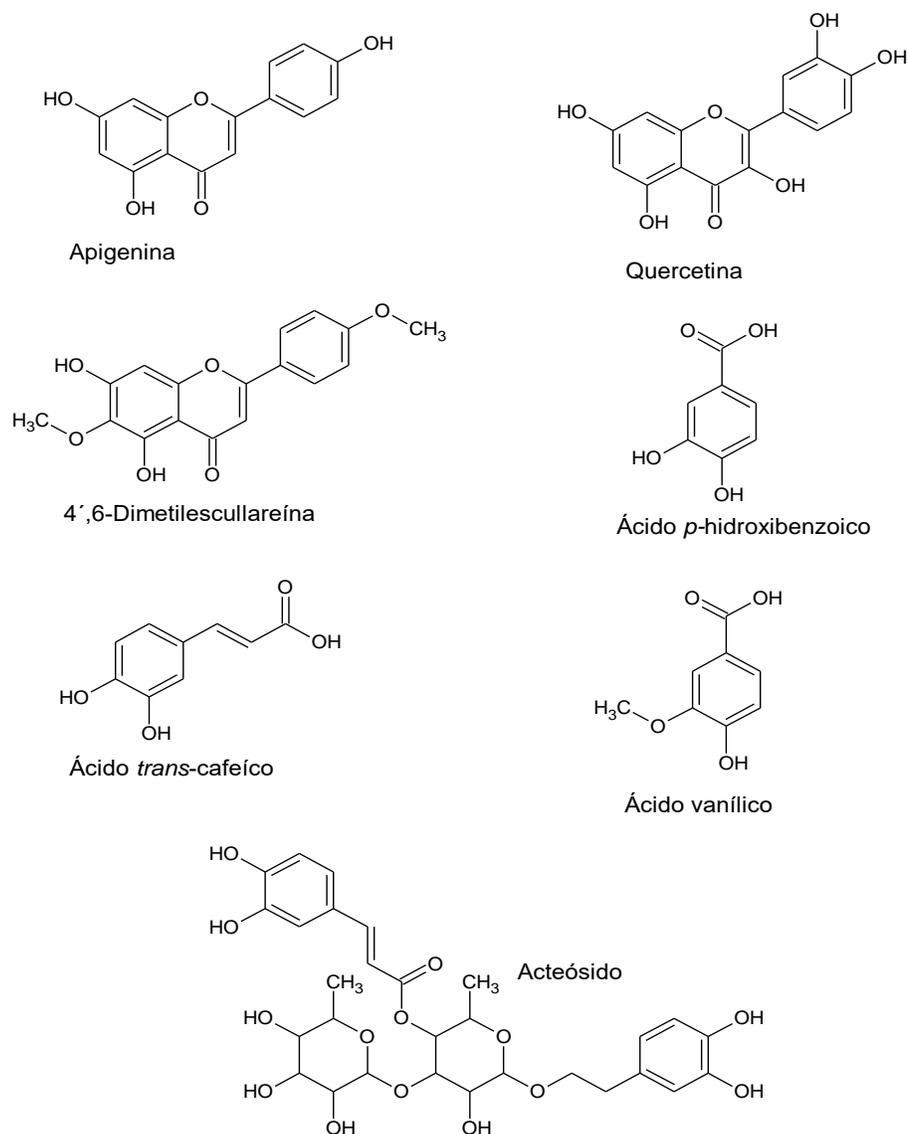


Figura 3. Compuestos aislados de extractos hidro-alcohólicos de hojas y tallos de *P. volubilis* L. [10].

Según la revisión bibliográfica realizada, se puede concluir, que el estudio de especies florales del género *Petrea* es bastante escaso, aunque es una matriz de compuestos químicos bastante promisoría, ya que en ella, se podrían encontrar sustancias con actividad biológica, lo que permitirá eventualmente reemplazar compuestos de origen sintético por unas de origen natural.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades

2.1.1 Familia Verbenaceae

La familia Verbenaceae contiene 100 géneros y alrededor de 2600 especies, presentes principalmente, en el continente Americano, con un par de grupos en Europa, Asia, África y Madagascar. Las especies pertenecientes a esta familia pueden ser hierbas, arbustos, árboles pequeños e incluso enredaderas; generalmente, poseen hojas alternadas, la floración se da en inflorescencias, que son pequeños racimos, en ellos aparece un gran número de flores [15].

2.1.1.1 Género *Petrea*

Dentro de la familia Verbenaceae se encuentra el género *Petrea*, que comprende 14 especies que son exclusivamente neotropicales, es decir, que se distribuyen, principalmente desde el sur de México, Centroamérica, Islas del Caribe, hasta Bolivia, Paraguay, Brasil y las Guyanas. Las plantas pertenecientes a este género son leñosas, trepadoras, arbustos o árboles de hojas opuestas o alternadas. Presentan inflorescencias con ciertas similitudes [16].

2.1.1.2 *Petrea volubilis* L.

Una de las especies dentro del género *Petrea*, que ha generado gran interés, es la *Petrea volubilis* L., originaria de México, el Caribe y, principalmente, Centroamérica. La *P. volubilis* L. es un arbusto leñoso o, en algunos casos, enredadera que alcanza hasta 10 m de altura; sus hojas son gruesas, rígidas y decusadas, es decir, son hojas opuestas que crecen en un sentido perpendicular al par anterior [12]. Los tallos son delgados, de color marrón pálido o gris [17]. Esta especie, se adapta a diferentes tipos de climas, principalmente, tropicales, necesita ser regada al menos una vez por semana y su crecimiento se ve favorecido en lugares soleados. Se reproduce mediante esquejes o por semillas, y presenta floración *perenne* [18]. La flor de *P. volubilis* L. es una inflorescencia (**Figura 4**), que consiste en un eje principal que define la flor y las otras que crecen en los laterales, siendo las flores más jóvenes, las más distantes del pedúnculo, que es la rama que sostiene la inflorescencia [19]. Desde el punto de vista botánico, se consideran como racimos de racimos, es decir, un racimo principal, compuesto de racimos secundarios, que se originan desde un complejo de tres yemas, que se encuentran en las axilas formadas por las brácteas primarias y el raquis [20].

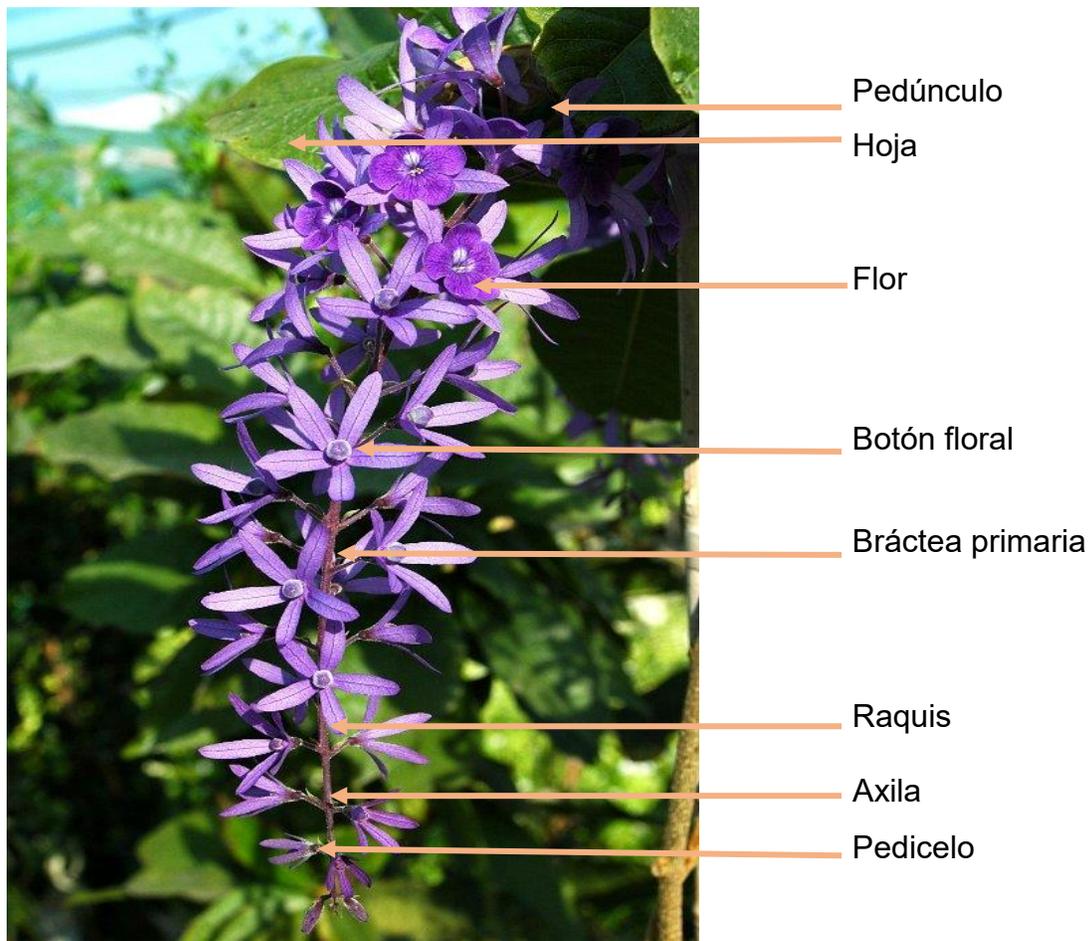


Figura 4. Descripción de una inflorescencia de *P. volubilis* L. [5,20]

2.1.1.2.1 Flor de *Petrea volubilis* L.

La flor de *P. volubilis* L. (**Figura 5**) es de color lila-azul; su tonalidad es más intensa en los días de floración, que dura aproximadamente dos días; después, se desprende y en la inflorescencia permanecen los sépalos; estos tienen una duración aproximada de diez días, en los que van adquiriendo una coloración gris, hasta que finalmente mueren. Las flores de *P. volubilis* L. no poseen una fragancia característica que sea percibida por el olfato humano. Sin embargo, es una especie admirada, principalmente, por su belleza y la coloración. Estudios realizados han caracterizado morfológicamente la inflorescencia de la *P. volubilis* L. [5] y la manera en la que está distribuida a nivel mundial [16]. Actualmente, el mayor uso que se le da a esta especie es ornamental. La flor de *P. volubilis* L. se clasificó como una flor perfecta por el biólogo-botánico, Director del Programa de Agronomía de la Universidad del Pacífico, profesor Robert Tulio González Mina, Ph.D. Una flor es

perfecta, cuando posee simultáneamente los órganos característicos masculinos y femeninos (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) [21].



Figura 5. Flores de *P. volubilis* L., fotografía tomada por la autora el 1 de noviembre de 2015, en CENIVAM, Bucaramanga-Colombia.

2.1.1.2.2 Identificación taxonómica

La *P. volubilis* L. se identifica taxonómicamente como se muestra a continuación [22].

| | |
|----------------|---------------------|
| Reino: | Plantae |
| Subreino: | Tracheobionta |
| Superdivisión: | Spermatophyta |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Subclase | Asteridae |
| Orden: | Lamiales |
| Familia: | Verbenaceae |
| Género: | <i>Petrea</i> |
| Especie: | <i>volubilis</i> L. |
| Nombre común: | Reina del jardín |

2.2 Tratamiento y recolección de flores

Las plantas de *P. volubilis* L., se cultivan en el Complejo Piloto Experimental del Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM). Debido a que la *P.*

volubilis L. posee floración *perenne*, ha sido importante recolectar el material vegetal, cuando sucede el proceso de floración.

2.3 Liofilización

Esta técnica se desarrolló durante la Segunda Guerra Mundial. Inicialmente, se utilizó para conservar el plasma sanguíneo y en la preparación de los primeros antibióticos de penicilina [23]. La liofilización se usa principalmente para obtener productos con valor de humedad menor de 10% en comparación con los obtenidos por métodos de secado convencionales; entre ellos, secado por aire o a la sombra. Los productos liofilizados, son más estables y mantienen las propiedades iniciales de las materias primas tales como la apariencia, sabor y aroma [24]. En comparación con los procesos de secado de aire, que eliminan el agua en una sola etapa, la liofilización resulta ser un proceso costoso, ya que consume grandes tiempos de operación y grandes cantidades de energía para sublimar el hielo, condensar el vapor de agua y para mantener el vacío en el sistema [25].

Con relación a la industria de los alimentos, la liofilización se comenzó a utilizar en la fabricación de productos especiales para montañistas, astronautas, militares, conservación de alimentos de alto valor agregado como el café, entre otros [26]. En farmacéutica, se utiliza para preservar antibióticos, vacunas, plasma, hemoderivados, vitaminas, extractos y leche materna. En la industria química, la técnica se emplea para la preparación de catalizadores y el secado de materiales orgánicos. Otras aplicaciones son la preservación de animales (taxidermia), conservación de documentos y libros antiguos, entre otras [27,28].

La liofilización consiste, básicamente, en remover la mayor cantidad de agua de un producto. Para esto, el agua se congela y el hielo se elimina por sublimación [29], que se lleva a cabo a presión reducida (por debajo de 100 Pa) y a bajas temperaturas (unos 60 °C por debajo de la temperatura ambiente) [30].

Las siguientes son las principales ventajas de la liofilización: uso de bajas temperaturas, lo que evita que se produzcan cambios químicos en las sustancias termolábiles, incluyendo cambios de color; en el caso de los alimentos, se evita la desnaturalización de las proteínas y cambio en las propiedades organolépticas [31].

2.4 Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME) se desarrolló por Pawliszyn y colaboradores en 1990, ante la necesidad de facilitar el proceso de preparación de la muestra en el laboratorio [32]. Es una técnica de muestreo, que utiliza poca cantidad de muestra, bajos volúmenes de solventes y tiempos más cortos de análisis, sin que se vea comprometida la sensibilidad. Es una técnica ideal para el

análisis de compuestos volátiles y semivolátiles, que tiene su principio básico en la adsorción o absorción de analitos sobre o dentro de un material polimérico que recubre una fibra de sílice. Posteriormente, los analitos se desorben térmicamente de la fibra en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (GC) y de allí pasan a una columna capilar [33].

SPME es una técnica que se puede usar para múltiples aplicaciones. Krutz *et al.* (2003) [34] acoplaron SPME a GC-MS, para el análisis de herbicidas. Se ha utilizado, también, para la determinación de volátiles en fluidos biológicos: Arnáiz *et al.* (2014) [35], monitorearon volátiles en orina de rata utilizando SPME y GC-MS. La técnica se ha implementado para la caracterización química de compuestos volátiles que se encuentran en flores: Nascimento *et al.* (2015) [8], analizaron el perfil de volátiles de los compuestos emitidos por flores de *Bidens segetum* Martius ex Colla (Fam. Asteraceae). Liu *et al.* (2014) [36], analizaron por microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME) y GC-MS cambios en el perfil volátil en flores de *Hosta plantaginea* (Fam. Asparagaceae).

Los principales modos de operación en SPME son: (1) HS-SPME, (2) microextracción directa sumergiendo la fibra en la matriz y (3) extracción con protección de membrana. En el caso de HS-SPME, la fibra se expone al espacio de cabeza del recipiente en el cual se encuentra la muestra. En la extracción directa, la fibra se sumerge totalmente en la muestra, de tal forma, que los analitos pasan de la matriz al recubrimiento polimérico. Con protección de membrana, la fibra se recubre con una membrana, que permite el paso de analitos de peso molecular bajo e impide el paso de interferencias a la fibra. La instrumentación para SPME consiste en un *holder*, que es el contenedor de la fibra y fibras cubiertas con un material polimérico [37].

2.5 Metabolitos secundarios vegetales

En las plantas se encuentran presentes metabolitos primarios, comunes a todos los seres vivos, y metabolitos secundarios, diferentes para cada especie. Los metabolitos primarios son de gran importancia para la vida de las plantas, cumplen roles estructurales, de crecimiento, energético, entre otros [38] e involucran principalmente, proteínas, lípidos y carbohidratos como el almidón y la celulosa. De igual manera, las plantas sintetizan otro tipo de moléculas, muchas de ellas son derivados de los metabolitos primarios, que no están relacionadas directamente con sus procesos vitales y se denominan metabolitos secundarios. En muchos casos, la función de estos metabolitos no ha sido establecida completamente; sin embargo, se les ha atribuido un rol importante en la defensa química, adaptación y supervivencia de la planta [39].

Los polifenoles presentan diferentes estructuras, dependiendo del número de anillos fenólicos, y sus sustituyentes se clasifican en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos y taninos [44,45] (Véase **Figura 6**).

Los compuestos polifenólicos actúan como agentes quelantes de metales, antimutágenicos, anticancerígenos, agentes microbianos, antifúngicos, repelentes y atrayentes de insectos, entre otros [46].

2.5.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son una clase importante de polifenoles que se encuentran principalmente en frutas, verduras y cereales, que, a su vez, se distribuyen en diferentes partes de la planta, por ejemplo, en sus flores y hojas. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal, responden a la luz, regulan los niveles de las fitohormonas encargadas del crecimiento y diferenciación de las plantas [47]. Existen flavonoides aislados de frutas cuyo estudio se ha realizado ampliamente debido a sus efectos contra enfermedades cardiovasculares; entre ellos, figuran flavonoides quercetina, rutina y catequina [48].

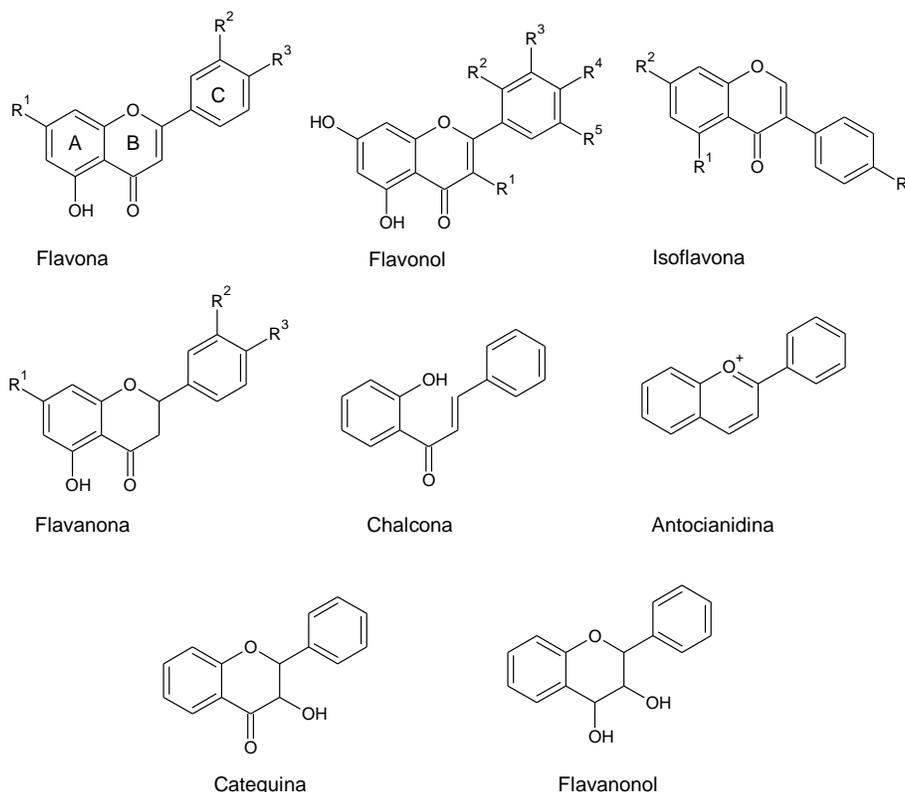


Figura 7. Estructura básica de algunos flavonoides.

Este tipo de polifenoles se utiliza comúnmente como compuestos antioxidantes, gracias a que poseen varios grupos hidroxilo fenólicos, capaces de donar átomos

de hidrógeno y retrasar los procesos de oxidación [45]. Se ha encontrado, además, que algunos flavonoides muestran diversas actividades relacionadas con la farmacología; un ejemplo de ello es la pinocembrina, que sirve como antiinflamatorio y antimicrobiano [49]. En la **Figura 7** se encuentran algunos ejemplos de flavonoides; los sustituyentes R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ aparecen en la **Tabla 1** junto con algunos ejemplos de flavonoides [50]

Tabla 1. Ejemplos de flavonas, flavanoles, flavanonas e isoflavonoles.

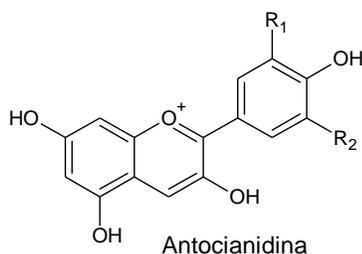
| Flavanona | R ¹ | R ² | R ³ | Masa molecular g/mol | | |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|----------------|----------------------|
| Hesperetina | OH | OH | OCH ₃ | 302 | | |
| Hesperidina | 7-O-Ram-Glu | OH | OCH ₃ | 610 | | |
| Naringina | 7-O-Ram-Glu | H | OH | 580 | | |
| Naringenina | OH | H | OH | 272 | | |
| Eriocitrina | 7-O-Ram-Glu | OH | OH | 596 | | |
| Isosakuranetina | OH | H | OCH ₃ | 286 | | |
| Flavona | R ¹ | R ² | R ³ | Masa molecular g/mol | | |
| Crisoeriol | OH | OCH ₃ | OH | 300 | | |
| Crisina | OH | H | H | 254 | | |
| Luteolina | OH | OH | OH | 286 | | |
| Acacetina | OH | H | OCH ₃ | 284 | | |
| Genkwanina | OCH ₃ | H | OH | 284 | | |
| Isoflavona | R ¹ | R ² | R ³ | Masa molecular g/mol | | |
| Biochanina | OH | OH | OCH ₃ | 284 | | |
| Sisotrina | OH | 7-O-Glu | OCH ₃ | 446 | | |
| Genisteína | OH | OH | OH | 270 | | |
| Genistina | OH | 7-O-Glu | OH | 432 | | |
| Ononin | H | 7-O-Glu | OH | 430 | | |
| Flavanol | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | R ⁵ | Masa molecular g/mol |
| Rutina | 3-O-Ram-Glu | H | OH | OH | H | 610 |
| Kaempferol | OH | H | H | OH | H | 286 |
| Quercetina | OH | H | OH | OH | H | 302 |
| Morina | OH | OH | H | OH | H | 302 |
| Isoramnetina | OH | H | OCH ₃ | OH | H | 316 |
| Miricetina | OH | H | OH | OH | OH | 318 |

2.5.1.2 Antocianinas

Dentro de los flavonoides se encuentran las antocianinas que son un grupo de compuestos que proporcionan a plantas la coloración azul y roja, se encuentran generalmente en frutos, flores y hojas. Su estructura está dada por la unión entre una antocianidina, conocida también como aglicona y un azúcar, a través de un enlace β -glucosídico. La base de las agliconas es el ion 2-fenil-benzopirilio (ion flavilio), que consiste en dos anillos aromáticos benzopirilio y un anillo fenólico [51].

De las antocianidinas conocidas en la actualidad, delfinidina, cianidina, pelargonidina, malvidina, peonidina y petunidina, son las más importantes (**Figura 8**), debido a que imparten características sensoriales a los alimentos que los contienen y también por el impacto positivo sobre la salud humana, ya que la mayoría de ellas presenta actividad biológica [52].

El azúcar presente en la antocianina le confiere una gran estabilidad y solubilidad. Los azúcares más comúnmente encontrados en las antocianinas son ramnosa, glucosa, galactosa, xilosa y arabinosa; en menor proporción, se encuentran la gentobiosa, la rutinosa y la soforosa. Las antocianinas son de colores intensos, que dependen de los sustituyentes que el catión flavilio posea. Si en el anillo fenólico se encuentran sustituyentes hidroxilo se intensifica el color azul, mientras que a mayor cantidad de grupos metoxilo se intensifica la coloración roja [53].



| Antocianidina | R ₁ | R ₂ |
|---------------|-------------------|-------------------|
| Delfinidina | -OH | -OH |
| Cianidina | -OH | -H |
| Peonidina | -OCH ₃ | -H |
| Petunida | -OH | -OCH ₃ |
| Malvidina | -OCH ₃ | -OCH ₃ |

Figura 8. Estructura de algunas antocianidinas. Tomado de: Aqil *et al.* (2014) [54].

2.6 Obtención de extractos

Los extractos son mezclas complejas que contienen metabolitos secundarios y otros compuestos. Algunos de los compuestos presentes en los extractos cuentan con propiedades farmacológicas, repelentes, antioxidantes, entre otras. De las flores de *P. volubilis* L. se prepararon extractos por diferentes técnicas de extracción.

2.6.1 Extracción con fluido supercrítico

Cada vez la conciencia pública sobre la salud humana, la preservación del medio ambiente y la seguridad en el uso de solventes orgánicos en el procesamiento de alimentos y contaminación de los productos finales con los solventes, ejerce mayor presión en la investigación y búsqueda de ingredientes naturales en los productos de uso humano y su obtención. Por tal razón, ha surgido la necesidad de desarrollar técnicas limpias para el procesamiento de alimentos y diferentes productos. La extracción con fluido supercrítico (SFE) utiliza dióxido de carbono (CO₂) como solvente y ha proporcionado una excelente alternativa al uso de solventes orgánicos [55].

El principal solvente supercrítico utilizado es CO₂ (condiciones críticas: 30.9 °C y 73.8 bar). Es un solvente económico, ecológico y reconocido como seguro por la Administración de Alimentos y Drogas de los EE.UU. (*Food and Drug Administration*–FDA) y la Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (*European Food Safety Authority*-EFSA). El CO₂ es gaseoso a presión y temperatura ambiente, lo que hace que su recuperación del extracto sea muy fácil y éste resulte libre de solventes. Una de las principales ventajas de la SFE con CO₂ es su capacidad de funcionar a una temperatura cercana a la temperatura ambiente (T_c = 32 °C), con el uso de un medio no oxidante, lo que permite la extracción de compuestos termolábiles o fácilmente oxidados. El principal inconveniente de la extracción con el CO₂ supercrítico es su baja polaridad; esto se puede superar empleando modificadores polares (co-solventes) para aumentar su poder de solvatación hacia el analito de interés [56].

El CO₂, tiene afinidad por moléculas de bajo a mediano peso molecular, apolares o de polaridad media; por ende, es habitual encontrar terpenos, algunos ácidos grasos y compuestos termolábiles, en los extractos de plantas obtenidos con CO₂ supercrítico [57].

Maksimovic *et al.* (2013) [58], utilizaron extracción con CO₂ supercrítico (15 Mpa y 40 °C), para aislar metabolitos y determinar el rendimiento de extracción de la flor de *curry* (*Helichrysum italicum*) y el aceite esencial obtenido de hojas de salvia (*Salvia officinalis*) por hidrodestilación. Los extractos supercríticos se analizaron y se compararon con los de las flores de *curry* y el aceite esencial de salvia. La SFE se llevó a cabo con una mezcla de flores de *curry* y el aceite esencial de salvia. En el estudio se encontró, que la cantidad de monoterpenos y sesquiterpenos, presentó un cambio considerable en la mezcla, en comparación con el extracto y el aceite esencial puro. El objetivo de SFE realizada a la mezcla de aceite esencial de salvia y extracto de *curry*, era observar el efecto que tiene el aceite esencial de salvia como co-solvente, para aumentar la solubilidad de compuestos de tipo terpénico en CO₂

umentando la polaridad del mismo. Gracias a esto, se extrajeron compuestos más pesados de la flor de *curry*. El uso de la SFE ha resultado efectivo para extraer flavonoides de diferentes matrices vegetales, como lo reportado por Liu *et al.* (2011) [59], que lograron extraer flavonoides de *Maydis stigma*.

2.6.2 Dispersión de la matriz en fase sólida

La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) es una técnica de extracción, desarrollada por Barker en 1989 [60], que consiste en la dispersión de los analitos de interés en un soporte sólido. Esta técnica presenta varias ventajas, entre ellas, tiempos cortos de operación, selectividad, homogeneización de la muestra y el uso de menor cantidad de solventes; además, requiere cantidades pequeñas de muestra (ca. 1.0 g). Ha resultado ser una técnica ideal para el análisis de trazas de contaminantes en alimentos [61] y ha demostrado tener eficiencia en la extracción de diversos compuestos presentes en gran variedad de matrices como tejidos animales, alimentos y muestras orgánicas [62]; asimismo, se ha reportado su eficiencia en la extracción de flavonoides [63].

El principio básico de operación consiste en la dispersión de la matriz, que posee los compuestos a analizar, mediante la mezcla mecánica con un soporte sólido, que puede ser arena, sílice, sílice-C₁₈, entre otros. El material dispersado se transfiere y empaca en una columna, adecuada para realizar la elución con solventes, cuya polaridad debe ser afín a la de los analitos de interés.

2.6.3 Extracción con solvente

La extracción con solvente (SE) es una técnica de extracción mediante la cual se aíslan compuestos a partir de una mezcla líquida o sólida, con base en las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla. Los compuestos se separan mediante la transferencia selectiva de cada analito desde la mezcla hacia una fase líquida, que, por lo general, es un solvente orgánico [64].

Una de las técnicas de extracción más utilizadas industrialmente es la extracción sólido-líquido, para aislar pesticidas y principios activos vegetales, entre otros. Sin embargo, los rendimientos de extracción son bajos. Por tal razón, existe la necesidad de desarrollar nuevos métodos para aumentar los rendimientos de extracción; en la actualidad, se utiliza ultrasonido, una herramienta mediante la cual se logra aumentar el rendimiento de la extracción; además, es una técnica que no altera los componentes de la muestra [65,66].

2.7 Antocianinas monoméricas totales

El contenido de antocianinas monoméricas totales, se determina a través del ensayo de pH diferencial propuesto por Guisti, *et al.* (2001) [67]; en este ensayo se producen alteraciones de pH en la muestra, los cuales favorecen la detección de compuestos de tipo antociánicos: las antocianinas presentan cambios reversibles de color con la variación de pH, debido a que ocurre un cambio en su estructura estabilizándose la forma base de catión flavilio a pH ácido ($< \text{pH}=1$), estructura de mayor estabilidad. Véanse **Figuras 9** y **10**, y el espectro UV-Vis tomado a pH =1 y pH 4.5.

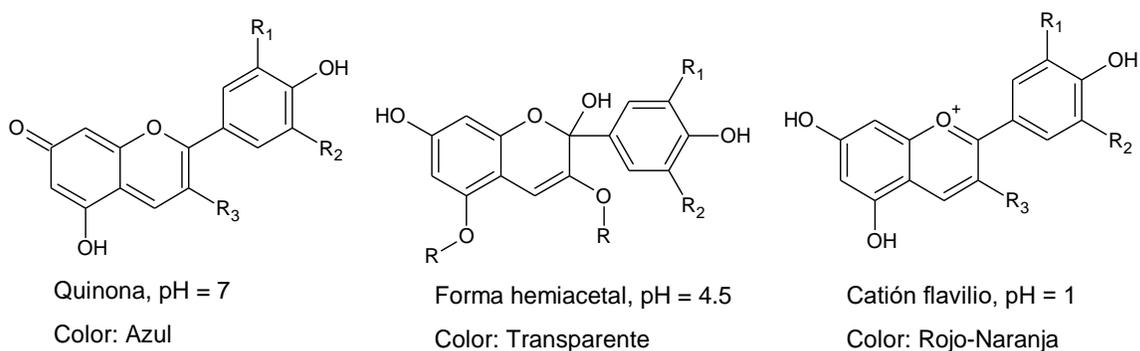


Figura 9. Influencia del pH en la estabilidad y el color de las antocianinas.

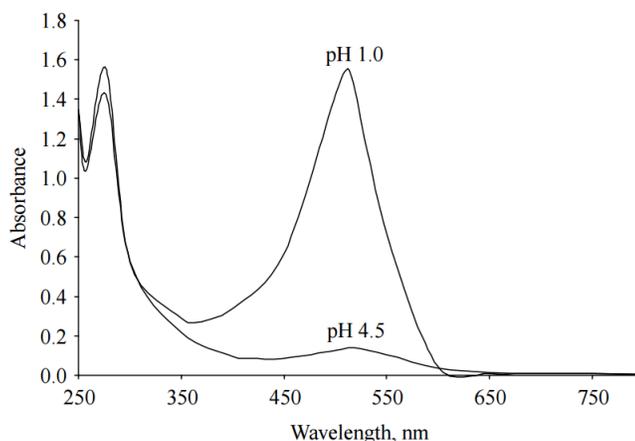


Figura 10. Espectro UV-Visible de antocianinas en soluciones *buffer* a pH 1.0 y 4.5 [67].

2.8 Capacidad antioxidante

Un antioxidante es una molécula capaz de retrasar procesos oxidativos en sistemas biológicos y tiene la habilidad de actuar sobre los radicales libres, que son moléculas que poseen en su estructura química electrones desapareados haciéndola altamente reactiva; según algunas investigaciones un radical libre puede afectar a un millón de moléculas en una reacción en cadena [68]. Los radicales en el organismo, son consecuencia del metabolismo humano y también pueden provenir de medios externos como ambiente, por radiación, entre otros [69]. Es importante buscar alternativas de protección al organismo contra los radicales libres, cuando están en exceso. Esto puede hacerse a través del uso de antioxidantes, los cuales pueden ingresar al organismo vía exógena por medio de la dieta [70]. Los antioxidantes exógenos pueden ser de origen natural o sintético [71], siendo los últimos los más utilizados comercialmente. Entre ellos, el BHT (butilhidroxitolueno) y el α -tocoferol, análogo de la vitamina E, que se utilizan ampliamente debido a que presentan condiciones de estabilidad mayores en comparación con los antioxidantes de origen natural [72].

Existe un creciente interés a nivel mundial, por desarrollar productos de origen natural, que posean las cualidades de poder detener o inhibir procesos de oxidación, que generan diferentes alteraciones de la salud [73]. Estudios han arrojado resultados prometedores en cuanto a la acción como agentes antioxidantes de compuestos fenólicos tales como flavonoides y antocianinas, los cuales captan radicales libres responsables por generar el estrés oxidativo. Estos compuestos antioxidantes han mostrado un efecto benéfico en la prevención de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas [74]. Algunos compuestos fenólicos naturales como el timol y el carvacrol son considerados como posibles antioxidantes, agentes antifúngicos y antibacteriales [75].

Dichos estudios se han dirigido, igualmente hacia el desarrollo de técnicas como DPPH, ORAC, ABTS^{•+} y Folin-Ciocalteu, entre otras, que permitan el estudio de analitos con posible actividad antioxidante [76]. La mayor parte de los ensayos de actividad antioxidante tienen como principio la transferencia de electrones (Folin-Ciocalteu y ABTS^{•+}) o transferencia de átomo de hidrógeno (ORAC) [77].

Ensayos de transferencia de electrón.

Sustancia oxidante + e⁻ proveniente del antioxidante → oxidante reducido + antioxidante oxidado.

Ensayos de transferencia de protón.

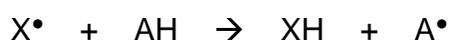




2.8.1 Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

El ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) se aplica a una amplia gama de muestras que incluyen productos alimenticios, bebidas y plasma sanguíneo. También, este ensayo se ha aplicado a muestras de naturaleza compleja y para ingredientes usados en la industria cosmética entre otras [78].

El método se basa en la habilidad que tienen los compuestos antioxidantes para bloquear radicales libres, por medio de la donación de un átomo de hidrógeno:



El ensayo ORAC consiste en medir la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína en el tiempo, como resultado del daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido (ROO^{\bullet}). Este método mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la fluoresceína del daño oxidativo [79].

2.8.2 Medición de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

El método Folin-Ciocalteu se utiliza, generalmente, para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos. El método está basado en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol y forman complejos fosfomolibdico y fosfotúngstico. La transferencia de electrones, a pH básico, reduce los complejos fosfomolibdico y fosfotúngstico en óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), cromógenos de color azul, cuya intensidad es proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula [80].

2.8.3 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

El ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}, es un método de transferencia de electrón, por medio del cual se mide la actividad antioxidante a compuestos antioxidantes lipofílicos o hidrofílicos; en este grupo se incluyen hidroxicinamatos, carotenóides, antioxidantes del plasma y flavonoides [81].

El catión-radical ABTS^{•+} de color verde-azulado, es producido por medio de la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$). El ensayo se basa en la disminución de la absorbancia del catión-radical del ácido ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Este cambio en el valor de absorbancia se debe a la reducción que presenta el catión-radical, por la transferencia de electrón, desde la muestra al catión-radical ABTS^{•+}. La absorbancia se mide a una longitud de onda

de 734 nm. El esquema de reacción del catión-radical ABTS^{•+} se muestra a continuación [77]:



2.9 Caracterización química

2.9.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases (GC) es un método de separación de mezclas. Se fundamenta en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases, una fase móvil, que es gaseosa, y una fase estacionaria, que puede ser líquida o sólida. Los mecanismos de separación en la cromatografía de gases varían según la fase estacionaria utilizada para el proceso de separación. En GC, se utilizan columnas que son la herramienta de separación, recubiertas de polímeros de diferente polaridad. La elución de los analitos que se desplazan por la columna en dirección de la fase móvil, dependerá de las afinidades de los analitos por la fase estacionaria [82].

Es una técnica utilizada en muchas ramas de la ciencia; tiene su fortaleza más grande en la determinación de cuántos componentes y en qué proporción se encuentran en una mezcla. Generalmente, está acoplada a un detector espectrométrico de masas (MS), que permite obtener el espectro de masas de la molécula, que proporciona información sobre su masa molecular, composición elemental (si se usan espectrómetros de masas de alta resolución) y grupos funcionales presentes [83].

La MS requiere ionización de la molécula; este proceso sucede en la cámara de ionización y puede darse por ionización por impacto de electrones (EI), ionización química (CI), ionización por campo (FI) o fotoionización (PI); aunque, generalmente, para la fase gaseosa, se utiliza impacto con electrones. Una vez formados los iones, se separan, según su relación de m/z , en el analizador de masas. El detector de masas se encarga de generar una señal eléctrica [84].

Stashenko *et al.* (2007), mediante GC-MS lograron identificar compuestos a nivel de trazas [85], al igual que estudiar la variación circadiana de flores de *Brugmansia suaveolens*, mediante el monitoreo *in-vivo* por HS-SPME [86]. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas presenta muchas aplicaciones: separar, detectar e identificar compuestos presentes en fragancias florales [87,88], caracterizar fósiles químicos en el petróleo [89], análisis de extractos obtenidos bajo condiciones supercríticas [90,91], analizar compuestos organoclorados en muestras acuosas [92], entre otras aplicaciones.

2.9.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) surgió como una alternativa a la limitación de usar cromatografía de gases para analizar moléculas con ciertas características específicas. HPLC permite analizar moléculas de peso molecular mayor de 400 Da, moléculas polares y termolábiles. Asimismo, HPLC se ha utilizado en la determinación de compuestos polares en extractos de plantas [93] y se considera como una herramienta muy importante para el análisis de metabolitos secundarios presentes en un sistema biológico, como los flavonoides. Para el análisis de metabolitos secundarios, se utiliza principalmente cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), en donde la polaridad de la fase estacionaria es menor que la de la fase móvil, lo que permite separar las moléculas con base en su polaridad; en fase reversa el tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, en comparación con las de carácter polar que eluyen con mayor rapidez [94].

HPLC es una técnica de separación de analitos, cuyo principio se basa en la transferencia de masa entre la fase estacionaria y la fase móvil. Después de disolver la muestra, los analitos se arrastran a lo largo de la columna, a una alta presión. Según las interacciones que presenten los analitos con las fases estacionaria y móvil, será el orden de salida de la columna cromatográfica.

Algunos de los detectores utilizados en cromatografía líquida son UV-Vis (Ultravioleta visible), DAD (Detector de arreglo de diodos), MS (Espectrómetro de masas). HPLC, al permitir el análisis de moléculas de alto peso molecular, termolábiles y polares, es aplicable a un amplio rango de moléculas. HPLC se ha utilizado para el análisis de biomoléculas [95], alcaloides [96], compuestos polifenólicos [97], que poseen anillos aromáticos, electrones tipo π , y, tras ser excitados por la luz ultravioleta, generan transiciones a longitudes de onda específicas, produciendo una respuesta en el detector de UV-Vis y DAD [98].

3. METODOLOGÍA

3.1 Materiales, reactivos y equipos utilizados

3.1.1 Reactivos

AAPH (clorhidrato de 2,2'-azo-bis-(2-amidino-propano), 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

ABTS (sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.

Acetato de sodio (99%, Merck, Darmstadt, Alemania).

Acetonitrilo grado LC-MS, 99.9%, Honeywell Burdick & Jackson, New Jersey, EE.UU.

Ácido acético, 99.9%, Merck, Darmstadt, Alemania.

Ácido clorhídrico, 37%, Merck, Darmstadt, Alemania.

Ácido fórmico, 98%, Merck, Darmstadt, Alemania.

Ácido gálico, 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.

BHT (Butilhidroxitolueno), Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.

Cianidina, 99%, PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Alemania.

Cianidina-3-glucósido, 99%, PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Alemania.

Cianidina-3-rutinósido, 99%, PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Alemania.

Cloruro de potasio, 99.5%, Merck, Darmstadt, Alemania.

Etanol (99.9%, Merck, Darmstadt, Alemania).

Fluoresceína, [benzoato disódico de 2-(3-oxo-6-óxido-3H-xanten-9-il)], 99%, Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.

Galato de epigallocatequina, 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.

Hidróxido de sodio, 99%, Merck, Darmstadt, Alemania.

Metanol, 99.9%, Merck, Darmstadt, Alemania.

Pelargonidina-3-glucósido, 99%, PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Alemania.

Persulfato de potasio, PDS, 97%, Merck, Darmstadt, Alemania.

Quercetina-3-ramnosa, 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.

Quercetina-3-rutinósido, 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.

Reactivo de Folin-Ciocalteu, 2N, Merck, Darmstadt, Alemania.

n-Tetradecano, ISTD, 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.

n-Hexadecano, ISTD, 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.

α -Tocoferol, 96%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.

Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico), 97%, Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.

3.1.2 Material

Fibra de poli(dimetilsiloxano) (PDMS), 100 μ m, código de color: rojo; Supelco; St. Louis, MO, EE.UU.

Fibra de poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS/DVB), 65 μ m, código de color: azul; Supelco; St. Louis, MO, EE.UU.

Fibra de carboxen/poli(dimetilbenceno) (CAR/PDMS), 85 μ m, código de color: celeste; Supelco. St. Louis, MO, EE.UU.

3.1.3 Equipos menores

Balanza analítica, Mettler Toledo AL204, Greifensee, Suiza.

Plancha de calentamiento, rango: 0-500 °C; modelo 505-03-1; serie 81250694; Heidolp MR-Hei Standard, Nuremberg, Alemania.

3.2 Recolección del material vegetal

Las flores de *Petrea volubilis* L., se recolectaron en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), localizado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga-Colombia).

3.3 Identificación taxonómica del material vegetal

Se prepararon las respectivas *exsiccatae* de la inflorescencia, tallos y hojas de la especie bajo estudio, *P. volubilis* L., que se cultivaron en las parcelas experimentales del Complejo Piloto CENIVAM. Las *exsiccatae* se enviaron al Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad

Nacional de Colombia en Bogotá, Colombia, y se guardaron sus copias en el CENIVAM.

3.4 Liofilización de flores de *Petrea volubilis* L.

Las flores de *P. volubilis* L., se llevaron a un liofilizador de bandejas *Virtis Advance Plus*, *SP scientific*, New York, EE.UU.). Seguidamente, el material liofilizado, para disminuir el tamaño de partícula, se colocó en una licuadora (*Oster*, ref: BPST02-B00-012, *Sunbeam Products, Inc.*, Tlalnepantla, México) y posteriormente, el material vegetal se tamizó, para dar homogeneidad a la muestra; finalmente, se almacenó en recipientes color ámbar para evitar que los compuestos fotosensibles pudieran degradarse.

3.5 Determinación de la fracción volátil de flores de *Petrea volubilis* L.

3.5.1 Microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza

Para realizar la microextracción en fase sólida (**Figura 11**), se siguió la metodología propuesta por Stashenko *et al.* (2013) [99]. El material vegetal recolectado se utilizó en fresco; la flor de *P. volubilis* L. (ca. 1.5 g) se depositó en un vial (15 mL), color ámbar, sellado, y se acondicionó a 40 o 60 °C durante 10 min. La extracción se llevó a cabo mediante la exposición de la fibra de SPME, recubierta con PDMS/DVB, PDMS o CAR/PDMS, en el interior del vial durante 30 min.

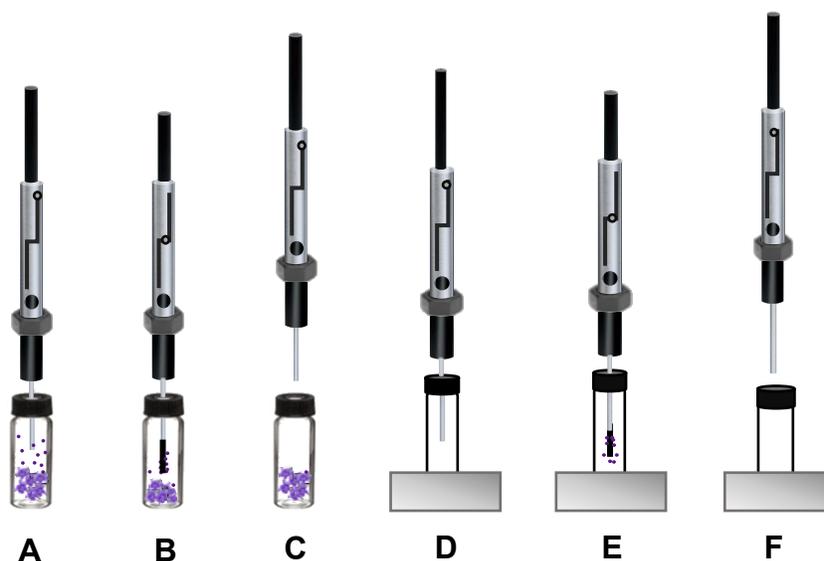


Figura 11. Procedimiento de extracción por HS-SPME [100]. A. Perforación del *septum*; B. Exposición de la fibra al espacio de cabeza; C. Retracción de la fibra del vial; D. Perforación del *septum* del puerto de inyección del cromatógrafo de gases; E. Desorción de la fibra dentro del puerto de inyección; F. Retiro de la fibra del puerto de inyección.

El muestreo por HS-SPME se realizó a diferentes horas del día (6:00 a.m.; 12:00 m.; 6:00 p.m.), por triplicado. El estándar interno, *n*-hexadecano (ca. 2 mg), se incorporó mediante la exposición de la fibra SPME durante 3 min a 60 °C; posteriormente, la fibra SPME se llevó al interior del vial con las flores de *P. volubilis* L.

3.6 Obtención de extractos

Los extractos de flores de *P. volubilis* L., se obtuvieron por extracción con fluido supercrítico (SFE), dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y extracción con solvente (SE).

3.6.1 Extracción con fluido supercrítico

La SFE se realizó en un equipo a escala piloto modelo *Thar SFE-2000-2-FMC50* (*Thar Instruments*, Inc, Pittsburgh, PA, EE.UU.), como solvente supercrítico se utilizó CO₂ y como co-solvente, etanol. El equipo de extracción tiene un portamuestra de acero inoxidable con una capacidad de 2x10⁻³ m³, además, posee un sistema de colección y separación de los extractos tipo ciclón, con capacidad de 5x10⁻⁴ m³, un regulador automático e independiente para la temperatura y la presión. Para el CO₂ se usó una bomba de alta presión (P-200A) y un medidor de flujo *Sitrans FC Massflo tipo MASS6000* (*Siemens AG*, Berlin, Alemania). Para la extracción de flavonoides se utilizó la metodología propuesta por Paes *et al.* (2014) [101]; los parámetros utilizados aparecen descritos en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Condiciones del proceso de extracción de flavonoides por SFE.

| Parámetro | Valor |
|----------------------------------|-------------|
| Material vegetal, g | 100 |
| Presión, bar | 200 |
| Temperatura, K | 313 |
| Flujo de CO ₂ , g/min | 0.105 |
| Tiempo de extracción, h | 2 |
| Co-solvente | Etanol, 10% |

3.6.2 Dispersión de la matriz en fase sólida

Para la extracción de polifenoles por MSPD, se utilizó la metodología propuesta por Xiao *et al.* (2004) [63] con algunas modificaciones, entre ellas, la relación material vegetal y el soporte sólido, 1:1. Para la extracción MSPD (Véase **Figura 12**), en un mortero, se agregaron material liofilizado (ca. 0.5 g), soporte sólido, sílice modificada con C₁₈ (ca. 0.5 g); se agregó luego el agente dispersante (MeOH, 1.0 mL); posteriormente, para homogeneizar la muestra se procedió a macerarla por 30

min. Por otro lado, se preparó una columna con un filtro de algodón y una pre-columna formada por sílice-C₁₈ (ca. 1.0 g).

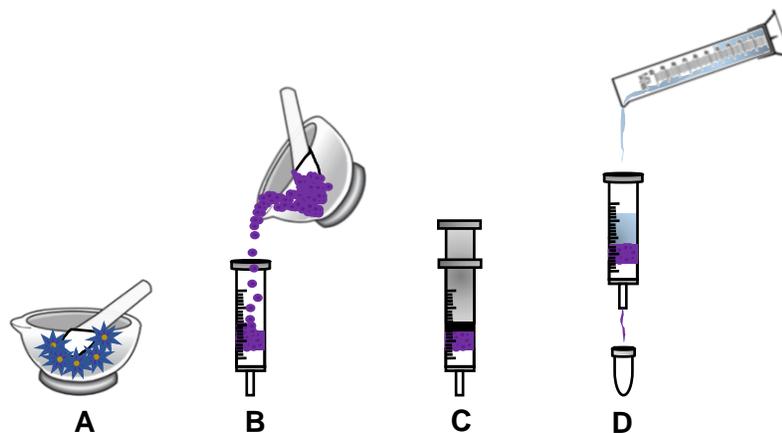


Figura 12. Esquema para la extracción en MSPD: A. Muestra, soporte sólido y agente dispersante. B. Transferencia de la muestra homogeneizada a la columna. C. Compresión de la muestra en la columna. D. Elución de analitos. Tomado, con modificaciones, de Xiao *et al.* (2004) [63].

El material vegetal homogeneizado se agregó a la columna donde, con ayuda de un émbolo, se compactó la muestra; seguidamente, se agregó el solvente de elución MeOH-H₂O (90:10 v/v %, 10 mL). El extracto obtenido se evaporó hasta sequedad con una corriente de N₂ y se reconstituyó en fase móvil para su análisis por LC-MS.

3.6.3 Extracción con solvente

Para la extracción con solvente (SE) se utilizó la metodología propuesta por Shuelter *et al.* (2006), con algunas modificaciones [102]. Con el fin de determinar las mejores condiciones de extracción se realizó un diseño experimental 2³ con cuatro réplicas en el centro, con tres variables, a saber: relación EtOH:H₂O, porcentaje de ácido clorhídrico y temperatura de extracción. El observable fue el contenido de antocianinas monoméricas totales. En la **Tabla 3**, se pueden apreciar los niveles para cada una de las variables de estudio.

Tabla 3. Variables y condiciones de extracción estudiadas en el diseño experimental.

| Variable | Niveles evaluados | | |
|---|-------------------|-----------|----------|
| | Bajo (-1) | Medio (0) | Alto (1) |
| X1: Relación EtOH:H ₂ O, v/v | 3:1 | 5:1 | 7:1 |
| X2: HCl, % | 0.0 | 0.5 | 1.0 |
| X3: Temperatura, °C | 30 | 40 | 50 |

Tabla 4. Condiciones de extracción con solvente, de flores de *P. volubilis* L.

| N° | X1 | X2 | X3 |
|----|----|----|----|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | -1 | 1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | -1 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | -1 | -1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | 1 | 1 | -1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 |

Para la obtención de los extractos, se prepararon soluciones, según las especificaciones para cada experimento (Véase **Tabla 4**), seguidamente, el material previamente liofilizado (ca. 1.0 g) se pesó en un recipiente de color ámbar y se agregó la solución EtOH:H₂O (20 mL); posteriormente, las extracciones se llevaron a cabo en un baño de ultrasonido (*Elmasonic S 15 H*, Singen, Alemania), a las temperaturas establecidas para cada experimento, por 15 min. Los extractos obtenidos se rotoevaporaron (*Heidolph, Hei-VAP, Advantage HL*, Chicago, EE.UU.). Seguidamente, se liofilizaron (*Virtis Advance Plus, SP Scientific*, New York, EE.UU.) y, finalmente, los extractos obtenidos por SE se almacenaron a una temperatura de 4 °C.

3.7 Antocianinas monoméricas totales

La determinación de las antocianinas monoméricas totales se realizó siguiendo la metodología planteada por Guisti *et al.* (2003) [103], se prepararon dos soluciones *buffer*, a saber: cloruro de potasio con ácido clorhídrico (pH= 1.0) y ácido acético con acetato de sodio (pH= 4.5). Se tomó extracto (1.2 mg) y se diluyó en cada una de las soluciones *buffer*. Las mediciones de absorbancia se efectuaron en un espectrofotómetro (6300 *Spectrophotometer*, JENWAY, Burlington, EE.UU.), para cada muestra y el blanco (*buffer*), a las longitudes de onda de 520 y 700 nm. La absorbancia total (A_T) se calculó, mediante la **Ecuación 1**; por medio de la **Ecuación 2**, se determinó el contenido total de antocianinas monoméricas totales, expresado en mg/L.

$$A_T = (A_{500nm} - A_{700nm})_{pH\ 1.0} - (A_{500nm} - A_{700nm})_{pH\ 4.5} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{Antocianinas monoméricas, mg/L} = \frac{A_T \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Ecuación 2

Donde:

- A_T - Absorbancia total
- PM - Peso de la antocianina delfinidina 3-glucósido a evaluar (465,1013 g/mol)
- FD - Factor de dilución
- ε - Absortividad molar de la delfinidina 3-glucósido, 23700 L*mol/cm⁻¹ [67].
- l - Ancho de la celda

3.8 Capacidad antioxidante y contenido total de fenoles

3.8.1 Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

Siguiendo la metodología propuesta por Ou, *et al.* (2002) [79], con algunas modificaciones se realizó la determinación de la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC). Cada uno de los extractos se diluyó en *buffer* fosfato (pH= 7.4). Seguidamente, en cada uno de los pozos de la microplaca, se depositaron extracto diluido (25 μL) y fluoresceína (150 μL), los 96 pozos se incubaron a 37 °C durante 20 min, en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader* (*Turner Biosystems*, California, EE.UU), en modo fluorescencia. Posteriormente, se agregó rápidamente la solución de AAPH. La lectura de la pérdida de la fluorescencia en la microplaca se llevó a cabo durante 80 min a 37 °C, a las longitudes de onda de emisión de 510 nm y de excitación de 490 nm. Se prepararon los respectivos blancos de las microplacas. Para ello, se siguió el procedimiento anteriormente mencionado, intercambiando muestra (25 μL) por solución *buffer* fosfato (pH= 7.4). La capacidad antioxidante de las muestras se determinó a través de las diferencias de áreas bajo las curvas del blanco y de la muestra (**Ecuación 3**), se cuantificó con respecto a una curva de calibración de Trolox® y los resultados se expresaron como μmol Trolox®/g de sustancia. También, se midió la actividad antioxidante del α-tocoferol y del BHT. Los resultados obtenidos se compararon con los registrados para las muestras.

$$ABC_{\text{neta}} = ABC_{\text{muestra}} - ABC_{\text{blanco}}$$

Ecuación 3

3.8.2 Medición de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Para la determinación del contenido total de fenoles, se utilizó la metodología descrita por Cala *et al.* (2007) [76], con algunas modificaciones. Se realizó una curva de calibración del ácido gálico (AG), y los resultados del contenido fenólico se expresaron como mg AG/ g de sustancia. Se prepararon el reactivo de Folin-Ciocalteu (2N) y una solución de hidróxido de sodio 0.35 M. Los extractos se diluyeron en agua tipo 1; en cada pozo de la placa se agregaron: muestra (50 μ L), reactivo de Folin-Ciocalteu (50 μ L) e hidróxido de sodio 0.35 M (100 μ L). Las mediciones se realizaron en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., ModulusTM II Microplate Multimode Reader* (*Turner Biosystems*, California, EE.UU) en modo absorbancia a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados obtenidos se compararon con la curva de calibración realizada con ácido gálico (AG).

3.8.3 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

Para la realización del ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}, se siguió la metodología propuesta por Re *et al.* (1999) [81], con algunas modificaciones. Inicialmente, se preparó una solución *buffer* de acetato de sodio (pH= 4.5), seguidamente, en un balón de 50 mL se adicionaron ABTS (7 mM), persulfato de potasio (2.45 mM) y se aforó con *buffer*. Posteriormente, la mezcla se llevó a baño ultrasónico por 30 min, el recipiente se cubrió con papel aluminio y se almacenó a 4 °C por 24 h, esto con el fin de estabilizar el ABTS^{•+}. Una vez transcurridas las 24 h, se tomaron 900 μ L de ABTS^{•+}, y se diluyeron en solución *buffer* hasta lograr una lectura de absorbancia de 0.71. Una vez estabilizada la absorbancia de la solución, ésta se almacenó durante 30 min, para su posterior uso. Seguidamente, se tomaron 100 mg de extracto y se diluyeron en etanol (2 mL), la mezcla se llevó a ultrasonido (30° C y 30 min). Las determinaciones de absorbancia se hicieron en un microlector de placas (*Turner Biosystems*, California, EE.UU), en modo de absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Por último, se realizó una curva de calibración con Trolox[®] y se determinó el porcentaje de inhibición, mediante la **Ecuación 4**.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \times 100\%$$

Ecuación 4

3.9 Caracterización de metabolitos y técnicas instrumentales

3.9.1 Condiciones de operación cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Según la metodología propuesta por Stashenko *et al.* (2011) [104], la separación e identificación de los metabolitos secundarios volátiles se realizó en un equipo GC *Agilent Technologies 7890 Series* (AT, Palo Alto, California, EE.UU.) (Véase **Figura 13**), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975C*. La separación se llevó a cabo en una columna capilar con fase estacionaria (f.e.) polar de poli(etilenglicol) (DB-WAX, *J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 µm, df. Helio (99.995 %, AP, Linde, Colombia) se empleó como gas de arrastre, con presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.90 psi y velocidad volumétrica de flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector fue de 250 °C, modo de inyección-*splitless*, con desorción de la fibra SPME durante 5 min en el puerto de inyección. La programación del horno cromatográfico fue desde 50 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min) a 5 °C/min, después hasta 230 °C por 35 min, a 5 °C/min. La velocidad lineal media del gas fue de 25 cm/s. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 285 °C, respectivamente. Los iones fragmento en los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI) 70 eV, en un rango de masas de *m/z* 30-300 u.m.a., con una velocidad de barrido de radiofrecuencia de 4 *scans/s*.

La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de los índices de retención lineales (LRI) experimentales, los espectros de masas obtenidos experimentalmente, con los reportados en las bases de datos WILEY, NIST y ADAMS, esto, para la identificación tentativa; la identificación confirmatoria se basó en el uso de sustancias de referencia certificadas.

Los índices de retención lineales experimentales se calcularon con base a los tiempos de retención de hidrocarburos lineales, *n*-C₅-*n*-C₂₅. Los cálculos se realizaron mediante la **Ecuación 5** [105].

$$\text{LRI} = 100n + 100 \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde,

LRI - Índice de retención lineal del compuesto de interés.

n - Número de átomos de carbono de la *n*-parafina que eluye antes del compuesto de interés.

- N - Número de átomos de carbono en la n -parafina que eluye después del compuesto de interés.
- t_{Rx} - Tiempo de retención del compuesto de interés.
- t_{Rn} - Tiempo de retención de la n -parafina que eluye antes del compuesto de interés.
- t_{Rn} - Tiempo de retención de la n -parafina que eluye después del compuesto de interés.



Figura 13. Cromatógrafo de gases GC *Agilent Technologies 7890 Series* (AT, Palo Alto, California, EE.UU.). Fotografía tomada por autora el 1 de agosto de 2016. Lugar, CROMMASS-UIS, Bucaramanga, Colombia.

3.9.2 Condiciones de operación de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Los extractos se analizaron en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia, HPLC (*Agilent Technologies*, Palo Alto California, EE.UU.), con interfaz de electronebulización, ESI, operada en modo positivo, acoplado a un espectrómetro de masas MSD con analizador de tiempo de vuelo (TOF MS 6210, AT, Palo Alto, CA, EE.UU.), con una bomba binaria *Agilent Technologies* de gradiente (G1312A) (**Figura 14**).

Se usaron una columna *Kinetex C₁₈* (*Phenomenex*, Torrance, California, EE.UU.) de 100 mm × 4.6 mm d.i., 2.6 μm de tamaño de partícula; fase móvil A, agua (0.2% ácido fórmico) y fase móvil B, acetonitrilo (0.2% ácido fórmico); con el siguiente gradiente: 90% de A y 10% de B, variando linealmente hasta 20% de B, en 5 min,

seguidamente, 80% de B en 10 min, por 5 min, seguidamente 100% de B en 5 min, y durante 5 min; las condiciones iniciales se retomaron en 15 min. El flujo fue de 0.2 mL/min, volumen de inyección (4 μ L), el voltaje de capilar fue 4000 V y el voltaje de fragmentador, 200 V. Se utilizó N₂ como gas de secado (350 °C, 7 L/min) y gas nebulizador (40 psi). Los espectros de masas, se adquirieron en el rango de m/z 100 a 1100, a una velocidad de adquisición de 2 espectros/s. Los resultados obtenidos se procesaron en el software *MassHunter*, versión B.02.00-SP3. La identificación de los compuestos, se confirmó mediante la medición de masas exactas, por comparación de tiempos de retención con patrones certificados y por exactitud Δ ppm.



Figura 14. Cromatógrafo líquido, HPLC 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). Lugar: Laboratorio CROMMASS, CENIVAM, Bucaramanga, Colombia.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Identificación taxonómica de *P. volubilis* L.

Se realizó la identificación botánica de la especie bajo estudio, que se cultivó en los jardines experimentales del CENIVAM. Las respectivas *exsiccatae* de las inflorescencias, hojas y tallos de *Petrea volubilis* L., se enviaron al Herbario de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá-Colombia), y se guardaron sus copias en el CENIVAM. En la **Tabla 5**, se encuentra el resultado suministrado por el Herbario Nacional de Colombia.

Tabla 5. Identificación taxonómica del material vegetal.

| | |
|-------------------------|--------------------------------|
| Especie | <i>P. volubilis</i> L. |
| Familia | Verbenaceae |
| Nº Voucher | 569628 |
| Lugar de colecta | CENIVAM, Bucaramanga, Colombia |

4.2 Identificación de metabolitos volátiles de flores de *Petrea volubilis* L.

4.2.1 Extracción por HS-SPME de la fracción volátil de flores de *P. volubilis* L. con fibras de SPME con diferentes recubrimientos poliméricos

La extracción por HS-SPME se realizó siguiendo la metodología descrita en la **Sección 3.5.1**; los metabolitos volátiles aislados se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), siguiendo los parámetros operacionales mencionados en la **Sección 3.9.1**. La fracción volátil de las flores de *P. volubilis* L. se obtuvo a través de la exposición de fibras de SPME con los siguientes recubrimientos poliméricos: PDMS, PDMS/DVB y CAR/PDMS, usados bajo las mismas condiciones. En la **Figura 15**, se muestra un perfil cromatográfico obtenido para las tres fibras de SPME. La identificación de los compuestos aislados se encuentra en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Análisis por GC-MS del perfil volátil obtenido por HS-SPME (Fibras: PDMS, PDMS/DVB y CARPDMS) de flores de *Petrea volubilis* L.

| Compuesto | LRI, DB-WAX | | A_i/A_{Istd} (prom \pm SD, $n=3$) | | |
|---|-------------|-----------------------|--|---------------------|-------------------|
| | Exp. | Lit. ^[106] | PDMS | PDMS/DVB | CAR/PDMS |
| β -Mirceno | 1162 | 1160 | - | 0.0298 \pm 0.0001 | 0.17 \pm 0.03 |
| Δ^3 -Careno | 1182 | 1133 | - | 0.008 \pm 0.002 | 0.025 \pm 0.003 |
| Limoneno | 1200 | 1198 | 0.0060 \pm 0.0001 | 0.04 \pm 0.02 | 0.13 \pm 0.02 |
| 2-Hexenal | 1216 | 1216 | 0.0085 \pm 0.0002 | 0.0577 \pm 0.0003 | 0.05 \pm 0.01 |
| <i>cis</i> - β -Ocimeno | 1230 | 1234 | 0.008 \pm 0.001 | - | 0.07 \pm 0.01 |
| <i>trans</i> - β -Ocimeno | 1249 | 1250 | 0.08 \pm 0.01 | 0.3 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.2 |
| Octan-3-ona | 1253 | 1254 | 0.12 \pm 0.02 | 0.023 \pm 0.001 | 0.10 \pm 0.03 |
| 3-Isopropenil-5,5-dimetil-ciclopenteno | 1264 | - | - | 0.007 \pm 0.004 | 0.024 \pm 0.005 |
| <i>p</i> -Cimeno | 1272 | 1270 | - | 0.0036 \pm 0.0001 | 0.016 \pm 0.003 |
| Terpinoleno | 1283 | 1282 | - | 0.007 \pm 0.004 | 0.03 \pm 0.01 |
| Octanal | 1287 | 1287 | - | 0.008 \pm 0.002 | 0.022 \pm 0.002 |
| Oct-1-en-3-ona | 1299 | 1301 | 0.04 \pm 0.01 | 0.130 \pm 0.046 | 0.14 \pm 0.05 |
| (<i>E</i>)-4,8-Dimetil-1,3,7-nonatrieno | 1304 | - | - | 0.08 \pm 0.05 | 0.10 \pm 0.04 |
| Pent-2-en-1-ol | 1314 | 1315 | - | 0.012 \pm 0.009 | 0.023 \pm 0.006 |
| 1-Hexanol | 1348 | 1351 | - | 0.0063 \pm 0.0005 | 0.05 \pm 0.03 |
| <i>cis</i> -2-Octen-1-ol | 1353 | - | - | - | 0.008 \pm 0.003 |
| Pent-3-en-2-ol | 1364 | - | 0.0066 \pm 0.0001 | 0.005 \pm 0.003 | 0.005 \pm 0.002 |
| <i>allo</i> -Ocimeno | 1371 | 1366 | 0.006 \pm 0.003 | 0.063 \pm 0.026 | 0.09 \pm 0.02 |
| <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 1380 | 1380 | 0.004 \pm 0.002 | 0.012 \pm 0.008 | 0.22 \pm 0.07 |
| Octan-3-ol | 1387 | 1391 | 0.013 \pm 0.004 | - | 0.2 \pm 0.1 |
| <i>allo-neo</i> -Ocimeno | 1394 | 1391 | 0.016 \pm 0.001 | 0.06 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.02 |
| <i>trans</i> -2-Hexen-1-ol | 1400 | 1399 | - | 0.0075 \pm 0.0001 | 0.04 \pm 0.02 |
| 2-Metilbutanoato de hexilo | 1427 | 1428 | - | 0.023 \pm 0.001 | 0.01 \pm 0.02 |
| Oct-1-en-3-ol | 1446 | 1444 | 0.3 \pm 0.1 | 1.1 \pm 0.5 | 4 \pm 2 |

Tabla 6. Continuación.

| | | | | | |
|---|------|------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Butanoato de <i>cis</i> -hex-3-enilo | 1460 | 1456 | - | 0.007 ± 0.003 | 0.057 ± 0.005 |
| 2-Metilbutanoato de <i>cis</i> -hex-3-enilo | 1473 | - | 0.03 ± 0.02 | | 0.3 ± 0.1 |
| 5- <i>terc</i> -Butil-1-ciclohepteno | 1479 | - | - | 0.004 ± 0.002 | 0.006 ± 0.001 |
| Valerato de <i>cis</i> -hex-3-enilo | 1487 | - | 0.016 ± 0.003 | 0.011 ± 0.003 | 0.02 ± 0.01 |
| α-Copaeno | 1503 | 1491 | 0.0029 ± 0.0004 | 0.008 ± 0.002 | 0.009 ± 0.003 |
| Benzaldehído | 1527 | 1518 | 0.004 ± 0.001 | 0.007 ± 0.004 | 0.004 ± 0.003 |
| Linalol | 1539 | 1543 | 0.9 ± 0.1 | 0.9 ± 0.3 | 5.0 ± 0.3 |
| Octanol | 1550 | 1551 | 0.012 ± 0.005 | 0.06 ± 0.05 | 0.05 ± 0.01 |
| 3-Metil-pentadecano | 1559 | - | 0.0036 ± 0.0004 | 0.0033 ± 0.0001 | 0.005 ± 0.001 |
| <i>trans</i> -β-Cariofileno | 1614 | 1598 | 0.008 ± 0.001 | 0.023 ± 0.005 | 0.04 ± 0.01 |
| Non-1-en-3-ol | 1644 | - | - | 0.004 ± 0.003 | 0.02 ± 0.01 |
| 1-Nonanol | 1655 | 1655 | 0.004 ± 0.001 | 0.04 ± 0.02 | 0.024 ± 0.009 |
| Angelato de <i>cis</i> -hex-3-enilo | 1669 | - | 0.005 ± 0.002 | 0.004 ± 0.001 | 0.022 ± 0.002 |
| <i>cis</i> -Non-3-en-1-ol | 1681 | - | - | 0.005 ± 0.002 | 0.006 ± 0.004 |
| α-Terpineol | 1699 | 1694 | 0.027 ± 0.002 | 0.004 ± 0.001 | 0.008 ± 0.004 |
| Acetato de geranilo | 1747 | 1751 | 0.0039 ± 0.0001 | 0.010 ± 0.004 | 0.0126 ± 0.0003 |
| Farnesol | 1778 | - | - | 0.0017 ± 0.0003 | 0.005 ± 0.001 |
| Salicilato de metilo | 1786 | 1767 | 0.0045 ± 0.0001 | 0.16 ± 0.07 | 0.02 ± 0.01 |
| Nerol | 1795 | 1794 | - | 0.0044 ± 0.0003 | 0.011 ± 0.004 |
| (<i>E,E</i>)-α-Farneseno | 1805 | 1743 | 0.004 ± 0.001 | 0.03 ± 0.01 | 0.03 ± 0.01 |
| Geraniol | 1842 | 1839 | 0.0025 ± 0.0001 | 0.005 ± 0.002 | 0.013 ± 0.001 |
| Alcohol feniletílico | 1914 | 1903 | 0.0031 ± 0.0001 | 0.02 ± 0.01 | 0.018 ± 0.005 |
| Benzoato de <i>cis</i> -hex-3-enilo | 2137 | 2119 | - | 0.005 ± 0.002 | 0.005 ± 0.002 |
| Monoterpenos (MH) | | | 0.15 | 0.59 | 2.23 |
| Monoterpenos oxigenados (MO) | | | 0.95 | 0.97 | 5.11 |
| Sesquiterpenos (SH) | | | 0.016 | 0.06 | 0.08 |
| Sesquiterpenos oxigenados (SO) | | | 0.003 | 0.01 | 0.03 |
| Compuestos oxigenados (otros) | | | 0.50 | 1.59 | 5.02 |

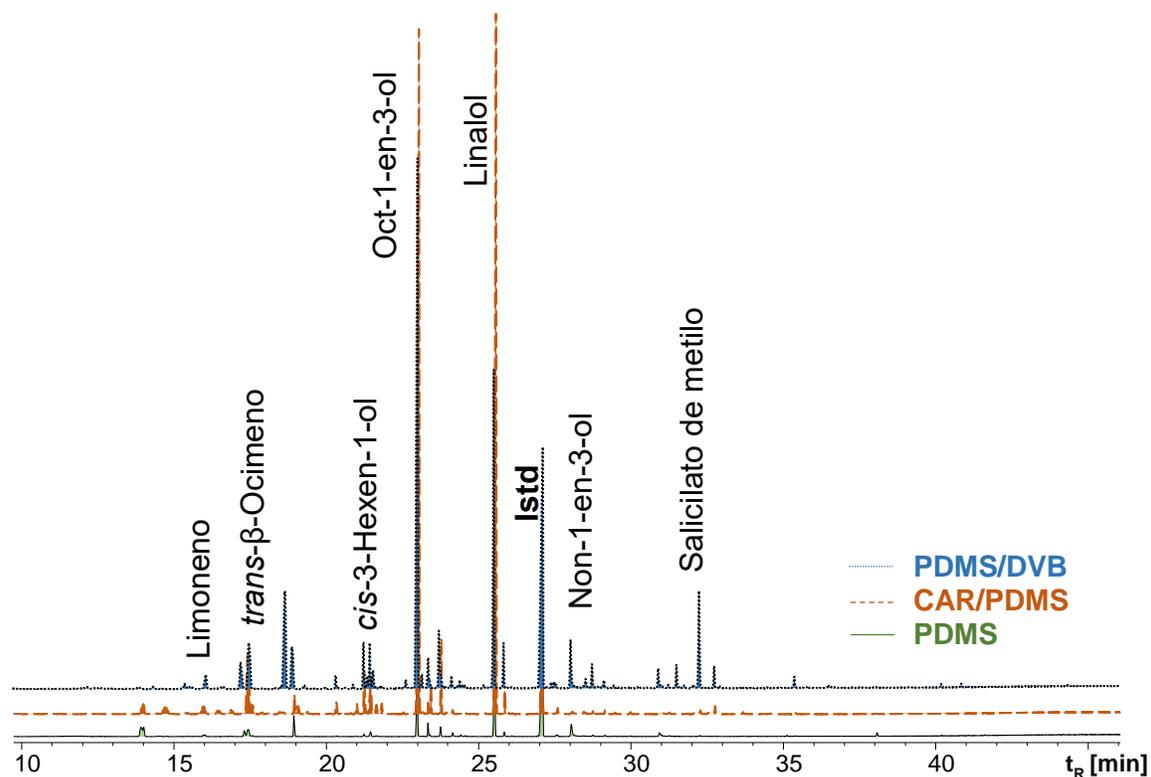


Figura 15. Perfil cromatográfico de la fracción volátil aislada por HS-SPME de flores de *P. volubilis* L., utilizando fibras con diferentes recubrimientos poliméricos (PDMS; PDMS/DVB; CAR/PDMS). Columna DB-WAX (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.), de 60 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 μ m, d_f , detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*.

En la **Figura 16**, se muestra la variación del valor de $\Sigma A_{total}/A_{Istd}$ para los metabolitos secundarios de flores de *P. volubilis* L., aislados por HS-SPME, utilizando fibras con diferentes recubrimientos poliméricos: PDMS, PDMS/DVB y CAR/PDMS. El valor más alto de $\Sigma A_{total}/A_{Istd}$, se obtuvo con la fibra de polaridad media-alta, CAR/PDMS; en comparación con la fibra de polaridad de media, PDMS/DVB y de polaridad baja, PDMS. En la fracción volátil de flores de *P. volubilis* L., se encontraron compuestos oxigenados como el 2-hexenal y la octan-3-ona; monoterpenos limoneno, *trans*- β -ocimeno y *allo*-ocimeno; monoterpenos oxigenados linalol; sesquiterpenos oxigenados farnesol; sesquiterpeno *trans*- β -cariofileno. Con la fibra de recubrimiento polimérico de CAR/PDMS, se logró aislar mayor número de metabolitos secundarios. Por tal razón, la fibra que se utilizó para realizar el monitoreo de volátiles florales fue CAR/PDMS.

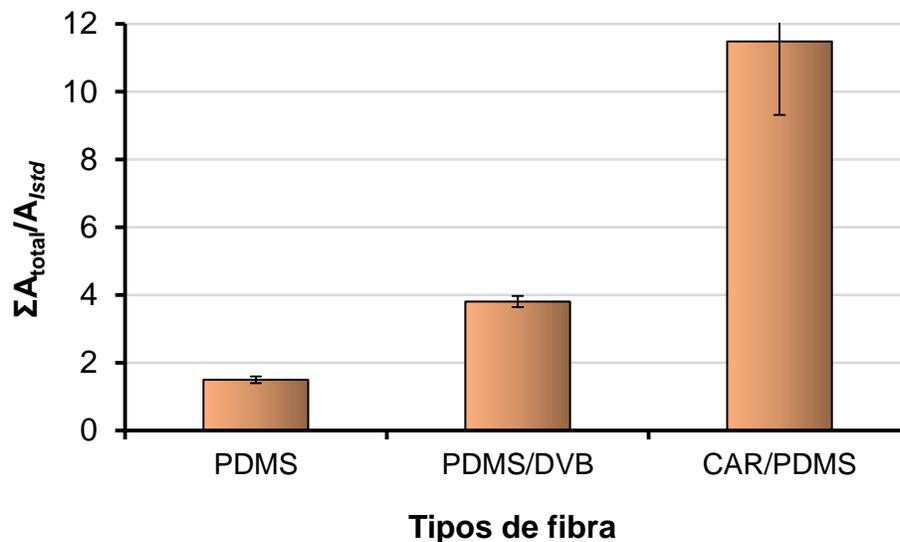


Figura 16. Selección del recubrimiento polimérico de la fibra de SPME: $\Sigma A_{total}/A_{Std}$, aislamiento por HS-SPME, de flores de *P. volubilis* L.

4.2.2 Extracción por HS-SPME (CAR/PDMS) de la fracción volátil de flores de *P. volubilis* L., a diferentes horas del día

El perfil de compuestos volátiles en las plantas, especialmente, hojas y flores puede variar durante el día [86,99,107]. Con el fin de establecer la hora de mayor emisión de metabolitos secundarios en flores de *P. volubilis* L., se realizó un monitoreo de su fragancia *in-vitro* a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m., utilizando como técnica de aislamiento HS-SPME y fibra de CAR/PDMS, que se seleccionó durante el estudio previo de las fibras de SPME (Véase **Sección 4.2.1**). En la **Figura 17**, se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS aislados por HS-SPME (CAR/PDMS) a diferentes horas de monitoreo; la identificación de los picos cromatográficos se registra en la **Tabla 7**.

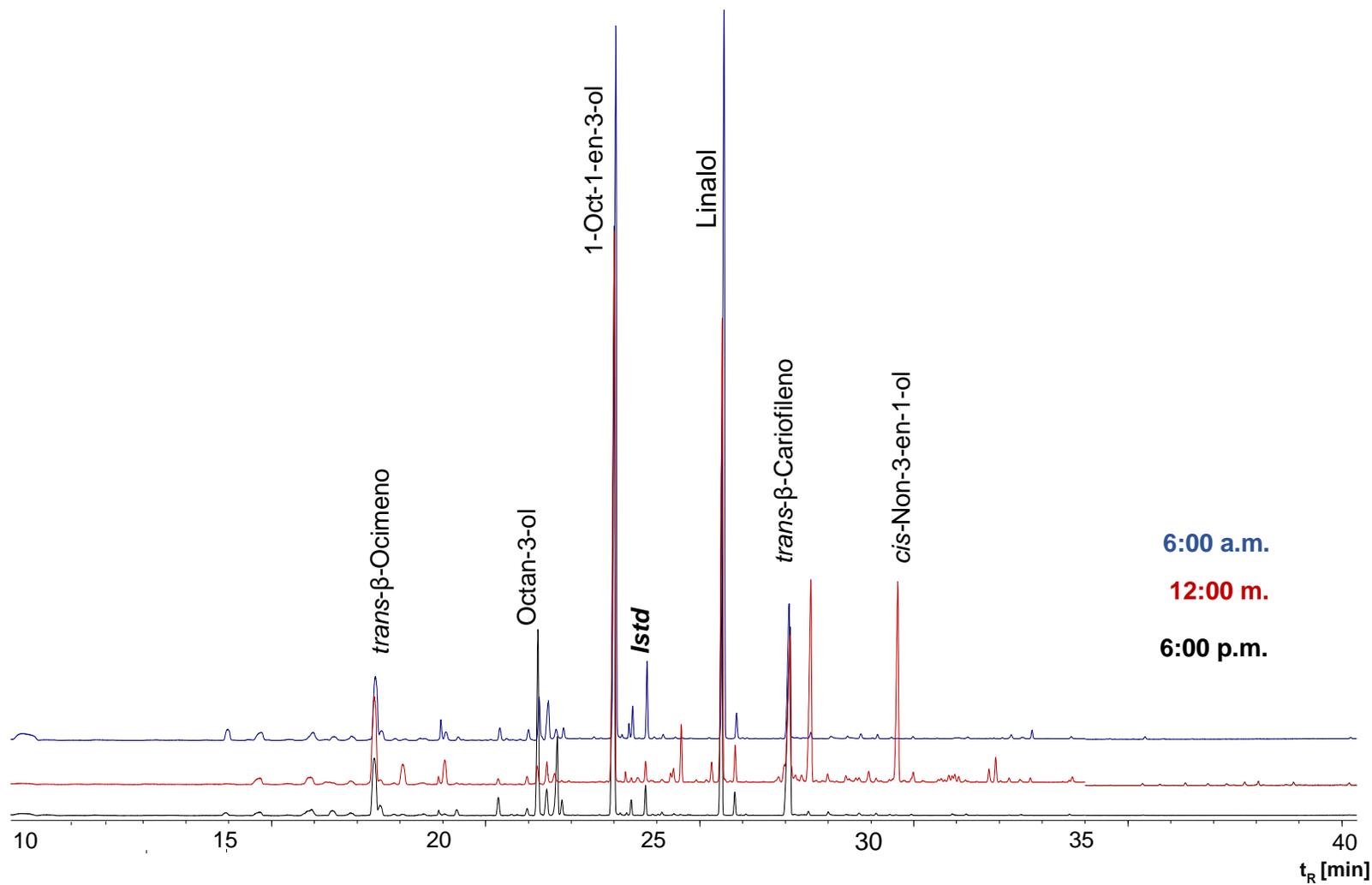


Figura 17. Perfiles cromatográficos de volátiles de flores de *P. volubilis* L., aislados por HS-SPME, utilizando fibra de CAR/PDMS; con muestreo a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m.

Tabla 7. Variación en el contenido de volátiles aislados por HS-SPME (CAR/PDMS) de flores de *P. volubilis* L., a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m.

| Compuesto | A_i/A_{Istd} (prom \pm SD, $n=3$) | | |
|---|--|---------------------|---------------------|
| | 6 a.m. | 12 m. | 6 p.m. |
| β -Mirreno | 0.17 \pm 0.03 | 0.09 \pm 0.01 | 0.04 \pm 0.01 |
| Δ^3 -careno | 0.025 \pm 0.003 | 0.0161 \pm 0.0002 | 0.008 \pm 0.001 |
| Limoneno | 0.13 \pm 0.02 | 0.11 \pm 0.02 | 0.05 \pm 0.02 |
| 2-Hexenal | 0.05 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.01 | 0.031 \pm 0.009 |
| <i>cis</i> - β -Ocimeno | 0.07 \pm 0.01 | 0.049 \pm 0.007 | 0.02 \pm 0.01 |
| <i>trans</i> - β -Ocimeno | 1.2 \pm 0.2 | 1.0 \pm 0.2 | 0.32 \pm 0.09 |
| Octan-3-ona | 0.10 \pm 0.03 | 0.0369 \pm 0.0002 | 0.08 \pm 0.03 |
| 3-Isopropenil-5,5-dimetil-ciclopenteno | 0.024 \pm 0.005 | 0.016 \pm 0.006 | 0.008 \pm 0.002 |
| <i>p</i> -Cimeno | 0.016 \pm 0.003 | 0.188 \pm 0.003 | 0.007 \pm 0.003 |
| Terpinoleno | 0.03 \pm 0.01 | 0.020 \pm 0.002 | 0.007 \pm 0.002 |
| Octanal | 0.022 \pm 0.002 | 0.03 \pm 0.01 | 0.012 \pm 0.005 |
| Oct-1-en-3-ona | 0.14 \pm 0.05 | 0.03 \pm 0.01 | 0.024 \pm 0.006 |
| (<i>E</i>)-4,8-Dimetil-1,3,7-nonatrieno | 0.10 \pm 0.04 | 0.15 \pm 0.02 | 0.0105 \pm 0.0009 |
| Pent-2-en-1-ol | 0.023 \pm 0.006 | 0.019 \pm 0.002 | 0.016 \pm 0.006 |
| 1-Hexanol | 0.05 \pm 0.03 | 0.04 \pm 0.01 | 0.04 \pm 0.02 |
| <i>cis</i> -2-Octen-1-ol | 0.008 \pm 0.003 | - | - |
| Pent-3-en-2-ol | 0.005 \pm 0.002 | 0.0027 \pm 0.0003 | - |
| <i>allo</i> -Ocimeno | 0.09 \pm 0.02 | 0.05 \pm 0.01 | 0.019 \pm 0.006 |
| <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0.22 \pm 0.07 | 0.12 \pm 0.04 | 0.3 \pm 0.1 |
| Octan-3-ol | 0.2 \pm 0.1 | 0.10 \pm 0.02 | 0.09 \pm 0.01 |
| <i>allo-neo</i> -Ocimeno | 0.09 \pm 0.02 | 0.07 \pm 0.03 | 0.095 \pm 0.002 |
| <i>trans</i> -2-Hexen-1-ol | 0.04 \pm 0.03 | 0.03 \pm 0.01 | 0.01 \pm 0.003 |
| 2-Metilbutanoato de hexilo | 0.008 \pm 0.004 | 0.005 \pm 0.002 | - |
| Oct-1-en-3-ol | 4 \pm 2 | 3.7 \pm 0.8 | 2.7 \pm 0.6 |
| Butanoato de <i>cis</i> -hex-3-enilo | 0.057 \pm 0.005 | 0.06 \pm 0.04 | 0.02 \pm 0.02 |
| 2-Metilbutanoato de <i>cis</i> -hex-3-enilo | 0.3 \pm 0.1 | 0.21 \pm 0.02 | 0.023 \pm 0.001 |

Tabla 7. Continuación.

| | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|
| Valerato de <i>cis</i> -hex-3-enilo | 0.02± 0.01 | 0.0191± 0.0009 | 0.007± 0.002 |
| α-Copaeno | 0.009± 0.003 | 0.20± 0.04 | 0.0034± 0.0005 |
| Benzaldehído | 0.004± 0.003 | 0.011± 0.002 | -± - |
| Linalol | 5.0± 0.3 | 2.1± 0.1 | 0.99± 0.08 |
| Octanol | 0.05± 0.01 | 0.2± 0.1 | 0.10± 0.04 |
| 3-Metil-pentadecano | 0.005± 0.001 | 0.0049± 0.0004 | 0.0034± 0.0002 |
| <i>trans</i> -β-Cariofileno | 0.04± 0.01 | 1.1± 0.1 | 0.02± 0.01 |
| Non-1-en-3-ol | 0.02± 0.01 | 0.029± 0.007 | 0.0093± 0.0004 |
| 1-Nonanol | 0.02± 0.01 | 0.03± 0.01 | 0.010± 0.002 |
| Angelato de <i>cis</i> -hex-3-enilo | 0.022± 0.002 | 0.03± 0.01 | 0.005± 0.002 |
| <i>cis</i> -Non-3-en-1-ol | 0.006± 0.004 | 0.012± 0.001 | 0.006± 0.001 |
| α-Terpineol | 0.008± 0.004 | 0.04± 0.02 | 0.008± 0.003 |
| Acetato de geranilo | 0.0126± 0.0003 | 0.010± 0.004 | 0.0043± 0.0002 |
| Farnesol | 0.005± 0.001 | - | - |
| Salicilato de metilo | 0.02± 0.01 | 0.023± 0.004 | 0.010± 0.003 |
| Nerol | 0.011± 0.004 | 0.014± 0.008 | 0.0041± 0.0002 |
| (<i>E,E</i> -)α-Farneseno | 0.03± 0.01 | - | - |
| Geraniol | 0.013± 0.001 | 0.009± 0.002 | 0.0035± 0.0006 |
| Alcohol feniletílico | 0.018± 0.005 | 0.019± 0.008 | 0.003± 0.002 |
| Benzoato de <i>cis</i> -hex-3-enilo | 0.005± 0.002 | - | - |
| Monoterpenos (MH) | 0.49 | 1.81 | 0.60 |
| Monoterpenos oxigenados (MO) | 5.11 | 2.2 | 1.02 |
| Sesquiterpenos (SH) | 0.08 | 1.09 | 0.03 |
| Sesquiterpenos oxigenados (SO) | 0.03 | 0.39 | 0.01 |
| Compuestos oxigenados (otros) | 5.04 | 4.53 | 3.29 |

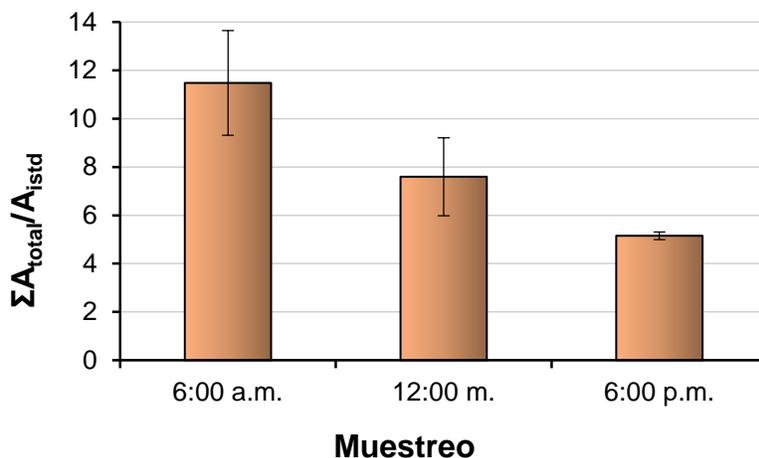


Figura 18. Relación $\Sigma A_{total}/A_{1std}$, de la fracción volátil aislada por HS-SPME, de flores de *P. volubilis* L., a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m.

Se puede apreciar como el valor del $\Sigma A_{total}/A_{1std}$ (**Figura 18**), varía con la hora de muestreo (6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m.); cambia también el perfil de compuestos volátiles de flores de *P. volubilis* L. Se presentó la mayor emisión de volátiles a las 6:00 a.m.

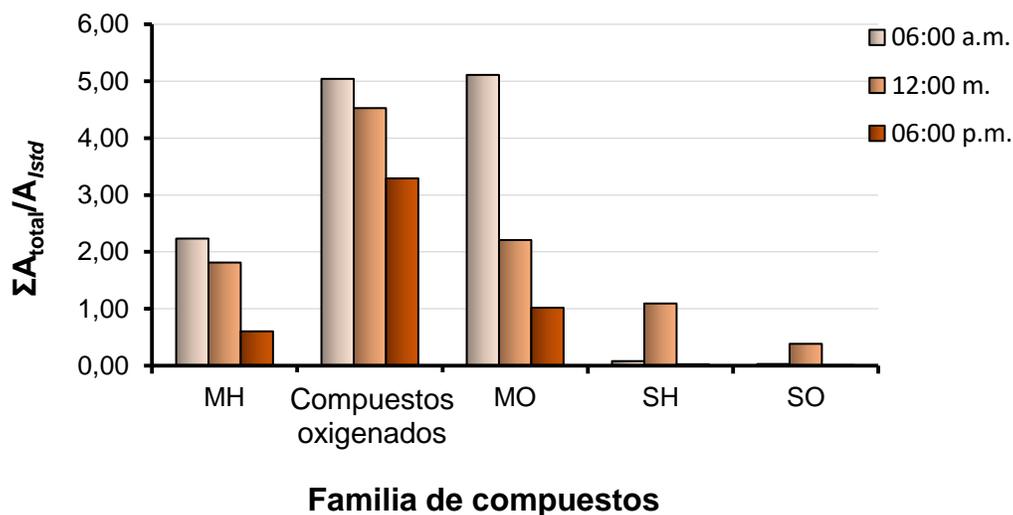


Figura 19. Relación $\Sigma A_{total}/A_{1std}$, según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de flores de *P. volubilis* L.

La mayor emisión de monoterpenos, monoterpenos oxigenados y compuestos oxigenados en el perfil volátil de flores de *P. volubilis* L., se registró a las 6:00 a.m.

Los sesquiterpenos oxigenados se detectaron a las 6:00 a.m. y se presentó su aumento notorio a las 12:00 m. (**Figura 19**).

La fracción volátil de flores de *P. volubilis* L., a las 6:00 a.m., estuvo compuesta, mayoritariamente, por linalol ($5.0\pm 0.3\%$), oct-1-en-3-ol ($4\pm 2\%$), y *trans*- β -ocimeno (1.2 ± 0.2); compuestos como el *cis*-oct-2-en-1-ol ($0.008\pm 0.003\%$) y farnesol ($0.005\pm 0.001\%$), fueron emitidos sólo a esa hora de monitoreo. Farnesol posee actividad repelente contra las hormigas de los géneros *Atta* y *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae), que se consideran una plaga en América, debido a que cortan indiscriminadamente hojas, flores y frutos de muchas plantas; esta podría ser una posible explicación del porqué la presencia de hormigas en horas de la mañana en las flores de *P. volubilis* L, es escasa [108].

El perfil de volátiles de flores de *P. volubilis* L., muestreado a las 12:00 m., estuvo compuesto, principalmente, por oct-1-en-3-ol ($3.7\pm 0.8\%$), linalol ($2.1\pm 0.1\%$) y *trans*- β -cariofileno ($1.1\pm 0.1\%$), este último fue emitido en mayor proporción comparado con las fracciones obtenidas a las 6:00 a.m. y a las 6:00 p.m.

A las 6:00 p.m., la fracción volátil de flores de *P. volubilis* L., estuvo compuesta, principalmente, por oct-1-en-3-ol ($2.7\pm 0.6\%$), linalol ($0.99\pm 0.08\%$) y *cis*-3-hexen-1-ol ($0.3\pm 0.1\%$), compuesto encontrado en gran variedad de plantas; se ha reportado, que el aumento en la emisión del *cis*-3-hexen-1-ol es un mecanismo de defensa de la planta ante un daño físico o por herbivoría [109].

Se observa, que para las fracciones obtenidas a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m., los compuestos mayoritarios fueron el oct-1-en-3-ol y el linalol, comunes para las fragancias monitoreadas a estas horas.

El perfil cromatográfico de volátiles obtenido para el monitoreo a las 6:00 a.m. de flores de *P. volubilis* L., se muestra en la **Figura 20**; los perfiles de volátiles recolectadas a las 12:00 m. y 6:00 p.m. están presentes en los **ANEXOS A y B**. La fracción volátil de flores de *P. volubilis* L. aislada a las 6:00 a.m., estuvo compuesta, principalmente, por monoterpenos *trans*- β -ocimeno ($1.2\pm 0.2\%$), 2-metilbutanoato de *cis*-hex-3-enilo ($0.3\pm 0.1\%$), β -mirceno ($0.17\pm 0.03\%$) y limoneno ($0.13\pm 0.02\%$); monoterpenos oxigenados el linalol ($5.0\pm 0.3\%$), angelato de *cis*-hex-3-enilo ($0.022\pm 0.002\%$); sesquiterpenos el *trans*- β -cariofileno ($0.02\pm 0.01\%$), (*E,E*)- α -farneseno ($0.03\pm 0.01\%$); sesquiterpenos oxigenados como farnesol ($0.005\pm 0.001\%$) y compuestos oxigenados, oct-1-en-3-ol ($4\pm 2\%$), octan-3-ol ($0.2\pm 0.1\%$) y salicilato de metilo ($0.02\pm 0.01\%$).

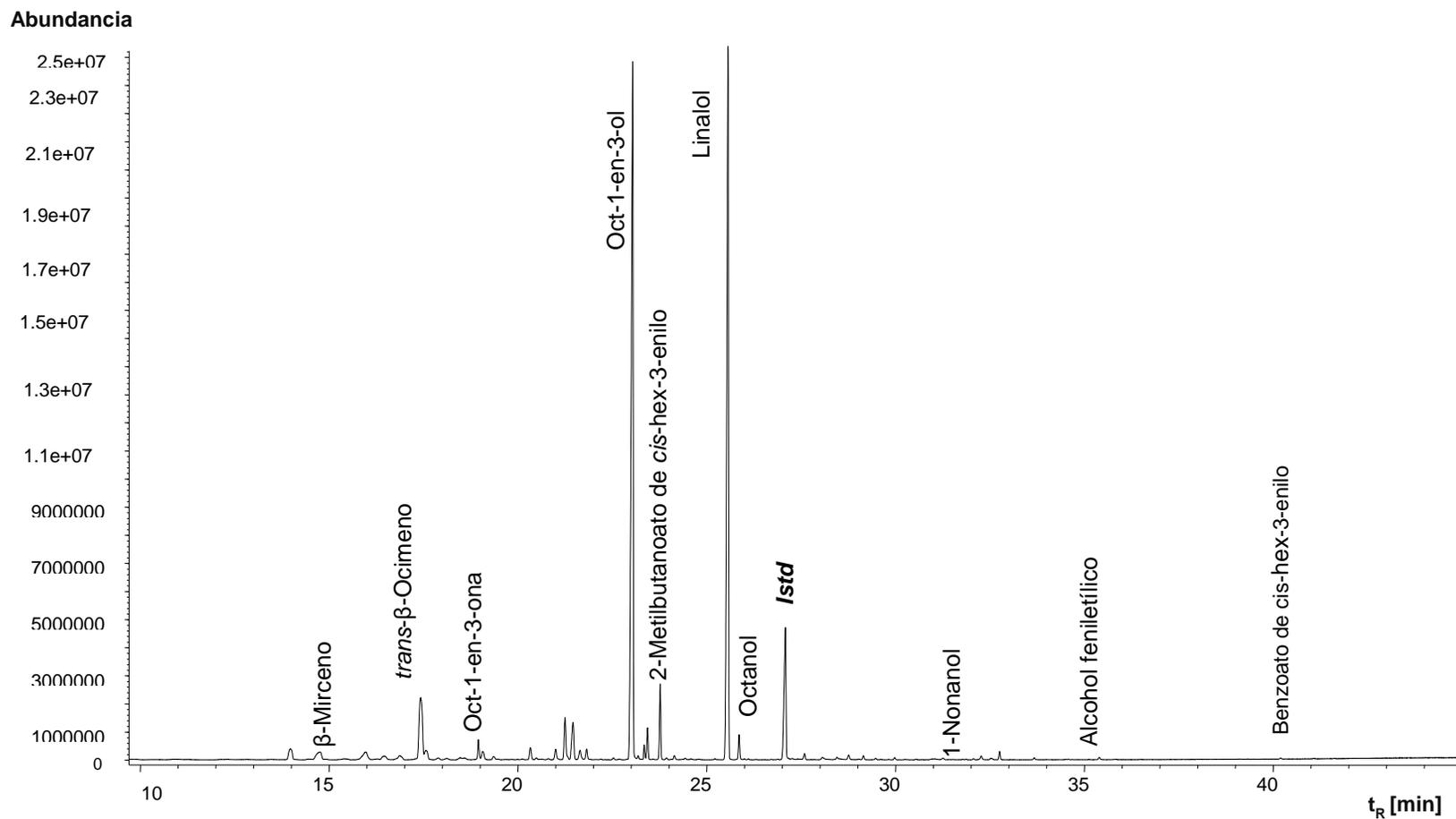


Figura 20. Perfil cromatográfico de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR/PDMS) de flores de *P. volubilis* L., monitoreadas a las 6:00 a.m. Columna DB-WAX de 60 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 μ m, d_f , detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*.

El β -mirceno es un precursor de feromonas en escarabajos [110]. Zhu *et al.* (2005) [111], encontraron que la presencia del (*E,E*)- α -farneseno y del salicilato de metilo en un mismo perfil volátil, se debe a un mecanismo de defensa, efectuado por la planta ante un ataque externo, sea por herbivoría o corte de la especie vegetal. Soares *et al.* (2013) [112], reportaron que el *trans*- β -cariofileno presenta actividad antileishmania y tiene efecto como regulador de la insulina [113].

Por otra parte, el limoneno es uno de los terpenos más comunes en la naturaleza y se encuentra principalmente en cítricos como naranja y limón; este compuesto presenta actividad anticancerígena y, además, disminuye el riesgo cardiovascular [114].

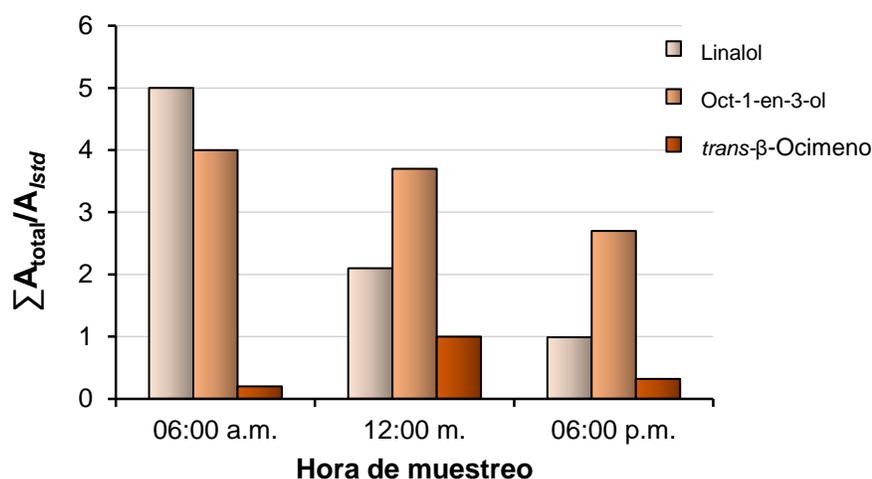


Figura 21. Relación $\sum A_{total}/A_{Istd}$, compuestos mayoritarios presentes en las fracciones volátiles de flores de *P. volubilis* L., monitoreadas *in-vitro* por HS-SPME a diferentes horas del día.

El linalol es el compuesto con mayor abundancia aislado por HS-SPME de flores de *P. volubilis* L., a las 6:00 a.m. (**Figura 21**). El linalol presenta actividad antiinflamatoria [115], funciona como agente antimicrobiano [116], posee actividad antidiabética [117] y, además, se utiliza ampliamente en la industria de perfumes [118], entre otras aplicaciones.

El oct-1-en-3-ol es el segundo compuesto mayoritario en el perfil de volátiles de flores de *P. volubilis* L., a las 6:00 a.m. Se ha reportado al oct-1-en-3-ol como atrayente de insectos [119], esta puede ser una posible explicación a la disminución en su emisión; en la mañana la flor necesita ser polinizada y emite en mayor cantidad este metabolito para atraer visitantes florales. Una vez fecundada, la flor no necesita la ayuda de los polinizadores y disminuye la emisión del compuesto mencionado [120-122].

Andersson *et al.* (2007) [123], reportaron al *trans*- β -ocimeno como uno de los componentes mayoritarios en la fragancia floral de la *Lantana camara* (Fam. Verbenacea), atribuyéndole a este compuesto el rol de atrayente de mariposas (*Heliconius melpomene*), que ayudan en los procesos de polinización.

4.3 Análisis por UV-vis del contenido de antocianinas monoméricas totales presentes en extractos obtenidos por SE

Se determinó el contenido de antocianinas monoméricas totales, para los extractos hidro-alcohólicos obtenidos por SE de flores de *P. volubilis* L. Para ello, se realizó un diseño experimental 2^3 , con tres variables, para cada una de ellas dos niveles y cuatro réplicas en el punto central, para así obtener mejores condiciones de extracción.

El observable fue el contenido de antocianinas monoméricas totales, que se determinó por medio del pH diferencial; la absorbancia que registró cada una de las muestras se encuentra en la **Tabla 8**. Con esos valores se procedió a calcular el valor de absorbancia total (**Ecuaciones 3 y 4, Sección 3.7**) y, finalmente, los resultados del observable (**Tabla 9**) se expresaron en mg de delfinidina-3-glúcosido/L.

Tabla 8. Absorbancias obtenidas a las longitudes de onda de 520 y 700 nm, para los extractos obtenidos por SE de flores de *P. volubilis* L.

| N° | Absorbancia, λ , nm | | | |
|----|-----------------------------|-------|------------------|-------|
| | Buffer a pH= 1.0 | | Buffer a pH= 4.5 | |
| | 520 | 700 | 520 | 700 |
| 1 | 0.913 | 0.431 | 0.777 | 0.340 |
| 2 | 0.610 | 0.451 | 0.422 | 0.266 |
| 3 | 0.991 | 0.507 | 0.910 | 0.439 |
| 4 | 0.769 | 0.352 | 0.652 | 0.343 |
| 5 | 0.502 | 0.302 | 0.396 | 0.249 |
| 6 | 0.467 | 0.271 | 0.340 | 0.179 |
| 7 | 0.979 | 0.668 | 0.570 | 0.258 |
| 8 | 0.670 | 0.266 | 0.522 | 0.195 |
| 9 | 0.989 | 0.610 | 0.628 | 0.268 |
| 10 | 0.989 | 0.612 | 0.628 | 0.260 |
| 11 | 0.989 | 0.611 | 0.627 | 0.256 |
| 12 | 0.989 | 0.611 | 0.629 | 0.289 |

Tabla 9. Contenido total de antocianinas monoméricas presentes en los extractos obtenidos por SE de flores de *P. volubilis* L.

| N° | X1 EtOH:H2O | X2 HCl, % | X3 Temperatura, °C | Cantidad, mg Dp-3-glu/L |
|----|----------------|--------------|-----------------------|----------------------------|
| 1 | 3-1 | 0 | 30 | 8.8 |
| 2 | 3-1 | 0 | 50 | 28.1 |
| 3 | 3-1 | 1 | 30 | 6.3 |
| 4 | 3-1 | 1 | 50 | 21.2 |
| 5 | 7-1 | 0 | 30 | 28.4 |
| 6 | 7-1 | 0 | 50 | 6.9 |
| 7 | 7-1 | 1 | 30 | 58.7 |
| 8 | 7-1 | 1 | 50 | 15.1 |
| 0 | 5-1 | 0.5 | 40 | 41.4 |
| 0 | 5-1 | 0.5 | 40 | 39.6 |
| 0 | 5-1 | 0.5 | 40 | 39.0 |
| 0 | 5-1 | 0.5 | 40 | 39.4 |

Tabla 10. Resultados del ANOVA aplicado al diseño experimental 2³, con los efectos de las variables de estudio y combinaciones; A: EtOH:H₂O, B: HCl, % y C: temperatura, °C.

| Valores Fisher | A | B | C | AB | AC | BC | ABC |
|-------------------|--------|-------|--------|--------|---------|-------|-------|
| F.calculado | 230.02 | 96.92 | 110.46 | 263.43 | 1132.90 | 79.45 | 35.84 |
| F.umbral* | 10.11 | | | | | | |

*Valor calculado usando el *software* Microsoft Excel.

Se realizó un análisis estadístico, de los efectos principales por medio de la prueba de Fisher al 95% de confianza. Se encontró que tanto las variables A, B, C y las interacciones AB, AC y BC, poseen un efecto significativo (**Tabla 10**). Esto indica, que todas las variables influyen sobre la extracción de antocianinas monoméricas. El efecto más alto lo presentó la interacción entre la relación EtOH:H₂O y la temperatura (1132.90), siendo esta interacción de gran importancia para la extracción de antocianinas. La mayor respuesta del observable se obtuvo, con la relación EtOH:H₂O 7:1 (nivel 1) y la temperatura 30 °C (nivel -1) (**Tabla 9**).

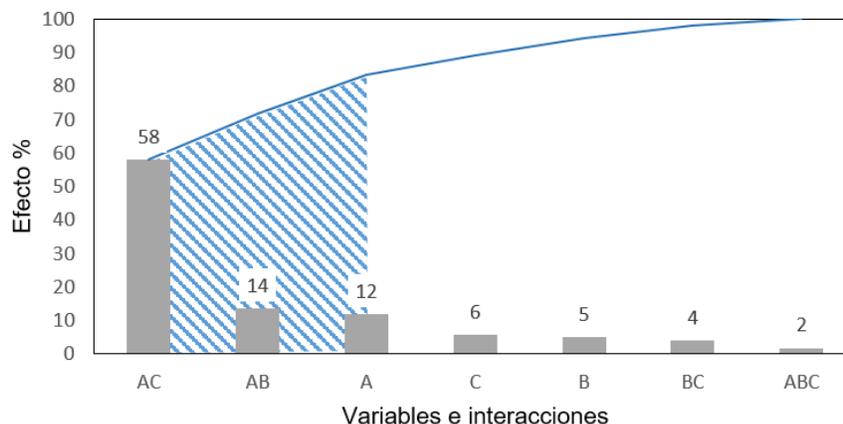


Figura 22. Gráfica de Pareto para la extracción de antocianinas monoméricas de flores de *P. volubilis* L.

El gráfico de Pareto (**Figura 22**), muestra cuáles son las variables o interacciones con los efectos más pronunciados. Aquellos, que se muestran dentro de la zona sombreada explican el 80% de la varianza total de los datos. En este caso, la relación EtOH:H₂O presenta el efecto independiente más alto. La interacción entre las variables X1 (EtOH:H₂O) y X3 (temperatura, °C) tiene el efecto más grande, seguida de la interacción entre la relación EtOH:H₂O y el porcentaje de ácido clorhídrico (HCl, %).

Estos resultados coinciden con los reportados por Nicoué *et al.* (2007) [124], que estudiaron el contenido de antocianinas monoméricas totales, en bayas de las especies *Vaccinium angustifolium* y *V. myrtilloides* (Fam. Ericaceae), ellos encontraron, que al variar la temperatura y el grado de acidez del solvente de extracción, cambiaba el contenido de antocianinas, se obtuvieron mejores resultados con el solvente más acidificado y a una temperatura de 26 °C. Khana *et al.* (2010) [125], estudiaron el efecto de la temperatura, en la variación del contenido de antocianinas monoméricas totales del orujo de uvas y arándanos; encontraron que por encima de 40 °C, la estabilidad de las antocianinas disminuyó y, por ende, el contenido antociánico se redujo.

En las **Figuras 23** y **24**, se muestra cómo cambia la respuesta del observable (antocianinas monoméricas totales), si permanece constante la variable temperatura. En la **Figura 23** se puede apreciar que se presenta un aumento en el observable, con el incremento de la relación EtOH:H₂O y HCl (%), para la temperatura de 30 °C y a 50° C (**Figura 24**) el aumento del observable se da con la mayor relación EtOH:H₂O (nivel 1) y el aumento del HCl (%).

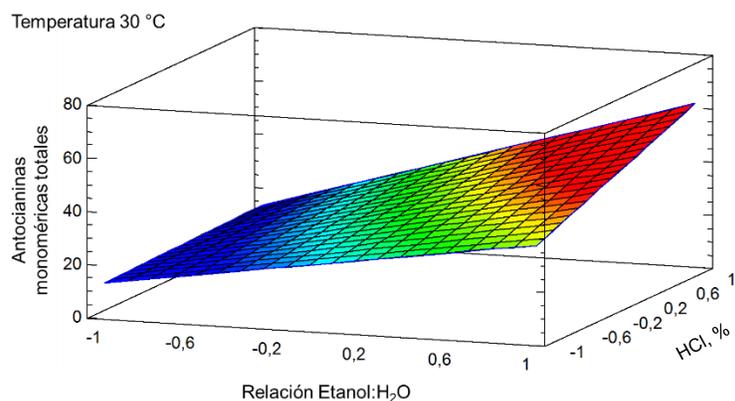


Figura 23. Gráfica de superficie de respuesta estimada para la relación EtOH:H₂O y HCl (%), en el nivel inferior de temperatura 30 °C.

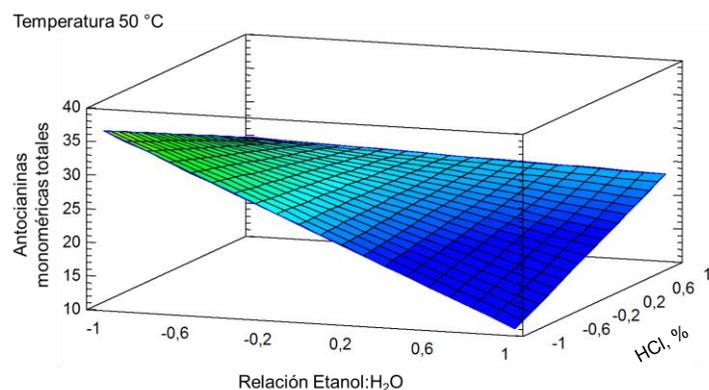


Figura 24. Superficie de respuesta estimada para la relación EtOH:H₂O y HCl (%) en el nivel superior de temperatura, 50 °C.

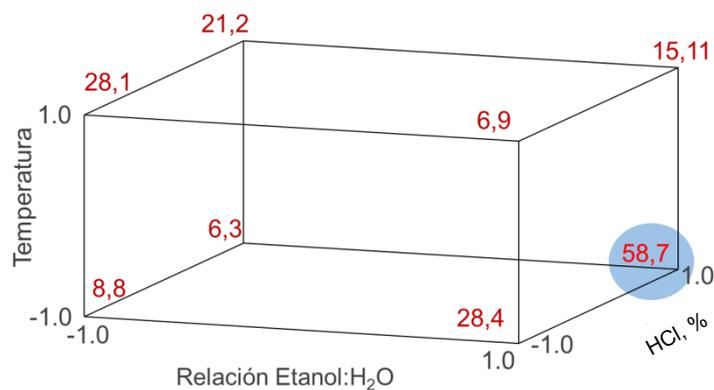


Figura 25. Resultados del diseño experimental 2³ y coordenadas experimentales.

En la **Figura 25**, se muestran las coordenadas experimentales para el diseño experimental 2^3 . El punto en que se obtiene la mayor respuesta del observable, corresponde a las coordenadas [1, 1, -1] y representa las siguientes condiciones de extracción: relación EtOH:H₂O (1:7), porcentaje de ácido clorhídrico (HCl, 1%) y temperatura nivel inferior (30 °C).

4.4 Identificación de metabolitos secundarios en flores de *P. volubilis* L., aislados por SFE y su caracterización por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

4.4.1 Rendimiento de extracción por SFE de flores de *P. volubilis* L.

Es de gran importancia conocer los rendimientos de extracción (**Tabla 11**) para tener una idea de si es viable realizar el proceso a gran escala y también para comparar los rendimientos de extracción de una matriz específica por diferentes técnicas de extracción.

Tabla 11. Porcentaje de rendimiento de la extracción con fluido supercrítico.

| Muestra | Cantidad de material utilizado, g | Extracto obtenido, g | Rendimiento (%) |
|------------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------|
| <i>P. volubilis</i> L. | 100.0 | 0.3 | 0.3 |

4.4.2 Caracterización de metabolitos secundarios extraídos por SFE de flores de *P. volubilis* L.

La caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos por SFE, de flores de *P. volubilis* L., se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, siguiendo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 3.9.1**. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de los índices de retención lineales (LRI) y los espectros de masas obtenidos experimentalmente, con los de las bases de datos: WILEY, NIST y ADAMS [126,127]. En la **Figura 26** y en la **Tabla 12**, se muestran los metabolitos identificados en los extractos obtenidos por SFE de flores de *P. volubilis* L.; cabe mencionar, que los metabolitos no-volátiles del extracto no se pueden detectar por GC-MS.

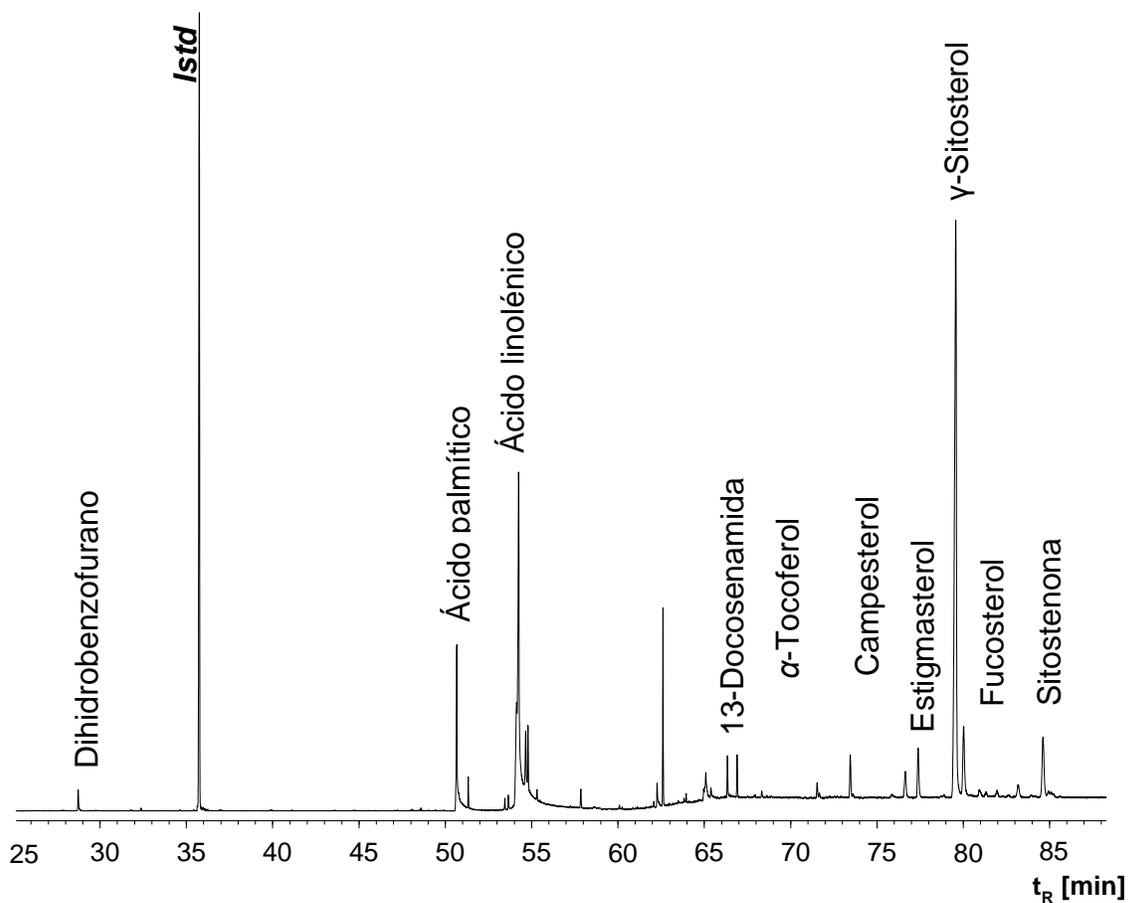


Figura 26. Perfil cromatográfico por GC-MS del extracto de flores de *P. volubilis* L., obtenido con CO₂ supercrítico.

Tabla 12. Composición del extracto obtenido por SFE de flores de *P. volubilis* L.

| Compuesto | Fórmula | IRL DB-5MS | | A _i /A _{Istd} |
|--------------------|--|--------------|------------|-----------------------------------|
| | | Experimental | Literatura | |
| Dihidrobenzofurano | C ₈ H ₈ O | 1215 | 1226 | 0.10 |
| Ácido palmítico | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 1958 | 1968.4 | 0.25 |
| Ácido linolénico | C ₁₈ H ₃₀ O ₂ | 2137 | 2134 | 0.64 |
| 13-Docosenamida | C ₂₂ H ₄₃ NO | 2533 | 2625 | 0.06 |
| α-Tocoferol | C ₂₉ H ₅₀ O ₂ | 3133 | 3112 | 0.05 |
| Campesterol | C ₂₈ H ₄₈ O | 3242 | - | 0.07 |
| Estigmasterol | C ₂₉ H ₄₈ O | 3267 | 3248 | 0.12 |
| γ-Sitosterol | C ₂₉ H ₅₀ O | 3327 | 3290 | 2.03 |
| Fucosterol | C ₂₉ H ₄₈ O | 3339 | 3305 | 0.18 |
| Sitostenona | C ₂₉ H ₄₈ O | 3447 | 3458 | 0.19 |

El perfil cromatográfico del extracto obtenido por SFE de flores de *P. volubilis* L., (**Figura 26**), está compuesto mayoritariamente por fitoesteroles como el γ -sitosterol, estigmasterol, fucosterol y sitostenona; ácidos palmítico y linolénico; por lignanos como el dihidrobenzofurano y por α -tocoferol.

Según el análisis por GC-MS, el compuesto mayoritario en el extracto obtenido por SFE fue el γ -sitosterol. A este metabolito, se le han atribuido actividades antidiabética y anti-hiperglicémica [128], anti-reumática, anti-inflamatoria y antibacteriana [129], entre otros. Por otra parte, se ha reportado que el estigmasterol posee actividad anti-inflamatoria y se utiliza como precursor en la síntesis de vitamina D₃ [130]. Lee *et al.* (2004) [131], aislaron de *Pelvetia siliquosa*, fucosterol y encontraron que este compuestos presentaba actividad antidiabética y efectos antioxidantes [132].

Otro componente en el extracto obtenido por SFE de flores de *P. volubilis* fue el campesterol, que presenta actividad anti-inflamatoria [133]. Yosida *et al.* (2003) [134], demostraron los efectos antioxidantes proporcionados por los fitoesteroles campesterol, sitosterol y estigmasterol, además, encontraron que estos compuestos presentan actividad antioxidante. El ácido linolénico posee actividad anticarcinogénica [135] y el α -tocoferol, antioxidante [136].

4.5 Análisis por LC-MS-ESI (+)-TOF de metabolitos secundarios aislados por SE, SFE y MSPD de flores de *P. volubilis* L.

4.5.1 Análisis por LC-MS del extracto obtenido por SE de flores de *P. volubilis* L.

La caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos por SE de flores de *P. volubilis* L., se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, siguiendo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 3.9.2**. La identificación de los compuestos, se confirmó mediante la medición de masas exactas, la exactitud Δppm (**Ecuación 6**) y por comparación de tiempos de retención con los de patrones certificados.

$$\Delta ppm = \frac{Masa\ exacta - Masa\ experimental}{Masa\ exacta} \times 10^6$$

Ecuación 6

En la **Figura 27** y en la **Tabla 13**, se muestran los metabolitos identificados en los extractos hidro-alcohólicos de flores de *P. volubilis* L.

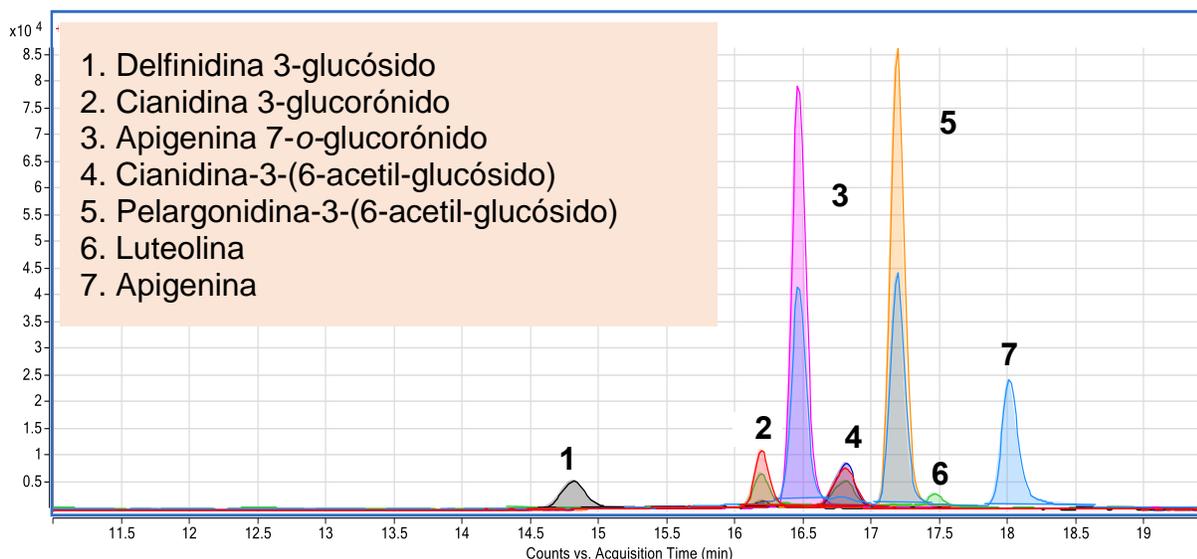


Figura 27. Perfil cromatográfico por LC-ESI(+)-TOF-MS del extracto obtenido por SE de flores de *P. volubilis* L.

Tabla 13. Metabolitos secundarios aislados por SE de flores de *P. volubilis* L.

| Compuesto | Fórmula | Masas | | Δ ppm |
|--------------------------------------|----------------------|--------------|----------|--------------|
| | | Experimental | Exacta | |
| Delfinidina 3-glucósido | $C_{21}H_{21}O_{12}$ | 465.1013 | 465.1009 | 3.99 |
| Cianidina-3-glucorónido | $C_{21}H_{19}O_{12}$ | 463.0860 | 463.0864 | 1.59 |
| Apigenina 7- <i>o</i> -glucorónido | $C_{21}H_{19}O_{11}$ | 447.0927 | 447.0922 | 1.10 |
| Cianidina-3-(6-acetil-glucósido) | $C_{23}H_{23}O_{12}$ | 491.4215 | 491.4511 | 4.80 |
| Pelargonidina-3-(6-acetil-glucósido) | $C_{23}H_{23}O_{11}$ | 475.1208 | 475.1215 | 1.47 |
| Luteolina | $C_{15}H_{11}O_6$ | 287.0541 | 287.0550 | 3.15 |
| Apigenina | $C_{15}H_{11}O_5$ | 271.0603 | 271.0601 | 0.73 |

En el extracto hidro-alcohólico, se identificaron compuestos de tipo fenólico, a saber: los tres flavonoides apigenina, luteolina y apigenina 7-*o*-glucorónido; y cuatro antocianinas, delfinidina 3-glucósido, cianidina-3-glucorónido, cianidina-3-(6-acetil-glucósido) y pelargonidina-3-(6-acetil-glucósido). Se pudo observar, que los extractos de coloración más intensa se obtuvieron con el solvente más acidulado pH= 1. Esto debido a que el catión flavilio (estructura base de la antocianina), se estabiliza a pH ácido. Como también se encontró en el diseño experimental, las mejores condiciones para la extracción de compuestos fenólicos correspondieron a

pH más bajos. Es por esto que los solventes de extracción deben contener un ácido [43].

Mediante el análisis por LC-MS, se encontró que la mayor cantidad de compuestos fenólicos, se extrajo bajo las siguientes condiciones: relación EtOH:H₂O (7:1) solución acidulada con HCl (1%), baño ultrasonido (30°C y 30 min).

4.5.2 Análisis por LC-MS del extracto obtenido por SFE de flores de *P. volubilis* L.

La caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos por SFE de flores de *P. volubilis* L., se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, bajo parámetros operacionales descritos en la **Sección 3.9.2**. La identificación de los compuestos, se confirmó mediante la medición de masas exactas, Δ ppm (**Ecuación 6**) y por comparación de tiempos de retención con patrones certificados.

En la **Figura 28** y en la **Tabla 14**, se muestran los metabolitos identificados en los extractos obtenidos por SFE de flores de *P. volubilis* L.

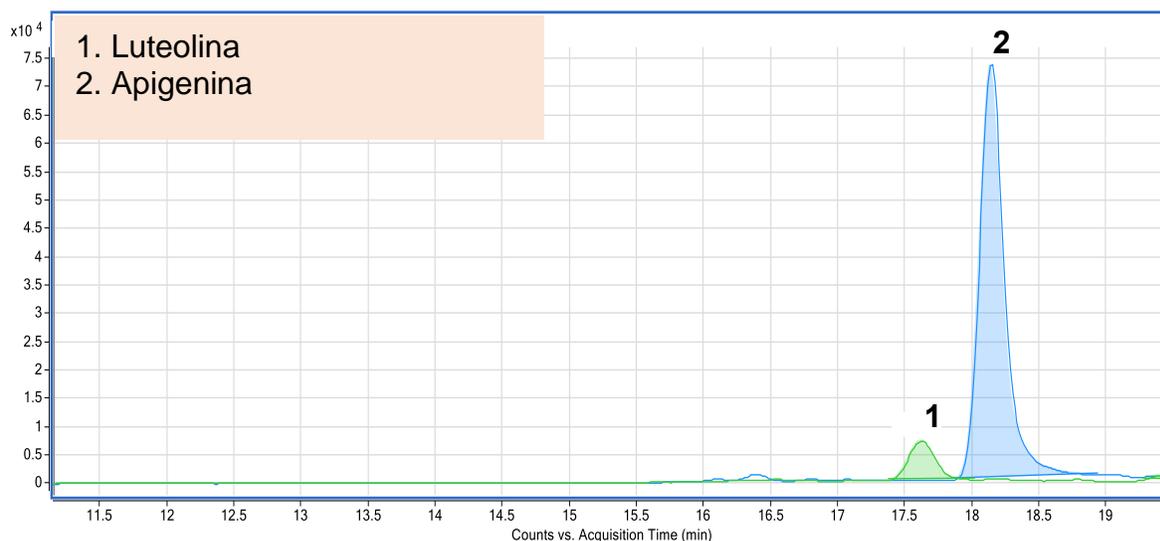


Figura 28. Perfil cromatográfico por LC-ESI(+)-TOF-MS del extracto obtenido por SFE de flores de *P. volubilis* L.

Tabla 14. Metabolitos secundarios aislados por SFE de flores de *P. volubilis* L.

| Compuesto | Fórmula | Masas | | Δ ppm |
|-----------|--|--------------|----------|--------------|
| | | Experimental | Exacta | |
| Luteolina | C ₁₅ H ₁₁ O ₆ | 287.0541 | 287.0550 | 3.15 |
| Apigenina | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ | 271.0603 | 271.0601 | 0.73 |

En el extracto obtenido por SFE de flores de *P. volubilis* L., se logró identificar dos compuestos de naturaleza fenólica (**Figura 29**), apigenina y luteolina (flavonas).

Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Bimakr *et al.* (2011) [137], quienes aislaron metabolitos secundarios por SFE y SE, de hojas de *Mentha spicata* L. (Fam. Lamiaceae), encontraron que a las condiciones de extracción supercrítica (tiempo 60 min, temperatura 333 K y presión 200 bar), se obtenían la mayor cantidad de compuestos fenólicos, principalmente, agliconas, entre ellas, luteolina y apigenina que se extraen con recuperación más alta bajo estas condiciones. Reportaron también, que por SE se aísla un mayor número de compuestos debido a la solubilidad que presentan los compuestos fenólicos en solventes polares como etanol y metanol.

4.5.3 Análisis por LC-MS del extracto de flores de *P. volubilis* L. obtenido por MSPD

La caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de flores de *P. volubilis* L., obtenidos por MSPD, se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, siguiendo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 3.9.2**. En la **Figura 29** y en la **Tabla 15**, se muestran los metabolitos identificados en los extractos obtenidos por MSPD de flores de *P. volubilis* L.

Tabla 15. Metabolitos secundarios aislados por MSPD de flores de *P. volubilis* L.

| Compuesto | Fórmula | Masas | | Δ ppm |
|------------------------------------|---|--------------|----------|--------------|
| | | Experimental | Exacta | |
| Delfinidina 3-glucósido | C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂ | 465.1013 | 465.1009 | 3.99 |
| Cianidina-3-glucorónido | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ | 463.0860 | 463.0864 | 1.59 |
| Apigenina 7- <i>o</i> -glucorónido | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ | 447.0927 | 447.0922 | 1.10 |
| Luteolina | C ₁₅ H ₁₁ O ₆ | 287.0541 | 287.0550 | 3.15 |
| Apigenina | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ | 271.0603 | 271.0601 | 0.73 |

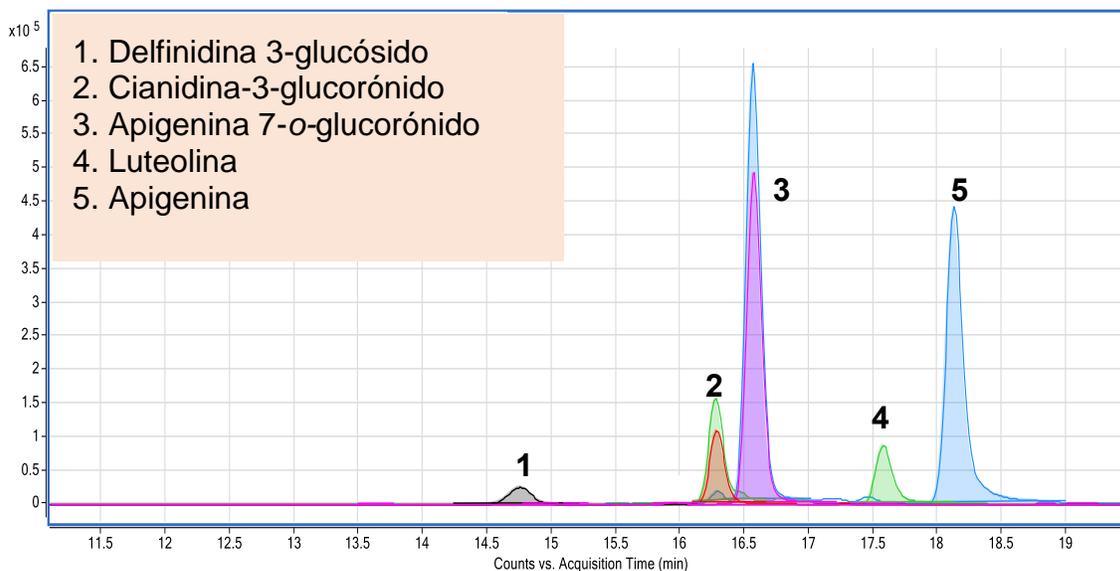


Figura 29. Perfil cromatográfico por LC-ESI(+)-TOF-MS del extracto obtenido por MSPD de flores de *P. volubilis* L.

En el extracto de flores de *P. volubilis* L., obtenido por MSPD se identificaron cinco compuestos de naturaleza fenólica (**Figura 29**), tres flavonoides, apigenina 7-*o*-glucorónido, luteolina y apigenina; y dos antocianinas, delfinidina 3-glucósido y cianidina-3-glucorónido. La identificación de los compuestos, se confirmó mediante la medición de masas sus exactas, Δ ppm (**Ecuación 6**) y por comparación de tiempos de retención con los de patrones certificados.

A los polifenoles encontrados en los extractos de flores *P. volubilis* L., se les ha atribuido actividad biológica. Miean *et al.* (2001) [138], reportaron la presencia de la apigenina en vegetales como coles, pimientos, ajo, guisantes y calabazas. Viola *et al.* (1995) [139], estudiaron los extractos acuosos de flores de *Matricaria recutita*, y encontraron la apigenina como uno de los componentes mayoritarios, al cual se le atribuye un efecto anti-inflamatorio. La apigenina ha sido encontrada en 62 plantas comestibles; entre ellas, col china y pimentón, además, este flavonoide inhibe el crecimiento de células de cáncer de tiroides [140].

La luteolina ha sido encontrada en diferentes matrices alimenticias; entre ellas, brócoli, cebollas y zanahorias [138] y se le ha atribuido actividad anti-cancerígena [141]. Brown *et al.* (1998) [142], estudiaron la composición de la alcachofa e identificaron luteolina y encontraron que presentaba una actividad protectora de lípidos, dando como resultado una actividad antioxidante alta. También, la luteolina ha presentado actividad anti-inflamatoria y anticancerígena; disminuye el riesgo cardiovascular [143].

Lo anterior evidencia que en los extractos de flores de *P. volubilis* se encuentran compuestos fenólicos a los cuales se les han atribuido propiedades biológicas, por lo que la especie estudiada, con base en sus metabolitos identificados, podría considerarse como promisoría.

Los compuestos de los extractos obtenidos por SFE, MSPD y SFE, junto con los de la fracción volátil aislada por HS-SPME, de las flores de *P. volubilis* L., caracterizados por LC-MS y GC-MS, se registran en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Compuestos mayoritarios identificados por LC-MS y GC-MS, presentes en extractos y en la fracción volátil de flores de *P. volubilis* L.

| Compuesto | Fórmula | Técnica de extracción | | | | Clasificación |
|---|---|-----------------------|-----|----|------|---------------------|
| | | MSPD | SFE | SE | SPME | |
| Delfinidina 3-glucósido | C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂ | + | - | + | - | Antocianina |
| Cianidina 3-glucorónido | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ | + | - | + | - | Antocianina |
| Pelargonidina 3-(6-acetil-glucósido) | C ₂₃ H ₂₃ O ₁₁ | - | - | + | - | Antocianina |
| Cianidina-3-(6-acetil-glucósido) | C ₂₃ H ₂₃ O ₁₂ | - | - | + | - | Antocianina |
| Apigenina 7- <i>o</i> -glucorónido | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ | + | - | + | - | Flavonoide |
| Luteolina | C ₁₅ H ₁₁ O ₆ | + | + | + | - | Flavona |
| Apigenina | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ | + | + | + | - | Flavona |
| Ácido palmítico | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | - | + | - | - | AGS* |
| Ácido linoléico | C ₁₈ H ₃₀ O ₂ | - | + | - | - | AGI, C18:3** |
| Campesterol | C ₂₈ H ₄₈ O | - | + | - | - | Fitoesterol |
| Estigmasterol | C ₂₉ H ₄₈ O | - | + | - | - | Fitoesterol |
| γ -Sitosterol | C ₂₉ H ₅₀ O | - | + | - | - | Fitoesterol |
| Fucoesterol | C ₂₉ H ₄₈ O | - | + | - | - | Fitoesterol |
| Sitostenona | C ₂₉ H ₄₈ O | - | + | - | - | Fitoesterol |
| Linalol | C ₁₀ H ₁₈ O | - | - | - | + | MO |
| <i>trans</i> - β -Ocimeno | C ₁₀ H ₁₆ | - | - | - | + | MH |
| 2-Metilbutanoato de <i>cis</i> -hex-3-enilo | C ₁₁ H ₂₀ O ₂ | - | - | - | + | MH |
| Oct-1-en-3-ol | C ₈ H ₁₆ O | - | - | - | + | Compuesto oxigenado |
| <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | C ₆ H ₁₂ O | - | - | - | + | Compuesto oxigenado |
| Octan-3-ol | C ₈ H ₁₈ O | - | - | - | + | Compuesto oxigenado |

*AGS: Ácido graso saturado.

**AGI: Ácido graso insaturado.

4.6 Resultados de actividad antioxidante y el contenido total de fenoles en extractos de flores de *P. volubilis* L.

La actividad antioxidante y el contenido total de fenoles (Véanse **Secciones 3.8.1, 3.8.2 y 3.8.3**) de los extractos obtenidos por MSPD, SFE y SE, de flores de *P. volubilis* L., se evaluó a través de los ensayos ORAC, ABTS^{•+} y Folin-Ciocalteu. Los valores registrados se compararon con los obtenidos para las sustancias de referencia, BHT y α -tocoferol. Los resultados de actividad antioxidante obtenidos por ORAC y ABTS^{•+} se expresaron en $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia y el contenido de fenoles totales en mg AG/g sustancia (**Tabla 17**).

Tabla 17. Resultados de actividad antioxidante y fenoles totales para los extractos obtenidos por MSPD, SFE y SE.

| Muestra | Folin Ciocalteu mg AG/g sustancia | ORAC $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ | ABTS $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| Extracto SE | 26 \pm 2 | 3500 \pm 100 | 1340 \pm 40 |
| Extracto MSPD | 50 \pm 10 | 1940 \pm 47 | 910 \pm 47 |
| Extracto SFE | 13 \pm 2 | 1640 \pm 46 | 260 \pm 47 |
| BHT | 27.2 \pm 0.2 | 660 \pm 4 | 1800 \pm 49 |
| α-Tocoferol | 16.9 \pm 0.2 | 550 \pm 13 | 920 \pm 63 |

A través del ensayo de ORAC, se evalúa la capacidad que tiene una sustancia para retardar procesos oxidativos causados por los radicales libres. Este método se basa en la transferencia de protones y, en este caso, los metabolitos identificados en los extractos fueron polifenoles, ácidos grasos y fitoesteroles. Los polifenoles, especialmente, los flavonoides, deben su potencial antioxidante a la presencia de grupos hidroxilo que pueden transferir un hidrógeno lábil a los radicales: a mayor cantidad de grupos hidroxilo presentes en la muestra mayor será su capacidad antioxidante [144]. Las antocianinas poseen una estructura química que puede actuar como antioxidante; pueden donar tanto electrones como protones a los radicales libres [145].

Para el ensayo de ORAC (**Tabla 17**), los extractos, obtenidos con solvente, presentaron valor ORAC 3500 \pm 100 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ (SE), mucho mayor que los extractos obtenidos por otros métodos, *i.e.*, 1940 \pm 47 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ (MSPD), 1640 \pm 46 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ (SFE) y las sustancias de referencia BHT (660 \pm 4 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$) y α -tocoferol (550 \pm 13 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$). El extracto obtenido por SE presentó la mayor actividad antioxidante: esto se debe principalmente a que por este medio de aislamiento se logró extraer una mayor cantidad de compuestos polifenólicos (flavonoides y antocianinas) (**Tabla 13**), que poseen un número mayor de grupos hidroxilo los cuales pueden donar átomos de hidrógeno. Además, al ser

un extracto acuoso y acidulado permite la extracción de compuestos de tipo antocianico, que presentan actividad antioxidante [144,145].

En el ensayo de capacidad antioxidante ABTS^{•+}, basado en el mecanismo de transferencia de electrones, se encontró que el extracto SE presentó actividad antioxidante (1340±40 µmol Trolox[®]/g) mayor en comparación que la del extracto obtenido por MSPD (910±47 µmol Trolox[®]/g), o por SFE (260±47 µmol Trolox[®]/g), las sustancias de referencia α-tocoferol (920±63 µmol Trolox[®]/g), pero menor que la sustancia de referencia BHT (1800±49 µmol Trolox[®]/g). Se puede inferir que la diferencia en los resultados de capacidad antioxidante obtenidos por ORAC y ABTS^{•+}, se deben a que los metabolitos presentes en los extractos son más susceptibles al mecanismo de transferencia de protón que a la de electrón.

El ensayo de Folin Ciocalteu (FC) se basa en la transferencia de electrones de compuestos fenólicos en medio alcalino a los complejos de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico, para formar complejos de color azul que se determinan espectroscópicamente aproximadamente a una $\lambda = 760$ nm. Los compuestos fenólicos facilitan la eliminación de radicales de oxígeno debido a que el potencial de reducción de electrones del radical fenólico, es menor que el potencial de reducción de electrones de radicales de oxígeno, y también porque los radicales fenoxilo son generalmente menos reactivos que los de oxígeno [146].

Para el método de FC aplicado a los extractos, se encontró que el extracto MSPD presentó contenido de fenoles (50±10 mg AG/g sustancia) mayor en comparación con las sustancias de referencia BHT (27.2±0.2 mg AG/g sustancia) y α-tocoferol (16±9 mg AG/g sustancia). El extracto SE registró contenido fenólico (25±9 mg AG/g sustancia) mayor en comparación con la del extracto SFE (13±2 mg AG/g sustancia) y la sustancia de referencia α-tocoferol, pero fue más bajo que la de la sustancia de referencia BHT. El contenido de fenoles en el extracto SFE fue de 13±2 mg AG/g sustancia, más bajo que las sustancias de referencia BHT y α-tocoferol.

Una posible explicación de los resultados obtenidos por FC es que la polaridad del solvente de extracción afecta el contenido de fenoles totales. Turkmen *et al.* (2005) [147] reportaron que el uso de solventes, tales como agua, metanol, etanol a diversas concentraciones y mezclas, sí afectaba el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante, debido a que cuando en la técnica de extracción se utilizaban 100% de etanol y solventes de baja polaridad se obtenía una respuesta a FC menor. El extracto obtenido por MSPD presentó el mayor valor de fenoles totales, debido a que el solvente de elución fue una mezcla de MeOH:H₂O (8:1).

5. CONCLUSIONES

Por medio de la fibra SPME con recubrimiento polimérico de carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), se extrajo un mayor número de compuestos volátiles y semi-volátiles de flores de *P. volubilis* L., en comparación con el obtenido usando fibras PDMS/DVB y PDMS.

En la fracción volátil, aislada *in-vitro* por HS-SPME de flores de *P. volubilis* L., a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 6:00 p.m., se encontraron metabolitos secundarios que pertenecen a las familias de monoterpenos (limoneno, *trans*- β -ocimeno y *allo*-ocimeno); monoterpenos oxigenados (linalol y α -terpineol); sesquiterpenos oxigenados (farnesol); sesquiterpenos (*trans*- β -cariofileno); y otros compuestos oxigenados (oct-1-en-3-ol, 2-hexenal y octan-3-ona), se observó la variación en el perfil de volátiles de flores de *P. volubilis* L, a lo largo del día, los compuestos mayoritarios tales como el linalol y oct-1-en-3-ol presentaron su mayor emisión en la mañana, a las 6:00 am y la menor, en la tarde, a las 6:00 p.m.

Por medio de las técnicas de extracción MSPD y SE, se aislaron compuestos de tipo fenólico, flavonoides y antocianinas, mientras que por SFE, compuestos de naturaleza lipídica, fitoesteroles, ácidos grasos y lignanos.

Mediante la implementación de un diseño experimental 2^3 , donde el observable fue la cantidad de antocianinas monoméricas (mg, Dp-3-glu/L), se encontró que las variables EtOH:H₂O, temperatura, HCl (%) y sus interacciones, tienen un efecto significativo sobre la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos. En las condiciones de extracción etanol-agua (1:7), HCl (1%) y temperatura (30 °C) la respuesta del observable fue mayor.

El extracto de flores de *Petrea volubilis* L., obtenido por SE presentó actividad antioxidante (ORAC: 3500 \pm 100 μ mol Trolox[®]/g; ABTS^{•+}: 1340 \pm 40 μ mol Trolox[®]/g) mucho mayor que el extracto obtenido por MSPD (ORAC: 1940 \pm 47 μ mol Trolox[®]/g; ABTS^{•+}: 910 \pm 47), o por SFE (ORAC: 1640 \pm 46 μ mol Trolox[®]/g; ABTS^{•+}: 260 \pm 47). Los extractos obtenidos por MSPD y SE presentaron contenido fenólico 50.7 \pm 10 mg AG/g sustancia y 25 \pm 9 mg AG/g sustancia, respectivamente, más alto que el obtenido para el extracto SFE (13 \pm 2 mg AG/g sustancia). Los resultados concuerdan con el análisis de extractos por LC-MS, que mostró la presencia de compuestos fenólicos con actividad antioxidante reportada.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios de actividad biológica, *i.e.*, anti-inflamatoria, de los extractos de flores de *P. volubilis* L., obtenidos por MSPD, SFE y SE, para ampliar el alcance del estudio realizado, y generar un mayor valor agregado a esta matriz.

Se sugiere realizar también el monitoreo *in-vivo* por SPME de flores de *P. volubilis* L., y comparar los resultados con los obtenidos por HS-SPME *in-vitro*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Á. Celis; C. Mendoza; M. Pachón; J. Cardona; W. Delgado; L. Cuca, "Extractos vegetales utilizados como biocontroladores", *Agronomía Colombiana*, 2008, **26**, 97-106.
- [2] C. Rijswick, "Gearing up for stronger competition", *Food & Agribusiness Research and Advisory*, 2015, **475**, 1-4.
- [3] A. Krings; G. Morillo, "*Gonolobus murphyae* (Apocynaceae), a new species from montane Colombia", *Systematic Botany*, 2013, **38**, 1138-1141.
- [4] J. Garzón Venegas; F. González, "Five new species and three new records of *Burmeistera* (Campanulaceae-Lobelioidea) from Colombia", *Caldasia*, 2012, **34**, 309-324.
- [5] S. Drewes; S. Martínez, "Morphology of inflorescences in Verbenaceae-Verbenoideae II: Tribe Petreeae", *Darwiniana*, 1999, **37**, 209-218.
- [6] E. Stashenko; J. Martínez, "Plantas aromáticas y aceites esenciales: estudio y aplicaciones", *Publicaciones UIS*, 2012, 15-41.
- [7] E. Berardi; S. Hildreth; R. Helm; B. Winkel; S. Smith, "Evolutionary correlations in flavonoid production across flowers and leaves in the *Lochrominae* (Solanaceae)" *Phytochemistry*, 2016, **121**, 1-9.
- [8] A. Nascimento; L. Raggi; M. Young; P. Moreno, "Chemical characterization of the volatile compounds of the flowers of *Bidens segetum* Martius ex Colla Asteraceae", *Journal of Essential Oil Research*, 2015, **27**, 70-75.
- [9] D. Yin; R. Yuan; Q. Wu; S. Li; S. Shao; Y. Xu; X. Hao; L. Wang, "Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities", *Food Chemistry*, 2015, **187**, 20-28.
- [10] M. Abdelwahab; A. Abdel; M. Fouad; S. Desoukey; M. Kamel, "Phytochemical and biological study of *Petrea volubilis* L. (Verbenaceae)", *Bulletin of Pharmaceutical Sciences - Assiut University*, 2011, **34**, 9-20.
- [11] N. Abdel; G. Dawoud; A. El; T. Morsy, "Interrelation of antioxidant, anticancer and antilishmania effects of some selected Egyptian plants and their phenolic constituents", *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 2011, **41**, 785-800.

- [12] J. Shah; K. Unnikrishnan, "Vascular connections of axillary buds in some members of the Verbenaceae and the Labiatae", *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B*, 1968, **68**, 284-288.
- [13] M. Rahman; A. Siddika; B. Bhadra; S. Rahman; M. Chowdhury; B. Agarwala; M. Rahmatullah, "Antihyperglycemic activity studies on methanol extract of *Petrea volubilis* L. (Verbenaceae) leaves and *Excoecaria agallocha* L. (Euphorbiaceae) stems", *Advances in Natural and Applied Sciences*, 2010, **4**, 361-364.
- [14] O. Palacios; G. Castillo; S. Vázquez; S. del Amo, "Flora vascular de la selva mediana subcaducifolia del centro de Veracruz, México", *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 2014, **85**, 125-142.
- [15] J. Sena; J. Durringer; G. Maia; J. Tavares; H. Xavier; M. Sobral; E. da Cunha; J. Barbosa, "Ecdysteroids from *Vitex* Species: Distribution and Compilation of Their ¹³C-NMR Spectral Data", *Chemistry & Biodiversity*, 2008, **5**, 707-713.
- [16] R. Rueda, "Systematics and Evolution of the Genus *Petrea* (Verbenaceae)", *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1994, **81**, 610-652.
- [17] Universidad de Illes Balears, "Herbario Virtual del Mediterráneo Occidental", Disponible: <http://herbarivirtual.uib.es/cat-med/especie/5926.html>; Fecha de acceso: 28 de noviembre de 2016.
- [18] E. Gilman, "*Petrea volubilis*", University of Florida, *Fact Sheet*, 1999, **467**, 1-3.
- [19] J. Plitt, "La flor y otros órganos derivados", 1ª Ed., Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, 2006, 100-101.
- [20] D. Debouk, "Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)", 2ª Ed., Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Palmira, Colombia, 1984, 36-37.
- [21] L. Arce, "Flora de Costa Rica I", 1ª Ed., Universidad Estatal a distancia, San José, Costa Rica, 2011, 27.
- [22] Universidad Nacional de Colombia, "Herbario virtual Universidad Nacional de Colombia, colecciones científicas en líneas", Disponible: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=110579>; Fecha de acceso: 1 de agosto de 2016.
- [23] K. Niranjani; J. Pardo; D. Mottram, "In Engineering and Food for the 21st Century: The Relation Between Sublimation Rate and Volatile Retention During the Freezing-drying of Coffee", *CRC Press*, Boca Raton, Florida, 2002, 253-268.

- [24] C. de Oliveira; J. Vilela; R. Ribeiro; M. Torres, "Stability of the microstructure and carotenoids contents of the freeze-dried pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp in the powdered form", *Food Science and Technology*, 2008, **4**, 830-839.
- [25] J. Lombraña; C. De Elvira; M. Villaran, "Simulation and design of heating profiles in heat controlled freeze-drying of pharmaceuticals in vials by the application of a sublimation cylindrical model", *Drying Technology*, 1993, **11**, 85-102.
- [26] C. Ratti, "Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review", *Journal of Food Engineering*, 2001, **49**, 311-319.
- [27] N. Burguet; N. Sierra; L. Brito, "Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad", *CENIC Ciencias Biológicas*, 2012, **43**, 1-4.
- [28] S. Padma; C. Anandharamakrishnana; A. Stapleyc, "Spray-freeze-drying: A novel process for the drying of foods and bioproducts", *Trends in Food Science & Technology*, 2015, **41**, 161-181.
- [29] P. Matteo; G. Donsì; G. Ferrari, "The role of heat and mass transfer phenomena in atmospheric freeze-drying of foods in a fluidized bed", *Journal of Food Engineering*, 2003, **59**, 267-275.
- [30] J. Chanes; J. Aguilera; G. Barbosa, "Engineering and Food for the 21st Century", *CRC Press*, New York, EE.UU., 2002, 254-255.
- [31] L. Grajales; W. Cardona; C. Orrego, "Liofilización de carambola (*Averrhoa carambola* L.) osmodeshidratada", *Ingeniería y Competitividad*, 2005, **7**, 19-26.
- [32] J. Pawliszyn, "Theory of Solid-Phase Microextraction", *Journal of Chromatographic Science*, 2000, **38**, 270-278.
- [33] E. Stashenko; J. Martínez, "Review sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, **70**, 235-242.
- [34] L. Krutz; S. Senseman; A. Sciumbato, "Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples", *Journal of Chromatography A.*, 2003, **999**, 103-121.
- [35] E. Arnáiz, "Determination of volatiles in mouse urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry", *Analytical Letters*, 2014, **47**, 721-729.

- [36] Q. Liu; G. Sun; S. Wang; Q. Lin; J. Zhang; X. Li, "Analysis of the variation in scent components of *Hosta* flowers by HS-SPME and GC-MS", *Scientia Horticulturae*, 2014, **175**, 57-67.
- [37] M. Alpendurada, "Solid-phase microextraction: a promising technique for simple preparation in environmental analysis", *Journal of Chromatography A.*, 2000, **889**, 3-14.
- [38] O. Gottlieb, "Phytochemicals: differentiation and function", *Phytochemistry*, 1990, **29**, 1715-1724.
- [39] B. Schulz; C. Boyle; S. Draeger; A. Römmert; K. Krohn, "Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites", *Mycological Research*, 2002, **9**, 996-1004.
- [40] F. Macías; J. Mollinillo; R. Varella; J. Galindo, "Allelopathy: A natural alternative for weed control", *Pest Management Science*, 2007, **63**, 327-348.
- [41] A. Vilela; L. González; D. Ravetta, "Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento" *Ecología Austral*, 2011, **21**, 317-327.
- [42] A. Talmaciu; I. Volf; V. Popa, "A Comparative analysis of the 'green' techniques applied for polyphenols extraction from bioresources" *Chemistry and Biodiversity*, 2015, **12**, 1635-1651.
- [43] R. Ross, *Polyphenols in Plants. Isolation, Purification and extract Preparation*, 2014, Elsevier 1ª Ed., San Diego, EE.UU., 37-52.
- [44] G. Du; L. Sun; R. Zhao; L. Du, J. Song; L. Zhang; G. He; Y. Zhang; J. Zhang, "Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease", *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, **162**, 23-34.
- [45] J. Guillén; S. Mori; L. M. Paucar, "Características y propiedades funcionales del maíz morado (*Zea mays* L.) var. subnigroviolaceo", *Scientia Agropecuaria*, 2014, **5**, 211-217.
- [46] H. Gharras, "Polyphenols: food sources, properties and applications – a review", *International Journal of Food Science and Technology*, 2009, **44**, 2512-2518.
- [47] S. Martínez; J. González; J. Culebras; M. Tuñón, "Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes", *Nutrición Hospitalaria*, 2002, **6**, 271-278.
- [48] R. Russo; M. Sánchez, "Los flavonoides en la terapia cardiovascular", *Revista Costarricense de Cardiología*, 2006, **8**, 13-18.

- [49] A. Antonioli; A. Fontana; P. Piccoli, R. Bottini, "Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec", *Food Chemistry*, 2015, **178**, 172-178.
- [50] E. Rijke; P. Out; W. Niessen; W. Ariese; C. Gooijer; U. Brinkman, "Analytical separation and detection methods for flavonoids", *Journal of Chromatography A*, 2006, **1112**, 31-63.
- [51] C. Del Capiro; C. Serrano; M. Giusti, "Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler", *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 2009, **75**, 76-86.
- [52] S. de Pascual; M. Sanchez, "Anthocyanins: from plant to health", *Phytochemistry Reviews*, 2008, **7**, 281-299.
- [53] M. Aguilera; M. Reza; R. Chew; J. Meza, "Propiedades funcionales de las antocianinas", *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 2011, **8**, 16-22.
- [54] F. Aqil; M. Vadhanam; J. Jeyabalan; J. Cai; I. Singh; R. Gupta; "Detection of Anthocyanins/Anthocyanidins in Animal Tissues" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, **62**, 3912-3918.
- [55] R. Mohamed; G. Mansoori, "The Use of Supercritical Fluid Extraction Technology in Food Processing", *Food Technology Magazine*, 2002, 1-14.
- [56] M. Herrero; J. Mendiola; A. Cifuentes; E. Ibáñez, "Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, Review", *Journal of Chromatography A.*, 2010, **1217**, 2495-2511.
- [57] D. Ndiomu; C. Simpson, "Some applications of supercritical fluid extraction", *Analytica Chimica Acta*, 1998, **213**, 237-243.
- [58] S. Maksimovic; Z. Kesic; I. Lukic; M. Stoja, "Supercritical fluid extraction of *curry* flowers, sage leaves, and their mixture", *The Journal of Supercritical Fluids*, 2013, **84**, 1-12.
- [59] J. Liu; S. Lin; Z. Wang; E. Wang; Y. Zhang; J. Liu, "Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Maydis stigma* and its nitrite-scavenging ability", *Food and Bioproducts Processing*, 2011, **89**, 333-339.
- [60] S. Barker, "Matrix solid phase dispersion (MSPD), Review", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, **70**, 151-162.

- [61] K. Ridgway; S. Lalljie; R. Smith, "Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods", *Journal of Chromatography A*, 2007, **1153**, 36-53
- [62] A. Capriotti; C. Cavaliere; P. Giansanti; R. Guiotti, "Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction, Review", *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**, 2521-2532.
- [63] H. Xiao; M. Krucker; K. Albert; X. Liang, "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.*, 2004, **1032**, 117-124
- [64] A. Bucić, M. Planinić, Srećko Tomas, Mate Bilić, Darko Velić "Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds", *Journal of Food Engineering*, 2007, **81**, 236-242.
- [65] M. Romdhane; C. Gourdon, "Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound", *Chemical Engineering Journal*, 2002, **87**, 11-19.
- [66] D. Donskoy; A. Sutin; A. Ekimov, "Nonlinear acoustic interaction on contact interfaces and its use for nondestructive testing", *NDT&E International* 2001, **34**, 231-238.
- [67] M. Giusti; R. Wrolstad, "Characterization and measurement of anthocyanins by UV-vis spectroscopy", *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001, **5**, 1-13.
- [68] J. Zamora, "Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud", *Revista Chilena de Nutrición*, 2007, **34**, 17-26.
- [69] J. Rodríguez; J. Menéndez; Y. Trujillo, "Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo", *Revista Cubana de Medicina Militar*, 2001, **30**, 36-44.
- [70] M. Coronado; H. Salvador; L. Rey; M. Vázquez; C. Radilla, "Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana", *Revista Chilena de Nutrición*, 2015, **42**, 206-212.
- [71] Á. Vásquez; M. Cala; I. Miranda; G. Tafur; J. Martínez; E. Stashenko, "Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos hidro-alcohólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia Sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*", *Scientia et Technica Año XIII*, 2007, **33**, 205-207.
- [72] M. Martinello; M. Pramparo, "Poder antioxidante de extractos de romero concentrados por destilación molecular", *Información Tecnológica*, 2005, **16**, 17-20.

- [73] V. Sánchez; N. Méndez, “Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas: Review”, *Revista de Investigación Médica Sur*, 2013, **20**, 161-168.
- [74] E. Kukoski; A. Asuero; A. Troncoso, “Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2005, **25**, 726-732.
- [75] A. Muñoz; M. Castañeda; K. Blanco; C. Cardenas, J. Reyers; V. Kouznetsov; E. Stashenko, “Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol”, *Scientia et Technica Año XIII*, 2007, **1**, 125-128.
- [76] M. Cala; Á. Vásquez; J. Martínez; E. Stashenko, “Caracterización de compuestos fenólicos por electroforesis capilar de la especie *Phyllanthus acuminatus* (Euphorbiaceae) y estudio de su actividad antioxidante”, *Scientia et Technica Año XIII*, 2007, **1**, 173-175.
- [77] D. Huang; B. Ou; R. L. Prior, “The chemistry behind antioxidant capacity assays”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**, 1841-1856.
- [78] K. Stockham; R. Paiminb; J. Orbell; P. Adorno; S. Buddhadasa, “Modes of handling Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) data and reporting values in product labelling”, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, **24**, 686-691.
- [79] B. Ou; D. Hampsch; M. Flanagan; J. Deemer, “Analysis of antioxidant in common vegetable employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 3122-3128.
- [80] D. Gutiérrez; C. Ortiz; A. Cisneros, “Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal”, Simposio de Metrología 2008, Santiago de Querétaro, México, 2008, 1-5.
- [81] R. Re; N. Pellegrini; A. Proteggente; A. Pannala; M. Yand; C. Evans, “Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay”, *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, **26**, 1231-1237.
- [82] E. Stashenko; J. Martínez, “GC y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones”, *Scientia Chromatographica*, 2010, **2**, 23-46.
- [83] E. Stashenko; J. Martínez, “¿Cuántos componentes hay en una mezcla? Respuesta Cromatográfica”, *Scientia Chromatographica*, 2009, **1**, 23-33.

- [84] E. Stashenko; J. Martínez, "Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación", *Scientia Chromatographica*, 2009, **1**, 19-36.
- [85] E. Stashenko; J. Martínez, "Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2006, **70**, 235-242.
- [86] E. Stashenko; J. Martínez "Sampling flower scent for chromatographic analysis" *Journal of Separation Science*, 2008, **31**, 2022-2031.
- [87] E. Stashenko; J. Martínez, "Separar, fragmentar e integrar: la rutina de un análisis por GC-MS. Patrones de fragmentación de moléculas orgánicas", *Scientia Chromatographica*, 2010, **2**, 5-12.
- [88] E. Stashenko; J. Martínez, "Análisis de fragancias florales por GC-MS", *Scientia Chromatographica*, 2013, **5**, 7-25.
- [89] E. Stashenko; J. Martínez, "La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como herramienta de alta selectividad para caracterizar fósiles químicos en el petróleo", *Scientia Chromatographica*, 2012, **4**, 125-138.
- [90] E. Stashenko; J. Martínez; M. Cala; D. Durán; D. Caballero, "Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (verbenaceae) aromatic plants", *Journal of Separation Science*, 2013, **36**, 192-202.
- [91] S. Rissatoa; M. Galhiane; F. Knoll; B. Apon, "Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection", *Journal of Chromatography A*, 2004, **1048**, 153-159.
- [92] C. Batista; P. Sâmya; S. Gebara; N. Ré, "Análise de pesticidas organoclorados em agua usando a microextração em fase sólida por headspace com Cromatografia gasosa e espectrometría de massas", *Química Nova*, 2011, **34**, 1260-1264.
- [93] M. Mata; C. Lacueva; O. Jáuregui; R. Lamuela, "Determination of flavonoids in a citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS", *Food Chemistry*, 2007, **101**, 1742-1747.
- [94] A. Mari; A. Napolitano; M. Masullo; C. Pizza; S. Piacente, "Identification and quantitative determination of the polar constituents in *Helichrysum italicum* flowers and derived food supplements", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, **96**, 249-255.

- [95] J. Zhao; F. Gao; Y. Fu; W. Jin; P. Yang; D. Zhao, "Biomolecule separation using large pore mesoporous SBA-15 as a substrate in high performance liquid chromatography", *Chemical Communications*, 2002, **7**, 752-753.
- [96] S. Li; C. He; H. Liu; K. Li; F. Liu, "Ionic liquid-based aqueous two-phase system, a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid chromatography of opium alkaloids", *Journal of Chromatography B*, 2005, **826**, 58-62.
- [97] R. Tsao; R. Yang; J. Christopher; H. Zhu, "Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 6347-6353.
- [98] J. P. Coppin; Y. Xu; H. Chen; M. H. Pan; C. T. Ho; R. Juliani; J. E. Simon; Q. Wu, "Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*", *Journal of Funcional Foods*, 2013, **5**, 1892-1899.
- [99] E. Stashenko; J. Martínez; S. Cárdenas; R. Saavedra; D. Durán, "GC-MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques", *Journal of Separation Science*, 2013, **39**, 2901-2013.
- [100] M. Ormsby, "Analysis of laminated documents using solid-phase microextraction", *Journal of the American Institute for Conservation*, 2005, **44**, 13-26.
- [101] J. Paes; Raquel Dotta; G. F. Barbero; J. Martínez, "Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids", *The Journal of Supercritical Fluids*, 2014, **95**, 8-16.
- [102] J. Schuelter; E. Oliveira; B. Costa; P. Fernandes; V. Cinque; J. Visentainer, "Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis", *Chemistry Central Journal*, 2014, **8**, 1-9.
- [103] M. Giusti; R. Wrolstad, "Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems", *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **14**, 217-225.
- [104] E. Stashenko; C. Ruiz; A. Muñoz; M. Castañeda; J. Martínez, "Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia", *Natural Product Communications*, 2011, **43**, 141-148.
- [105] E. Stashenko; J. Martínez, "Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas" 2010, *Scientia Chromatographica*, **2**, 29-47.

- [106] V. Babushok; P. Linstrom; I. Zenkevich, "Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils" *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2011, **40**, 1-47.
- [107] S. Duarte; C. Cárdenas; J. Martínez; E. Stashenko, "Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por destilación-extracción con solvente simultánea, de hojas de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae)", *Scientia et Technica Año XIII*, **1**, 83-85.
- [108] F. Palacios; S. Gladstone, "Eficacia del farnesol y de un extracto de semilla de ayote como repelentes de *Atta mexicana*", *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 2003, **68**, 89-91.
- [109] J. Arey; A. Winer; R. Atkinson; S. Aschmann; W. Long; C. Morrison, "The emission Of (Z)-3-Hexen-1-ol, (Z)-3-Hexenylacetate and other oxygenated hydrocarbons from agricultural plant species", *Atmospheric Environment*, 1991, **25**, 1063-1075.
- [110] P. Hughes, "Myrcene: A precursor of pheromones in ips beetles", *Journal of Insect Physiology*, 1974, **20**, 1271-1275.
- [111] J. Zhu; K. Chung, "Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*" *Journal of Chemical Ecology*, 2005, **31**, 1733-1746.
- [112] D. Soares; N. Portella; M. Freiman; S. Ramos; A. Siani; E. Saraiva, "*trans*- β -caryophyllene: an effective antileishmanial compound found in commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.)", *Hindawi Publishing Corporation*, 2013, **2013**, 1-13.
- [113] W. Suijun; Y. Zhen; G. Ying; W. Yanfang, "A role for *trans*-caryophyllene in the moderation of insulin secretion", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, **444**, 451-454.
- [114] J. Sun, "D-Limonene: Safety and Clinical Applications: Review", *Alternative Medicine*, 2007, **12**, 259-264.
- [115] A. Peana; P. D'Aquila; F. Panin; G. Serra; P. Pippia; M. Moretti, "Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils", *Phytomedicine*, 2002, **9**, 721-726.
- [116] A. Herman; T. Krzysztof, "Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils", *Current Microbiology*, 2016, **72**, 165-172.
- [117] T. More; B. Kulkarni; M. Nalawade; A. Arvindekar, "Antidiabetic activity of linalool and limonene in streptozotocin induced diabetic rat: a combinatorial therapy

approach”, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, **6**, 159-163.

[118] A. Lapczynski; C. Letizia; A. Api, “Addendum to fragrance material review on linalool”, *Food and Chemical Toxicology*, 2008, **46**, 190-192.

[119] W. Takken; D. Kline, “Carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants”, *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1989, **5**, 311-316”

[120] P. Xu; F. Zhu; G. Buss; W. Leal, “1-Octen-3-ol the attractant that repels”, *Faculty 1000 Research*, 2015, **18**, 156.

[121] D. Okull; R. Beelman; H. Gourama, “Antifungal activity of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid and 1-octen-3-ol against *Penicillium expansum* in potato dextrose agar medium”, *Journal of Food Protection*, 2003, **66**, 1503-1505.

[122] G. Laporta; M. Sallum, “Effect of CO₂ and 1-octen-3-ol attractants for estimating species richness and the abundance of diurnal mosquitoes in the southeastern Atlantic forest, Brazil”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2011, **106**, 279-284.

[123] S. Andersson; H. Dobson, “Behavioral foraging responses by the butterfly *Heliconius Melpomene* to *Lantana camara* Floral Scent”, *Journal of Chemical Ecology*, 2003, **29**, 2303-2318.

[124] E. Nicoué; S. Savard; K. Belkacemi, “Anthocyanins in Wild Blueberries of Quebec: Extraction and Identification”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2007, **55**, 56.

[125] R. Khanal; L. Howard; R. Prior, “Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins”, *Food Research International*, 2010, **43**, 1464-1469.

[126] NIST Chemistry WebBook, “Base de datos”, Disponible en: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Fecha de acceso: 28 de noviembre de 2016.

[127] R. Adams, “Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry”, Editorial Allured Publishing Corporation, 4^a Ed., Illinois, EE.UU., ISBN 1932633219, 2004, 1-804.

[128] R. Balamurugan; V. Duraipandiyar; S. Ignacimuthu, “Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin-induced diabetic rats” *European Journal Pharmacology*, 2011, **667**, 410-418.

- [129] M. Singh; G. Khare; S. Iyer; G. Sharwan; D. Tripathi, "Clerodendrum serratum: A clinical approach", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2012, **2**, 11-15
- [130] T. Kametani; H. Furuyama, "Synthesis of Vitamin D₃ and Related Compounds" *Medial Research Reviews*, 1987, **7**, 147-171.
- [131] Y. Lee; K. Shin, B. Kwang; S. Lee, "Anti-diabetic activities of fucosterol from *Pelvetia siliquosa*", *Archives of Pharmacal Research*, 2004, **27**, 1120-1122.
- [132] M. Sang; J. Sun; H. Choi; Y. Cho; M. Bang; N. Baek; K. Tae, "Fucosterol isolated from *Undaria pinnatifida* inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines via the inactivation of nuclear factor- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in RAW264.7 macrophages", *Food Chemistry*, 2012, **135**, 967–975.
- [133] A. Navarro; B. de las Heras; A. Villar, "Anti-Inflammatory and Immunomodulating Properties Fraction from *Sideritis foetens* CLEM", *Pharmaceutical Society of Japan*, 2001, **24**, 470-473.
- [134] F. Conforti; S. Sosa; M. Marrelli; F. Menichini; G. Statti; D. Uzunov; A. Tubaro; F. Menichini; R. Della, "In-vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants" *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, **116**, 144–151.
- [135] C. Canella; A. Giusti, "Conjugated linoleic acid a natural anticarcinogenic substance from animal food", *Italian Journal of Food Science*, 2000, **12**, 123-127.
- [136] S. Lima; M. Fonseca; J. de Franca; V. Manfredini; M. da Silveira; L. Tatsuo, "Espécies reativa de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinacao" *Quimica Nova*, 2007, **30**, 1323-1338.
- [137] M. Bimakr; R. Rahmana; F. Saleena; A. Ganjloo; L. Salleha; J. Selamat; A. Hamidc; I. Zaidul, "Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves", *Food and Bioproducts Processing*, 2011, **89**, 67-72.
- [138] K. Miean; S. Mohamed, "Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants", *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 2001, **49**, 3106-3112.
- [139] H. Viola; C. Wasowski; M. Levi; C. Wolfman; R. Silveira; F. Dajas; J. Medina; A. Paladini, "Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects", *Planta Medica*, 1995, **61**, 213-6.

- [140] F. Yin; A. Giuliano; R. Law; A. Van, "Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells", *Anticancer Research*, 2001, **21**, 413-420.
- [141] H. Ueda; C. Yamazaki; M. Yamazaki, "Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, **25**, 1197-1202.
- [142] J. Brown; C. Rice, "Luteolin-Rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation *in vitro*", *Free Radical Research*, 1998, **29**, 247-255.
- [143] M. López, "Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin" *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2009, **9**, 31-59.
- [144] C. Tortosa; Ø. Andersen; P. Gardner; P. Morrice; S. Wood; S. Duthie; A. Collins; G. Duthie, "Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and dna damage in vitamin e-depleted rats", *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, **31**, 1033-1037.
- [145] E. Kuskoski; A. Asuero; M. García; A. Troncoso; R. Fett, "Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos", *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2004, **24**, 692-693.
- [146] E. Ainsworth; K. Gillespie, "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent", *Nature Publishing Group*, 2007, **2**, 875-877.
- [147] N. Turkmen; F. Sari; Y. Sedat, "Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods" *Food Chemistry*, 2006, **99**, 835–841.

BIBLIOGRAFÍA

- A. Antonioli; A. Fontana; P. Piccoli, R. Bottini, "Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec", *Food Chemistry*, 2015, **178**, 172-178.
- A. Bucić, M. Planinić, Srećko Tomas, Mate Bilić, Darko Velić "Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds", *Journal of Food Engineering*, 2007, **81**, 236-242.
- A. Capriotti; C. Cavaliere; P. Giansanti; R. Guiotti, "Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction, Review", *Journal of Chromatography A*, 2010,**1217**, 2521-2532.
- Á. Celis; C. Mendoza; M. Pachón; J. Cardona; W. Delgado; L. Cuca, "Extractos vegetales utilizados como biocontroladores", *Agronomía Colombiana*, 2008, **26**, 97-106.
- A. Herman; T. Krzysztof, "Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils", *Current Microbiology*, 2016, **72**, 165-172.
- A. Krings; G. Morillo, "*Gonolobus murphyae* (Apocynaceae), a new species from montane Colombia", *Systematic Botany*, 2013, **38**, 1138-1141.
- A. Lapczynski; C. Letizia; A. Api, "Addendum to fragrance material review on linalool", *Food and Chemical Toxicology*, 2008, **46**, 190-192.
- A. Mari; A. Napolitano; M. Masullo; C. Pizza; S. Piacente, "Identification and quantitative determination of the polar constituents in *Helichrysum italicum* flowers and derived food supplements", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, **96**, 249-255.
- A. Muñoz; M. Castañeda; K. Blanco; C. Cardenas, J. Reyers; V. Kouznetsov; E. Stashenko, "Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol", *Scientia et Technica Año XIII*, 2007, **1**, 125-128.
- A. Nascimento; L. Raggi; M. Young; P. Moreno, "Chemical characterization of the volatile compounds of the flowers of *Bidens segetum* Martius ex Colla Asteraceae", *Journal of Essential Oil Research*, 2015, **27**, 70-75.

- A. Navarro; B. de las Heras; A. Villar, "Anti-Inflammatory and Immunomodulating Properties Fraction from *Sideritis foetens* CLEM", *Pharmaceutical Society of Japan*, 2001, **24**, 470-473.
- A. Peana; P. D'Aquila; F. Panin; G. Serra; P. Pippia; M. Moretti, "Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils", *Phytomedicine*, 2002, **9**, 721-726.
- A. Talmaciu; I. Volf; V. Popa, "A Comparative analysis of the 'green' techniques applied for polyphenols extraction from bioresources" *Chemistry and Biodiversity*, 2015, **12**, 1635-1651.
- Á. Vásquez; M. Cala; I. Miranda; G. Tafur; J. Martínez; E. Stashenko, "Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos hidro-alcohólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia Sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*", *Scientia et Technica Año XIII*, 2007, **33**, 205-207.
- A. Vilela; L. González; D. Ravetta, "Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento" *Ecología Austral*, 2011, **21**, 317-327.
- B. Ou; D. Hampsch; M. Flanagan; J. Deemer, "Analysis of antioxidant in common vegetable employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 3122-3128.
- B. Schulz; C. Boyle; S. Draeger; A. Römmert; K. Krohn, "Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites", *Mycological Research*, 2002, **9**, 996-1004.
- C. Batista; P. Sâmya; S. Gebara; N. Ré, "Análise de pesticidas organoclorados em agua usando a microextração em fase sólida por headspace com Cromatografia gasosa e espectrometria de massas", *Química Nova*, 2011, **34**, 1260-1264.
- C. Canella; A. Giusti, "Conjugated linoleic acid a natural anticarcinogenic substance from animal food", *Italian Journal of Food Science*, 2000, **12**, 123-127.
- C. de Oliveira; J. Vilela; R. Ribeiro; M. Torres, "Stability of the microstructure and carotenoids contents of the freeze-dried pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp in the powdered form", *Food Science and Technology*, 2008, **4**, 830-839.
- C. Del Capio; C. Serrano; M. Giusti, "Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler", *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 2009, **75**, 76-86.

- C. Ratti, "Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review", *Journal of Food Engineering*, 2001, **49**, 311-319.
- C. Rijswick, "Gearing up for stronger competition", *Food & Agribusiness Research and Advisory*, 2015, **475**, 1-4.
- C. Tortosa; Ø. Andersen; P. Gardner; P. Morrice; S. Wood; S. Duthie; A. Collins; G. Duthie, "Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and dna damage in vitamin e-depleted rats", *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, **31**, 1033-1037.
- D. Debouk, "Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)", 2ª Ed., Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Palmira, Colombia, 1984, 36-37.
- D. Donskoy; A. Sutin; A. Ekimov, "Nonlinear acoustic interaction on contact interfaces and its use for nondestructive testing", *NDT&E International* 2001, **34**, 231-238.
- D. Gutiérrez; C. Ortiz; A. Cisneros, "Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal", Simposio de Metrología 2008, Santiago de Querétaro, México, 2008, 1-5.
- D. Huang; B. Ou; R. L. Prior, "The chemistry behind antioxidant capacity assays", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**, 1841-1856.
- D. Ndiomu; C. Simpson, "Some applications of supercritical fluid extraction", *Analytica Chimica Acta*, 1998, **213**, 237-243.
- D. Okull; R. Beelman; H. Gourama, "Antifungal activity of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid and 1-octen-3-ol against *Penicillium expansum* in potato dextrose agar medium", *Journal of Food Protection*, 2003, **66**, 1503-1505.
- D. Soares; N. Portella; M. Freiman; S. Ramos; A. Siani; E. Saraiva, "*trans*- β -caryophyllene: an effective antileishmanial compound found in commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.)", *Hindawi Publishing Corporation*, 2013, **2013**, 1-13.
- D. Yin; R. Yuan; Q. Wu; S. Li; S. Shao; Y. Xu; X. Hao; L. Wang, "Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities", *Food Chemistry*, 2015, **187**, 20-28.
- E. Ainsworth; K. Gillespie, "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent", *Nature Publishing Group*, 2007, **2**, 875-877.

- E. Arnáiz, "Determination of volatiles in mouse urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry", *Analytical Letters*, 2014, **47**, 721-729.
- E. Berardi; S. Hildreth; R. Helm; B. Winkel; S. Smith, "Evolutionary correlations in flavonoid production across flowers and leaves in the *Lochrominae* (Solanaceae)" *Phytochemistry*, 2016, **121**, 1-9.
- E. Gilman, "*Petrea volubilis*", University of Florida, *Fact Sheet*, 1999, **467**, 1-3.
- E. Kukoski; A. Asuero; A. Troncoso, "Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos", *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2005, **25**, 726-732.
- E. Kuskoski; A. Asuero; M. García; A. Troncoso; R. Fett, "Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos", *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2004, **24**, 692-693.
- E. Nicoué; S. Savard; K. Belkacemi, "Anthocyanins in Wild Blueberries of Quebec: Extraction and Identification", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2007, **55**, 56.
- E. Rijke; P. Out; W. Niessen; W. Ariese; C. Gooijer; U. Brinkman, "Analytical separation and detection methods for flavonoids", *Journal of Chromatography A*, 2006, **1112**, 31-63.
- E. Stashenko; C. Ruiz; A. Muñoz; M. Castañeda; J. Martínez, "Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia organoides* H.B.K. grown in Colombia", *Natural Product Communications*, 2011, **43**, 141-148.
- E. Stashenko; J. Martínez "Sampling flower scent for chromatographic analysis" *Journal of Separation Science*, 2008, **31**, 2022-2031.
- E. Stashenko; J. Martínez, "¿Cuántos componentes hay en una mezcla? Respuesta Cromatográfica", *Scientia Chromatographica*, 2009, **1**, 23-33.
- E. Stashenko; J. Martínez, "Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas" 2010, *Scientia Chromatographica*, **2**, 29-47.
- E. Stashenko; J. Martínez, "Análisis de fragancias florales por GC-MS", *Scientia Chromatographica*, 2013, **5**, 7-25.
- E. Stashenko; J. Martínez, "Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación", *Scientia Chromatographica*, 2009, **1**, 19-36.

- E. Stashenko; J. Martínez, "GC y GC-MS: configuración del equipo *versus* aplicaciones", *Scientia Chromatographica*, 2010, **2**, 23-46.
- E. Stashenko; J. Martínez, "La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como herramienta de alta selectividad para caracterizar fósiles químicos en el petróleo", *Scientia Chromatographica*, 2012, **4**, 125-138.
- E. Stashenko; J. Martínez, "Plantas aromáticas y aceites esenciales: estudio y aplicaciones", *Publicaciones UIS*, 2012, 15-41.
- E. Stashenko; J. Martínez, "Review sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, **70**, 235-242.
- E. Stashenko; J. Martínez, "Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2006, **70**, 235-242.
- E. Stashenko; J. Martínez, "Separar, fragmentar e integrar: la rutina de un análisis por GC-MS. Patrones de fragmentación de moléculas orgánicas", *Scientia Chromatographica*, 2010, **2**, 5-12.
- E. Stashenko; J. Martínez; M. Cala; D. Durán; D. Caballero, "Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (verbenaceae) aromatic plants", *Journal of Separation Science*, 2013, **36**, 192-202.
- E. Stashenko; J. Martínez; S. Cárdenas; R. Saavedra; D. Durán, "GC-MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques", *Journal of Separation Science*, 2013, **39**, 2901-2013.
- F. Aqil; M. Vadhanam; J. Jeyabalan; J. Cai; I. Singh; R. Gupta; "Detection of Anthocyanins/Anthocyanidins in Animal Tissues" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, **62**, 3912-3918.
- F. Conforti; S. Sosa; M. Marrelli; F. Menichini; G. Statti; D. Uzunov; A. Tubaro; F. Menichini; R. Della, "*In-vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants" *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, **116**, 144–151.
- F. Macías; J. Mollinillo; R. Varella; J. Galindo, "Allelopathy: A natural alternative for weed control", *Pest Management Science*, 2007, **63**, 327-348.
- F. Palacios; S. Gladstone, "Eficacia del farnesol y de un extracto de semilla de ayote como repelentes de *Atta mexicana*", *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 2003, **68**, 89-91.

- F. Yin; A. Giuliano; R. Law; A. Van, "Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells", *Anticancer Research*, 2001, **21**, 413-420.
- G. Du; L. Sun; R. Zhao; L. Du, J. Song; L. Zhang; G. He; Y. Zhang; J. Zhang, "Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease", *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, **162**, 23-34.
- G. Laporta; M. Sallum, "Effect of CO₂ and 1-octen-3-ol attractants for estimating species richness and the abundance of diurnal mosquitoes in the southeastern Atlantic forest, Brazil", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2011, **106**, 279-284.
- H. Gharras, "Polyphenols: food sources, properties and applications – a review", *International Journal of Food Science and Technology*, 2009, **44**, 2512-2518.
- H. Ueda; C. Yamazaki; M. Yamazaki, "Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, **25**, 1197-1202.
- H. Viola; C. Wasowski; M. Levi; C. Wolfman; R. Silveira; F. Dajas; J. Medina; A. Paladini, "Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects", *Planta Medica*, 1995, **61**, 213-6.
- H. Xiao; M. Krucker; K. Albert; X. Liang, "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.*, 2004, **1032**, 117-124
- J. Coppin; Y. Xu; H. Chen; M. H. Pan; C. T. Ho; R. Juliani; J. E. Simon; Q. Wu, "Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*", *Journal of Funcional Foods*, 2013, **5**, 1892-1899.
- J. Zamora, "Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud", *Revista Chilena de Nutrición*, 2007, **34**, 17-26.
- J. Arey; A. Winer; R. Atkinson; S. Aschmann; W. Long; C. Morrison, "The emission Of (Z)-3-Hexen-1-ol, (Z)-3-Hexenylacetate and other oxygenated hydrocarbons from agricultural plant species", *Atmospheric Environment*, 1991, **25**, 1063-1075.
- J. Brown; C. Rice, "Luteolin-Rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation *in vitro*", *Free Radical Research*, 1998, **29**, 247-255.
- J. Chanes; J. Aguilera; G. Barbosa, "Engineering and Food for the 21st Century", *CRC Press*, New York, EE.UU., 2002, 254-255.

- J. Garzón Venegas; F. González, "Five new species and three new records of *Burmeistera* (Campanulaceae-Lobelioidea) from Colombia", *Caldasia*, 2012, **34**, 309-324.
- J. Guillén; S. Mori; L. M. Paucar, "Características y propiedades funcionales del maíz morado (*Zea mays* L.) var. subnigroviolaceo", *Scientia Agropecuaria*, 2014, **5**, 211-217.
- J. Liu; S. Lin; Z. Wang; E. Wang; Y. Zhang; J. Liu, "Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Maydis stigma* and its nitrite-scavenging ability", *Food and Bioproducts Processing*, 2011, **89**, 333-339.
- J. Lombraña; C. De Elvira; M. Villaran, "Simulation and design of heating profiles in heat controlled freeze-drying of pharmaceuticals in vials by the application of a sublimation cylindrical model", *Drying Technology*, 1993, **11**, 85-102.
- J. Paes; Raquel Dotta; G. F. Barbero; J. Martínez, "Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids", *The Journal of Supercritical Fluids*, 2014, **95**, 8-16.
- J. Pawliszyn, "Theory of Solid-Phase Microextraction", *Journal of Chromatographic Science*, 2000, **38**, 270-278.
- J. Plitt, "La flor y otros órganos derivados", 1ª Ed., Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, 2006, 100-101.
- J. Rodríguez; J. Menéndez; Y. Trujillo, "Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo", *Revista Cubana de Medicina Militar*, 2001, **30**, 36-44.
- J. Schuelter; E. Oliveira; B. Costa; P. Fernandes; V. Cinque; J. Visentainer, "Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis", *Chemistry Central Journal*, 2014, **8**, 1-9.
- J. Sena; J. Durringer; G. Maia; J. Tavares; H. Xavier; M. Sobral; E. da Cunha; J. Barbosa, "Ecdysteroids from *Vitex* Species: Distribution and Compilation of Their 13C-NMR Spectral Data", *Chemistry & Biodiversity*, 2008, **5**, 707-713.
- J. Shah; K. Unnikrishnan, "Vascular connections of axillary buds in some members of the Verbenaceae and the Labiatae", *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B*, 1968, **68**, 284-288.
- J. Sun, "D-Limonene: Safety and Clinical Applications: Review", *Alternative Medicine*, 2007, **12**, 259-264.

J. Zhao; F. Gao; Y. Fu; W. Jin; P. Yang; D. Zhao, "Biomolecule separation using large pore mesoporous SBA-15 as a substrate in high performance liquid chromatography", *Chemical Communications*, 2002, **7**, 752-753.

J. Zhu; K. Chung, "Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*" *Journal of Chemical Ecology*, 2005, **31**, 1733-1746.

K. Miean; S. Mohamed, "Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants", *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 2001, **49**, 3106-3112.

K. Niranjana; J. Pardo; D. Mottram, "In Engineering and Food for the 21st Century: The Relation Between Sublimation Rate and Volatile Retention During the Freezing-drying of Coffee", *CRC Press*, Boca Raton, Florida, 2002, 253-268.

K. Ridgway; S. Lalljie; R. Smith, "Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods", *Journal of Chromatography A*, 2007, **1153**, 36-53

K. Stockham; R. Paiminb; J. Orbell; P. Adorno; S. Buddhadasa, "Modes of handling Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) data and reporting values in product labelling", *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, **24**, 686-691.

L. Arce, "Flora de Costa Rica I", 1^a Ed., Universidad Estatal a distancia, San José, Costa Rica, 2011, 27.

L. Grajales; W. Cardona; C. Orrego, "Liofilización de carambola (*Averrhoa carambola* L.) osmodeshidratada", *Ingeniería y Competitividad*, 2005, **7**, 19-26.

L. Krutz; S. Senseman; A. Sciumbato, "Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples", *Journal of Chromatography A.*, 2003, **999**, 103-121.

M. Abdelwahab; A. Abdel; M. Fouad; S. Desoukey; M. Kamel, "Phytochemical and biological study of *Petrea volubilis* L. (Verbenacea)", *Bulletin of Pharmaceutical Sciences - Assiut University*, 2011, **34**, 9-20.

M. Aguilera; M. Reza; R. Chew; J. Meza, "Propiedades funcionales de las antocianinas", *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 2011, **8**, 16-22.

M. Alpendurada, "Solid-phase microextraction: a promising technique for simple preparation in environmental analysis", *Journal of Chromatography A.*, 2000, **889**, 3-14.

- M. Bimakr; R. Rahmana; F. Saleena; A. Ganjloo; L. Salleha; J. Selamat; A. Hamidc; I. Zaidul, "Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves", *Food and Bioproducts Processing*, 2011, **89**, 67-72.
- M. Cala; Á. Vásquez; J. Martínez; E. Stashenko, "Caracterización de compuestos fenólicos por electroforesis capilar de la especie *Phyllanthus acuminatus* (Euphorbiaceae) y estudio de su actividad antioxidante", *Scientia et Technica Año XIII*, 2007, **1**, 173-175.
- M. Coronado; H. Salvador; L. Rey; M. Vázquez; C. Radilla, "Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana", *Revista Chilena de Nutrición*, 2015, **42**, 206-212.
- M. Giusti; R. Wrolstad, "Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems", *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **14**, 217-225.
- M. Giusti; R. Wrolstad, "Characterization and measurement of anthocyanins by UV-vis spectroscopy", *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001, **5**, 1-13.
- M. Herrero; J. Mendiola; A. Cifuentes; E. Ibáñez, "Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, Review", *Journal of Chromatography A.*, 2010, **1217**, 2495-2511.
- M. López, "Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin" *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2009, **9**, 31-59.
- M. Martinello; M. Pramparo, "Poder antioxidante de extractos de romero concentrados por destilación molecular", *Información Tecnológica*, 2005, **16**, 17-20.
- M. Mata; C. Lacueva; O. Jáuregui; R. Lamuela, "Determination of flavonoids in a citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS", *Food Chemistry*, 2007, **101**, 1742-1747.
- M. Ormsby, "Analysis of laminated documents using solid-phase microextraction", *Journal of the American Institute for Conservation*, 2005, **44**, 13-26.
- M. Rahman; A. Siddika; B. Bhadra; S. Rahman; M. Chowdhury; B. Agarwala; M. Rahmatullah, "Antihyperglycemic activity studies on methanol extract of *Petrea volubilis* L. (Verbenaceae) leaves and *Excoecaria agallocha* L. (Euphorbiaceae) stems", *Advances in Natural and Applied Sciences*, 2010, **4**, 361-364.
- M. Romdhane; C. Gourdon, "Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound", *Chemical Engineering Journal*, 2002, **87**, 11-19.

M. Sang; J. Sun; H. Choi; Y. Cho; M. Bang; N. Baek; K. Tae, "Fucosterol isolated from *Undaria pinnatifida* inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines via the inactivation of nuclear factor- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in RAW264.7 macrophages", *Food Chemistry*, 2012, **135**, 967–975.

M. Singh; G. Khare; S. Iyer; G. Sharwan; D. Tripathi, "*Clerodendrum serratum*: A clinical approach", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2012, **2**, 11-15

N. Abdel; G. Dawoud; A. El; T. Morsy, "Interrelation of antioxidant, anticancer and antilishmania effects of some selected Egyptian plants and their phenolic constituents", *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 2011, **41**, 785-800.

N. Burguet; N. Sierra; L. Brito, "Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad", *CENIC Ciencias Biológicas*, 2012, **43**, 1-4.

N. Turkmen; F. Sari; Y. Sedat, "Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods" *Food Chemistry*, 2006, **99**, 835–841.

NIST Chemistry WebBook, "Base de datos", Disponible en: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Fecha de acceso: 28 de noviembre de 2016.

O. Gottlieb, "Phytochemicals: differentiation and function", *Phytochemistry*, 1990, **29**, 1715-1724.

O. Palacios; G. Castillo; S. Vázquez; S. del Amo, "Flora vascular de la selva mediana subcaducifolia del centro de Veracruz, México", *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 2014, **85**, 125-142.

P. Hughes, "Myrcene: A precursor of pheromones in ips beetles", *Journal of Insect Physiology*, 1974, **20**, 1271-1275.

P. Matteo; G. Donsì; G. Ferrari, "The role of heat and mass transfer phenomena in atmospheric freeze-drying of foods in a fluidized bed", *Journal of Food Engineering*. 2003, **59**, 267-275.

P. Xu; F. Zhu; G. Buss; W. Leal, "1-Octen-3-ol the attractant that repels", *Faculty 1000 Research*, 2015, **18**, 156.

Q. Liu; G. Sun; S. Wang; Q. Lin; J. Zhang; X. Li, "Analysis of the variation in scent components of *Hosta* flowers by HS-SPME and GC-MS", *Scientia Horticulturae*, 2014, **175**, 57-67.

- R. Adams, "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry", Editorial Allured Publishing Corporation, 4^a Ed., Illinois, EE.UU., ISBN 1932633219, 2004, 1-804.
- R. Balamurugan; V. Duraipandiyan; S. Ignacimuthu, "Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin-induced diabetic rats" *European Journal Pharmacology*, 2011, **667**, 410-418.
- R. Khanal; L. Howard; R. Prior, "Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins", *Food Research International*, 2010, **43**, 1464-1469.
- R. Mohamed; G. Mansoori, "The Use of Supercritical Fluid Extraction Technology in Food Processing", *Food Technology Magazine*, 2002, 1-14.
- R. Re; N. Pellegrini; A. Proteggente; A. Pannala; M. Yand; C. Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS^{•+} radical cation decolorization assay", *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, **26**, 1231-1237.
- R. Ross, Polyphenols in Plants. Isolation, Purification and extract Preparation, 2014, Elsevier 1^a Ed., San Diego, EE.UU., 37-52.
- R. Rueda, "Systematics and Evolution of the Genus *Petrea* (Verbenaceae)", *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1994, **81**, 610-652.
- R. Russo; M. Sánchez, "Los flavonoides en la terapia cardiovascular", *Revista Costarricense de Cardiología*, 2006, **8**, 13-18.
- R. Tsao; R. Yang; J. Christopher; H. Zhu, "Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 6347-6353.
- S. Andersson; H. Dobson, "Behavioral foraging responses by the butterfly *Heliconius Melpomene* to *Lantana camara* Floral Scent", *Journal of Chemical Ecology*, 2003, **29**, 2303-2318.
- S. Barker, "Matrix solid phase dispersion (MSPD), Review", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, **70**, 151-162.
- S. de Pascual; M. Sanchez, "Anthocyanins: from plant to health", *Phytochemistry Reviews*, 2008, **7**, 281-299.
- S. Drewes; S. Martínez, "Morphology of inflorescences in Verbenaceae-Verbenoideae II: Tribe Petreeae", *Darwiniana*, 1999, **37**, 209-218.

S. Duarte; C. Cárdenas; J. Martínez; E. Stashenko, "Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por destilación-extracción con solvente simultánea, de hojas de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae)", *Scientia et Technica Año XIII*, **1**, 83-85.

S. Li; C. He; H. Liu; K. Li; F. Liu, "Ionic liquid-based aqueous two-phase system, a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid chromatography of opium alkaloids", *Journal of Chromatography B*, 2005, **826**, 58-62.

S. Lima; M. Fonseca; J. de Franca; V. Manfredini; M. da Silveira; L. Tatsuo, "Espécies reativa de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinacao" *Quimica Nova*, 2007, **30**, 1323-1338.

S. Maksimovic; Z. Kesic; I. Lukic; M. Stoja, "Supercritical fluid extraction of *curry* flowers, sage leaves, and their mixture", *The Journal of Supercritical Fluids*, 2013, **84**, 1-12.

S. Martínez; J. González; J. Culebras; M. Tuñón, "Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes", *Nutrición Hospitalaria*, 2002, **6**, 271-278.

S. Padma; C. Anandharamakrishnana; A. Stapley, "Spray-freeze-drying: A novel process for the drying of foods and bioproducts", *Trends in Food Science & Technology*, 2015, **41**, 161-181.

S. Rissatoa; M. Galhiane; F. Knoll; B. Apon, "Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection", *Journal of Chromatography A*, 2004, **1048**, 153-159.

T. Kametani; H. Furuyama, "Synthesis of Vitamin D₃ and Related Compounds" *Medial Research Reviews*, 1987, **7**, 147-171.

T. More; B. Kulkarni; M. Nalawade; A. Arvindekar, "Antidiabetic activity of linalool and limonene in streptozotocin induced diabetic rat: a combinatorial therapy approach", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, **6**, 159-163.

Universidad de Illes Balears, "Herbario Virtual del Mediterráneo Occidental", Disponible: <http://herbarivirtual.uib.es/cat-med/especie/5926.html>; Fecha de acceso: 1 de febrero de 2017.

Universidad Nacional de Colombia, "Herbario virtual Universidad Nacional de Colombia, colecciones científicas en líneas", Disponible:

<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=110579>; Fecha de acceso: 1 de febrero de 2017.

V. Babushok; P. Linstrom; I. Zenkevich, "Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils" *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2011, **40**, 1-47.

V. Sánchez; N. Méndez, "Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas: Review", *Revista de Investigación Médica Sur*, 2013, **20**, 161-168.

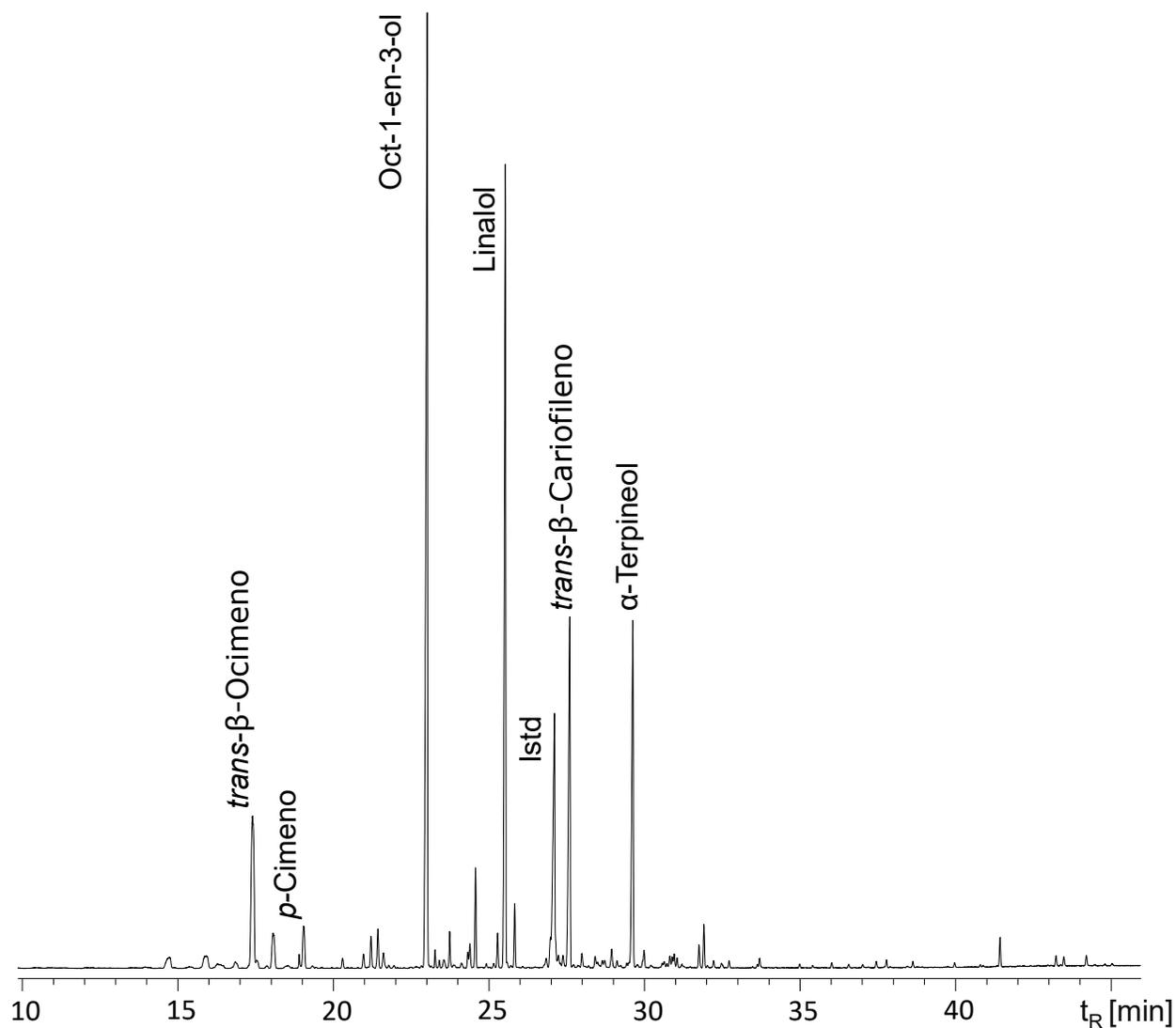
W. Suijun; Y. Zhen; G. Ying; W. Yanfang, "A role for *trans*-caryophyllene in the moderation of insulin secretion", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, **444**, 451-454.

W. Takken; D. Kline, "Carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants", *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1989, **5**, 311-316"

Y. Lee; K. Shin, B. Kwang; S. Lee, "Anti-diabetic activities of fucosterol from *Pelvetia siliquosa*", *Archives of Pharmacal Research*, 2004, **27**, 1120-1122.

ANEXOS

ANEXO A. Perfil cromatográfico de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR/PDMS) de flores de *P. volubilis* L., muestreada a las 12:00 m. Columna DB-WAX de 60 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 μ m, d_f , detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*.



ANEXO B.

Perfil cromatográfico de la fracción volátil aislada por HS-SPME (CAR/PDMS) de flores de *P. volubilis* L., muestreada a las 6:00 p.m. Columna DB-WAX de 60 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 μ m, d_f , detector selectivo de masas (EI, 70 eV), modo de inyección: *splitless*.

