

Estudio de la composición química y la capacidad antioxidante del aceite esencial y de los extractos aislados de *O. campechianum* (Lamiaceae).

Juan Josafat Tarazona Fiallo

Trabajo de Grado para optar por el título de Químico

Directora

Elena Stashenko

Química, PhD.



Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2022

### **Dedicatoria**

Indudablemente, cada uno de los logros personales y académicos alcanzados, son y serán dedicados a mis padres, don JOSAFAT y doña TERESA, a quienes amo con mi vida y quienes han entregado todo de ellos por hacer de mí una persona integra, con carácter y muy feliz. Además, quiero dedicarle este logro a todos aquellos que continúan soñando y construyendo una Colombia en paz y con real justicia social.

### **Agradecimientos**

En primera medida, agradecerle a la vida por permitirme ser parte de este proceso de formación no solamente profesional, sino personal. A mis padres, quienes han sido y seguirán siendo un importante apoyo, quienes siempre han sido y continuarán siendo un importante apoyo en mi vida, quienes día a día continúan motivándome e inculcándome la importancia de la educación en la construcción de un mejor futuro para todos. De igual forma, agradecer a toda mi familia por creer e impulsarme siempre a sacar lo mejor de mí. A la doctora Elena Stashenko y al doctor Jairo René Martínez por sus importantes enseñanzas y por permitirme hacer parte de tan importante centro de investigación CENIVAM, a todos mis compañeros de CIBIMOL y CROM-MASS por hacer parte.

Agradecimientos a Minciencias, Mineducación, Mincomercio e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

**Tabla de Contenido**

Introducción .....	40
1. Marco Referencial .....	42
1.1. Marco de Antecedentes .....	42
1.2. Marco Teórico .....	47
1.2.1 <i>Ocimum campechianum</i> Mill .....	47
1.2.2. <i>Aceites Esenciales</i> .....	48
1.2.3. Técnicas de Destilación .....	48
1.2.4. Extractos Vegetales .....	49
1.2.5. Técnicas de Extracción .....	50
1.2.6. Análisis Cromatográfico.....	51
1.2.7. Actividad Antioxidante.....	53
2. Metodología.....	58
2.1. Recolección del Vegetal de <i>O. campechianum</i> .....	58
2.2. Obtención de Metabolitos Secundarios Presentes en la Especie Vegetal <i>O. campechianum</i> . .....	59
2.2.1. <i>Hidrodestilación Asistida por la Radiación de Microondas</i> .....	59
2.2.2. <i>Extracción con Solvente Agua-Etanol</i> .....	60
2.2.3 <i>Extracción por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida.</i> .....	61
2.3. Análisis Cromatográfico .....	62
2.3.1. <i>Análisis por GC/MS</i> .....	62
2.3.2. <i>Análisis por GC-FID</i> .....	63
2.3.3. <i>Análisis HPLC-DAD</i> .....	63
2.3.4. <i>Análisis por UHPLC-ESI/Orbitrap-MS</i> .....	64

	5
2.4. Capacidad Antioxidante .....	65
2.4.1. <i>Ensayo de Decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup></i> .....	65
2.4.2 <i>Evaluación de la Capacidad Antioxidante Mediante el Ensayo de Decoloración del <math>\beta</math>-caroteno</i> .....	66
3. Resultados y Discusión .....	68
3.1. Rendimiento de Destilación y Extracción. ....	68
3.2. Identificación Química de los Metabolitos Secundarios de la Especie Vegetal <i>O. campechianum</i> . ....	70
3.2.1. <i>Caracterización Química de los AE Obtenidos Mediante MWHD.</i> .....	70
3.2.2. <i>Caracterización de los Estractos Obtenidos con Solvente y por MSPD.</i> .....	83
3.3. Actividad Antioxidante .....	75
3.3.1. <i>Determinación de la Actividad Antioxidante Mediante los Ensayos de Decoloración del Cation-radical ABTS<sup>+</sup> y del <math>\beta</math>-caroteno.</i> .....	75
3. Conclusiones.....	80
Referencias Bibliográficas .....	82
Apéndices.....	94

**Lista de Tablas**

Tabla 1. Relación del número de publicaciones por año. Período de observación: del 2000 al 2021.....	43
Tabla 2. Relación del número de publicaciones, por año, sobre los AE y extractos obtenidos de las especies <i>O. campechianum</i> y <i>O. micranthum</i> . Periodo de observación: 2000 - 2021 .....	44
Tabla 3. Información taxonómica de la especie vegetal <i>O. campechianum</i> Mill .....	48
Tabla 4. Especies reactivas del oxígeno, de tipo radicales y no radicales .....	54
Tabla 5. Resultados de los rendimientos de destilación por MWHD de material vegetal fresco y seco de <i>O. campechianum</i> .....	68
Tabla 6. Resultados de los rendimientos de extracción con alcohol:agua y MSPD para la especie <i>O. campechianum</i> .....	69
Tabla 7. Caracterización por GC/MS del AE destilado de las hojas y flores frescas de <i>O. campechianum</i> .....	74
Tabla 8. Caracterización por GC/MS del AE destilado de plantas frescas y secas de <i>O. campechianum</i> .....	76
Tabla 9. Cuantificación por GC/FID (mg de sustancia/ g de AE) de los AE destilados de las hojas y flores frescas de <i>O. campechianum</i> (Albahaca de clavo) en estado fresco .....	78
Tabla 10. Cuantificación por GC/FID (mg de sustancia/ g de AE) de los AE destilados de las partes aéreas frescas y secas de <i>O. campechianum</i> .....	80
Tabla 11. Compuestos presentes en extractos obtenidos de plantas del género <i>Ocimum</i> , según la especie.....	83
Tabla 12. Identificación por HPLC-DAD del ácido rosmarínico presente en los extractos de <i>O. campechianum</i> .....	86
Tabla 13. Cuantificación del ácido rosmarínico presente en los extractos de <i>O. campechianum</i> , usando como patrón interno el ácido cafeico en una concentración conocida de 0,05 ppm, en el análisis por UHPLC/ESI--Orbitrap-MS, operado en modo de adquisición de ion.....	56
Tabla 14. Masas exactas por UHPLC/ESI+/Orbitrap-MS de moléculas protonadas [M+H] <sup>+</sup> presentes en los extractos obtenidos de material vegetal seco y después de su destilación de <i>O. campechianum</i> , analizados .....	59

Tabla 15. Masas exactas por UHPLC/ESI-/Orbitrap-MS de moléculas deprotonadas [M-H]- presentes en los extractos H <sub>2</sub> O/EtOH y MSPD de <i>O. campechianum</i> , después de su destilación, y en estado seco .....	60
Tabla 16. Actividad antioxidante media por los ensayos de decoloración del catión-radical ABTS+• y del β-caroteno para aceites esenciales y extractos aislados de <i>O. campechianum</i> .....	77
Tabla 17. Actividad antioxidante media por los ensayos de decoloración del catión-radical ABTS+• y de β-caroteno para las sustancias de referencia eugenol y ácido rosmarínico (componentes mayoritarios en los AE y extractos, respectivamente), y para el BHT y α-to .....	78

**Lista de Figuras**

Figura 1. Planta de <i>O. campechianum</i> en florescencia .....	47
Figura 2. Estructura básica de los flavonoides.....	49
Figura 3. Estructura química del catión-radical ABTS+• .....	56
Figura 4. Montaje experimental MWHHD para la obtención de los AE .....	60
Figura 5. Montaje experimental de la extracción con solvente para la obtención de los extractos hidroetanólicos.....	61
Figura 6. Cartuchos de MSPD para la obtención de los extractos.....	62
Figura 7. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan), en columna polar (DB-WAX) del AE de plantas secas de <i>O. campechianum</i> . Inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV) .....	71
Figura 8. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan), en columna polar (DB-WAX), del AE de plantas frescas de <i>O. campechianum</i> . Inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV).....	71
Figura 9. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan), en columna polar DB-WAX, del AE de las hojas frescas de <i>O. campechianum</i> . Inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV).....	72
Figura 10. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan), en columna polar DB-WAX, del AE de las flores frescas de <i>O. campechianum</i> . Inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV) .....	72
Figura 11. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan), en columna polar DB-WAX, de la mezcla de algunas sustancias de referencia. Inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV).....	73
Figura 12. Estructura molecular del eugenol .....	74
Figura 13. Estructuras moleculares (A-E) de los metabolitos secundarios identificados en los extractos obtenidos de <i>O. campechianum</i> .....	84
Figura 14. Espectros UV del ácido rosmarínico obtenidos a $\lambda = 270$ nm .....	87
Figura 15. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos hidroalcohólicos y MSPD de la especie <i>O. campechianum</i> .....	88
Figura 16. Corrientes iónicas extraídas, EIC, de moléculas protonadas $[M+H]^+$ , obtenidas por UHPLC-ESI+/Orbitrap-MS, de compuestos presentes en los extractos obtenidos de <i>O. campechianum</i> .....	57
Figura 17. Corrientes iónicas extraídas, EIC, de moléculas deprotonadas $[M-H]^-$ , obtenidas por UHPLC-ESI-/Orbitrap-MS, de compuestos presentes en los extractos obtenidos de <i>O. campechianum</i> .....	58

Figura 20. Espectro de masas obtenidos por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 30 eV), de la rutina presente en los extractos de <i>O. campechianum</i> .....	62
Figura 21. Espectro de masas obtenidos por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 30 eV), de la sustancia de referencia de la rutina.....	63
Figura 22. Espectro de masas obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 30 eV), de la rutina presente en los extractos de <i>O. campechianum</i> .....	64
Figura 23. Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 10 eV), del ácido rosmarínico presente en el extracto de <i>O. campechianum</i> .....	65
Figura 24. Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 10 eV), de la sustancia patrón del ácido rosmarínico .....	66
Figura 25. Espectro de masas experimental obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 10 eV), del ácido rosmarínico en las muestras de extractos de <i>O. campechianum</i> .....	67
Figura 26. Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 40 eV), de la luteolina en las muestras de extractos de <i>O. campechianum</i> .....	68
Figura 27. Espectro de masas obtenido por ESI+/Orbitrap-MS, HCD de 40 eV de la sustancia de referencia de la luteolina.....	69
Figura 28. Espectro de masas experimental obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 30 eV), de la luteolina presente en los extractos de <i>O. campechianum</i> .....	70
Figura 29. Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 20 eV), de la apigenina presente en los extractos de <i>O. campechianum</i> .....	71
Figura 30. Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 40 eV), de la sustancia de referencia de la apigenina .....	71
Figura 31. Espectro de masas experimental obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 20 eV), de la sustancia de referencia de apigenina .....	72
Figura 32. Espectro de masas experimental obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 20 eV), de la apigenina presente en los extractos de <i>O. campechianum</i> .....	72
Figura 33. Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS, HCD de 10 eV, del ácido ursólico presente en los extractos de <i>O. campechianum</i> .....	73
Figura 34. Espectro de masas obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 10 eV), de la sustancia de referencia del ácido ursólico .....	74

Figura 35. Espectro de masas experimental obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 30 eV), del ácido ursólico presente en los extractos de *O. campechianum* ..... 74

Figura 36. Curva de calibración usando Trolox® para cuantificar la actividad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS+•..... 76

Figura 37. Curva de calibración usando Trolox® para medir la actividad antioxidante en el ensayo de decoloración del β-caroteno ..... 76

**Lista de Apéndices**

Figura A 1. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS del aceite esencial de partes aéreas secas de <i>O. campechianum</i> . Columna DB-5MS (60 m). Inyección split (1:30). Identificación de los picos (Tabla 8) .....	94
Figura A 2. Espectro de masas obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) del eugenol presente en el aceite esencial de <i>O. campechianum</i> .....	95
Figura A 3. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD de mezcla de sustancias de referencia. Pico cromatográfico en 39,5 min corresponde al ácido rosmarínico.....	95
Figura A 4. Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por UHPLC-ESI+/Orbitrap-MS de la sustancia de referencia (ácido rosmarínico) presente en los extractos de <i>O. campechianum</i> .....	96

**Lista de Abreviaturas**

ABTS: *2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)* [ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)].

AE: Aceite esencial o aceites esenciales.

BHT: Butilhidroxitolueno.

CENIVAM: Centro Nacional de Investigaciones para la Agro-industrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales.

CIBIMOL: Centro de Investigación en Biomoléculas.

d.i.: Diámetro interno.

DAD: *Diode Array Detector* (Detector de arreglos de diodos).

d<sub>r</sub>: Espesor de la fase estacionaria.

DPPH: *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl* (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo).

ESI: *Electrospray ionization* (Ionización por electronebulización).

eV: Electrón-voltio.

FID: *Flame Ionization Detector* (Detector de ionización de llama).

GC: *Gas Chromatography* (Cromatografía de gases).

HCD: *Higher-Energy Collision Dissociation Cell* (Celda de disociación de alta energía).

HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida de alta eficiencia).

HRMS: *High-Resolution Mass Spectrometry* (Espectrometría de masas de alta resolución).

HS: *Headspace* (Espacio de cabeza).

i.e.: *id est* (Esto es).

LRI: Índice(s) de retención lineal(es).

ISTD: *Internal Standard* (Estándar interno).

LC: *Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida).

m.s.n.m.: Metros sobre el nivel del mar.

*m/z*: Relación masa/carga.

MSPD: *Matrix Solid-Phase Dispersion* (Dispersión de la matriz en fase solida).

MWHD: *Microwave-Assisted Hydrodistillation* (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas).

N.I.: No identificado.

ORAC: *Oxygen-Radical Absorbance Capacity* (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno).

rpm: Revoluciones por minuto.

$t_R$ : Tiempo de retención.

UHPLC: *Ultra-High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia).

UV: Ultravioleta.

### Resumen

**Título:** Estudio de la composición química y la capacidad antioxidante del AE y de los extractos aislados de *O. campechianum* (Lamiaceae).\*

**Autor:** Juan Josafat Tarazona Fiallo.\*\*

**Palabras clave:** Aceites esenciales, extractos con solvente, dispersión de la matriz en fase sólida, antioxidante, radicales.

**Descripción:** Las especies reactivas de oxígeno son sustancias capaces de deteriorar alimentos, cosméticos y fármacos, además, son causantes de algunas enfermedades producto de la oxidación celular en los organismos. Los aceites esenciales (AE) y extractos presentes en plantas aromáticas y medicinales son mezclas de compuestos que pueden ser empleadas para prevenir o inhibir dichos procesos oxidativos.

En este trabajo, se implementaron distintas técnicas destilativas y de extracción, como la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), extracción con solvente (SE) y dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), respectivamente, con el fin de obtener los AE y extractos de la especie vegetal *O. campechianum* (Lamiaceae), cultivada en parcelas experimentales del Complejo Agroindustrial piloto CENIVAM de la UIS en Bucaramanga, Santander. Además, se implementaron técnicas *in vitro* para evaluar la capacidad antioxidante de los AE y los extractos obtenidos.

La composición química de las partes aéreas de *O. campechianum*, se caracterizó usando las técnicas cromatográficas GC-MS, GC-FID, HPLC-DAD y UHPL-ESI-Orbitrap/MS, evaluando las posibles diferencias en función del tratamiento postcosecha de la planta. Se encontró que la mezcla de metabolitos secundarios que componen los AE y los extractos obtenidos de *O. campechianum* favorecen la capacidad de disminuir o inhibir los procesos oxidativos producidos por especies radicalarias, lo cual hace de esta especie, una planta promisoría de interés científico.

---

\* Trabajo de grado.

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

**Abstract**

**Title:** Estudio de la composición química y la capacidad antioxidante del AE y de los extractos aislados de *O. campechianum* (Lamiaceae).\*

**Author:** Juan Josafat Tarazona Fiallo.\*\*

**Key Words:** Essential oil, Solvent extraction, MSPD, antioxidant.

**Description:** Reactive oxygen species are substances capable of deteriorating food, cosmetics, and drugs, in addition, they are the cause of some diseases because of cellular oxidation in organisms. The EOs and extracts present in aromatic and medicinal plants are mixtures of compounds that can be used to prevent and inhibit these oxidative processes.

In this work, different distillation and extraction techniques were carried out, such as microwave radiation-assisted hydrodistillation (MWHHD), solvent extraction (SE), and solid-phase matrix dispersion (MSPD), respectively, to obtain the EOs and extracts of the plant species *O. campechianum* (Lamiaceae), cultivated in experimental plots of the CENIVAM agroindustrial complex at the UIS in Bucaramanga, Santander. In addition, *in vitro* techniques were implemented to evaluate the antioxidant capacity of the EOs and the extracts obtained.

The chemical composition of the aerial parts of *O. campechianum* was characterized using the GC-MS, GC-FID, HPLC-DAD and UHPL-ESI-Orbitrap/MS chromatographic techniques, evaluating the possible differences depending on the post-harvest treatment of the plant. It was found that the mixture of secondary metabolites presents in the EOs and the extracts obtained from *O. campechianum* possesses the ability to reduce or inhibit the oxidative processes produced by radical species, which makes this species a promising plant of scientific interest.

---

\* Project to degree.

\*\* Science Faculty. Chemistry School. Director: Elena Stashenko, Chemistry PhD.

## Introducción

El uso de las plantas aromáticas se ha dado de manera tradicional en varias culturas del mundo para el tratamiento de diferentes enfermedades (Méndez y col, 2014). Con el uso de diferentes técnicas destilativas y de extracción, es posible aislar los AE y los extractos, que contienen mezclas de metabolitos secundarios, y poseen importantes actividades biológicas de interés para la ciencia y la industria (Suárez, S., 2017).

Los compuestos presentes en los AE son de bajo peso molecular, por lo cual, se pueden aislar de la matriz vegetal por técnicas destilativas. La caracterización química de estos compuestos se hace por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) (Salles y col, 2006). Los AE obtenidos de las plantas aromáticas se usan para la elaboración de perfumes, en aromaterapia, cosmética, fitoterapia, como especias en nutrición (Buchbauer, 2000).

En los extractos, están presentes compuestos de peso molecular más alto y menor volatilidad. Su caracterización se realiza usando técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas, u otros detectores (Pyo y col, 2009). Los extractos también se usan ampliamente en la elaboración de productos farmacéuticos, alimenticios, entre otros.

El género *Ocimum* (Lamiaceae) pertenece al grupo de plantas aromáticas y medicinales que han sido estudiadas con el fin de explicar el efecto terapéutico que se ha observado en la medicina tradicional y ancestral para tratar o prevenir algunas enfermedades (Prabhu y col, 2009). Estos efectos terapéuticos han sido atribuidos a la mezcla de metabolitos secundarios biosintetizadas en la matriz vegetal. De los efectos observados en las plantas aromáticas, la capacidad antioxidante es típica de muchos compuestos presentes en la planta. Esta actividad es de gran interés, ya que los metabolitos secundarios, al estar presentes en bajas concentraciones, en relación con el sustrato, son responsables de la disminución o inhibición de los procesos oxidativos (Halliwell, 1995).

Los antioxidantes sintéticos han sido empleados durante mucho tiempo para prevenir el deterioro oxidativo de los alimentos, cosméticos, fármacos, entre otros. Sin embargo, estas sustancias pueden tener efectos carcinogénicos y hepatotóxicos, lo cual ha motivado a la comunidad científica al estudio de sustancias con capacidad antioxidante más seguras para los humanos (Figueiredo y col, 2018).

El Ministerio de Educación Nacional y Colciencias (actualmente, Minciencias) a través del programa Colombia Científica, con la participación de la Universidad Industrial de Santander como Institución de Educación Superior, llevan a cabo el programa Bio-Reto XXI 15-50, con el que se reconoce la riqueza de la biodiversidad de nuestro país, por la gran variedad geográfica y de sus ecosistemas. Ha sido aún poco el estudio realizado sobre las plantas aromáticas nativas de nuestro país, las cuales pueden ser una importante fuente promisoría de metabolitos secundarios con diferentes propiedades biológicas útiles en diferentes ramas de la industria (Caamal y col, 2018).

El programa Bio-Reto XXI 15:50, a partir del estudio de 50 especies de plantas aromáticas, busca el desarrollo de 15 bioproductos relacionados con el sector salud, agropecuario y cosmético. *O. campechianum* es una planta aromática, usada de manera tradicional en diferentes regiones de América del Sur, para el tratamiento de dolores y enfermedades relacionadas con el sistema gastrointestinal (Ruíz Vargas y col, 2019). Es por esto que el presente trabajo de investigación busca generar un aporte científico al macroproyecto Bio-Reto XXI 15-50, con los resultados obtenidos de la caracterización química y de la evaluación de la capacidad antioxidante de la especie vegetal *O. campechianum*, la cual hace parte del grupo de especies vegetales promisorias que fueron estudiadas para el posible desarrollo de los bioproductos, a base del AE y/o de los extractos obtenidos y estudiados de plantas aromáticas.

## 1. Marco Referencial

### 1.1. Marco de Antecedentes

Para conocer los estudios desarrollados sobre el tema de investigación, se realizaron búsquedas bibliográficas sobre albahaca de clavo (*O. campechianum*) en torno a aspectos generales, composición química del AE y de los extractos aislados por diferentes técnicas y sobre la actividad biológica de la planta, relacionada con la capacidad antioxidante de sus metabolitos secundarios. Usando la base de datos *Scopus* (*Elsevier*) en un período comprendido entre 2000 - 2021, se realizó la búsqueda empleando las palabras clave: “*Ocimum* AND *campechianum*” y “*Ocimum* AND *micranthum*”. Se obtuvieron los resultados, según el año de publicación, que se presentan en la Tabla 1.

Se encontraron en total 41 artículos y tres documentos de revisión (a la fecha de revisión: febrero 06 de 2022), publicados sobre *O. campechianum*, y para su sinonimia *O. micranthum*, 32 artículos y tres documentos de revisión publicados, principalmente, en el área de agricultura y ciencias biológicas, al igual que farmacología, toxicología, química, bioquímica, medicina, biología molecular, entre otras. La mayor parte de los estudios publicados se realizaron en Brasil, México y Estados Unidos. En Colombia, se han publicado cuatro documentos sobre *O. campechianum* (*O. micranthum*), hasta la fecha de consulta (febrero 06 de 2022) según la base de datos *Scopus* (*Elsevier*) revisada.

**Tabla 1.**

*Relación del número de publicaciones por año. Período de observación: del 2000 al 2021.*

Años	Número de publicaciones	
	<i>O. campechianum</i>	<i>O. micranthum</i>
2000 -2005	11	8
2006-2010	10	5
2011-2015	9	12
2016-2020	11	9
2021-2022	1	1

**Nota:** Tomado de *Scopus* (Elsevier). Fecha de consulta: 06 de febrero de 2022, elaboración propia.

En el artículo publicado por O’Leary, N. (2017), los autores hacen la revisión taxonómica de la familia Lamiaceae en Argentina y proporcionan una descripción completa del género *Ocimum*, representado por cuatro especies, *O. campechianum*, *O. nudicaule*, *O. ovatum* y *O. selloi*.

En el estudio publicado por Sarwat, M. y col. (2016), se presenta un análisis del género *Ocimum*, que posee una amplia diversidad a nivel de su morfología, composición química y genética de las plantas. En este estudio, se menciona, además, que la albahaca es una de las especies más importantes de la familia Lamiaceae por sus diversos usos en la medicina tradicional.

Para una segunda búsqueda bibliográfica, en la ecuación de búsqueda se adicionaron las palabras clave: “*Essential AND Oil*”, para un período comprendido entre el año 2000 y 2021. Los resultados encontrados para *O. campechianum* fueron 22 y 18 publicaciones, sobre los AE y los extractos, respectivamente. Para la sinonimia *Ocimum micranthum*, 22 y 12 publicaciones, respectivamente, los cuales se relacionan en la Tabla 2, junto con el año de su publicación.

Los autores Sacchetti y col. (2004), estudiaron el espécimen de *O. micranthum* obtenido de la fundación “*Chankuap*” en Macas, Ecuador. El AE de este espécimen fue aislado por hidro-

destilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y caracterizado por la técnica de cromatografía de gases; los autores identificaron 31 compuestos. Los metabolitos secundarios mayoritarios identificados fueron eugenol (46,6%),  $\beta$ -cariofileno (11,9 %) y  $\beta$ -elemeno (9,1%).

Según los criterios de búsqueda usados en esta base de datos, en Colombia, han publicado entre 2000 - 2021, cuatro estudios sobre la composición química del AE de *O. campechianum*. Los autores Miranda Brand y col. (2015) destilaron el AE de *O. campechianum* mediante el método descrito por Stashenko y col. (2004). Por cromatografía de gases lograron la identificación de 34 compuestos. Los dos componentes mayoritarios encontrados fueron el metil-eugenol (53,9%) y el *trans*- $\beta$ -cariofileno (13,0%).

## Tabla 2.

*Relación del número de publicaciones, por año, sobre los AE y extractos obtenidos de las especies O. campechianum y O. micranthum. Periodo de observación: 2000 - 2021.*

Palabras claves		Número de publicaciones por año			
		2000-2005	2006-2010	2011-2015	2016-2021
<i>O. campechianum</i>	<i>Essential oil</i>	4	5	4	7
	<i>Extracts</i>	5	5	2	5
<i>O. micranthum</i>	<i>Essential oil</i>	5	2	7	6
	<i>Extracts</i>	3	1	4	3

**Nota:** Base de datos: *Scopus* (Elsevier). Fecha de consulta: 06 febrero de 2022. Elaboración propia.

Otro estudio publicado en Colombia fue realizado por Pino Benítez y col. (2009), con material vegetal recolectado en Pacurita, municipio de Quibdó, por la Universidad Tecnológica de Chocó. Los autores obtuvieron el AE de *O. campechianum* y *O. gratissimum* mediante MWHD, descrito por Stashenko y col. (2004). En el estudio, los autores usaron GC/MS para identificar 37

compuestos que constituían el 66.1% del AE, de los cuales, el 33,9% fueron hidrocarburos sesquiterpénicos, 10,7% sesquiterpenos oxigenados, 10,7% de hidrocarburos monoterpénicos y 7.1% monoterpénos oxigenados.

Se realizó, también, la búsqueda bibliográfica, adicionando a la ecuación de búsqueda la palabra clave “*Extracts*”. En los resultados obtenidos en esta búsqueda, se encontraron pocas publicaciones sobre la extracción con solvente y por MSPD, de *O. campechianum* y *O. micranthum*. Sin embargo, en el trabajo publicado por Tacchini y col. (2021), los autores obtuvieron los metabolitos secundarios de *O. campechianum* usando metanol o etanol 70% como solvente. Los extractos obtenidos se caracterizaron por GC/MS, cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores de espectrometría de masas y de arreglo de diodos (HPLC-DAD-HRMS) y se estudió su actividad biológica *in vitro*. En este estudio, el eugenol y el ácido rosmarínico fueron los principales componentes identificados.

De los estudios de extractos de *O. micranthum* obtenidos con solvente, se encontró el publicado por Caamal Herrera y col. (2016), quienes usaron material vegetal cultivado en Yucatán, México, para aislar los metabolitos secundarios mediante extracción Soxhlet e identificarlos por GC/MS. Los compuestos mayoritarios fueron cariofileno (27%), metil-eugenol (14%) y eugenol (12%). En el estudio realizado y publicado por Ruíz Vargas y col. (2019), quienes usaron diferentes solventes: agua, metanol, hexano, diclorometano y acetato de etilo, se aislaron los metabolitos secundarios de *O. campechianum* para evaluar su actividad inhibidora de la encima  $\alpha$ -glucosidasa.

Pino, J. y col. (1998), compararon los datos obtenidos por cromatografía de gases de los metabolitos secundarios aislados de *O. gratissimum* por MWHD, extracción Soxhlet usando hexano como solvente, y con fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>). El timol fue el componente mayoritariamente identificado en cada caso así: destilación (32,6%), extracción con solvente (89%) y extracción con fluido supercrítico (72,4%).

Es importante aclarar que, al realizar la búsqueda bibliográfica sobre estudios relacionados con la técnica de MSPD, no se encontraron reportes sobre el uso de esta técnica para extracción de metabolitos secundarios de *O. campechianum*.

Los autores Salles Trevisan y col. (2006) estudiaron cinco especies del género *Ocimum*. El espécimen de *O. micranthum* fue recolectado de Jardín de plantas medicinales de la Universidad Federal de Ceará (UFC) para obtener los metabolitos secundarios usando hexano como solvente. La identificación de los compuestos se realizó por cromatografía líquida y de gases acopladas a espectrometría de masas. El eugenol fue el componente mayoritario en *O. micranthum*.

La revisión bibliográfica, se llevó a cabo usando también las palabras-clave: “*antioxidant AND activity*” para los AE y extractos para ambas especies sinonimias. El resultado obtenido en la base de datos *Scopus* fueron seis artículos y un artículo de revisión para *O. campechianum*, y cuatro artículos y uno de revisión para *O. micranthum*.

De los estudios reportados, Figueiredo B. y col. (2018), evaluaron la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios aislados de *O. campechianum* mediante hidrodestilación, usando el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH<sup>•</sup>).

La revisión bibliográfica realizada, permitió concluir que la especie vegetal *O. campechianum*, es una planta, aunque estudiada por la comunidad científica; carece de estudios sobre la composición química de extractos MSPD y su análisis por LC/MS; *O. campechianum* es una planta aromática de profundo interés científico por su potencial actividad biológica y aplicaciones.

## 1.2. Marco Teórico

### 1.2.1 *Ocimum campechianum* Mill

La especie vegetal *O. campechianum* pertenece a la familia Lamiaceae (Tabla 3) y fue descrita por primera vez por el botánico británico Philip Miller en 1768 en su libro “*The Gardeners Dictionary*”. Además, según el “Diccionario de los diversos nombres vulgares de muchas plantas usuales o notables del antiguo y nuevo mundo”, “Albahaca de clavo” es el nombre común que ha recibido en países como Cuba y Venezuela (Colmeiro, M., 1871).

Según la base de datos Trópicos, la especie vegetal *O. micranthum* W., es aceptada como sinonimia de *O. campechianum* (www.tropicos.org, fecha de consulta: abril 16 de 2020).

#### Figura 1.

*Planta de O. campechianum en florescencia.*



**Nota:** Foto tomada por Josafat Tarazona. Lugar: parcela experimental de CENIVAM, UIS, Bucaramanga. Fecha: 19 de noviembre de 2019.

*Ocimum micranthum* fue descrita por primera vez por Carl Ludwig von Willdenow en su libro “*Enumeratio Plantarum Horti Botanici Berolinensis*” (von Willdenow, 1809).

**Tabla 3.***Información taxonómica de la especie vegetal O. campechianum Mill.*

Clase	Equisetopsida
Superorden	Asteranae
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Ocimum</i>
Especie	<i>O. campechianum</i>
Sinonimia	<i>O. micranthum</i>
Nombre común	Albahaca de clavo

**Nota:** Elaboración propia.

### 1.2.2. Aceites Esenciales

Los AE son una mezcla compleja de metabolitos secundarios bio-sintetizados en la planta para su interacción, supervivencia y adaptación al ambiente. Estos compuestos son de carácter volátil y son lipofílicos; se obtienen a partir de técnicas destilativas, por ejemplo, por arrastre con vapor, destilación con vapor/agua e hidrodestilación. Los AE pueden considerarse una huella química del material vegetal del que proceden, por su olor y sabor característico (Stashenko E., 2009).

Los AE tienen las siguientes propiedades físicas: alta volatilidad, son incoloros o ligeramente coloreados; recién destilados, su densidad puede ser inferior a la del agua, poseen un alto índice de refracción, son solubles en alcohol, pero poco solubles en el agua (Stashenko E., 2009).

### 1.2.3. Técnicas de Destilación

#### 1.2.3.1. Hidrodestilación Asistida por la Radiación Microondas

La hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD, *Microwave-Assisted Hydrodistillation*) está relacionada con la técnica de hidrodestilación convencional para obtener los AE del material vegetal fresco o seco. Los compuestos volátiles presentes en el material vegetal

sumergido en agua se evaporan al calentarse y ebullición el agua, y sus vapores arrastran los componentes del AE separado por condensación y decantación (Stashenko, E. y col, 2004).

En la técnica MWHD, el calentamiento se realiza usando un horno de radiación de microondas convencional, dentro del cual se encuentra un balón redondo con el material vegetal para destilar, que se conecta por un orificio en el horno a un aparato tipo *Clevenger* con una trampa *Dean-Stark*, donde ocurre la condensación y se logran separar por diferencias de densidades, el agua y el AE (Golmakani, M. y Rezaei, K., 2008).

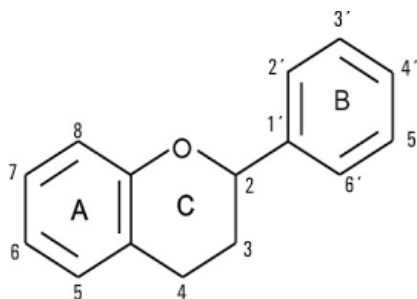
#### 1.2.4. Extractos Vegetales

Los compuestos químicos aislados de las plantas con disolventes, se denominan extractos vegetales y son productos del metabolismo secundario de las plantas. Los extractos se diferencian de los AE en que, por lo general, están conformados por metabolitos con un peso molecular más alto, mayor polaridad y menor volatilidad.

Los compuestos polifenólicos son algunos de los metabolitos secundarios que se encuentran en los extractos vegetales, entre ellos, están presentes los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbencenos y odorantes y lignanos. Los flavonoides son polifenoles que contienen hasta 15 átomos de carbono, ordenados en dos anillos aromáticos (A y B) (Véase Figura 2) (Mejía, 2014).

#### Figura 2.

*Estructura básica de los flavonoides.*



**Nota:** Elaboración propia.

Los extractos vegetales contienen la fracción semivolátil o no volátil de la planta. Su obtención se realiza a través de distintas técnicas basadas en la extracción mediante el aprovechamiento de las propiedades como solubilidad y polaridad de componentes químicos de la matriz vegetal y su afinidad con el solvente (Stashenko, E. y col, 2011)

### **1.2.5. Técnicas de Extracción**

#### **1.2.5.1. Extracción con Solvente**

En esta técnica de extracción, se emplea una fase líquida para obtener los analitos de una matriz vegetal. Normalmente, la fase líquida está constituida por un solvente, o por una mezcla de solventes, que pueden solvatar las moléculas de interés. La selección del solvente se da mediante un estudio previo de los compuestos que se desean extraer, en torno a sus propiedades como volatilidad, peso molecular y polaridad. La fase líquida debe ser afín a estas propiedades para facilitar la extracción de los analitos (Pan, J. y col, 2008).

En este método de extracción, el solvente puede ser recuperado sin afectar la composición de la muestra. La eficiencia depende fundamentalmente de la solubilidad, transferencia de masa y efecto de la matriz. El alto consumo de solvente, el tiempo de extracción largo, la formación de emulsiones y la toxicidad de los solventes son algunas de las principales desventajas de esta técnica (Mora, A. y Stashenko, E., 1997).

#### **1.2.6.2 Extracción por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida.**

La dispersión de la matriz en fase sólida, (*MSPD* por sus siglas en inglés, *Matrix Solid-Phase Dispersión*), es una técnica de amplio uso para el aislamiento de sustancias presentes en medicamentos, suelos, alimentos, así como también, para extraer los metabolitos secundarios presentes en especies vegetales (Barker, 2007). La técnica implica mezclar la muestra con un

soporte sólido, por ejemplo, la sílice modificada con C<sub>18</sub>, y un solvente dispersante. La mezcla homogeneizada se empaca en una columna de extracción, luego, los componentes adsorbidos en la columna se eluyen usando el solvente apropiado (Xiao, H., 2004).

## **1.2.6. Análisis Cromatográfico**

### **1.2.6.1. Cromatografía de Gases**

La cromatografía de gases (GC) es una técnica usada para separar mezclas de sustancias volátiles o volatilizables, termoestables y de polaridad media. Se basa en la presencia de dos fases, una fase móvil, que es gaseosa (N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, He) y otra estacionaria, que puede ser líquida o sólida. La separación de los compuestos se da con el paso de la fase móvil que arrastra consigo los analitos por una columna recubierta de polímeros de diferente polaridad [PDMS, poli(dimetilsiloxano) o PEG, poli(etilenglicol)] hasta la elución, según el tiempo de retención, el cual depende de la afinidad de los analitos con la fase estacionaria (Stashenko, E. y col, 2010).

La cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas (MS) es uno de los métodos más usados en el análisis químico, por la información que proporciona sobre la masa molecular, composición elemental y grupos funcionales de los compuestos presentes en la muestra. La espectrometría de masas se basa en la generación de iones moleculares cargados y sus fragmentos a partir de moléculas provenientes de la columna cromatográfica. La separación de los iones se da en un analizador según su relación  $m/z$ ; luego, un detector de masas genera una señal eléctrica que se procesa en función del tiempo (Stashenko, E. y col, 2009).

Para la cuantificación de los analitos presentes, se emplea el método de cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (FID). El detector se basa en la detección de los productos ionizados en una llama de hidrógeno (H<sub>2</sub>) y aire. Las sustancias que eluyen de la columna se “queman” en la llama, generando iones dirigidos hacia un electrodo colector, el cual mide una

corriente que se amplifica y produce, luego, una señal cromatográfica. La magnitud de esta señal es proporcional a la cantidad de analito presente, esto permite determinar la concentración de cada componente eludido de la mezcla, disponiendo de sustancias de referencia (patrones) y haciendo la respectiva calibración (Ahuja, S., 2003).

### **1.2.6.2. Cromatografía líquida de alta y ultra-alta eficiencia**

Mediante el uso de la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*) es posible cuantificar los compuestos presentes en una matriz que contiene metabolitos poco volátiles, termoinestables, muy polares o de alto peso molecular, con diversos grupos funcionales (Ahuja, S., 2003). En HPLC, la fase móvil constituida por un solvente o una mezcla de solventes, en el caso de la elución isocrática o de gradiente, respectivamente, pasa a través de la fase estacionaria en una columna de acero inoxidable empaquetada de gel de sílice u otro polímero. Para el caso de los compuestos fenólicos, se usan fases no polares para separar los compuestos con grupos hidrofóbicos (Waksmundzka-Hajnos y col, 2010).

Al igual que en cromatografía de gases, luego de la separación de los analitos en la columna, estos son eluidos hacia un detector ultravioleta visible (UV-Vis), detector con arreglo de diodos (DAD) o espectrómetro de masas (MS). El anillo aromático presente en los compuestos fenólicos les da la capacidad de absorber luz ultravioleta (Merken y col, 2000).

La cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UHPLC, por sus siglas en inglés, *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) implica el uso de columnas más delgadas con empaque de partículas de menor tamaño y se requiere presiones de trabajo mucho más altas. Se usan fases estacionarias equivalentes a las de HPLC. La alta eficiencia y la velocidad de las separaciones

cromatográficas se deben principalmente al progreso en el desarrollo de columnas con nuevas fases estacionarias (Bhagya & Chandrashekar, 2020).

El acoplamiento más importante para cromatografía líquida y espectrometría de masas es a través de la interfaz de la ionización por *electrospray* (ESI, *Electrospray Ionization*), que brinda la eficiencia de ionización más alta, y, con una sensibilidad alta. *UHPLC* aprovecha el uso de columnas empaquetadas con partículas menores de 2  $\mu\text{m}$  y altas velocidades de flujo de fase móvil para acelerar la separación cromatográfica (Novakova y col, 2017).

Frecuentemente, en la técnica LC/MS se usa un detector de masas *Orbitrap*, que está compuesto por dos electrodos concéntricos dispuestos en forma axial. Los iones ingresan al *Orbitrap* por “paquetes” de iones acelerados y se diferencian según su relación  $m/z$ , separados en nanosegundos y dirigidos hacia el electrodo central perpendicularmente. Los iones con distinta relación  $m/z$  evidencian diferente amplitud y frecuencia de oscilación sobre el eje de los electrodos. A los resultados obtenidos de las corrientes iónicas se les aplica la transformada de Fourier para obtener la relación  $m/z$  de cada grupo de iones contenido en la muestra analizada (Makarov, 2000).

### **1.2.7. Actividad Antioxidante**

#### **1.2.7.1. Estrés Oxidativo**

La presencia de oxígeno en la naturaleza está relacionada con la fotosíntesis y su reducción durante los procesos de biosíntesis del ATP en las células aeróbicas. La disminución del oxígeno en estos procesos puede ser descontrolada, acelerando la formación de radicales libres. Ante esta situación, actúan los sistemas de defensa antioxidante del organismo. Sin embargo, cuando hay un desequilibrio en la formación de los radicales libres, estos empiezan a abundar y prevalecer, generando estrés oxidativo, el cual está asociado con enfermedades cardiovasculares y

envejecimiento prematuro de las células. En la Tabla 4, las especies reactivas de oxígeno se clasifican en especies radicalarias y no radicalarias (Kohen & Nyska, 2002).

**Tabla 4.**

*Especies reactivas del oxígeno, de tipo radicales y no radicales.*

Especies	Nombre	Símbolo
Radicales	Oxígeno triplete	O <sub>2</sub>
	Ion superóxido	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
	Hidroxilo	OH <sup>•</sup>
	Peroxilo	ROO <sup>•</sup>
	Alcóxido	RO <sup>•</sup>
No radicales	Óxido nítrico	NO <sup>•</sup>
	Peróxido de hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	Ácido hipocloroso	HOCl
	Ozono	O <sub>3</sub>
	Oxígeno singulete	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>

**Nota:** Tomado de Córdoba (2014). Elaboración propia.

### 1.2.7.2. Capacidad Antioxidante

Una sustancia presente en bajas concentraciones comparadas con un sustrato oxidable, que inhibe o previene la oxidación, se llama antioxidante. Estas sustancias son efectivas *in vivo*, si cumplen con los siguientes requerimientos: (1) deben reaccionar efectivamente con los radicales libres; (2) el producto de reacción entre el antioxidante y los radicales libres no debe ser tóxico para el organismo; (3) deben estar presentes en el organismo en una concentración suficiente para neutralizar el efecto del radical libre y (4) el tiempo de vida media del antioxidante debe ser suficiente para que ocurra la reacción con el oxidante (Córdoba, 2014).

Entre los antioxidantes de origen natural más comunes figuran los compuestos fenólicos y los flavonoides. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que poseen uno o más grupos

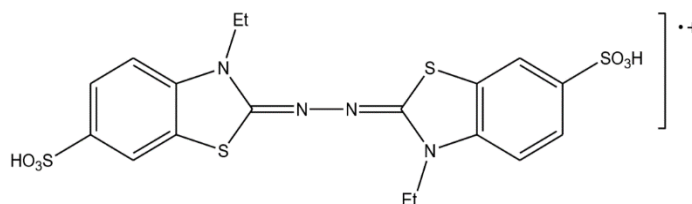
hidroxilo unidos a uno o varios anillos aromáticos. Las plantas con esta capacidad antioxidante han despertado el interés de los científicos, ya que estos compuestos fenólicos pueden retardar la oxidación celular (Wojdylo y col, 2007).

Los flavonoides son polifenoles que poseen anillos aromáticos bencénicos, enlazados por un heterociclo oxigenado. Son sustancias sólidas de color blanco o amarillento, su clasificación se da por las variaciones estructurales. Los flavonoides más destacados por su uso farmacológico son las flavonas, flavonoles, flavononas, antocianinas y catequinas (Vermerris & Nicholson, 2008).

Según la capacidad de capturar los radicales libres o en la capacidad reductora, se han desarrollado diferentes metodologías para evaluar la capacidad antioxidante, *in vitro*, que se clasifican en métodos que involucran la transferencia de átomos de hidrógeno, tales como el ensayo de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) en el que el antioxidante y el sustrato compiten por radicales peroxilo; y, por otro lado, en métodos basados en la transferencia de electrones, tal como el ensayo de decoloración de catión-radical ABTS<sup>+</sup>, en el que se mide la capacidad de una sustancia de atrapar el radical, que cambia de color al reducirse (Huang y col, 2005).

### **1.2.7.3. Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup>**

Para medir la capacidad antioxidante de una muestra, ésta se compara con el Trolox<sup>®</sup> y su capacidad de prevenir la oxidación del ABTS<sup>+</sup>. La concentración de una solución de Trolox<sup>®</sup> con un potencial antioxidante equivalente a una concentración 1 mM del compuesto oxidante bajo estudio, se define como el valor de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox<sup>®</sup> (Córdoba, 2014).

**Figura 3.***Estructura química del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>.***Nota:** Estructura química del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>. Elaboración propia.

Este método, se mide capacidad antioxidante mediante la inhibición oxidativa, donde se determina la disminución del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>, cuando se añade previamente el compuesto antioxidante, lo cual se traduce en el retraso generado para la aparición de la coloración verde-azulada. Por otro lado, se mide mediante la decoloración, donde se añade el antioxidante luego de la formación del catión-radical ABTS<sup>•+</sup> produciendo una pérdida de la coloración o de la absorbancia a causa de la reducción del radical (Miller, N. y col, 1993).

**1.2.7.4. Evaluación Mediante el Método de Decoloración del  $\beta$ -caroteno.**

En la naturaleza se encuentran muchos carotenoides, que protegen las células y los organismos. Debido a enlaces dobles altamente conjugados, los carotenoides participan en las reacciones con radicales libres, lo que se relaciona con su posible actividad antioxidante. A altas temperaturas se forma apocarotenales y compuestos epoxídicos, por la reacción del  $\beta$ -caroteno con los radicales peroxilo (Yamauchi y col, 1993).

La adición de la muestra antioxidante a una emulsión de  $\beta$ -caroteno, permite evaluar la capacidad de inhibir la oxidación, que está relacionada con la decoloración del  $\beta$ -caroteno. El porcentaje de inhibición se calcula mediante la siguiente ecuación, donde la absorbancia del blanco

y de la muestra será la diferencia de la absorbancia inicial y la absorbancia a 60 min, respectivamente.

$$\% \text{ Inhibición} = \left( \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \right) \times 100$$

## 2. Metodología

La metodología desarrollada para alcanzar los objetivos planteados comprendió la realización de diferentes etapas, a saber: recolección del material vegetal, obtención, caracterización y evaluación de la capacidad antioxidante de los AE y extractos obtenidos de *O. campechianum*.

### 2.1. Recolección del Material Vegetal de *O. campechianum*

La especie vegetal de *O. campechianum* Mill (albahaca de clavo) fue propagada por esquejes y cultivada en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, ubicado en la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia), donde, a su vez, se realizó la recolección del material vegetal necesario para el presente estudio, cuando el espécimen alcanzó un tamaño de aproximadamente 1,5 m y estando en floración como etapa fenológica. El espécimen de albahaca de clavo fue identificado por el Herbario de la Universidad Industrial de Santander con *váucher* N° 20889 (registrado legalmente en el Registro Único Nacional de Colecciones Biológicas), con el nombre científico: *O. campechianum* Mill, el 25 de febrero de 2020 y relacionado con el proyecto Bio-Reto XXI 15-50, con el código Bio-Reto 043. El material vegetal fue proveído por el estado Colombiano a través del contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados N° 270, formato entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible y la UIS. Una vez obtenido el material vegetal, se dividió para los experimentos posteriores; una parte se secó a temperatura ambiente en el vivero de secado, durante siete días aproximadamente y, otra parte, fue procesada en fresco.

## **2.2. Obtención de Metabolitos Secundarios Presentes en la Especie Vegetal *O. campechianum*.**

### ***2.2.1. Hidrodestilación Asistida por la Radiación de Microondas***

La obtención de los metabolitos secundarios que componen el AE de *O. campechianum* Mill, se realizó, según el método descrito por Stashenko, E. y col. (2010) por *MWHD*, para lo cual se adaptó, a un horno microondas convencional *Samsung*, MS-1242zk de 1200 y 2,4 GHz, operado a un 60% de su potencial total.

Las partes aéreas del material vegetal se hidro-destilaron en un aparato tipo *Cleavenger* con trampa *Dean-Stark* (Véase Figura 4), durante una hora, en cuatro sesiones de 15 min cada una. En un balón de 2 L, que contenía el material vegetal, previamente picado para disminuir el tamaño de partícula, se le adicionó agua en una relación 1:1,5 con respecto al peso del material vegetal (en todos los casos se pesaron 500 g de material vegetal). El AE se recogió por decantación y la humedad se eliminó agregando sulfato de sodio anhidro  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . La destilación se realizó por triplicado y el rendimiento de destilación se obtuvo con la relación de los pesos del AE obtenido y la matriz vegetal procesada. Este procedimiento se desarrolló para la obtención del AE de la especie vegetal en fresco, en seco y a partir de las diferentes partes aéreas de la planta.

Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en frascos ámbar, protegidos de la luz, a una temperatura de 4 °C.

**Figura 4.**

*Montaje experimental MWHD para la obtención de los AE.*



**Nota:** Foto tomada por el autor Josafat tarazona. Fecha: septiembre 28 de 2021. Lugar: CENIVAM, UIS, Bucaramanga.

### **2.2.2. Extracción con Solvente Agua-Etanol**

Los extractos hidroetanólicos de partes aéreas de *O. campechianum*, fueron obtenidos según el método descrito por Borrás Linares y col. (2005), con algunas modificaciones. Al material vegetal seco y al material vegetal, después de destilar, por separado, se les adicionaron 300 mL de solución acuosa de etanol al 70% v/v (1:20 en relación con el peso de material vegetal), en todos los casos, se pesaron 150 g de material vegetal en frascos de vidrio.

Las mezclas se almacenaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 24 h, para luego llevarse al equipo de ultrasonido *Elmasonic S15H* (Signen, Alemania) durante 1 h a 50°C. El extracto obtenido fue doblemente filtrado, primero por gravedad (Véase **Figura 5**) y luego usando una bomba de vacío; el filtrado fue concentrado en un roto-evaporador *Heidolph® Basis Hei-Vap HL* (Schwabach, Alemania) a 80 rpm, durante 45 min, a 50 °C.

Luego, los extractos fueron secados en un liofilizador de bandejas VirTis® *AdVantage Plus* (*SP Scientific*, Gardiner, New York, EE. UU.), durante 48 h, para ser almacenados hasta su análisis por cromatografía líquida.

### Figura 5.

*Montaje experimental de la extracción con solvente para la obtención de los extractos hidroetanólicos.*



**Nota:** Foto tomada por el autor Josafat TARAZONA. Fecha: mayo 12 de 2021. Lugar: CENIVAM, UIS, Bucaramanga.

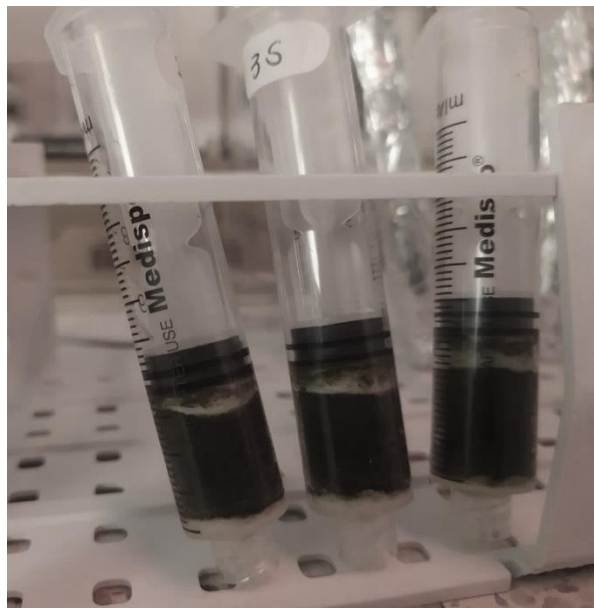
#### **2.2.3 Extracción por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida.**

Los experimentos se desarrollaron con base en los trabajos publicados por Barker (2007) y Xiao, H., (2004), con algunas modificaciones. Se usó sílice modificada con C<sub>18</sub> como soporte sólido y como solvente eluyente una mezcla de etanol/agua al 70%. Se pesaron 0,5 g de cada muestra obtenida de partes aéreas de *O. campechianum*, después de su destilación, y en estado seco. El material vegetal se mezcló y homogeneizó durante 30 min junto con el soporte sólido en una relación 1:3 p/p y con 2 mL de *iso*-propanol como solvente dispersante. El homogeneizado se transfirió y se compactó en una jeringa tipo cartucho (Véase Figura 6) de 20 mL que contenía en

el fondo una trampa de algodón, el extracto líquido se eluyó con 10 mL del solvente etanólico al 70%. Los extractos aislados se concentraron con corriente de nitrógeno y, luego, se liofilizaron para calcular los rendimientos de extracción.

### Figura 6.

*Cartuchos de MSPD para la obtención de los extractos.*



**Nota:** Foto tomada por el autor Josafat TARAZONA. Fecha: agosto 16 de 2021. Lugar: CENIVAM, UIS, Bucaramanga.

## 2.3. Análisis Cromatográfico

### 2.3.1. Análisis por GC/MS

El análisis cromatográfico del AE de *O. campechianum*, se realizó en un cromatógrafo de gases (GC), *Agilent Technologies 6890N Series Network System* (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD-5973* (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.). La separación de los compuestos presentes en el AE se llevó a cabo en una columna capilar, con fase estacionaria apolar de 5%-fenil-poli (dimetilsiloxano), DB-5MS, de 60 m x 0.25 mm (d.i.) x

0.25  $\mu\text{m}$  ( $d_f$ ), y en una columna capilar con fase estacionaria polar de poli (etilenglicol), DB-WAX, de 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25  $\mu\text{m}$  ( $d_f$ ).

Mediante ionización con electrones (EI), a una energía de 70 eV, se obtuvieron los espectros de masas, que se compararon con los de las bases de datos, Adams (2007), Babushok *et al.* (2011) y NIST (2017), en busca de identificar los componentes presentes en los AE. Los índices de retención lineales, obtenidos en ambas columnas, se calcularon usando la serie homóloga de *n*-alcanos C<sub>6</sub>-C<sub>25</sub> (*Sigma-Aldrich*, Milwaukee, WI, EE. UU.), para hacer la identificación tentativa de los compuestos presentes. Para la identificación confirmatoria, de los metabolitos secundarios volátiles mayoritarios presentes en los AE hidrodestilados, se usaron sustancias de referencia adquiridas a *Sigma-Aldrich* (Milwaukee, WI, EE. UU.).

### **2.3.2. Análisis por GC-FID**

Los metabolitos secundarios volátiles presentes en el AE de *O. campechianum* se cuantificaron en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 7890A (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector de ionización en llama (FID), un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación *split* 1:30, volumen de inyección de 1  $\mu\text{L}$ ), y con un sistema automático de inyección AT 7683B. La separación cromatográfica de los componentes se llevó a cabo en una columna capilar, con fase estacionaria apolar de 5%-fenil-poli (dimetilsiloxano), DB-5MS, de 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25  $\mu\text{m}$  ( $d_f$ ).

### **2.3.3. Análisis HPLC-DAD**

El análisis cromatográfico de los extractos se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies* 1200 Infinity Series (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), con una bomba cuaternaria AT G1315B, un inyector automático y un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD).

La separación de los compuestos se realizó en una columna cromatográfica apolar GEMINI C<sub>18</sub> (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) de 250 mm de longitud x 4.6 mm d.i. x 5 µm tamaño de partícula. Se empleó como fase móvil una solución acuosa de ácido fórmico al 0.5% v/v (A) y acetonitrilo, grado HPLC (B), con un flujo de 1 mL/min y gradiente de elución programado así: 98% A (0 min), 88% A (15 min), 88% A (15-23 min), 60% A (46 min), 10% A (71 min), 10% A (71-75 min), 98% A (80 min), 98% A (80-85 min). La detección de los compuestos se realizó en el DAD a las longitudes de onda,  $\lambda=245, 270, 290$  y  $515$  nm.

El procesamiento de datos se desarrolló usando el *software AT ChemStation*, Versión B.04.01 (SP1) y la identificación de los compuestos se realizó por comparación de los tiempos de retención ( $t_R$ ) y de los espectros UV-Vis con los de las sustancias de referencia disponibles.

#### **2.3.4. Análisis por UHPLC-ESI/Orbitrap-MS**

Los extractos obtenidos de *O. campechianum*, se analizaron en un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia (UHPLC), Dionex Ultimate 3000 (*Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE. UU.), equipado con una bomba binaria de gradiente HPG3400RS, un inyector automático de muestras WPS300TRS y una unidad termostática TCC3000.

Las muestras se prepararon a una concentración de 1,0 g/L y la separación de los compuestos se realizó en una columna apolar de C<sub>18</sub> Hypersil GOLD Aq (*Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE. UU.) con 100 mm de longitud, 2.1 mm d.i. y 1.9 µm de tamaño de partícula. La temperatura de la columna se ajustó a 35 °C; velocidad de flujo: 0.4 mL/min; volumen de inyección: 1.0 µL, fase móvil de acetonitrilo, grado LC/MS, con 0.2% del ácido fórmico (A) y una solución acuosa con 0.2% del ácido fórmico (B), con gradiente de elución programado así: 10% (A) durante 0.5 min, 10–25% (A) en 1 min, 25–30% (A) en 1.75 min, 30–45% (A) en 3,5 min y 45% (A) durante 0,25 min, seguido del reequilibrio de la columna durante 2,5 min con 10% (A). Los espectros de

masas se obtuvieron por ESI-Orbitrap-MS, operado en modo de iones positivos, empleando un analizador de masas Orbitrap (Exactive Plus, *Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE. UU.). La temperatura de la interfaz de electronebulización fue de 350 °C; presión del gas nebulizador 40 psi; voltaje del capilar 3.5 kV; rango de masas  $m/z$  80–1100. Los espectros de masas se adquirieron en el modo de fragmentación completa, con energías de 10 a 50 eV en la celda de disociación por colisión de alta energía (HCD, *High Collision Dissociation Cell*).

Los datos se analizaron usando el *software Thermo Xcalibur v3.1* (Thermo Scientific, San José, CA, EE. UU.). Los compuestos presentes en la corriente iónica total se identificaron con base en la composición elemental de las moléculas protonadas, y en el estudio de los patrones de fragmentación, y la medición de las masas exactas de moléculas protonadas y iones-producto en las sustancias presentes en las muestras y de las sustancias de referencia.

## **2.4. Capacidad Antioxidante**

### **2.4.1. Ensayo de Decoloración del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>**

En el ensayo, se empleó un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc, Modulus™ II Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, CA, EE. UU), con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos, usando el módulo de absorbancia a una longitud de onda de  $\lambda = 750$  nm, con base en el procedimiento descrito por Re, R., y col. (1999).

La solución *stock* del catión-radical ABTS<sup>•+</sup> se preparó mezclando una solución de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2,45 mM). Se homogeneizó en un equipo ultrasonido por 30 min y se dejó reaccionar por 24 h, a 4 °C, en ausencia de luz. Finalmente, se prepararon las soluciones del AE, extractos y sustancias de referencia de tal manera que la decoloración de la solución resulte entre el 10 y 80% del blanco de absorbancia (Arias, G., 2012).

Usando la siguiente ecuación, se calculó la relación respuesta-concentración de las sustancias de referencia (BHT y  $\alpha$ -tocoferol), de los AE y los extractos obtenidos, como porcentaje de absorbancia del catión-radical ABTS<sup>++</sup> sin inhibir, es decir, el blanco de la reacción. Según la ecuación,  $A_f$  es la absorbancia medida a 60 min, después de la adición del antioxidante,  $A_o$ , es la absorbancia del blanco de reacción.

$$\text{Inhibición de } A_{\lambda:750} \% = \left( \frac{1-A_f}{A_o} \right) \times 100$$

La capacidad antioxidante se determinó mediante la disminución de la coloración azul-verdosa del catión-radical ABTS<sup>++</sup> que, en presencia del antioxidante, neutraliza el ABTS, el cual es incoloro. Finalmente, se obtuvieron los valores de equivalentes a  $\mu\text{mol}$  de Trolox<sup>®</sup> por  $\text{mmol}$  de sustancia antioxidante evaluado para las sustancias de referencia y la capacidad antioxidante total, en  $\mu\text{mol}$  de Trolox<sup>®</sup> por gramo de muestra de AE y de los extractos obtenidos (Arias, G. 2012).

#### **2.4.2 Evaluación de la Capacidad Antioxidante Mediante el Ensayo de Decoloración del $\beta$ -caroteno**

Se determinó la capacidad antioxidante de los AE y los extractos aislados de *O. campechianum*, basado en la metodología propuesta por Mikami y col. (2009), con algunas modificaciones. Para ello, se usó un lector de microplacas Turner Biosystems Inc. Modulos<sup>TM</sup> Microplate Multimode Reader (Sunnyvale, CA, EE. UU.) en el módulo de absorbancia con microplacas transparentes de poli(estireno) de 96 pozos.

Las muestras de AE y de los extractos, se prepararon en etanol, grado absoluto. Las mezclas se llevaron al equipo de ultrasonido por 30 min para luego ser centrifugadas por 15 min, y, luego, incubadas en el lector de microplacas a 45 °C, por 10 min.

A cada muestra, se le adicionó una emulsión de  $\beta$ -caroteno que se preparó con una solución *stock* de  $\beta$ -caroteno en cloroformo. Luego, el cloroformo se evaporó con flujo de nitrógeno por 3

min y, a la mezcla evaporada, se le adicionaron 3 mL de una solución de  $K_2S_4O_8$ , al 1 %, como agente oxidante (Pereira y col, 2017).

Usando una curva de calibración, se calculó el porcentaje de inhibición de la oxidación obtenido mediante la **Ecuación 1** (página 30), presentados en equivalente de  $\mu\text{mol}$  de Trolox<sup>®</sup> por gramos de muestra de AE y de los extractos.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Rendimiento de Destilación y Extracción.

Los rendimientos de obtención fueron calculados usando las **Ecuaciones 3 y 4**, que relacionan la cantidad de AE y extractos obtenidos en las destilaciones y las extracciones, respectivamente, con la cantidad de material vegetal usado.

$$\text{Rendimiento destilación, \%} = \frac{\text{g aceite esencial}}{\text{g material vegetal}} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\text{Rendimiento extracción, \%} = \frac{\text{g extracto}}{\text{g material vegetal}} * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

En las Tablas 5 y 6, se presentan los rendimientos de los AE y extractos, obtenidos a partir de partes aéreas de *O. campechianum*. Los experimentos se realizaron por triplicado.

**Tabla 5.**

*Resultados de los rendimientos de destilación por MWHD de material vegetal fresco y seco de O. campechianum.*

	Material vegetal	Aceite esencial, g	p/p, % (x ± s, n=3)
Aceite esencial	Fresco	0,95	0,38 ± 0,01
	Seco	0,97	0,38 ± 0,02
	Hojas frescas	1,26	0,63 ± 0,03
	Flores frescas	0,51	0,25 ± 0,01

**Nota:** Elaboración propia.

La obtención de los AE de las partes aéreas de *O. campechianum*, permitió observar que, al procesar la matriz vegetal en estado fresco o seco, los rendimientos de destilación no varían significativamente (0,38 %), por lo que resulta más eficiente usar el material vegetal en estado

fresco. Por otro lado, según los resultados, la destilación de únicamente las hojas frescas mostró un mayor rendimiento (0,63 %), comparado con la cantidad de AE obtenido de las inflorescencias separadas (0,25 %).

A partir de esto, se puede concluir que, los compuestos que componen el AE de *O. campechianum* se encuentran en mayor cantidad en las hojas, debido a que en ellas podrían encontrarse los principales órganos que almacenan los metabolitos secundarios volatilizables.

Se podría mencionar, que a través del desoje inducido de la planta, será posible lograr una producción de hojas más rápida y, por ende, una mayor cantidad de AE en función del tiempo.

#### **Tabla 6.**

*Resultados de los rendimientos de extracción con alcohol:agua y MSPD para la especie O. campechianum.*

<b>Método de extracción</b>	<b>Material vegetal</b>	<b>Extracto, g</b>	<b>p/p, % (<math>\bar{x} \pm s, n=3</math>)</b>
Con solvente	Después de destilación	0,79	$5,258 \pm 0,001$
	Seco	1,33	$8,857 \pm 0,001$
MSPD	Después de destilación	0,03	$6,262 \pm 0,001$
	Seco	0,06	$11,345 \pm 0,002$

**Nota:** Elaboración propia.

De los resultados obtenidos sobre los rendimientos de extracción (Véase Tabla 6), se observa que, para cualquiera de las dos técnicas usadas, extracción con solvente o MSPD, el rendimiento de extracción es mayor cuando se usa material vegetal en estado seco, en comparación con el material destilado.

Se observó que, usando la técnica de MSPD, se obtuvo un rendimiento de extracción más alto. Esto puede ser posible ya que, al homogeneizar el material vegetal con el soporte sólido de sílice modificada con C<sub>18</sub>, se puede asegurar que el soporte sólido ayuda a disgregar el tejido y facilita la

extracción por parte del solvente; también, hay una mayor superficie de contacto al reducir al polvo el tamaño de partícula del material vegetal.

### **3.2. Identificación Química de los Metabolitos Secundarios de la Especie Vegetal *O. campechianum*.**

#### **3.2.1. Caracterización Química de los AE Obtenidos Mediante MWHD.**

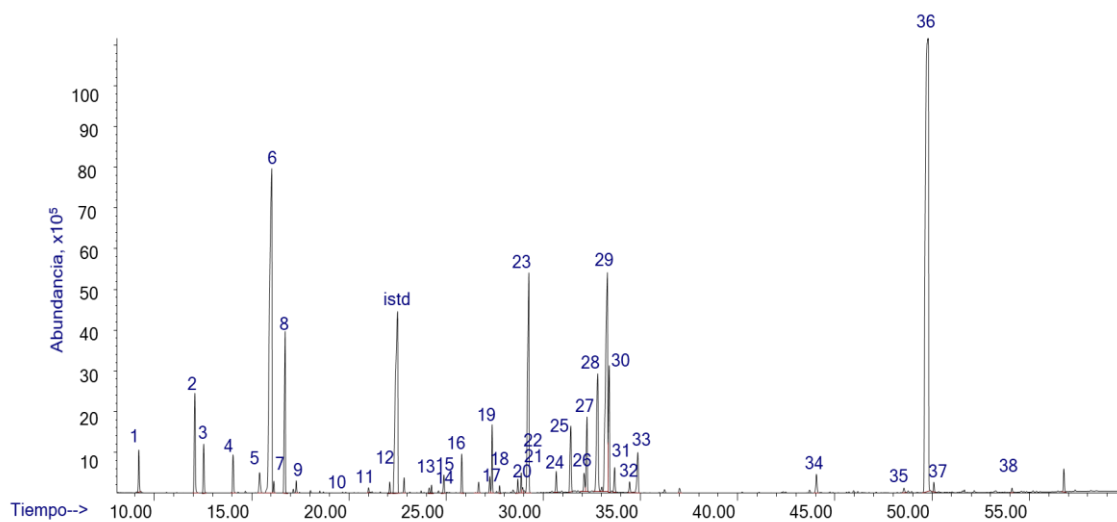
La caracterización química de los AE obtenidos de *O. campechianum* por MWHD, se realizó por GC/MS. Los datos experimentales se compararon con los espectros de masas e índices de retención lineales obtenidos en columnas con fases estacionarias apolar y polar, y con los datos disponibles en la literatura científica (Babushock *et. al.*, 2011) y en las bases de datos (Adams, NIST, Wiley), así como por comparación con los datos experimentales (tiempos de retención, índices de retención y espectros de masas) de las sustancias de referencia disponibles en el laboratorio.

La cuantificación de los componentes de los AE de *O. campechianum* se basó en los datos obtenidos de las corridas cromatográficas GC/FID en la columna con fase estacionaria apolar, mediante el análisis de las áreas relativas (%) de los picos cromatográficos.

Los cromatogramas obtenidos por GC/MS, usando columna polar DB-WAX, de los AE destilados de material vegetal seco y fresco de *O. campechianum*, se presentan en las Figuras 7 y 8. Los cromatogramas de los AE aislados de las hojas y flores frescas, por separado, se presentan en las Figuras 9 y 10. En la Figura 11, se muestra el cromatograma de la mezcla de patrones preparada para confirmar la identidad química de algunos de los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal estudiada.

**Figura 7.**

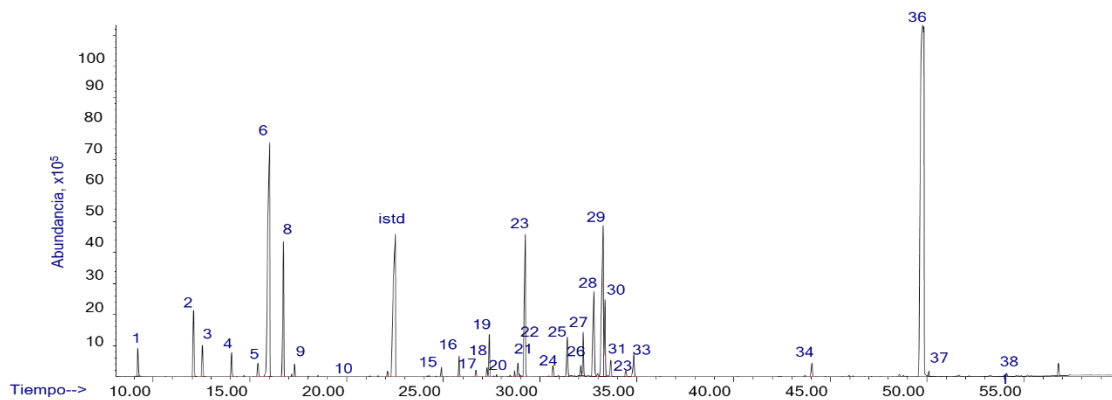
Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan), en columna polar (DB-WAX) del AE de plantas secas de *O. campechianum*. Inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV).



**Nota:** Elaboración propia.

**Figura 8.**

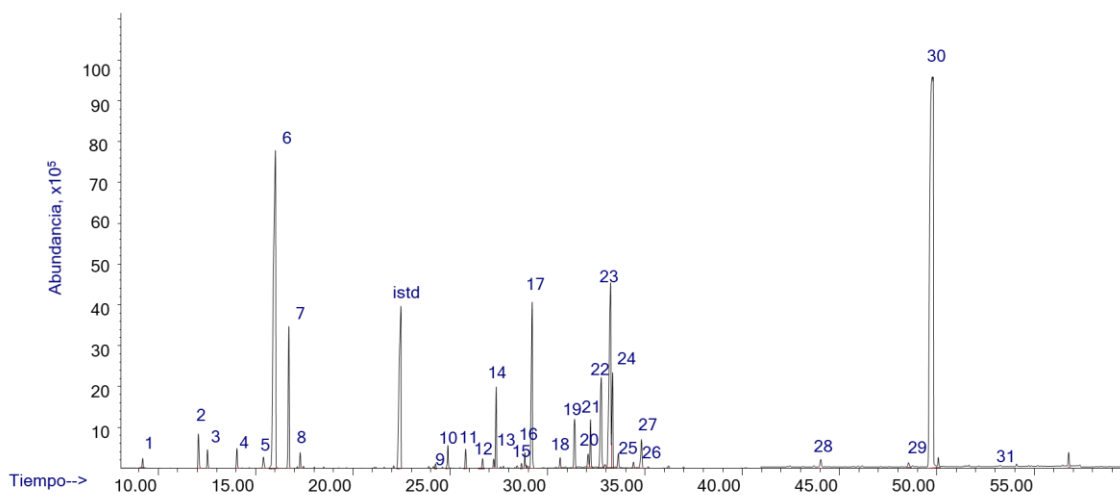
Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan), en columna polar (DB-WAX), del AE de plantas frescas de *O. campechianum*. Inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV).



**Nota:** Elaboración propia.

**Figura 9.**

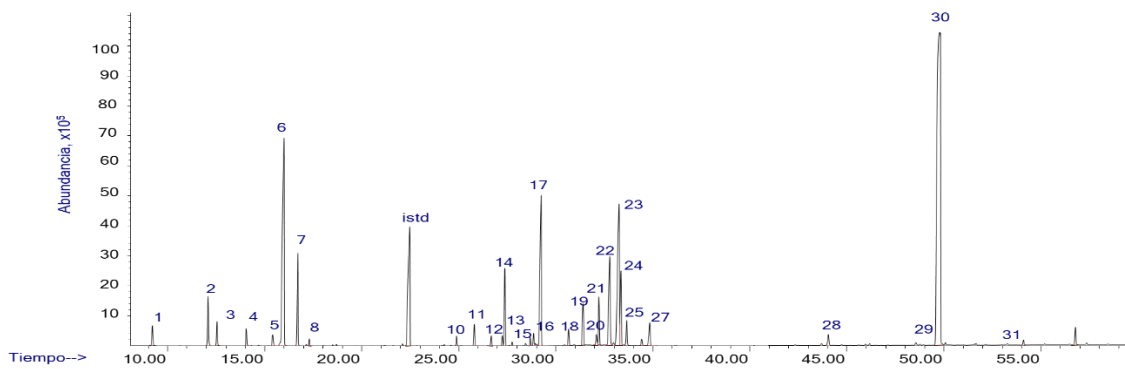
Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan), en columna polar DB-WAX, del AE de las hojas frescas de *O. campechianum*. Inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV).



**Nota:** Elaboración propia.

**Figura 10.**

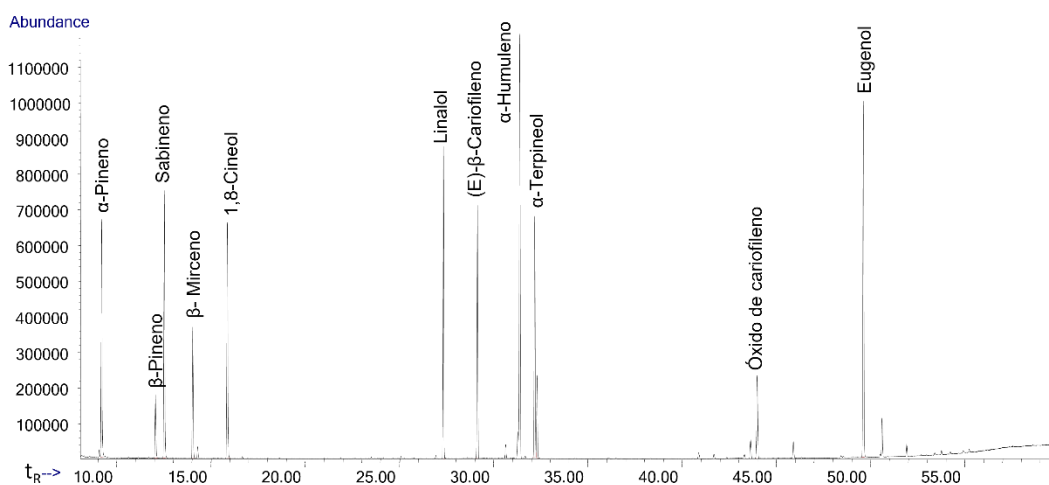
Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan), en columna polar DB-WAX, del AE de las flores frescas de *O. campechianum*. Inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV).



**Nota:** Elaboración propia.

**Figura 11.**

Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan), en columna polar DB-WAX, de la mezcla de algunas sustancias de referencia. Inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV).



**Nota:** Elaboración propia.

En las Tablas 7 y 8, aparecen los resultados de la identificación química de los AE destilados de *O. campechianum* por MWHD. En las Tablas 9 y 10, se presentan los resultados de la cuantificación por GC/FID de los componentes de los AE obtenidos.

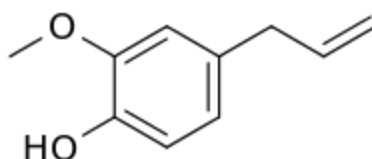
En total, se identificaron 29 compuestos presentes en los AE obtenidos de las hojas y las flores frescas de *O. campechianum* (Véase Tabla 7), respectivamente, y 38 compuestos en los AE obtenidos de material vegetal seco y fresco de la especie estudiada (Véase Tabla 8). Del total de metabolitos secundarios identificados, el 88 % correspondieron a hidrocarburos sesquiterpénicos, compuestos oxigenados y monoterpenos oxigenados.

La identificación de los metabolitos secundarios presentes en los AE destilados de *O. campechianum*, mostró que la especie vegetal bajo estudio es quimiotipo eugenol (Véase Figura

12), ya que en todos los AE este metabolito secundario se encontró en mayor cantidad relativa seguido de 1,8-cineol, (*E*)- $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -selineno, frente los demás metabolitos identificados.

### Figura 12.

Estructura molecular del eugenol.



### Tabla 7.

Caracterización por GC/MS del AE destilado de las hojas y flores frescas de *O. campechianum*.

Figs . N° 9 y 10	t <sub>R</sub> , min	Compuesto	Índices de retención lineales				Área GC relativa, %	
			DB-WAX		DB-5MS		(±s, n=3)	
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.	Hojas	Flores
1	9,21	$\alpha$ -Pineno <sup>a,b,c</sup>	1015	1025	935	936	0,2±0,1	0,7±0,4
2	12,08	$\beta$ -Pineno <sup>a,b,c</sup>	1104	1110	980	978	0,9±0,1	1,8±0,5
3	12,54	Sabineno <sup>a,b,c</sup>	1117	1122	974	973	0,5±0,1	0,8±0,2
4	14,05	$\beta$ -Mirceno <sup>a,b,c</sup>	1158	1160	989	989	0,5±0,1	0,6±0,1
5	15,41	Limoneno <sup>a,b</sup>	1196	1198	--	--	0,4±0,1	0,5±0,1
6	16,03	1,8-Cineol <sup>a,b,c</sup>	1213	1211	1038	1032	19,6±0,	14,3±0,
							5	1
7	16,72	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimeno <sup>a,b</sup>	1232	1234	--	--	3,9±0,2	3,2±0,4
8	17,30	$\gamma$ -Terpineol <sup>a,b</sup>	1248	1245	--	--	0,3±0,2	0,2±0,1
9	24.88	Hidrato de <i>cis</i> -sabineno <sup>a,b</sup>	1467	1460	1074	1074	0,6±0,1	0,3±0,1
10	25.80	$\alpha$ -Copaeno <sup>a,b</sup>	1495	1491	1385	1376	0,5±0,1	0,7±0,1
11	26.67	$\beta$ -Bourbuneno <sup>a,b</sup>	1522	1523	--	--	0,3±0,1	0,3±0,1
12	27.24	$\beta$ -Cubebeno <sup>a,b</sup>	1540	1542	--	--	0,2±0,1	0,3±0,1

13	27.37	Linalol <sup>a,b,c</sup>	1544	1543	1101	1099	1,8±0,1	2,4±0,3
14	28.68	<i>cis</i> - $\alpha$ -Bergamoteno	1586	1559	--	--	0,1±0,1	0,3±0,1
15	28.85	$\beta$ -Elemeno <sup>a,b</sup>	1592	1590	1398	1390	0,4±0,1	0,4±0,1
16	29.24	( <i>E</i> )- $\beta$ -Cariofileno <sup>a,b,c</sup>	1604	1599	1434	1420	5,7±0,1	7,8±0,4
17	30.66	Aloaromadendreno	1650	1649	1473	1460	0,3±0,1	0,6±0,1
18	31.40	$\alpha$ -Humuleno <sup>a,b,c</sup>	1673	1666	1468	1453	1,6±0,1	1,8±0,2
19	32.09	N.I.	1695		1495	--	0,4±0,1	0,5±0,1
20	32.22	$\alpha$ -Terpinol <sup>a,b,c</sup>	1699	1694	1201	1190	1,2±0,1	1,7±0,2
21	32.78	Germacreno D <sup>a,b</sup>	1713	1708	1493	1481	3,7±0,1	5,1±0,3
22	33.25	$\beta$ -Selineno <sup>a,b</sup>	1725	1717	1503	1486	8,7±0,2	9,2±0,3
23	33.35	$\alpha$ -Selineno <sup>a,b</sup>	1728	1725	1509	1493	2,7±0,1	2,8±0,3
24	33.65	Biciclogermacreno	1735	1734	--	--	0,4±0,1	1,0±0,3
25	34.42	$\delta$ -Cadineno <sup>a,b,c</sup>	1755	1756	--	--	0,2±0,1	0,3±0,2
26	34.84	7- <i>epi</i> - $\alpha$ -Selineno <sup>a,b</sup>	1766	1764	--	--	1,1±0,1	1,1±0,3
27	44.04	Óxido de cariofileno <sup>a,b,c</sup>	1988	1986	1596	1581	0,3±0,1	0,5±0,1
28	49.79	Eugenol <sup>a,b,c</sup>	2169	2163	1370	1358	43,2±0,	40,7±0,
							2	6
29	54.10	Chavicol <sup>a,b</sup>	2334	2338	--	--	0,2±0,1	0,2±0,1

**Nota:** tr: trazas (< 0,1%)

- a. Identificación basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia > 90%).
- b. Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columnas DB-WAX y DB-5MS ([1] Adams, 2007; [2] Babushok *et al.*, 2011; [3] NIST, 2011).
- c. Identificación confirmatoria basada en el análisis cromatográfico de las sustancias de referencia.

N.I. – No identificado. Elaboración propia.

**Tabla 8.**Caracterización por GC/MS del AE destilado de plantas frescas y secas de *O. campechianum*.

Figs . N° 7 y 8	tr, min DB- WAX	Compuesto	Índices de retención lineales				Área GC relativa, % ( $\pm$ s, $n=3$ )	
			DB-WAX		DB-5MS		Seco	Fresco
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
1	9,22	$\alpha$ -Pinenol <sup>a,b,c</sup>	1015	1025	934	936	0,9 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,4
2	12,09	$\beta$ -Pinenol <sup>a,b,c</sup>	1104	1110	980	978	2,3 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,1
3	12,55	Sabinol <sup>a,b,c</sup>	1117	1122	974	973	1,0 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,4
4	14,06	$\beta$ -Mircol <sup>a,b,c</sup>	1158	1160	989	989	0,8 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,4
5	15,42	Limonol <sup>a, b,</sup>	1196	1198	--	1029	0,6 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,3
6	16,05	1,8-Cineol <sup>a,b,c</sup>	1213	1211	1037	1032	17,3 $\pm$ 0,	18,2 $\pm$ 0,
							8	6
7	16,15	2-( <i>E</i> )-Hexenal <sup>a, b</sup>	1216	1216	--	853	0,2 $\pm$ 0,1	Tr
8	16,73	( <i>E</i> )-Ocimol <sup>a, b</sup>	1232	1234	1047	1048	3,8 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2
9	17,31	$\gamma$ -Terpinol <sup>a, b</sup>	1248	1245	--	1060	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1
10	21,02	Hexenol <sup>a, b</sup>	1352	1351	--	870	0,1 $\pm$ 0,1	tr
11	22,11	3-Hexen-1-ol <sup>a, b</sup>	1384	1380	--	857	0,2 $\pm$ 0,1	tr
12	22,85	2-( <i>E</i> )-Hexenol <sup>a, b</sup>	1405	1400	--	864	0,2 $\pm$ 0,4	tr
13	24,14	1,3,8- <i>p</i> -Menthatrienol <sup>a, b</sup>	1444	1411	--	1112	0,1 $\pm$ 0,1	tr
14	24,26	1-Octen-3-ol <sup>a, b</sup>	1448	1444	--	980	0,1 $\pm$ 0,1	tr
15	24,89	Hidrato de <i>cis</i> -sabinol <sup>a,</sup> b	1467	1460	1073	1098	0,4 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,1
16	25,81	$\alpha$ -Copaenol <sup>a, b</sup>	1495	1491	1383	1376	0,8 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,1
17	26,68	$\beta$ -Bourbunol <sup>a, b</sup>	1522	1523	1392	1384	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
18	27,25	$\beta$ -Cubebol <sup>a, b</sup>	1541	1542	--	1387	0,4 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1
19	27,37	Linalol <sup>a,b,c</sup>	1545	1543	1100	1099	1,3 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,5
20	27,75	1-Octanol <sup>a, b</sup>	1557	1552	--	1071	0,1 $\pm$ 0,1	tr
21	28,69	<i>cis</i> - $\alpha$ -Bergamol <sup>a, b</sup>	1587	1559	--	1414	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
22	28,87	$\beta$ -Elemol <sup>a, b</sup>	1593	1590	1396	1390	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
23	29,26	( <i>E</i> )-Cariofilol <sup>a,b,c</sup>	1605	1599	1433	1420	7,8 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,2

24	30,67	Aloaromadendreno <sup>a, b</sup>	1650	1649	1471	1460	0,5±0,2	0,4±0,1
25	31,42	$\alpha$ -Humuleno <sup>a, b</sup>	1674	1666	1467	1453	2,0±0,1	1,6±0,9
26	32,10	N.I.	1696	NN	1493	--	0,6±0,3	0,4±0,5
27	32,24	$\alpha$ -Terpinol <sup>a, b, c</sup>	1700	1694	1200	1190	1,7±0,1	1,4±0,8
28	32,80	Germacreno D <sup>a, b</sup>	1714	1708	1492	1481	4,8±0,3	4,3±0,2
29	33,30	$\beta$ -Selineno <sup>a, b</sup>	1727	1717	1502	1486	10,9±0,	8,8±0,2
							4	
30	33,39	$\alpha$ -Selineno <sup>a, b</sup>	1729	1725	1507	1493	3,3±0,1	2,7±0,0
							4	
31	33,67	Biciclogermacreno <sup>a, b</sup>	1736	1734	--	1494	0,6±0,3	0,6±0,8
32	34,44	$\delta$ -Cadineno <sup>a, b</sup>	1756	1756	1525	1523	0,3±0,2	0,2±0,1
33	34,86	7- <i>epi</i> - $\alpha$ -Selineno <sup>a, b</sup>	1766	1764	--	1517	1,3±0,6	1,0±0,5
34	44,04	Óxido de cariofileno <sup>a, b, c</sup>	1988	1986	1594	1581	0,6±0,4	0,5±0,2
35	48,55	Espatuleno <sup>a, b</sup>	2126	2127	--	1576	0,1±0,1	tr
36	49,79	Eugenol <sup>a, b, c</sup>	2169	2163	1367	1358	33±2	37,7±0,
							7	
37	50,09	Timol <sup>a, b</sup>	2179	2164	--	1290	0,2±0,1	0,2±0,1
38	54,11	Chavicol <sup>a, b</sup>	2333	2337	---	1254	0,1±0,1	tr

**Nota:** tr: trazas (< 0,1%)

a. Identificación basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia > 90%).

b. Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columnas DB-WAX y DB-5MS ([1] Adams, 2007; [2] Babushok et al., 2011; [3] NIST, 2011).

c. Identificación confirmatoria basada en el análisis cromatográfico de las sustancias de referencia.

N.I. – No identificado. Elaboración propia.

**Tabla 9.**

Cuantificación por GC/FID (mg de sustancia/ g de AE) de los AE destilados de las hojas y flores frescas de *O. campechianum* (Albahaca de clavo) en estado fresco.

Figs . N° 7 y 8	tr, min DB- WAX	Compuesto	Índices de retención lineales				mg sustancia/g AE (n=3)	
			DB-WAX		DB-5MS		Hojas	Flores
			Exp.	Lit.	Exp	Lit.		
1	9,21	$\alpha$ -Pineno <sup>a,b,c</sup>	1015	102	935	936	2,38±0,1	6,59±0,4
				5				
2	12,08	$\beta$ -Pineno <sup>a,b,c</sup>	1104	111	980	978	9,37±0,1	18,17±0,5
				0				
3	12,54	Sabineno <sup>a,b,c</sup>	1117	112	974	973	4,72±0,1	8,14±0,2
				2				
4	14,05	$\beta$ -Mirceno <sup>a,b,c</sup>	1158	116	989	989	4,88±0,1	5,67±0,1
				0				
5	15,41	Limoneno <sup>a,b</sup>	1196	119	--	--	3,96±0,1	4,66±0,1
				8				
6	16,03	1,8-Cineol <sup>a,b,c</sup>	1213	121	103	103	196,04±0,	143,2±0,1
				1	8	2	1	
7	16,72	(Z)- $\beta$ -Ocimeno <sup>a,b</sup>	1232	123	--	--	38,89±0,2	32,36±0,4
				4				
8	17,30	$\gamma$ -Terpineol <sup>a,b</sup>	1248	124	--	--	3,47±0,1	2,09±0,1
				5				
9	24.88	Hidrato de <i>cis</i> -Sabineno <sup>a,b</sup>	1467	146	107	107	5,82±0,1	3,08±0,1
				0	4	4		
10	25.80	$\alpha$ -Copaeno <sup>a,b</sup>	1495	149	138	137	4,62±0,1	6,88±0,1
				1	5	6		

11	26.67	$\beta$ -Bourbuneno <sup>a,b</sup>	1522	152	--	--	2,57±0,1	3,31±0,1
				3				
12	27.24	$\beta$ -Cubebeno <sup>a,b</sup>	1540	154	--	--	2,21±0,1	03,18±0,1
				2				
13	27.37	Linalol <sup>a,b,c</sup>	1544	154	110	109	18,10±0,1	24,43±0,3
				3	1	9		
14	28.68	<i>cis</i> - $\alpha$ -Bergamoteno	1586	155	--	--	1,10±0,1	2,56±0,1
				9				
15	28.85	$\beta$ -Elemeno <sup>a,b</sup>	1592	159	139	139	3,59±0,1	3,75±0,1
				0	8	0		
16	29.24	( <i>E</i> )-Cariofileno <sup>a,b,c</sup>	1604	159	143	142	56,58±0,1	77,91±0,4
				9	4	0		
17	30.66	Aloaromadendreno	1650	164	147	146	2,86±0,1	5,57±0,1
				9	3	0		
18	31.40	$\alpha$ -Humuleno <sup>a,b,c</sup>	1673	166	146	145	15,77±0,1	18,45±0,2
				6	8	3		
19	32.09	N.I.	1695		149	--	4,13±0,1	4,71±0,1
					5			
20	32.22	$\alpha$ -Terpinol <sup>a,b,c</sup>	1699	169	120	119	12,07±0,1	16,91±0,2
				4	1	0		
21	32.78	Germacreno D <sup>a,b</sup>	1713	170	149	148	36,55±0,1	50,55±0,3
				8	3	1		
22	33.25	$\beta$ -Selineno <sup>a,b</sup>	1725	171	150	148	86,64±0,2	91,79±0,3
				7	3	6		
23	33.35	$\alpha$ -Selineno <sup>a,b</sup>	1728	172	150	149	27,08±0,1	28,20±0,3
				5	9	3		
24	33.65	Biciclogermacreno	1735	173	--	--	4,13±0,1	9,83±0,1
				4				
25	34.42	$\delta$ -Cadineno <sup>a,b,c</sup>	1755	175	--	--	1,79±0,1	2,57±0,1
				6				

26	34.84	7- <i>epi</i> - $\alpha$ -Selineno <sup>a,b</sup>	1766	176	--	--	10,6 $\pm$ 0,1	11,38 $\pm$ 0,3
				4				
27	44.04	Óxido de cariofileno <sup>a,b,c</sup>	1988	198	159	158	3,19 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1
				6	6	1		
28	49.79	Eugenol <sup>a,b,c</sup>	2169	216	137	135	431,51 $\pm$ 0,	406,90 $\pm$ 0,
				3	0	8	2	6
29	54.10	Espatulenol <sup>a,b</sup>	2126	212	--	--	2,64 $\pm$ 0,1	2,64 $\pm$ 0,1
				7				

**Nota:** tr: trazas (< 0,1%)

a. Identificación basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia > 90%).

b. Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columnas DB-WAX y DB-5MS ([1] Adams, 2007; [2] Babushok et al., 2011; [3] NIST, 2011).

c. Identificación confirmatoria basada en el análisis cromatográfico de las sustancias de referencia.

N.I. – No identificado. Elaboración propia.

### Tabla 10.

*Cuantificación por GC/FID (mg de sustancia/ g de AE) de los AE destilados de las partes aéreas frescas y secas de O. campechianum.*

Figs . N° 9 y 10	t <sub>R</sub> , min DB- WAX	Compuesto	Índices de retención lineales				mg sustancia/g AE (n=3)	
			DB-WAX		DB-5MS		Seco	Fresco
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
1	9,22	$\alpha$ -Pineno <sup>a,b,c</sup>	1015	1025	934	936	8,61 $\pm$ 0,2	9,57 $\pm$ 0,2
2	12,09	$\beta$ -Pineno <sup>a,b,c</sup>	1104	1110	980	978	23,41 $\pm$ 0, 1	25,76 $\pm$ 0, 4
3	12,55	Sabineno <sup>a,b,c</sup>	1117	1122	974	973	10,10 $\pm$ 0, 1	11,25 $\pm$ 0, 2

4	14,06	$\beta$ -Mirceno <sup>a,b,c</sup>	1158	1160	989	989	7,92 $\pm$ 0,4	8,65 $\pm$ 0,0
							2	
5	15,42	Limoneno <sup>a,b</sup>	1196	1198	--	1029	6,17 $\pm$ 0,0	6,53 $\pm$ 0,1
							3	
6	16,05	1,8-Cineol <sup>a,b,c</sup>	1213	1211	1037	1032	172,50 $\pm$ 0	181,65 $\pm$ 0
							,8	,2
7	16,15	2-( <i>E</i> )-Hexenal <sup>a,b</sup>	1216	1216	--	853	1,94 $\pm$ 0,1	tr
8	16,73	( <i>E</i> )-Ocimeno <sup>a,b</sup>	1232	1234	1047	1048	38,38 $\pm$ 0,	2,81 $\pm$ 0,2
							1	
9	17,31	$\gamma$ -Terpineno <sup>a,b</sup>	1248	1245	--	1060	2,28 $\pm$ 0,1	3,71 $\pm$ 0,0
							1	
10	21,02	Hexenol <sup>a,b</sup>	1352	1351	--	870	0,84 $\pm$ 0,1	tr
11	22,11	3-Hexen-1-ol <sup>a,b</sup>	1384	1380	--	857	1,99 $\pm$ 0,1	tr
12	22,85	2-( <i>E</i> )-Hexenol <sup>a,b</sup>	1405	1400	--	864	2,48 $\pm$ 0,4	tr
13	24,14	1,3,8- <i>p</i> -Menthatriene <sup>a,b</sup>	1444	1411	--	1112	1,10 $\pm$ 0,3	tr
14	24,26	1-Octen-3-ol <sup>a,b</sup>	1448	1444	--	980	1,35 $\pm$ 0,1	tr
15	24,89	Hidrato de <i>cis</i> - Sabineno <sup>a,b</sup>	1467	1460	1073	1098	3,90 $\pm$ 0,3	3,19 $\pm$ 0,2
16	25,81	$\alpha$ -Copaeno <sup>a,b</sup>	1495	1491	1383	1376	8,35 $\pm$ 0,4	6,49 $\pm$ 0,2
17	26,68	$\beta$ -Bourbuneno <sup>a,b</sup>	1522	1523	1392	1384	2,59 $\pm$ 0,1	2,25 $\pm$ 0,2
18	27,25	$\beta$ -Cubebeno <sup>a,b</sup>	1541	1542	--	1387	3,51 $\pm$ 0,2	2,80 $\pm$ 0,1
19	27,37	Linalol <sup>a,b,c</sup>	1545	1543	1100	1099	13,28 $\pm$ 0,	12,65 $\pm$ 0,
							1	2
20	27,75	1-Octanol <sup>a,b</sup>	1557	1552	--	1071	12,07 $\pm$ 0,	tr
							1	
21	28,69	<i>cis</i> - $\alpha$ -Bergamoteno <sup>a,b</sup>	1587	1559	--	1414	2,78 $\pm$ 0,1	1,67 $\pm$ 0,1
22	28,87	$\beta$ -Elemeno <sup>a,b</sup>	1593	1590	1396	1390	4,19 $\pm$ 0,0	4,01 $\pm$ 0,1
							2	
23	29,26	( <i>E</i> )-Cariofileno <sup>a,b,c</sup>	1605	1599	1433	1420	78,30 $\pm$ 0,	63,79 $\pm$ 0,
							3	8
24	30,67	Aloaromadendreno <sup>a,b</sup>	1650	1649	1471	1460	4,94 $\pm$ 0,2	3,67 $\pm$ 0,1

25	31,42	$\alpha$ -Humuleno <sup>a, b</sup>	1674	1666	1467	1453	20,28±0, 7	16,34±0, 03
26	32,10	N.I.	1696	NN	1493	--	5,73±0,3	4,16±0,0 3
27	32,24	$\alpha$ -Terpinol <sup>a, b, c</sup>	1700	1694	1200	1190	17,13±0, 8	14,32±0, 1
28	32,80	Germacreno D <sup>a, b</sup>	1714	1708	1492	1481	47,83±0, 3	43,39±0, 2
29	33,30	$\beta$ -Selineno <sup>a, b</sup>	1727	1717	1502	1486	109,23±0, ,4	88,35±0, 6
30	33,39	$\alpha$ -Selineno <sup>a, b</sup>	1729	1725	1507	1493	32,86±0, 1	26,63±0, 2
31	33,67	Biciclogermacreno <sup>a, b</sup>	1736	1734	--	1494	6,15±0,0 3	6,08±0,0 1
32	34,44	$\delta$ -Cadineno <sup>a, b</sup>	1756	1756	1525	1523	2,84±0,2	2,11±0,0 1
33	34,86	7- <i>epi</i> - $\alpha$ -Selineno <sup>a, b</sup>	1766	1764	--	1517	13,31±0, 6	10,29±0, 05
34	44,04	Óxido de cariofileno <sup>a, b, c</sup>	1988	1986	1594	1581	5,72±0,4	4,53±0,2
35	48,55	Espatuleno <sup>a, b</sup>	2126	2127	--	1576	1,49±0,1	tr
36	49,79	Eugenol <sup>a, b, c</sup>	2169	2163	1367	1358	332±2	377±2

Tabla 10, continuación.

37	50,09	Timol <sup>a, b</sup>	2179	2164	--	1290	2,09±0,0 1	1,69±0,0 1
38	54,11	Chavicol <sup>a, b</sup>	2333	2337	---	1254	0,97±0,0 1	tr

**Nota:** tr: trazas (< 0,1%)

a. Identificación basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia > 90%).

b. Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columnas DB-WAX y

DB-5MS ([1] Adams, 2007; [2] Babushok et al., 2011; [3] NIST, 2011).

c. Identificación confirmatoria basada en el análisis cromatográfico de las sustancias de referencia.

N.I. – No identificado. Elaboración propia.

### 3.2.2. Caracterización de los Estractos Obtenidos con Solvente y por MSPD.

Los extractos obtenidos con solvente y mediante *MSPD*, se caracterizaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPCL-DAD) y usando cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC-ESI/*Orbitrap*-MS) en modo de adquisición de iones positivos y negativos.

Para la identificación, se realizó una revisión bibliográfica sobre los metabolitos secundarios (flavonoides y ácidos fenólicos) presentes en plantas del mismo género *Ocimum* (Tabla 9).

**Tabla 11.**

*Compuestos presentes en extractos obtenidos de plantas del género Ocimum, según la especie.*

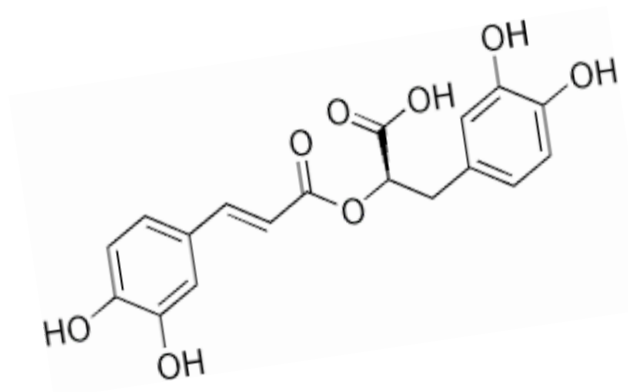
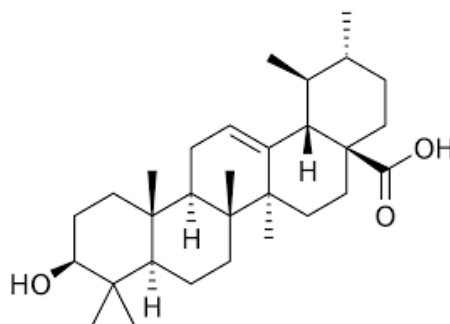
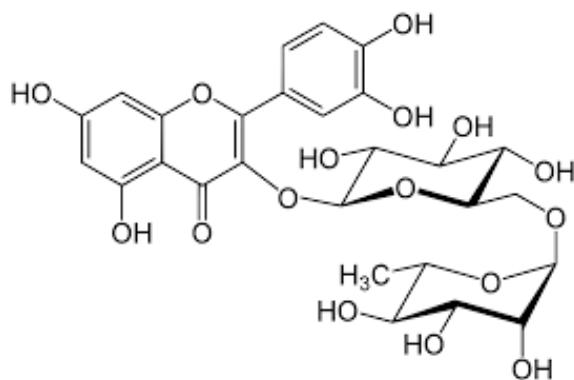
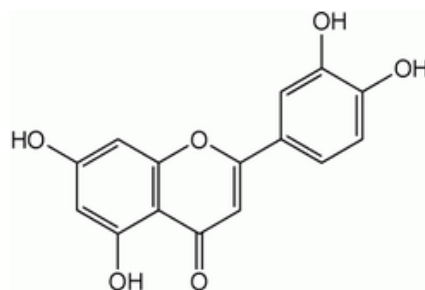
Compuesto	Especie vegetal	Referencia
Luteolina	<i>O. campechianum</i>	Girme y col, 2021
Ácido rosmarínico	<i>O. campechianum</i>	Ruiz-Vargas y col, 2019
Kaempferol	<i>O. basilicum</i>	Cavar y col, 2020
Rutina	<i>O. campechianum</i>	Tachinni y col, 2021
Ácido cafeico	<i>O. gratissimum</i>	Cavar y col, 2020
Apigenina	<i>O. gratissimum</i>	Cavar y col, 2020
Ácido ursólico	<i>O. gratissimum</i>	Girme y col, 2021
2-Vicenina	<i>O. gratissimum</i>	Girme y col, 2021

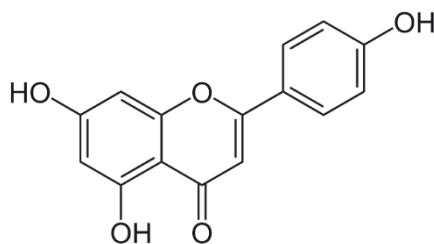
**Nota:** Elaboración propia.

Los metabolitos secundarios no volátiles reportados en literatura para el género *Ocimum*, pertenecen a la familia de flavonoides como flavonas, flavonoles, algunos triterpenos, entre otros (Cavar y col., 2020) (Figura 13).

**Figura 13.**

*Estructuras moleculares (A-E) de los metabolitos secundarios identificados en los extractos obtenidos de O. campechianum.*

**A.** Ácido rosmarínico (ácido fenólico).**B.** Ácido ursólico (triterpeno).**C.** Rutina (flavonol).**D.** Luteolina (flavona).



**E.** Apigenina (flavona).

**Nota:** Elaboración propia.

### 3.2.2.1. Análisis de los Metabolitos Secundarios por HPLC-DAD.

El análisis de los metabolitos secundarios en los extractos de *O. campechianum*, se realizó por HPLC-DAD. Se analizaron y compararon los tiempos de retención y las longitudes de onda de los máximos de absorción en los espectros UV obtenidos para cada componente en las muestras y de las sustancias de referencia.

Los resultados obtenidos por HPLC-DAD, permitieron identificar confirmatoriamente únicamente el ácido rosmarínico (A) en los extractos de *O. campechianum*, que presentó coincidencia en las longitudes de onda de máximos de absorción en los espectros UV (Figura 14) y en los tiempos de retención en los cromatogramas (Figura 15) obtenidos, respectivamente, para las muestras y para la sustancia de referencia. Sin embargo, los metabolitos secundarios, *e.g.*, ácido ursólico (B), rutina (C), luteolina (D) y apigenina (E) no se lograron identificar por HPLC-DAD.

En la Tabla 10 se presentan los tiempos de retención y las longitudes de onda de máxima absorción para el ácido rosmarínico presente en los extractos obtenidos con solvente y por MSPD de partes aéreas secas y después de destilación, de *O. campechianum*.

**Tabla 12.**

*Identificación por HPLC-DAD del ácido rosmarínico presente en los extractos de O. campechianum.*

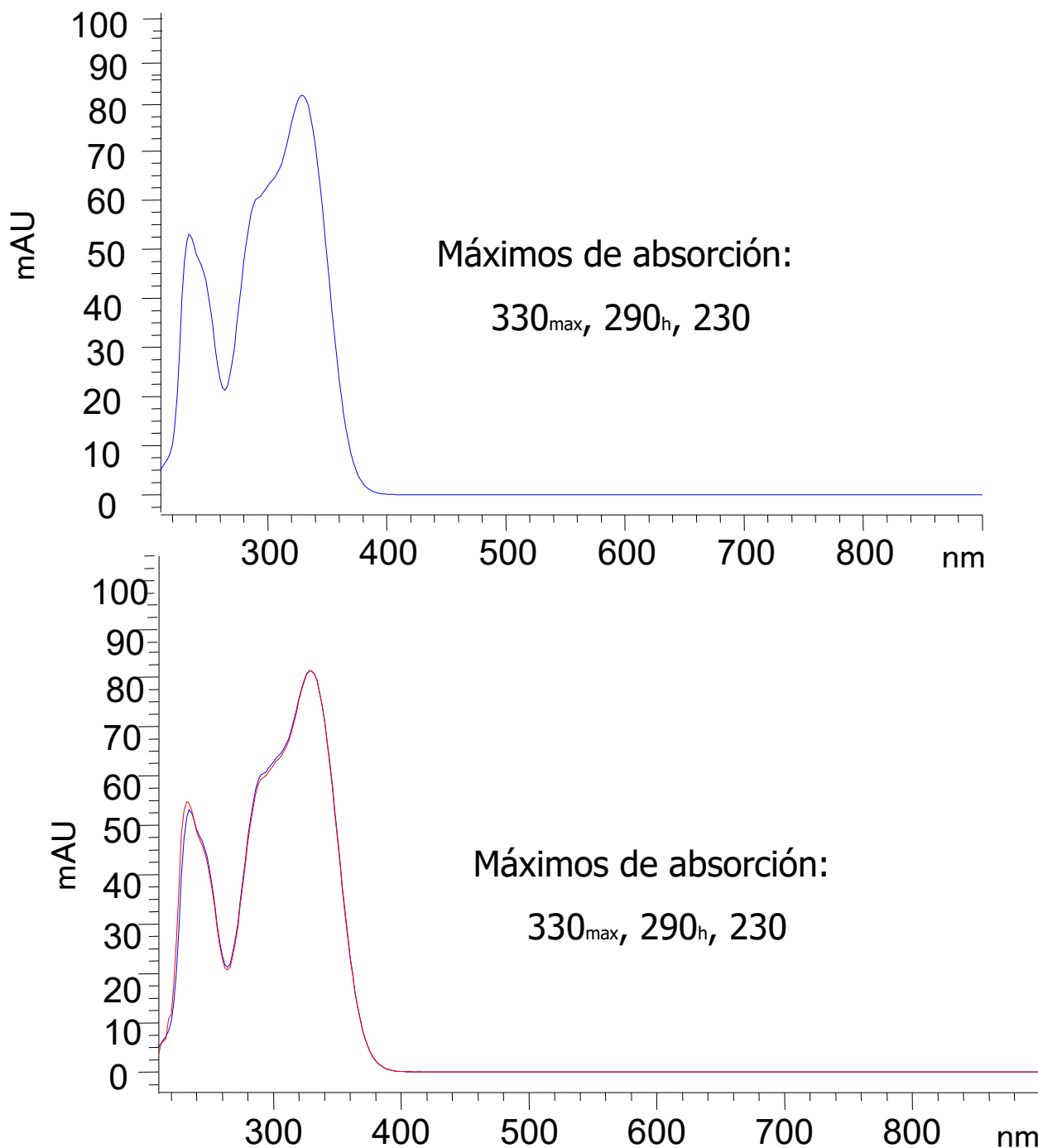
Muestra	t <sub>R</sub> , min (n=3)		λ, nm
	Seco	Después de destilación	
Extracto hidroetanólico	39,62±0,01	39,63±0,01	330 <sup>máx</sup> , 290 <sup>h</sup> , 230
Extracto MSPD	39,64±0,03	39,58±0,01	
Sustancia de referencia		39,58±0,04	330 <sup>máx</sup> , 290 <sup>h</sup> , 230

**Nota:** Se usó la sustancia de referencia (ácido rosmarínico) para el análisis cromatográfico.

Elaboración propia.

**Figura 14.**

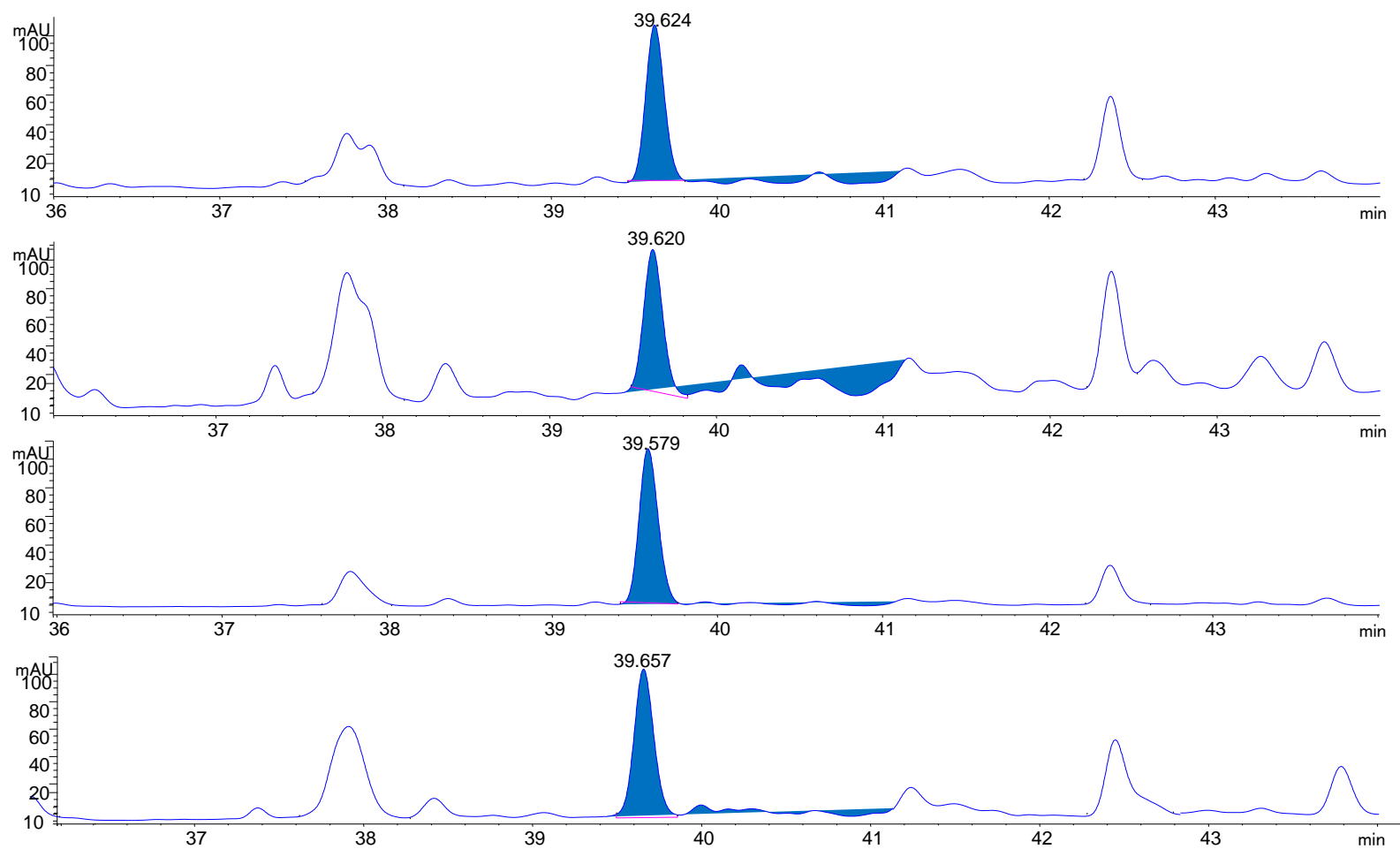
*Espectros UV del ácido rosmarínico obtenidos a  $\lambda = 270$  nm.*



**Nota:** A. Espectro UV del ácido rosmarínico presente en las muestras. B. Comparación de los espectros UV del ácido rosmarínico obtenido en la muestra y de la sustancia de referencia. max: Máximo h: Hombro. Elaboración propia.

**Figura 15.**

Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos hidroalcohólicos y MSPD de la especie *O. campechianum*.



**Nota:** **A.** Extracto hidro-etanólico de material vegetal después de destilar. **B.** Extracto hidro-etanólico de material vegetal seco. **C.** Extracto MSPD de material vegetal después de destilar. **D.** Extracto MSPD de material vegetal seco. Columna C<sub>18</sub> Gemini (Phenomenex). Elaboración propia.

### 3.2.2.2. Identificación de los metabolitos secundarios de *O. campechianum* mediante UHPLC-ESI/*Orbitrap*-MS de los extractos hidroetanólicos y MSPD.

El análisis por UHPLC-ESI/*Orbitrap*-MS, de los extractos de *O. campechianum*, se realizó mediante, usando ambos modos de adquisición de iones, tanto positivos como negativos. Para la identificación de los metabolitos secundarios en los extractos, se prepararon las muestras en la respectiva fase móvil, según el modo de adquisición de iones. Se analizaron las sustancias de referencia, respectivamente, para cada compuesto (Figura 13), bajo los mismos parámetros cromatográficos.

La identificación se realizó comparando los tiempos de retención de cada compuesto con su respectiva sustancia de referencia, como también, comparando los iones producto característicos en sus espectros de masas.

El análisis de las muestras por UHPLC-ESI<sup>+</sup>/*Orbitrap*-MS en modo de adquisición de iones positivos, permitió la identificación de las moléculas protonadas [M+H]<sup>+</sup> de los metabolitos secundarios, *e.g.* rutina en  $m/z$  611.16066, ácido rosmarínico en  $m/z$  361.09315, luteolina en  $m/z$  287.05501, apigenina en  $m/z$  271.06009 y ácido ursólico en  $m/z$  457.36762, presentes en los extractos de *O. campechianum*. Estos mismos metabolitos secundarios, a través de sus moléculas deprotonadas [M-H]<sup>-</sup>, fueron identificados en modo de adquisición de iones negativos en el análisis por UHPLC-ESI<sup>-</sup>/*Orbitrap*-MS, así: rutina en  $m/z$  609.14501, ácido rosmarínico en  $m/z$  359.07614, luteolina en  $m/z$  285.03936, apigenina en  $m/z$  269.04445 y ácido ursólico en  $m/z$  455.35197.

En la Tabla 11, se relacionan las cantidades de ácido rosmarínico encontradas en los extractos de *O. campechianum*, calculadas a partir de la Ecuación 5, usando el ácido cafeico como patrón

interno, a una concentración de 0,05 ppm, lo cual permitió comparar las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los ácidos cafeico y rosmarínico.

$$\text{Cantidad del ácido rosmarínico} = \frac{(A_x * 0,05)}{A_{std}} \quad \text{Ecuación 5}$$

En las Tablas 12 y 13 se presentan los datos de las corrientes iónicas extraídas, EIC, obtenidas en modo *full scan*, tanto en modo positivo como negativo, respectivamente (Véanse Figuras 16 y 17), usando las masas exactas de las moléculas protonadas y deprotonadas de los compuestos identificados en el análisis de los extractos hidroetanólico y MSPD, aislados de *O. campechianum*.

En las Figuras 18-34, se muestran los espectros de masas de los compuestos identificados en el análisis LC/MS en modo de adquisición de iones positivos y negativos, usando la cámara de colisiones activadas de alta energía, HCD, a 10, 20, 30 o 40 eV, para cada caso.

En los espectros de masas se señalan los iones  $[M+H]^+$  y  $[M-H]^-$  de los metabolitos secundarios identificados, y los iones producto característicos formados por la ruptura más probable en las moléculas protonadas y deprotonadas, respectivamente, para cada compuesto identificado en los extractos hidroetanólicos y MSPD de *O. campechianum*, comparados con los espectros de masas de las respectivas sustancias de referencia.

**Tabla 13.**

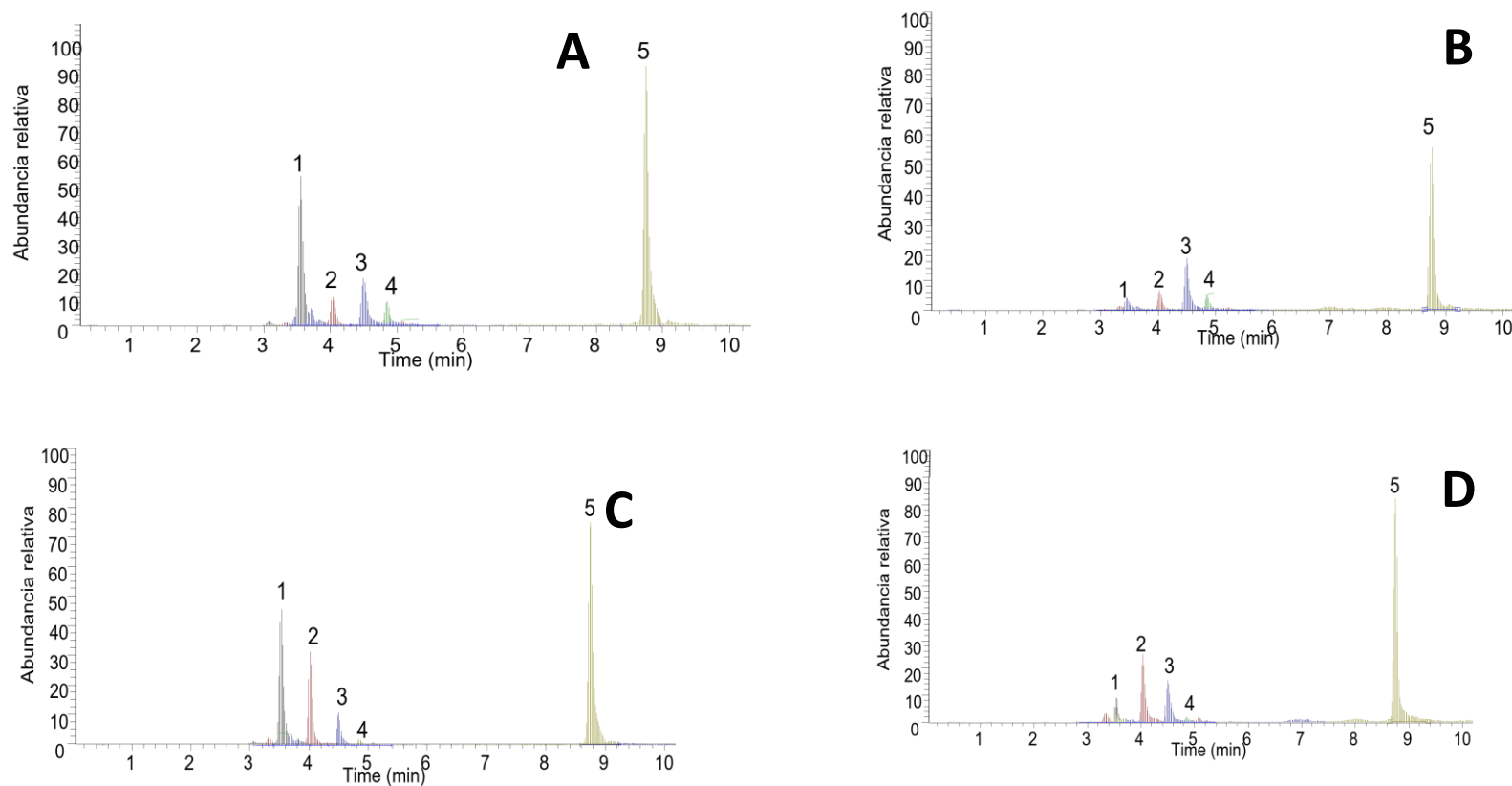
*Cuantificación del ácido rosmarínico presente en los extractos de O. campechianum, usando como patrón interno el ácido cafeico en una concentración conocida de 0,05 ppm, en el análisis por UHPLC/ESI--Orbitrap-MS, operado en modo de adquisición de ion.*

		µg sustancia / mg extracto (±s, n=3)
Técnica extracción	Material vegetal	Ácido rosmarínico
Extracción EtOH	Seco	0,14±0,2
	Después de destilación	0,20±0,1
Extracción MSPD	Seco	0,61±0,2
	Después de destilación	1,09±0,5

**Nota:** Elaboración propia.

**Figura 16.**

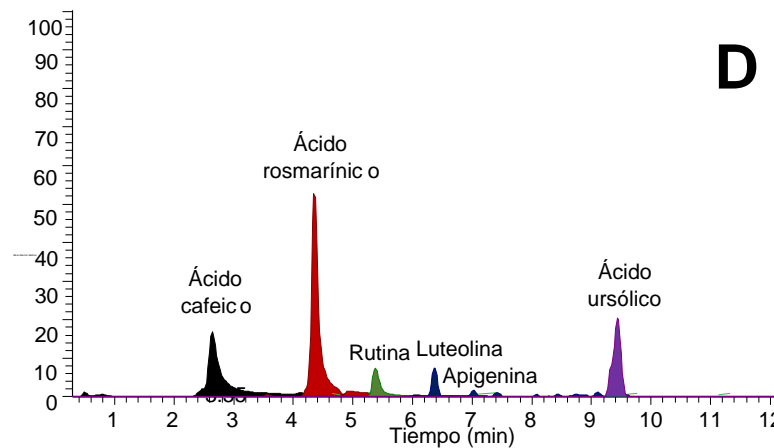
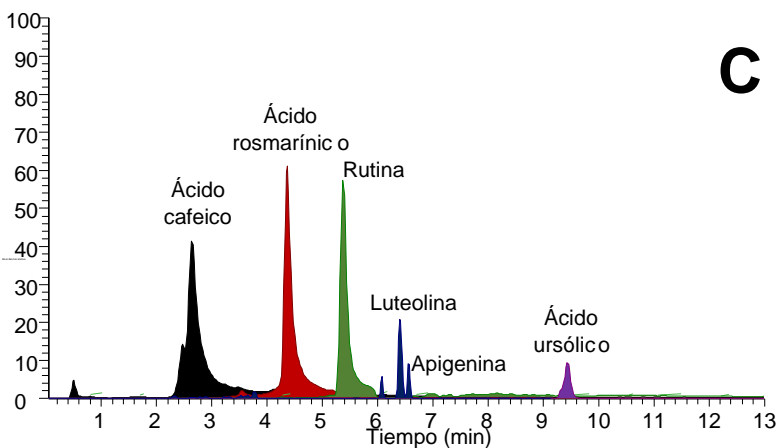
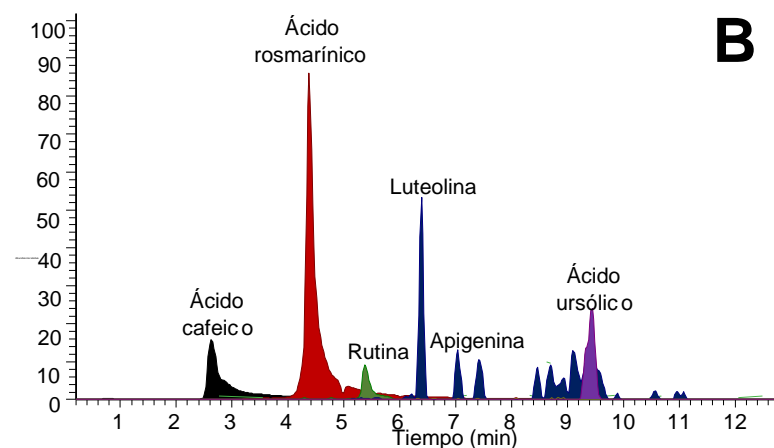
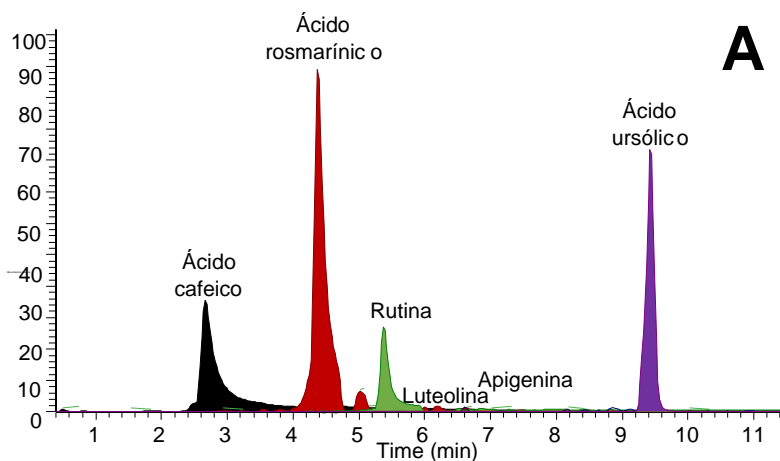
Corrientes iónicas extraídas, EIC, de moléculas protonadas  $[M+H]^+$ , obtenidas por UHPLC-ESI+/Orbitrap-MS, de compuestos presentes en los extractos obtenidos de *O. campechianum*.



**Nota:** **A.** Extracto hidroetanólico de material vegetal seco. **B.** Extracto hidroetanólico de material vegetal, después de su destilación. **C.** Extracto MSPD de material vegetal seco. **D.** Extracto MSPD de material vegetal, después de su destilación. Véase la identificación de los picos en la Tabla 12. Elaboración propia.

**Figura 17.**

Corrientes iónicas extraídas, EIC, de moléculas deprotonadas  $[M-H]^-$ , obtenidas por UHPLC-ESI-/Orbitrap-MS, de compuestos presentes en los extractos obtenidos de *O. campechianum*.



**Nota:** Extracto hidroetanólico de material vegetal seco. **B.** Extracto hidroetanólico de material vegetal después de destilación. **C.** Extracto MSPD de material vegetal seco. **D.** Extracto MSPD de material vegetal después de destilación. Véase la identificación de los picos en la Tabla 13. Elaboración propia.

**Tabla 14.**

*Masas exactas por UHPLC/ESI+/Orbitrap-MS de moléculas protonadas [M+H]<sup>+</sup> presentes en los extractos obtenidos de material vegetal seco y después de su destilación de O. campechianum, analizados.*

Fig. N° 16	Compuesto	Fórmula	$t_R$ , min						Masa molecular [M+H] <sup>+</sup> ( $\Delta$ ppm)				Tipo de fragmento			
			STD	Extracto EtOH		Extracto MSPD		Calculada	Experimental		HCD	Fragmento	Fórmula	<i>m/z</i>		
				Material vegetal					Extracto EtOH						Extracto MSPD	
			Material vegetal				Material vegetal		Material vegetal		Material vegetal					
			Seco	Después de su destilación	Seco	Después de su destilación	Seco	Después de su destilación	Seco	Después de su destilación	Seco	Después de su destilación	Seco	Después de su destilación		
1	Rutina	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	3,53	3,52	3,53	3,53	3,51	611,16066	611,16089 (0,4)	611,16187 (1,3)	611,16113 (0,8)	611,16028 (0,6)	30	[(M+H)- C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ] [(M+H)- C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> ] [(M+H)- C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> ]	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	465,10440 303,04878
2	Ácido rosmarínico	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	4,02	4,01	4,03	4,04	4,01	361,09179	361,09195	361,09140 (1,1)	361,09183 (0,1)	361,09247 (1,8)	10	[(M+H)- C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ]	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	181,04973
3	Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	4,47	4,47	4,50	4,50	4,48	287,05501	287,05490 (0,4)	287,05508 (0,2)	287,05478 (0,8)	287,05508 (0,2)	30	[(M+H)- C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ]	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153,01854
4	Apigenina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	4,84	4,84	4,84	4,85	4,85	271,06009	271,05997 (0,5)	271,05975 (1,3)	271,06009 (0,1)	271,05988 (0,8)	30	[(M+H)- C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O]	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153,01854
5	Ácido ursólico	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	8,74	8,74	8,75	8,76	8,74	457,36762	457,36646 (2,5)	457,36775 (0,2)	457,36655 (2,3)	457,36700 (1,3)	10	[(M+H)- CH <sub>2</sub> O] [(M+H)- C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub> ]	C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> O C <sub>14</sub> H <sub>23</sub>	411,36115 191,17934

**Nota:** Elaboración propia.

**Tabla 15.**

*Masas exactas por UHPLC/ESI-/Orbitrap-MS de moléculas deprotonadas [M-H]- presentes en los extractos H2O/EtOH y MSPD de O. campechianum, después de su destilación, y en estado seco.*

Compuesto	Fórmula	Patrón	t <sub>R</sub> , min				Calculada	Masa molecular [M-H] (Δ ppm)				HCD	Tipo de fragmento		
			Extracto EtOH		Material vegetal			Extracto EtOH		Material vegetal			Fragmento	Fórmula	m/z
			Seco	Después de su destilación	Seco	Después de su destilación		Seco	Después de destilación	Seco	Después de destilación				
<b>Rutina</b>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	5,42	5,45	5,43	5,44	5,43	609,14501	609,14578 (1,3)	609,14665 (1,8)	609,14601 (1,6)	609,14590 (1,4)	30	[(M-H)- C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub> ]	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	301,03428
<b>Ácido rosmarínico</b>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	4,40	4,41	4,42	4,40	4,40	359,07614	359,07678 (1,8)	359,07672 (0,6)	359,07675 (1,6)	359,07675 (1,7)	10	[(M-H)- C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] [(M-H)- C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ]	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	197,04495 161,02359
<b>Luteolina</b>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	6,43	6,45	6,46	6,43	6,45	285,03936	285,04008 (2,5)	285,03993 (2,0)	285,03999 (2,2)	285,04001 (2,3)	30	[(M-H)- C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] [(M-H)- C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ]	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	241,05043 151,00256 133,02834
<b>Apigenina</b>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	6,80	6,81	6,81	6,80	6,80	269,04445	269,04523 (2,9)	269,04445 (2,4)	269,04445 (2,5)	269,04538 (2,4)	30	[(M-H)- CO <sub>2</sub> ] [(M-H)- C <sub>14</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ]	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> CH <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	225,05602 126,90494
<b>Ácido ursólico</b>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	9,57	9,55	9,55	9,59	9,56	455,35197	455,35263 (1,4)	455,35207 (0,2)	455,35231 (0,7)	455,35252 (1,2)	10	[(M-H)- C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> ]	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	355,32191

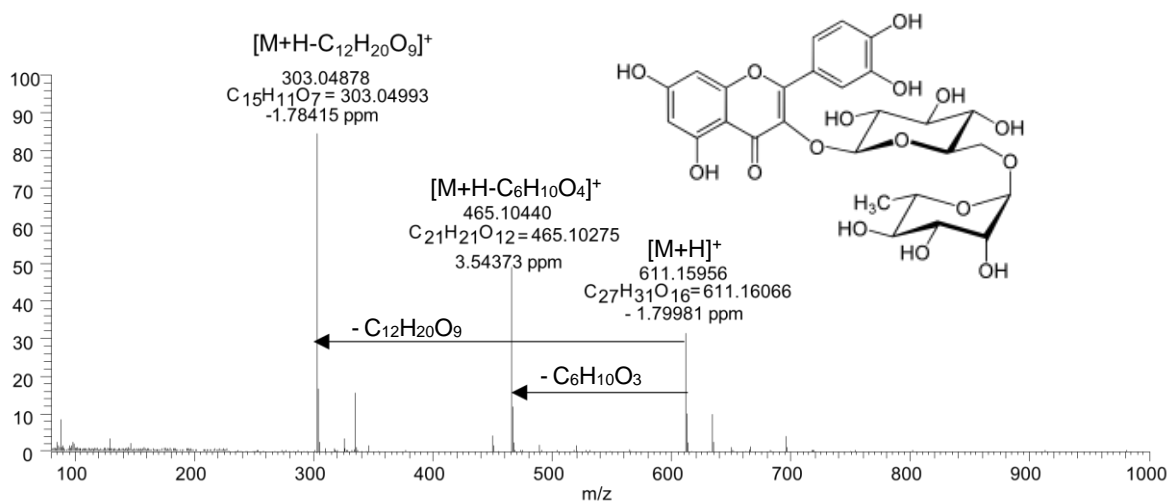
**Nota:** Elaboración propia.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.

La rutina, es un glucósido unido a una aglicona, de la familia de los flavonoles. En la Figura 19 se muestra la formación del ion quercetina a partir de la fragmentación de la molécula protonada  $[M+H]^+$  ( $m/z$  611.16066), por la ruptura del enlace glucosídico, formando el ion-producto  $[M+H-C_{12}H_{20}O_9]^+$  en  $m/z$  303.04878, señalado en el espectro de masas de la Figura 18.

**Figura 18.**

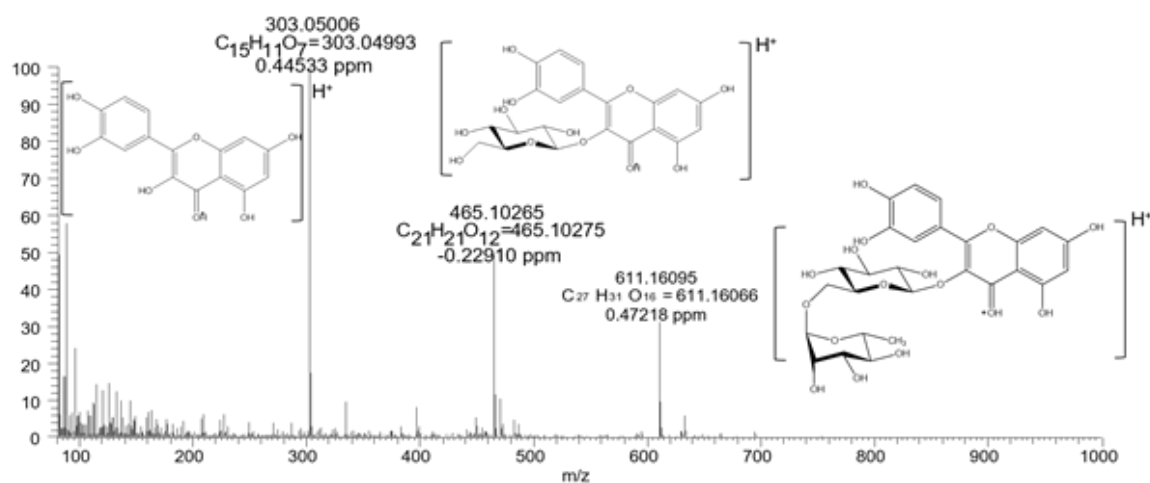
*Espectro de masas obtenidos por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 30 eV), de la rutina presente en los extractos de O. campechianum.*



**Nota:** Elaboración propia.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.**Figura 19.**

Espectro de masas obtenidos por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 30 eV), de la sustancia de referencia de la rutina.

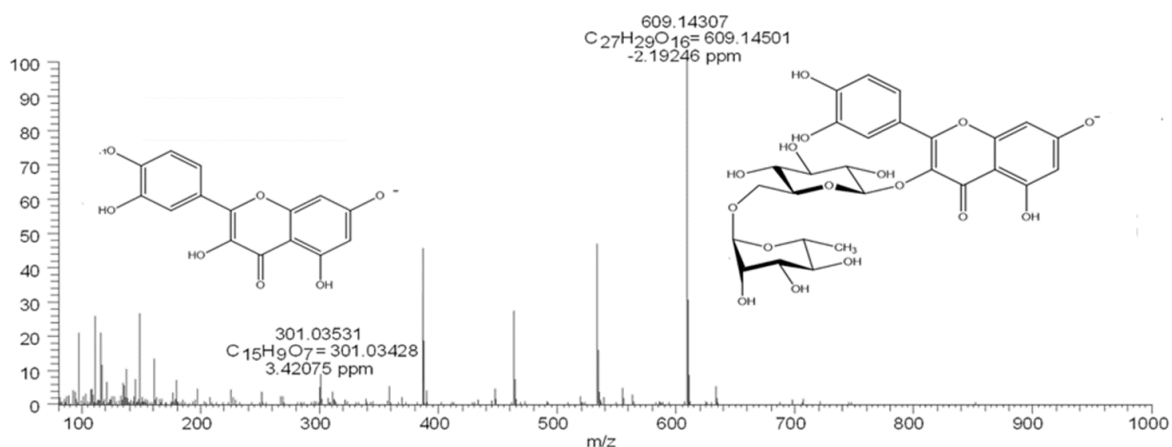


**Nota:** Elaboración propia.

Usando UHPLC-ESI/Orbitrap-MS, se confirmó la presencia de la rutina en los extractos de *O. campechianum*. El espectro de masas de la **Figura 20** evidencia la fragmentación de la molécula deprontada [M-H]<sup>-</sup> ( $m/z$  609.14501), dando lugar a la formación del ion  $m/z$  301.03428, producto de la pérdida de los azúcares unidos por al anillo C en la rutina. Estos resultados son acordes a los reportados por Du y col, 2021.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.**Figura 20.**

*Espectro de masas obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 30 eV), de la rutina presente en los extractos de O. campechianum.*



**Nota:** Elaboración propia.

La molécula de la rutina protonada fue reportada por Chen y col. (2020) en el análisis por UHPLC-MS/MS en modo de adquisición de iones positivos, cuando identificaron el ion  $m/z$  303 correspondiente a la formación de la quercetina a partir de la ruptura del enlace glucosídico en el anillo C de la rutina.

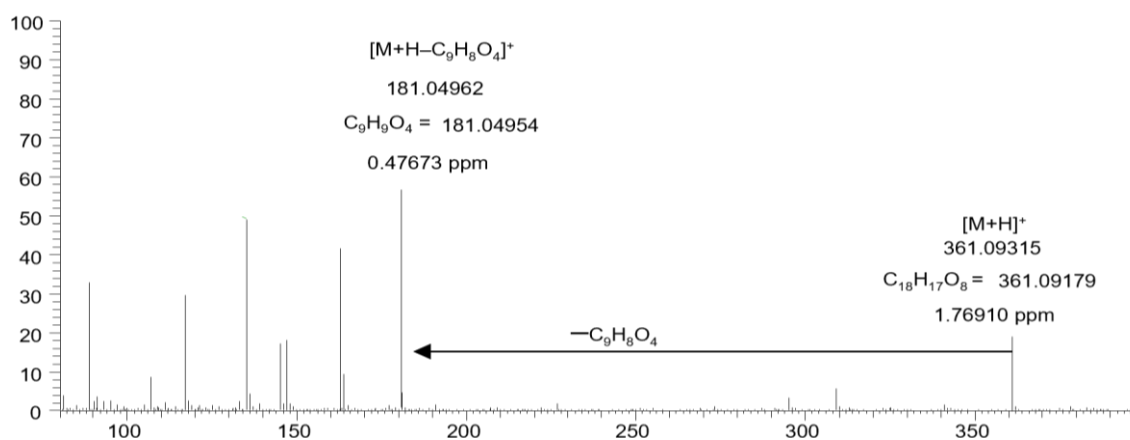
El ácido rosmarínico fue identificado en los extractos aislados con solvente y MSPD de partes aéreas de *O. campechianum*. Los resultados obtenidos en el análisis por LC/MS de la sustancia de referencia del ácido rosmarínico, permitió comparar y confirmar la presencia de esta molécula en los extractos de *O. campechianum*. En el análisis en modo de adquisición de iones positivos, la molécula protonada del ácido rosmarínico  $[M+H]^+$  ( $m/z$  361.09140), se disocia, formando el ion  $[M+H-C_9H_8O_4]^+$  en  $m/z$  181.04962, el cual se observa y en ambos espectros de masas tanto de la sustancia de referencia y como en las muestras de los extractos

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.*

(Véanse Figuras 21 y 22). La formación de este ion es producto de la ruptura del enlace  $\beta$  respecto al grupo carbonilo protonado.

**Figura 21.**

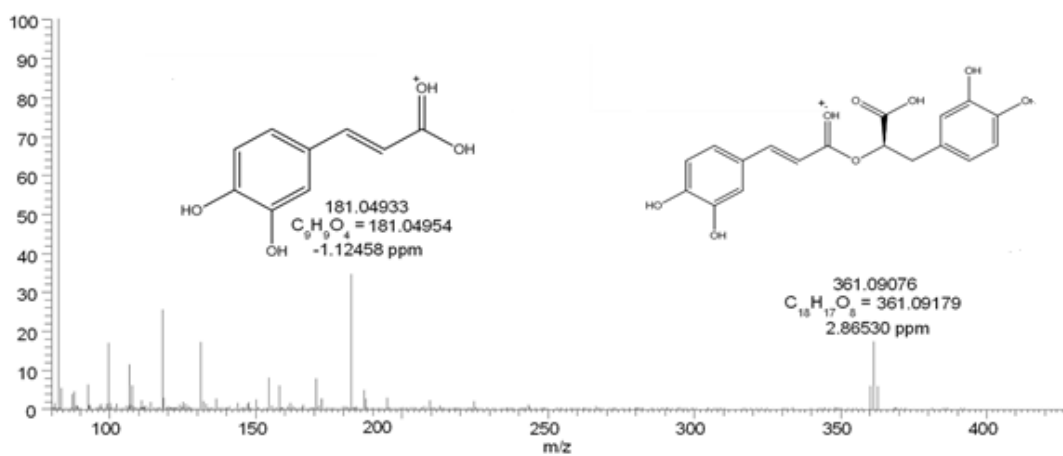
*Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 10 eV), del ácido rosmarínico presente en el extracto de O. campechianum.*



**Nota:** Elaboración propia.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.**Figura 22.**

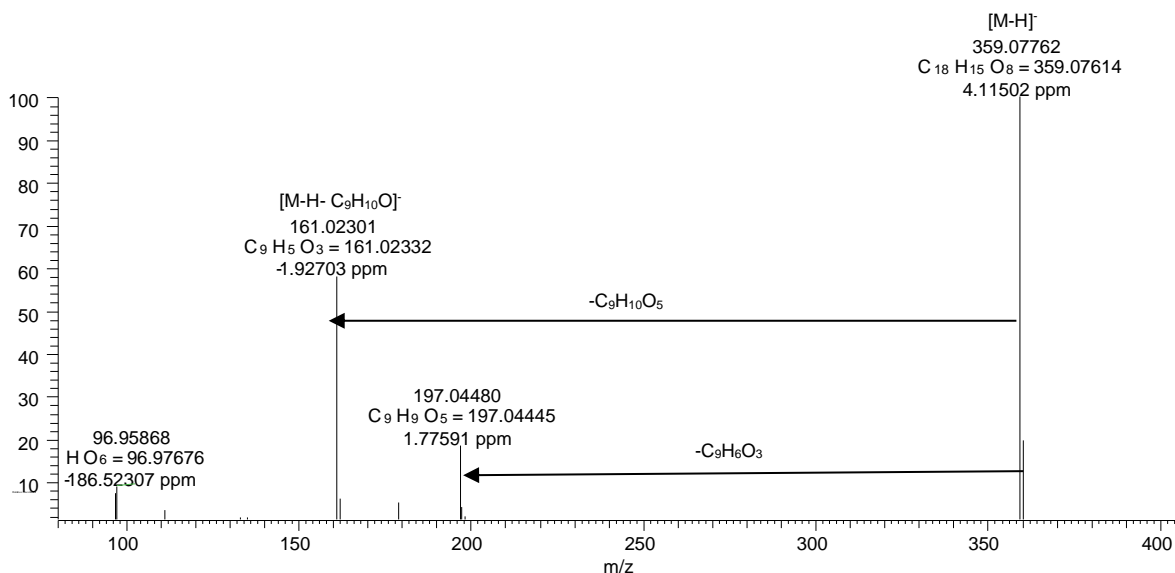
*Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 10 eV), de la sustancia patrón del ácido rosmarínico.*



**Nota:** Elaboración propia.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.**Figura 23.**

*Espectro de masas experimental obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 10 eV), del ácido rosmarínico en las muestras de extractos de O. campechianum.*



**Nota:** Elaboración propia.

De igual forma, se confirmó también la presencia del ácido rosmarínico en los extractos de *O. campechianum* por LC/MS en modo de adquisición de iones negativos. Los iones señalados en el espectro de masas de la **Figura 23**, corresponden a la molécula deprotonada  $[\text{M}-\text{H}]^-$  ( $m/z$  359.07762), que se fragmenta generando el ion  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}]^-$  en  $m/z$  161.02332.

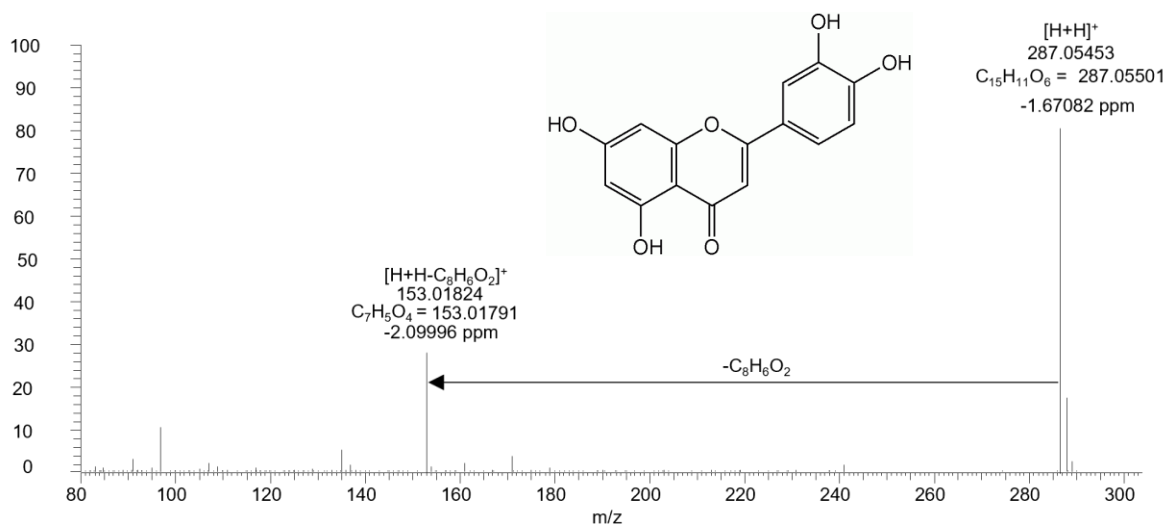
El ácido rosmarínico ha sido reportado en la literatura por Bandoniene y col. (2005), quienes identificaron su presencia usando HPLC-MS, operado en modo positivo, en los extractos acuosos de diferentes especies del género *Salvia*. Los autores reportan el ion producto característico  $[\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_4]^+$  ( $m/z$  181.04954), el cual también fue identificado en el presente estudio (Véase Figura 22), en los extractos obtenidos de *O. campechianum*.

## ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.

La luteolina y apigenina, por sus estructuras moleculares, hacen parte de la familia de moléculas derivadas de la flavona. En el trabajo de investigación de maestría en química realizado por Oliveros, Cristian A. (2020), se identificó el ion característico en  $m/z$  153.01859, producto de la fragmentación de  $[M+H-C_8H_6O]^+$ . Las rupturas del enlace C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> en el anillo C, el enlace C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> en  $[M+H-CO]^+$  y O-C<sub>2</sub> en  $[M+H-C_8H_6O]^+$ , genera la formación de este ion característico.

### Figura 24.

*Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 40 eV), de la luteolina en las muestras de extractos de O. campechianum.*



**Nota:** Elaboración propia.

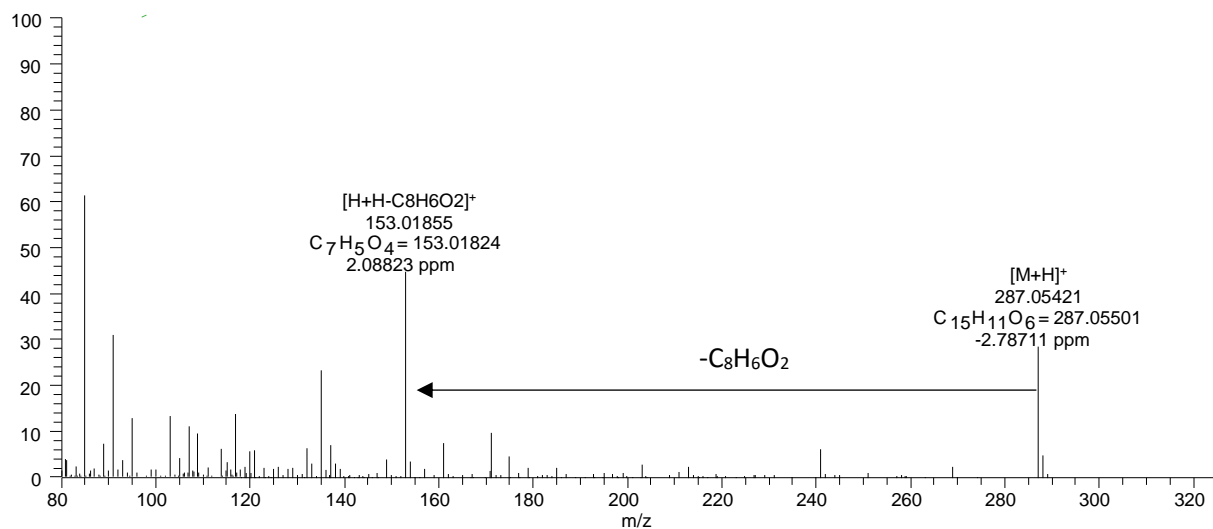
Los resultados obtenidos en el análisis por LC/MS permitieron identificar la luteolina y la apigenina en los extractos de *O. campechianum*. En las Figuras 24-30, se muestran sus espectros de masas, analizados en modo de adquisición de iones positivos y negativos. El

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.

ion-producto  $[M+H-C_8H_6O_2]^+$  ( $m/z$  153.01824), fue identificado en los espectros de masas de la luteolina y apigenina, respectivamente.

**Figura 25.**

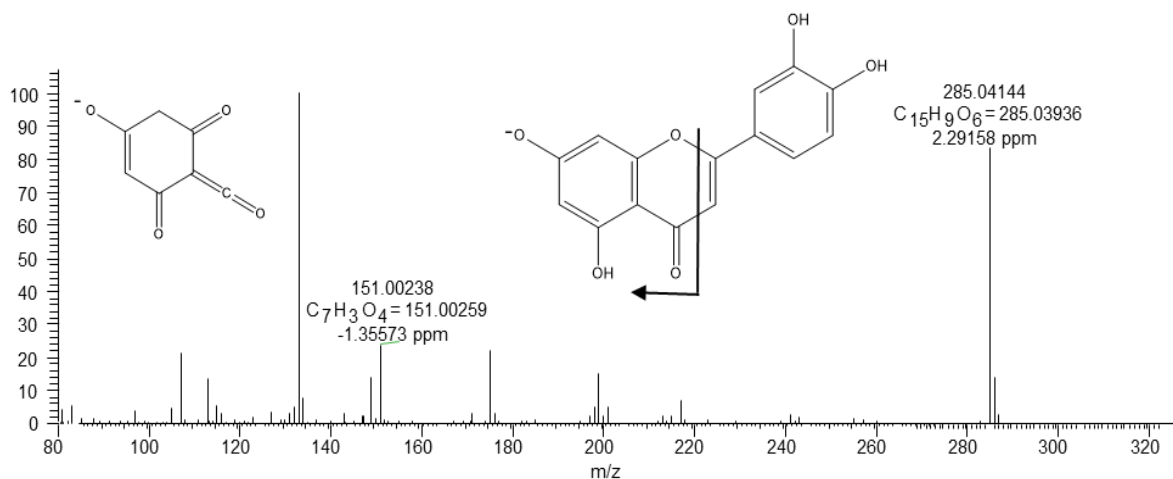
*Espectro de masas obtenido por ESI+/Orbitrap-MS, HCD de 40 eV de la sustancia de referencia de la luteolina.*



**Nota:** Elaboración propia.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.**Figura 26.**

*Espectro de masas experimental obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 30 eV), de la luteolina presente en los extractos de O. campechianum.*

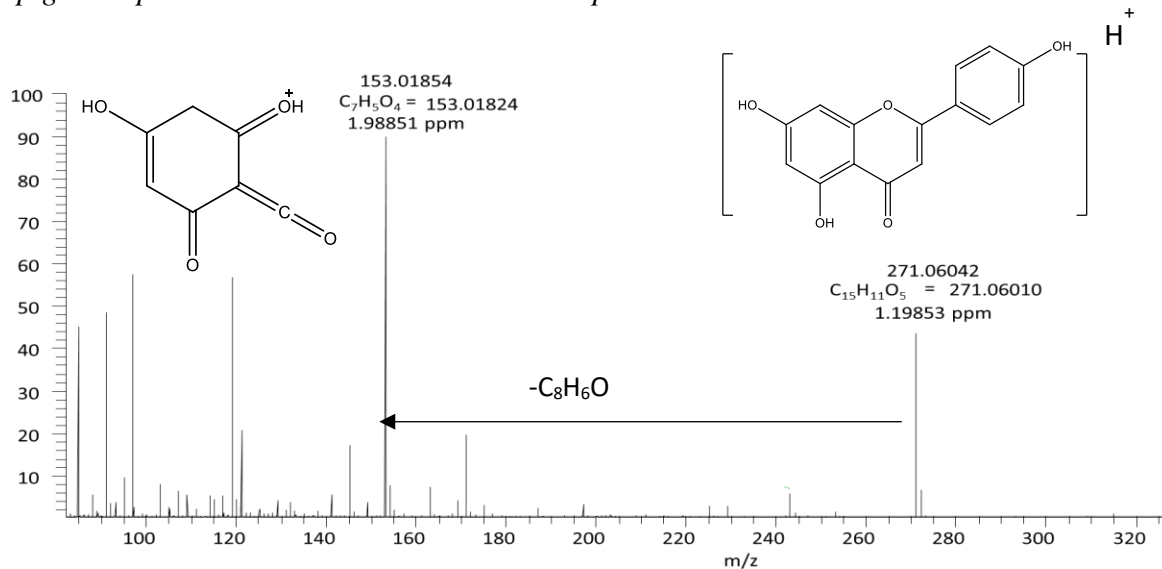


**Nota:** Elaboración propia.

Bajo los mismos parámetros operacionales cromatográficos, se analizaron las sustancias de referencia, la luteolina y la apigenina, y se obtuvieron sus espectros de masas mostrados en las Figuras 25 y 28, donde se señalan las fragmentaciones conducentes a la formación del ion-producto característico en ambos espectros de masas, lo que confirmó la presencia de luteolina y apigenina, en los extractos hidroetanólicos y MSPD de *O. campechianum*.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.**Figura 27.**

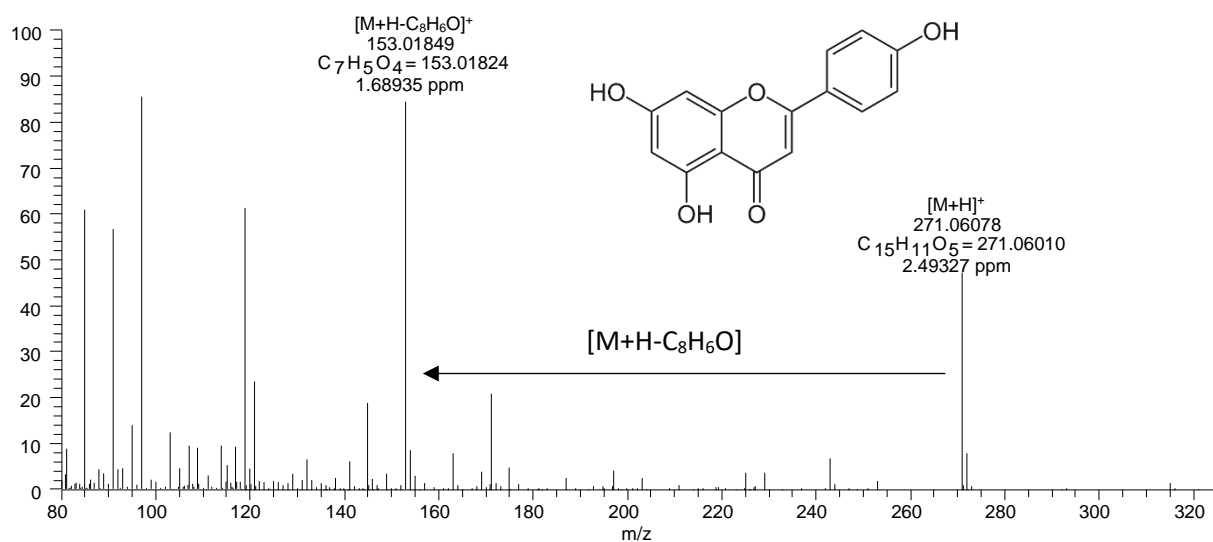
*Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 20 eV), de la apigenina presente en los extractos de O. campechianum.*



**Nota:** Elaboración propia.

**Figura 28.**

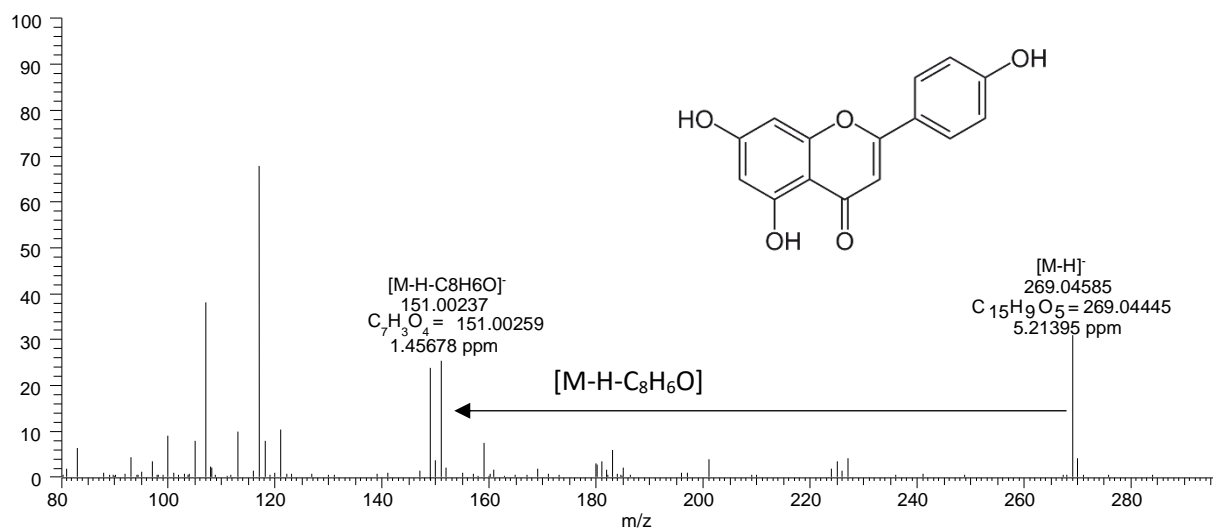
*Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 40 eV), de la sustancia de referencia de la apigenina.*



**Nota:** Elaboración propia.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.**Figura 29.**

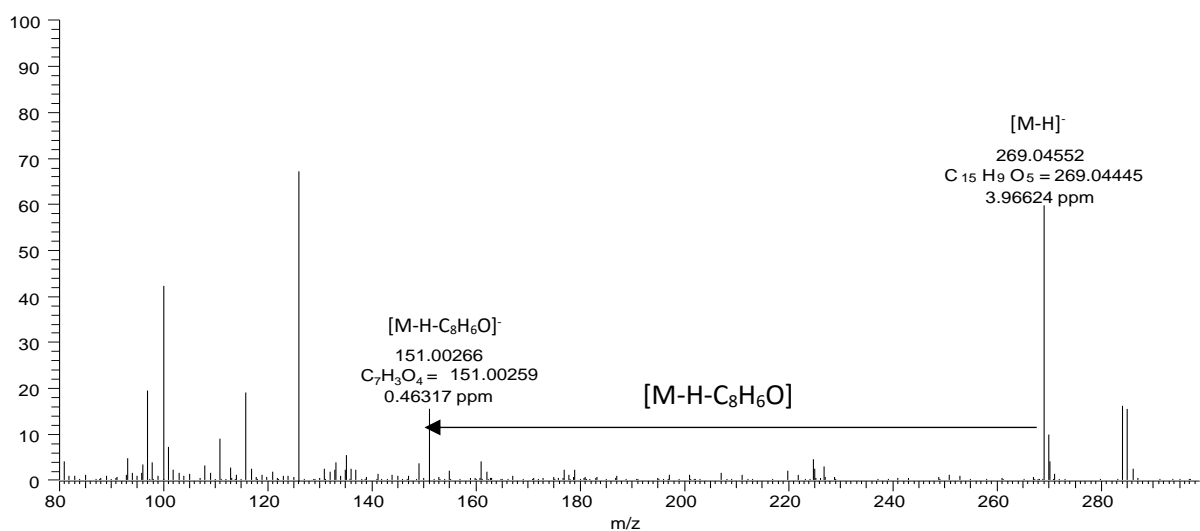
*Espectro de masas experimental obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 20 eV), de la sustancia de referencia de apigenina.*



**Nota:** Elaboración propia.

**Figura 30.**

*Espectro de masas experimental obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 20 eV), de la apigenina presente en los extractos de *O. campechianum*.*



**Nota:** Elaboración propia.

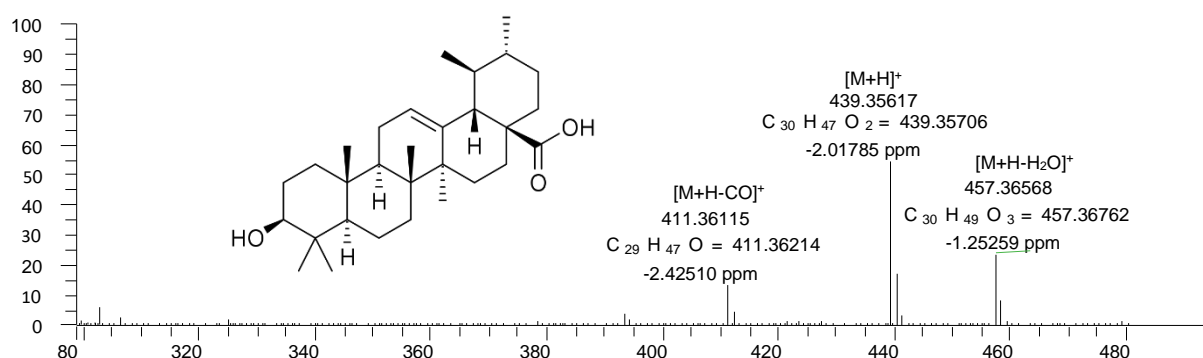
ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.

Para el caso del ácido ursólico, su identificación se realizó de forma tentativa, comparando los resultados obtenidos en el análisis de los extractos de *O. campechianum* por LC/MS, operado en modo de adquisición de iones positivos y negativos, con obtención de los espectros de masas que aparecen en las Figuras 31-34.

La molécula protonada del ácido ursólico  $[M+H]^+$  ( $m/z$  457.36762), se fragmentó en el espectrómetro de masas generando los iones en  $m/z$  439.35706 y en  $m/z$  411.36214, que se señalan la Figura 31.

**Figura 31.**

*Espectro de masas experimental obtenido por ESI+/Orbitrap-MS, HCD de 10 eV, del ácido ursólico presente en los extractos de O. campechianum.*

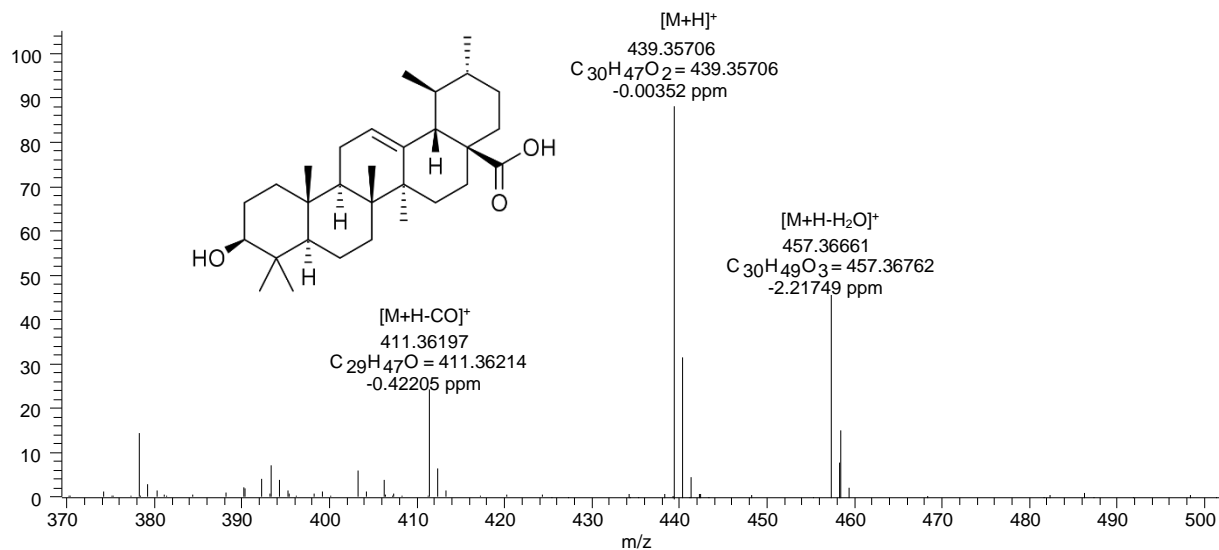


**Nota:** Elaboración propia.

Los resultados se compararon y validaron con los obtenidos por Chen, Q. y col. (2011), quienes, en el análisis de plantas chinas, reportaron la presencia del ácido ursólico por HPLC/MS, registrando los iones en  $m/z$  457.36762, 439.35706 y en  $m/z$  411.36214. Estos iones, producto de las fragmentaciones características de esta molécula, fueron identificados en los espectros de masas obtenidos del análisis de los extractos bajo estudio, por LC/MS en modo de adquisición de iones positivos.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.***Figura 32.**

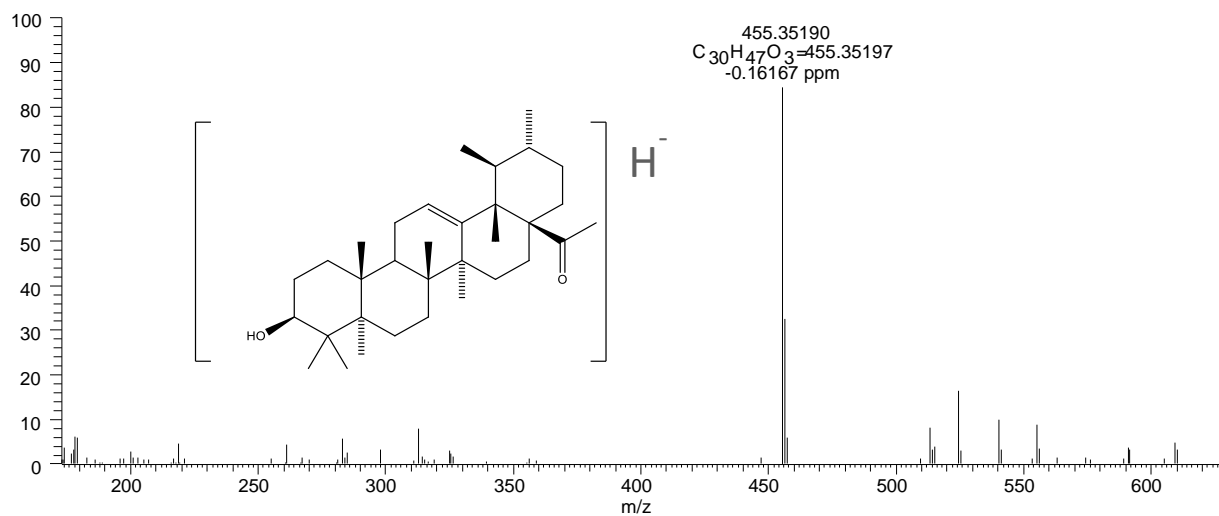
*Espectro de masas obtenido por ESI+/Orbitrap-MS (HCD de 10 eV), de la sustancia de referencia del ácido ursólico.*



**Nota:** Elaboración propia.

**Figura 33.**

*Espectro de masas experimental obtenido por ESI-/Orbitrap-MS (HCD de 30 eV), del ácido ursólico presente en los extractos de *O. campechianum*.*



**Nota:** Elaboración propia.

## ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.

La identificación del ácido ursólico se realizó por LC/MS en modo de adquisición de iones negativos, donde no se logró observar los iones productos característicos de la fragmentación de la molécula, lo que concuerda con lo reportado en la base de datos “*Human Metabolome Database*”, para la sustancia, identificada con el código HMDB0002395 (Wishart, DS. Y col. 2022), donde se señala el ion  $m/z$  455, el cual corresponde a la molécula deprotonada del ácido ursólico. Esto, permitió identificar tentativamente este metabolito secundario, triterpeno, en los extractos de *O. campechianum*.

El análisis de la sustancia de referencia del ácido ursólico permitió obtener los espectros de masas de las Figuras 33 y 34, donde se señalan los iones-producto característicos para las moléculas de ácido ursólico, protonada y deprotonada. Estos resultados permitieron la identificación confirmatoria del ácido ursólico presente en los extractos de *O. campechianum*.

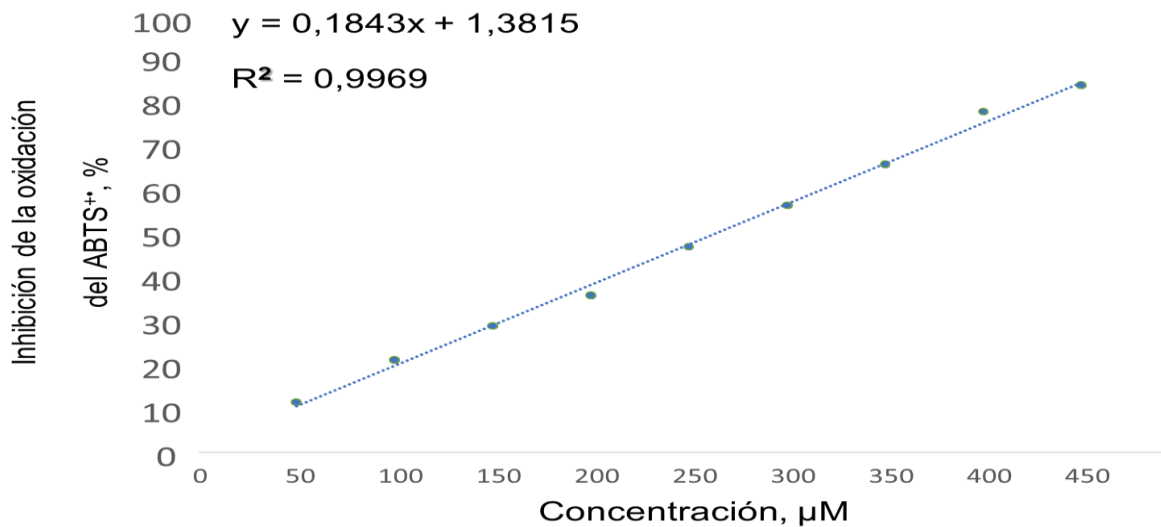
### **3.3. Actividad Antioxidante**

#### ***3.3.1. Determinación de la Actividad Antioxidante Mediante los Ensayos de Decoloración del Cation-radical ABTS<sup>•+</sup> y del $\beta$ -caroteno.***

En las Figuras 34 y 35, se presentan las curvas de calibración con Trolox<sup>®</sup>, usadas para la cuantificación de la actividad antioxidante medida por los métodos colorimétricos de descoloración del cation-radical ABTS<sup>•+</sup> y la del  $\beta$ -caroteno de los AE y extractos obtenidos de *O. campechianum*, junto con las sustancias de referencia, eugenol, ácido rosmarínico, BHT y  $\alpha$ -tocoferol. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 13, como equivalentes  $\mu\text{mol}$  de Trolox<sup>®</sup>/g de muestra.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.***Figura 34.**

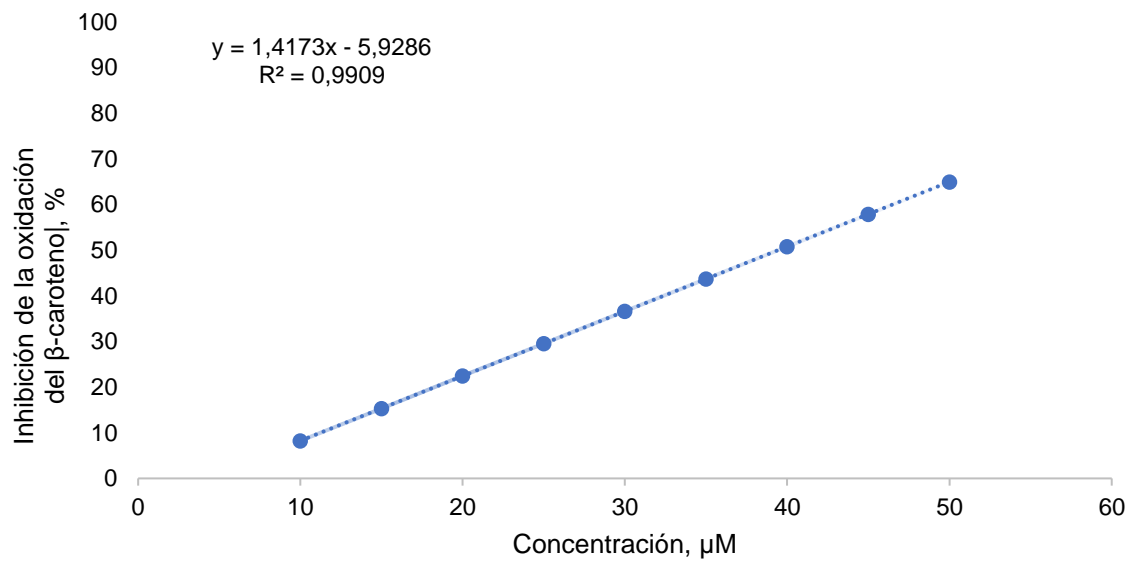
Curva de calibración usando Trolox® para cuantificar la actividad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup>•.



**Nota:** Elaboración propia.

**Figura 35.**

Curva de calibración usando Trolox® para medir la actividad antioxidante en el ensayo de decoloración del β-caroteno.



**Nota:** Elaboración propia.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.

De los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de los AE aislados de *O. campechianum*, se observó que la actividad más baja la tuvo el AE aislado de las hojas frescas, con un valor de  $230 \pm 8$   $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de muestra, en relación con los valores obtenidos para los demás AE aislados del material vegetal seco, fresco y de las flores frescas, cuya actividad antioxidante medida por este ensayo fue de  $456,3 \pm 0,25$ ,  $456,3 \pm 0,7$  y  $455,2 \pm 0,90$   $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de muestra, respectivamente.

Para el caso de los extractos aislados de material vegetal de *O. campechianum* seco y después de su destilación, la actividad antioxidante de los extractos MSPD fue de  $480 \pm 4$  y  $410 \pm 8$   $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de muestra, respectivamente, siendo más alta en comparación con la actividad obtenida para los extractos hidroetanólicos, a saber:  $280 \pm 6$   $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de muestra para los extractos obtenidos de material vegetal seco y de  $280 \pm 8$   $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de muestra para el extracto aislado del material vegetal, después de su destilación.

**Tabla 16.**

*Actividad antioxidante media por los ensayos de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup>• y del  $\beta$ -caroteno para aceites esenciales y extractos aislados de *O. campechianum*.*

Muestra	Material vegetal	Decoloración del catión radical ABTS <sup>+</sup>		Decoloración del $\beta$ -caroteno	
		Inhibición, %	$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra	Inhibición, %	$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra
Aceite esencial	Seco	$85,4 \pm 0,21$	$456,3 \pm 0,25$	$85 \pm 1,1$	$40,1 \pm 0,45$
	Fresco	$85,4 \pm 0,23$	$456,3 \pm 0,7$	$85,8 \pm 0,91$	$40,5 \pm 0,38$
	Flores frescas	$85,3 \pm 0,75$	$455,2 \pm 0,90$	$85,8 \pm 0,61$	$40,5 \pm 0,26$
	Hojas frescas	$40 \pm 4$	$234 \pm 9$	$77,5 \pm 0,63$	$37,0 \pm 0,26$
Extractos hidroetanólicos	Seco	$53 \pm 3,1$	$284 \pm 5,9$	$53 \pm 3,3$	$27 \pm 1,4$
	Después de destilación	$52 \pm 4,1$	$277 \pm 8,0$	$60 \pm 2,7$	$29 \pm 1,1$

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.*

Extractos MSPD	Seco	88±3,7	475±4,2	59±3,8	29±1,6
	Después de destilación	76±6,6	406±8,8	76±5,7	36±2,4

**Nota:** Elaboración propia.

En la evaluación de la actividad antioxidante de los AE destilados de *O. campechianum*, mediante el ensayo de la decoloración del  $\beta$ -caroteno, se observó que los AE aislados del material vegetal seco, fresco y de las flores frescas, tuvieron valores cercanos a 40  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g de muestra, que resultaron ser más altos que los obtenidos para el AE aislado de las hojas frescas (37,0±0,26  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g de muestra).

En la evaluación de la actividad antioxidante que se realizó para los extractos hidroetanólicos y MSPD mediante el ensayo de la decoloración del  $\beta$ -caroteno, se observó que el extracto MSPD aislado de material, después de su destilación, resulto ser con actividad antioxidante más alta, con un valor de 36±2,4  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g de muestra, en comparación con los valores de los extractos analizados (26-30  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g de muestra) para este ensayo colorimétrico.

**Tabla 17.**

*Actividad antioxidante media por los ensayos de decoloración del catión-radical ABTS+• y de  $\beta$ -caroteno para las sustancias de referencia eugenol y ácido rosmarínico (componentes mayoritarios en los AE y extractos, respectivamente), y para el BHT y  $\alpha$ -to*

Sustancia de referencia	$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g de muestra	$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g de muestra
Eugenol	428±3,3	40,4±0,23
Ácido rosmarínico	448,2±0,38	41±1,3
BHT	4990±55	390±2
$\alpha$ -Tocoferol	2320±36	410±1

**Nota:** Elaboración propia.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.*

La actividad antioxidante, medida por los dos ensayos colorimétricos, de las sustancias de referencia, mostraron que posiblemente el eugenol y el ácido rosmarínico, metabolitos secundarios presentes en los AE y extractos asilados de *O. campechianum*, son responsables de la actividad antioxidante encontrada en el presente estudio, ya que los valores obtenidos para la actividad antioxidante de estas sustancias de referencia son muy cercanos a los datos obtenidos para los AE y extractos, por ambos métodos usados. Sin embargo, la actividad antioxidante medida para todas las muestras fue menor que la de las sustancias de referencia, BHT y  $\alpha$ -tocoferol (Véase Tabla 14).

### 3. Conclusiones

La especie vegetal “albahaca de clavo”, cultivada en Santander, Colombia, identificada por el herbario UIS (Váucher N° 20889), como *Ocimum campechianum*, fue motivo de estudio del presente proyecto de grado, ya que, sus usos tradicionales y la poca literatura reportada en torno a su composición química y actividad biológica, la convierten en una especie vegetal de interés, de carácter promisorio.

Usando de técnicas destilativas como hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) y técnicas extractivas como dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y extracción con solvente (etanol 70%), se lograron aislar los aceites esenciales y extractos vegetales de diferentes partes aéreas de *Ocimum campechianum*.

En términos de producción de aceites esencial y extractos vegetales de esta especie vegetal, el presente estudio permitió concluir que, la mayor cantidad de AE, se logró obtener de las hojas frescas de la planta, mientras que, la mayor cantidad de extracto vegetal se aisló por MSPD, usando material vegetal seco.

El análisis químico por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permitió la identificación de 38 compuestos presentes en el aceite esencial destilado de *O. campechianum*. Los aceites esenciales contienen hidrocarburos sesquiterpénicos, monoterpenos oxigenados y otros compuestos oxigenados. La especie vegetal de *O. campechianum* cultivada y estudiada, corresponde al quimiotipo eugenol, por su alto contenido en el AE.

Por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y a un detector de arreglo de diodos, se lograron identificar algunos flavonoides y ácidos fenólicos presentes en los

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.*

extractos aislados de *O. campechianum*. En todos los extractos, hubo presencia de flavonas, la apigenina y la luteolina, un flavonol, correspondiente a la rutina, y dos ácidos, el ácido rosmarínico, de carácter fenólico, y el ácido ursólico, de naturaleza triterpéno. Además del trabajo realizado y publicado por Tachinni y col. 2021, quienes identificaron el eugenol y el ácido rosmarínico en los extractos de *Ocimum campechianum*, no se han publicado más estudios donde se reporte la presencia de los demás metabolitos secundarios identificados en los extractos de esta especie vegetal.

Finalmente, los valores de la evaluación de la actividad antioxidante, mediante los métodos colorimétricos usados en esta investigación, muestran que a pesar de ser inferiores en relación con los valores para el BHT y el  $\alpha$ -tocoferol, los resultados obtenidos en el presente estudio de la especie vegetal *Ocimum campechianum*, sean un importante aporte científico para el cumplimiento del proyecto bio-reto XXI 15:50, mediante la divulgación de los resultados con la publicación de un artículo científico.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.***Referencias Bibliográficas**

- Ahuja, S. (2003). Chromatography and separation science. *Academic Press*. Calabash, North Carolina, Estados Unidos. 4, 142.
- Arias, V., A. J., Ramírez Pérez, E., Stashenko, E., Martínez, J. R. (2012). Obtención de extractos con CO<sub>2</sub> supercrítico a escala piloto de las especies *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava* (Tesis de Grado). Escuela de Ingeniería Química. Universidad industrial de Santander. Bucaramanga, Santander, Colombia.
- Arias, G., Stashenko, E., Martínez, J. R. (2012). Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citrodora*, cultivadas en el municipio de Sucre (Santander) (Trabajo de investigación de Maestría). Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia.
- Arias, J., Mejía, J., Córdoba, Y., Martínez, J. R., Stashenko, E., & del Valle, J. M. (2020). Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO<sub>2</sub> after steam distillation. *Industrial Crops & Products*. 146, 1-9.
- Barker, Steven A. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) (2006). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 70, 151-162.
- Bandoni, A., Mendiondo, M., Rondinar R., Coussio, J. (1976). Survey of Argentine medicinal plants. *Journal of Natural Products*. 976 (30), 169-181.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.*

- Bandoniene, Donata., Murkovix, Michael., Veskutonis, Petras R. (2005) Determination of Rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. *Journal of Chromatographic Science*. 43(7), 372-376.
- Bhagya, N., & Chandrashekar, K. R. (2020). Identification and quantification of cytotoxic phenolic acids and flavonoids in *Ixora brachiata* by UPLC-DAD and UPLC-ESI-MS. *International Journal of Mass Spectrometry*. 450, 1-20.
- Bisby, R. H., Brooke, R., & Navaratnam, S. (2008). Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry*. 108, 1002-1007.
- Borrás Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arraéz-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*. 69, 385-394.
- Brand Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 28, 25-30.
- Buchbauer, G. (2000). The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties. *Environmental Science*. 25, 64-67.
- Caamal Herrera, I. O., Carrillo Cocom, L. M., Escalante Réndiz, D. Y., Aráiz Hernández, D., & Azamar Barrios, J. A. (2018). Antimicrobial and antiproliferative activity of essential oil, aqueous and ethanolic extracts of *O. micranthum* leaves. *Journal of Complementary and Alternative Medicine*. 18 (55), 1-9.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.*

- Caamal Herrera, I. O., Muñoz Rodríguez, D., Madera Santana, T., & Azamar Barrios, J. A. (2016). Identification of volatile compounds in essential oil and extracts of *O. micranthum* Wild leaves using GC-MS. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. 9, 31-40.
- Cáceres, A., Lange, K., Cruz, S., Velásquez, R., Lima, S., Menéndez, M., Gonzáles, J. (2012). Assessment of antioxidant activity of 24 native plants used in Guatemala for their potential application in natural product industry. *Acta Horticulturae*. 964, 85-92.
- Cañigüeral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. L. (2003). Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Latin American Journal of Pharmacy*. 22(3), 267-278.
- Cavar Zeljkovic, Sanja, Karolina Komzakova, Jana Siskova, Erna Karalija, Katerina Smekalova, Petr tarkowski. (2020). Phytochemical variability of selected basil genotypes. *Industrial Crops & Products*. 157, 1-10.
- Chen, Q., Zhang, Y., Zhang, W., & Chen, Z. (2011). Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 25(12), 1381–1388.
- Chen, X., Wei, L., Pu, X., Wang, Y., & Xu, Y. (2020). Pharmacokinetics, tissue distribution study of fifteen ingredients of *Polygonum chinese* Linn extract in rats by UHPLC-MS/MS. *Biomedical Chromatography*, 3.
- Colmeiro, M. (1871). Diccionario de los diversos nombres vulgares de muchas plantas usuales o notables el antiguo y Nuevo Mundo.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.*

[www.biodiversitylibrary.org/item/76796#page/17/mode/1up](http://www.biodiversitylibrary.org/item/76796#page/17/mode/1up). Fecha de consulta: 15 enero de 2022.

Córdoba, Y., Stashenko, E., Martínez, J. R., (2014). Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos y aceites esenciales de seis especies de *Lippia* spp. (Familia Verbenácea), por diferentes métodos (ABTS<sup>+</sup>, ORAC y monitoreo de peroxidación lipídica). (Trabajo de investigación de Maestría). Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia.

de Albuquerque, U. P., (1999). Three new varieties in *Ocimum* L. (Lamiaceae). *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. 42(1), 1-7.

Du, Yan., Li, Xingyan., Xiong, Xiaolin., Cai, Xinyu., Ren, Xueyan., Kong, Qingjun. An investigation on polyphenol composition and content in skin of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Hutai No.8) fruit during ripening by UHPLC-MS2 technology combined with multivariate statistical analysis. *Food Bioscience*. 43, 6.

Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function, and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*. 198, 16-32.

Figueiredo B., P. L., Silva, S., Nascimento, L. D., Ramos, A. R., Setzer, W. N., da Silva, J., & Andrade A., E. H. (2018). Seasonal study of methyl eugenol chemotype of *O. campechianum* essential oil and its fungicidal and antioxidant activities. *Natural Product Communications*. 13, 1055-1058.

Girme, A., Bhoj, P., Saste, G., Pawar, S., Mirgal, A., Raut, D., Hingorani, L. (2021). Development and Validation of RP-HPLC Method for Vicenin-2, Orientin, Cynaroside,

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.

- Betulinic Acid, Genistein, and Major 8 Bioactive Constituents with LC-ESI-MS/MS profiling in *Ocimum* genus. *Journal of AOAC International*. 104(6), 1634-1651.
- Grayer, Réne J., Kite, Geoffrey C., Aboud-Zaid, Mamdouh, Archer, Luoise J. (2000). The application of atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography mass spectrometry in the chemotaxonomic study of flavonoids: Characterization of flavonoids from *Ocimum gratissimum* var. *gratissimum*. *Phytochemical Analysis*. 11, 257-267.
- Golmakani, M.-T., & Rezaei, K. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*. 109, 925-930.
- Halliewell, B. (1995). Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochemistry Pharmacology*. 49(10),1341-1348.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1841-1856.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 1815-821.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological system: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for the quantification. *Toxicology Pathology Journal*. 30(6), 620-650.
- Leal, P. F., M. Chaves, F., Ming, L. C., Petenate, A. J., & A. Meireles, M. (2006). Global yields, chemical compositions, and antioxidant activities of clove basil (*Ocimum gratissimum*

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.*

- L.) extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Process Engineering*. 29, 547-559.
- Mejía, Jessica J. Caracterización química y evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) (Proyecto de Grado). Escuela de Química. Universidad industrial de Santander. Bucaramanga, Santander, Colombia.
- Makarov, A. (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*. 72, 1156-1162.
- Méndez González, M., Torres Avilez, W., Dorantes Euán, A., & Durán García, R. (2014). Jardines medicinales en Yucatán: Una alternativa para la conservación de la flora medicinal de los mayas. *Revista Fitotécnica Mexicana*. 17, 97-106.
- Merken, H. M., & Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(3), 577-599.
- Mikami, I., Yamaguchi, M., Shinmoto, H., & Tsushida, T. (2009). Development and validation of microplate-based  $\beta$ -carotene bleaching assay and comparison of antioxidant activity (AOA) in several crops measured by  $\beta$ -carotene bleaching, DPPH and ORAC assays. *Food Science and Technology Research*. 15(2), 171-178.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 84, 407-412.
- Miller, P. (1768). The Gardeners Dictionary: 8th ed. N° 5. *Biodiversity Heritage Library*. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/395278> Fecha de consulta: 10 enero de 2021.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.*

Ministerio de Educación Nacional. (s.f.). Alianza 1: Bio-Reto XXI 15-50. Obtenido de [https://www.mineducacion.gov.co/1759/articles-363271\\_recurso\\_4.pdf](https://www.mineducacion.gov.co/1759/articles-363271_recurso_4.pdf). Fecha de consulta: abril 17 de 2020.

Miranda Brand, Y., Roa Linares, V., Betancur Galvis, L. A., Durán García, D. C., & Stashenko, E. (2015). Antiviral activity of Colombian Labiatae and Verbenaceae family essential oil and monoterpenes on human herpes viruses. *Journal of Essential Oil Research*. 28(2), 130-137.

Mora Martínez, A., & Stashenko, E. E. (1997). Composición química del aceite de *Cymbopogon citraus* en función del método de extracción, época de cosecha y tiempo de sacado de la planta (Trabajo de Investigación de Maestría). Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Santander, Colombia.

Novakova, L., Svoboda, P., & Pavlik, J. (2017). Ultra-high performance liquid chromatography. *Liquid Chromatography*. 29, 719-769.

Oliveros, Cristian Andrés., Stashenko, EE. (2020). Estudio por técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas de los metabolitos secundarios de *Pogostemon cablin* Beth (Fam. Lamiaceae) en función de diferentes métodos de extracción (Trabajo de Investigación de Maestría). Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Santander, Colombia.

O'Leary, N. (2017). Taxonomic revision of *Ocimum* (Lamiaceae) in Argentina. *Journal of the Botanical Society*. 144, 74-87.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.

- Pan, J., Xia, X.-X., & Liang, J. (2008). Analysis of pesticides multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15, 25-32.
- Pereira, D., Pinheiro, R. S., Heldt, L. S., Moura, C., Bianchin, M., Almeida, J. d., Carpes, S. T. (2017). Rosemary as natural antioxidant to prevent oxidation in chicken burgers. *Food Science and Technology*. 37(1), 17-23.
- Pino Benitez, N., Meléndez León, E. M., & Stashenko, E. E. (2009). Eugenol and methyl eugenol chemotypes of essential oil of species *O. gratissimum* L. and *O. campechianum* Mill from Colombia. *Journal of Chromatographic Science*. 47, 800-803.
- Pino, J. A., García, J., & Martínez, M. A. (1998). A comparison between the oil, solvent extract and supercritical carbon dioxide extract of *O. gratissimum* L. *Journal of Essential Oil Research*. 10, 575-577.
- Prabhu, K., Lobo, R., Shirwaikar, A., & Shirwaikar, A. (2009). *O. gratissimum*: A review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. *The Open Complementary Medicine Journal*. 1, 1-15.
- Pyo, D., Yoo, J., & Surh, J. (2009). Comparison of supercritical fluid extraction and solvent extraction of isoflavones from soybeans. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 37, 923-932.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improve ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231-1237.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.

- Ruíz Vargas, J. A., Morales Ferra, D. L., Ramírez Ávila, G., Zamilpa, A., Negrete León, E., Acevedo Fernández, J. J., & Peña Rodríguez, L. M. (2019).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity and *in vivo* antihyperglycemic effect of secondary metabolites from the leaf infusion of *O. campechianum* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*. 243, 1-7.
- Sacchetti, G., Medici, A., Maietti, S., Radice, M., Muzzoli, M., Manfredini, S., Bruni, R. (2004). Composition and functional properties of the essential oil of *Amazonian* basil, *O. micranthum* Wild, Labiatae in comparison with commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 3486-3491.
- Salles Trevisan, M., Vasconcelos Silva, M., Pfundstein, B., Spiegelhalder, B., & Wyn Owen, R. (2006). Characterization of volatile pattern and antioxidant capacity of essential oil from different species of the genus *Ocimum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 4378-4382.
- Sarwat, M., Srivastava, S., & Naved, T. (2016). Diversity analysis in *Ocimum* species: Why and How? *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 8, 252-262.
- Seeley, J. V., & Seeley, S. K. (2012). Multidimensional gas chromatography: Fundamental advances and new applications. *Analytical Chemistry*. 85, 558-575.
- Sell, C. (2003). A fragrant introduction to terpenoid chemistry. *The Royal Society of Chemistry, Cambridge*. Ashford, Kent, Inglaterra. 1-17.
- Stashenko, E. (2009). Aceites esenciales. División de publicaciones. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.*

- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2009). Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación. *Scientia Chromatographica*. 1, 19-36.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. (2010). GC y GC-MS: Configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica*. 2, 33-59.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2011). Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*. 3, 25-49.
- Stashenko, E. E., Acosta, R., & Martínez, J. R. (2000). High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by supercritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens L.*). *Biochemical and Biophysical Methods*. 43, 379-390.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* Mill, N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*. 1025, 93-103.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. A., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*. 33, 93-103.
- Stashenko, E. E., Puertas, M. A., & Combariza, M. Y. (1996). Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*. 752, 223-232.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.

Suarez Torrenegra, S., Stashenko, E. (2017). Estudio de metabolitos secundarios de *Plectranthus amboinicus* aislados por diferentes métodos de extracción y evaluación de su capacidad antioxidante (Trabajo de Grado). Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Santander, Colombia.

Tachinni, M., Echeverria, M., Grandini, A., Maresca, I., Radice, M., Angiolella, L., Guerrini, A. (2021). *O. campechianum* Mill. from Amazonian Ecuador: Chemical composition and biological activities of extracts and their main constituents (Eugenol and Rosmarinic acid). *Molecules*. 26, 84.

Trópicos.org. (s.f.). Recuperado el 16 de 04 de 2020, de Jardín Botánico de Missouri.

<http://www.tropicos.org>

Vermeris, W., & Nicholson, R. (2008). Phenolic compounds biochemistry. Ed. *Springer*. New York, EE. UU.

von Willdenow, C. (1809). Enumeratio plantarum horti regii botanici berolinensis. Berolini. *Taberna Libraria Scholar Realis*. <https://bibdigital.rjb.csic.es/records/item/10963-enumeratio-plantarum-horti-regii-berolinensis>. Fecha de consulta: 24 abril de 2021.

Waksmundzka-Hajnos, M., & Sherma, J. (2010). High performance liquid chromatography in Phytochemical analysis. *Chromatographic Science Series. Academic Press*. Florida, EE. UU.

Wishart DS, Guo AC, Oler E, *et al.*, HMDB 5.0: La base de datos del metaboloma humano para 2022. *Nucleic Acids Research*. Enero 7 de 2022; 50 (D1): HMDB0002395.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 105, 940-949.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.*

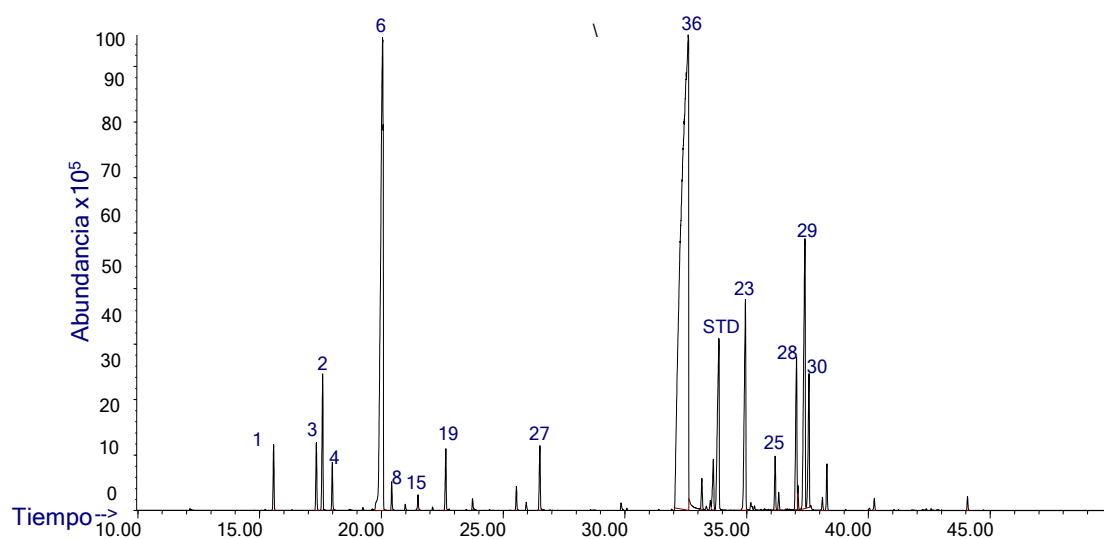
- Xiao, H.B., Krucker, Albert, Liang, X.M. (2004). Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 1032, 117-124.
- Yamauchi, R., Miyake, N., Inoue, H., & Kato, K. (1993). Products formed by peroxy radical oxidation of  $\beta$ -carotene. *Journal Agricultura and Food Chemistry*. 41, 708-713.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.

## Apéndices

## Figura A 1.

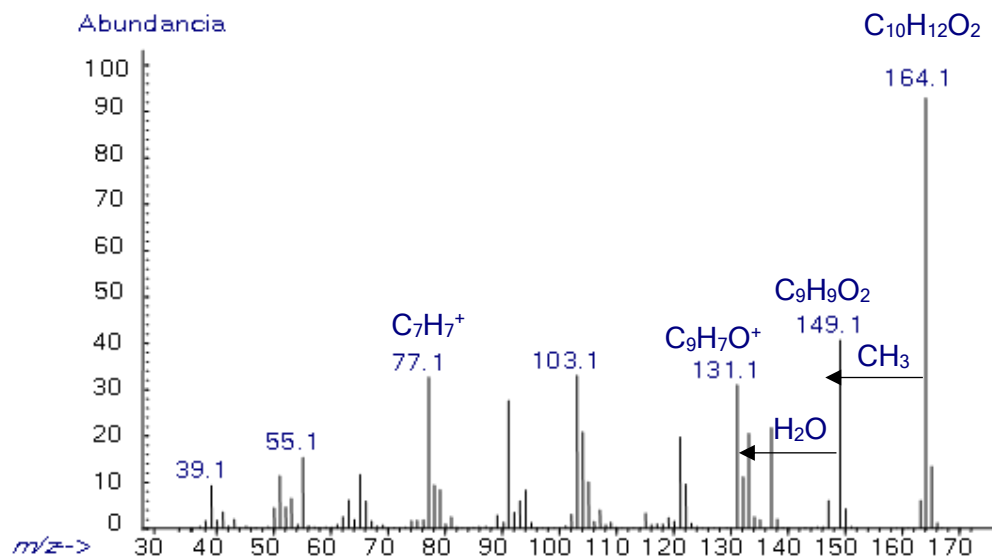
Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS del aceite esencial de partes aéreas secas de *O. campechianum*. Columna DB-5MS (60 m). Inyección split (1:30). Identificación de los picos (Tabla 8).



**Nota:** Elaboración propia.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM* M.**Figura A 2.**

*Espectro de masas obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) del eugenol presente en el aceite esencial de O. campechianum.*

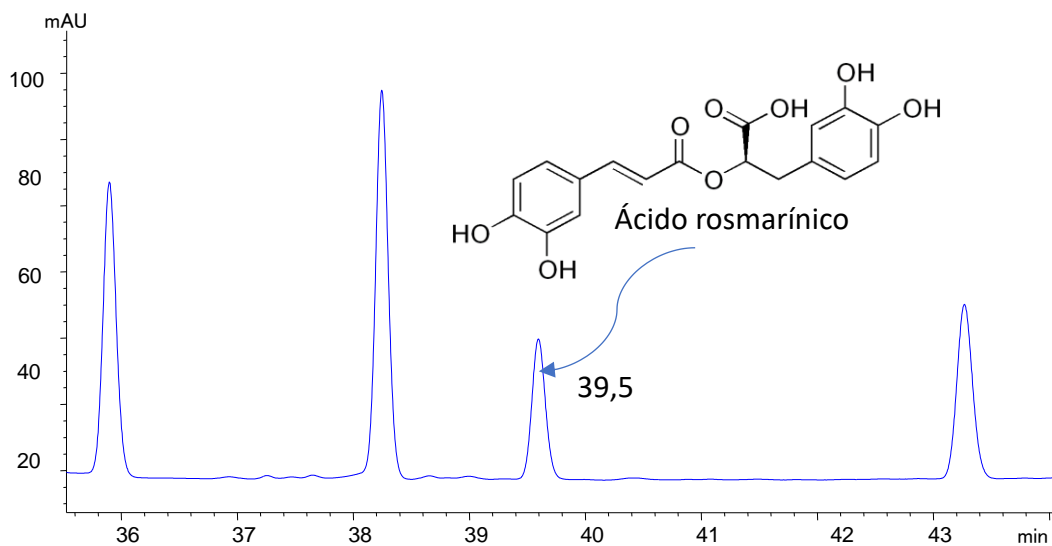


**Nota:** Elaboración propia.

**Figura A 3.**

*Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD de mezcla de sustancias de referencia.*

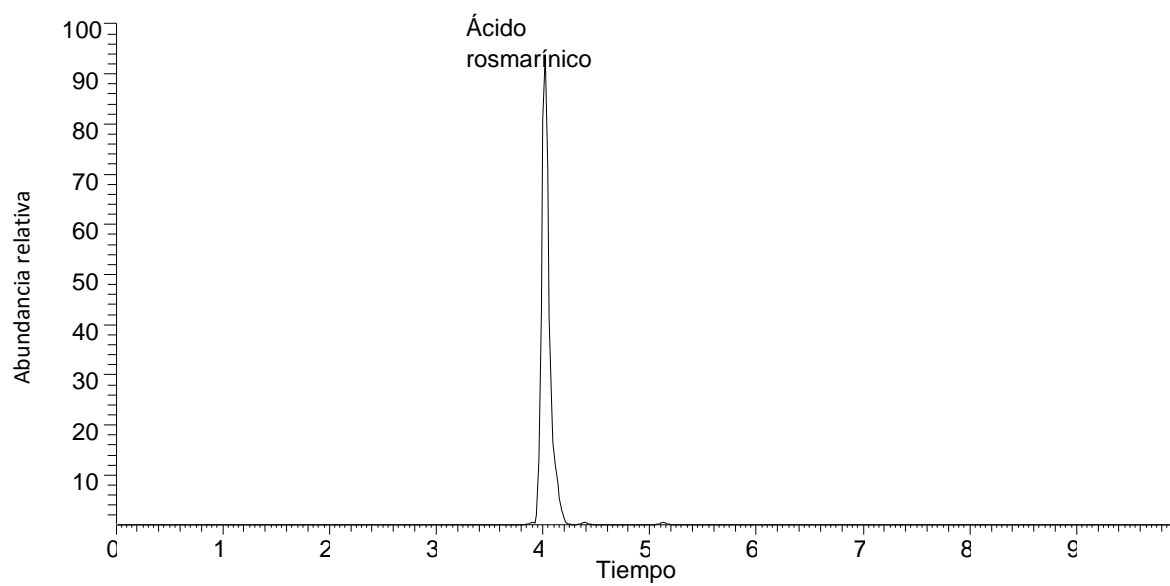
*Pico cromatográfico en 39,5 min corresponde al ácido rosmarínico.*



**Nota:** Elaboración propia.

ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL *OCIMUM CAMPECHIANUM M.***Figura A 4.**

*Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por UHPLC-ESI+/Orbitrap-MS de la sustancia de referencia (ácido rosmarínico) presente en los extractos de O. campechianum.*



**Nota:** Elaboración propia.