

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL PRESENTE EN LAS  
HOJAS DE ALTAMISA (*Ambrosia arborescens* Miller) POR CROMATOGRFÍA  
DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y  
DETERMINACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

EDGARDO ANDRES BENAVIDES PANTOJA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2011

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL PRESENTE EN LAS  
HOJAS DE ALTAMISA (*Ambrosia arborescens* Miller) POR CROMATOGRFÍA  
DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y  
DETERMINACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

EDGARDO ANDRES BENAVIDES PANTOJA

Trabajo presentado como requisito para optar al título de Químico

Director

NELSON H. HURTADO  
Ph.D. en Ciencias Químicas

Codirector

JUAN PABLO JIMENEZ  
Químico

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2011

Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”.

Art.1 del acuerdo No 324 de octubre 11 de 1966, emanado del honorable consejo directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

---

Director

---

Jurado

---

Jurado

San Juan de Pasto, Agosto del 2011

## DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado a mis padres, Aurelia Pantoja y Alejandro Benavides, los seres más importantes en mi vida, por su sacrificio diario, por el amor que me han brindado, por la formación de la que gozo y por los valores que me han sido inculcados; a mis hermanos Héctor, Sandra, William, Ruth, Ovidio, Aura y Nubia, por su apoyo incondicional, su afecto y solidaridad.

*Andres Benavides*

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por darme la fuerza y sabiduría para enfrentar el reto de culminar mi carrera; a los profesores por la disciplina inculcada y los conocimientos impartidos; al Ph.D. Nelson Humberto Hurtado por su orientación durante el desarrollo de este proyecto de investigación. Al grupo de investigación en productos de importancia biológica (GIPIB) (Universidad de Nariño), por haberme abierto las puertas para aprender y trabajar. Un agradecimiento especial a los Químicos David Arturo y Juan Pablo Jiménez, por su grandiosa colaboración. A mis padres y hermanos por su inmenso cariño, muestras de afecto y darme ánimos para alcanzar esta meta tan importante en mi carrera profesional.

A todos muchas gracias por su apoyo.

*Andres Benavides*

## TABLA DE CONTENIDO

|   | Pág. |
|---|------|
| INTRODUCCIÓN.....   | 16   |
| 1. OBJETIVOS.....   | 17   |
| 1.1 Objetivo general.....   | 17   |
| 1.2 Objetivos específicos.....  | 17   |
| 2. MARCO REFERENCIAL.....   | 18   |
| 2.1 Antecedentes.....   | 18   |
| 2.1.1 Usos y aplicaciones de algunos compuestos terpénicos.....                 | 19   |
| 2.2 Marco Contextual.....   | 22   |
| 2.3 MARCO TEÓRICO.....  | 24   |
| 2.3.1 Productos naturales.....  | 24   |
| 2.4 Generalidades sobre los aceites esenciales.....                             | 24   |
| 2.4.1 Moléculas no terpenoides.....   | 26   |
| 2.4.2 Moléculas terpenoides.....  | 27   |
| 2.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....   | 34   |
| 2.6 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.....   | 38   |
| 2.6.1 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD)...          | 38   |
| 2.6.2 Destilación Extracción Simultanea (DES).....                              | 40   |
| 2.7 TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS.....                                    | 41   |
| 2.7.1 Cromatografía de gases (CG).....  | 41   |
| 2.7.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría<br>de masas (CG/MS)..... | 42   |
| 2.7.3 Correlación entre GC/MS e índices de retención de Kovats ( $I_K$ ).....   | 43   |
| 3. METODOLOGÍA .....  | 44   |
| 3.1 Recolección del material vegetal.....                                       | 44   |

|  |    |
|--|----|
| 3.2 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD).....   | 44 |
| 3.3 Destilación-extracción simultánea (DES).....   | 46 |
| 3.4 Determinación de la capacidad antioxidante por el método TEAC....  | 47 |
| 3.5 Normalización o porcentaje por áreas.....  | 48 |
| 3.6 Análisis estadístico.....  | 48 |
| 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....   | 51 |
| 4.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.....   | 51 |
| 4.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN<br>DEL ACEITE ESENCIAL PRESENTE EN LAS HOJAS<br>DE <i>Ambrosia arborescens</i> Miller..... | 52 |
| 4.2.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN<br>DEL AE UTILIZANDO LA TÉCNICA MWHD.....  | 52 |
| 4.2.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN<br>DEL AE UTILIZANDO LA TÉCNICA DES.....   | 58 |
| 4.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL<br>DE <i>Ambrosia arborescens</i> Miller. POR CG/MS.....                                     | 60 |
| 4.3.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS<br>OBTENIDOS POR LA TÉCNICA MWHD.....   | 61 |
| 4.3.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS<br>OBTENIDOS POR LA TÉCNICA DES.....  | 63 |
| 4.3.3 CLASIFICACIÓN Y COMPARACIÓN DE LOS<br>PRINCIPALES COMPUESTOS OBTENIDOS POR LAS<br>TÉCNICAS MWHD y DES.....                             | 64 |
| 4.4 ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS DE MASAS DE LOS<br>COMPUESTOS MAYORITARIOS PRESENTES EN EL AE DE<br><i>A. arborescens</i> Miller.....          | 66 |
| 4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....  | 72 |
| CONCLUSIONES.....  | 77 |
| RECOMENDACIONES.....   | 78 |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 79 |
| ANEXOS.....  | 86 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Mapa del Departamento de Nariño donde figura el Municipio de El Encano.....   | 23   |
| Figura 2. Algunos componentes no terpénicos presentes en los aceites esenciales.....  | 27   |
| Figura 3. Isopentenil difosfato.....  | 28   |
| Figura 4. Ejemplos de terpenos presentes en los aceites esenciales.....   | 28   |
| Figura 5. Resumen de la ruta citosólica acetato/mevalonato y la plastidial piruvato/gliceraldehido-3- fosfato hacia el isopentenil difosfato. P y PP indica el fosfato y difosfato respectivamente..... | 32   |
| Figura 6. Formación de las diferentes familias de terpenos a través del precursor universal isopentenil difosfato mediante la difosfato isomerasa (encuadrada) y preniltransferasas.....                | 33   |
| Figura 7. Equipo de destilación Clevenger.....  | 39   |
| Figura 8. Instrumento utilizado para la extracción destilación simultanea (DES).....  | 40   |
| Figura 9. Equipo para MWHD.....   | 45   |
| Figura 10. Equipo para DES.....   | 46   |
| Figura 11. Especie vegetal <i>Ambrosia arborescens</i> Miller.....  | 51   |
| Figura 12. Comparación entre medias de los picos cromatográficos para cada potencia.....  | 55   |
| Figura 13. Comparación entre medias de los picos cromatográficos para cada tiempo (MWHD).....   | 56   |
| Figura 14. Gráfico de Interacción .....   | 57   |
| Figura 15. Comparación entre medias de los picos cromatográficos para cada tiempo (DES).....  | 60   |
| Figura 16. Perfil cromatográfico del AE <i>A. arborescens</i> Miller, extraído mediante MWHD (P 40% / 30 min).....  | 61   |

|  |    |
|--|----|
| Figura 17. Perfil cromatográfico del AE de <i>A. arborescens</i> Miller, obtenido por la técnica DES (tiempo: 60 minutos)..... | 63 |
| Figura 18. Principales compuestos presentes en el AE de <i>A. arborescens</i> Miller, obtenidos por MWH y DES.....             | 65 |
| Figura 19. Espectro de masas del Limoneno.....   | 67 |
| Figura 20. Posibles rutas de fragmentación del Limoneno.....   | 67 |
| Figura 21. Espectro de masas del <i>cis</i> -Crisantenol.....  | 68 |
| Figura 22. Posibles rutas de fragmentación del <i>cis</i> -Crisantenol.....  | 69 |
| Figura 23. Espectro de masas del <i>ar</i> -Curcumeno.....   | 70 |
| Figura 24. Posibles rutas de fragmentación del <i>ar</i> -Curcumeno.....   | 71 |
| Figura 25. Curva de calibración para el método TEAC.....   | 72 |
| Figura 26. Esquema de reacción del ABTS+• con el aceite esencial.....  | 73 |
| Figura 27. Comparación de los valores TEAC de diversos aceites esenciales extraídos de plantas colombianas.....                | 75 |
| Figura 28. Reacción entre el catión-radical ABTS+• y un AO .....   | 75 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Especificaciones de extracción por la técnica MWHD.....   | 45   |
| Tabla 2. Especificaciones de extracción por la técnica DES .....   | 47   |
| Tabla 3. Numero de señales obtenidas en los cromatogramas<br>por MWHD.....   | 53   |
| Tabla 4. ANOVA de dos factores (Potencia, Tiempo) .....  | 53   |
| Tabla 5. Diferencia mínima significativa (Potencias).....  | 54   |
| Tabla 6. Diferencia mínima significativa (Tiempo).....   | 56   |
| Tabla 7. Numero de señales obtenidas en los cromatogramas<br>por DES.....  | 58   |
| Tabla 8. ANOVA de un factor (Tiempo) .....   | 58   |
| Tabla 9. Diferencia mínima significativa (Tiempo).....   | 59   |
| Tabla 10. Principales compuestos identificados por CG/MS, aislados<br>por MWHD.....                                    | 62   |
| Tabla 11. Principales compuestos identificados por CG/MS, aislados<br>por DES.....                                     | 64   |
| Tabla 12. Clasificación de los compuestos terpénicos extraídos<br>por MWHD y DES.....                                  | 64   |
| Tabla 13. Datos de absorbancia de los patrones de Trolox.....  | 72   |
| Tabla 14. Datos de absorbancia del ácido ascórbico, BHT y el AE<br>de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller.....          | 73   |
| Tabla 15. TEAC de las sustancias antioxidantes de referencia:<br>Ácido ascórbico, BHT y el AE estudiado.....           | 74   |
| Tabla 16. Compuestos mayoritarios presentes en varias especies<br>de plantas aromáticas y medicinales colombianas..... | 76   |
| Tabla 17. Datos para el cálculo del ANOVA de dos factores .....  | 79   |
| Tabla 18. Datos para el cálculo del ANOVA de un factor.....  | 81   |

## LISTA DE ANEXOS

|         | Pág.  |
|---------|---|
| Anexo A | Cálculo del ANOVA de dos factores..... 86   |
| Anexo B | Cálculo de la DMS (MWHD)..... 88  |
| Anexo C | Cálculo del ANOVA de un factor..... 88  |
| Anexo D | Cálculo de la DMS (DES)..... 90   |
| Anexo E | Cromatograma obtenido por GC-FID de la mezcla de parafinas estándar (C <sub>6</sub> -C <sub>18</sub> )..... 91          |
| Anexo F | Estructuras químicas de los principales compuestos identificados por CG/MS..... 91                                      |
| Anexo G | Espectros de masas de los compuestos mayoritarios obtenidos de las bases de datos de Adams, Wiley 138 y NIST 05..... 93 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|          |   |
|----------|---|
| ABTS     | Ácido 2,2 azinobis-(3-etibenzotiazolin-6- sulfónico)      |
| AE       | Aceite esencial   |
| AE's     | Aceites esenciales  |
| ANOVA    | Análisis de Varianza                                      |
| BHT      | 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol                     |
| CV       | Coefficiente de variación                                 |
| DES      | Destilación-extracción simultánea con solventes           |
| DS       | Desviación estándar                                       |
| DMS      | Diferencia mínima significativa                           |
| DIA      | Diseño irrestrictamente al azar                           |
| et al.   | Et allí (y otros)   |
| CG       | Cromatografía de gases                                    |
| GC/MS    | Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas |
| GL       | Grados de libertad  |
| HD       | Hidrodestilación  |
| Ibíd.    | En el mismo lugar   |
| Ik       | Índice de retención de Kovats                             |
| m.s.n.m  | Metros sobre el nivel del mar                             |
| MWHD     | Hidrodestilación asistida por radiación con microondas    |
| Op. cit. | Opere citato (en la obra citada)                          |
| Ref.     | Referencia  |
| Vol.     | Volumen   |
| TEAC     | Capacidad antioxidante equivalente al Trolox              |

## RESUMEN

Se realizó la identificación de los principales metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial (AE) de la especie vegetal *Ambrosia arborescens* Miller. Para la extracción del AE se utilizaron dos métodos, la hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) y la destilación extracción simultánea (DES). Las condiciones óptimas de extracción del AE obtenidas por medio de la técnica MWHD, correspondieron a la potencia de 40% y tiempo de 30 minutos; empleando la técnica DES, la mejor condición se encontró a los 60 minutos de extracción. La identificación se llevó a cabo mediante el uso de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/MS). De los extractos obtenidos por MWHD, se identificaron 14 compuestos, de los cuales, el 29% fueron hidrocarburos monoterpénicos( - pineno, o-cimeno, p-cimeno y limoneno), el 50% terpenos oxigenados(cis-crisantenol, isoborneol, ar-tumerol, espatulenol, oxido de cariofileno, curcufenol y xantorizol) y el 21% restante hidrocarburos sesquiterpénicos(ar-curcumeno, -curcumeno y germacreno D), mientras que por DES se obtuvieron 9 compuestos, el 33,3% fueron hidrocarburos monoterpénicos(o-cimeno, p-cimeno y limoneno), el 33,3% terpenos oxigenados(cis-crisantenol, ar-tumerol y xantorizol) y el 33,3% hidrocarburos sesquiterpénicos(ar-curcumeno, -curcumeno y germacreno D). Se determinó además la capacidad antioxidante del aceite esencial mediante el método TEAC (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox), obteniéndose un valor de 60,9 mmol de Trolox/Kg de Aceite esencial. El AE mostró ser una mezcla de antioxidantes eficientes en comparación con extractos de diferentes especies vegetales colombianas.

## ABSTRACT

The main secondary metabolites found in the essential oil of *Ambrosia arborescens* Miller were identified. The essential oil was extracted by two methods, the microwave radiation hydrodistillation (MWHD) and the simultaneous distillation-extraction (SDE). The optimum extraction conditions found in the MWHD technique were potency 40% and 30 minutes of time extraction. In the SDE technique the best extraction was made at 60 minutes. The identification of main components in the essential oils was made by gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS). In the extracts obtained by MWHD, 14 compounds were identified, of which 29% were monoterpenic hydrocarbons ( $\alpha$ -pinene, *o*-cymene, *p*-cymene and limonene), 50% oxygenated terpenes (*cis*-chrysanthenol, isoborneol, *ar*-tumerol, spathulenol, caryophyllene oxide, curcuphenol and xanthorrhizol) and the remaining 21% hydrocarbon sesquiterpenes (*ar*-curcumene,  $\beta$ -curcumene and germacrene D), while DES was obtained 9 compounds, 33,3% were hydrocarbon monoterpenic (*o*-cymene, *p*-cymene and limonene), 33,3% oxygenated terpenes (*cis*-chrysanthenol, *ar*-tumerol and xanthorrhizol), and 33,3% hydrocarbon sesquiterpenes (*ar*-curcumene,  $\beta$ -curcumene and germacrene D). Antioxidant capacity of essential oil was also measured by TEAC method (Trolox equivalent antioxidant capacity), obtaining a value of 60,9 mmol Trolox/kg of essential oil. The AE was shown to be a mixture of antioxidants efficient compared with different aromatic and medicinal Colombian vegetable species.

## INTRODUCCIÓN

Colombia es un país inmensamente rico en especies vegetales de indudable importancia. La gran mayoría de estas plantas no han sido objeto de estudio y el conocimiento fitoquímico que de ellas se tiene es casi nulo. La gran variedad de flora que hay en nuestra región, permite desarrollar investigaciones relacionadas con las propiedades de dichos recursos, particularmente el estudio de los aceites esenciales.

Dentro de este contexto, los aceites esenciales que son productos naturales de gran valor e importancia económica hoy en día, son utilizados como materias primas en áreas tales como: perfumería, aromaterapia, fitoterapia, y nutrición.

Los aceites esenciales, son mezclas complejas de muchos metabolitos secundarios; cada uno de los cuales contribuye al beneficio o efecto adverso en la salud de las personas. Es por esto que se debe profundizar en la elucidación (composición) de estos metabolitos, para permitir un mejor entendimiento de su mecanismo de acción.

Actualmente el campo referente a los aceites esenciales ha focalizado la atención de muchas áreas científicas, lo que permite el estudio de plantas nativas e investigar las actividades biológicas de estos. Su Bioactividad se estudia a partir de los efectos farmacológicos que tienen este tipo de extractos. Esto nos permitirá obtener nueva información sobre estos productos, los cuales son obtenidos por diferentes técnicas fisicoquímicas.

La importancia de la Fitoterapia en nuestros días pone de manifiesto la necesidad de investigar sobre las propiedades farmacológicas de numerosas plantas que aún no han sido del todo determinadas en nuestro medio, tal es el caso de la especie vegetal *Ambrosia arborescens* Miller, de nombre común Altamisa, muy usada en la medicina tradicional y de la cual se conoce que la infusión de partes aéreas de la planta se ha utilizado en el dolor de cabeza, parásitos intestinales, espasmos, gastritis, malestares cardiacos, arritmias de tipo nerviosas, hipertensión, dolores musculares, reumatismo, epilepsia, fiebre, estreñimiento y para inducir el sueño.

La identificación de los principales compuestos presentes en el aceite esencial de la planta Altamisa y la determinación de su capacidad antioxidante, son aspectos de gran importancia que permiten generar conocimiento químico, a partir del cual se podría mejorar el uso farmacológico de los componentes de esta especie vegetal y a la vez, motivar futuras investigaciones que permitan profundizar en el campo de la síntesis orgánica, hemisíntesis o biotecnología.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar químicamente el aceite esencial presente en las hojas de *Ambrosia arborescens* Miller. y determinar su capacidad antioxidante.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer y purificar el aceite esencial presente en las hojas de *Ambrosia arborescens* Miller, utilizando las técnicas de Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) y la destilación-extracción simultánea (DES).
- Optimizar las condiciones de extracción del aceite esencial presente en las hojas de *Ambrosia arborescens* Miller, utilizando como variables de respuesta la intensidad y número de picos en el cromatograma.
- Identificar por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de las hojas de *Ambrosia arborescens* Miller.
- Valorar la capacidad de captura radical por medio del método TEAC (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox)

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 ANTECEDENTES

La especie vegetal *Ambrosia arborescens* Miller, objeto de estudio para el presente trabajo de investigación, y de la que por medicina tradicional se conoce que tiene propiedades terapéuticas, no ha sido fitoquímicamente estudiada en su totalidad, por lo tanto no existe un conocimiento acerca de la composición química de su aceite esencial, ni se le ha procurado encontrar una actividad biológica para la cual pueda ser útil. Desde este contexto, podemos referirnos a las diferentes propiedades biológicas que presentan los aceites esenciales, pero una en particular es la actividad antioxidante; el conocimiento de esta capacidad tiene gran relevancia y aplicación, ya que se ha demostrado su participación en la prevención de enfermedades degenerativas, e.g. cardiovasculares, neurológicas, diferentes tipos de cáncer y otras relacionadas con el estrés oxidativo<sup>1</sup>.

Debido a la gran importancia que representa el estudio de los aceites esenciales, el propósito del presente trabajo de investigación, es realizar un estudio fitoquímico, identificando los principales compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de la planta Altamisay determinar su capacidad antioxidante, estudio que permitiría mejorar el uso farmacológico de los componentes de esta especie vegetal y de esta manera contribuir con el uso de estos productos naturales en el tratamiento de enfermedades.

A continuación se presentan algunos estudios fitoquímicos realizados al extracto hidroalcohólico de la especie vegetal *Ambrosia arborescens* Miller.

Según Chang S. y colaboradores (1987), mediante un screening fitoquímico detectaron los siguientes metabolitos secundarios: En hojas: taninos, triterpenoides y/o esteroides, catequinas, flavonoides, saponinas, y compuestos con anillos lactónicos. En flores se encontraron taninos, triterpenoides, catequinas, flavonoides, saponinas, y compuestos con anillos lactónicos<sup>2</sup>.

A. Chang, y S. Klinar (1999), evaluarondiferentes técnicas de extracción de aceites esenciales, esto con el fin de determinar su máxima eficiencia. La extracción por Soxhlet dio el mayor rendimiento. Sin embargo, en esta investigación se utilizaron las técnicas de extracción como son MWHD y DES<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup>ESPINOZA, H. BRUGERAS, J. Vitaminas y minerales contra el estrés. En: Rev. Cubana. Farm. La Habana. Vol. 35, No. 3 (2001); p. 74 - 78

<sup>2</sup> CHANG, S y CASTILLO, R. Avances del Catálogo de Plantas Medicinales de ICA. En: XV Congreso Peruano de Química. Lima. Vol. 22, No. 18 (1987); p. 67-88

<sup>3</sup>A, Chang yS, Klinar. Evaluación Química y Espectroscópica de tres plantas medicinales de ICA. En: I Congreso de Investigación. Lima. Vol. 12, No. 13 (1984); p. 129

S.Klinar y colaboradores (1993), realizaron ensayos biológicos de *Ambrosia arborescens* Miller, obteniéndose los siguientes resultados: el extracto hidroalcohólico de hojas presenta marcada actividad en la inhibición de la enzima -Glucuronidasa, lo que indica actividad hepatoprotectora<sup>4</sup>.

En la misma investigación, no mostró inhibición a la enzima Xantina Oxidasa.

También se realizaron ensayos preliminares para determinar la actividad antitumoral, el extracto de hojas mostró capacidad de enlazamiento al ADN, por lo que se realizarán ensayos más selectivos para comprobar o demostrar dicha actividad<sup>5</sup>.

A. Chang y colaboradores (2000), evaluaron la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Ambrosia arborescens* Miller, encontrando que este extracto presentaba una actividad antioxidante 36% superior al de la vitamina C<sup>6</sup>.

### 2.1.1 Usos y aplicaciones de algunos compuestos terpénicos

Una vez identificados los principales compuestos presentes en el aceite esencial de la especie vegetal *A. arborescens* Miller, se investigó sobre los usos y aplicaciones que se le daban a dichos compuestos y de esta manera establecer una conexión con los reportes de actividad terapéutica que presenta esta planta (según la medicina tradicional). A continuación se describen las características más importantes de algunos compuestos aislados.

- Limoneno: recientes estudios parecen apuntar que el limoneno tiene efectos anticancerígenos. Incrementa los niveles de enzimas hepáticas implicados en la detoxificación de carcinógenos. La glutatión S--transferasa (GST) es un sistema que elimina carcinógenos. El limoneno parece promover el sistema GST del hígado y los intestinos atenuando el efecto dañino de los carcinógenos. Estudios en animales demuestran que limoneno en la dieta reduce el crecimiento tumoral en mamíferos<sup>7</sup>.

En estudios sobre la actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia *Asteraceae*, el componente mayoritario del aceite esencial de la especie vegetal *B. latifolia*, fue el limoneno (9,4%). En este estudio se

---

<sup>4</sup>S.Klinar, P.Castillo, A.Chang, G.Schmeda y S. Reyes. Actividad Biológica de Plantas Medicinales de ICA. Lima. En: VI Congreso Peruano de Farmacia. Vol. 31 (1993); p. 166-170

<sup>5</sup>Ibíd., p. 166-170

<sup>6</sup>A. Chang, S. Klinar y J. Chanllío. Evaluación de la actividad antioxidante de cinco plantas medicinales de ICA. Lima. En: I Congreso Internacional FITO. Vol. 42, No. 41 (2000); p. 86-94

<sup>7</sup>Limoneno [en línea] Colombia. [Citado el 19 de Julio de 2011]. Disponible en internet: <http://es.wikipedia.org/wiki/Limoneno>

demonstró la actividad antimicótica del limoneno contra el hongo *Fusarium oxysporum*<sup>8</sup>.

Por otra parte, el limoneno presenta un amplio uso en la industria de productos de limpieza del hogar, industria alimentaria y cosmética. También es usado, por ejemplo, en disolvente de resinas, pigmentos, tintas, pinturas, en la fabricación de adhesivos, como aditivo en fragancias, en fluidos refrigerantes, como control de olores, etc. También es usado por las industrias farmacéutica y alimentaria como aromatizante y para dar sabor, siendo usado, por ejemplo, en la obtención de sabores artificiales de menta y en la fabricación de dulces, goma de mascar, bebidas y especias<sup>9</sup>.

- Oxido de Cariofileno: el óxido de cariofileno, existe en muchos aceites esenciales de plantas, el cual ha sido utilizado como conservante de alimentos y cosméticos, y se ha incluido por el Consejo Europeo en la lista de sustancias aromatizantes naturales y sintéticas, por ser tolerable, seguro y no tóxico.

Este compuesto sesquiterpénico muestra propiedades importantes como anti-inflamatorio y anti-cancerígeno, siendo un compuesto de gran interés. También se ha probado su actividad antifúngica, comparándola con ciclopiroxolamina y sulconazol, comúnmente utilizados en el tratamiento de la onicomicosis y elegidos por sus estructuras químicas muy diferentes, estos estudios permitieron comparar la eficiencia del óxido de cariofileno frente a diferentes fármacos antimicóticos<sup>10</sup>.

- Curcufenol: según Calderón (1997), el sesquiterpeno (+)-curcufenol, presenta importante acción antimicrobiana y citotóxica<sup>11</sup>. También se ha probado su actividad antitumoral mediante el bioensayo de tumorigénesis inducida por *Agrobacteriumtumefaciens* en disco de zanahoria, produciéndose inhibición en concentraciones mayores de 60µg/mL<sup>12</sup>.

---

<sup>8</sup>ZAPATA, Bibiana., DURAN, Camilo., STASHENKO, Elena., BETANCUR GALVIS, Liliana & MESA ARANGO, Ana Cecilia. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia *Asteraceae*. En: Revista Iberoamericana de Micología. El SevierDoyma. Colombia. Vol. 27, No. 2 (2010); p.101–103

<sup>9</sup>Limoneno [en línea] Op. cit., <http://es.wikipedia.org/wiki/Limoneno>

<sup>10</sup>YANG, Depo. MICHEL, Laura. CHAUMONT, Jean-Pierre.& CLERC, Joelle. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis.In: Mycopathologia. KluverAcademicPublishers. Vol. 14, No. 148 (1999); p. 79-82.

<sup>11</sup>CALDERÓN, L. Modificaciones de la estructura química del (+)-curcufenol y su influencia en la actividad antimicrobiana. Tesis de Maestría en Química. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá. 1997.

<sup>12</sup> M. SALAMA, Ahmed. FONSECA, Claudia. RENGIFO, Laura. Actividad antitumoral y toxicidad de (+)-curcufenol y de curcudiol aislados de la esponja marina *Didiscusoxeata*. En:

Revista Colombiana de Ciencias Químico – Farmacéuticas. Universidad Nacional de Colombia. Vol. 3, No. 29 (jul.-sep. 2000); p. 50-56

- Isoborneol: según M. Armaka (2000), el Isoborneol, mostró actividad viricida doble contra el herpes simplex tipo 1 (HSV-1). El isoborneol en primer lugar, inactiva HSV-1 en casi 4 log<sub>10</sub> valores dentro de los 30 minutos de exposición, y en segundo lugar, el isoborneol a una concentración de 0,06% inhibió completamente la replicación viral, sin afectar la adsorción viral. Además, El Isoborneol no mostró citotoxicidad significativa en concentraciones que oscilan entre 0,016% y 0,08% al medirse con líneas celulares humanas y de Mono <sup>13</sup>.

- Xantorrizol: es uno de los principales componentes en el rizoma de las especies de *Curcuma*. Hwang y sus colaboradores (2000) encontraron que el xantorrizol tuvo la mayor actividad antibacteriana contra las especies de *Streptococcus* responsable de la caries dental <sup>14</sup>.

El Xantorrizol y su actividad in vitro frente a hongos filamentosos oportunistas se evaluó mediante el método estándar NCCLS (M38-A). El Xantorrizol resultó ser activo frente a todas las especies estudiadas, a saber, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopusoryzae* y *Trichophyton mentagrophytes*. La susceptibilidad de las seis especies de hongos filamentosos a xantorrizol fue comparable a la de los antimicóticos comerciales, la anfotericina B. Xanthorrhizol también tiene una actividad para inhibir la germinación de conidias de todas las especies estudiadas. Los resultados sugieren fuertemente que xanthorrhizol puede ser desarrollado como un agente antimicótico natural <sup>15</sup>.

- -Pineno: es utilizado en la manufactura de alcanfor, insecticidas, solventes, plastificantes, bases para perfumes, aceite de pino sintético, terpineol, terpinoleno, acetato de terpinilo y dipenteno <sup>16</sup>.

- Germacreno D: se utiliza como plaguicida y constituye una importante feromona que estimula la comunicación entre insectos <sup>17</sup>.

---

<sup>13</sup> M, Armaka. E, Papanikolaou. A, Sivropoulou. M, Arsenakis. Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. In: MedLine. Aristotle University. Vol. 43, No. 33 (1999); p. 89-94

<sup>14</sup> JK, Hwang. JS, Shim. and YR, Pyun. Antibacterial activity of Xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens. In: Fitoterapia. Vol. 71, No. 8 (2000); p. 321–323

<sup>15</sup> RUKAYADI, Yaya., HWANG, Jae-Kwan. In Vitro antimycotic activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. In: PubMed. Phytotherapy research. Vol. 21, No. 5 (2007); p. 434-438

<sup>16</sup> Usos del alfa pineno [en línea] Colombia. [Citado 12 de Julio de 2011]. Disponible en internet: <http://www.cosmos.com.mx/b/tec/dxjl.htm>

<sup>17</sup> GUENTHER, Ernest. The essential Oils. Volumen 3. Editorial New York. (1942); p.155

## 2.2 MARCO CONTEXTUAL

El material vegetal se recolectó en el corregimiento de El Encano, ubicado a 25 km de la ciudad de Pasto, limita al Norte con el municipio de Buesaco y el Corregimiento de La Laguna; al Sur con el Municipio de Funes y el Departamento del Putumayo; al Occidente con los Corregimientos de Catambuco y Santa Bárbara, y al Oriente con el Departamento del Putumayo (Figura 1). Además de la cabecera (Encano Centro), lo conforman las veredas: Ramos, Romerillo, Motilón, Carrizo, Casapamba, El Socorro, Bellavista, El Puerto, San José, Campo Alegre, Santa Clara, Santa Rosa, Mojondinoy, Naranjal, El Estero, Santa Isabel, Santa Teresita y Santa Lucía<sup>18</sup>.

El Encano, se encuentra a una altura de 2.875 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura de 8 a 12 grados centígrados y una humedad relativa del 87%, con pluviosidad de 1.348 mm. anuales. Es una zona muy rica en agua, flora y fauna, de ahí que se la conozca como Cuenca Alta del Río Guamués o La Cocha (voz quechua que traduce Laguna), la cual es alimentada por los diferentes ríos y quebradas que nacen en las montañas que la rodean, cuenta con algunos paramos en diferentes lugares, como también zonas de reserva natural y de protección<sup>19</sup>.

Las principales actividades productivas son la siembra de monocultivos de cebolla, papa y mora, la cría de truchas y la extracción de carbón vegetal, actividad que ha deteriorado los recursos naturales. (LA COCHA, HUMEDAL DEL MUNDO)<sup>20</sup>.

---

<sup>18</sup>RODRIZALES, Javier. Resguardo indígena Quillacinga "refugio del sol" corregimiento de El encano. [En línea]. Colombia. [Citado 1/ Abril/ 2009]. Disponible en internet:<http://www.xexus.com.co/modules.php?op=modload&name=Sections&file=index&req=printpagp&artid=158>

<sup>19</sup>Ibid. http.



<sup>21</sup> DUKE J. A., BOGENSCHUTZ-GODWIN M. J. & OTTESEN A. R. Duke's Handbook Of Medicinal Plants Of Latin America, CRC Press. Taylor & Francis Group; Boca Raton.(2009); p.33

## 2.3 MARCO TEÓRICO

### 2.3.1 Productos naturales

Desde siempre la naturaleza ha sido una fuente inagotable de compuestos activos que, desde un punto de vista farmacológico, se vienen utilizando con gran efectividad para combatir multitud de enfermedades. En las dos últimas décadas se ha producido un renovado interés en el campo de los productos naturales. Ahora somos conscientes de la diversidad de estructuras químicas que proporciona la naturaleza, lo que ha estimulado la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Dichos compuestos constituyen herramientas útiles en el campo de la bioquímica y biología molecular para explorar con detalle la función celular.

Así pues, la investigación en productos naturales es uno de los medios principales para descubrir compuestos bioactivos, ya sea para aplicaciones farmacéuticas o agroquímicas. Debido a que en ocasiones se desconoce la etiología de muchas patologías, resulta difícil diseñar moléculas potencialmente activas para su tratamiento, de ahí la necesidad de buscar compuestos cabeza de serie a partir de fuentes naturales. El resurgimiento experimentado por la investigación en este campo va paralelo al desarrollo y disponibilidad de una serie de nuevos bioensayos, por una parte, y de métodos más eficaces de aislamiento, separación, purificación y elucidación, por otra. La velocidad y facilidad con la que los productos naturales pueden ser aislados y caracterizados seguirá aumentando conforme lo haga la automatización de cada una de las etapas, desde el ensayo biológico hasta la determinación estructural<sup>22</sup>.

### 2.4 Generalidades sobre los aceites esenciales

Los aceites esenciales (constituidos principalmente por terpenos) se pueden definir como productos volátiles de naturaleza compleja, producidos por ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable. De forma oficial, se denominan aceites esenciales los productos que se pueden obtener por arrastre con corriente de vapor de agua o por prensado del pericarpio de

ciertos frutos. Habitualmente son denominados como esencias, aunque esta denominación es mucho más amplia, porque engloba no solo a los aceites esenciales sino también a otras sustancias obtenidas por métodos de extracción muy diversos <sup>[23, 24]</sup>.

---

<sup>22</sup>GIL RUIZ, P. Productos naturales. 1ª Ed. Universidad Politécnica de Navarra. (2002); p. 74

<sup>23</sup>KUKLINSKI, C. Aceites esenciales. En: Farmacognosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Ediciones Omega S.A. Barcelona. (2000);p. 134-143

<sup>24</sup>BRUNETON, J. Aceites esenciales. En: Farmacognosia Factores de variabilidad de los aceites esenciales. Acribia, S.A. Zaragoza: España. (2001); p. 488-491

Los aceites esenciales, son generalmente líquidos a temperatura ambiente. La mayoría son prácticamente transparentes, incoloros o coloreados (amarillentos), salvo ciertas excepciones como el aceite de manzanilla que posee un color azul intenso. En la mayoría de los casos, estos productos son menos densos que el agua (esencia de clavo y canela son excepciones). Los aceites esenciales son insolubles en agua, aunque en ciertas esencias puede que alguno de sus componentes se solubilice parcialmente. Son también lipófilos y solubles en disolventes orgánicos apolares (éter etílico, hexano...). Suelen ser solubles en alcoholes de alta graduación. Tienen índices de refracción elevados y poseen actividad óptica. Los aceites esenciales se oxidan con facilidad y polimerizan dando productos resinosos<sup>25</sup>.

Los aceites esenciales son productos casi exclusivos de las angiospermas. Una excepción sería el género *Pinus*, gimnosperma de la familia *Pinaceae* que fabrican en canales resiníferos sus esencias. Entre las familias que disponen de representantes productores de aceites esenciales cabe destacar la familia *Apiaceae* (anís, hinojo), la familia *Lauraceae* (canela), la familia *Asteraceae* (manzanilla), *Mirtaceae* (eucalipto, clavo), *Rutaceae* (cítricos) o la familia *Lamiaceae* (menta, melisa, lavanda, tomillo...).

La localización de los aceites esenciales es muy variada. Pueden aparecer en raíces y rizomas, como en la cúrcuma o el jengibre, en la corteza como la canela, en los frutos en el caso de los cítricos, el anís o el enebro, en el leño como ocurre con el alcanfor, en las flores, siendo un ejemplo las manzanilla, en las hojas como sucede en el eucalipto, laurel o el boldo y en sumidades floridas muy frecuente en las labiadas. Los aceites esenciales se acumulan en glándulas o tricomas en las labiadas, en cavidades esquizogénicas de los cítricos, en conductos resiníferos de las coníferas, etc....

Los aceites esenciales son generalmente mezclas complejas de varias sustancias, pudiendo llegar a tener más de 200 compuestos. Éstos a su vez pueden tener estructuras muy diversas<sup>26</sup>.

Los componentes químicos de los aceites esenciales dependen de varios factores. En primer lugar estaría el origen botánico, ya que cada especie posee una composición química diferente, incluso dentro de una misma especie podemos encontrar varias razas químicas (quimiotipos). Las características cuantitativas y cualitativas de una especie varían según la fase del ciclo vegetativo en que se encuentre. Influye también en las cualidades de los aceites esenciales, las condiciones medioambientales en las que se encuentra<sup>27</sup>.

---

<sup>25</sup>KUKLINSKI, Op. cit., p. 134-146

<sup>26</sup>Ibíd., p. 134-146

<sup>27</sup>KUKLINSKI, Op. cit., p. 134-146

También cabe anotar que ciertos procedimientos de extracción pueden alterar la composición del aceite esencial respecto al vegetal de origen<sup>28</sup>, e.g las técnicas de hidrodestilación, destilación por arrastre con vapor de agua y la destilación con agua – vapor. En la hidrodestilación, la presencia de agua y particularmente a altas temperaturas pueden ocurrir reacciones que favorecen la formación de compuestos, como alcoholes y ácidos por descomposición de los ésteres, causantes de una disminución en la producción del aceite, esta es una de las desventajas de esta técnica pues por la cantidad de agua presente puede producirse mayor hidrólisis; En el caso de la destilación agua vapor, el grado de hidrólisis es mucho menor y lo es aún menos en la destilación por arrastre con vapor de agua<sup>29</sup>.

Los componentes presentes en los aceites esenciales se pueden dividir en dos grandes grupos: terpenoides y no terpenoides<sup>30</sup>.

2.4.1 Moléculas no terpenoides: dentro del grupo de los no terpénicos encontramos sustancias volátiles alifáticas que suelen ser hidrocarburos (C, H) o sustancias con función oxigenada (C, H y O). Un ejemplo sería el 2-Hexenol. También encontramos en este grupo sustancias volátiles con diferentes estructuras como C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (vainillina), C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (eugenol o safrol) o derivados cumarínicos (bergapteno). Hay, aunque son poco frecuentes, sustancias nitrogenadas como aminas alifáticas volátiles (metilamina, etilamina) o derivados del indol los cuales dan olores a pescado o a heces respectivamente. Con menos frecuencia aun aparecen sustancias con azufre como el isotiocianato de alilo presente en la mostaza o el disulfuro de alilo en el ajo<sup>31</sup>.

---

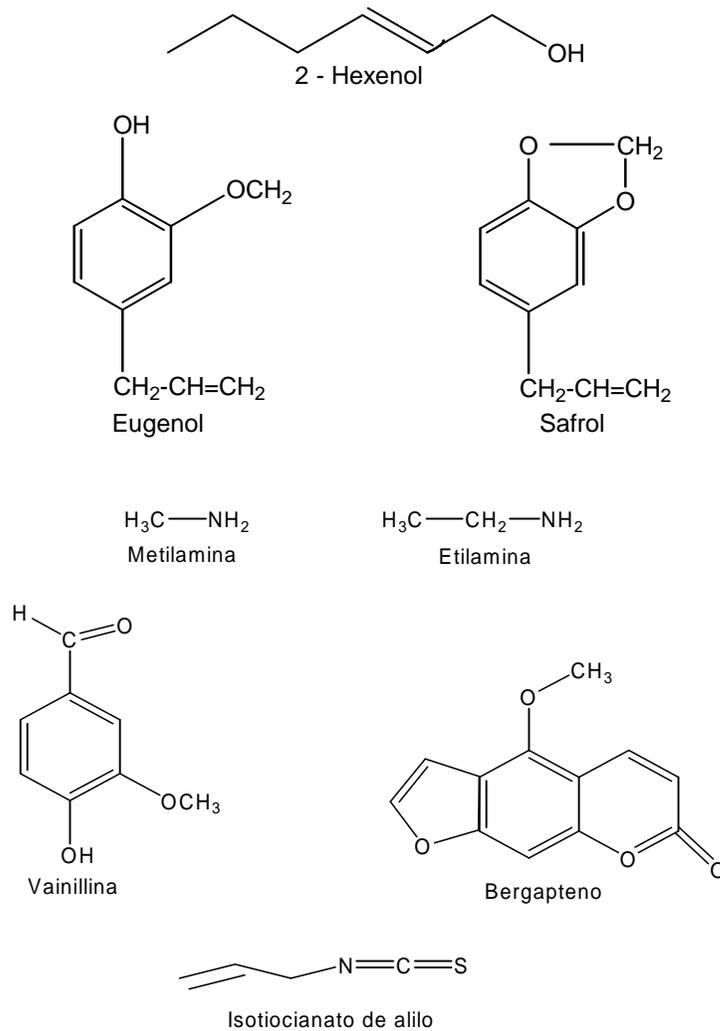
<sup>28</sup>Ibíd., p. 134-146

<sup>29</sup>BANDONI, Arnoldo. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Editorial Universidad Nacional de la Plata. Argentina, (2000); p. 168

<sup>30</sup> BRUNETON, Op. cit., p. 488-491

<sup>31</sup> KUKLINSKI, Op. cit., p. 134-146

Figura 2. Algunos componentes no terpénicos presentes en los aceites esenciales.

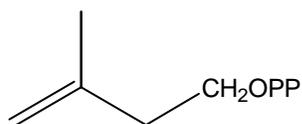


Fuente: KUKLINSKI, C. Aceites esenciales. En: Farmacognosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Ediciones Omega S.A. Barcelona. (2000);p. 134-143

2.4.2 Moléculas terpenoides: los terpenoides son, en la mayoría de los casos, los componentes más abundantes en los aceites esenciales y los que les proporcionan sus propiedades más características. Los compuestos terpénicos se biosintetizan por la ruta del ácido mevalónico, vía isopentenil difosfato (figura 3), que son unidades de 5 carbonos<sup>32</sup>.

<sup>32</sup>LITTLE, D. B. & R. B. Croteau. Biochemistry of essential oil terpene. A thirty year overview. In: Flavor Chemistry: 30 Year of Progress. Ed. Teranishi et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. (1999); p. 239-253

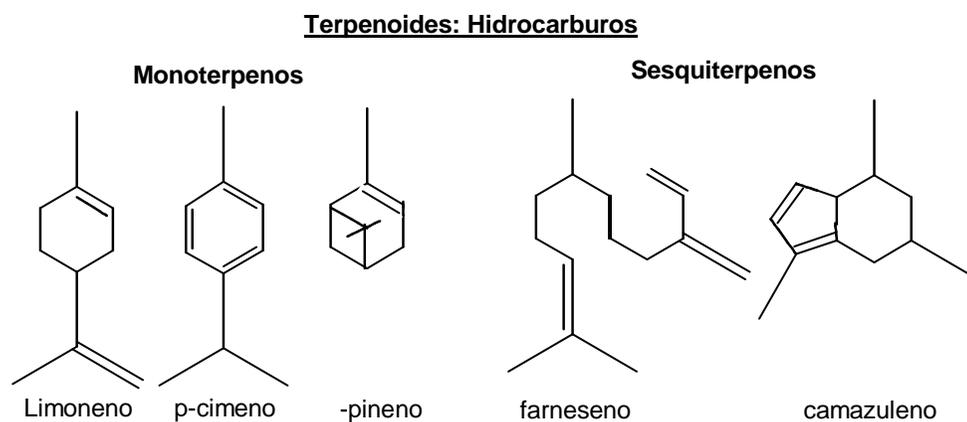
Figura 3. Isopentenil difosfato



Fuente: DEVON, T. K. & A. I. Scott. Handbook of naturally occurring compounds. Vol. II. Terpenes. Academic Press, New York, (1972); p. 71

El número de estructuras terpénicas se ha ido incrementando, favorecidas por la aplicación de nuevas técnicas de caracterización y las posibilidades comerciales de dichos productos<sup>33</sup>. Así se ha pasado de 4.000 terpenoides conocidos en 1972 a unos 34.000 en 1998<sup>34</sup>.

Figura 4. Ejemplos de terpenos presentes en los aceites esenciales.

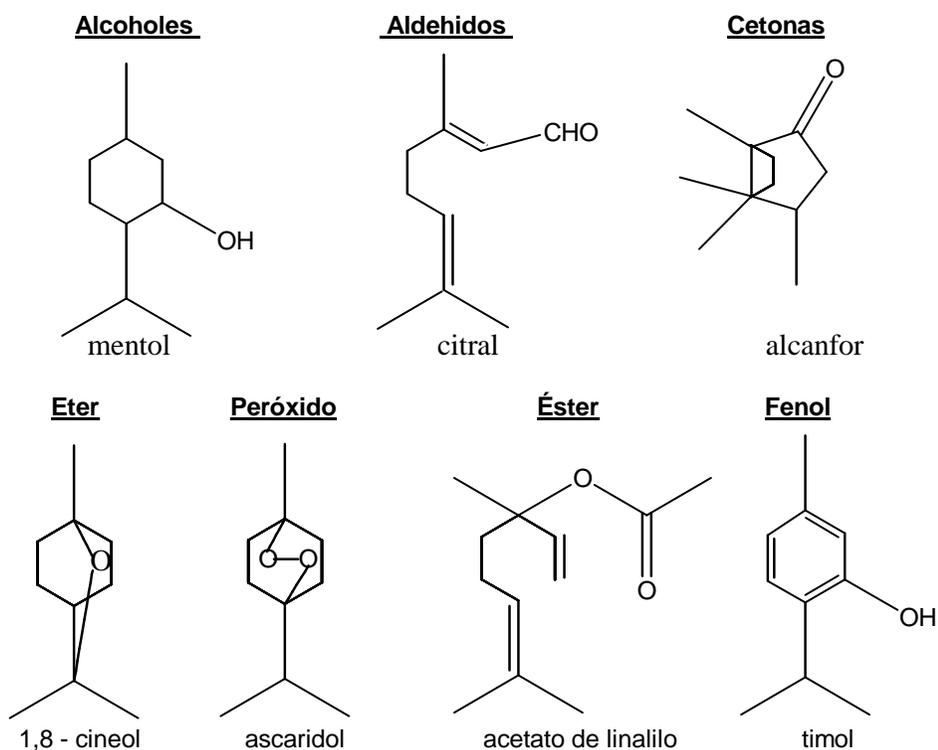


<sup>33</sup>DEVON, T. K. & A. I. Scott. Handbook of naturally occurring compounds. Vol. II. Ed. Academic Press, New York, (1972); p. 69-78

<sup>34</sup>BUCKINGHAM, J. Dictionary of Natural Products on CD-ROM. Version 6.1. Chapman and Hall. London, (1998); p. 147-162

Continuación de la figura 4.

### Terpenoides: Funcionalizados



Fuente: KUKLINSKI, C. Aceites esenciales. En: Farmacognosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Ediciones Omega S.A. Barcelona. (2000);p. 134-143

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de 5 carbonos (isopreno) que contengan. Por razones históricas la familia de terpenoides de 10 carbonos se le denomina monoterpenos. A partir de aquí se denominó hemiterpenos a los que poseen 5 carbonos, sesquiterpenos los que tiene 15, diterpenos 20 y así en adelante. A su vez los compuestos terpénicos pueden tener o no oxígeno. Los que no poseen oxígeno se denominan hidrocarburos y son monoterpenos y sesquiterpenos. Los terpenoides que incluyen en su composición oxígeno son terpenos funcionalizados; con función alcohol (mentol), fenol (timol), aldehído (citral), cetona (alcanfor), éter (eucaliptol), éster (Acetato de linalilo) o peróxido (alcaridol) (figura 4) <sup>[35, 36]</sup>.

---

<sup>35</sup>KUKLINSKI, Op. cit., p. 134-146.

<sup>36</sup>LITTLE, D. B. & R. B. Croteau, Op. cit., p. 239-253.

Las denominadas “reglas del isopreno”<sup>37</sup> enunciadas por Wallach, (1914)<sup>38</sup>, que se basan en que la mayoría de los terpenos pueden ser hipotéticamente contruidos por el ensamblaje de unidades de isoprenos fue la hipótesis base para el entendimiento de la síntesis de estos compuestos químicos<sup>39</sup>. Con posterioridad las “reglas biogenéticas del isopreno” refinaron los conocimientos anteriores y han proporcionado una herramienta eficaz como modelo de trabajo para el estudio y la biosíntesis de terpenos y la comprensión de los ciclos implicados en la formación de estos componentes químicos. Para establecer el contexto fisiológico de la biosíntesis de los monoterpenos los esfuerzos fueron dirigidos al estudio de alimentación radioisotópica (radioisotopicfeeding) alcanzándose conocimientos de gran valor en importantes ciclos<sup>[40,41]</sup>. En la actualidad la aplicación de sistemas biosistemáticos de células libres (cell-free biosystematics systems) están dando a conocer ciclos, enzimas y mecanismos de formación de terpenos<sup>42</sup>.

Con estos nuevos conocimientos se han logrado avances en la genética molecular de la biosíntesis de los terpenos que han permitido abrir las puertas a la explotación biotecnológica<sup>43</sup>.

Todos los compuestos terpénicos son biosintetizados a partir del isopentenil difosfato (IPP). Dicho componente puede ser formado por 2 rutas. La más conocida de ellas es la denominada ruta Acetato/Mevalonato. La otra, ruta Piruvato/Gliceraldehido-3-Fosfato, fue descubierta recientemente.

En la ruta Acetato/Mevalonato, tres moléculas de acetil-CoA son fusionadas mediante las enzimas aciltransferasa e hidroximetilglutaril-CoA sintetasa, para producir el compuesto de 6 carbonos hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA). Éste último (HMG-CoA), es reducido mediante la HMG-CoA reductasa a

---

<sup>37</sup> RUZICKA, L. A. Eschenmoser & H. Heusser the isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, (1953); p. 357-396

<sup>38</sup> WALLACH, O. Terpene und Campher. Zusammenfassungeinigeruntersuchungen auf dem Gebiet der alicyclischen Kohlenstoffverbindungen. 2nd ed. Vit. Leipzig. Germany. (1914); p. 109

<sup>39</sup> CROTEAU, R. The discovery of terpenes. In: *Discoveries in Plant Biology*. Ed: S. D. Kung & S. F. Yang. World Scientific Publ. Hong Kong. (1998); p. 329-343

<sup>40</sup> BANTHORPE, D. V., B. V. Charlwood & M. J. O. Francis. The biosynthesis of monoterpenes. *Chem. New York*, (1972); p. 115-155

<sup>41</sup> CORI, O. M. Enzymic aspects of the biosynthesis of monoterpenes in plants. *Phytochemistry*. New York, (1983); p. 331-341

<sup>42</sup>LOOMIS, W. D. & R. Croteau. Biochemistry and physiology of lower terpenoids. Recent Adv. Phytochem. New York, (1973); p. 147-182

<sup>43</sup>McCASKILL, D. & R. Croteau. Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. Advances Biochem. Engin. Biotechnol. New York, (1997); p. 102-146

ácido mevalónico, que es considerado el paso regulatorio de este ciclo. Por último el ácido mevalónico es transformado al isopentenil difosfato (IPP), que como dijimos es un compuesto de 5 carbonos. Esta última transformación se da en un proceso de tres pasos que comprenden dos fosforilaciones catalizadas por mevalonato quinasa y fosfomevalonato kinasa y un paso final de descarboxilación iluminativa (figura 5).

La ruta Piruvato/Gliceraldehido-3-Fosfato (figura 5), es conocido desde hace poco tiempo. Se caracteriza y diferencia principalmente del ciclo anterior por no tener como intermediario el ácido mevalónico. El paso inicial de este ciclo fue formulado como una reacción transcetolásica entre el gliceraldehido-3-fosfato con los carbonos 2 y 3 del piruvato, produciéndose el intermediario 1-deoxi-d-xilulosa-5-fosfato, mediante la enzima deoxixilulosa fosfato sintetasa. El 1-deoxi-d-xilulosa-5-fosfato será transformado, en un segundo paso, a 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfato, mediante una reacción catalizada por 1-deoxi-d-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa. No son conocidos los siguientes pasos que nos llevarán a la formación final del isopentenil difosfato (IPP), aunque está claro que debe darse reducciones, deshidrataciones y una fosforilación <sup>[44,45]</sup>.

Se cree que en el citosol se da predominantemente la ruta Acetato/mevalonato, produciendo isoprenos que serán usados para la biosíntesis de sesquiterpenos, triterpenos y otros isoprenoides citosólicos. Mientras, en los plastidios serán liberados los isoprenos procedentes de la ruta Piruvato/gliceraldehido-3-fosfato y que serán utilizados estos isoprenos para sintetizar monoterpénos, diterpenos y tetraterpenos. De todas formas este contexto es bastante complicado ya que se puede dar, dependiendo del medio u otras circunstancias, intercambio de isoprenos entre el citosol y los plásmidos<sup>46</sup>.

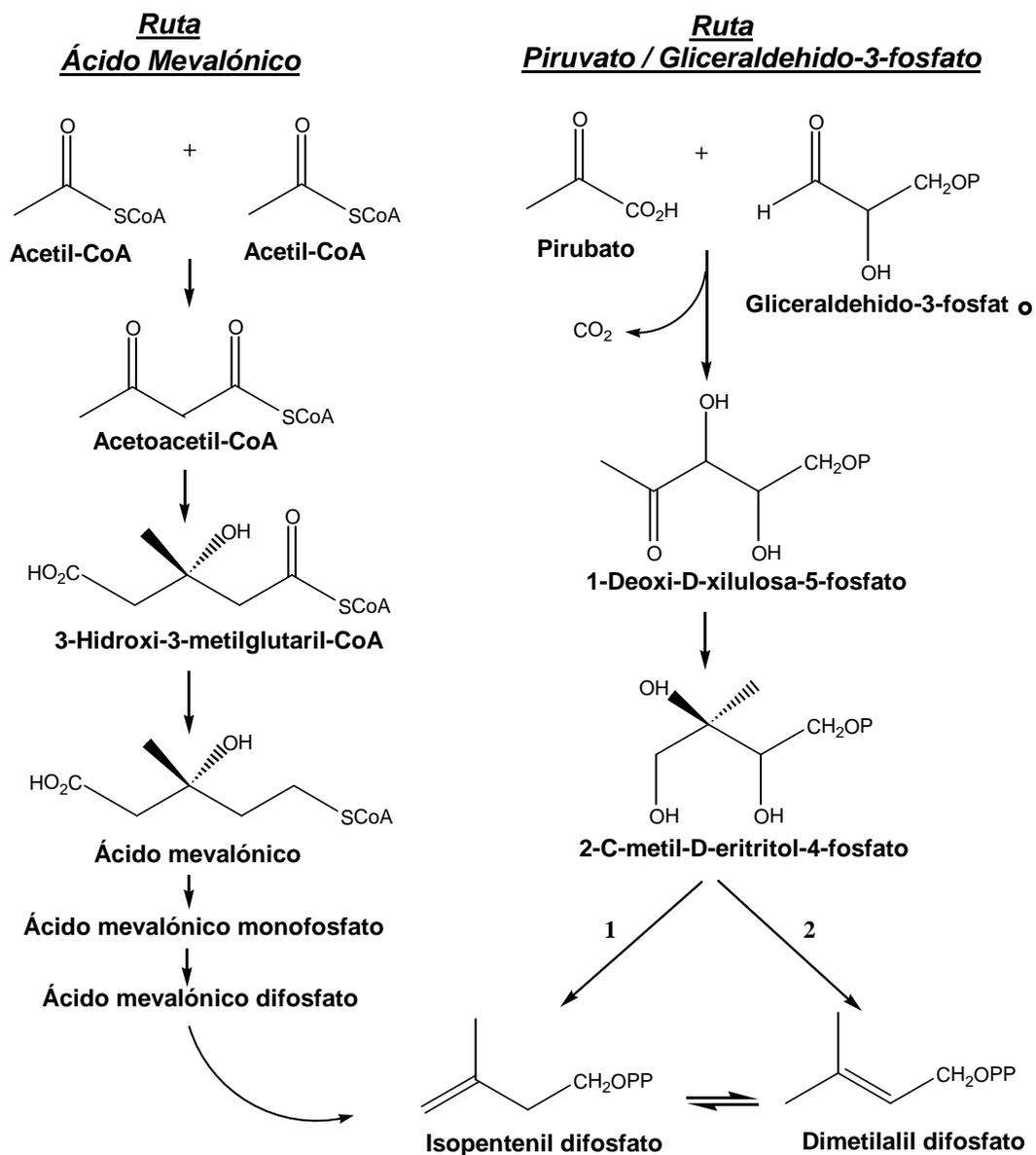
---

<sup>44</sup>NES, N. R. & M. L. Mckean Biochemistry of steroids and other isopentenoids. University Park Press, Baltimore. MD,(1977); p. 217-232

<sup>45</sup>GERSHENZON, J. & R. Croteau. Terpenoidbiosynthese: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In: Lipid Metabolism in Plants. Ed. T. S. Moore. CRC Press, Boca Raton, Fl. (1993); p. 340-388

<sup>46</sup>LITTLE, D. B. & R. B. Croteau. Croteau, Op.cit., p. 239-253

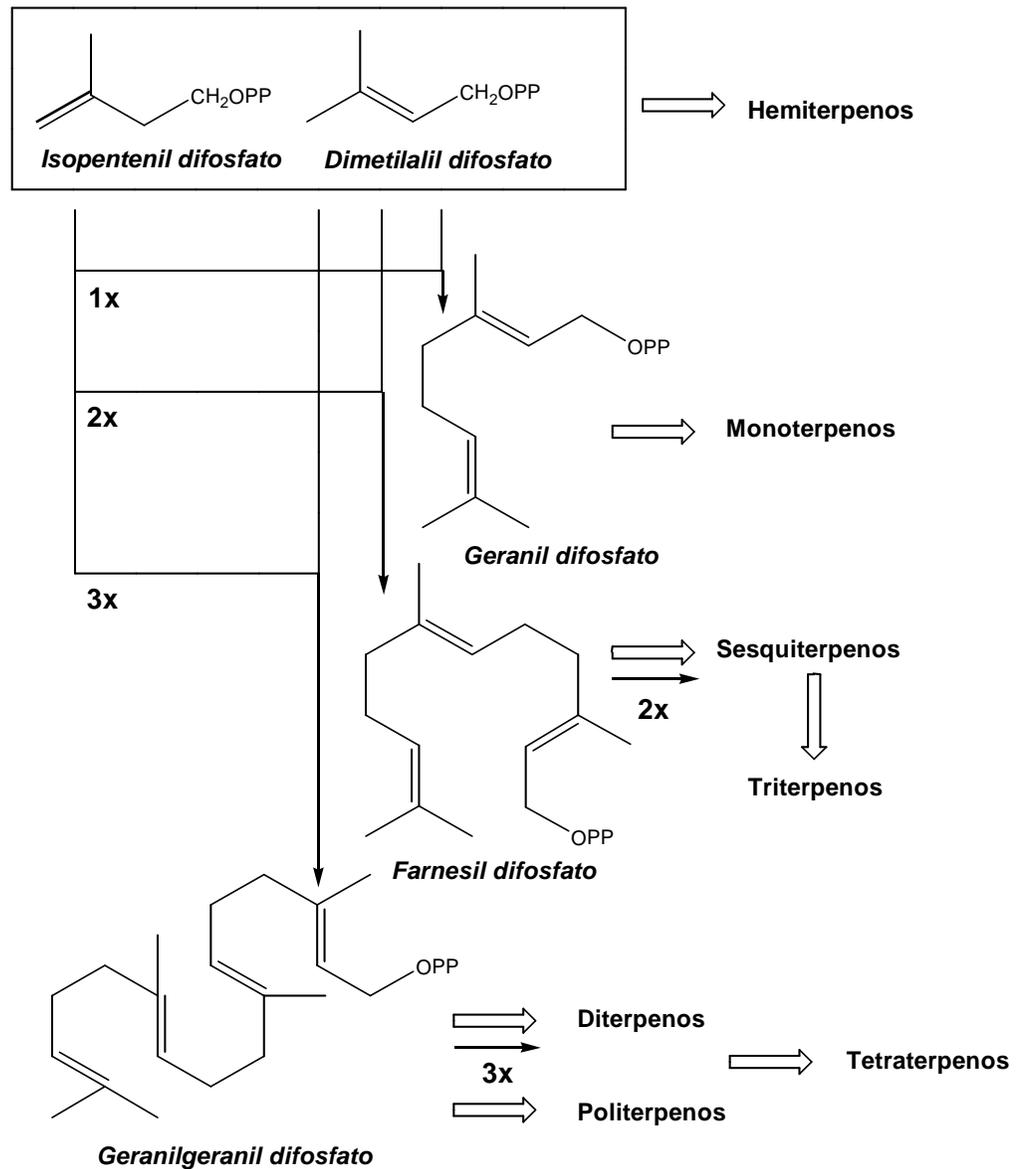
Figura 5. Resumen de la ruta citosólica acetato/mevalonato y la plastidial piruvato/gliceraldehido-3- fosfato hacia el isopentenil difosfato. P y PP indica el fosfato y difosfato respectivamente. CoA indica la Coenzima A.



Fuente: LITTLE, D. B. & R. B. Croteau. Biochemistry of essential oil terpene. A thirty year overview. In: Flavor Chemistry: 30 Year of Progress. Ed. Teranishi et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. (1999); p. 239-253

Una vez fabricado el isopreno, el último paso será la biosíntesis de las diferentes familias terpénicas (figura 6)<sup>47</sup>.

Figura 6. Formación de las diferentes familias de terpenos a través del precursor universal isopentenil difosfato mediante la difosfato isomerasa (encontrada) y preniltransferasas.



Fuente: GERSHENZON, J. & R. Croteau. Terpenoidbiosynthesi: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In: Lipid Metabolism in Plants. Ed. T. S. Moore. CRC Press, Boca Raton, Fl. (1993); p. 340-388

---

<sup>47</sup> GERSHENZON, J. & R. Croteau. , Op.cit., p. 240-388.

Esta síntesis está basada en reacciones de condensación electrolítica entre una molécula de isopentenil difosfato con una molécula de dimetilalil difosfato, el cual deriva de una isomerización reversible del isopentenil difosfato gracias a la isopentenil isomerasa. De esta forma se sintetiza el geranil difosfato (GPP), compuesto de 10 carbonos, que es el precursor de los monoterpenos. Al adicionar otro isopentenil difosfato al geranil difosfato (GPP) se obtiene farnesil Difosfato (FPP), el precursor de los sesquiterpenos y triterpenos, y otra adición de isopentenil difosfato al farsinil difosfato (FPP) dan lugar a geranilgeranil difosfato (GGPP), precursor de diterpenos y tetraterpenos. Las reacciones de condensación electrolíticas antes mencionadas son catalizadas por preniltransferas, llamadas GPP sintetasa, FPP sintetasa y GGPP sintetasa.

En un principio se les consideró a los terpenos volátiles presentes en los aceites esenciales como productos de deshecho del metabolismo de las plantas. Sin embargo, estudios posteriores han dado a estos compuestos volátiles un número importantes de funciones para los seres vegetales que los producen tales como función comunicadora (atracción de polinizadores), defensa ante insectos herbívoros e incluso función alelopática<sup>48</sup>.

## 2.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Los antioxidantes se dividen en dos categorías principalmente que son: sintéticos y naturales. En general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides. Los antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (Butil – hidroxianisol y Butil-hidroxitolueno) han sido utilizados como antioxidantes desde principios del siglo pasado. Sin embargo, se han impuesto medidas de precaución y se ha restringido su uso debido a su carcinogenicidad. Debido a esto, el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado considerablemente ya que la capacidad de actuar como antioxidante se ha demostrado en el laboratorio y mencionado en la literatura<sup>[49, 50]</sup>.

---

<sup>48</sup> PAECH, K. Biochemie und Physiologie der SekundaerenPflanzenstoffe.Springwer-Verlag, Berlin, Germany. (1950); p. 99-110

<sup>49</sup>SOTO H. M. "Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippigraveolenshbkvar. BerlandieriSchafer*)" Fitotecnia Mexicana.Chapingo, México. Vol. 30, No. 1 (enero – marzo 2007); p 43 – 49

<sup>50</sup>DAYMY PINEDA A. "Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos" Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos yIntituto Nacional de Nutrición de Italia In: Rev. Cubana AlimentNutr. La Habana.Vol.13, No 33 (1999); p. 104-111

Muchos antioxidantes naturales, en especial los flavonoides, muestran un amplio rango de efectos biológicos incluyendo funciones antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas y vasodilatadores. Una terapia antioxidante provee una alternativa barata para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo ya que se ha demostrado el efecto antioxidante de productos naturales provenientes de las plantas<sup>51</sup>.

En la actualidad se utiliza, en la industria alimentaria, una serie de técnicas analíticas complejas para disponer de información acerca de los compuestos de naturaleza antioxidante que poseen los alimentos. Dichas técnicas separan y purifican los compuestos de interés. La metodología empleada en esos casos es costosa tanto en dinero como en tiempo, y no muestra el potencial antioxidante de un producto vegetal, puesto que son muchos y muy variados los componentes que pueden contribuir a la capacidad o actividad antioxidante. Además, pueden darse efectos de sinergismo o antagonismo entre los componentes de la muestra vegetal estudiada y, por lo tanto, la actividad de la muestra no coincidiría con la suma de las acciones producidas por las sustancias aisladas. Todos estos problemas unidos a las restricciones en la utilización de antioxidantes artificiales por parte de la legislación alimentaria vigente han promovido un mayor interés por la medida de la denominada "actividad antioxidante" que pueda presentar un determinado alimento <sup>[52, 53, 54, 55]</sup>.

La denominada medida "actividad antioxidante" puede considerarse un parámetro que cuantifica la capacidad de una sustancia biológica compleja, o de un producto natural o artificial, para captar radicales libres<sup>56</sup>. De esta forma se podrá definir la actividad antioxidante como una característica global de un producto en cuestión, independientemente de la composición que éste posea.

---

<sup>51</sup>Y.S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao y B. D. Oomah "Actividad Antioxidante y Fenoles totales y frutas selectas, vegetales y productos de grano". In: Journal Agric Food Chem. Vol. 19, No 22 (1998); p. 349-371

<sup>52</sup> ARNAO, M. B., A. Cano, J. F. Alcolea & M. Acosta. Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigment extract.In: Phytochemical Analysis. Vol. 12, No 34 (2001); p.138-143

<sup>53</sup> PALOZZA, P. & N. I. Krinsky. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. *Meth.enzymol.* New York, (1992); p. 403-420

<sup>54</sup> MILLER, N. J., A. T. Diplock, C. Rice-Evans. Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *In: Agric. Food Chem. New York. Vol. 43, No 29 (1995); p. 1794-1801*

<sup>55</sup> HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. *Ann. In: Rev. Nutr. New York. Vol. 16, No 49 (1996); p. 33-50*

<sup>56</sup> WAYNER, D. D. M., G. W. Burton, K. U. Ingold & S. Locke. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled lipid peroxidation. *FEBS Lett. New York, (1985); p. 33-37*

Por lo tanto, este parámetro podrá ser utilizado para la caracterización de un producto y su evaluación a través del procesado industrial o de su almacenamiento, e incluso formar parte de su control de calidad<sup>57</sup>. Así, diversos autores han centrado sus estudios en la evaluación de la actividad antioxidante total (AAT) de muestras biológicas<sup>[58, 59, 60, 61]</sup>.

Recientemente Miller<sup>62</sup> et al. (1993) propusieron un nuevo método para medir la actividad antioxidante total (AAT) de sustancias puras en muestras de fluidos corporales y en material vegetal, el método TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox), conocido también como método de decoloración del radical ABTS+• 2,2-azino-bis-(3-etylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), este método consiste en la oxidación del ABTS produciendo el denominado radical catión ABTS+• que se caracteriza por ser una excelente herramienta para determinar la actividad antioxidante de agentes donadores de hidrógeno (captadores de radicales en fase acuosa) y de agentes rompedores de cadena (captadores de radicales lipídicos peroxilo). Trabajos posteriores (Rice-Evans & Miller<sup>63</sup>, 1994; Miller<sup>64</sup> et al. 1995; Rice-Evans<sup>65</sup> et al. 1995; Miller & Rice-Evans<sup>66</sup>, 1996) han demostrado que el radical ABTS+• puede ser usado

---

<sup>57</sup> HALLIWELL, B. & J. M. C. Gutteridge. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Meth. Enzymol. New York. Vol. 186 (1990); p. 1-85*

<sup>58</sup> STANLEY, J. & A. Mogg. MAFF antioxidant research programme. *The Biochemist. (Feb/Mar, 1995); p. 22-24*

<sup>59</sup> WAYNER, D. D. M., G. W. Burton, K. U. Ingold & S. Locke. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled lipid peroxidation. *FEBS Lett. New York. Vol. 187 (1985); p 33-37*

<sup>60</sup> JOHNSON, L. E. Food technology of the antioxidant nutrients. *CRC Crit. In: Rev. Food Sci. Nutr. New York. Vol. 35 (1995); p 149-159*

<sup>61</sup> Mc CARTHY, T. L., J. P. Kerry, J. F. Kerry, P. B. Lynch & D. J. Buckley. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science. Vol. 57 (2001); p 45-52*

<sup>62</sup> MILLER, N. J., C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan & A. Milner. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci. Vol. 84 (1993); p. 407-412*

<sup>63</sup> RICE-EVANS, C. & N. J. Miller. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Meth.Enzymol.* Vol. 234 (1994); p. 279-293

<sup>64</sup> MILLER, N. J., A. T. Diplock, C. Rice-Evans. *Op. cit.*, p. 1794-1801

<sup>65</sup> RICE-EVANS, C., N. J. Miller, P. G. Bolwell, P. M. Bramley & J. B. Pridham. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.* Vol. 22 (1995); p. 375-383

<sup>66</sup> RICE-EVANS, C., N. J. Miller & G. Paganga. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* Vol. 20 (1996); p. 933-956  
para medir la actividad antioxidante de una amplia diversidad de compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipófila.

El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342nm, es muy soluble en agua y químicamente estable<sup>67</sup>. El radical ABTS+• una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa, mioglobina) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico o ABAP [2,2'-azobis - (2- amidinopropeno) HCl]<sup>68</sup>, pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734, y 815 nm<sup>69</sup>. El radical ABTS+• es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los antocianos, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria<sup>70</sup>.

La confirmación por parte de diversos ensayos, de que los aceites esenciales poseen actividad antioxidante han promovido los trabajos in vivo, donde se ha observado la acción terapéutica de estas sustancias sobre diversos tejidos<sup>71</sup>. Es relevante señalar que no siempre existe una convergencia entre los resultados in vitro e in vivo debido a los complejos procesos de absorción de una determinada sustancia por parte de un organismo, por lo que será necesario estudios en ambas direcciones<sup>72</sup>.

---

<sup>67</sup> ANTOLOVICH, M. PRENZLER, P.D. PATSALIDES, E. MCDONALD, S and ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.* Vol. 127 (2002); p. 183-198

<sup>68</sup> MILLER, N.J. and RICE-EVANS, C.A. Factores influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Research.* Vol. 26 (1997); p. 195-199

<sup>69</sup> ROBARDS, K. PRENZLER, P.D. TUCKER, G. SWATSITANG, P. and GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* Vol. 66 (1999); p. 401-436

<sup>70</sup> RE, R. PELLEGRINI, N. PROTEGGENTE, A. PANNALA, A. YANG, M. and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* Vol. 26 (1999); p. 1231-1237

<sup>71</sup> RECSAN, Z. PAGLIUCA, M. PIRETTI, L. PENZES, K. YODIM, R. C., Noble & S. G. Deans. Effect of essential oils on the lipids of the retina in the ageing rat: a possible therapeutic use. *Journal of Essential Oil Research.* Vol. 9 (1997); p. 53-56

<sup>72</sup> GALVAO, R. M. & J. Mancini - Filho. Antioxidant activity of spices: evaluation and comparison of in vitro and in vivo methods. *J. Brazilian Soc. Food Nutr.* Vol. 22 (2001); p. 49-62

## 2.6 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

### 2.6.1 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD)

Actualmente, gracias a la evolución de las técnicas de extracción de compuestos de interés biológico presentes en una amplia diversidad de especies de origen natural, ha sido posible combinar diferentes técnicas de extracción con el fin de encontrar nuevos metabolitos secundarios<sup>73</sup>. Tal es el caso de la MWHD, que combina la hidrodestilación (HD) y la extracción por microondas.

El principio de la HD es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. Mientras que la extracción por microondas patentada originalmente en Canadá (Paré y colaboradores, 1989), consiste en calentar el agua contenida en el material vegetal, que a su vez está inmerso en un disolvente transparente a la radiación de microondas<sup>74</sup>.

Teniendo en cuenta estos dos principios, en la MWHD, el calor interno del agua por efecto de su presión de vapor hace que se rompan las estructuras celulares del material vegetal que contienen al AE el cual es recogido sobre un solvente<sup>75</sup>. La principal ventaja de esta técnica es su velocidad, pues pueden lograrse extracciones en minutos<sup>76</sup>, además, se requiere de poco material vegetal y durante la extracción no se afectan la naturaleza química ni la calidad del aceite, ya que la energía de las microondas está por debajo de la energía necesaria para romper los enlaces de las moléculas orgánicas<sup>77</sup>.

El montaje consta de un equipo de destilación tipo Clevenger (figura 7), que emplea un horno microondas para el calentamiento. En el balón A, ubicado dentro del horno se introduce el material vegetal, que se cubre por completo con agua destilada; mediante calentamiento programado se produce la ebullición del agua, que en forma de vapor arrastra los compuestos volátiles a través del refrigerador C, en donde se condensan de tal forma que caen hasta el colector B, que puede o no contener un solvente adecuado para atrapar dichos compuestos.

<sup>73</sup>Métodos de separación en Química Analítica. Universidad del Tolima: Especialización en Productos Naturales, 2004. [En línea]. Colombia [Citado 25 Oct, 2009]. Disponible en Internet: <http://www.ut.edu.co/fc/0940/index.htm>

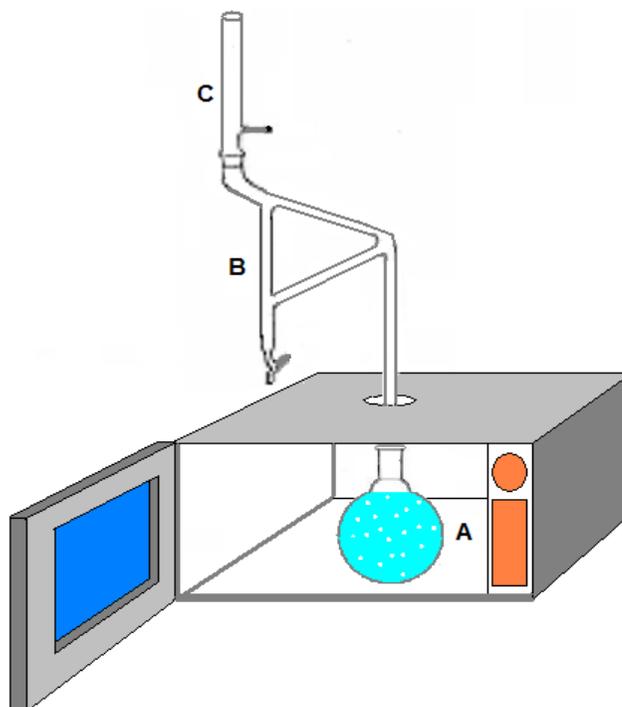
<sup>74</sup>BANDONI, Op. cit., p. 167

<sup>75</sup>Ibíd., p. 168

<sup>76</sup>NAVES, R. Volatile plant constituents. En: Bull. Soc. Chim. France. Vol.3 (1971); p.886-888

<sup>77</sup>Ibíd., p. 889

Figura 7. Equipo de destilación Clevenger.



Fuente: esta investigación

Con el fin de verificar las ventajas de esta técnica, se han realizado estudios comparativos con HD y se ha establecido que la MWHD es una buena alternativa para la extracción de AE's a partir de plantas aromáticas, como por ejemplo; ylang-ylang, albahaca, menta de jardín, tomillo, pimienta blanca y negra y algunas especies de la familia *verbenaceae*. Además, se ha utilizado para la extracción de ácidos grasos en semillas de eneldo y cilantro <sup>[78 -- 81]</sup>.

---

<sup>78</sup>Ibíd., p. 901.

<sup>79</sup> SERRANO, Martín. Estudio de la variación del aroma de flores de Ylang- Ylang, en función del tiempo de su almacenamiento y hora de recolección, y de su posible actividad antioxidante "in vitro". Bucaramanga. Tesis (Magíster en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Área de productos naturales. (2002); p.93

<sup>80</sup> LUCCHESI, Marie; CHEMAT, Farid y SMADJA, Jacqueline. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. In: Journal of Chromatography A. New York. Vol.1043 (2004); p. 323-327

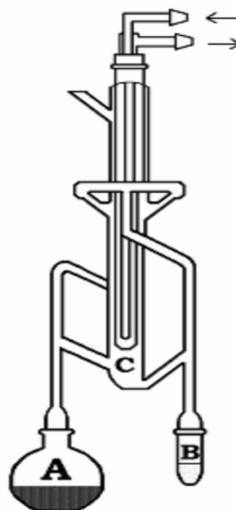
<sup>81</sup> PLESSI, M. BERTELLI, D. y MIGLIETTA, F. Effect of microwaves on volatile compounds in White and Black Pepper. In: Lebensmittel- Wissenschaftund-technologie, New York. Vol.35 (2005); p. 260-264

## 2.6.2 Destilación Extracción Simultanea (DES)

Lickens y Nickerson (1964), diseñaron un equipo para la extracción-destilación simultánea (SDE). Con esta técnica se pueden extraer cantidades considerables de componentes, partiendo de muestras líquidas o sólidas, utilizando cantidades de solvente muy pequeñas<sup>82</sup>.

La muestra a extraer es colocada en el balón A y en el balón B el solvente, cada uno de estos balones está conectado al mismo sistema de condensación C, como se muestra en la Figura 8. Estos balones se calientan por separado a diferentes temperaturas, el balón A se lleva hasta ebullición, mientras el balón B se mantiene a temperaturas por debajo del punto de ebullición del solvente para evitar su evaporación total. El agua, el solvente y el extracto se condensan al mismo tiempo, el solvente arrastra y concentra el extracto en el balón que contiene el solvente separándolo del vapor de agua, este es un proceso continuo<sup>83</sup>.

Figura 8. Instrumento utilizado para la extracción destilación simultanea (DES)



Fuente: SERRANO, Martín. Estudio de la variación del aroma de flores de Ylang-Ylang, en función del tiempo de su almacenamiento y hora de recolección y de su posible actividad antioxidante “*in vitro*”. Bucaramanga, 2002, 93p. Trabajo de grado (Magister). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias. Escuela de química área de productos naturales.

---

<sup>82</sup> LICKENS, S. T., y G. B. NICKERSON, 1964.-Am. Soc. Brewing Chem. Proc. New York. 1964.

<sup>83</sup> SERRANO, Martín. Op.cit., p. 35

En 1970, Maarse y Kepher<sup>84</sup> introdujeron una modificación al sistema, aplicando una trampa de vacío para evitar la prematura condensación del vapor y un condensador de hielo seco con el fin de minimizar las pérdidas del disolvente. Posteriormente, en 1974, Römer y Renner<sup>85</sup> adaptaron un generador de vapor externo al equipo original.

Buttery *et al.* (1976), modificaron el sistema diseñado por Lickens-Nickerson<sup>86</sup>, con el fin de obtener los extractos a presión reducida y de esta manera minimizar la degradación y aparición de componentes extraños ocasionados por las elevadas temperaturas que requiere la técnica cuando se trabaja a presión atmosférica, tal como fue diseñada originalmente<sup>87</sup>.

Estudios realizados por Jennings *et al.* (1977) sobre el empleo de diferentes técnicas para la preparación de la muestra, incluyendo el atrapamiento sobre polímeros porosos y la destilación-extracción simultánea, les llevó a la conclusión de que ninguna técnica conducía hacia resultados que reprodujesen la muestra original; no obstante, con el sistema de destilación-extracción los resultados eran más próximos a los reales<sup>88</sup>.

## 2.7 TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS

### 2.7.1 Cromatografía de gases (CG)

La cromatografía de gases es una técnica de separación basada principalmente en fenómenos de partición entre una fase móvil gaseosa (helio, argón, hidrógeno, nitrógeno) y una fase estacionaria constituida por un líquido muy viscoso retenido en el interior de una columna cromatográfica. La columna se coloca en un horno con temperatura regulable y programable, lo que nos permite influir de forma decisiva en la separación de los componentes de la

---

<sup>84</sup> MAARSE, H., Kepher, R. E. Change in composition of volatile terpenes in Douglas fir needles during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 18 (1970); p.1095-1101.

<sup>85</sup> RÖMER, G., Renner, E. Simple methods for the isolation and enrichment of flavour materials from food. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, Vol 156 (1974); p. 329-325.

<sup>86</sup>LICKENS, S. T., y G. B.NICKERSON, 1964.-Am. Soc. Brewing Chem. New York. 1964

<sup>87</sup>Buttery, R. G., Guadagny, D. G., Ling, L.C., Seifert, R. M., Lipton, W. Additional volatile components of cabbage, broccoli and cauliflower. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 24 (1976); p. 829-835.

<sup>88</sup>JENNINGS, M. E., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw, W., Chemat, F. Methods of isolationL.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. Vol. 79 (1977); p.1079-1086

mezcla. El cromatógrafo se completa con un sistema de inyección, que nos permite introducir la muestra en la columna y un detector que muestra las diferentes sustancias a medida que van saliendo de la columna, una vez separadas. Las columnas cromatográficas utilizadas actualmente son de tipo capilar: están constituidas por un tubo de cuarzo flexible de diámetro muy pequeño (normalmente 0.25 mm) y muy largo (25 a 60 m, hasta 200 m); proporcionan alta resolución y permiten separar las mezclas multicomponentes de sustancias de diversa polaridad y/o peso molecular (monoterpenos, sesquiterpenos, etc.)<sup>89</sup>

#### 2.7.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS)

La espectrometría de masas es una herramienta analítica cuyo objetivo primordial es determinar la masa molecular de la sustancia de interés, así como proporcionar una valiosa información estructural de la misma. Para determinar la masa molecular es necesario ionizar la molécula mediante diferentes técnicas como Impacto Electrónico (IE), Ionización Química (IQ), etc. El acoplamiento de la Cromatografía Gaseosa previa a la Espectrometría de masas aporta una poderosa técnica de identificación de estructuras que se encuentran en forma de mezcla compleja, como es el caso de los aceites esenciales. Cada uno de los componentes puros de un aceite esencial, separados por CG y representados en un cromatograma por un pico simple (Williams, 1996), se transfiere directamente al espectrómetro de masas, en el que sufre los diversos procesos de ionización, fragmentación y detección.

El cromatograma obtenido aporta la información sobre los porcentajes relativos de cada uno de los componentes en la mezcla, al mismo tiempo que la información espectral de cada pico permite identificar a las diversas sustancias que la forman<sup>[90, 91, 92]</sup>.

---

<sup>89</sup>BANDONI, Op. cit., p. 329

<sup>90</sup>WILLIAMS, DH.& I, Fleming.Spectroscopic Methods in Organic Chemistry, McGraw-Hill. Ed. Publishing Co., London, (1966); p. 288-291

<sup>91</sup> ESTEBAN, J. L. MARTÍNEZ-CASTRO, I. & SANZ. Evaluation and optimization of the automatic thermal desorption (ATD) method in the gas chromatographic determination of plant volatile compounds. J. Chromatogram. A 657. (1993); p. 155-164

<sup>92</sup> SEFIDKON, F.ABDOLI, M. (Research Institute of Forests and Rangelands, PO Box 13185-116, Tehran, Iran) Essential oil composition of *Aziliaeryngiodes* (Pau) Hedge et Lamond from Iran. Journal of EssentialOilResearch, Vol. 16 (2004); p. 103-104

### 2.7.3 Correlación entre GC/MS e índices de retención de Kovats ( $I_k$ ).

Los tiempos de retención y los índices de retención de Kovats no son información suficiente por si solos para asegurar una identificación positiva en el caso de mezclas complejas como los AE's. Una aproximación adicional consiste en combinar la especificidad y/o reproducibilidad de los índices de retención con los patrones de fragmentación obtenidos por espectrometría de masas, para el componente correspondiente al tiempo de retención considerado<sup>93</sup>.

Los  $I_k$  indican el orden de aparición de los compuestos respecto a parafinas lineales, su determinación se hace dependiendo de las condiciones de temperatura a las que se haya realizado el análisis de la muestra.El análisis más común se realiza a temperatura programada, en donde los tiempos de retención de una serie homóloga aumentan en forma lineal con el número de carbonos y la ecuación que los relaciona tiene la siguiente expresión:

$$I_k = 100 \left[ \frac{t_{Rx} - t_{Ry}}{t_{Rz} - t_{Ry}} \right] + 100y$$

Ecuación 1

$y$  = número de átomos de carbono del n-alcano menor

$t_{Rx}$  = tiempo de retención del componente x

$t_{Ry}$  = tiempo de retención del n-alcano menor

$t_{Rz}$  = Tiempo de retención del n-alcano mayor <sup>94</sup>.

---

<sup>93</sup>A. PABLO, Op. Cit., p. 10.

<sup>94</sup> ALVAREZ, M., Alba Teresa. Aislamiento, purificación e identificación de principios toxicosalcoloidales en plantas del genero *crotalarina* y alimento contaminado para aves. Bucaramanga. Tesis (Magister en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Área de Productos Naturales. (2004); p. 135

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Recolección del material vegetal

El muestreo se realizó en el corregimiento de El Encano. La recolección del material vegetal se hizo en época de verano, cuando las plantas se hallaban en plena fase de floración. Las muestras fueron tomadas de acuerdo al diseño experimental completamente aleatorizado (DCA), escogido por su simplicidad y porque no presenta restricciones de aleatoriedad, lo que quiere decir que los tratamientos se asignan a las unidades experimentales sin formar subgrupos.

En total se recolectaron 50 Kg de Hoja fresca, estas muestras se empaclaron en bolsas grandes de papel, y se llevaron al Laboratorio de Compuestos Heterocíclicos y Productos Naturales de la Universidad de Nariño para su respectivo secado.

El proceso de secado tuvo como fin: por un lado, estabilizar y conservar la planta seca con las mismas propiedades y principios activos que contiene la planta fresca, y por otro, evitar procesos físico-químicos de degradación del material. El material vegetal se secó hasta que alcanzo un contenido de humedad del 13%. Una vez seco el material vegetal, se almacenó sin riesgo a la degradación debida a procesos biológicos.

Para la extracción del aceite esencial presente en las hojas de la especie vegetal *Ambrosia arborescens* Miller, se utilizaron dos técnicas, la hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) y la destilación-extracción simultánea (DES).El procedimiento se describe a continuación.

#### 3.2 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD)

Se introdujeron 100g de hoja seca de la planta Altamisa en un balón de 2 litros de capacidad y se adicionaron 1.5L de agua destilada, acoplado todo el sistema de acuerdo con el montaje de la figura 9, que se encuentra en laboratorio de investigación de la Universidad de Nariño.

La extracción del AE se realizó utilizando un horno microondas marca SAMSUNG, modelo AMW8113ST/XAP, con una potencia máxima de 1100W y 10 niveles de potencia (10 = 100 % de la potencia máxima).

Los extractos se obtuvieron teniendo en cuenta los siguientes parámetros: las potencias estimadas fueron: 4, 6, 8 y 10 (correspondientes al 40, 60, 80, y 100% de la potencia máxima). Por cada potencia se evaluaron cuatro tiempos de extracción (30, 60, 90 y 120 minutos). Esta parte experimental se hizo por triplicado, realizándose un total de 48 extracciones.

Figura 9. Equipo para MWHD.



Fuente: esta investigación.

Las especificaciones del diseño experimental se describen a continuación.

Tabla 1. Especificaciones de extracción por la técnica MWHD.

| Resumen del Diseño Experimental |                  |   |
|---------------------------------|------------------|---|
| Clase de diseño                 |                  | Factorial completo de dos factores                                    |
| Número de extracciones          | 48 aleatorizadas |   |
| Factores experimentales         | Potencia         | 4 Niveles (40, 60, 80 y 100%)<br>4 Niveles (30, 60, 90 y 120 minutos) |

|                        |   |  |
|------------------------|---|--|
|                        | Tiempo  |  |
| Variables de respuesta | Intensidad y número de picos en el cromatograma |  |

De los extractos se tomaron alícuotas de 1,00µl, las cuales se analizaron por GC-FID, usando un cromatógrafo de gases GC-17A ShimadzuQP5000/QP5050A (que se encuentra en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño), dotado con un puerto de inyección split/splitless, con una columna cromatográfica DB-5 de 30m de longitud, 0.25mm de diámetro interno y 0,25µm de espesor de fase estacionaria, a las siguientes condiciones cromatográficas: temperatura de inyección 250°C, temperatura del detector 280°C, temperatura de la columna 40°C por 5 minutos; 5°C/min hasta 250°C por 15min, obteniéndose un tiempo total de 62min; se utilizó Helio como gas de arrastre a una presión de 134KPa con una razón split 30:1 y velocidad de 40cm/seg.

### 3.3 Destilación extracción simultánea (DES)

Para la obtención de los metabolitos secundarios volátiles por DES, se emplearon 8g de hoja seca (teniendo en cuenta la capacidad del balón empleado en este montaje), los cuales se depositaron en el balón A (figura 8) con 200 mL de agua destilada, el balón A se lo sumergió en glicerina hasta que el nivel de glicerina permaneció por encima del nivel de la muestra con agua, esto con el fin de obtener una mejor homogenización del calor dentro del balón. En el balón B se adicionaron 50mL de solvente (diclorometano) y se lo sumergió en agua. Una vez listo el montaje (figura 10), se calentaron los dos balones hasta que los solventes alcanzaron el punto de ebullición.

Figura 10. Equipo para DES



Fuente: esta investigación

Las extracciones del aceite esencial se realizaron a diferentes tiempos: 30, 60, 90 y 120 minutos. Esta parte experimental se realizó por triplicado, obteniéndose un total de 12 extractos. Las especificaciones del diseño experimental se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Especificaciones de extracción por la técnica DES.

| Resumen del Diseño Experimental |   |
|---------------------------------|---|
| Clase de diseño                 | Catagórico de único factor                      |
| Número de extracciones          | 12 aleatorizadas                                |
| Factor experimental             | Tiempo (4 Niveles: 30, 60, 90 y 120 minutos)    |
| Variables de respuesta          | Intensidad y número de picos en el cromatograma |

El análisis cromatográfico de los extractos, se hizo a las mismas condiciones descritas en el numeral 3.2.

### 3.4 Determinación de la capacidad antioxidante por el método TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox)

a) Preparación de la solución stock del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>: se generó el catión-radical ABTS<sup>•+</sup>, tras la reacción del ABTS 7mM con persulfato de potasio

2,45mM. La solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 24 horas. Posteriormente, la solución *stock* del cromóforo ABTS+• se diluyó en metanol hasta conseguir una absorbancia de 0.950 ( $\pm 0.4$ ) a una longitud de onda de 734 nm (solución W) <sup>95</sup>.

b) Preparación de la curva de calibración con Trolox: se preparó una solución 10 mM de Trolox, disolviendo 25 mg de Trolox en 10 mL de metanol HPLC; a partir de esta solución se prepararon soluciones diluidas de 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 mM.

c) Preparación de las muestras a evaluar: para verificar la funcionalidad del método, se emplearon dos sustancias antioxidantes de referencia, Ácido ascórbico y 2,6-bis(1,1-dimetil-4-metilfenol) (BHT), en concentración 0.634 mM y 1.5 mM respectivamente. El aceite esencial, objeto de estudio, se preparó a una concentración del 2.22% p/v, en metanol HPLC.

d) Medición de la capacidad antioxidante: para la preparación del blanco, se adicionaron 30  $\mu$ L de metanol (HPLC) a 3 mL de la solución W. Esta solución se homogenizó con un agitador Fisher Scientific, fixed speed mini vortex durante 1 min y se dejó en reposo por 6 min. Al cabo de este tiempo se midió la absorbancia a 734 nm. Este procedimiento se repitió para los patrones de Trolox y las muestras a evaluar.

La capacidad de captura de radicales se expresó como la capacidad antioxidante total, en mmol de Trolox por Kg de sustancia. El procedimiento se realizó por triplicado.

---

<sup>95</sup>RE, R.PELLEGRINI, N.PROTEGGENTE, A.P.YANG, M.; and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS+• radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 26(1999); p. 1231-1237

### 3.5 Normalización o porcentaje por áreas

Con base en el cromatograma de la muestra separada, es posible cuantificar cada uno de sus componentes por el área bajo la curva. La normalización por áreas, es un medio para establecer el porcentaje de cada componente en la muestra. Este se determinó dividiendo el área de cada componente entre el área total y multiplicando por 100%, es decir:

$$\% A = \frac{\text{Area de A}}{\text{Area total}} \times 100$$

Ecuación 2

### 3.6 Análisis estadístico

La interpretación de los resultados obtenidos a partir del estudio de cualquier fenómeno natural como la producción de metabolitos secundarios en especies vegetales, requiere tener en cuenta aspectos fundamentales que influyen directamente con el análisis de los mismos. El carácter variable de estos

fenómenos es uno de los rasgos más extendidos y consiste en que sus manifestaciones no se repiten exactamente, de modo que al estudiar las mediciones que se obtienen, éstas nunca son completamente iguales, esto se debe a que además de los factores que hacen parte del estudio, existen factores incontrolables, tales como la heterogeneidad del suelo, diferencia genética entre plantas, factores climáticos, errores humanos, entre otros, que es necesario considerar a la hora de interpretar los resultados obtenidos. Esta es la principal razón de la variabilidad que se encuentra en el mundo natural <sup>96</sup>.

En esta investigación se efectuó un diseño irrestrictamente al azar (DIA), como su nombre lo dice, los tratamientos se distribuyen al azar en todas las unidades experimentales, pudiendo ser el número de repeticiones igual o diferente. Generalmente se usa este diseño, en experimentos en donde la variabilidad es pequeña y donde se puedan controlar algunos factores que muy a menudo la aumentan; este diseño se recomienda en fenómenos en donde se van a dedicar a la experimentación uniforme con los factores que pueden influenciar sobre los resultados del experimento y aun así, debe combinarse con el análisis de varianza para mayor precisión.

La principal herramienta utilizada para manejar e interpretar datos de este tipo es el análisis estadístico, a través de un diseño de experimentos que relaciona los tratamientos y las unidades experimentales en términos de estímulos y respuestas, que se avalúan mediante el Análisis de Varianza (ANOVA), que determina si las diferencias entre los tratamientos aplicados son significativos o pueden atribuirse al error experimental <sup>97</sup>.

---

<sup>96</sup> WILDT, A. y AHTOLA, O. Analysis de covariencia. Ed. Sage publications. London(1987); p.07-102.

<sup>97</sup> ALVAREZ, M, Op. cit., p. 44.

Con el fin de optimizar las condiciones de extracción del aceite esencial presente en las hojas de *Ambrosia arborescens* Miller, utilizando como variables de respuesta la intensidad y el número de picos presentes en el cromatograma, se utilizaron dos modelos para el ANOVA:

El primer modelo (utilizado para el análisis de los datos obtenidos por la técnica DES), que utiliza una sola variable independiente o factor y una variable dependiente, llamado ANOVA de un factor o unifactorial, compara grupos o muestras que difieren sistemáticamente en un solo factor. El modelo matemático se muestra en la ecuación 3.

$$X_{ij} = \mu + T_i + E_{ij} \text{Ecuación 3}$$

$X_{ij}$  = variable de respuesta del tratamiento i, repetición j

$\mu$  = media general del experimento

$T_i$  = efecto del tratamiento j

$E_{ij}$ = componente aleatorio llamado error experimental para el tratamiento  $i$ , repetición  $j$ .

El segundo modelo (utilizado para el análisis de los datos obtenidos por la técnica MWHF), llamado ANOVA de dos factores o Multifactorial. Está diseñado para construir un modelo estadístico describiendo el impacto de dos o más factores categóricos  $X$  sobre la variable dependiente  $Y$ . Para ello, se realizan pruebas de significación para determinar si hay o no diferencias significativas entre las medias a diferentes niveles de los factores y si hay o no interacciones entre estos<sup>98</sup>.

Cuando se estableció la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, fue necesario realizar una prueba de significación (diferencia mínima significativa), la cual permitió determinar si las diferencias eran significativas o si se podían justificar solo por variaciones aleatorias. Según Colton Hays y Sachs, por medio del cálculo de la diferencia mínima significativa (DMS) y su comparación con las diferencias entre las medias de los tratamientos, se puede establecer cuál de los tratamientos empleados es el más apropiado, de tal forma que existirán diferencias significativas, si el valor absoluto de la diferencia entre las medias es mayor al valor establecido para la DMS, el cual se determina aplicando la ecuación 4.

---

<sup>98</sup> ARKIN, Herbert y COLTON, Raidmond. Métodos estadísticos. Ed. Continental. Mexico. (1970); p. 151-169

$$DMS = t^* \sqrt{(2CMe/r)} \quad \text{Ecuación 4}$$

$t$ , de Student: asociada a la probabilidad de función de los grados de libertad

CMe: corresponde a los cuadrados medios del error.

$r$ : número de repeticiones <sup>[99, 100]</sup>.

---

<sup>99</sup> HAYS, William. Statistics for the social sciences. New York: Hold, Rinehart and Winston. New York.(1973); p. 403-404

<sup>100</sup> SACHS, Lothar. Estadística aplicada. Ed. Labor. Barcelona.(1978); p. 192-195

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La identificación del material vegetal se realizó en el herbario PSO de la Universidad de Nariño sede Torobajo. La descripción de la especie vegetal se hace a continuación.

Nombre común: Altamisa; Marco

Nombre científico: *Ambrosia arborescens* Miller.

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Género: *Ambrosia*

Especie: *Arborescens*

Características: Planta anual, Arbusto leñoso de aproximadamente 2 metros, hojas alternas, hojas con olor característico, hojas de color verde

oscuras en el az y verde claro en el envez, palmatipartidas, inflorescencia en capitulo, fruto aquenio.

Figura 11. Especie vegetal *Ambrosia arborescens* Miller.



Fuente: esta investigación

#### 4.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL PRESENTE EN LAS HOJAS DE *Ambrosia arborescens* Miller.

Para la extracción del aceite esencial presente en las hojas de *Ambrosia arborescens* Miller, se utilizaron dos métodos: la hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWH) y la destilación extracción simultánea (DES). A los extractos obtenidos por medio de estas técnicas, se les realizó el correspondiente análisis cromatográfico (CG-FID), a partir de los cuales se calcularon los índices de Kovats, permitiendo la identificación tentativa de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial. Además, a partir de estos datos, se encontró las mejores condiciones de extracción del aceite esencial, utilizando como variables de respuesta la intensidad y número de picos presentes en los cromatogramas.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), el cual separa y estima las diferentes causas de variación entre los tratamientos aplicados. En la prueba F (de Fisher) del ANOVA se consideró un nivel de significación  $P = 0,05$  en todos los análisis. Cuando se estableció la existencia de diferencias significativas entre tratamientos, estos fueron

separados a través del método de Fisher (DMS). Para la generación de graficasse utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus Versión 5.1.

Para la optimización de las condiciones de extracción del AE, por medio de la técnica DES, se utilizó para el análisis estadístico de los datos, el ANOVA de un factor, que utiliza una sola variable independiente (Tiempo) y como variables de respuesta la intensidad y número de picos presentes en el cromatograma. Los 4 niveles del factor estudiados fueron tiempos de 30, 60, 90 y 120 min.

Para la optimización de las condiciones de extracción del AE, por medio de la técnica MWHD, se utilizó en el análisis estadístico de los datos, el ANOVA de dos factores, el cual describe el impacto de los dos factores utilizados: Potencia del microondas (con 4 niveles: 40, 60, 80 y 100% de la potencia máxima del equipo) y Tiempo (con 4 niveles: 30, 60, 90 y 120 min), sobre la variable de respuesta.

#### 4.2.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL AE UTILIZANDO LA TÉCNICA MWHD

Para la optimización de las condiciones de extracción del aceite esencial presente en las hojas de *Ambrosia arborescens* Miller, por medio de la técnica MWHD, se excluyó del análisis las señales cromatográficas que proporcionaron información no relevante (picos con bajo porcentaje de área), estimando de esta manera las señales más significativas. Por lo tanto, se consideró para el análisis, solo aquellos picos cromatográficos que presentaron un porcentaje de área igual o mayor al 1%.

En la tabla 3 se presenta el número de señales obtenidas bajo diferentes condiciones de extracción: potencia del microondas y tiempo de exposición de la muestra a la radiación.

Tabla 3. Numero de señales obtenidas en los cromatogramas por MWHD

| TIEMPO<br>(%) (min) | 30             | 60             | 90             | 120            |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| POTENCIA            |                |                |                |                |
| 40                  | 28<br>29<br>32 | 18<br>19<br>19 | 13<br>13<br>13 | 16<br>16<br>16 |
| 60                  | 12<br>10<br>13 | 11<br>8<br>11  | 13<br>15<br>15 | 13<br>15<br>15 |
| 80                  | 9<br>9<br>9    | 13<br>13<br>14 | 14<br>13<br>12 | 13<br>13<br>13 |
| 100                 | 13<br>13       | 13<br>11       | 13<br>13       | 12<br>12       |

|  |    |    |    |    |
|--|----|----|----|----|
|  | 11 | 12 | 14 | 12 |
|--|----|----|----|----|

Para el análisis estadístico de los datos de la tabla 3, se utilizó el análisis de varianza de dos factores (Tabla 4), el cual permite estudiar simultáneamente los efectos de las fuentes de variación (potencia y tiempo) sobre la variable dependiente. Los cálculos detallados del ANOVA se muestran en el anexo A.

Tabla 4. ANOVA de dos factores (Potencia, Tiempo)

| Fuente              | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado Medio | Cociente F | Valor Crítico F |
|---------------------|-------------------|----|----------------|------------|-----------------|
| Efectos principales |                   |    |                |            |                 |
| A:Potencia          | 439,063           | 3  | 146,354        | 140,50     | 2,901           |
| B:Tiempo            | 40,2292           | 3  | 13,4097        | 12,87      | 2,901           |
| Interacciones       |                   |    |                |            |                 |
| AB                  | 517,854           | 9  | 57,5394        | 55,24      | 2,189           |
| Residuos            | 33,3333           | 32 | 1,04167        |            |                 |
| Total (corregido)   | 1030,48           | 47 |                |            |                 |

P (Nivel de significación de la prueba)  $P = 0.05$

a) Para el análisis entre potencias (factor A), se comprobó las siguientes hipótesis (Ho: hipótesis nula; Hi: hipótesis alternativa):

Ho<sub>(A)</sub> = Al modificar las potencias se obtienen igual número de picos en el cromatograma.

Hi<sub>(A)</sub> = Existen diferencias significativas en el número de picos cromatográficos al variar las potencias.

La tabla 4 muestra que el valor calculado del cociente F para el factor A, excede al valor crítico F (obtenido de tablas estadísticas), por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, indicando que existen diferencias estadísticamente significativas en el número de picos cromatográficos al variar las potencias, por lo que se hace necesario desarrollar una prueba de significación que permita diferenciar cual o cuales tratamientos son más significativos. Esta prueba es la diferencia mínima significativa de Fisher (DMS) (el cálculo de la DMS se muestra en el anexo B), de la cual se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 5. Diferencia mínima significativa (Potencias)

| Potencia (%) | n N° de Picos | Media estándar | Error confianza(95%) | Intervalo de homogéneos | Grupos |
|--------------|---------------|----------------|----------------------|-------------------------|--------|
| 80           | 12            | 12,0833        | 0,294628             | +/- 0,60015             | X      |
| 100          | 12            | 12,4167        | 0,294628             | +/- 0,60015             | X      |
| 60           | 12            | 12,5833        | 0,294628             | +/- 0,60015             | X      |
| 40           | 12            | 19,3333        | 0,294628             | +/- 0,60015             | X      |
| Contraste    |               | Diferencias    |                      | +/- DMS                 |        |
| 40 - 60      |               | *6,75000       |                      | 0,848724                |        |

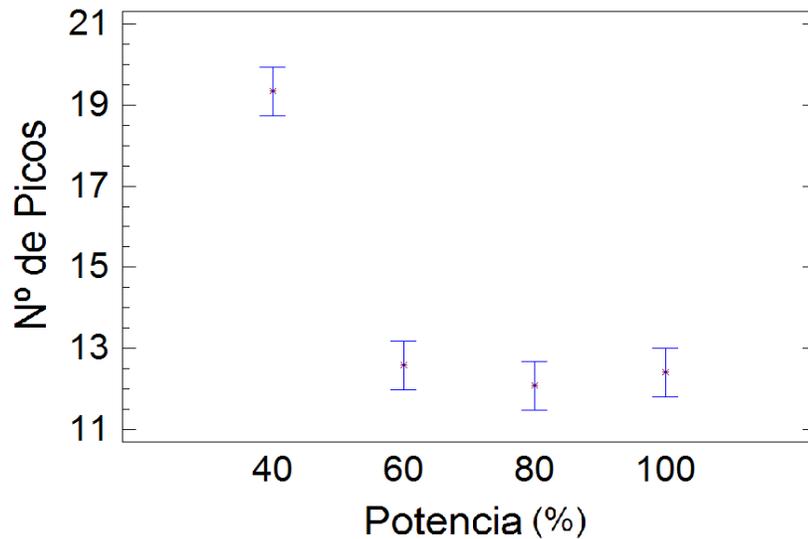
|          |          |          |
|----------|----------|----------|
| 40 - 80  | *7,25000 | 0,848724 |
| 40 - 100 | *6,91667 | 0,848724 |
| 60 - 80  | 5,00000  | 0,848724 |
| 60 - 100 | 0,16667  | 0,848724 |
| 80 - 100 | -0,33333 | 0,848724 |

---

En la parte superior izquierda de la tabla 5, se muestra los grupos o niveles que toma el factor (potencia (%)), así como el tamaño de la muestra (n) y la media muestral obtenida para la variable de análisis en cada grupo, con su respectivo error estándar. A la derecha aparece el campo, grupos homogéneos, el cual muestra las diferencias entre cada grupo, marcándolos con uno o más signos (X). Los grupos marcados se interpretan de la siguiente manera: se considera que no hay diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95%, entre las medias de los picos cromatográficos de aquellos grupos que tengan el signo (X) en la misma columna. Analizando los datos de la parte superior de la tabla, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo (X) en la columna. El primer grupo corresponde a las potencias (%) de 80,100 y 60, el segundo grupo corresponde únicamente a la potencia de 40. Se puede observar en la tabla 5, que el valor de la media de los picos cromatográficos para el segundo grupo, es significativamente mayor en comparación con las medias del primer grupo.

En la parte inferior derecha de la tabla, se indica el valor calculado de la MDS igual a 0,848724. La mitad inferior de la tabla, muestra la mínima diferencia estimada entre cada par de medias del Contraste. Al comparar el valor de la MDS con las diferencias entre las medias obtenidas de los contrastes 40-60, 40-80 y 40-100 (indicados con asterisco), se observa que estos datos son mayores que el valor (0,848724), indicando que el tratamiento realizado a la potencia de 40%, presentó una diferencia estadísticamente significativa respecto a las otras potencias, con un nivel de confianza del 95,0%. Esta diferencia se observa claramente en la figura 12.

Figura 12. Comparación entre medias de los picos cromatográficos para cada potencia.



Fuente: esta investigación

En la figura 12, cada punto representa la media de los picos cromatográficos para cada potencia con un intervalo de confianza del 95% (+/- 0,60015). Si los intervalos de confianza de cada punto se solapan horizontalmente, se puede decir que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles del factor. En la figura se observa que el único punto que no presenta solapamiento horizontal, es el que pertenece a la potencia de 40%.

Por lo tanto, se puede concluir que la potencia a la cual se obtiene el mayor número de picos en el cromatograma es a la potencia de 40%, con un nivel de confianza del 95%.

b) Para el análisis entre los tiempos (Factor B), se comprobó las siguientes hipótesis:

$H_{0(B)}$  = A diferentes tiempos se obtienen igual número de picos en el cromatograma.

$H_{i(B)}$  = Existen diferencias significativas en el número de picos cromatográficos al variar el tiempo.

Según los resultados obtenidos en la prueba F del ANOVA (tabla 4) para el factor B, se rechaza la hipótesis nula y se acepta que existen diferencias estadísticamente significativas en el número de picos cromatográficos al variar el tiempo, por lo que se recurrió a la prueba de Fisher (DMS), para encontrar el tratamiento más significativo. Los resultados de esta prueba se indican a continuación.

Tabla 6. Diferencia mínima significativa (Tiempo)

| Tiempo (min) | n  | Media Nº de Picos | Error estándar | Intervalo de confianza (95%) | Intervalo de homogéneos | Grupos |
|--------------|----|-------------------|----------------|------------------------------|-------------------------|--------|
| 90           | 12 | 13,4167           | 0,294628       | +/- 0,60015                  |                         | X      |

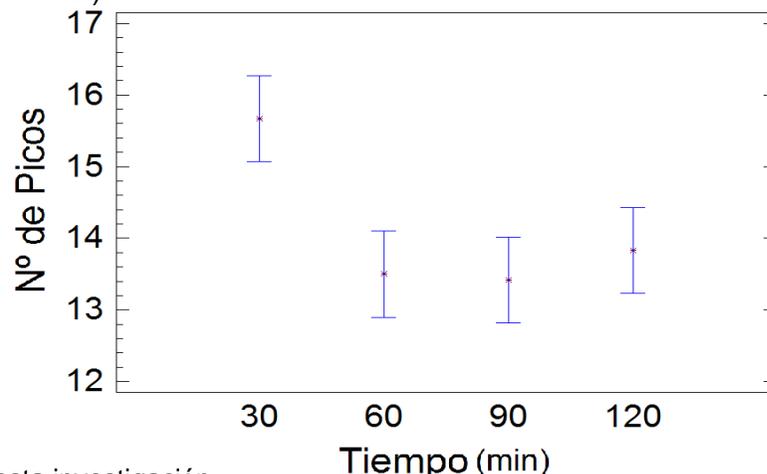
|     |    |         |          |             |   |   |
|-----|----|---------|----------|-------------|---|---|
| 60  | 12 | 13,5    | 0,294628 | +/- 0,60015 |   | X |
| 120 | 12 | 13,8333 | 0,294628 | +/- 0,60015 | X |   |
| 30  | 12 | 15,6667 | 0,294628 | +/- 0,60015 | X |   |

| Contraste | Diferencias | +/- DMS  |
|-----------|-------------|----------|
| 30 - 60   | *2,16667    | 0,848724 |
| 30 - 90   | *2,25000    | 0,848724 |
| 30 - 120  | *1,83333    | 0,848724 |
| 60 - 90   | 0,08333     | 0,848724 |
| 60 - 120  | -0,33333    | 0,848724 |
| 90 - 120  | -0,41667    |          |
|           | 0,848724    |          |

En la parte superior de la tabla, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo (X) en la columna, el primer grupo está constituido por los tratamientos de 90, 60 y 120 minutos, el segundo grupo lo constituye el tratamiento de 30 minutos. Se puede observar que el valor de la media de los picos cromatográficos para el segundo grupo, es significativamente mayor en comparación a las medias del primer grupo.

Al comparar el valor de la MDS con las diferencias entre las medias obtenidas de los contrastes 30-60, 30-90 y 30-120 (indicados con asterisco), se observa que estos datos son mayores que el valor calculado (0,848724), indicando que el tratamiento realizado a los 30 minutos, presentó una diferencia estadísticamente significativa respecto a los demás tratamientos, con un nivel de confianza del 95,0%. Esta diferencia se observa claramente en la figura 13.

Figura 13. Comparación entre medias de los picos cromatográficos para cada tiempo (MWHD)



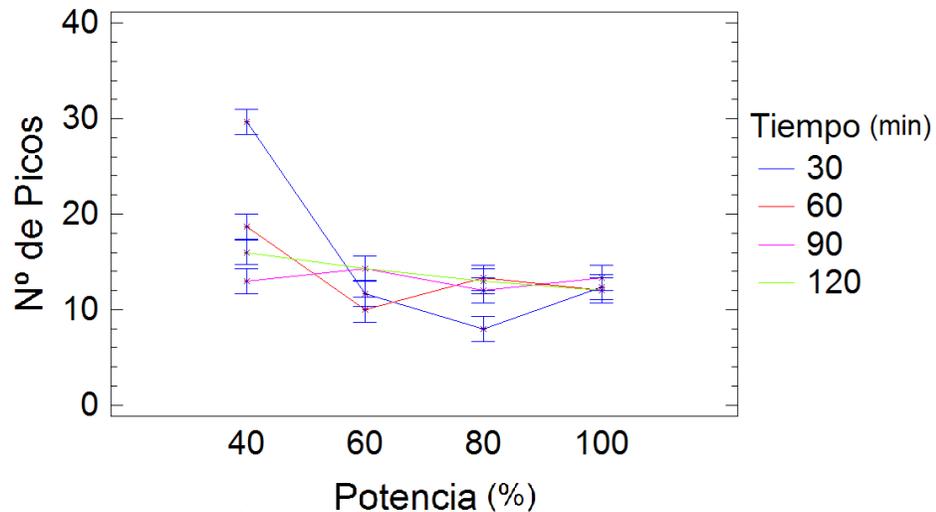
Fuente: esta investigación

En la figura se observa que el único punto que presenta diferencia estadística significativa, es el que pertenece al tiempo de 30 minutos, obteniéndose por medio de este tratamiento el mayor número de picos en el cromatograma. Además, se puede observar que en los tratamientos realizados a los 60, 90 y

120 minutos, hay una disminución (relativamente constante) en el número de picos cromatográficos. Este hecho puede explicarse debido a la volatilidad de los compuestos presentes en el aceite esencial (principalmente terpenos inferiores e.g. monoterpenos y sesquiterpenos); a mayor tiempo de exposición de la muestra a la radiación y a una temperatura dada, los compuestos con mayor presión de vapor se evaporan más fácilmente que los compuestos con una menor presión de vapor, esta propiedad hace que los primeros compuestos puedan escapar del equipo de MWHD, disminuyendo la cantidad relativa de los mismos en el AE, y al final de la extracción, solo se cuantifican en el cromatograma los compuestos que mantuvieron una abundancia relativa igual o mayor al 1%.

c) Interacciones entre factores: en la tabla 4 vemos la información referente a la interacción entre los factores AB, separada de los efectos principales. La hipótesis nula será en este caso la ausencia de interacción entre los factores potencia y tiempo. Dado que el valor del cociente F (55,24), es mayor que el valor crítico (2,189), se rechaza la hipótesis nula, indicando que existen interacciones entre los dos factores. Estas interacciones se representan en la figura 14.

Figura 14. Gráfico de Interacción



Fuente: esta investigación

Teniendo en cuenta que cada punto del gráfico, es el promedio de los valores de cada celda de la tabla 3, si los intervalos de confianza para cada celda se solapan, se puede interpretar como que el efecto de los dos factores es igual, o no existen diferencias estadísticamente significativas en cada celda. En la figura 14, se observa que el único punto donde hay interacciones significativas, es el que pertenece a la potencia de 40% y tiempo de 30 min.

En este experimento los dos factores, es decir, potencia y tiempo, son factores controlados. En química analítica una aplicación importante de las técnicas

ANOVA es investigar dos o más factores controlados y sus interacciones en experimentos de optimización.

#### 4.2.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL AE UTILIZANDO LA TÉCNICA DES

Para la optimización de las condiciones de extracción del aceite esencial presente en las hojas de *Ambrosia arborescens* Miller, por medio de la técnica DES, se consideró como variables de respuesta la intensidad y número de picos presentes en los cromatogramas. En este caso, también se consideraron únicamente los picos cromatográficos que presentaron un porcentaje de área igual o mayor al 1%. Los datos obtenidos experimentalmente se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Número de señales obtenidas en los cromatogramas por DES

| TIEMPO (min) | 30 | 60 | 90 | 120 |
|--------------|----|----|----|-----|
| Nº DE PICOS  | 18 | 24 | 21 | 23  |
|              | 18 | 23 | 21 | 23  |
|              | 18 | 24 | 21 | 23  |

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó el análisis de varianza de un factor (los cálculos del ANOVA se muestran en el anexo C). Este modelo plantea un contraste de hipótesis para el cual la hipótesis nula es la igualdad de medias entre las subpoblaciones que definen los distintos niveles del factor.

Tabla 8. ANOVA de un factor (Tiempo)

| Fuente            | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado Medio | Cociente F | Valor Crítico F |
|-------------------|-------------------|----|----------------|------------|-----------------|
| Entre Grupos      | 58,25             | 3  | 19,4167        | 233,00     | 4,066           |
| Dentro de Grupos  | 0,666667          | 8  | 0,0833333      |            |                 |
| Total (Corregido) | 58,9167           | 11 |                |            |                 |

Las hipótesis que se evaluaron fueron las siguientes:

$H_0$  = A diferentes tiempos se obtienen igual número de picos en el cromatograma.

$H_1$  = Existen diferencias significativas en el número de picos cromatográficos al variar el tiempo

Puesto que el valor del cociente F excede al valor crítico, se rechaza la hipótesis nula, indicando que existen diferencias significativas entre las medias

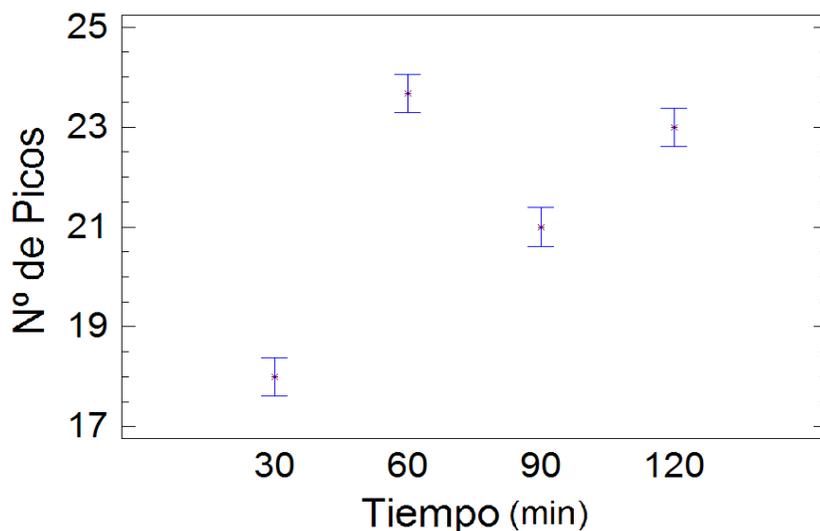
del número de picos cromatográficos, de un nivel de tiempo a otro. Para encontrar el tratamiento estadísticamente más significativo, se realizó la prueba de Fisher (DMS) (ver anexo D). Los resultados de esta prueba se indican a continuación.

Tabla 9. Diferencia mínima significativa (Tiempo)

| Tiempo (min) | n          | Media    | Error          | Intervalo de | Grupos   |
|--------------|------------|----------|----------------|--------------|----------|
| (min)        | Nº de Pico | estándar | confianza(95%) | homogéneos   |          |
| 30           | 3          | 18,0     | 0,166667       | 0,3843       | X        |
| 60           | 3          | 23,66    | 0,166667       | 0,3843       | X        |
| 90           | 3          | 21,0     | 0,166667       | 0,3843       | X        |
| 120          | 3          | 23,0     | 0,166667       | 0,3843       | X        |
| Contraste    |            |          | Diferencias    |              | +/- DMS  |
| 30 - 60      |            |          | *-5,66667      |              | 0,543532 |
| 30 - 90      |            |          | *-3,0          |              | 0,543532 |
| 30 - 120     |            |          | *-5,0          |              | 0,543532 |
| 60 - 90      |            |          | *2,66667       |              | 0,543532 |
| 60 - 120     |            |          | *0,666667      |              | 0,543532 |
| 90 - 120     |            |          | *-2,0          |              | 0,543532 |

La mitad inferior de la tabla, muestra la diferencia estimada entre cada par de medias del contraste. Los valores señalados con un asterisco, indica que estos datos mostraron diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la tabla, se identifican 4 grupos homogéneos según la alineación del signo (X) en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen el signo (X), forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias significativas. Al representar gráficamente estos valores (figura 15), se observa claramente que el tratamiento al cual se obtiene el mayor número de picos en el cromatograma, es al tiempo de 60 minutos.

Figura 15. Comparación entre medias de los picos cromatográficos para cada tiempo (DES)



Fuente: esta investigación

#### 4.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Ambrosia arborescens* Miller. POR CG/MS

El análisis de las muestras por CG/MS se realizó en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander. El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890 Plus, acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, *Agilent Technologies* 5973) (EI, 70 eV), operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (full scan). La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*). [5%-Fenil-poli(dimetilsiloxano), 60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m]. La inyección se realizó en modo *split* (30:1).

La identificación de los principales compuestos presentes en el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller, se hizo con base en el cálculo de los índices de retención de Kovats; mediante el análisis de sus espectros de masas (posibles rutas de fragmentación de los compuestos) y usando las bases de datos de Adams, Wiley 138 y NIST 05.

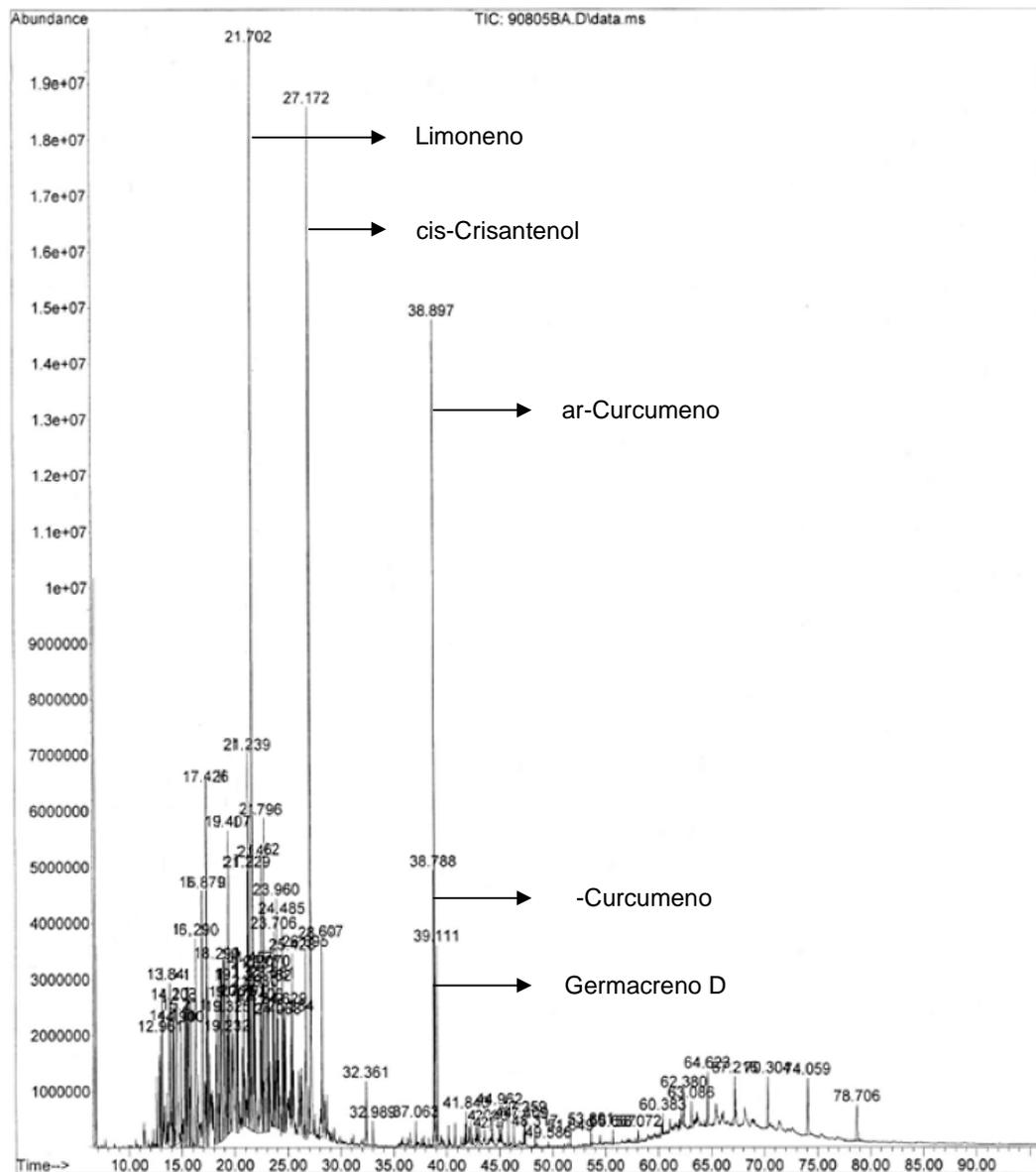
La cuantificación se realizó considerando el área de los picos cromatográficos (normalización de las áreas), expresándose las cantidades relativas como porcentajes.

##### 4.3.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS OBTENIDOS POR LA TÉCNICA MWH

El análisis por CG/MS se realizó al extracto que presentó el mayor número de picos en el cromatograma de acuerdo a las condiciones óptimas de potencia y tiempo determinadas en el análisis anterior (ver numeral 4.3.1). Estas condiciones fueron: potencia 40% y tiempo de 30 minutos.

En la Figura 16 se presenta el perfil cromatográfico del aceite esencial extraído bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Figura 16. Perfil cromatográfico del AE *A. arborescens* Miller, extraído mediante MWD (P 40% / 30 min)



Fuente: esta investigación an loscompuestos identificados en este extracto, los tiempos de retención, los índices de Kovats y la relación masa/carga (m/z) de

cada constituyente. Solo se identificaron los compuestos terpénicos que presentaron un porcentaje de área igual o superior al 1%. En el anexo E se presenta el cromatograma de la mezcla de parafinas C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>, usado para cálculo del índice de Kovats.

Tabla 10. Principales compuestos identificados por CG/MS, aislados por MWHD.

| Nº Picos | T <sub>R</sub> <sup>a</sup> (min) | IK <sup>b</sup> Exp | IK <sup>c</sup> Teórico | Compuesto            | m/z <sup>d</sup> M <sup>+</sup> | Cantidad Relativa (%) |
|----------|-----------------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 1        | 17,42                             | 934                 | 934                     | -Pino                | 136                             | 1,1                   |
| 2        | 21,23                             | 1013                | 1011                    | o-cimeno             | 134                             | 1,6                   |
| 3        | 21,46                             | 1035                | 1033                    | p-cimeno             | 134                             | 1,1                   |
| 4        | 21,7                              | 1046                | 1039                    | Limoneno             | 136                             | 8                     |
| 5        | 27,17                             | 1159                | 1163                    | cis-Crisantenol      | 152                             | 7,2                   |
| 6        | 28,60                             | 1181                | 1186                    | Isoborneol           | 154                             | 2,2                   |
| 7        | 38,79                             | 1464                | 1466                    | -Curcumeno           | 204                             | 1,4                   |
| 8        | 38,9                              | 1471                | 1477                    | ar-Curcumeno         | 202                             | 4                     |
| 9        | 39,11                             | 1497                | 1499                    | Germacreno D         | 204                             | 1                     |
| 10       | 41,84                             | 1573                | 1574                    | ar-Tumerol           | 218                             | 1,1                   |
| 11       | 42,00                             | 1579                | 1578                    | Espatuleno           | 220                             | 1,2                   |
| 12       | 42,14                             | 1583                | 1583                    | Oxido de Cariofileno | 220                             | 1,5                   |
| 13       | 45,37                             | 1711                | 1715                    | Curcufenol           | 218                             | 1                     |
| 14       | 46,20                             | 1757                | 1751                    | Xantorizol           | 218                             | 1,1                   |

<sup>a</sup>Tiempos de retención del cromatograma de la figura 16

<sup>b</sup>Índices de Kovats determinados experimentalmente

<sup>c</sup>Índices de Kovats publicados en la bibliografía con numeral [101, 102]

<sup>d</sup>Relación masa/carga del ión molecular

El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, permitió identificar para este extracto, en total 14 compuestos mayoritarios. En la tabla 10 se observa que los compuestos con mayor concentración, obtenidos por MWHD fueron: limoneno (8%), cis-crisantenol (7.2%), ar-curcumeno (4%) y el isoborneol con el 2,2%. También puede observarse que la composición del aceite esencial, está caracterizada principalmente por compuestos terpénicos oxigenados (cis-Crisantenol, Isoborneol, ar-Tumerol, Espatuleno, Oxido de Cariofileno, Curcufenol y Xantorizol).

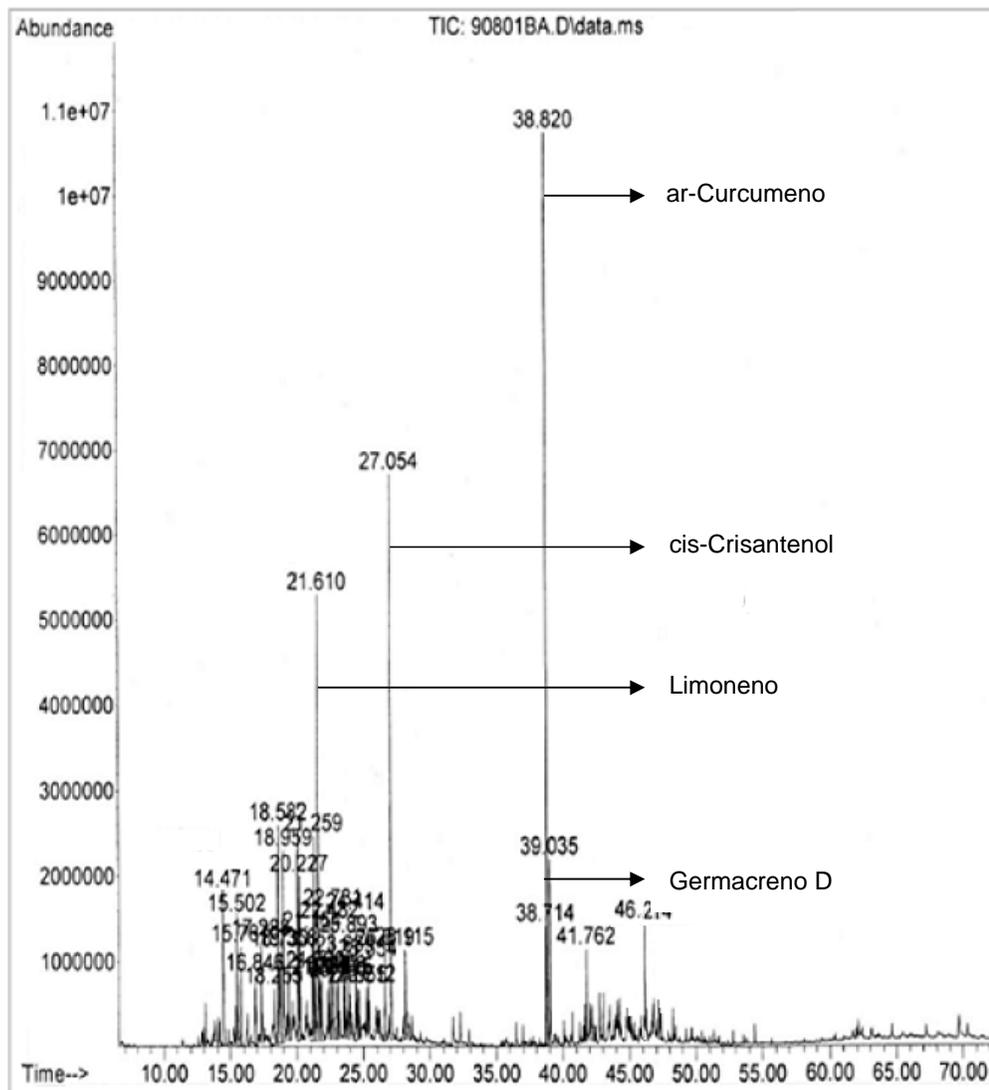
<sup>101</sup> ADAMS, Robert. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy. Carol Stream. Ed. Allured Publishing Corporation. Illinois USA. (1995); p. 25-40

<sup>102</sup> Pherobase [en línea] Colombia. [Citado 28 de Marzo de 2011]. Disponible en internet: <http://www.pherobase.com>

#### 4.3.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS OBTENIDOS POR LA TÉCNICA DES

En la Figura 17 se presenta el perfil cromatográfico de los compuestos orgánicos volátiles del AE de *Ambrosia arborescens* Miller, extraído bajo las condiciones óptimas de tiempo (60 minutos), de acuerdo al análisis presentado en el numeral 4.3.2

Figura 17. Perfil cromatográfico del AE de *Ambrosia arborescens* Miller, obtenido por la técnica DES (tiempo: 60 minutos)



| Nº Picos | T <sub>R</sub> <sup>a</sup> (min) | IK <sup>b</sup> Exp | IK <sup>c</sup> Teórico | Compuesto       | m/z <sup>d</sup> M <sup>+</sup> | Cantidad Relativa (%) |
|----------|-----------------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------------|
| 1        | 21,16                             | 1013                | 1011                    | o-cimeno        | 134                             | 1,7                   |
| 2        | 21,4                              | 1035                | 1033                    | p-cimeno        | 134                             | 1,3                   |
| 3        | 21,61                             | 1048                | 1039                    | Limoneno        | 136                             | 5,9                   |
| 4        | 27,05                             | 1159                | 1163                    | cis-Crisantenol | 152                             | 8,8                   |
| 5        | 38,71                             | 1469                | 1466                    | -Curcumeno      | 204                             | 1,7                   |
| 6        | 38,82                             | 1471                | 1477                    | ar-Curcumeno    | 202                             | 13,1                  |
| 7        | 39,04                             | 1497                | 1499                    | Germacreno D    | 204                             | 2,6                   |
| 8        | 41,76                             | 1555                | 1574                    | ar-Tumerol      | 218                             | 1,2                   |
| 9        | 46,21                             | 1757                | 1751                    | Xantorrizol     | 218                             | 1                     |

<sup>a</sup>Tiempos de retención del cromatograma de la figura 17<sup>b</sup>Índices de Kovats experimentales

<sup>c</sup>Ik publicados en las bibliografías de Ref. Nº [91, 92]<sup>d</sup> Relación masa/carga del ión molecular

El análisis por CG/MS, del extracto obtenido por medio de la técnica DES, permitió identificar 9 compuestos presentes en el aceite esencial. Los compuestos identificados, que presentaron mayor concentración fueron: ar-curcumeno (13.1%), cis-crisantenol (8.8%), limoneno (5.9%) y germacreno D con el 2.6% de abundancia relativa. En la tabla 11 se puede observar que los hidrocarburos sesquiterpénicos (ar-curcumeno, -curcumeno y germacreno D), se extrajeron en mayor concentración, que los aislados por la técnica MWHD.

#### 4.3.3 CLASIFICACIÓN Y COMPARACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS OBTENIDOS POR LAS TÉCNICAS MWHD Y DES

En la tabla 12, se presentan las principales familias de compuestos terpénicos aislados por los métodos MWHD y DES. Estas familias se clasifican según el número de unidades de isopreno en cada compuesto y el grupo funcional presente. (En el anexo F se presentan las estructuras químicas de los compuestos aislados).

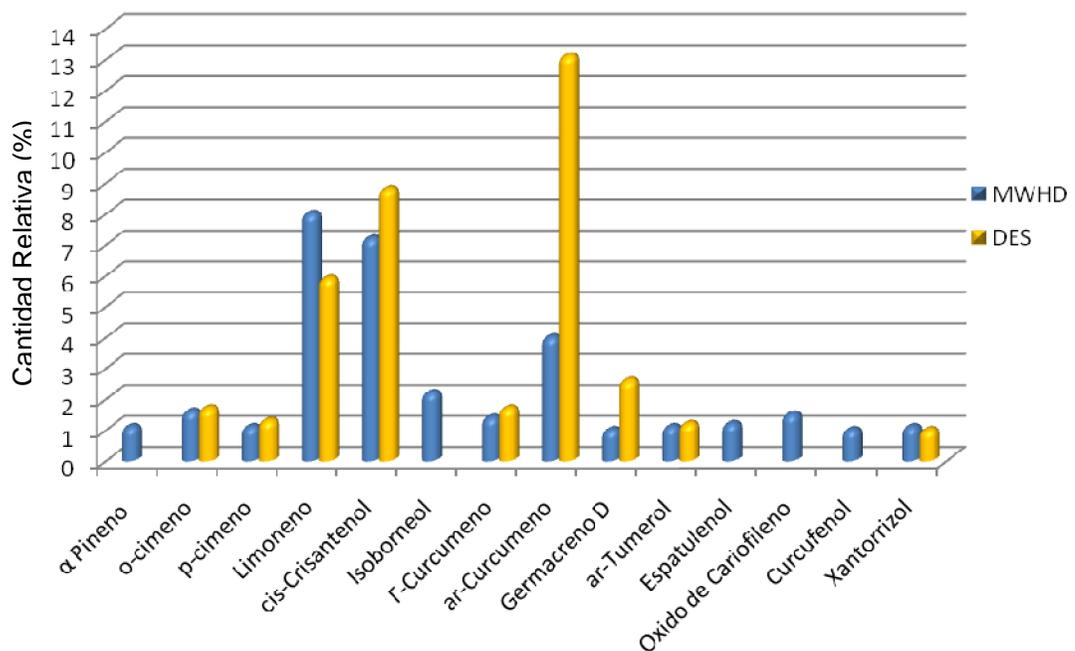
Tabla 12. Clasificación de los compuestos terpénicos extraídos por MWHD y DES

| Clasificación                  | Compuestos   |
|--------------------------------|--|
| Hidrocarburos monoterpénicos   | Pineno; o-Cimeno; p-Cimeno; Limoneno                                   |
| Hidrocarburos sesquiterpénicos | ar-Curcumeno; -Curcumeno; Germacreno D                                 |
| Monoterpenos oxigenados        | cis-Crisantenol; Isoborneol  |
| Sesquiterpenos oxigenados      | ar-Tumerol; Epatulenol; Curcufenol; Xantorrizol; Oxido de cariofileno. |

Teniendo en cuenta que las técnicas de extracción, DES y MWHD, fueron utilizadas con el fin de extraer compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles respectivamente. Por medio de estos dos métodos, se logró identificar un total de 14 compuestos; de estos, el 65% fueron comunes en las dos técnicas. El 35% restante, correspondió a los compuestos: curcufenol, isoborneol, espatulenol, oxido de cariofileno y  $\alpha$ -pineno, los cuales fueron extraídos por la técnica MWHD.

A continuación se presenta una gráfica (figura 18) en la cual se compara la concentración (cantidad relativa %), de los compuestos obtenidos por las dos técnicas de extracción.

Figura 18. Principales compuestos presentes en el AE de *A. arborescens* Miller, obtenidos por MWHD y DES



Fuente: esta investigación

Entre los principales compuestos extraídos por MWHD y DES se destacan: el limoneno, ar-curcumeno y el cis-crisantenol, que presentaron la mayor abundancia relativa en las dos técnicas.

De acuerdo con los compuestos identificados en el aceite esencial, se observó que la composición química fue similar, variando principalmente en su concentración. Por medio de la técnica DES, se presentó un aumento significativo en la concentración de los hidrocarburos sesquiterpénicos (ar-curcumeno 13,1% y germacreno D 2,6%), con respecto a la técnica MWHD, con la cual, estos compuestos se obtuvieron en concentraciones del 4 y 1%, respectivamente.

A través de la técnica MWHD, se logró extraer un mayor número de compuestos oxigenados (xantorrizol, cis-crisantenol, isoborneol, espatulenol, ar-tumerol, curcufenol y óxido de cariofileno) respecto a la técnica DES, con la cual solo se aislaron 3 compuestos (ar-tumerol, xantorrizol y cis-crisantenol); es evidente que el solvente utilizado en esta última técnica (diclorometano) es más selectivo a compuestos más apolares (hidrocarburos mono y sesquiterpénicos), los cuales se obtuvieron en mayor concentración.

La extracción de compuestos volátiles oxigenados determina en un alto grado las propiedades funcionales de los aceites esenciales, los monoterpenos oxigenados, son los principales responsables de las notas aromáticas de las esencias y de su solubilidad en etanol. Los compuestos fenólicos, poseen las mayores efectividades como agentes antirradicalarios y antioxidantes<sup>103</sup>.

#### 4.4 ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS DE MASAS DE LOS COMPUESTOS MÁS REPRESENTATIVOS EN EL AE DE *A. arborescens* Miller.

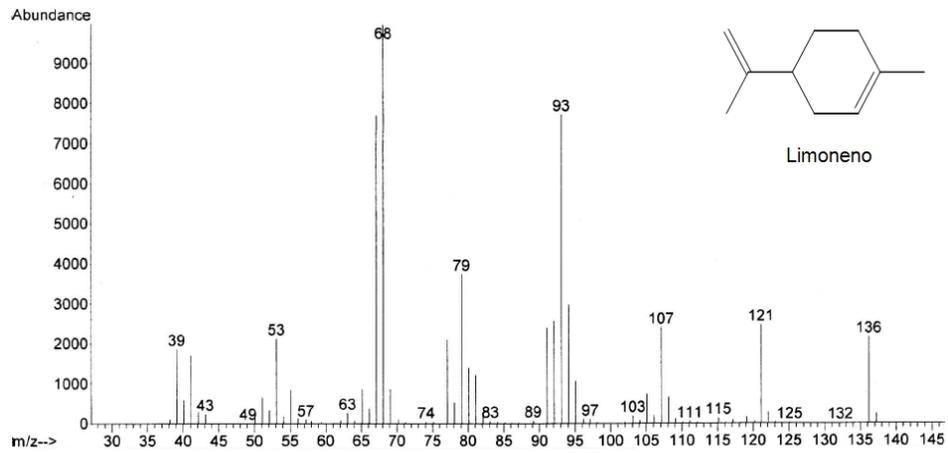
A continuación se presentan algunos espectros de masas experimentales de los principales compuestos identificados en el AE de *A. arborescens* Miller y sus posibles mecanismos de fragmentación. Los espectros de masas, además se compararon con las bases de datos de Adams, Wiley 138 y NIST 05, estos se muestran en el Anexo G.

- Limoneno: El ion molecular de este compuesto en  $m/z$  136 (ver figura 20), sufre durante su ionización disociativa la ruptura *retro-Diels-Alder*, con la cual el dieno formado constituye el pico base en  $m/z$  de 68, el cual por pérdida de radical eteno genera el pico con  $m/z$  41. Adicionalmente, la eliminación homolítica del radical metilo, seguido de un reordenamiento de hidrógeno y posterior pérdida homolítica de radical eteno conduce al pico con  $m/z$  94, el cual sufre una pérdida homolítica de radical hidrógeno para generar el pico con  $m/z$  93. Por otra parte, la pérdida homolítica de radical metilo a partir del ion molecular conlleva al catión con relación  $m/z$  121. El ion con relación  $m/z$  79 se produce tras la pérdida homolítica de radical isopropenilo seguido de una ruptura homolítica de hidrógeno. El ion con  $m/z$  107 se genera por pérdida de una molécula neutra de eteno a partir del ion molecular seguido de una ruptura homolítica de hidrógeno.

---

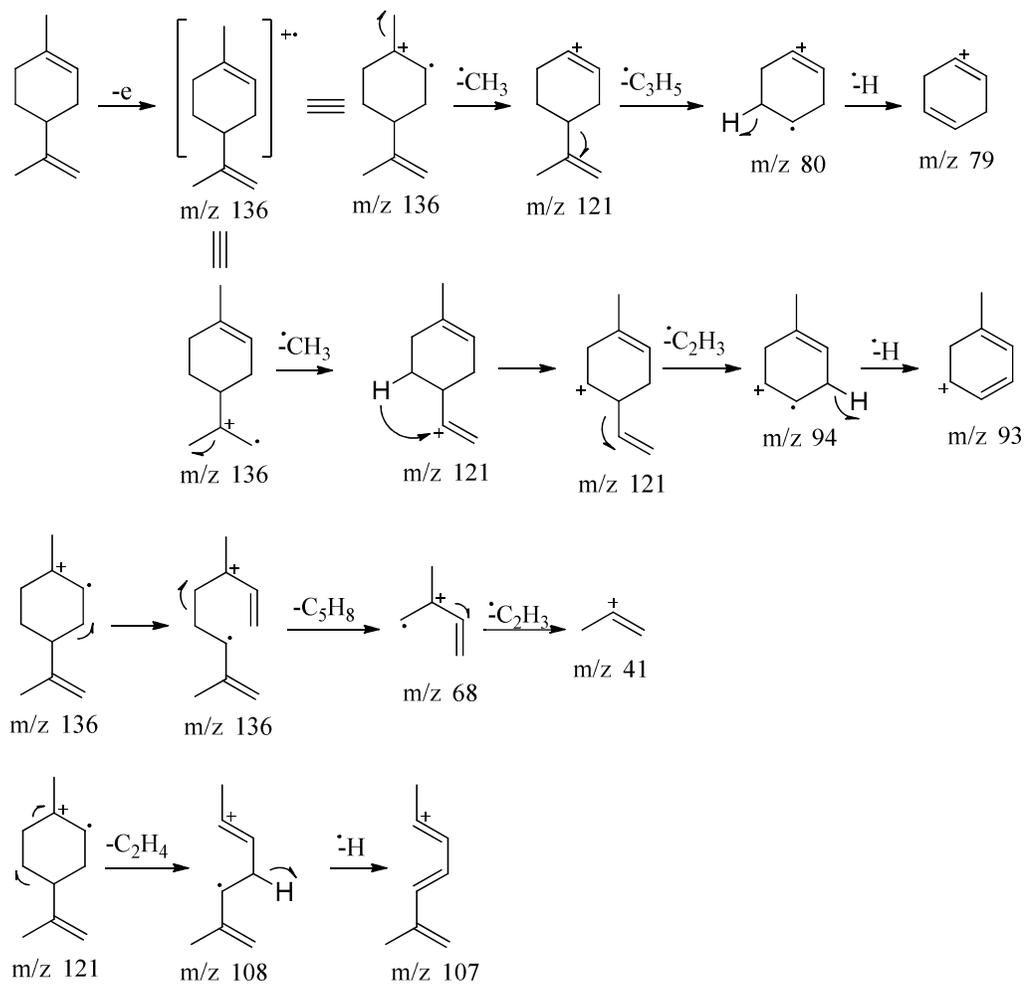
<sup>103</sup>ROSSITER, K.J., Structure-odor relationships. In: Chemical Reviews. New York. Vol. 96(1996); p.3201-3240.

Figura 19. Espectro de masas del Limoneno.



Fuente: esta investigación

Figura 20. Posibles rutas de fragmentación del Limoneno.



Fuente: esta investigación

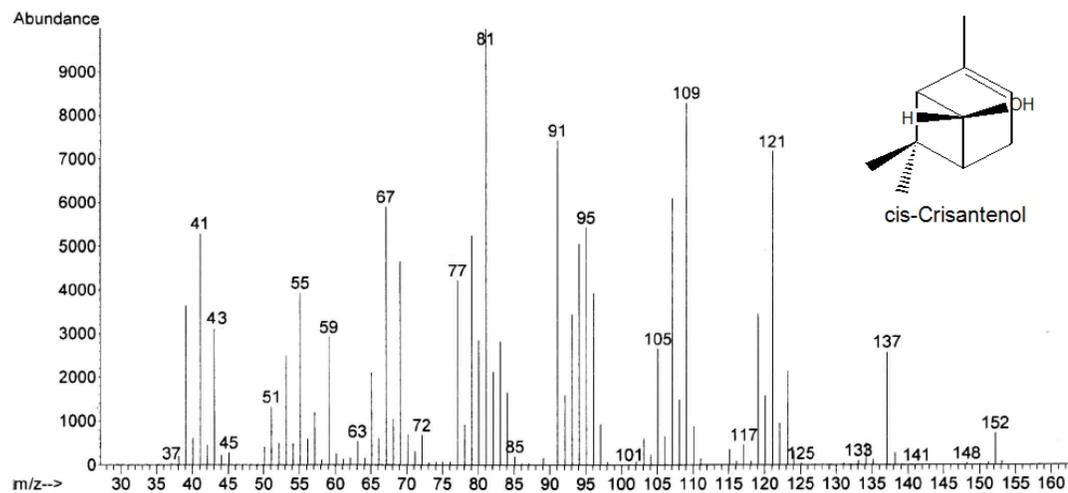
- cis-Crisantenol: La pérdida de un electrón permite identificar el ión molecular con  $m/z$  152. Una ruptura homolítica del radical metilo genera el pico de  $m/z$  137. Seguido a esto una ruptura de hidrógeno y de metilo de manera homolítica dan origen al pico de  $m/z$  121.

Una ruptura intramolecular seguido de una transposición de hidrógeno con posterior ruptura homolítica de radical isopropilo genera el pico de  $m/z$  109. Una doble ruptura homolítica del radical hidroxilo y metilo en el catión de  $m/z$  137 da origen al pico con  $m/z$  105.

Una ruptura homolítica intramolecular, con posterior pérdida de una molécula de eteno genera un catión radical de 124 unidades el cual es el responsable de los picos con relación  $m/z$  95, 81 y 67. El pico con relación  $m/z$  95 se genera por una ruptura heterolítica de CO con posterior pérdida de H radical a partir de  $m/z$  124. De igual manera los picos con  $m/z$  81 y 67, se generan por pérdidas de tipo homolítico en todos los casos.

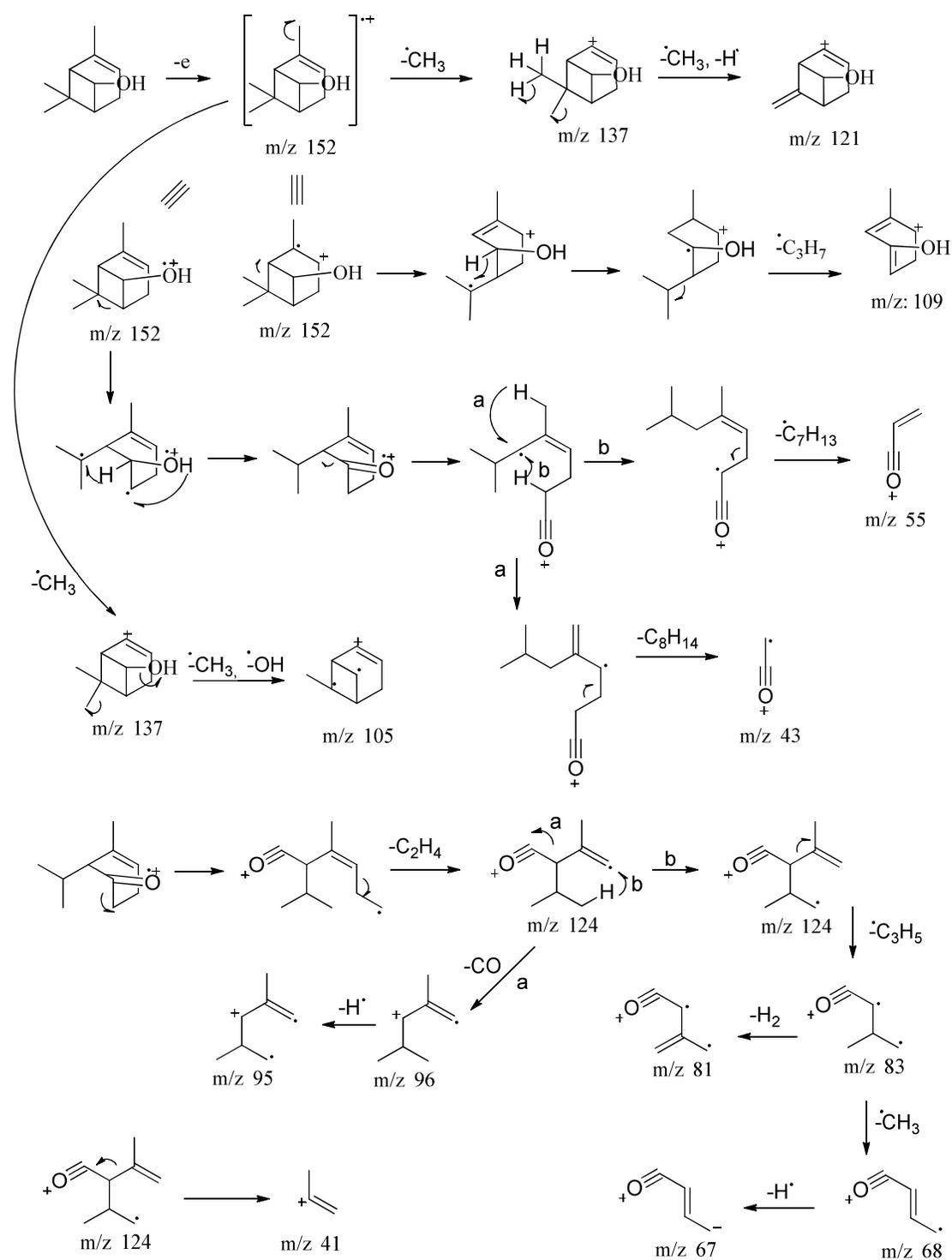
A partir del ion molecular se produce una ruptura homolítica intramolecular seguido de una transposición de hidrógeno y posterior ruptura homolítica del fragmento  $-C_7H_{13}$  dando origen al pico de  $m/z$  55. De la misma manera la pérdida de  $-C_8H_{14}$  genera el pico  $m/z$  43. A partir de  $m/z$  124, una ruptura heterolítica, genera el pico  $m/z$  41.

Figura 21. Espectro de masas del cis-Crisantenol



Fuente: esta investigación

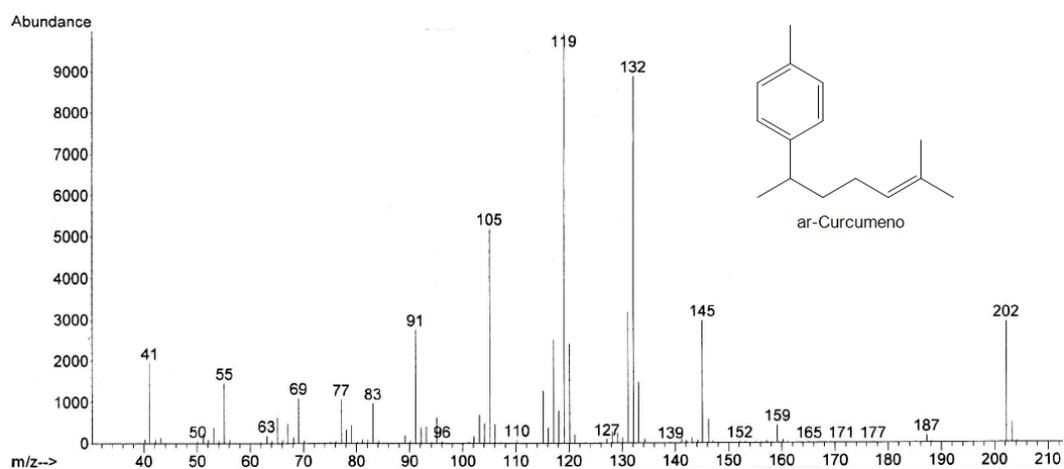
Figura 22. Posibles rutas de fragmentación del cis-Crisantenol



Fuente: esta investigación

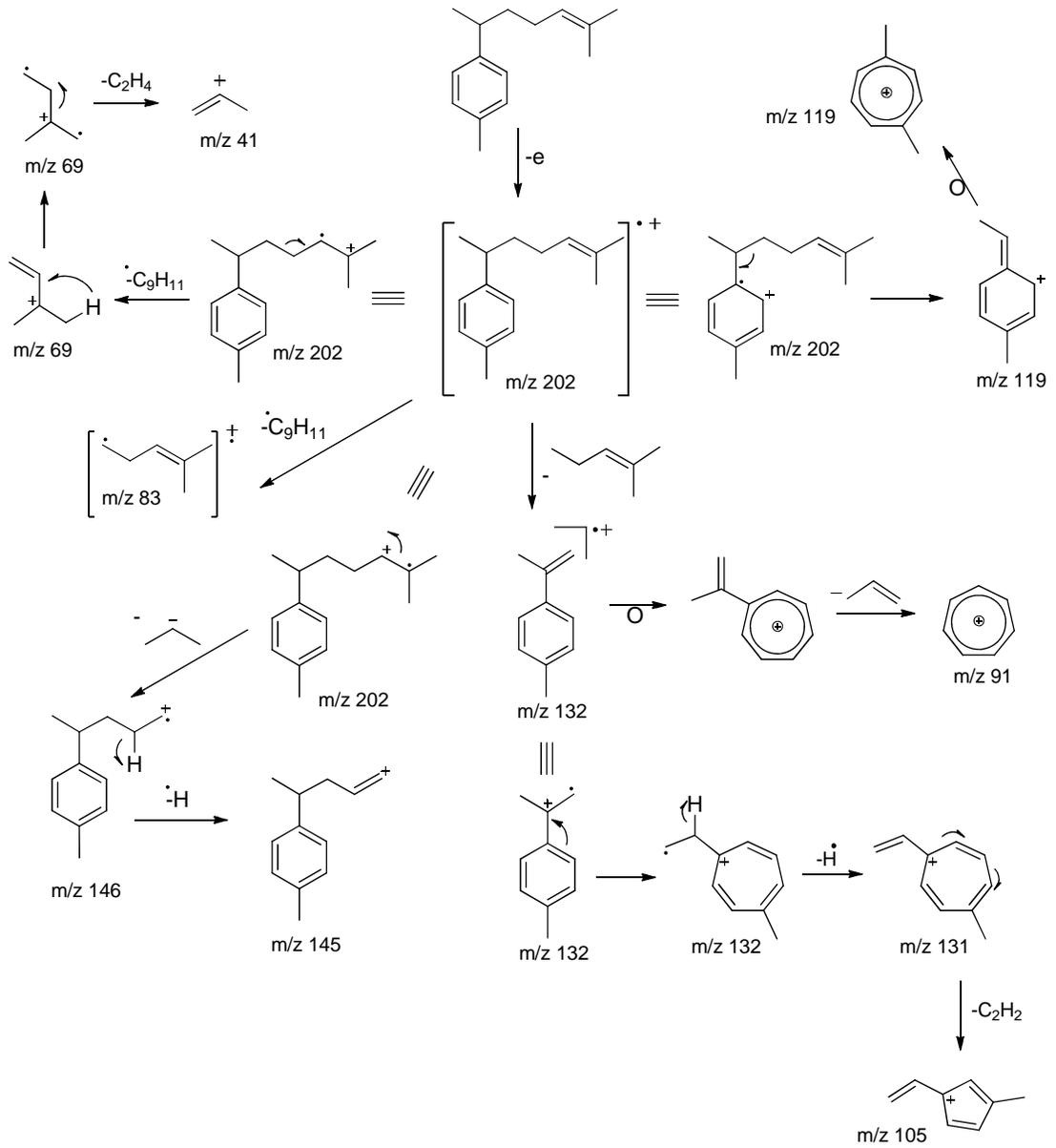
- ar-Curcumeno: En la figura 24 se observa el ion molecular con relación m/z de 202. La ruptura bencílica a partir del ion molecular conduce a la formación de iones complementarios en m/z 119 (pico base), que posteriormente se reordena a ion dimetil-tropilio; y el ion en m/z 83. La ruptura alílica a partir del ion molecular, conduce a la formación del fragmento en m/z 69, el cual tras la pérdida de una molécula de etileno, da origen al catión alilo en m/z 41. La pérdida de isopenteno a partir del ion molecular conduce a la formación del ion en m/z 132. A partir de este se generan los iones fragmento  $[(M-C_5H_{10})-C_3H_5]^+$  en m/z 105 y  $C_7H_7^+$ , ion tropilio en m/z 91.

Figura 23. Espectro de masas del ar-Curcumeno.



Fuente: esta investigación

Figura 24. Posibles rutas de fragmentación del ar-Curcumeno



Fuente: esta investigación

#### 4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó por el método TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox), propuesto por RE, R. et al (1999), descrito en el numeral 3.4.

A continuación se presentan los datos de absorbancia medidos a una longitud de onda de 734nm, según el procedimiento descrito previamente. Con estos datos se construyó la recta de calibrado expuesta en la figura 25.

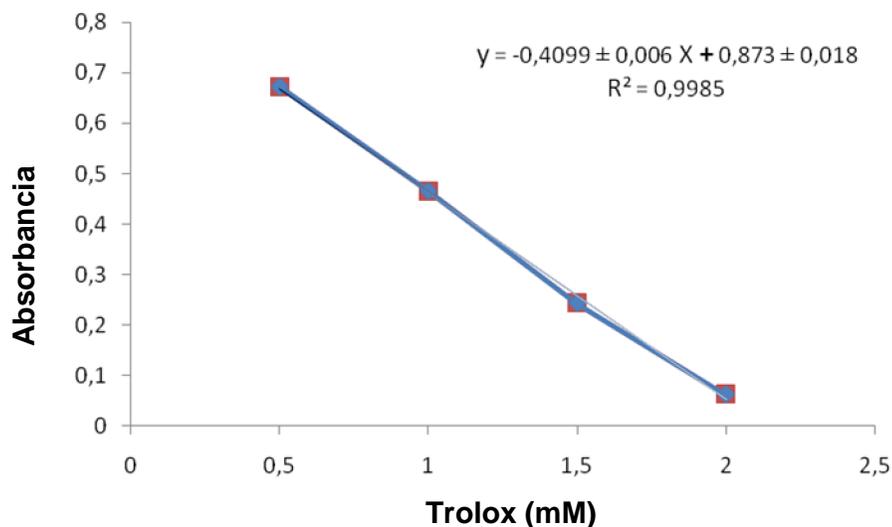
Tabla 13. Datos de absorbancia de los patrones de Trolox

| Trolox (mM) | Abs <sup>a</sup><br>1 | Abs<br>2 | Abs<br>3 | Media | SD <sup>b</sup> |
|-------------|-----------------------|----------|----------|-------|-----------------|
| 0,0         | 0,885                 | 0,897    | 0,889    | 0,890 | 0,006           |
| 0,5         | 0,677                 | 0,689    | 0,649    | 0,672 | 0,021           |
| 1,0         | 0,467                 | 0,467    | 0,461    | 0,465 | 0,003           |
| 1,5         | 0,252                 | 0,243    | 0,235    | 0,243 | 0,009           |
| 2,0         | 0,064                 | 0,062    | 0,061    | 0,022 | 0,001           |

a: Absorbancia

b: Desviación estándar

Figura 25. Curva de calibración para el método TEAC



Fuente: esta investigación

Con el fin de determinar la funcionalidad del método, se determinó la eficiencia antirradical de dos antioxidantes conocidos: ácido ascórbico y 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (BHT), cuyos valores TEAC se publican en la literatura científica (ver las referencias número 104 y 105). En la tabla 14, se muestra los valores experimentales de las absorbancias obtenidas para estas sustancias, incluyendo la absorbancia del aceite esencial (AE) objeto de estudio. Todos los datos se obtuvieron por triplicado.

Tabla 14. Datos de absorbancia del ácido ascórbico, BHT y el AE de *Ambrosia arborescens* Miller.

| MUESTRAS  | Concentración | Abs 1 <sup>a</sup> | Abs 2 | Abs 3 | Media Abs | SD <sup>b</sup> |
|---|---------------|--------------------|-------|-------|-----------|-----------------|
| Ácido Ascórbico                                       | 0,634 mM      | 0,587              | 0,604 | 0,578 | 0,590     | 0,013           |
| BHT   | 1,5 mM        | 0,725              | 0,701 | 0,712 | 0,713     | 0,012           |
| AE de <i>Ambrosia<sup>c</sup> arborescens</i> Miller. | 2,22 % p/v    | 0,309              | 0,331 | 0,316 | 0,319     | 0,011           |

a: Absorbancia

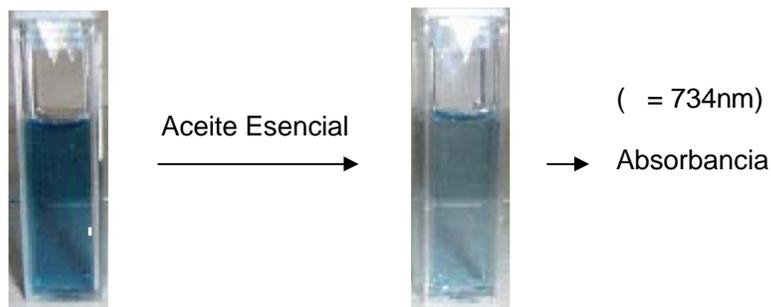
b: Desviación estándar

c: AE extraído por la técnica MWHD (Potencia 40%; tiempo 30min)

En la figura 26 se muestra una imagen, representando el cambio de color producido tras la reducción del catión-radical ABTS+•, por parte del antioxidante en estudio. El aceite esencial que es una mezcla compleja que puede contener más de 100 compuestos, produce una disminución paulatina en la absorbancia, la cual irá reduciéndose hasta estabilizarse, al ir convirtiendo el ABTS+• (cromóforo) en ABTS (incoloro).

Figura 26. Esquema de reacción del ABTS+• con el aceite esencial.

ABTS+• ABTS



Fuente: esta investigación

Haciendo uso de la ecuación de regresión de la recta de calibrado, se determinaron los valores TEAC de las muestras de interés (tabla 15). El TEAC se expresa como mmol de trolox / mmol de sustancia.

Tabla 15. TEAC de las sustancias antioxidantes de referencia:Ácido ascórbico, BHT y el AE estudiado.

| SUSTANCIAS   | TEAC<br>(mmol de Trolox /<br>mmol de sustancia)*  | TEAC<br>(mmol de Trolox /<br>kg de sustancia) * | Valores de TEAC <sup>[104,</sup><br><sup>105]</sup> reportados en la<br>Bibliografía <sup>a</sup> |
|--|---|---|---|
| Ácido Ascórbico                                    | 1,09 ± 0,05                                       | 6182,79 ± 57,4                                  | 1,05 ± 0,02   |
| BHT  | 0,26 ± 0,04                                       | 1179,94 ± 30,7                                  | 0,26 ± 0,004  |
| <i>A. arborescens</i><br>Miller. (AE) <sup>b</sup> | Valores disponibles sólo<br>para sustancias puras | 60,91 ± 1,13 <sup>c</sup>                       |   |

\* Promedio de las tres mediciones ± SD

a: Unidades en: mmol de Trolox / mmol de sustancia

b: AE extraído por la técnica MWHD (Potencia 40%; tiempo 30min)

c: Unidades en: mmol de Trolox / Kg de Aceite esencial

Comparando los valores experimentales del TEAC de las sustancias de referencia, con los reportados en la bibliografía (tabla 15), es evidente que los valores están en concordancia con los datos publicados en la literatura científica.

De los datos experimentales indicados en la tabla, se puede determinar que el aceite esencial de la especie vegetal *Ambrosia arborescens* Miller, presenta una baja capacidad para reducir el catión-radical ABTS+•, en comparación con los antioxidantes comerciales de referencia, esto, posiblemente, se deba a la baja cantidad de compuestos fenólicos presentes en el AE y a posibles antagonismos químicos como consecuencia de la composición de los AE, por tratarse de mezclas complejas.

Sin embargo, al realizar la comparación del TEAC de la especie vegetal *Ambrosia arborescens* Miller, con los TEAC de varias especies de plantas aromáticas y medicinales oriundas de la región de Bolívar, El Peñón y Guavatá, Santander-Colombia<sup>106</sup> (ver figura 27), se puede observar que los aceites esenciales de las especies vegetales, *Tagetes lucida*, *Lippia dulcis*, *Rosmarinus officianlis*, *Lippia alba*, *Minthostachys mollis* y *Tagetes filifolia*, presentan una capacidad antiradical *in vitro* mucho más baja que la del aceite esencial de la especie vegetal objeto de estudio.

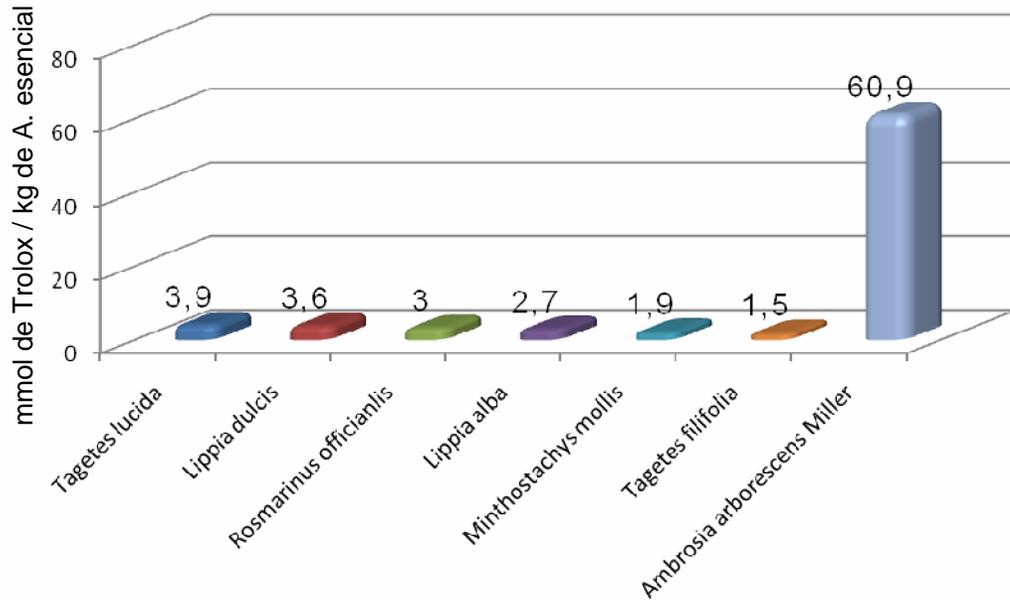
<sup>104</sup> RE, R.PELLEGRINI, N.PROTEGGENTE, A. P.YANG, M. and RICE-EVANS, Op. Cit., p. 1235

<sup>105</sup> Puertas, M.M.A. Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos volátiles y evaluación de la posible actividad antioxidante *in vitro* de algunos productos

naturales y sintéticos. Tesis de Doctorado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, (2002); p. 171.

<sup>106</sup> Ibid., p. 102, 171

Figura 27. Comparación de los valores TEAC de diversos aceites esenciales extraídos de plantas colombianas.



Fuente: esta investigación

De la figura 27, se puede concluir que el aceite esencial de la especie vegetal *Ambrosia arborescens* Miller, está constituido por antioxidantes más eficientes que los que contienen los aceites esenciales de las especies anteriormente mencionadas. En la tabla 16, se presentan los compuestos mayoritarios encontrados en las especies vegetales que estamos comparando.

Según los datos de la tabla 16, es posible que los terpenos oxigenados, constituyentes mayoritarios del aceite esencial de la planta Altamisa, sean los compuestos responsables de la mayor actividad antioxidante en el extracto; ya que el grado en que cada posible antioxidante decolore el catión-radical  $ABTS^{+\bullet}$ , depende de la presencia de sustituyentes electro-donadores, como el grupo hidroxilo (-OH) y su disponibilidad para ceder electrones. En la figura 28, se representa la reacción entre una sustancia antioxidante (AO) y el catión-radical  $ABTS^{+\bullet}$ .

Figura 28. Reacción entre el catión-radical  $ABTS^{+\bullet}$  y un AO<sup>107</sup>



<sup>107</sup>CAMPOS, A. M., LIAAEN, E. A. Kinetic of the reaction between 2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. In: *Free Rad. Biol. Med.*, Chile. (1996);p. 119-224

En general, los compuestos más efectivos para atrapar radicales, generalmente poseen grupos –OH, –NH<sub>2</sub> o –SH. Estos agentes captadores de radicales, interrumpen la fase de propagación de los procesos radicalarios <sup>108</sup>.

Tabla 16. Compuestos mayoritarios presentes en varias especies de plantas aromáticas y medicinales colombianas <sup>109</sup>

| <i>Tagetes lucida</i>  | <i>Lippia dulcis</i>   | <i>Rosmarinus officinalis</i>   |
|--|--|---|
| Nombre común: Pericón<br>Familia: <i>Asteraceae</i><br>Compuestos mayoritarios:<br>Estragol<br>7-metoxicumarina<br>-mirceno<br>(E)- -ocimeno                           | Nombre común: Hierbabuena dulce<br>Familia: <i>Verbenaceae</i><br>Compuestos mayoritarios: -<br>Copaeno,<br>-Bisabolol<br><i>trans</i> - -Cariofileno<br><i>trans</i> -Murola-4(14), 5-dieno<br>- muroleno<br>Biciclogermacreno<br>-Cadineno<br>Óxido de cariofileno | Nombre común: Romero<br>Familia: <i>Lamiaceae</i><br>Compuestos mayoritarios:a-<br>pineno<br>Canfeno<br>Limoneno<br>a-felandreno<br>-pineno<br>1,8-cineol<br>Alcanfor<br><i>trans</i> - -cariofileno  |
| <i>Tagetes filifolia</i>   |  | <i>A. arborescens</i> Miller  |
| Nombre común: Anisillo<br>Familia: <i>Asteraceae</i><br>Compuestos mayoritarios:<br><i>trans</i> -anetol<br>Estragol<br><i>cis</i> -Anetol<br><i>p</i> -Anisaldehído   |  | Nombre común: Altamisa<br>Familia: <i>Asteraceae</i><br>Compuestos mayoritarios:<br>Curcufenol<br><i>cis</i> -Crisantenol<br>Espatuleno<br>Isoborneol<br>ar-Tumerol<br>Xantorrizol<br>Limoneno<br>ar-Curcumeno<br>Óxido de cariofileno<br>Germacreno D<br><i>p</i> -cimeno<br><i>o</i> -cimeno<br>-pineno |
| <i>Lippia alba</i>   | <i>Minthostachis mollis</i>  |   |
| Nombre común: Pronto alivio<br>Familia: <i>Verbenaceae</i><br>Compuestos mayoritarios:<br>Carvona<br>Limoneno<br>Piperitona<br>Piperitenona<br>Biciclosesquifelandreno | Nombre común: Orégano<br>Familia: <i>Lamiaceae</i><br>Compuestos mayoritarios:<br>Mentona<br>Pulegona<br>isomentona<br>Limoneno<br>-pineno   |   |

<sup>108</sup> JIROVETZ, L. Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent. *In*: Recent Res. Devel. Agron. Horticult. Vol 2 (2006); p. 1-12

<sup>109</sup> Puertas, M.M.A, Op. Cit., p. 102 – 156

## CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas de extracción del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller, obtenidas por medio de la técnica de hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD), correspondieron a la potencia del 40 % y tiempo de 30 minutos.

La condición óptima de extracción del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller, obtenida por medio de la técnica de destilación extracción simultanea (DES), usando diclorometano como solvente, correspondió al tiempo de 60 minutos.

La identificación de los principales metabolitos secundarios presentes en el AE de *Ambrosia arborescens* Miller, se hizo usando el criterio cromatográfico (Índice de Kovats en columna apolar DB-5MS) y espectroscópico (espectros de masas, con EI de 70 eV). Por medio de la técnica MWHD, se identificaron 14 compuestos, siendo el Limoneno el compuesto con mayor abundancia relativa (8%). Con la técnica DES, se identificaron 9 compuestos, siendo el ar-Curcumeno el compuesto mayoritario con el 13.1% de abundancia relativa.

Teniendo en cuenta las principales familias de compuestos terpénicos aislados por los dos métodos de extracción; de los 14 compuestos identificados por MWHD, el 29% fueron hidrocarburos monoterpénicos (  $\alpha$ -pineno, o-cimeno, p-cimeno y limoneno), el 50% terpenos oxigenados (cis-crisantenol, isoborneol, ar-tumerol, espatulenol, oxido de cariofileno, curcufenol y xantorizol) y el 21% restante hidrocarburos sesquiterpénicos (ar-curcumeno,  $\beta$ -curcumeno y germacreno D). Mientras que de los 9 compuestos extraídos por DES, el 33% fueron hidrocarburos monoterpénicos (o-cimeno, p-cimeno y limoneno), el 33% terpenos oxigenados (cis-crisantenol, ar-tumerol y xantorizol) y el 33% hidrocarburos sesquiterpénicos (ar-curcumeno,  $\beta$ -curcumeno y germacreno D).

La efectividad antirradicalaria del AE estudiado (TEAC: 60,9), fue menor que la observada para los antioxidantes de referencia, BHT (TEAC: 1179,94) y ácido ascórbico (TEAC: 6182,79). Sin embargo, el AE resultó ser una mezcla de antioxidantes eficientes, en comparación con los extractos de diferentes especies vegetales aromáticas y medicinales colombianas. La mayor actividad de la esencia, con respecto a otros aceites esenciales, puede deberse al mayor contenido de terpenos oxigenados.

El aporte al conocimiento sobre la composición química del aceite esencial de *A. arborescens* Miller, puede considerarse como un avance en el estudio fitoquímico de esta especie debido a la escasa información encontrada en bibliografía y bases de datos.

#### RECOMENDACIONES

En cuanto a la recolección del material vegetal, se pueden realizar posteriores trabajos de investigación en los cuales se incluyan otras variables tales como: época de recolección, edad de la planta, tipo de suelo, etc. Con el fin de establecer los cambios en la obtención de los metabolitos secundarios presentes en esta planta.

Realizar la medición de propiedades físico-químicas, tales como índice de refracción, densidad, poder rotatorio, solubilidad en etanol, índices de acidez, entre otros, las cuales permitan elaborar una ficha técnica propia del aceite esencial, siendo ésta de gran importancia en el momento de la comercialización del mismo.

Realizar los test de actividad biológica correspondientes de los compuestos encontrados, que permitan determinar su toxicidad y de esta forma poder orientar el uso que se les puede dar a los principios activos de la planta a nivel farmacológico y agronómico.

Se recomienda realizar experimentos que midan la capacidad antioxidante de los AE por métodos diferentes a la captura de radicales, que permitan tener una visión más amplia de su comportamiento como antioxidantes, en diferentes sistemas, e.g. peroxidación lipídica.

## BIBLIOGRAFÍA

A, Chang y S, Klinar. Evaluación Química y Espectroscópica de tres plantas medicinales de ICA. En: I Congreso de Investigación. Lima. Vol. 12, No. 13 (1984); p. 129

A. Chang, S. Klinar y J. Chanllío. Evaluación de la actividad antioxidante de cinco plantas medicinales de ICA. Lima. En: I Congreso Internacional FITO. Vol. 42, No. 41 (2000); p. 86-94

ADAMS, Robert. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy. Carol Stream. Ed. Allured Publishing Corporation. Illinois USA. (1995); 886.p

ALVAREZ, M., Alba Teresa. Aislamiento, purificación e identificación de principios toxicosalcoloidales en plantas del genero crotalarina y alimento contaminado para aves. Bucaramanga. Tesis (Magister en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Área de Productos Naturales. (2004); p. 135

ANTOLOVICH, M. PRENZLER, P.D. PATSALIDES, E. MCDONALD, S and ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. Vol. 127 (2002); p. 183-198

ARKIN, Herbert y COLTON, Raidmond. Métodos estadísticos. Ed. Continental. Mexico. (1970); 667.p

ARNAO, M. B., A. Cano, J. F. Alcolea & M. Acosta. Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigment extract. In: *Phytochemical Analysis*. Vol. 12, No 34 (2001); p.138-143

BANDONI, Arnoldo. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Editorial Universidad Nacional de la Plata. Argentina, (2000); 788.p

BANTHORPE, D. V., B. V. Charlwood & M. J. O. Francis. The biosynthesis of monoterpenes. *Chem*. New York, (1972); p. 115-155

BRUNETON, J. Aceites esenciales. En: *Farmacognosia Factores de variabilidad de los aceites esenciales*. Acribia, S.A. Zaragoza: España. (2001); p. 488-491

BUCKINGHAM, J. Dictionary of Natural Products on CD-ROM. Version 6.1. Chapman and Hall. London, (1998); p. 147-162

Buttery, R. G., Guadagny, D. G., Ling, L.C., Seifert, R. M., Lipton, W. Additional volatile components of cabbage, brocoli and cauliflower. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 24 (1976); p. 829-835

CALDERÓN, L. Modificaciones de la estructura química del (+)-curcufenol y su influencia en la actividad antimicrobiana. Tesis de Maestría en Química. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá. 1997.

CAMPOS, A. M., LIAAEN, E. A. Kinetic of the reaction between 2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *In: Free Rad. Biol. Med.*, Chile. (1996); p. 119-224

CHANG, S y CASTILLO, R. Avances del Catálogo de Plantas Medicinales de ICA. *En: XV Congreso Peruano de Química*. Lima. Vol. 22, No. 18 (1987); p. 67-88

CORI, O. M. Enzymic aspects of the biosynthesis of monoterpenes in plants. *Phytochemistry*. New York, (1983); p. 331-341

CROTEAU, R. The discovery of terpenes. *En: Discoveries in Plant Biology*. Ed. S. D. Kung & S. F. Yang. World Scientific Publ. Hong Kong. (1998); 902p.

DAYMY PINEDA A. "Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos" Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos y Instituto Nacional de Nutrición de Italia *In: Rev. Cubana Aliment Nutr.* La Habana. Vol.13, No 33 (1999); p. 104 -111

DEVON, T. K. & A. I. Scott. *Handbook of naturally occurring compounds*. Vol. II. Ed. Terpenes. Academic Press, New York, (1972); 1055.p

DUKE J. A., BOGENSCHUTZ-GODWIN M. J. & OTTESEN A. R. *Duke's Handbook Of Medicinal Plants Of Latin America*, Ed. CRC Press. Taylor & Francis Group; Boca Raton. (2009); 962.p

ESPINOZA, H. BRUGERAS, J. Vitaminas y minerales contra el estrés. *En: Rev. Cubana. Farm.* La Habana. Vol. 35, No. 3 (2001); p. 74-78

ESTEBAN, J. L. MARTÍNEZ-CASTRO, I. & SANZ. Evaluation and optimization of the automatic thermal desorption (ATD) method in the gas chromatographic determination of plant volatile compounds. *J. Chromatogram*. A 657. (1993); p. 155-164

GALVAO, R. M. & J. Mancini - Filho. Antioxidant activity of spices: evaluation and comparison of in vitro and in vivo methods. *J. Brazilian Soc. Food Nutr.* Vol.22 (2001); p. 49-62

GERSHENZON, J. & R. Croteau. Terpenoidbiosynthesi: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In: Lipid Metabolism in Plants. Ed. T. S. Moore. CRC Press, Boca Raton, Fl. (1993); p. 340-388

GERSHENZON, J. & R. Croteau. Terpenoidbiosynthesi: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In: Lipid Metabolism in Plants. Ed. T. S. Moore. CRC Press, Boca Raton, Fl. (1993); p. 340-388

GIL RUIZ, P. Productos naturales. 1ª Ed. Universidad Politécnica de Navarra. (2002); 943.p

GUENTHER, Ernest. The essential Oils.Volumen 3. Ed. New York. (1942); 1066.p

HALLIWELL, B. & J. M. C. Gutteridge. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease.Meth.Enzymol. New York. Vol. 186 (1990); p. 1-85

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. Ann. In: Rev. Nutr. New York. Vol. 16, No 49 (1996); p. 33-50

HAYS, William. Statistics for the social sciences.Ed. Rinehart and Winston. New York. (1973); 845.p

JENNINGS, M. E., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw, W., Chemat, F. Methods of isolation L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. Vol. 79 (1977); p.1079-1086

JIROVETZ, L. Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent.In: Recent Res. Devel. Agron.Horticul.Vol 2 (2006); p. 1-12

JK, Hwang. JS, Shim. and YR, Pyun. Antibacterial activity of Xanthorrhizol from Curcuma xanthorrhiza against oral pathogens.In: Fitoterapia. Vol. 71, No. 8 (2000); p. 321–323

JOHNSON, L. E. Fodd technology of the antioxidant nutrients. CRC Crit. In: Rev. Food Sci. Nutr. New York. Vol. 35 (1995); p 149-159

KUKLINSKI, C. Aceites esenciales. En: Farmacognosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicantosas de Origen Natural. Ediciones Omega S.A. Barcelona. (2000); 1123.p

Limoneno [en línea] Colombia. [Citado el 19 de Julio de 2011]. Disponible en internet: <http://es.wikipedia.org/wiki/Limoneno>

LITTLE, D. B. & R. B. Croteau. Biochemistry of essential oil terpene. A thirty year overview. In: Flavor Chemistry: 30 Year of Progress. Ed. Teranishi et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. (1999); p. 630.p

LOOMIS, W. D. & R. Croteau. Biochemistry and physiology of lower terpenoids. Recent Adv. Phytochem. New York, (1973); p. 147-182

LUCCHESI, Marie; CHEMAT, Farid y SMADJA, Jacqueline. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. In: Journal of Chromatography A. New York. Vol. 1043 (2004); p. 323-327

M, Armaka. E, Papanikolaou. A, Sivropoulou. M, Arsenakis. Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. In: MedLine. Aristotle University. Vol. 43, No. 33 (1999); p. 89-94

M. SALAMA, Ahmed. FONSECA, Claudia. RENGIFO, Laura. Actividad antitumoral y toxicidad de (+)-curcufenol y de curcudiol aislados de la esponja marina *Didiscosoa*. En: Revista Colombiana de Ciencias Químico – Farmacéuticas. Universidad Nacional de Colombia. Vol. 3, No. 29 (jul.-sep. 2000); p. 50-56

MAARSE, H., Kepher, R. E. Change in composition of volatile terpenes in Douglas fir needles during maturation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 18 (1970); p. 1095-1101

Mc CARTHY, T. L., J. P. Kerry, J. F. Kerry, P. B. Lynch & D. J. Buckley. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. Meat Science. Vol. 57 (2001); p 45-52

McCASKILL, D. & R. Croteau. Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. Advances Biochem. Engin. Biotechnol. New York, (1997); p. 102-146

Métodos de separación en Química Analítica. Universidad del Tolima: Especialización en Productos Naturales, 2004. [En línea]. Colombia [Citado 25 Oct, 2009]. Disponible en Internet: <http://www.ut.edu.co/fc/0940/index.htm>

MILLER, N. J., A. T. Diplock, C. Rice-Evans. Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. In: Agric. Food Chem. New York. Vol. 43, No 29 (1995); p. 1794-1801

MILLER, N. J., C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan & A. Milner. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin. Sci. Vol. 84 (1993); p. 407-412

MILLER, N.J. and RICE-EVANS, C.A. Factores influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Research*. Vol. 26 (1997); p. 195-199

NAVES, R. Volatile plant constituents. *En: Bull. Soc. Chim. France*. Vol.3 (1971); p.886-888

NES, N. R. & M. L. Mckean *Biochemistry of steroids and other isopentenoids*. Ed. University Park Press, Baltimore. MD, (1977); 1188.p

PAECH, K. *Biochemie und Physiologie der Sekundären Pflanzenstoffe*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. (1950); p. 99-110

PALOZZA, P. & N. I. Krinsky. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. *Meth. enzymol.* New York, (1992); p. 403-420

Pherobase [en línea] Colombia. [Citado 28 de Marzo de 2011]. Disponible en internet: <http://www.pherobase.com>

PLESSI, M. BERTELLI, D. y MIGLIETTA, F. Effect of microwaves on volatile compounds in White and Black Pepper. *In: Lebensmittel- Wissenschaft und-technologie*, New York. Vol.35 (2005); p. 260-264

Puertas, M.M.A. Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos volátiles y evaluación de la posible actividad antioxidante in vitro de algunos productos naturales y sintéticos. Tesis de Doctorado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, (2002); p. 171

RE, R. PELLEGRINI, N. PROTEGGENTE, A. PANNALA, A. YANG, M. and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* Vol. 26 (1999); p. 1231-1237

RE, R. PELLEGRINI, N. PROTEGGENTE, A.P. YANG, M.; and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS+. radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 26 (1999); p. 1231-1237

RECSAN, Z. PAGLIUCA, M. PIRETTI, L. PENZES, K. YODIM, R. C, Noble & S. G. Deans. Effect of essential oils on the lipids of the retina in the ageing rat: a possible therapeutic use. *Journal of Essential Oil Research*. Vol. 9 (1997); p. 53-56

RICE-EVANS, C. & N. J. Miller. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Meth. Enzymol.* Vol. 234 (1994); p. 279-293

RICE-EVANS, C., N. J. Miller & G. Paganga. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* Vol. 20 (1996); p. 933-956

RICE-EVANS, C. J. Miller, P. G. Bolwell, P. M. Bramley & J. B. Pridham. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.* Vol. 22 (1995); p. 375-383

ROBARDS, K. PRENZLER, P.D. TUCKER, G. SWATSITANG, P. and GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* Vol. 66 (1999); p. 401-436

RODRIZALES, Javier. Resguardo indígena Quillacinga "refugio del sol" corregimiento de El Encano. [En línea]. Colombia. [Citado 1/ Abril/ 2009]. Disponible en internet: <http://www.xexus.com.co/modules.php?op=modload&name=Sections&file=indei&req=printpagp&artid=158>

RÖMER, G., Renner, E. Simple methods for the isolation and enrichment of flavour materials from food. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, Vol 156 (1974); p. 329-325.

ROSSITER, K.J., Structure-odor relationships. *In: Chemical Reviews*. New York. Vol. 96 (1996); p. 3201-3240

RUKAYADI, Yaya., HWANG, Jae-Kwan. In Vitro antimycotic activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *In: PubMed. Phytotherapy research*. Vol. 21, No. 5 (2007); p. 434-438

RUZICKA, L. A. Eschenmoser & H. Heusser the isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, (1953); p. 357-396

S.Klinar, P.Castillo, A.Chang, G. Schmeda y S. Reyes. Actividad Biológica de Plantas Medicinales de ICA. Lima. *En: VI Congreso Peruano de Farmacia*. Vol. 31 (1993); p. 166-170

SACHS, Lothar. Estadística aplicada. Ed. Labor. Barcelona. (1978); 686.p

SEFIDKON, F. ABDOLI, M. (Research Institute of Forests and Rangelands, PO Box 13185 116, Tehran, Iran) Essential oil composition of *Aziliaeryngiodes* (Pau) Hedge et Lamond from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 16 (2004); p. 103 104

SERRANO, Martín. Estudio de la variación del aroma de flores de Ylang-Ylang, en función del tiempo de su almacenamiento y hora de recolección, y de su posible actividad antioxidante "in vitro". Bucaramanga. Tesis (Magíster en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Área de productos naturales. (2002); p.93

SOTO H. M. "Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *Berlandieri* Schafer)" *Fitotecnia Mexicana*. Chapingo, México. Vol. 30, No. 1 (enero – marzo 2007); p 43-49

STANLEY, J. & A. Mogg. MAFF antioxidant research programme. The Biochemist. (Feb/Mar, 1995); p. 22-24

Usos del alfa pineno [en línea] Colombia. [Citado 12 de Julio de 2011]. Disponible en internet: <http://www.cosmos.com.mx/b/tec/dxjl.htm>

WALLACH, O. Terpene und Campher. Zusammenfassung einiger Untersuchungen auf dem Gebiet der alicyclischen Kohlenstoffverbindungen. 2nd ed. Vit. Leipzig. Germany. (1914); p. 109

WAYNER, D. D. M., G. W. Burton, K. U. Ingold & S. Locke. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled lipid peroxidation. FEBS Lett. New York, (1985); p. 33-37

WILDT, A. y AHTOLA, O. Analysis de covariance. Ed. Sage publications. London (1987); 556.p

WILLIAMS, DH. & I, Fleming. Spectroscopic Methods in Organic Chemistry, Ed. McGraw-Hill Publishing Co. London, (1966); 922.p

Y.S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao y B. D. Oomah "Actividad Antioxidante y Fenoles totales y frutas selectas, vegetales y productos de grano". In: Journal Agric Food Chem. Vol. 19, No 22 (1998); p. 349-371

YANG, Depo. MICHEL, Laura. CHAUMONT, Jean-Pierre. & CLERC, Joelle. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. In: Mycopathologia. Kluwer Academic Publishers. Vol. 14, No. 148 (1999); p. 79-82

ZAPATA, Bibiana., DURAN, Camilo., STASHENKO, Elena., BETANCUR GALVIS, Liliana & MESA ARANGO, Ana Cecilia. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. En: Revista Iberoamericana de Micología. El Sevier Doyma. Colombia. Vol. 27, No. 2 (2010); p.101-103

## ANEXOS

### Anexo A: Calculo del ANOVA de dos Factores

El primer paso en los cálculos es encontrar los totales de cada celda. Esto se hace en la tabla 17, que también incluye otras cantidades necesarias en los cálculos.  $T_i$ , denota el total de la fila  $i$ -ésima, el  $T_j$  el total de la columna  $j$ -ésima y  $T$  el gran total.

Tabla 17. Datos para el cálculo del ANOVA de dos Factores

| P \ T     | 30    | 60    | 90    | 120   | $T_i$          | $T_i^2$ |
|-----------|-------|-------|-------|-------|----------------|---------|
| 40        | 89    | 56    | 39    | 48    | 232            | 53824   |
| 60        | 35    | 30    | 43    | 43    | 151            | 22801   |
| 80        | 27    | 40    | 39    | 39    | 145            | 21025   |
| 100       | 37    | 36    | 40    | 36    | 149            | 22201   |
| $T_j =$   | 188   | 162   | 161   | 166   | $T = 677$      |         |
| $T_j^2 =$ | 35344 | 26244 | 25921 | 27556 | $T^2 = 458329$ |         |

P = Potencia    T= Tiempo

$$T_j^2 = 115065$$

$$T^2 = 119851$$

Se calculan las sumas de cuadrados entre filas, entre columnas y del total. Cada cálculo requiere el término  $T^2/nrc$  (donde  $n$  es el número de mediciones repetidas en cada celda, en este caso 3 (ver tabla 3),  $r$  = número de filas y  $e$  = número de columnas). A este término se le denomina término de corrección,  $C$ . Tenemos:

$$C = T^2/nrc = 458329 / (3*4*4) = 9548,520833$$

Se calculan ahora las sumas de cuadrados:

$$\text{Suma de cuadrados entre filas (Potencia)} = (T^2 / nc) - C$$

$$(T^2 / nc) - C = (119851 / 3*4) - 9548,520833 = 439,063$$

Con  $r - 1 = 3$  grados de libertad

$$\text{Suma de cuadrados entre columnas (Tiempo)} = (T_j^2 / nc) - C$$

$$(T_j^2 / nc) - C = (115065 / 3*4) - 9548,520833 = 40,2292$$

Con  $c - 1 = 3$  grados de libertad

Suma de cuadrados total (Total corregido) =  $X^2_{ijk} - C$

Donde  $X_{ijk}$  es la  $k$ -ésima réplica en la  $i$ -ésima fila y  $j$ -ésima columna, es decir,  $X^2_{ijk}$  es la suma de los cuadrados de las mediciones individuales que aparecen en la tabla 3.

Suma de cuadrados total (Total corregido) =

$$= X^2_{ijk} - C = 10579 - 9548,520833 = 1030,48$$

Con  $nrc - 1 = 47$  grados de libertad.

La variación debida al error aleatorio (normalmente llamada variación residual o residuos) se estima a partir de la variación dentro de las celdas, es decir, la variación entre réplicas. La suma de cuadrados residual =  $X^2_{ijk} - T^2_{ij} / n$  donde  $T_{ij}$  es el total para la celda de la  $i$ -ésima fila y  $j$ -ésima columna, es decir, la suma de las mediciones replicadas en la  $i$ -ésima fila y la  $j$ -ésima columna.

Suma de cuadrados residual (Residuos) =  $X^2_{ijk} - T^2_{ij} / n$

$$= 10579 - (31637 / 3) = 33.3333$$

Con  $(n - 1)rc = 32$  grados de libertad.

La suma de cuadrados de la interacción y sus grados de libertad se pueden obtener ahora por diferencia.

$$\text{Interacciones AB} = 1030,48 - 33,3333 - 439,063 - 40,2292 = 517,854$$

Con:  $47 - 32 - 3 - 3 = 9$  grados de libertad

Calculo de cociente F: [Cuadrado Medio (CM) fila o columna] / CM Residuos]

a) Entre filas (es decir entre potencias). Tenemos:

$$F_{3, 32} = 146,354 / 1,04167 = 140,50$$

El valor crítico de  $F_{3,32}$  es 2,901 ( $P = 0.05$ ).

b) Entre columnas (es decir entre tiempos). Tenemos:

$$F_{3, 32} = 13,4097 / 1,04167 = 12,87$$

El valor crítico de  $F_{3,32}$  es 2,901 ( $P = 0.05$ ).

c) Interacciones AB:

$$F_{9,32} = 57,5394 / 1,04167 = 55,24$$

El valor crítico de  $F_{9,32}$  es 2,189 ( $P = 0.05$ ).

A continuación se resumen los resultados de estos cálculos.

| Fuente              | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado Medio | Cociente-F | Valor Crítico F |
|---------------------|-------------------|----|----------------|------------|-----------------|
| Efectos principales |                   |    |                |            |                 |
| A:Potencia          | 439,063           | 3  | 146,354        | 140,50     | 2,901           |
| B:Tiempo            | 40,2292           | 3  | 13,4097        | 12,87      | 2,901           |
| Interacciones       |                   |    |                |            |                 |
| AB                  | 517,854           | 9  | 57,5394        | 55,24      | 2,189           |
| Residuos            | 33,3333           | 32 | 1,04167        |            |                 |
| Total (corregido)   | 1030,48           | 47 |                |            |                 |

Nivel de significación de la prueba  $P = 0.05$

Anexo B. Cálculo de la DMS (MWHd)

$$DMS = t^* \sqrt{(2CMe/r)}$$

t, de Student, asociada a la probabilidad de función de los grados de libertad de Residuos (32 grados de libertad)

CMe, corresponde al cuadrado medio de los Residuos.

r, numero de repeticiones (12)

$$DMS = 2,0369 \quad (2 * 1,04167) / 12 = 0,848724$$

Anexo C. Cálculo del ANOVA de un Factor

Tabla 18. Datos para el cálculo del ANOVA de un factor

| Tiempo | Nº de Picos |    |              | Media      |
|--------|-------------|----|--------------|------------|
| 30     | 18          | 18 | 18           | 18         |
| 60     | 24          | 23 | 24           | 23,67      |
| 90     | 21          | 21 | 21           | 21         |
| 120    | 23          | 23 | 23           | 23         |
|        |             |    | Media global | 21,4166667 |

La hipótesis nula adoptada es que todas las muestras se extraen de una población con media  $\mu$  y varianza  $\sigma_0^2$ . Con base en esta hipótesis se puede estimar  $\sigma_0^2$  de dos formas; una estudia la variación *dentro de* cada muestra, y la otra la variación *entre* las distintas muestras.

#### Variación dentro de la muestra

Para cada muestra se puede calcular una varianza utilizando la fórmula  $(x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)$ . Si usamos los valores de la tabla 18, tenemos que las varianzas de las muestras son:

$$\text{Tiempo 30} = \frac{(18 - 18)^2 + (18 - 18)^2 + (18 - 18)^2}{3 - 1} = 0$$

$$\text{Tiempo 60} = \frac{(24 - 23,67)^2 + (23 - 23,67)^2 + (24 - 23,67)^2}{3 - 1} = 0,33333$$

$$\text{Tiempo 90} = \frac{(21 - 21)^2 + (21 - 21)^2 + (21 - 21)^2}{3 - 1} = 0$$

$$\text{Tiempo 120} = \frac{(23 - 23)^2 + (23 - 23)^2 + (23 - 23)^2}{3 - 1} = 0$$

Al promediar estos valores se obtiene el Cuadrado Medio dentro de la muestra.

$$\text{Estimación de } \sigma_0^2 \text{ dentro de la muestra} = (0 + 0,33333 + 0 + 0)/4 = 0,0833333$$

Esta estimación tiene 8 grados de libertad: la estimación de la varianza de cada muestra tiene 2 grados de libertad y hay 4 muestras.

La ecuación que representa el cálculo del Cuadrado Medio dentro de la muestra es:  $\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 / h(n - 1)$ . El sumatorio sobre  $J$  y la división por  $(n - 1)$  se refiere a la varianza de cada muestra; el sumatorio sobre  $i$  y la división por  $h$  promedia estas varianzas muestrales.

Ya que en este caso el número de grados de libertad es 8 y la estimación dentro de la muestra es 0,0833333 la suma de los términos cuadráticos es:

$$\text{Suma de Cuadrados} = 0,0833333 \times 8 = 0,666667$$

#### Variación entre muestras

Si todas las muestras se extraen de una población cuya varianza es  $\sigma_0^2$ , entonces sus medias proceden de una población con varianza  $\sigma_0^2/n$ . Así, si la hipótesis nula es verdadera, la varianza de las medias de las muestras proporciona una estimación de  $\sigma_0^2/n$ . De la tabla 18:

Varianza de la media muestral =

$$= \frac{(18 - 21,4167)^2 + (23,67 - 21,4167)^2 + (21 - 21,4167)^2 + (23 - 21,4167)^2}{4 - 1} = 6,4722223$$

El Cuadrado Medio entre la muestra es:

$$\text{Estimación entre muestras de } s_0^2 = 6,4722223 \times 3 = 19,4167$$

Esta estimación tiene 3 grados de libertad, ya que se ha calculado a partir de 4 medias muestrales.

La ecuación que representa el cálculo de la estimación de  $s_0^2$  entre muestras es:  $\sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2 / (h - 1)$ . En este caso, el número de grados de libertad es 3 y la estimación entre muestras es 19,41666817, por lo que la suma de los términos cuadráticos es:

$$\text{Suma de Cuadrados} = 3 \times 19,41666817 = 58,25$$

$$\text{Total (corregido)} = 0,666667 + 58,25 = 58,9167$$

Calculo del cociente F: [CM entre muestra] / CM dentro de las muestras]

$$F_{3,8} = 19,4167 / 0,0833333 = 233,00$$

El valor crítico de  $F_{3,8}$  es 4,066 ( $P=0.05$ ).

A continuación se resumen los resultados de estos cálculos.

| Fuente            | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado Medio | Cociente-F | Valor Critico F |
|-------------------|-------------------|----|----------------|------------|-----------------|
| Entre Grupos      | 58,25             | 3  | 19,4167        | 233,00     | 4,066           |
| Dentro de Grupos  | 0,666667          | 8  | 0,0833333      |            |                 |
| Total (Corregido) | 58,9167           | 11 |                |            |                 |

Anexo D. Cálculo de la DMS (DES)

$$DMS = t^* \sqrt{(2CMe/r)}$$

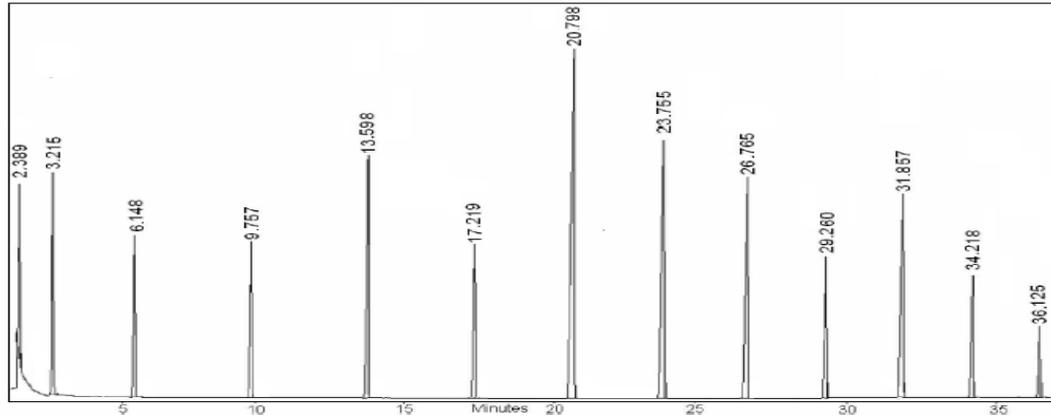
t, de Student, asociada a la probabilidad de función de los grados de libertad Dentro de los grupos (8 grados de libertad)

CMe, corresponde al cuadrado medio Dentro de los grupos.

r, numero de repeticiones (3)

$$DMS = 2,306 (2 * 0,0833333) / 3 = 0,543532$$

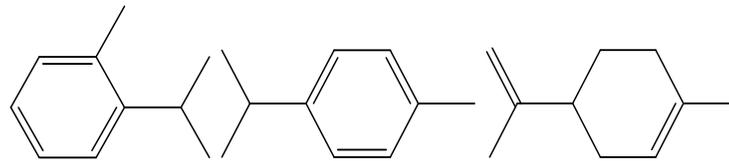
Anexo E: Cromatograma obtenido por GC-FID de la mezcla de parafinas estándar (C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>).



Fuente: esta investigación

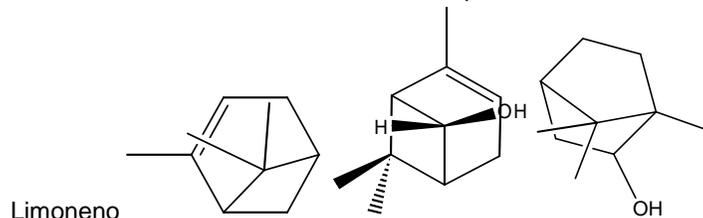
Anexo F: Estructuras químicas de los principales compuestos identificados por CG/MS

A continuación, se presentan las estructuras químicas de los principales metabolitos secundarios volátiles presentes en el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller, obtenidos mediante las técnicas de extracción MWHD y DES.



o-Cimeno

p-Cimeno

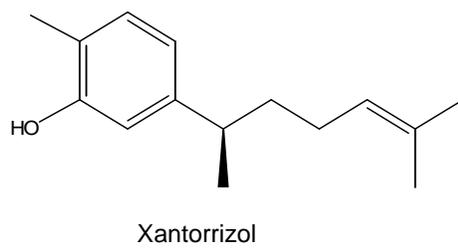
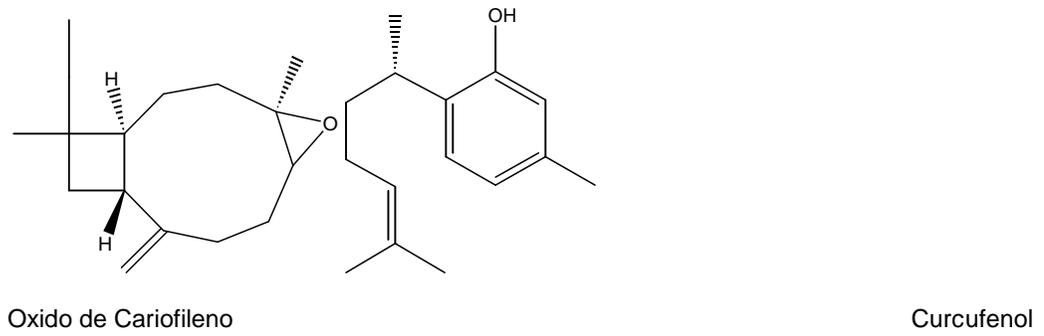
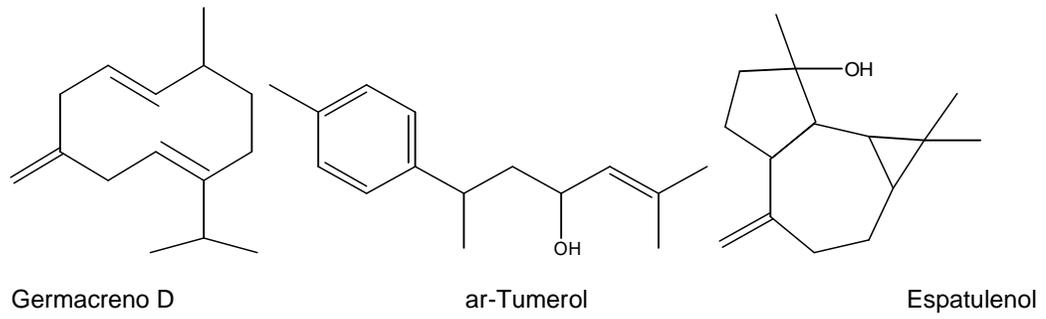
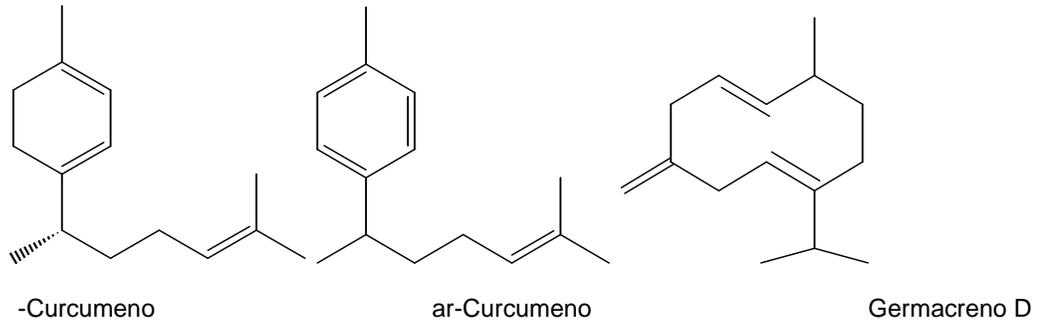


Limoneno

Pineno

cis-Crisantenol

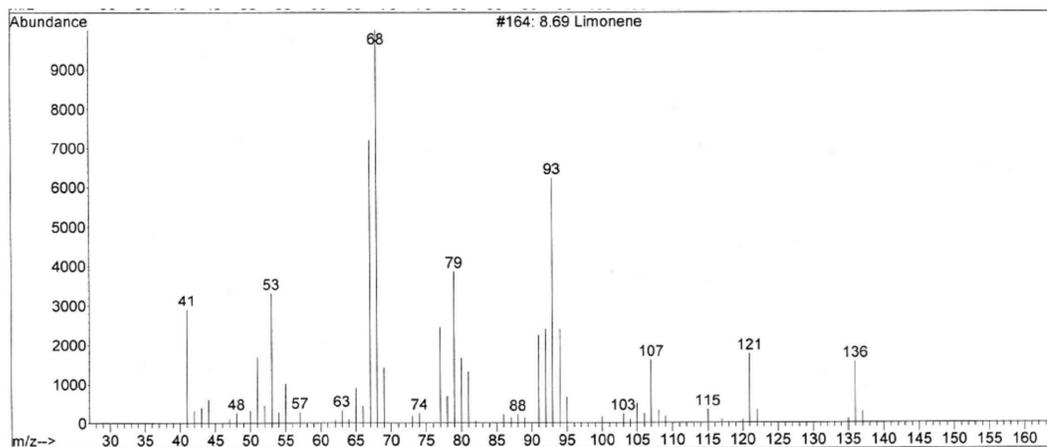
Isoborneol



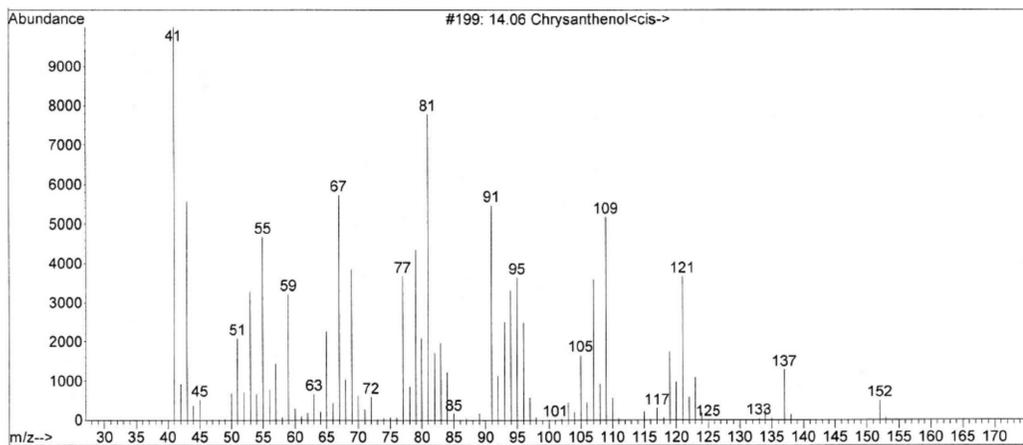
Fuente: esta investigación

Anexo G: Espectros de masas de los compuestos mayoritarios obtenidos de las bases de datos de Adams, Wiley 138 y NIST 05.

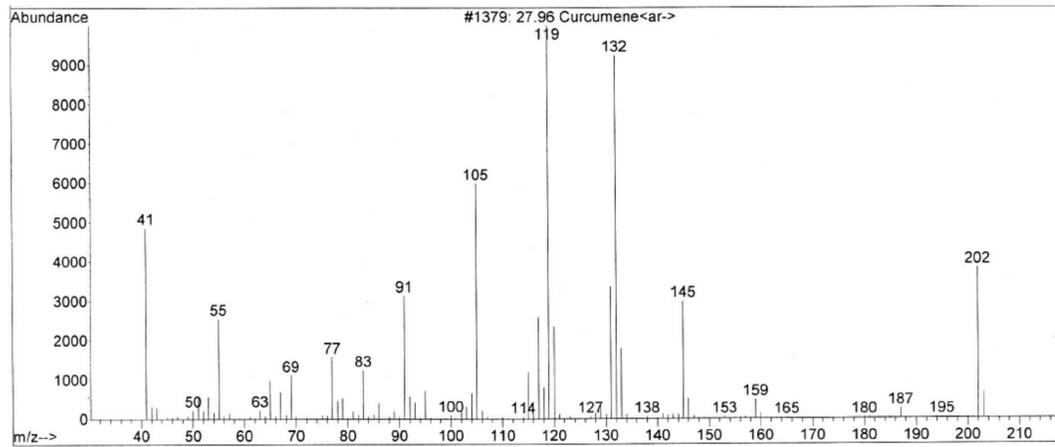
Library Searched : D:\Database\Adams.L  
Quality : 97  
ID : 8.69 Limonene



Library Searched : D:\Database\Adams.L  
Quality : 97  
ID : 14.06 Chrysanthenol<cis->



Library Searched : D:\Database\Adams.L  
Quality : 99  
ID : 27.96 Curcumene<ar->



Fuente: esta investigación

