

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DEL ACEITE
ESENCIAL PRESENTE EN LAS HOJAS DE *Lepechinia vulcanicola*, CULTIVADA
EN DOS REGIONES DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

YORLIN BETANCOURT

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
PASTO 2013

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DEL ACEITE
ESENCIAL PRESENTE EN LAS HOJAS DE *Lepechinia vulcanicola*, CULTIVADA
EN DOS REGIONES DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

YORLIN BETANCOURT

Trabajo presentado como requisito parcial para optar el título de Químico.

Director:
Olga Lucia Benavides,
M. Sc. Productos Naturales.

Codirector:
Juan Pablo Jiménez,
Químico.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
PASTO 2013

“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 por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Director

Codirector

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, noviembre de 2013.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme la sabiduría y entendimiento para lograr cumplir con una de las metas más importantes en mi vida.

A mi familia, por su apoyo incondicional, su amor y sus buenos consejos.

A la M. Sc. Olga Lucia Benavides y al Químico. Juan Pablo Jiménez, quienes posibilitaron el desarrollo de esta investigación, por su asesoría y colaboración.

Al Químico. David Arturo, por sus recomendaciones y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A la sección de laboratorios especializados de la Universidad de Nariño por toda la colaboración prestada.

A mis amigos, profesores y conocidos, con quienes compartí buenos y malos momentos en este trayecto de mi vida.

RESUMEN

En la presente investigación se trabajó con la especie vegetal *Lepechinia vulcanicola*, se estudió la composición del aceite esencial (AE) y su actividad antioxidante, incluyendo como variable la región de cultivo: Matico, cultivada en el corregimiento de Gualmatán, departamento de Nariño y Salvarrial Blanco, cultivada en el municipio de Yacuanquer, departamento de Nariño.

El AE se extrajo mediante la técnica de hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD) y se analizó mediante GC y GC-MS. Se encontró que para el aceite esencial de Matico (AEM), los compuestos mayoritarios fueron: limoneno, prenil limoneno (trans) y thujopsan-2-alfa-ol (408, 319 y 208 mg del compuesto/Kg de material vegetal seco, respectivamente), para el aceite esencial de Salvarrial Blanco (AESB), los compuestos mayoritarios fueron: thujopsan-2-alfa-ol, limoneno y palustrol (802, 595, 183 mg del compuesto/Kg de material vegetal seco, respectivamente). El compuesto delta-2-careno, solo se identificó para AEM y los compuestos gama-curcumeno y bulnesol solo se identificaron para AESB.

Por el método de actividad antioxidante equivalente al trolox (TEAC), se determinó la actividad antioxidante total (AAT), se estableció para AEM una AAT=9,05 y para AESB una AAT=8,42. También se determinó la eficiencia anti-radical (EAR), obteniendo para AEM una EAR=3,75E-7 y para AESB una EAR=2,09E-7). El ácido ascórbico, fue utilizado como sustancia de referencia.

ABSTRACT

In this research, worked with the plant species *Lepechinia vulcanicola*, was studied the essential oil composition (AE) and their antioxidant activity, including variable growing region: Matico, cultivated in the village of Gualmatán, Nariño department and Salvarrial Blanco, cultivated in the municipality of Yacuanquer, Nariño department.

The AE is extracted by the technique of hydrodistillation assisted by microwave radiation (MWHD) and analyzed by GC and GC-MS. We found that for Matico essential oil (AEM), the major components were: limonene, prenyl limonene (trans) and thujopsan-2-alpha-ol (408, 319 and 208 mg of compound / kg of dry plant material, respectively) for the Salvarrial Blanco essential oil (AESB), the major components were: thujopsan-2-alpha-ol, limonene and palustrol (802, 595, 183 mg of compound/kg of dried plant material, respectively). It was also established that the delta-2-carene, are only present in AEM, just as the range-curcumene and bulnesol only identified in AESB.

By the method trolox equivalent antioxidant activity (TEAC), we determined the total antioxidant activity (TAA), was established to AEM one AAT=9.05 and AESB one AAT=8.42. We also determined the anti-radical efficiency (EAR), obtaining for AEM one EAR=3,75E-7 and AESB one EAR=2,09E-7). Ascorbic acid was used as reference substance.

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| INTRODUCCIÓN | 21 |
| 1. OBJETIVOS..... | 23 |
| 1.1. OBJETIVO GENERAL | 23 |
| 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 23 |
| 2. MARCO REFERENCIAL..... | 24 |
| 2.1. ANTECEDENTES..... | 24 |
| 2.1.1. Especie vegetal..... | 24 |
| 2.1.1.1. Clasificación taxonómica..... | 24 |
| 2.1.1.2. Hábitat y descripción..... | 24 |
| 2.1.1.3. Usos..... | 25 |
| 2.1.2. Trabajos relacionados con el género Lepechinia..... | 25 |
| 2.1.2.1. Las Lepechinias y la medicina tradicional..... | 25 |
| 2.1.2.2. Las Lepechinias y los aceites esenciales..... | 26 |
| 2.1.2.3. Las Lepechinias y la actividad antioxidante..... | 27 |
| 2.2. MARCO CONTEXTUAL..... | 29 |
| 2.2.1. Corregimiento de Gualmatán..... | 29 |
| 2.2.2. Municipio de Yacuanquer..... | 30 |
| 2.3. MARCO TEÓRICO..... | 31 |
| 2.3.1. Aceites esenciales..... | 31 |
| 2.3.1.1. Generalidades..... | 31 |
| 2.3.1.2. Biosíntesis..... | 32 |
| 2.3.1.3. Composición química..... | 32 |
| 2.3.1.4. Aplicaciones..... | 33 |
| 2.3.2. Técnicas de extracción y de análisis..... | 33 |
| 2.3.2.1. Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD)..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 2.3.2.2. Cromatografía de gases y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas | 34 |
| 2.3.3. Procesos de oxidación y propiedades antioxidantes | 36 |
| 2.3.4. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante | 36 |
| 2.3.4.1. Actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) | 37 |
| 2.3.4.2. Evaluación de la eficiencia anti-radical (DPPH) | 38 |
| 3.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA | 40 |
| 3.3. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL | 40 |
| 3.3.1. <i>Lepechinia vulcanicola</i> , (Matico) | 41 |
| 3.3.2. <i>Lepechinia vulcanicola</i> , (Salvarrial Blanco)..... | 42 |
| 3.4. ANÁLISIS INSTRUMENTAL | 43 |
| 3.4.1. Análisis cromatográfico | 43 |
| 3.4.2. Identificación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS | 44 |
| 3.4.3. Cuantificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial..... | 44 |
| 3.5. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE | 45 |
| 3.5.1. Actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) | 45 |
| 3.5.2. Evaluación de la eficiencia anti-radical (DPPH) | 47 |
| 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 49 |
| 4.1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA | 49 |
| 4.2. DETERMINACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL PRESENTE EN LAS HOJAS DE <i>LEPECHINIA VULCANICOLA</i> | 49 |
| 4.2.1. Determinación del mejor tratamiento para <i>Lepechinia vulcanicola</i> (Matico, cultivada en Gualmatán): | 50 |
| 4.2.2. Determinación del mejor tratamiento para <i>Lepechinia vulcanicola</i> , (Salvarrial Blanco, cultivada en Yacuanquer) | 50 |
| 4.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA POR GC Y GC/MS DEL AE DE <i>LEPECHINIA VULCANICOLA</i> (MATICO Y SALVARRIAL BLANCO). | 55 |

| | |
|---|----|
| 4.3.1. Identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios para el AE de Lepechinia vulcanicola, Matico, cultivada en Gualmatán | 56 |
| 4.3.2. Identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios para el AE de Lepechinia vulcanicola, Salvarrial Blanco, cultivada en Yacuanquer..... | 59 |
| 4.3.3. Posibles rutas de fragmentación de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de Lepechinia vulcanicola | 61 |
| 4.3.4. Análisis cualitativo comparativo entre el AE de Matico y Salvarrial Blanco.. | 66 |
| 4.3.5. Análisis complementarios, por columna polar de polietilenglicol DB-WAX .. | 68 |
| 4.4. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES | 72 |
| 4.4.1. Actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC). | 72 |
| 4.4.1.1. Determinación de la longitud de onda..... | 72 |
| 4.4.1.2. Curva de calibración | 73 |
| 4.4.2. Evaluación de la eficiencia anti-radical (DPPH)..... | 80 |
| 4.4.2.2. Curva de calibración | 80 |
| 4.4.2.3. Determinación de la eficiencia anti-radical..... | 83 |
| ANEXOS | 99 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de Matico y Salvarrial Blanco..... | 24 |
| Tabla 2. Componentes químicos de los AEs. | 33 |
| Tabla 3. Especificaciones de extracción por la técnica MWHD. | 42 |
| Tabla 4. Numero de señales obtenidas en los perfiles cromatográficos. | 50 |
| Tabla 5. ANOVA de dos factores (potencia, tiempo). | 51 |
| Tabla 6. Diferencia mínima significativa (potencias) | 52 |
| Tabla 7. Diferencia mínima significativa (Tiempo) | 54 |
| Tabla 8. Compuestos mayoritarios presentes en el AE de Lepechinia vulcanicola, Matico. Identificados por GC/MS, aislados por MWHD..... | 57 |
| Tabla 9. Compuestos mayoritarios presentes en el AE de Lepechinia vulcanicola, Salvarrial Blanco. Identificados por GC/MS, aislados por MWHD. | 60 |
| Tabla 10. Principales aspectos de comparación entre el AE de Matico y Salvarrial Blanco..... | 66 |
| Tabla 11. Compuestos mayoritarios presentes en el AE de Lepechinia vulcanicola (Matico), columna DB-WAX. | 70 |
| Tabla 12. Compuestos mayoritarios presentes en el AE de Lepechinia vulcanicola (Salvarrial Blanco). Columna DB-WAX. | 71 |
| Tabla 13. Absorbancia final de las soluciones de Trolox. | 73 |
| Tabla 14. Absorbancia de soluciones de ABTS•+ a diferentes concentraciones de trolox. | 74 |
| Tabla 15. Concentraciones experimentales de soluciones de trolox. | 75 |
| Tabla 16. Datos necesarios para calcular TEAC y ATT..... | 76 |
| Tabla 17. Actividad antioxidante del AE de Lepechinia vulcanicola (Matico y Salvarrial Blanco) y de ácido ascórbico. | 76 |
| Tabla 18. Especie vegetal y componentes mayoritarios de su aceite esencial..... | 79 |

| | |
|---|----|
| Tabla 19. Absorbancia final de las soluciones de DPPH•..... | 81 |
| Tabla 20. Absorbancia de soluciones de DPPH•..... | 82 |
| Tabla 21. Exactitud del método DPPH..... | 83 |
| Tabla 22. Concentración, % DPPH•□remanente y tiempo en el estado estacionario de la sustancia de referencia, AEM y AESB. | 84 |
| Tabla 23. EC50 y su clasificación cinética. | 88 |
| Tabla 24. Eficiencia anti-radical. | 89 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Figura 1. Mapa del municipio de pasto y sus corregimientos. | 29 |
| Figura 2. Mapa del municipio de Yacuanquer..... | 30 |
| Figura 3. Elementos del metabolismo del carbono en relación con las rutas de síntesis de metabolitos secundarios. | 32 |
| Figura 4. Representación del equipo de hidrodestilación asistida por la radiación con microondas..... | 34 |
| Figura 5. Equipo de hidrodestilación asistida por radiación de microondas..... | 41 |
| Figura 6. Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A..... | 43 |
| Figura 7. Equipo GC/MS cromatógrafo de gases Shimadzu QP 2010S. | 44 |
| Figura 8. Lepechinia Willd. Vulcanicola, Matico y Salvarrial Blanco. | 49 |
| Figura 9. Perfil cromatográfico del AE de Lepechinia vulcanicola, Matico, extraído mediante MWHD (W=80%, T=90 min)..... | 56 |
| Figura 10. Perfil cromatográfico del AE Lepechinia vulcanicola, Salvarrial Blanco, extraído mediante MWHD (W=80%, T=90 min)..... | 59 |
| Figura 11. Espectro de masas experimental de limoneno (Matico, cultivada en Gualmatán). | 62 |
| Figura 12. Espectro de masas experimental de limoneno (Salvarrial Blanco, cultivada en Yacuanquer). | 62 |
| Figura 13. Espectro de masas experimental de mirceno (Matico, cultivada en Gualmatán). | 63 |
| Figura 14. Espectro de masas experimental de mirceno (Salvarrial Blanco, cultivada en Yacuanquer). | 63 |
| Figura 15. Espectro de masas experimental de linalol (Matico, cultivada en Gualmatán). | 65 |

| | |
|---|----|
| Figura 16. Espectro de masas experimental de linalol (Salvarrial Blanco, cultivada en Yacuanquer). | 65 |
| Figura 17. Estado físico del AE de Matico y Salvarrial Blanco..... | 67 |
| Figura 18. Perfil cromatográfico del AE <i>Lepechinia vulcanicola</i> (Matico), extraído mediante MWHD (W=80%, T=90 min). Columna DB-WAX. | 69 |
| Figura 19. Perfil cromatográfico del AE <i>Lepechinia vulcanicola</i> (Salvarrial Blanco), extraído mediante MWHD (W=80%, T=90 min). Columna DB-WAX. | 70 |
| Figura 20. Estructura molecular del ácido ascórbico. | 77 |

LISTA DE GRÁFICAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Gráfica 2. Comparación entre medias de las señales cromatográficas para cada potencia. | 52 |
| Gráfica 3. Comparación entre medias de las señales cromatográficas para cada tiempo de extracción..... | 54 |
| Gráfica 4. Gráfico de Interacción potencia-tiempo..... | 55 |
| Gráfica 5. Concentración (mg compuesto/kg material vegetal seco) de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de Lepechinia vulcanicola, Matico.. | 58 |
| Gráfica 6. Composición porcentual de las familias químicas presentes en el AE de Lepechinia vulcanicola, Matico. | 58 |
| Gráfica 7. Concentración (mg compuesto/kg material vegetal seco) de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de Lepechinia vulcanicola, Salvarrial Blanco..... | 60 |
| Gráfica 8. Composición porcentual de las familias químicas presentes en el AE de Lepechinia vulcanicola, Salvarrial Blanco. | 61 |
| Gráfica 9. Compuestos presentes en el AE de Matico y Salvarrial Blanco. | 68 |
| Gráfica 10. Familias químicas presentes en el AE de Matico y Salvarrial Blanco. | 68 |
| Gráfica 11. Espectro de absorción del catión-radical ABTS•+. | 72 |
| Gráfica 12. Curva de calibración de soluciones trolox a 734 nm. | 73 |
| Gráfica 13. Grado de inhibición del catión-radical ABTS•+, en función de la concentración (mM) de trolox..... | 75 |
| Gráfica 14. Comparación de la actividad antioxidante del AE de Lepechinia vulcanicola, Matico y Salvarrial Blanco, con otros aceites esenciales. | 78 |
| Gráfica 15. Espectro de absorción del radical DPPH•. | 80 |
| Gráfica 16. Curva de calibración de soluciones DPPH• a 515 nm..... | 81 |
| Gráfica 17. Comportamiento cinético de ácido ascórbico, AEM Y AESB. | 85 |

| | |
|--|----|
| Gráfica 18. Disminución de la concentración del DPPH• en función de la cantidad de ácido ascórbico, AEM ó AESB..... | 86 |
| Gráfica 19. Variación del tiempo en el estado de equilibrio en función de la cantidad de ácido ascórbico, AEM ó AESB. | 87 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Esquema 2. Reacción de un antioxidante..... | 36 |
| Esquema 3. Representación de la reacción de reducción ABTS•+ en presencia de un antioxidante..... | 38 |
| Esquema 4. Representación de la reacción de reducción DPPH• en presencia de un antioxidante..... | 39 |
| Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del limoneno. | 62 |
| Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación del mirceno. | 64 |
| Esquema 7. Posibles rutas de fragmentación de linalol..... | 66 |

LISTA DE ECUACIONES

| | Pág. |
|--|-------------|
| Ecuación 2. Índices de Kovàts. | 35 |
| Ecuación 3. Cuantificación en GC. | 36 |
| Ecuación 4. Porcentaje de inhibición. | 39 |
| Ecuación 5. % [DPPH•] Remanente. | 39 |
| Ecuación 6. Eficiencia anti-radical. | 39 |
| Ecuación 7. Coeficiente de variación. | 46 |
| Ecuación 8. Intervalos de confianza. | 46 |

LISTA DE ANEXOS

Pág.

| | |
|---|-----|
| Anexo A. Perfiles cromatográficos de <i>Lepechinia vulcanicola</i> , Matico. Zona de cultivo: Gualmatán. | 100 |
| Anexo B. Perfiles cromatográficos de <i>Lepechinia vulcanicola</i> , Salvarrial Blanco. Zona de cultivo: Yacuanquer. | 101 |
| Anexo C. Perfiles cromatográficos con estándar interno. | 105 |
| Anexo D. Perfiles cromatográficos de parafinas columna DB-5 y columna DB-wax. | 108 |
| Anexo E. Espectros de masas experimentales de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de Matico. | 109 |
| Anexo F. Espectros de masas experimentales de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de Salvarrial Blanco. | 112 |
| Anexo G. Espectros de masas teóricos (base de datos Adams, R. 2004) de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de Matico y Salvarrial Blanco. | 114 |
| Anexo H. Características y aplicaciones más representativas de algunos de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de <i>Lepechinia vulcanicola</i> | 118 |
| Anexo I. Certificado de identificación taxonómica. | 123 |

GLOSARIO

| | |
|-------------------|---|
| AAO | Actividad antioxidante |
| AO | Antioxidante |
| AE | Aceite esencial |
| Aes | Aceites esenciales |
| MWHD | Hidrodestilación asistida por radiación de microondas |
| GC | Cromatografía de gases |
| GC/MS | Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas |
| TEAC | Capacidad antioxidante equivalente al Trolox |
| DPPH* | 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo |
| IC50 | Concentración media inhibitoria |
| EC50 | Concentración media efectiva |
| MIC | Concentración mínima inhibitoria |
| Fr | Factor de respuesta |
| ABTS** | 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) |
| EC ₅₀ | Cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial del radical a la mitad |
| T _{EC50} | tiempo que tarda el EC50 para alcanzar el estado estacionario |
| EAR | Eficiencia anti-radical |
| AEM | Aceite esencial de Matico |
| AESB | Aceite esencial de Salvarrial Blanco |
| W | Porcentaje de potencia del horno microondas |
| T | Tiempo total de extracción |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| DMS | Diferencia mínima significativa |
| Ho | Hipótesis nula |
| Hi | Hipótesis alternativa |
| %CV | Coeficiente de variación |
| EM | Espectro de masas |
| S | Segundo |
| %Er | Porcentaje de error relativo de la curva de calibración |
| I _k | Índice de Kovàts |

INTRODUCCIÓN

Lepechinia vulcanicola, es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional, algunas de sus aplicaciones están relacionadas con el alivio de afecciones como: el dolor de estómago, trastornos digestivos, tratamiento de úlceras, entre otras¹, estas enfermedades podrían ser aliviadas por la actividad antioxidante (AAO) del aceite esencial (AE) presente en las hojas de esta especie vegetal y es por ello que se estudió este aspecto. Las principales técnicas y métodos utilizados en la investigación fueron: La hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD), utilizada en la extracción del AE debido a que la transferencia de calor es más efectiva y los tiempos de extracción son cortos². La cromatografía de gases (GC), utilizada en la identificación preliminar de los compuestos presentes en el AE, debido a su alta resolución, velocidad, sensibilidad, sencillez y resultados cuantitativos³.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), necesaria para realizar una identificación tentativa de los metabolitos presentes en el AE. El método TEAC y DPPH, muy utilizados para evaluar la AAO, debido a que son métodos rápidos, sensibles y reproducibles, además su sistema de oxidación se asemeja al de la peroxidación lipídica y si una sustancia presenta buenos resultados a través de estos métodos, lo más probable, es que pueda ser utilizada como un antioxidante comercial, para la protección de productos alimenticios⁴.

¹ ROSERO, A.; BENAVIDES, O.; Arturo, D., Caracterización de los componentes mayoritarios del aceite esencial de hojas y tallo de la planta salvelugo del galeras (*Lepechinia vulcanicola*), Por medio de CG/EM. Trabajo de grado, Químico. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. 2013. 141p.

² CELIS, C.; STASHENKO, E., Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de lippia alba, lippia organoides y phyla (lippia) dulcis, especies de la familia verbenaceae. Trabajo de grado, Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. 2007. 136p.

³ RENDÓN, J.; OROZCO, J.; MONTROYA, C., Estandarización y verificación de la determinación de colesterol en leche y sus derivados por cromatografía de gases-fid. Trabajo de grado, Químico. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Programa de Química Industrial. 2010. 145p.

⁴ GULCIN, I.; HUYUT, Z.; ELMASTAS, M.; ABOUI-Enein, H., Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. En: Arabian Journal of Chemistry. Vol 3: 43–53p. 2010.

Puntualmente esta investigación se enfocó en estudiar la AAO in vitro del AE presente en las hojas de *Lepechinia vulcanicola*, cultivada en dos regiones diferentes del departamento de Nariño: la primera planta cultivada en el corregimiento de Gualmatán, conocida con el nombre común de Matico y la segunda planta cultivada en el municipio de Yacuanquer, en la vereda los Ajos, conocida con el nombre común de Salvarrial Blanco. Es acertado incluir como variable la región de cultivo, debido a que la composición de un quimiotipo en un AE es influenciada por las condiciones ambientales a las que está sometida la planta⁵ y por ende esta variable podría caracterizar la AAO.

⁵ DÍAZ, O.; STASHENKO, E.; MARTÍNEZ, J., Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Her) Britton, cultivada en tres regiones de Colombia. Trabajo de grado, Químico. Bucaramanga: Universidad industrial de Santander. Escuela de Química. Laboratorio de Cromatografía, CENIVAM. 2007. 149p.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial presente en las hojas de *Lepechinia vulcanicola*, cultivada en dos regiones del departamento de Nariño (Matico, cultivada en Gualmatán y Salvarrial Blanco cultivada en Yacuanquer), mediante las técnicas de TEAC (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox) y de DPPH (evaluación de la eficiencia anti radical).

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

a) Extraer el aceite esencial presente en las hojas de cada una de las muestras consideradas (Matico o Salvarrial Blanco), mediante la técnica de hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD).

b) Identificar los compuestos mayoritarios del aceite esencial presente en cada una de las muestras consideradas (Matico o Salvarrial Blanco), mediante cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

c) Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial obtenido de cada una de las muestras consideradas (Matico o Salvarrial Blanco), mediante las técnicas de TEAC (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox) y de DPPH (evaluación de la eficiencia anti radical).

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. Especie vegetal, *Lepechinia vulcanicola*.

2.1.1.1. Clasificación taxonómica: El Matico y el Salvarrial Blanco, tienen la misma clasificación científica, ambas plantas pertenecen a la especie *Lepechinia vulcanicola*, esto según información depositada en los catálogos y etiquetas de las muestras del Herbario PSO de la Universidad de Nariño (número ID: 39557, anexo I), tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de Matico y Salvarrial Blanco.

| | |
|----------------------|--|
| Reino: | <i>Plantae</i> |
| Clase: | <i>Equisetopsida C. Agardh</i> |
| Subclase: | <i>Magnoliidae Novák ex Takht.</i> |
| Superorden: | <i>Asteranae Takht.</i> |
| Orden: | <i>Lamiales Bromhead</i> |
| Familia: | <i>Lamiaceae Martinov (labiadas)</i> |
| Género: | <i>Lepechinia Willd.</i> |
| Especie: | <i>Vulcanicola</i> |
| Nombre Común: | <i>Salvielungo del Galeras, Matico, Salvarrial Blanco.</i> |

Fuente: esta investigación.

2.1.1.2. Hábitat y descripción: *Lepechinia vulcanicola*, nombre en español referente al nombre común dado a las plantas de este género, especie endémica de Colombia y del departamento de Nariño, localizada en el volcán Galeras y zonas aledañas, entre los 2700 y 3600 m de altitud; es un arbusto aromático de 1.5 a 4 m de altura, ramoso con hojas ovaladas, gramas y bulladas por el haz, tormentoso-grisáceas por el envés. Tiene inflorescencias terminales poco ramosas y densas, es una especie asociada a los bosques de niebla, crece junto con otros géneros de arbustos del bosque andino⁶. Estudios fitoquímicos indican que las especies de este género, biosintetizan principalmente, diterpenos tricíclicos, triterpenos y flavonoides⁷.

⁶ FERNÁNDEZ, J.; RIVERA-DÍAZ, O., Las labiadas (familia Labiatae). En: Instituto de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. 680p.

⁷ CASTILLO, P., Estudio químico y de actividad antioxidante en *Lepechinia meyeri* (Walp.). Tesis, M.Sc. Química. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú. 2004. 109p.

2.1.1.3. Usos: por la tradición oral del departamento de Nariño se conoce que la parte más utilizada de esta planta son las hojas, usadas para calmar afecciones como: el dolor de estómago, trastornos digestivos, dolores que se presentan en el ciclo menstrual, tratamiento de úlceras (uso: Beber una taza de agua aromática y poner emplastos de la planta sobre el vientre). También es utilizada para ayudar a la cicatrización de heridas¹ y como aninflamatorio (uso: se aplica el cataplasma de la planta sobre las zonas afectadas). Para despejar las vías aéreas (gripe, catarros, bronquitis y asma) se debe inhalar el vapor de la infusión de la planta.

2.1.2. Trabajos relacionados con el género *Lepechinia*: A continuación se presentan varios trabajos realizados sobre especies vegetales del género *Lepechinia*, con lo cual se pone de manifiesto que la planta *Lepechinia vulcanicola* no ha sido fitoquímicamente estudiada en su totalidad.

También permite inferir que el género *Lepechinia* de la familia de las labiadas exhibe varias aplicaciones en medicina y algunas relacionadas con la actividad antioxidante (AAO), razón por la cual esta investigación realiza un estudio de la capacidad antioxidante del AE.

2.1.2.1. Las *Lepechinias* y la medicina tradicional: En esta sección se reportan trabajos en los cuales se evidencia que plantas del género *Lepechinia* tienen utilidad en la medicina tradicional, es así como:

Rojas y colaboradores (2003), investigaron la actividad antimicrobial de 36 extractos de 24 plantas (una de ellas es *Lepechinia meyenii*), usadas en medicina tradicional peruana, para el tratamiento de infecciones severas y para desordenes inflamatorios⁸.

Hilgert (2001), en su trabajo recopiló información sobre las plantas medicinales utilizadas en una región de la Argentina, entre estas especies se tiene *Lepechinia floribunda* (Benth.), que es usada para tratar afecciones respiratorias y contra la influenza⁹.

⁸ ROJAS, R.; BUSTAMANTE, B.; BAUER, J.; FERNÁNDEZ, I.; Albán, J.; Lock, O., Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. En: Journal of Ethno pharmacology. Vol. 88: 199–204p. 2003.

⁹ HILGERT, N., Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. En: Journal of Ethno pharmacology. Vol. 76: 11–34p. 2001.

2.1.2.2. Las Lepechinias y los aceites esenciales: En esta sección se reportan investigaciones en donde se identifican los compuestos presentes en el AE de una *Lepechinia*, esto es importante ya que brinda indicios sobre la composición del AE de *Lepechinia vulcanicola* (Matico y Salvarrial Blanco), es así como:

Rosero y colaboradores (2013), reportan que los compuestos mayoritarios presentes en el AE de las hojas y de los tallos de *Lepechinia vulcanicola* (Matico), para hojas son: ledol, limoneno y palustrol, para tallos son: ledol, palustrol y alfa-farneseno, la identificación de estos compuestos en este trabajo se realizó mediante columna apolar DB-1. También realizaron la identificación mediante columna polar DB-WAX, obteniendo como resultado que los compuestos mayoritarios en las hojas son: ledol, limoneno y palustrol y en los tallos los compuestos mayoritarios son: ledol, palustrol y beta-selineno¹.

Ávila y colaboradores (2005), investigaron la especie *Lepechinia caulescens*, encontrada en la región de los Purepecha (grupo étnico Mejicano) y utilizada en el tratamiento de infecciones gastrointestinales. Determinaron los componentes mayoritarios del AE por GC-MS los cuales fueron: borneol, camfor y trans-cariofileno, además concluyeron que el AE fue agente activo contra algunas especies de *Vibrio* (*Vibrio cholerae*, una proteo bacteria que afecta el tracto digestivo)¹⁰.

Rojas y colaboradores (2004), extrajeron el AE presente en las hojas de *Lepechinia schideana*, por medio de destilación por arrastre de vapor con un rendimiento del 0,26%. Analizaron el AE mediante GC y GC-MS, identificando 30 componentes que constituían el 97,6% del AE. Los compuestos más abundantes fueron el ledol (29,1%), el delta-3-careno (18,4%) y el α -cadinol (9,6%). El ledol fue aislado en forma cristalina e identificado mediante RMN ¹H y ¹³C. El aceite muestra actividad antimicótica ante *Candida albicans*¹¹.

Los trabajos que se citan a continuación ponen de manifiesto que la región de cultivo de una planta puede influir directamente en el quimiotipo de un AE y por tanto en su AAO, esto es importante, ya que en esta investigación, se trabajó con

¹⁰ AVILA, J.; MUÑOZ, J.; MARTÍNEZ, A.; GARCIA, A.; MARTÍNEZ, G.; PEÑALOSA, I., In vitro anti-*Vibrio cholerae* activity of essential oil from *Lepechinia caulescens*. En: Fitoterapia. Vol. 76: 104–107p. 2005.

¹¹ ROJAS, L.; USUBILLAGA, A.; CEGARRA, J.; BORREGALES, E.; CARRERO, S., Composición Química y Actividad Antimicótica del Aceite Esencial de la *Lepechinia schiedeana* (Schlecht)Vatke. En: Revista de la facultad de farmacia. Vol. 46 (1): 27-30p. 2004.

Matico y Salvarrial Blanco, plantas pertenecientes a la especie *Lepechinia vulcanicola*, pero cultivadas en diferentes regiones. Los trabajos citados son:

Kizil (2010), Estudió la influencia de la región de cultivo (entre Anatolia y el Mediterráneo en Turquía) sobre rendimiento y la composición del AE presente en las partes aéreas de *Thymbra spicata*. Los resultados indican que el AE de la muestra colectada en Diyarbakir-Kulp presentó un quimiotipo en el que el 53% es terpineno, mientras que las demás muestras presentan carvacrol como componente principal entre un 49,7-94,5%¹².

Msaada y colaboradores (2009), identificaron el quimiotipo del AE extraído de los frutos del cilantro (*Coriandrum sativum* L.) y analizaron el efecto que sobre él tiene la región de cultivo (Menzel Temime y El Borj IFAA, en Túnez) y el estado de madurez del fruto. Concluyeron que los rendimientos más altos del AE, se obtienen en las últimas etapas de madurez (0,324% Menzel Temime y 0,327% Borj el ifaa), también determinaron que la composición del AE cambio significativamente con respecto a la región de cultivo, 35 de los compuestos son sensibles al factor regional y alfa-pineno, sabineno, limoneno, gama-terpineno, cis-dihidrocarvona y geranial son insensibles al factor regional¹³.

2.1.2.3. Las Lepechinias y la actividad antioxidante: en la sección se citan trabajos relacionados con la actividad antioxidante (AAO) del genero *Lepechinia*, aspecto muy importante para esta investigación.

Parejo y colaboradores (2004), evaluaron la AAO de los compuestos presentes en la fracción de acetato de etilo del extracto etanólico de *Lepechinia graveolens*, los compuestos presentes en esta fracción se aislaron utilizando cromatografía en Sephadex LH-20 obteniéndose cinco fracciones activas. Concluyeron que *Lepechinia graveolens* presenta AAO (IC50 = 4,37 µg/mL, método DPPH) y es debida principalmente al ácido rosmarínico¹⁴.

¹² KIZIL, S., Determination of essential oil variations of *Thymbra spicata* var. *spicata* L naturally growing in the wild flora of East Mediterranean and Southeastern Anatolia regions of Turkey. En: Industrial Crops and Products. Vol. 32: 593–600p. 2010.

¹³ MSAADA, K.; Taarit, M.; HOSNI, K.; HAMMAMI, M.; MARZOUK, B., Regional and maturational effects on essential oils yields and composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits. En: Scientia Horticulturae. Vol. 122: 116–124p. 2009.

¹⁴ PAREJO, I.; CAPRAI, E.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; JÁUREGUI, O.; CODINA, C., Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. En: Journal of Ethno pharmacology. Vol. 94: 175–184p. 2004.

Castillo (2004), identificó los compuestos responsables de la AAO de la especie *Lepechinia meyenii* (Walp.). De los compuestos aislados los que presentaron mayor AAO fueron: el ácido 2-hidroxicafeico (EC50 = 3,46 µg/mL, mejor resultado), el ácido cafeico y los ésteres metílico y etílico del ácido 2-hidroxicafeico⁷. En el trabajo utilizaron extractos etanólicos y el método del DPPH.

A continuación se cita trabajos que tratan aspectos relacionados con la actividad biológica, diferentes a la AAO, con esto se pretende motivar nuevas investigaciones. Los trabajos son:

Pérez y colaboradores (2008), trabajaron con *Lepechinia caulescens* y evaluó la capacidad que los extractos de hexano de las hojas de esta planta, tuvieron para relajar las contracciones del útero de ratas¹⁵.

Aguirre y colaboradores (2006), determinaron que el extracto metanólico de *Lepechinia caulescens* produce un significativo efecto vasodilatador (aumento del calibre de los vasos sanguíneos)¹⁶.

Encarnación y colaboradores (1998), desarrollaron una investigación en la cual encontraron la concentración mínima inhibitoria (MIC) del carnosol y del extracto etanólico de las partes aéreas de *Lepechinia hastata* contra varias cepas de bacterias, el carnosol y los extractos etanólicos mostraron actividad contra bacterias gram (+), pero no contra bacterias gram (-)¹⁷.

¹⁵ PEREZ-HERNANDEZ, N.; PONCE-MONTER, H.; MEDINA, J.; Joseph-Nathan, P., SPASMOLYTIC effect of constituents from *Lepechinia caulescens* on rat uterus. En: Journal of Ethno pharmacology. Vol. 115: 30–35p. 2008.

¹⁶ AGUIRRE-CRESPO, F.; VERGARA-GALICIA, J.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; LÓPEZ-GUERRERO, J.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; ESTRADA-SOTO, S., Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. En: Life Sciences. Vol. 79: 1062–1068p. 2006

¹⁷ Encarnación-Dimayuga, R.; ALMADA, G.; Virgen, M., Minimum antimicrobial inhibitory concentration of carnosol and of the ethanol extract from *Lepichinia hastata* (Lamiaceae). En: Phytomedicine, Vol. 5(4): 301–305p. 1998.

2.2. MARCO CONTEXTUAL

La presente investigación se realizó en los laboratorios de la Universidad de Nariño.

El material botánico se recolectó en el corregimiento de Gualmatán (Matico) y en el municipio de Yacuanquer en la vereda los Ajos, vía a la laguna Télpis (Salvarrial Blanco), en el departamento de Nariño.

2.2.1. Corregimiento de Gualmatán: Hace parte del municipio de Pasto (ver figura 1). El municipio está ubicado geográficamente a Latitud $1^{\circ}12'52.48''N$, Longitud $77^{\circ}16'41.22''O$, posee una temperatura promedio de $12^{\circ}C$, una altitud de 2.527 msnm y 1.181 km² de superficie, aproximadamente 800 mm de precipitación al año¹⁸.

Figura 1. Mapa del municipio de pasto y sus corregimientos.

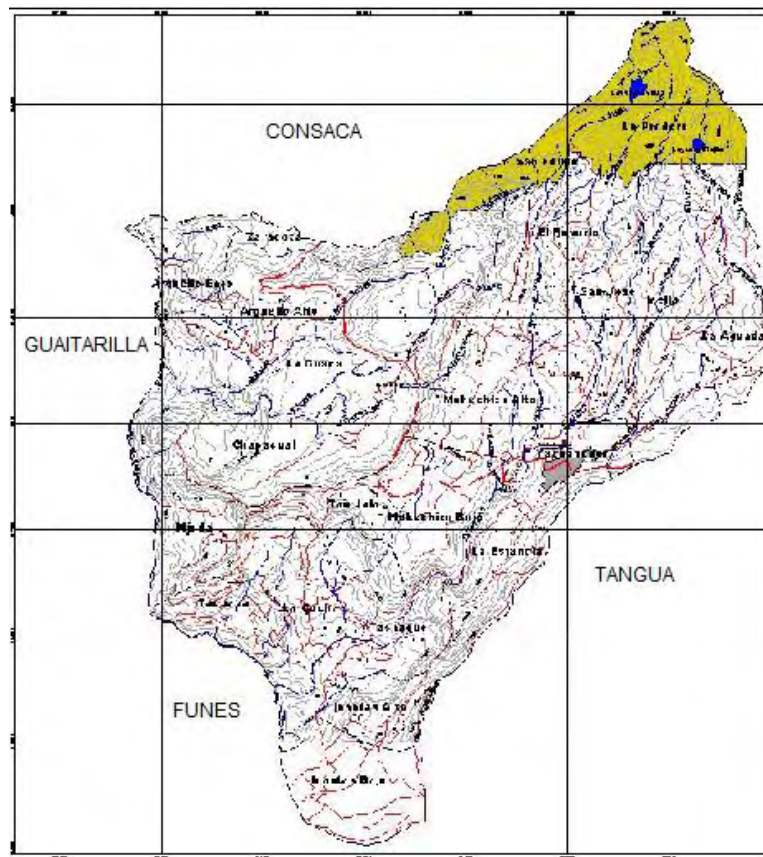


Fuente: San Juan de Pasto [En línea] Colombia [Citado 03 de febrero de 2012] Disponible en internet: <http://www.pasto.gov.co>

¹⁸ SAN JUAN DE PASTO [En línea] Colombia [Citado 03 de febrero de 2012] Disponible en internet: <http://www.pasto.gov.co>.

2.2.2. Municipio de Yacuanquer: El municipio limita al norte con Pasto y Consacá, al sur con el municipio de Imués, al oeste con Guaitarilla e Imués, al este con Tangua (ver figura 2). El municipio está ubicado geográficamente a Latitud 1°08'00,31"N, Longitud 77°25'00.24"O, posee una temperatura promedio de 13°C, una altitud de 2.670 msnm y 111 Km² de superficie, aproximadamente 1146 mm de precipitación al año ¹⁹.

Figura 2. Mapa del municipio de Yacuanquer.



Fuente: Yacuanquer [En línea] Colombia [Citado 03 de febrero de 2012] Disponible en internet: <http://yacuanquer-narino.gov.co>

¹⁹ YACUANQUER [En línea] Colombia [Citado 03 de febrero de 2012] Disponible en internet: <http://yacuanquer-narino.gov.co>.

2.3. MARCO TEÓRICO

2.3.1. Aceites esenciales: La presente investigación determinó la actividad antioxidante (AAO) de un aceite esencial (AE) y sobre estos se hace indispensable conocer, los siguientes puntos: sus características generales, los mecanismos de biosíntesis, la composición química y sus aplicaciones. Esto es necesario para comprender la importancia de los resultados obtenidos.

2.3.1.1. Generalidades: Los AEs se pueden definir como productos volátiles de naturaleza compleja, producidos por ciertos vegetales a los que les confieren un aroma agradable. De forma oficial, se denominan AEs los productos que se pueden obtener por arrastre con corriente de vapor de agua o por prensado del pericarpio de ciertos frutos^{20,21}.

Los AE son productos casi exclusivos de las angiospermas (plantas con flores) y pueden aparecer en raíces y rizomas, en la corteza, en los frutos, en el leño, en las flores y en las hojas. Son generalmente líquidos a temperatura ambiente y la mayoría son prácticamente transparentes, incoloros o coloreados (amarillentos). Son menos densos que el agua e insolubles en ella, aunque en ciertas esencias puede que alguno de sus componentes se solubilice parcialmente. Son lipófilos y solubles en disolventes orgánicos apolares. Suelen ser solubles en alcoholes de alta graduación. Tienen índices de refracción elevados. Se oxidan con facilidad y se polimerizan dando productos resinosos^{22,23}.

²⁰ 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.

²¹ BRUNETON, J. Aceites esenciales. En: Farmacognosia Factores de variabilidad de los aceites esenciales. Acribia, S.A. Zaragoza: España. (2001); p. 488-491

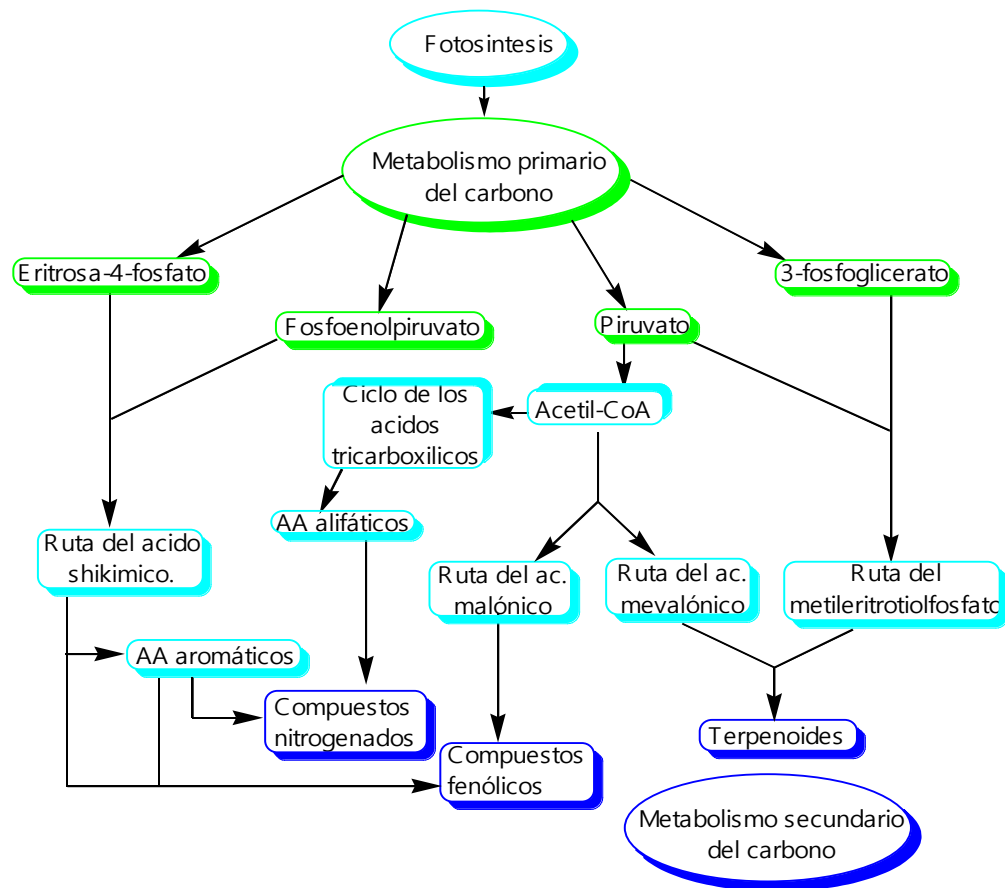
²² KUKLINSKI, Op. cit., p. 134-146.

²³ BENAVIDES, A.; HURTADO, N.; JIMENEZ, J. Caracterización química del aceite esencial presente en las hojas de altamisa (*Ambrosia arborescens* miller) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y determinación de su capacidad antioxidante. Trabajo de grado, Químico. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. 2011. 94p.

2.3.1.2. Biosíntesis: Los AEs están conformados casi exclusivamente por terpenos, los cuales son producidos por medio del metabolismo secundario de las plantas²⁴. Los compuestos terpénicos se biosintetizan por la ruta del ácido mevalónico, vía isopentenil difosfato (figura 3, página 26).

2.3.1.3. Composición química: Los componentes presentes en los AE se pueden dividir en dos grandes grupos: terpenoides y no terpenoides²⁵ (ver tabla 2, página 26).

Figura 3. Elementos del metabolismo del carbono en relación con las rutas de síntesis de metabolitos secundarios.



Fuente: Ávalos, A. y colaboradores (2009).

²⁴ ÁVALOS, A.; PÉREZ, E., Metabolismo secundario de plantas. *En*: Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. Vol. 2: 119–145p. 2009.

²⁵ BRUNETON, Op. cit., p. 488-491.

Tabla 2. Componentes químicos de los AEs.

| Moléculas no terpenoides | Moléculas terpenoides |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Sustancias volátiles alifáticas: hidrocarburos (C, H) o con función oxigenada (C, H y O) • Menos comunes: aminas alifáticas volátiles o derivados del indol. • Con menos frecuencia existen sustancias con azufre como el disulfuro de alilo. <p>ejm: vainillina, eugenol o derivados cumarínicos.</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Son los más abundantes y proporcionan las propiedades más características. • Se clasifican según el número de unidades de 5 carbonos (isopreno) que contengan. • Pueden tener o no oxígeno: <p>Hidrocarburos: monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos.</p> <p>Funcionalizados: con función alcohol, fenol, aldehído, cetona, éter, éster o peróxido.</p> |

Fuente: Bruneton, J. y colaboradores (2001).

2.3.1.4. Aplicaciones: Los AE tienen una amplia variedad de aplicaciones, a continuación se reportan unos ejemplos:

En el trabajo de Bakkali y colaboradores (2008), se enuncia que los AE se han utilizado ampliamente en productos farmacéuticos, sanitarios, cosméticos, agrícolas y alimenticios²⁶. Otro trabajo relacionado es el de Javad y colaboradores (2009), en donde se afirma que los fenoles, AE y diferentes extractos de las plantas pueden actuar como antioxidantes y ser importantes en la prevención de varias condiciones patológicas, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, que pueden estar asociados con el estrés oxidativo²⁷.

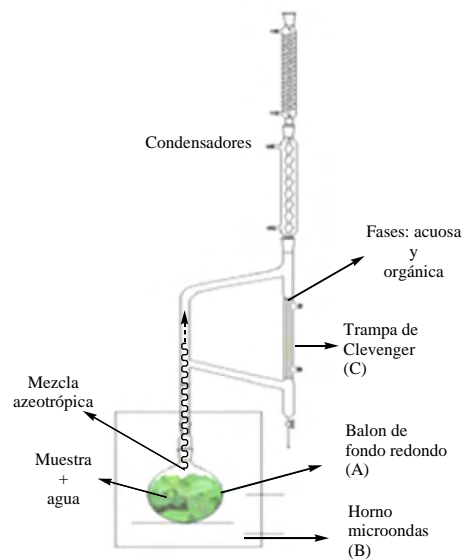
2.3.2. Técnicas de extracción y de análisis: En términos generales, el procedimiento analítico aplicado a un AE comprende dos etapas, a saber: extracción del aceite y su análisis cromatográfico y espectroscópico.

²⁶ BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M., Biological effects of essential oils – A review. En: Food and Chemical Toxicology. Vol. 46: 446–475 p. 2008.

²⁷ JAVAD, S.; ABDOLRASOUL, H.; Zahra, D.; HOSSEIN, B., GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. EN: Food Chemistry. Vol. 115: 1524–1528p. 2009.

2.3.2.1. Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD): En el desarrollo de la investigación se utilizó esta técnica para la extracción del AE, debido a que presenta varias ventajas como: transferencia de calor más efectiva y tiempos de extracción cortos (por lo general no mayores a 90min), esto en comparación con el método que utiliza el calentamiento convencional (por lo general mínimo 4h)².

Figura 4. Representación del equipo de hidrodestilación asistida por la radiación con microondas.



Fuente: MWHD [Citado 03 de febrero de 2012] Disponible en internet: <http://cecam.uis.edu.co>

Esta técnica fue desarrollada por Paré² y consiste en someter el material vegetal a un proceso de hidrodestilación, para lo cual, se sumerge el material vegetal en agua (A) y por medio de un horno microondas (B) se calienta el agua hasta ebullición, generándose una mezcla azeotrópica en A, que por efecto de la presión de vapor asciende hasta la trampa de Clevenger (C), en donde es condensada y se almacena para que se formen dos fases (una acuosa y otra orgánica, rica en aceite), seguidamente las dos fases son separadas por decantación (ver figura 4, página 27).

2.3.2.2. Cromatografía de gases y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas: La caracterización de los AEs es una tarea fundamental para comprender sus propiedades organolépticas, biológicas y fisico-químicas. Existen diversas herramientas instrumentales para hacer el análisis, entre ellas se encuentran la GC y GC-MS, técnicas que se utilizaron en el desarrollo de esta investigación.

Los constituyentes del AE en primera instancia se identifican por GC con base en los índices de retención, los más frecuentemente usados son los índices de Kovàts (Ecuación 1)²³. Los índices de Kovàts se calculan teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de hidrocarburos, analizados en el cromatógrafo de gases bajo las mismas condiciones operacionales que los AEs.

Ecuación 1. Índices de Kovàts.

$$I_k = 100n + 100D \left(\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right)$$

Donde: I_k : índice de Kovàts; n : número de átomos de carbono de la parafina que eluye antes del compuesto de interés; D : diferencia entre el número de átomos de carbono, de la parafina que eluye antes y después del compuesto de interés; t_{Rn} : tiempo de retención de la parafina que eluye antes que el compuesto de interés; t_{RN} : tiempo de retención de la parafina que eluye después del compuesto de interés; t_{Rx} : tiempo de retención del compuesto de interés x .

Una vez identificados los compuestos por medio de GC, se realiza una identificación estructural tentativa, para el caso de los AE y por tratarse de mezclas complejas, se utiliza la técnica GC-MS. El acoplamiento de la GC previa a la MS aporta una poderosa técnica de identificación de estructuras de los metabolitos secundarios, presentes en un AE. Cada uno de los componentes puros de un AE, separados por GC y representados en un perfil cromatográfico por una señal simple, se transfiere directamente al espectrómetro de masas, en el que sufre los diversos procesos de ionización, fragmentación y detección²⁸.

Luego de la identificación de los compuestos, estos deben ser cuantificados y esto se realiza por el método del estándar interno, utilizando como estándar C_{14} (n-tetradecano)²³. El método consiste en realizar una curva de calibración con el estándar para determinar el factor de respuesta (Rf), la curva debe realizarse bajo las condiciones con las que se analizó el AE, luego se adiciona el estándar interno (concentración conocida) a la muestra del AE y se analiza nuevamente bajo las mismas condiciones, por último se aplica la ecuación 2 para obtener la cuantificación de los componentes del AE.

²⁸ Williams, DH. & I, Fleming. Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. En: McGraw-Hill. Ed. Publishing Co. Londres, (1966); p. 288-291.

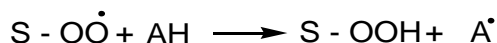
Ecuación 2. Cuantificación en GC.

$$\text{Ecuación 2. } Cx = \frac{Ax}{Rf} \times \frac{Vf}{Wx}$$

Donde: Cx: Concentración del analito en mg de compuesto/kg de material vegetal seco; Ax: Área cromatográfica del analito; Rf: Factor de respuesta del estándar interno; Vf: volumen final del extracto y Wx: Peso de la muestra tomada (Kg).

2.3.3. Procesos de oxidación y propiedades antioxidantes. Los procesos de oxidación son intrínsecos en la producción de energía de los organismos (respiración) y presentan un estricto control en los procesos celulares, ya que si hay una excesiva producción de radicales libres o un desequilibrio en los mecanismos de protección antioxidante, se genera la aparición de numerosas enfermedades²⁹, esto se conoce como estrés oxidativo y con el fin de disminuir los efectos de este fenómeno se utilizan los antioxidantes, ya que son inhibidores de la oxidación de biomoléculas, un antioxidante potente posee una habilidad significativa para capturar el radical peroxilo por medio de la donación de su átomo de H a la especie radical³⁰, (ver esquema 1).

Esquema 1. Reacción de un antioxidante.



Donde: S-OO[·] es el sustrato de la oxidación; AH es el antioxidante; A[·] es el radical generado a partir del antioxidante.

Fuente: Jiménez, J. y colaboradores (2008).

2.3.4. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante: los métodos utilizados para evaluar la actividad antioxidante, tienen en cuenta el mecanismo de reacción, por el cual un antioxidante, inhibe la oxidación de biomoléculas, algunos de estos mecanismos son: el atrapamiento de radicales, la interrupción de la reacción en cadena de la peroxidación. Entre los métodos más utilizados para

²⁹ Bektas, T.; Degerli, S.; Arslan, S.; Malatyali, E.; Sarikurkcu, C., Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiameobic activities of Teucrium polium and Stachys iberica. *En: Fitoterapia*. Vol. 82: 237–246p. 2011.

³⁰ Jimenez, J.; Villarreal, J.; Hurtado, N.; Cruz, S., Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del Mutilon (*Hyeronima macrocarpa*). Trabajo de grado, Químico. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. 2008. 104p.

evaluar la actividad antioxidante están: la determinación de la eficiencia anti-radical (DPPH^{*}) y actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC), métodos utilizados en esta investigación, debido a que son una buena aproximación de lo que ocurre en los seres vivos y también porque son una medida general de la capacidad antioxidante³¹.

2.3.4.1. Actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC). Esta técnica fue descrita por Re, R. y colaboradores (1999)³², se basa en la habilidad de los antioxidantes para capturar el catión-radical libre 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico), conocido como radical ABTS^{*+} (esquema 2)³³. El radical se prepara luego de hacer reaccionar ABTS con persulfato potásico. La ventaja del radical es su estabilidad cuando se encuentra en refrigeración y lejos de la luz, además es un cromóforo azul/verde³⁴.

El ensayo se basa en la inhibición de la absorbancia del catión-radical ABTS^{*+} por el antioxidante (AE). Dicho radical muestra principalmente un pico de absorción a los 415 nm y una absorción máxima a los 660, 734 y 820 nm. Cuando el trolox se utiliza como estándar, el método es llamado TEAC (capacidad antioxidante equivalente a trolox³²).

El método permite expresar los resultados de acuerdo a la capacidad del antioxidante para estabilizar (reducir y neutralizar) al radical cromóforo, debido a la ganancia de un electrón (e⁻) fácilmente donado por la sustancia antioxidante (esquema 2). Experimentalmente, se observa una disminución de la absorbancia medida a 734 nm debido a la reducción del catión-radical³³. La decoloración que la solución de ABTS^{*+} experimenta en la reacción, se compara con la decoloración hecha por un antioxidante patrón (trolox), mediante una curva de calibración.

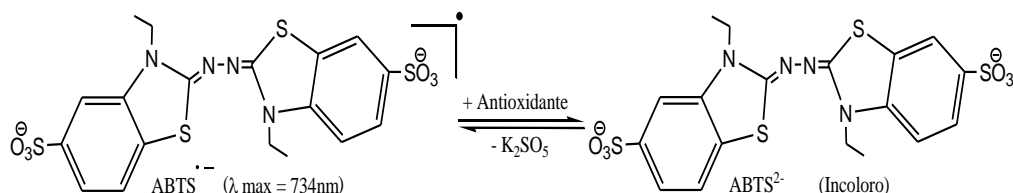
³¹ MEJÍA, C.; HURTADO, N., Extracción, fraccionamiento y valoración de la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de pulpa de *Carica candamarcensis*. Trabajo de grado, Químico. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. 2012. 118p.

³² RE, R.; PELLEGRINI, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: Free Radical Biology & medicine. Vol. 26: 1231-1237p. 1999.

³³ ZULUETA, A.; Esteve, M.; FRÍGOLA, A., Orac and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. En: Food Chemistry. Vol. 114: 310-316p. 2009.

³⁴ KUSKOSKI, M.; ASUERO, A.; Troncoso, A., Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpa de frutos. En: Cience Technology Aliments, Campinas. Vol. 25 (4): 726-732p. 2005.

Esquema 2. Representación de la reacción de reducción ABTS•+ en presencia de un antioxidante.



Fuente: Zulueta, A. y Colaboradores (2009).

En el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS•⁺, la capacidad de captura del radical se expresa como TEAC, en mmol de trolox por mmol de sustancia, para el caso de sustancias puras (ácido ascórbico), o como AAT, en mmol de trolox por kg de AE, para el caso de mezclas de sustancias (AEM y AESB)³².

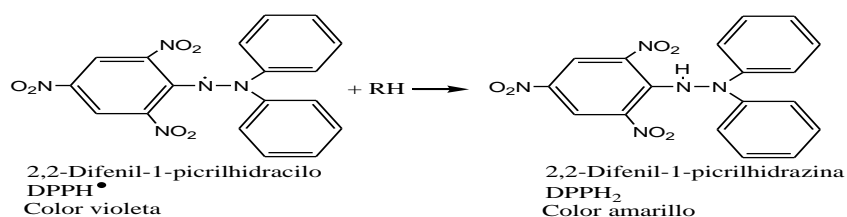
2.3.4.2. Evaluación de la eficiencia anti-radical (DPPH). Procedimiento desarrollado por Brand-Williams y colaboradores (1995)³⁵, utiliza como radical libre el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•). La molécula de este radical se caracteriza por ser un radical estable, debido a la deslocalización de electrones y presenta un color violeta intenso caracterizado por una banda de absorción cerca a los 520 nm. Cuando una solución de DPPH• es reducida presenta un color amarillo (esquema 3)³⁶.

El método DPPH es útil para medir la capacidad de captura de radicales de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. En este procedimiento analítico se evitan reacciones indeseables y altas temperaturas³⁶. Este método permite determinar la capacidad anti-radical de los AEs y de las sustancias de referencia, midiendo el grado de decoloración del DPPH• a 515 nm, la reacción se representa en el esquema 3. La capacidad que una sustancia antioxidante tiene para decolorar una solución del radical DPPH•, depende principalmente de su capacidad para donar hidrogeno³⁵.

³⁵ BRAND-Williams, W.; CUVÉLIER, M.; BERSET, C., Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. En: *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* Vol. 28: 25-30p. 1995.

³⁶ MOLYNEUX, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. En: *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* Vol. 28: 213-219p. 2003.

Esquema 3. Representación de la reacción de reducción DPPH• en presencia de un antioxidante.



Fuente: Molyneux, (2004).

En el método se realiza un estudio cinético, es decir, se observa el cambio de la absorbancia de la mezcla en función del tiempo y se utilizan diferentes concentraciones de antioxidante, con estos datos se puede calcular: el porcentaje de inhibición (ecuación 3, página 32), el % [DPPH•] remanente (ecuación 4, página 32), con estos resultados y las diferentes concentraciones se encuentra el parámetro EC_{50} el cual indica la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial del radical a la mitad y el $T_{EC_{50}}$, es decir el tiempo que tarda el EC_{50} para alcanzar el estado estacionario. De esta manera se puede determinar la eficiencia anti-radical (EAR, ecuación 5), que permite clasificar los antioxidantes. Cualitativamente se clasifica en: Bajos (EAR 1×10^{-3}), Medios (EAR entre 1×10^{-3} y 5×10^{-3}), Altos (EAR entre 5×10^{-3} y 10×10^{-3}) y Muy altos (EAR $> 10 \times 10^{-3}$)³⁷.

Ecuación 3. Porcentaje de inhibición.

$$\%inhibición = \frac{(absorbancia_0 - absorbancia_1)}{absorbancia_0}$$

Ecuación 4. % [DPPH•] Remanente.

$$\%[DPPH \bullet]_{remanente} = \frac{[DPPH \bullet]_t}{[DPPH \bullet]_{t=0}}$$

Ecuación 5. Eficiencia anti-radical.

$$EA = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC_{50}}}$$

³⁷ SANCHEZ, C.; Larrauri, J.; SAURA-CALIXTO, F., A procedure to measure the antirradical efficiency of polyphenols. *En: J Sci Food Agric*. Vol. 76: 270-276p. 1998.

3. METODOLOGÍA

3.1. RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

la recolección del material de la planta Matico, se realizó en el corregimiento de Gualmatán y la muestra de Salvarrial Blanco se recolectó en el municipio de Yacuanquer en la vereda los Ajos, vía a la laguna de Télpis. La recolección se realizó de manera aleatoria, debido a 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.

Se recolectó 50 kg de hoja fresca, estas muestras se empacaron en bolsas grandes de papel, y se llevaron a Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño, para su respectivo secado, con el fin de estabilizar y conservar la planta con las mismas propiedades y principios activos que contiene en estado fresco y también para evitar procesos físico-químicos de degradación del material. Luego el material fue almacenado cuidando de que no haya riesgo de degradación debida a procesos biológicos, con este propósito se almaceno las muestras vegetales en bolsas de papel, en un lugar fresco y seco, con 15 °C de temperatura, aproximadamente.

3.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

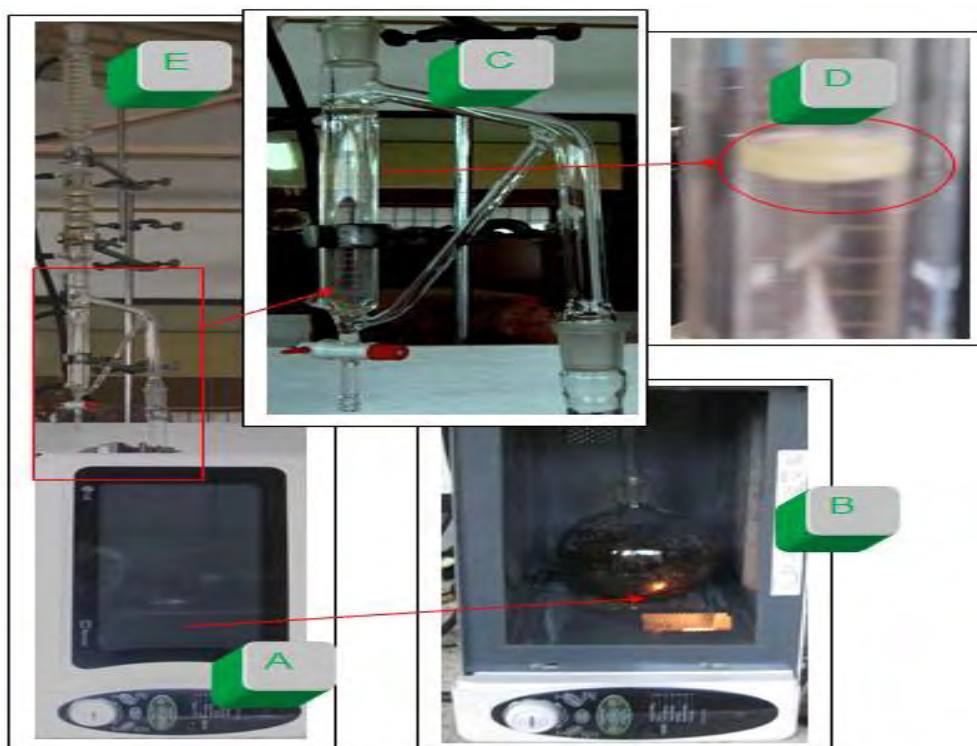
La identificación taxonómica de las dos plantas pertenecientes a la variedad *Lepechinia vulcanicola* se realizó en el Herbario Universidad de Nariño PSO (ver anexo I y tabla 1, página 19).

3.3. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Para la extracción del AE se utilizó la técnica MWHD, utilizando el equipo representado en la figura 5 (ver página 34). Para determinar el mejor tratamiento de extracción, se utilizó el modelo llamado ANOVA de dos factores o multifactorial, el cual 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 estos²³.

3.3.1. *Lepechinia vulcanicola*, (Matico): Para la extracción del AE de esta planta (AEM) se tuvieron en cuenta los parámetros para el mejor tratamiento, establecidos en el trabajo de Rosero y colaboradores (2013). Se introdujeron 80 g de hoja seca de la planta *Lepechinia vulcanicola*, Matico, en el balón y se adicionaron 500 mL de agua destilada, acoplando todo el sistema de acuerdo con el montaje de la figura 5 (página 34), para la extracción se empleó experimentalmente el 80% de la potencia total del horno (W). El tiempo total (T) de extracción fue de 90 min que se dividió en intervalos de 10 min. Para los análisis cromatográficos, el AE se extrajo con 2 mL de hexano, se recuperó por concentración con corriente de nitrógeno y se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4). Para realizar las pruebas de actividad antioxidante, se utilizó AE puro. Los extractos obtenidos se guardaron en un vial, protegidos contra luz y se almacenaron a 4 °C.

Figura 5. Equipo de hidrodestilación asistida por radiación de microondas.



Fuente: esta investigación.

Dónde: A es un horno doméstico marca LG, modelo MB-314VG con potencia de salida de 2450 W; B es un balón de 2 litros de capacidad, en el cual se introduce la muestra y agua; C es la trampa tipo Clevenger; D es el lugar en donde se recolecta el AE; E es un sistema de condensadores.

3.3.2. Lepechinia vulcanicola, (Salvarrial Blanco): para esta planta no se reportan antecedentes respecto al mejor tratamiento para la de extracción del AE, por esta razón se realizó un diseño experimental, que se detalla a continuación:

Para la extracción del AE se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: las potencias estimadas fueron: el 60 y 80% de la potencia máxima del horno. Por cada potencia se evaluaron dos tiempos de extracción (60 y 90 minutos). Esta parte experimental se realizó por duplicado, realizándose un total de 8 extracciones, se utilizó 80 g de muestra seca, 500 mL de agua destilada y las extracciones se realizaron a intervalos de 10 min. Las especificaciones del diseño experimental se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Especificaciones de extracción por la técnica MWHD.

Resumen del diseño experimental

| | | |
|--------------------------------|--|-------------------------|
| Clase de diseño | Factorial completo de dos factores. | |
| Numero de extracciones | 8 aleatorizadas | |
| Factores experimentales | Potencia | 2 Niveles (60 y 80%) |
| | Tiempo | 2 Niveles (60 y 90 min) |
| Variables de respuesta | Área y numero de señales en el perfil cromatográfico | |

Fuente: esta investigación.

En todos los análisis estadísticos se consideró un nivel de significación $P=0,05$. Cuando se estableció la existencia de diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó el método de Fisher (DMS). Para el análisis se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XV.

Para los análisis cromatográficos, el AE se extrajo con 2 mL de hexano, se recuperó por concentración con corriente de nitrógeno y se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4). Para realizar las pruebas de actividad antioxidante, se utilizó AE puro. Los extractos obtenidos se guardaron en un vial, protegidos contra la luz y se almacenaron a 4 °C.

3.4. ANÁLISIS INSTRUMENTAL

3.4.1. Análisis cromatográfico: De los extractos (0,5 mL de AE diluido en 2 mL de hexano), se inyectaron alícuotas de 1,0 μ L, las cuales se analizaron por GC-FID, usando un cromatógrafo de gases GC-17A Shimadzu, ubicado en los Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño (figura 6, página 36), dotado con un puerto de inyección *split/splitless*, con una columna cromatográfica DB-5 J&W-scientific de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μ m de espesor de fase estacionaria, a las siguientes condiciones cromatográficas: temperatura de inyección 250 °C, temperatura del detector 280°C, temperatura de la columna 50°C por 5 minutos; 10 °C/min hasta 250 °C por 5 min, obteniéndose un tiempo total de análisis de 30 min; se utilizó Helio AP como gas de arrastre a un flujo de 1,0 mL/minuto, con una razón *split* 1:6.

Con los perfiles cromatográficos obtenidos, se calcularon los índices de retención lineal de Kovàts para cada una de las señales presentes, teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C8 hasta C20, analizados por GC-FID bajo las mismas condiciones experimentales usadas para las muestras. Para su determinación se empleó la Ecuación 1 (página 28). Comparando los índices de retención obtenidos experimentalmente con los reportados en la literatura se consiguió una identificación tentativa de los metabolitos presentes en las muestras. Además con estos resultados se determinó el mejor tratamiento para la extracción del AE de Salvarrial Blanco (AESB).

Figura 6. Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A.



Fuente: esta investigación.

3.4.2. Identificación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS: El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases Shimadzu QP 2010S (figura 7) acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, Shimadzu QP 2010S) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (*full scan*, 35-400 *umas*). La columna empleada en los análisis fue DB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μ m).

Figura 7. Equipo GC/MS cromatógrafo de gases Shimadzu QP 2010S.



Fuente: Esta investigación.

Las condiciones operacionales fueron, una Rampa de temperatura 50 °C (5 min), hasta 250 °C a razón de 10 °C/min (5 min); temperatura del inyector 250 °C; temperatura de la cámara de ionización 200 °C; temperatura de la línea de transferencia (GC-MS) 280 °C; energía de ionización de 70 eV; inyector *split/splitless*, relación split (1:30) con un volumen de inyección de 1,0 μ L y se utilizó como gas de arrastre Helio UAP, con un flujo de arrastre de 1,0 mL/minuto.

La identificación de los componentes presentes en los extractos se realizó con base en la comparación de sus espectros de masas, con los de la espectroteca de Adams (2004)³⁸. Estos análisis se realizaron en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Nariño.

3.4.3. Cuantificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial: La cuantificación de los componentes mayoritarios presentes en el AE, se realizó por cromatografía de gases (GC), en el equipo *Shimadzu GC-17A* con las mismas condiciones cromatográficas utilizadas en el análisis de los AEs por GC-FID. Se

³⁸ ADAMS, R. Identification of essential oil components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy. En: Ediciones allured publishing corporation. (2004).

empleó el método del estándar interno, utilizando *n*-tetradecano, *Istd* (concentración 10,000 ppm), para la curva de calibración se prepararon siete soluciones en diclorometano a diferentes concentraciones de *n*-tetradecano (1, 5, 10, 50, 70, 100 y 200 ppm), la inyección se realizó por triplicado.

3.5. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

3.5.1. Actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC): por este método se determinó la AAO para el AE puro (a concentraciones en porcentaje p/v de: 4,681% AESB y 7,222% AEM). El procedimiento experimental se describe a continuación:

El análisis espectrofotométrico de la captura del catión-radical ABTS^{•+}, se determinó de acuerdo al método de Re y colaboradores (1999)³².

El radical ABTS^{•+} (solución stock), se generó, mediante la reacción entre ABTS (360 mg) y persulfato potásico (K₂S₂O₈, 67 mg), la concentración final de la solución fue de 7 mM en ABTS y 2,45 mM en K₂S₂O₈, la reacción se preparó en medio alcohólico (100 mL metanol grado HPLC), a temperatura ambiente, en oscuridad y durante 24 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluyó con metanol grado HPLC, hasta obtener un valor de absorbancia de 0,886 (solución W), a una longitud de onda de 734 nm³¹.

Para la reacción se midió 3 mL de la solución W y se adicionaron 30 µL de la solución a estudiar, agitando constantemente durante un minuto y transcurridos seis minutos de reposo se realizó la lectura de absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro Merck 300.

Por medio de una curva de calibración con soluciones de trolox a concentraciones 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mM y siguiendo la metodología antes descrita se expresaron los resultados obtenidos como capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) o actividad antioxidante total (AAT), según los requerimientos. La funcionalidad del método se verificó con un patrón de ácido ascórbico 5 mM y todo el análisis se realizó por triplicado.

Para proporcionar un alto grado de confianza y seguridad del método analítico, se determinaron parámetros estadísticos como:

- La exactitud expresa el grado de proximidad de los resultados obtenidos por el método, con relación a los verdaderos valores. Para determinar la exactitud del ensayo se utilizó el porcentaje de error relativo de la curva de calibración (%Er), este parámetro estadístico se obtuvo al determinar el cociente entre el error absoluto de las concentraciones y el valor estándar de ésta, para obtener un tanto por ciento se multiplica por 100³¹.
- La precisión indica el grado de concordancia entre los resultados de una prueba individual cuando el método es aplicado repetitivamente a múltiples lecturas de una muestra homogénea. Para comprobar la variabilidad del ensayo, se evaluó la repetibilidad del método, expresando los resultados como coeficientes de variación (ecuación 6)³¹. El valor límite establecido para determinaciones espectrofotométricas es del 3%³⁹.

Además, se debe tener en cuenta los intervalos de confianza, basados en el estadístico de la *t-student*, con un nivel de confianza determinado. Los intervalos de confianza se calculan de acuerdo a la ecuación 7.

Ecuación 6. Coeficiente de variación.

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Dónde: S = Desviación típica de la muestra; \bar{X} = Media de la muestra

Ecuación 7. Intervalos de confianza.

$$\bar{X} - Z \frac{S}{\sqrt{n}}; \bar{X} + Z \frac{S}{\sqrt{n}}$$

³⁹ CASTILLO, B.; GONZÁLES, R., Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. En: Revista Cubana Farm. Vol. 30: 4-6p. 1997.

Donde: \bar{X} = Media en la muestra; $Z = 2,31$ y se obtiene de la tabla de distribución de la t-student⁴⁰, en este caso, para 8 grados de libertad con una P de 95%; S = Media de la desviación estándar; n = Tamaño de la muestra.

- La linealidad, parámetro que permite expresar la capacidad del método analítico para dar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra y tiene como parámetros a r que es el coeficiente de correlación y r^2 el coeficiente de determinación considerándose el método lineal, cuando r es mayor a 0,99 y r^2 mayor o igual a 0,98⁴¹.

3.5.2. Evaluación de la eficiencia anti-radical (DPPH): Por este método se determinó la eficiencia anti-radical (EAR) para el AE puro (utilizando 3 diferentes concentraciones para cada muestra estudiada). La EAR se evaluó mediante el método desarrollado por Sánchez y colaboradores (1998)³⁷.

Se preparó una solución stock de DPPH[•], a una concentración de 0,812 mM y se dejó en reposo durante 24 horas en frío (6 °C aproximadamente). A partir de esta solución se realizó una curva de calibración de DPPH[•] a concentraciones mM de: 0,0099; 0,0199; 0,0298; 0,0399; 0,0599; 0,0686 y 0,0899, a una longitud de onda de 515 nm empleando un espectrofotómetro Merck 300. Las soluciones se prepararon con metanol grado HPLC. Para la reacción se tomó 3,9 mL de solución de DPPH[•] 0,1083 mM preparado el mismo día de análisis y 0,1 mL de la muestra a estudiar (ver tabla 22, página 72). Se midió la absorbancia cada 5 segundos hasta alcanzar el estado estacionario. La funcionalidad del método se verificó con un patrón de ácido ascórbico. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Con los resultados obtenidos se realizaron las siguientes gráficas:

1. Absorbancia vs. [DPPH[•]]
2. [DPPH[•]] vs tiempo
3. % [DPPH[•]]_{Remanente} vs tiempo del estado estacionario
4. % [DPPH[•]]_{Remanente} vs [Antioxidante] a tiempo t.
5. % de Inhibición vs tiempo

⁴⁰ Miller, J.C.; Miller, J.N., Estadística para química analítica. En: Addison-Wesley Iberoamericana. 2a ed. 1993. p. 23

⁴¹ Miller, J.C.; Miller, J.N., Op. Cit, p. 54.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la ecuación 3 (página 32) y el $\%[\text{DPPH}^*]_{\text{Remanente}}$ según la ecuación 4 (página 32). Por medio de la construcción de las gráficas indicadas en el anterior párrafo con los numerales 3 y 4 se calculó el EC_{50} (concentración de antioxidante necesaria para disminuir la $[\text{DPPH}^*]_{\text{Remanente}}$ al 50%) y el $T_{\text{EC}_{50}}$ (tiempo necesario para alcanzar el estado EC_{50}). Estos parámetros se emplean para obtener la EAR, de acuerdo a la expresión de la ecuación 5 (página 32).

Para proporcionar un alto grado de confianza y seguridad del método analítico, se determinó los parámetros estadísticos indicados en el literal 3.5.1.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La identificación taxonómica se realizó en el Herbario Universidad de Nariño (PSO, Pasto-Nariño, sede Torobajo). La descripción del Matico y del Salvarrial Blanco, coincidieron y obtuvieron igual clasificación taxonómica, la descripción detallada de la especie vegetal se observa en la tabla 1 (página 19), además está identificada con el número ID: 39557 (anexo I), en resumen las dos plantas (Matico y Salvarrial Blanco) fueron clasificadas como: *Lepechinia Vulcanicola*.

Figura 8. *Lepechinia Willd. Vulcanicola*, Matico y Salvarrial Blanco.



Fuente: Esta investigación.

4.2. DETERMINACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL PRESENTE EN LAS HOJAS DE *LEPECHINIA VULCANICOLA*.

Para la extracción del AE presente en las hojas de *Lepechinia vulcanicola* (Matico y Salvarrial Blanco), se utilizó MWHD. A los extractos obtenidos por medio de esta técnica, se les realizó el correspondiente análisis cromatográfico (GC-FID), a partir del cual se calcularon los índices de Kovàts, permitiendo la identificación de los compuestos mayoritarios presentes en el AE, por medio de la comparación de los I_k experimentales con la espectroteca ADAMS (2004).

Además, para el caso del Salvarrial Blanco, a partir de los resultados cromatográficos, se determinó el mejor tratamiento para la extracción, utilizando como variables de respuesta área y número de señales presentes en los perfiles cromatográficos. Ver anexo A y anexo B.

4.2.1. Determinación del mejor tratamiento para *Lepechinia vulcanicola* (Matico, cultivada en Gualmatán): Para este caso la extracción del AE, se realizó bajo los parámetros óptimos establecidos reportadas por Rosero y colaboradores (2013), que son $W=80\%$ y $t=90\text{min}$.

Se extrajo 0,3711 g de AE partiendo de 80 g de material vegetal seco, lo cual representa un porcentaje de rendimiento del 0,46%.

4.2.2. Determinación del mejor tratamiento para *Lepechinia vulcanicola*, (Salvarrial Blanco, cultivada en Yacuanquer): En este caso, fue necesario determinar el mejor tratamiento para la extracción, para ello, se realizó un diseño experimental factorial completo de dos factores, con las especificaciones indicadas en el literal 3.3.2 de la metodología (página 35). Se extrajo 0,4681 g de AE partiendo de 80 g de material vegetal seco, lo cual representa un porcentaje de rendimiento del 0,58%. Para determinar el mejor tratamiento para la extracción del AE presente en las hojas de *Lepechinia vulcanicola* (Salvarrial Blanco), por medio de la técnica MWHD, se utilizó el análisis de varianza de dos factores (ANOVA de dos factores), el cual separa y estima las diferentes causas de variación entre los tratamientos aplicados: potencia del microondas (con 2 niveles: 60 y 80% de la potencia máxima del equipo) y tiempo (con 2 niveles: 60 y 90 min), sobre la variable de respuesta (cantidad de compuestos identificados en el perfil cromatográfico, seleccionando aquellos con área del pico superior a 7000 cuentas, ver anexo B). En la tabla 4 (página 42) se presenta el número de señales obtenidas para cada una de las extracciones especificadas en el literal 3.3.2 de la metodología.

Tabla 4. Numero de señales obtenidas en los perfiles cromatográficos.

| W \ T | 60 | 90 |
|-------|----|----|
| 60 | 46 | 52 |
| 80 | 54 | 62 |
| | 57 | 58 |

Fuente: esta investigación.

W = potencia del equipo (%); T = tiempo de extracción (min).

Los resultados estadísticos de los datos de la tabla 4, después de aplicar el ANOVA de dos factores, se indican en la tabla 5. Estos resultados permiten estudiar simultáneamente los efectos de las fuentes de variación (potencia y tiempo) sobre la variable dependiente, compuestos seleccionados en el perfil cromatográfico.

Tabla 5. ANOVA de dos factores (potencia, tiempo).

| Fuente | Suma de Cuadrados | GL | Cuadrado Medio | Cociente F | Valor crítico F | Valor P |
|---------------------|-------------------|----|----------------|------------|-----------------|---------|
| Efectos Principales | | | | | | |
| A:potencia | 112,5 | 1 | 112,5 | 21,43 | 7,7086 | 0,0098 |
| B:tiempo | 40,5 | 1 | 40,5 | 7,71 | 7,7086 | 0,0499 |
| Interacciones | | | | | | |
| AB | 0 | 1 | 0 | 0,00 | 7,7086 | 1,0000 |
| Residuos | 21,0 | 4 | 5,25 | | | |
| Total (Corregido) | 174,0 | 7 | | | | |

Fuente: esta investigación.

P (Nivel de significación de la prueba) $P = 0,05$. Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual, GL = Grados de libertad.

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

$H_{0(A)}$ = Al modificar las potencias se obtienen igual número de señales en el perfil cromatográfico.

$H_{i(A)}$ = Existen diferencias significativas en el número de señales cromatográficas al variar las potencias.

De los resultados de la tabla 5 se puede apreciar 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 señales cromatográficas al variar las potencias, por lo tanto se hace necesario desarrollar una prueba de significación que permita diferenciar cual tratamiento es más significativo. Esta prueba es la diferencia mínima significativa de Fisher (DMS), de la cual se obtuvieron los resultados de la tabla 6 (página 43).

Tabla 6. Diferencia mínima significativa (potencias)

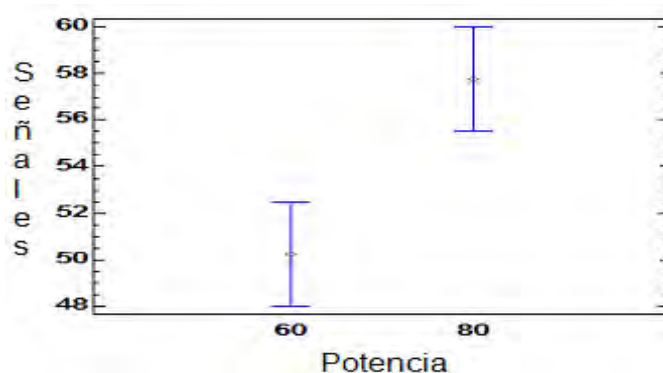
| Potencia (%) | n | Media # de señales | Error estándar | Intervalos de confianza (95%) | Grupos Homogéneos |
|------------------|---|--------------------|----------------|-------------------------------|-------------------|
| 60 | 4 | 50,25 | 1,14564 | +/- 3,1808 | X |
| 80 | 4 | 57,75 | 1,14564 | +/- 3,1808 | X |
| <i>Contraste</i> | | <i>Diferencia</i> | | <i>+/- DMS</i> | |
| 60 – 80 | | *-7,5 | | 4,49837 | |

Fuente: esta investigación.

* Indica una diferencia significativa, n = Tamaño de la muestra.

En la parte superior izquierda de la tabla 6, 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 la columna de grupos homogéneos, el cual muestra las diferencias entre cada grupo, marcándolos con un signo (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 las señales cromatográficas 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 la potencia (%) de 60, el segundo grupo corresponde a la potencia de 80. Se puede observar en la tabla 6, que el valor de la media de las señales cromatográficas para el segundo grupo, es significativamente mayor en comparación con las medias del primer grupo. En la parte inferior derecha de la tabla 6, se indica el valor calculado de la DMS igual a 4,49837, y como el valor para la diferencia para el contraste supera dicho valor, esto indica que se presentó una diferencia estadísticamente significativa entre las potencias, con un nivel de confianza del 95%. Esta diferencia se observa en la gráfica 1.

Gráfica 1. Comparación entre medias de las señales cromatográficas para cada potencia.



Fuente: esta investigación.

En la gráfica 1 (página 43), cada punto representa la media de las señales cromatográficas para cada potencia con un intervalo de confianza del 95% (+/- 3,1808). 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 no hay solapamiento horizontal, entre las potencias y como la media de la potencia 80% es más alta, se puede concluir que la potencia a la cual se obtiene el mayor número de señales en el perfil cromatográfico es a la potencia de 80%, por lo tanto, con un nivel de confianza del 95%, se rechaza la hipótesis nula.

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

$H_{0(B)}$ = A diferentes tiempos de extracción se obtiene igual número de señales en el perfil cromatográfico.

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

Según los resultados obtenidos en la prueba F del ANOVA (tabla 5, página 42) para el factor B, se rechaza la hipótesis nula y se acepta que existen diferencias estadísticamente significativas en el número de señales cromatográficas al variar el tiempo, por lo que se recurrió a la prueba de Fisher (DMS), para encontrar el tratamiento más significativo. Los resultados se indican en la tabla 7.

En la parte superior de la tabla 7, se identifican los grupos homogéneos según la alineación del signo (X) en la columna. El primero está constituido por los tratamientos de 60 minutos, el segundo grupo lo constituye el tratamiento de 90 minutos. Se puede observar que el valor de la media de las señales cromatográficas para el segundo grupo, es significativamente mayor en comparación a la media del primero.

En la parte inferior derecha de la tabla, se indica el valor calculado de la DMS igual a 4,49837, y como el valor para la diferencia para el contraste supera dicho valor, esto indica que se presentó una diferencia estadísticamente significativa entre los tiempos, con un nivel de confianza del 95%. Esta diferencia se observa claramente en la gráfica 2 (página 45).

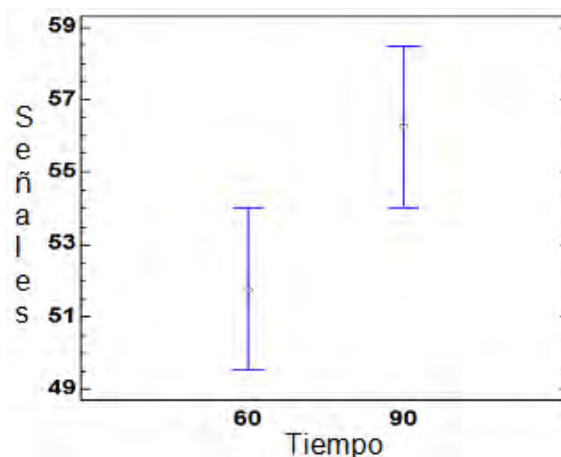
Tabla 7. Diferencia mínima significativa (Tiempo)

| Tiempo (min) | N | Media # de picos | Error estándar | Intervalos de confianza (95%) | Grupos Homogéneos |
|------------------|---|-------------------|----------------|-------------------------------|-------------------|
| 60 | 4 | 51,75 | 1,14564 | +/- 3,1808 | X |
| 90 | 4 | 56,25 | 1,14564 | +/- 3,1808 | X |
| <i>Contraste</i> | | <i>Diferencia</i> | | <i>+/- DMS</i> | |
| 60 – 90 | | *-4,5 | | 4,49837 | |

Fuente: esta investigación.

* indica una diferencia significativa.

Gráfica 2. Comparación entre medias de las señales cromatográficas para cada tiempo de extracción.

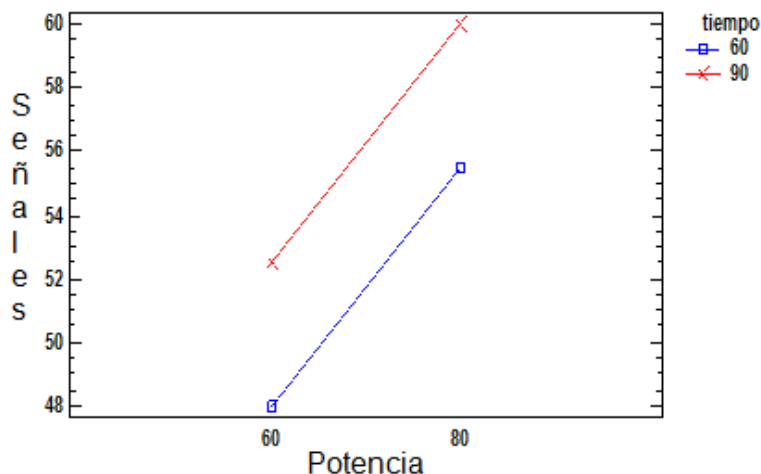


Fuente: esta investigación.

En la gráfica se observa que los tiempos estudiados presentan diferencia estadísticamente significativa, siendo la media de picos más alta para el tiempo de 90 min. Se puede concluir que el tiempo al cual se obtiene el mayor número de señales en el perfil cromatográfico es a 90 min, por lo tanto, con un nivel de confianza del 95%, se rechaza la hipótesis nula.

❖ Interacciones entre factores: en la tabla 5 (página 42) se observa 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 (0,00), es menor que el valor crítico (7,7086), se acepta la hipótesis nula, indicando que no existen interacciones entre los dos factores. Esto se representa en la gráfica 3.

Gráfica 3. Gráfico de Interacción potencia-tiempo.



Fuente: esta investigación.

Teniendo en cuenta que cada punto del gráfico, es el promedio de los valores de cada celda de la tabla 4 (página 42), si los intervalos de confianza para cada celda se solapan, se puede interpretar que el efecto de los dos factores es igual, o no existen diferencias estadísticamente significativas en cada celda. En la gráfica 3 (página 45), se observa que no hay interacciones significativas entre potencia y tiempo.

Después del análisis estadístico se puede concluir que el mejor tratamiento para la extracción del AE de *Lepechinia vulcanicola* (Salvarrial Blanco) son: potencia del horno microondas 80% y tiempo de extracción 90 min.

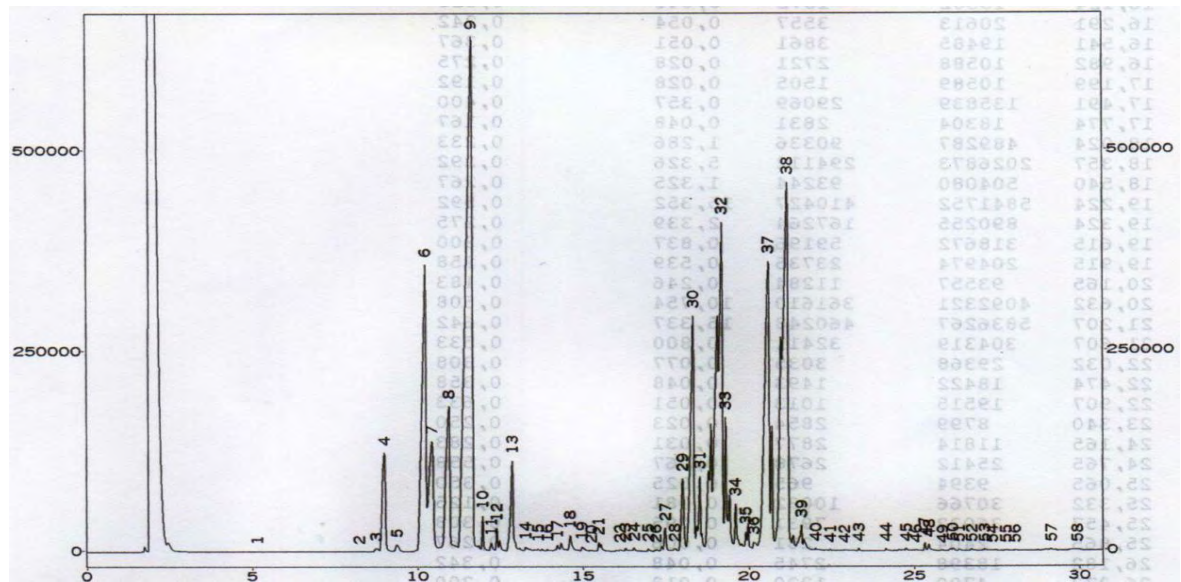
4.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA POR GC Y GC/MS DEL AE DE *LEPECHINIA VULCANICOLA* (MATICO Y SALVARRIAL BLANCO).

La identificación de los principales compuestos presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola* (Matico y Salvarrial Blanco), se hizo con base en el cálculo de los índices de retención de Kovàts (ecuación 1, página 28), mediante el análisis de sus espectros de masas (posibles rutas de fragmentación de los compuestos) y usando la base de datos de Adams (2004)³⁸. Para la cuantificación de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola* (Matico y Salvarrial Blanco), se utilizó el método del estándar interno, Con base a las áreas (cuentas) se determinó el valor de la pendiente de la recta que corresponde al factor de respuesta igual a 146 cuentas x L/mg. Se determinó el %CV (coeficiente

de variación), obteniéndose un valor menor al 5%; según Legarda⁴² y Hubber⁴³ los valores menores al 5% en el %CV son aceptables, es decir los resultados tienen buena homogeneidad, precisión y repetitividad, lo cual concuerda con trabajos de investigación similares⁴⁴. La concentración de los componentes del AE se presentó en términos de mg de compuesto/kg de material vegetal. Los perfiles cromatográficos utilizados para la cuantificación se indican en el anexo C.

4.3.1. Identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios para el AE de *Lepechinia vulcanicola*, Matico, cultivada en Gualmatán. El AE para esta planta se obtuvo aplicando el mejor tratamiento de extracción W=80% y T=90 min, estos extractos fueron analizados por GC y GC/MS. En la Figura 9 se presenta el perfil cromatográfico del AE extraído bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Figura 9. Perfil cromatográfico del AE de *Lepechinia vulcanicola*, Matico, extraído mediante MWH (W=80%, T=90 min).



Fuente: esta investigación

⁴² LEGARDA, L.; LAGOS, T., Diseño de experimentos agropecuarios. En: San Juan de Pasto: Unigraf 2001.

⁴³ HUBER, L., Buenas Prácticas De Laboratorio Y Buenas Prácticas De Fabricación Actuales. En: Hewlett-Packard Company, Miami, 1994. p. 160.

⁴⁴ TORRES, J.; BENAVIDES, O., Caracterización de los compuestos mayoritarios del aceite esencial del fruto de mortiño (*vaccinium floribundum* H.B.K.) en sus diferentes estados de maduración. Trabajo de grado, Químico. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. 2010. 118p.

En la Tabla 8 (página 48) se presentan los compuestos identificados en este extracto, los tiempos de retención, los índices de Kovàts, la concentración y la relación masa/carga del ion molecular (m/z , dato fundamental para la determinación estructural de una molécula) de cada constituyente. Solo se identificaron los compuestos que presentaron un porcentaje de área igual o superior al 0,884%. En el anexo D se presenta el perfil cromatográfico de la mezcla de parafinas C_8 - C_{20} , usadas para el cálculo del índice de Kovàts, en el anexo E los espectros de masas experimentales y en el anexo G los espectros de masas teóricos.

El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, permitió identificar para este extracto, en total 13 compuestos mayoritarios. En la tabla 8 y gráfica 4 (página 48), se observa que los compuestos con mayor concentración, fueron: limoneno, prenil limoneno, thujopsan-2-alfa-ol, ledol y beta-pineno.

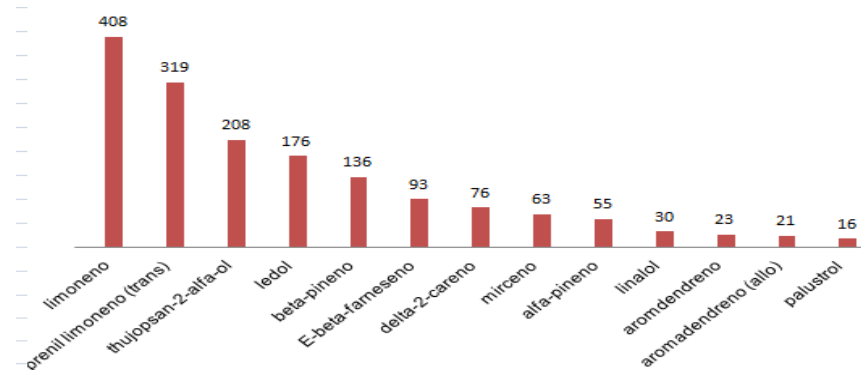
Tabla 8. Compuestos mayoritarios presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola*, Matico. Identificados por GC/MS, aislados por MWHD.

| Señal | T_r | I_k | I_{kt} | Compuesto | m/z | C | % |
|-------|--------|-------|----------|-------------------------|-------|-----|--------|
| 4 | 9,029 | 939 | 939 | alfa-pineno | 136 | 55 | 3.387 |
| 6 | 10,275 | 987 | 979 | beta-pineno | 136 | 136 | 8.374 |
| 7 | 10,450 | 994 | 991 | Mirceno | 136 | 63 | 3.879 |
| 8 | 10,979 | 1018 | 1002 | delta-2-careno | 136 | 76 | 4.680 |
| 9 | 11,687 | 1051 | 1029 | Limoneno | 136 | 408 | 25.123 |
| 13 | 12,887 | 1107 | 1097 | Linalol | 154 | 30 | 1.847 |
| 29 | 18,041 | 1416 | 1441 | aromadendreno | 204 | 23 | 1.416 |
| 30 | 18,378 | 1441 | 1457 | E-beta-farneseno | 204 | 93 | 5.727 |
| 31 | 18,561 | 1455 | 1460 | aromadendreno (allo) | 204 | 21 | 1.293 |
| 32 | 19,253 | 1505 | 1460 | prenil limoneno (trans) | 204 | 319 | 19.643 |
| 33 | 19,495 | 1523 | 1588 | palustrol | 222 | 16 | 0.985 |
| 37 | 20,661 | 1609 | 1569 | Ledol | 204 | 176 | 10.837 |
| 38 | 21,249 | 1658 | 1587 | thujopsan-2-alfa-ol | 222 | 208 | 12.808 |

Fuente: esta investigación

Señal = Numeral de la señal en el perfil cromatográfico; T_r = Tiempo de retención en minutos; I_k = Índices de Kovàts experimental; I_{kt} = Índice de Kovàts teórico; m/z = relación masa-carga del ion molecular; C = Concentración expresada en mg del compuesto/kg de material vegetal seco; % = abundancia porcentual.

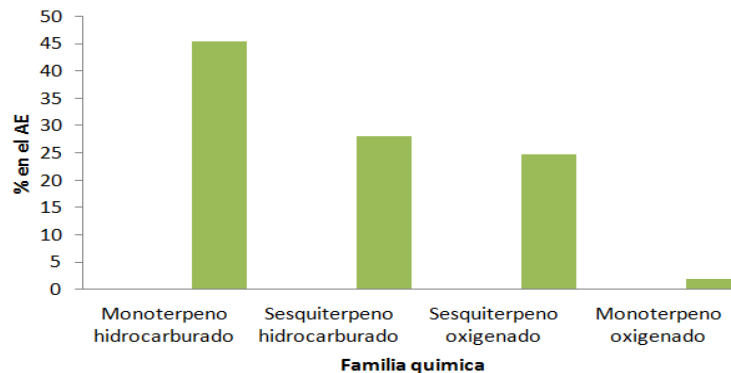
Gráfica 4. Concentración (mg compuesto/kg material vegetal seco) de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola*, Matico.



Fuente: esta investigación

También puede observarse que la composición del AEM, está caracterizada principalmente por compuestos monoterpénicos hidrocarburoados, que representan un 45,4% del AE, los compuestos de este tipo son: alfa-pineno, beta-pineno, mirceno, delta-2-careno y limoneno. De igual forma se tiene que los compuestos sesquiterpénicos hidrocarburoados representan el 28,1% del AE y los compuestos son: aromadendreno, E-beta-farneseno, aromadendreno (allo), y prenil limoneno (trans). Con un porcentaje de 24,6%, se encontró a la familia de los sesquiterpenos oxigenados con los siguientes compuestos: thujopsan-2-alfa-ol, palustrol y ledol. En menor porcentaje se tiene a la familia de los monoterpenos oxigenados con un 1,8% y el compuesto perteneciente a esta familia es el linalol. Esto se puede evidenciar en la gráfica 5.

Gráfica 5. Composición porcentual de las familias químicas presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola*, Matico.



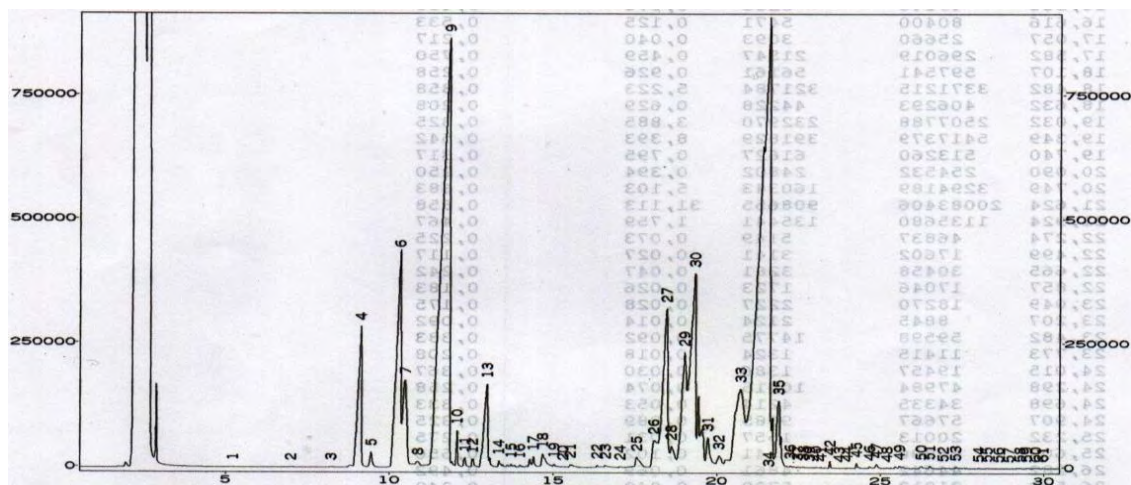
Fuente: esta investigación

Los resultados de esta investigación, corresponden con los antecedentes reportados¹, en donde se identificó como compuestos mayoritarios para el AE de esta planta a: limoneno, ledol, beta-pineno, aromadendreno (allo), delta-2-careno, linalol y alfa-pineno, entre otros. Todos estos compuestos fueron identificados en este trabajo, además también fue posible identificar los compuestos: prenil limoneno (trans), thujopsan-2-alfa-ol y aromadendreno. También se reporta que la principal familia química componente del AE del Matico es la de los monoterpenos hidrocarburoados, seguida por la de los sesquiterpenos hidrocarburoados, concordando con los resultados de esta investigación.

4.3.2. Identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios para el AE de *Lepechinia vulcanicola*, Salvarrial Blanco, cultivada en Yacuanquer.

Para este caso el AE, se obtuvo aplicando el mejor método de extracción, W=80% y T=90 min, estos extractos fueron analizados por GC y GC/MS. En la Figura 10 (página 50) se presenta el perfil cromatográfico del AE extraído bajo las condiciones mencionadas anteriormente. En la tabla 9 (página 50) se presentan los compuestos identificados en este extracto, los tiempos de retención, los índices de Kovats y la relación masa/carga del ion molecular (m/z, dato importante en la determinación estructural de una molécula) de cada constituyente. Solo se identificaron los compuestos que presentaron un porcentaje de área igual o superior al 0,884%. En el anexo D se presenta el perfil cromatográfico de la mezcla de parafinas C₈-C₂₀, usadas para cálculo del índice de Kovats, en el anexo F los espectros de masas experimentales y en el anexo G los espectros de masas teóricos.

Figura 10. Perfil cromatográfico del AE *Lepechinia vulcanicola*, Salvarrial Blanco, extraído mediante MWHD (W=80%, T=90 min).



Fuente: esta investigación

Tabla 9. Compuestos mayoritarios presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola*, Salvarrial Blanco. Identificados por GC/MS, aislados por MWHD.

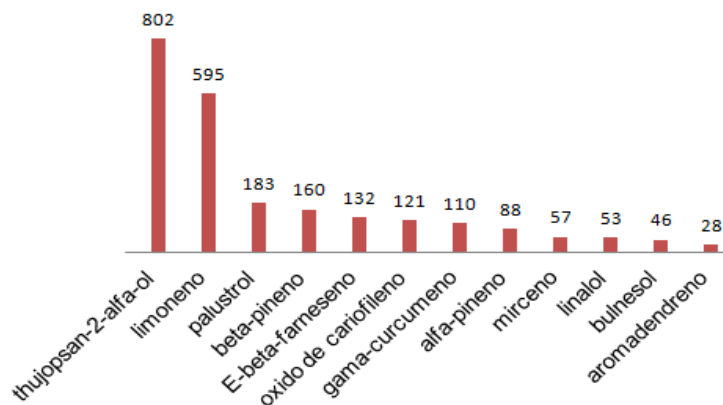
| Señal | T _r | I _k | I _{kt} | Compuesto | m/z | C | % |
|-------|----------------|----------------|-----------------|----------------------|-----|-----|--------|
| 4 | 9,128 | 942 | 939 | alfa-pineno | 136 | 88 | 3.705 |
| 6 | 10,320 | 989 | 979 | beta-pineno | 136 | 160 | 6.737 |
| 7 | 10,470 | 994 | 991 | mirceño | 136 | 57 | 2.400 |
| 9 | 11,803 | 1056 | 1029 | limoneno | 136 | 595 | 25.053 |
| 13 | 12,978 | 1112 | 1097 | linalol | 154 | 53 | 2.232 |
| 26 | 18,115 | 1422 | 1441 | aromadendreno | 204 | 28 | 1.179 |
| 27 | 18,473 | 1448 | 1457 | E-beta-farneseno | 204 | 132 | 5.558 |
| 29 | 19,032 | 1488 | 1483 | gama-curcumeno | 204 | 110 | 4.632 |
| 30 | 19,324 | 1510 | 1588 | palustrol | 222 | 183 | 7.705 |
| 33 | 20,719 | 1614 | 15,83 | oxido de cariofileno | 220 | 121 | 5.095 |
| 34 | 21,582 | 1685 | 1587 | thujopsan-2-alfa-ol | 222 | 802 | 33.768 |
| 35 | 21,886 | 1711 | 1672 | bulnesol | 222 | 46 | 1.937 |

Fuente: esta investigación

Señal = Numeral de la señal en el perfil cromatográfico; T_r = Tiempo de retención en minutos; I_k = Índices de Kovàts experimental; I_{kt} = Índice de Kovàts teórico; m/z = Relación masa carga del ion molecular; C = Concentración expresada en mg del compuesto/kg de material vegetal seco; % = abundancia porcentual.

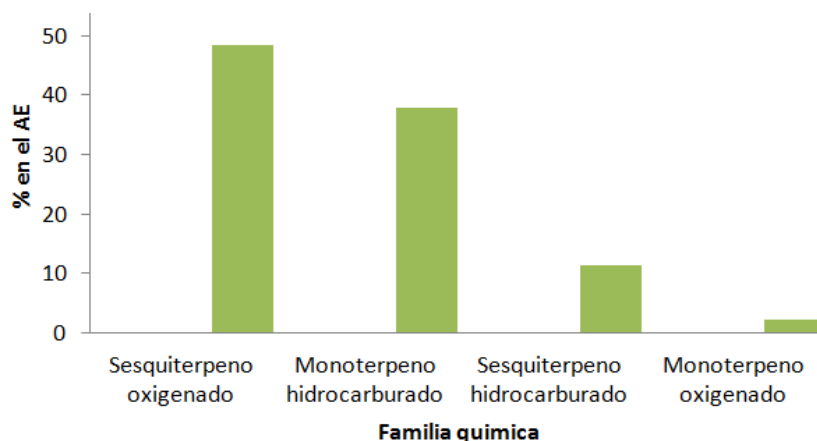
El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, permitió identificar para este extracto, en total 12 compuestos mayoritarios. En la tabla 9 y gráfica 6 (página 51), se observa que los compuestos con mayor concentración, fueron: thujopsan-2-alfa-ol, limoneno, palustrol, y beta-pineno.

Gráfica 6. Concentración (mg compuesto/kg material vegetal seco) de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola*, Salvarrial Blanco.



Fuente: esta investigación

Gráfica 7. Composición porcentual de las familias químicas presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola*, Salvarrial Blanco.



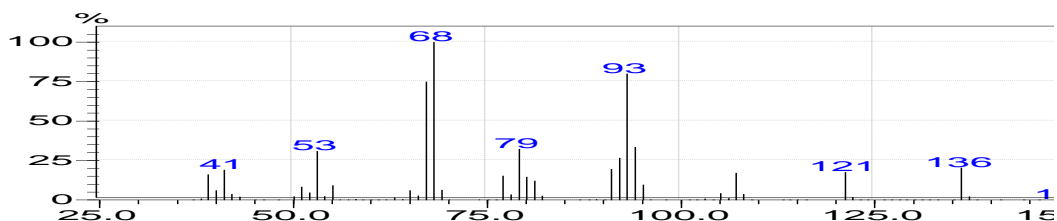
Fuente: esta investigación.

También puede observarse que la composición del AE, está caracterizada principalmente por compuestos sesquiterpénicos oxigenados representando un 48,5% del AE y los compuestos son: oxido de cariofileno, palustrol, thujopsan-2-alfa-ol y bulnesol. De igual forma se tiene que los compuestos monoterpénicos hidrocarburoados, que representan un 37,9% del AE, corresponden a: alfa-pineno, beta-pineno, mirceno y limoneno. En menor porcentaje se tiene a la familia de los sesquiterpénos hidrocarburoados con los siguientes compuestos: aromadendreno, E-beta-farneseno, y gama-curcumeno, que representa el 11,4% del AE. Por último se encontró a los monoterpénos oxigenados con un 2,2% y el compuesto perteneciente a esta familia es el linalol. Esto se puede evidenciar en la gráfica 7.

4.3.3. Posibles rutas de fragmentación de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola*. En esta sección se indica la ruta de fragmentación para algunos de los compuestos mayoritarios del AE de *Lepechinia vulcanicola*.

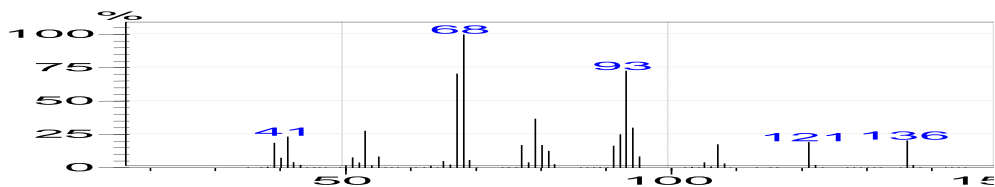
❖ Limoneno: Los espectros de masas obtenidos experimentalmente en el desarrollo de esta investigación, se pueden observar en las figuras 11 y 12.

Figura 11. Espectro de masas experimental de limoneno (Matico, cultivada en Gualmatán).



Fuente: esta investigación

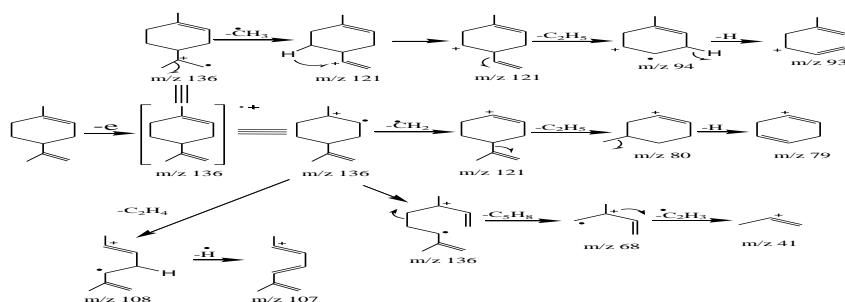
Figura 12. Espectro de masas experimental de limoneno (Salvarrial Blanco, cultivada en Yacuanquer).



Fuente: esta investigación

Según Rosero y colaboradores (2013), reportan que los monoterpenos monocíclicos (felandreno, alfa-terpineno, terpineno, terpinoleno, limoneno), bicíclicos (3-careno, alfa-pineno, sabineno, canfeno) y acíclicos (mirceno, allocimeno, ledol), poseen una fragmentación característica común: presentan en sus EM el ión m/z 93 como pico base o de alta abundancia, producido por una ruptura alílica en la molécula acompañada de la eliminación de un radical $C_3H_7^\bullet$. El ión molecular (m/z 136) es de intensidad media o baja y se descompone eliminando sucesivamente los radicales CH_3^\bullet y $C_3H_7^\bullet$, con formación de los iones en m/z 121 y 93, respectivamente. El ión $(MC_3H_7)^+$ posteriormente pierde CH_3^\bullet para generar el fragmento $(M-C_3H_7-CH_3)^+$ en m/z 79.

Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación del limoneno.



Fuente: Benavides y colaboradores (2011).

En relación al limoneno se puede apreciar que: el ion molecular de este compuesto en m/z 136 (esquema 4), 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 hidrógeno²³.

❖ Mirceno: Los espectros de masas obtenidos experimentalmente en el desarrollo de esta investigación, se pueden observar en las figuras 13 y 14.

Figura 13. Espectro de masas experimental de mirceno (Matico, cultivada en Gualmatán).

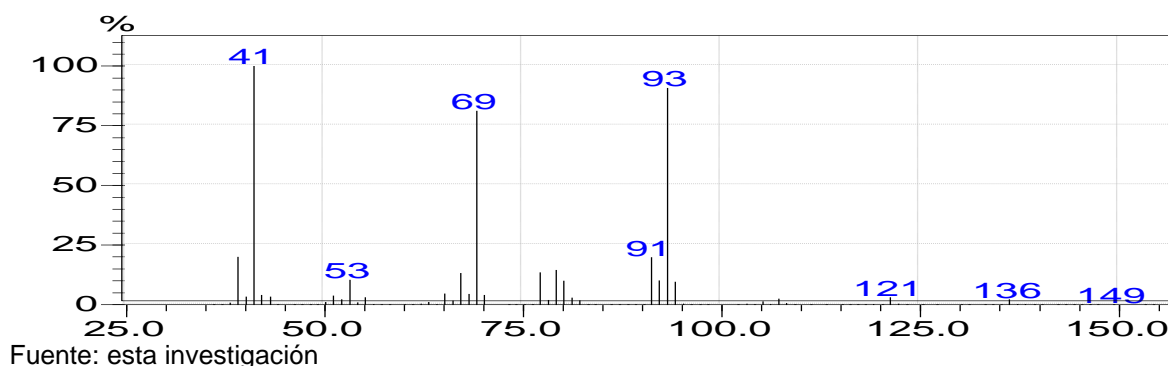
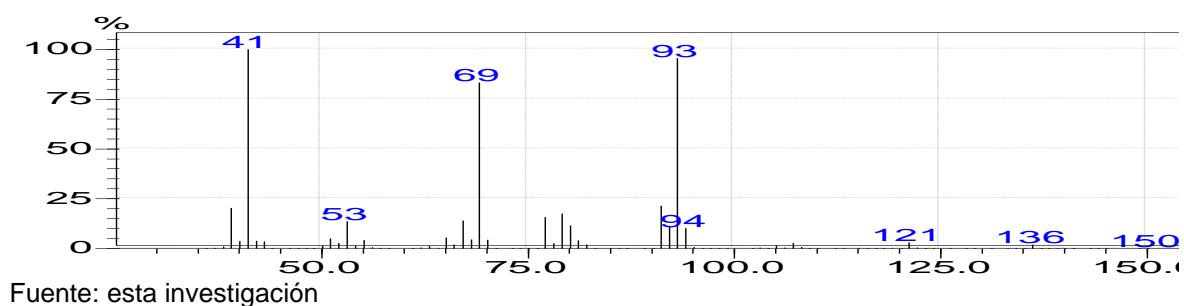
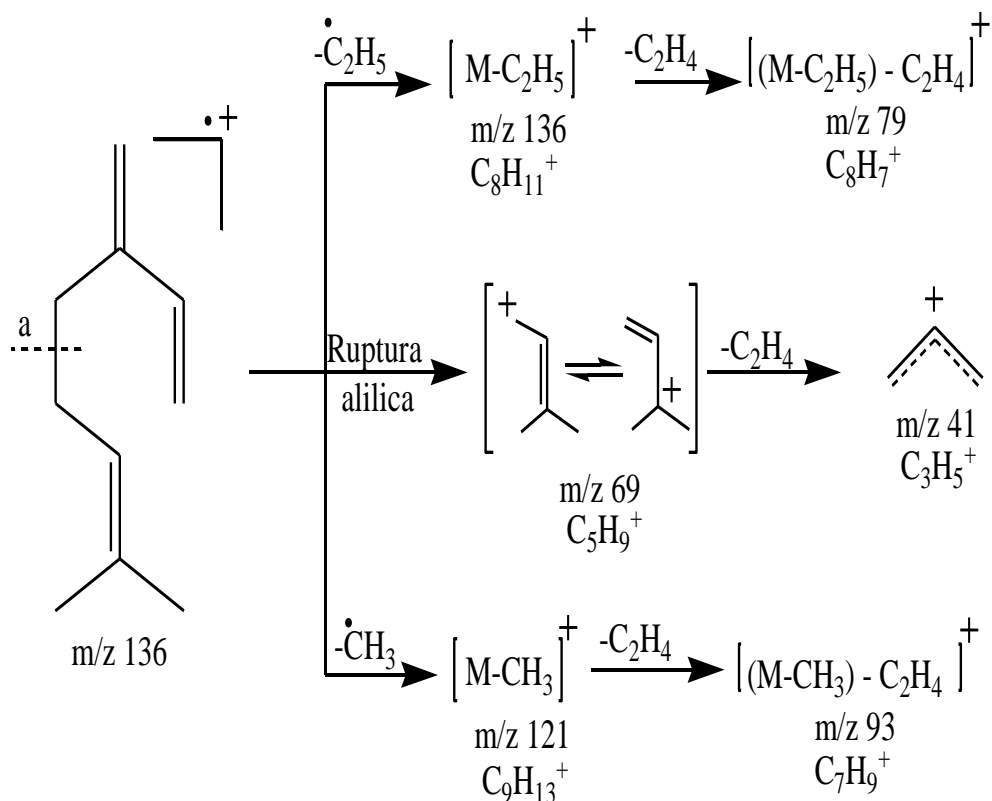


Figura 14. Espectro de masas experimental de mirceno (Salvarrial Blanco, cultivada en Yacuanquer).



El mirceno exhibe una fragmentación característica de los monoterpenos. El ion molecular tiene una relación m/z de 136 y presenta una intensidad baja. La fragmentación del mirceno conduce a la formación de iones característicos para monoterpenos, a saber: $(M-CH_3)^+$ en m/z 121 con una intensidad baja y el fragmento $(M-CH_3-C_2H_4)^+$ en m/z 93, como el pico de base. El ion m/z 69 se forma como resultado de una ruptura alílica a partir del ion molecular; la posterior eliminación de una molécula de etileno a partir del fragmento m/z 69 conduce a la formación del ion alilo m/z 41. Los fragmentos de intensidad baja en m/z 107 y 79, provienen de la eliminación del radical $C_2H_5^\bullet$ y de una molécula de etileno, respectivamente⁴⁵. Ver esquema 5 (página 55).

Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del mirceno.

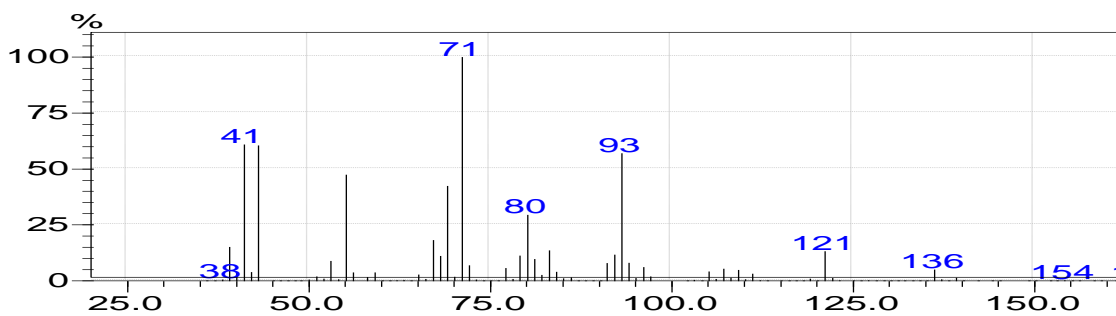


Fuente: Monsalve y colaboradores (2007).

⁴⁵ Monsalve, L.; Stashenko, E., Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas de *lippia alba* (mill) n.e brown, provenientes de diferentes regiones de Colombia. Trabajo de grado, Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. 2007. 141p.

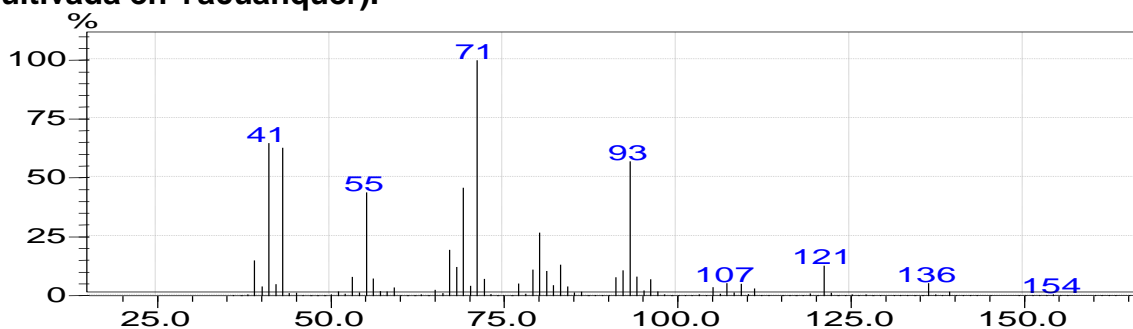
❖ Linalol: los espectros de masas obtenidos experimentalmente en el desarrollo de esta investigación, se pueden apreciar en las figuras 15 y 16.

Figura 15. Espectro de masas experimental de linalol (Matico, cultivada en Gualmatán).



Fuente: esta investigación

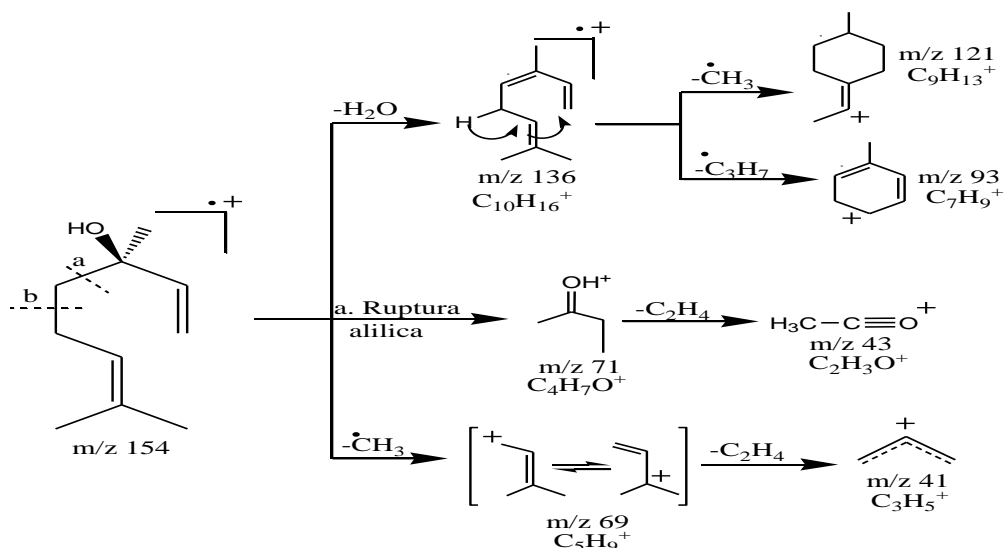
Figura 16. Espectro de masas experimental de linalol (Salvarrial Blanco, cultivada en Yacuanquer).



Fuente: esta investigación

El linalol presenta el patrón de fragmentación típico de monoterpenoles. Las rutas de la fragmentación se observan en el esquema 6. El ion molecular de m/z 154 muestra una intensidad baja. Se presentan dos rupturas alílicas en el ion molecular (a y b), que conducen a la formación de los fragmentos $C_4H_7O^+$ en m/z 71 (a), pico de base, y el ion $C_5H_9^+$ en m/z 69 (b). El ion 71, posteriormente, elimina una molécula de etileno conduciendo a la formación del ion CH_3CO^+ con m/z en 43, y el fragmento 69, también por pérdida de una molécula de C_2H_4 , forma el ion alílico $C_3H_5^+$ en m/z 41. Los iones $C_4H_7O^+$ (m/z 71), $C_5H_9^+$ (m/z 69), CH_3CO^+ (m/z 43) y $C_3H_5^+$ (m/z 41) constituyen los fragmentos “diagnóstico” en el EM del linalol y permiten distinguirlo fácilmente de otros monoterpenoles, confirmando la presencia del grupo OH- en la molécula y el número y la disposición de enlaces dobles en ella⁴². Ver esquema 6.

Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación de linalol.



Fuente: Monsalve y colaboradores (2007).

4.3.4. Análisis cualitativo comparativo entre el AE de Matico y Salvarrial Blanco. En la tabla 10 (página 57) se registran los principales aspectos de comparación entre las dos variedades de *Lepechinia vulcanicola*, uno de dichos aspectos son las condiciones de extracción, las cuales resultaron similares para las dos plantas, el rendimiento fue mayor para Salvarrial Blanco.

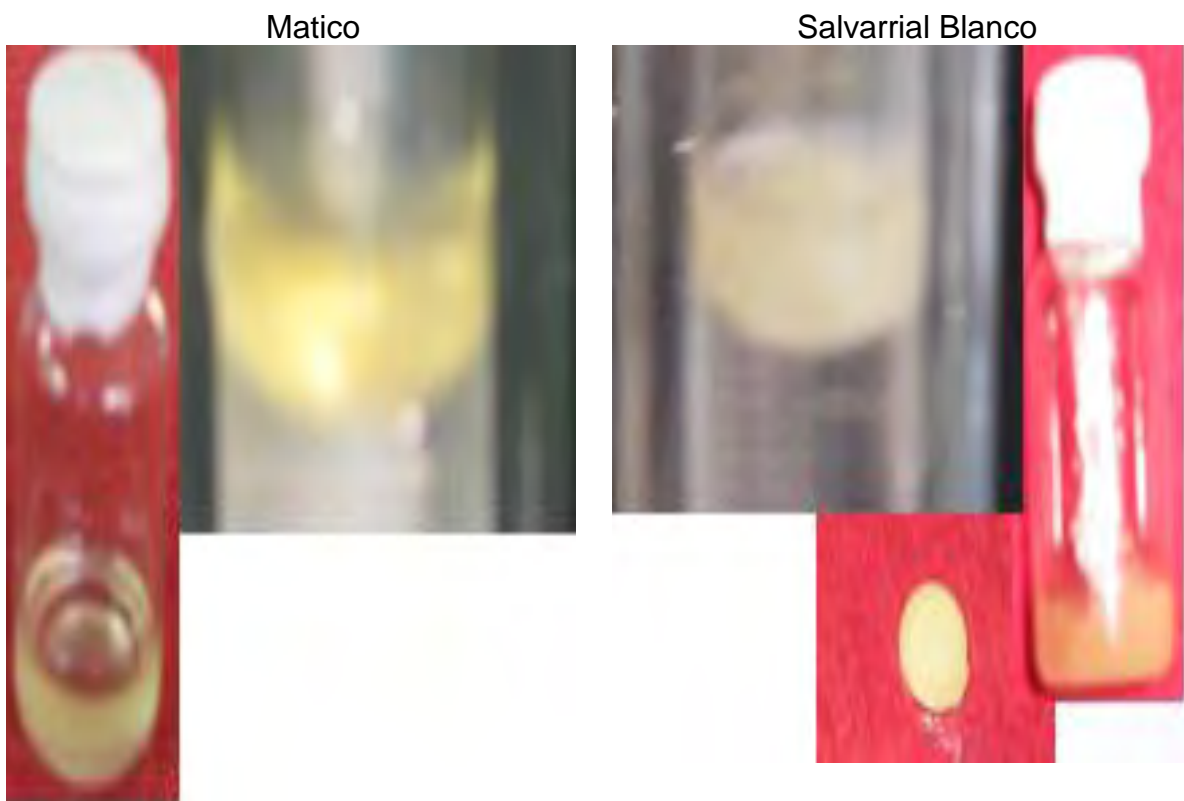
Tabla 10. Principales aspectos de comparación entre el AE de Matico y Salvarrial Blanco.

| | Matico | Salvarrial Blanco |
|--|---|---|
| Tratamiento óptimo de extracción. | Potencia = 80% Tiempo = 90 min | Potencia = 80% Tiempo = 90 min |
| | 80 g de muestra vegetal seco | |
| Rendimiento del AE | 0,46% | 0,58% |
| Aspecto del AE | Líquido | Sólido |
| Compuestos mayoritarios | 1. limoneno 2. prenil limoneno (trans) 3. thujopsan-2-alfa-ol | 1. thujopsan-2-alfa-ol 2. limoneno 3. palustrol |
| Familia química mayoritaria | Monotérpeno hidrocarburado | Sesquitérpeno oxigenado |

Fuente: esta investigación

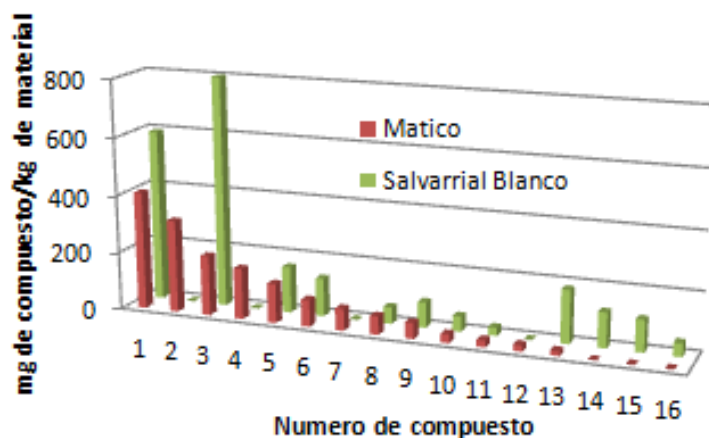
Un aspecto importante por el cual se realizó este trabajo comparativo son las diferentes características que presenta el AE, puntualmente el estado físico, que a temperatura ambiente (15-17 °C aproximadamente) para el Matico es líquido y para el Salvarrial Blanco es sólido (ver figura 17). Esto puede ser causado por la diferente composición química del AE, ya que la concentración de los compuestos identificados es diferente en las dos plantas estudiadas (gráfica 8, página 58), además la familia química más representativa en cada planta también es diferente (gráfica 9, página 58). La diferencia más importante se relaciona con la familia de los sesquiterpenos oxigenados, la abundancia de estos compuestos en el AESB es aproximadamente el doble que en el AEM, por lo cual dicho AE estaría en la capacidad de formar una red cristalina iónica más estable y por ende se necesitaría una mayor temperatura para que este AE se presente en estado líquido.

Figura 17. Estado físico del AE de Matico y Salvarrial Blanco.



Fuente: esta investigación

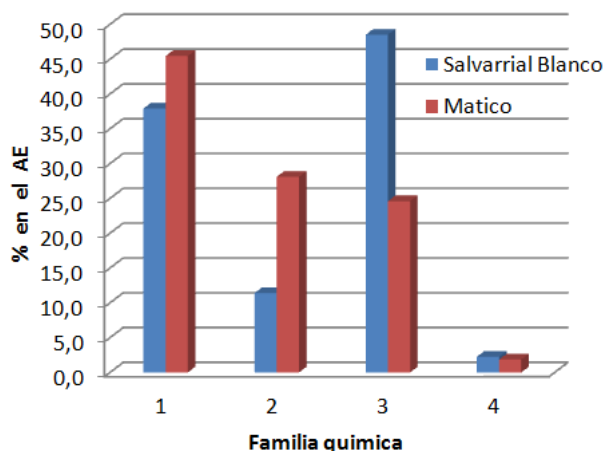
Gráfica 8. Compuestos presentes en el AE de Matico y Salvarrial Blanco.



1. limoneno.
2. prenil limoneno (trans).
3. thujopsan-2-alfa-ol
4. ledol.
5. beta-pineno.
6. E-beta-farneseno.
7. delta-2-careno.
8. mirceno.
9. alfa-pineno.
10. linalol.
11. aromadendreno.
12. aromadendreno (allo).
13. palustrol.
14. oxido de carifileno.
15. gama-curcumeno.
16. bulnesol.

Fuente: esta investigación

Gráfica 9. Familias químicas presentes en el AE de Matico y Salvarrial Blanco.



1. Monoterpeno hidrocarburado.
2. Sesquiterpeno hidrocarburado.
3. Sesquiterpeno oxigenado.
4. Monoterpeno oxigenado.

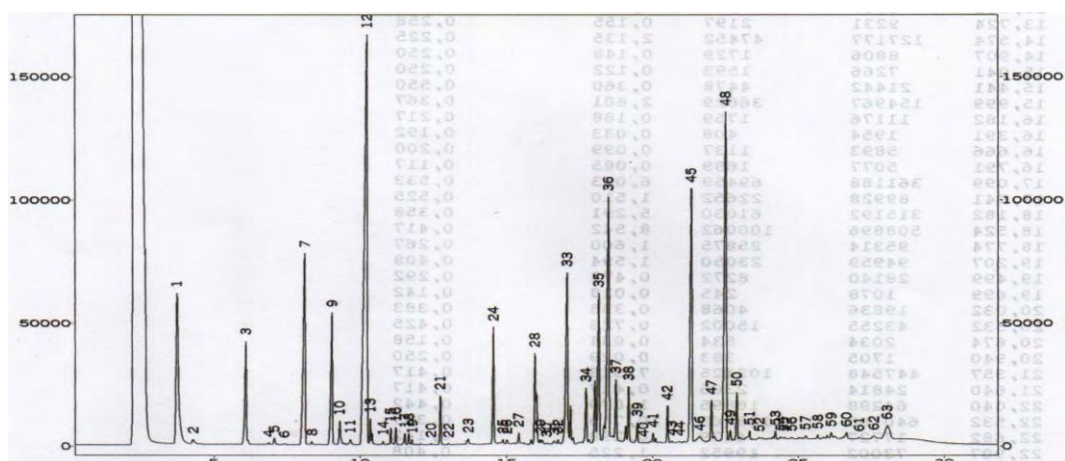
Fuente: esta investigación

4.3.5. Análisis complementarios, por columna polar de polietilenglicol DB-WAX. Debido a que los AEs son mezclas heterogéneas que contienen analitos tanto polares como apolares, se realizó el análisis cromatográfico del AE con una columna apolar (columna DB-5) y con una columna polar (DB-WAX). En los literales 4.3.1 y 4.3.2 se realizó el estudio correspondiente a la columna apolar, en este aporte se indica el análisis del AE con columna polar DB-WAX.

Los extractos necesarios para estos análisis se obtuvieron bajo el mejor tratamiento de extracción y se diluyeron en hexano hasta una concentración del 3,2% v/v. De los extractos se inyectaron alícuotas de 1,0 µL, las cuales se analizaron por GC-FID, usando un cromatógrafo de gases GC-17A Shimadzu, ubicado en los Laboratorios Especializados de la Universidad Nariño (figura 6, página 36), dotado con un puerto de inyección *split/splitless*, con una columna cromatográfica DB-WAX asilent AGILENT TECH de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de fase estacionaria, a las siguientes condiciones cromatográficas: temperatura de inyección 250 °C, temperatura del detector 280 °C, temperatura de la columna 50 °C por 5 minutos; 10 °C/min hasta 240 °C por 5 min, obteniéndose un tiempo total de análisis de 30 min; se utilizó Helio AP como gas de arrastre con un flujo de 1,0 mL/minuto, con una razón *split* 1:6.

En las figuras 18 y 19 se observan los perfiles cromatográficos obtenidos para cada muestra. En las tablas 11 y 12 se pueden apreciar los compuestos identificados en AEM y en AESB, respectivamente, también se registran: los tiempos de retención y los índices de Kovàts de los compuestos en el AE. Solo se identificaron los compuestos que presentaron un porcentaje de área igual o superior al 1%. En el anexo D se presenta el perfil cromatográfico de la mezcla de parafinas C₉-C₂₄, usadas para cálculo del índice de Kovàts, los valores teóricos de los índices de Kovàts se obtuvieron principalmente de la base de datos Pherobase y NIST⁴⁶.

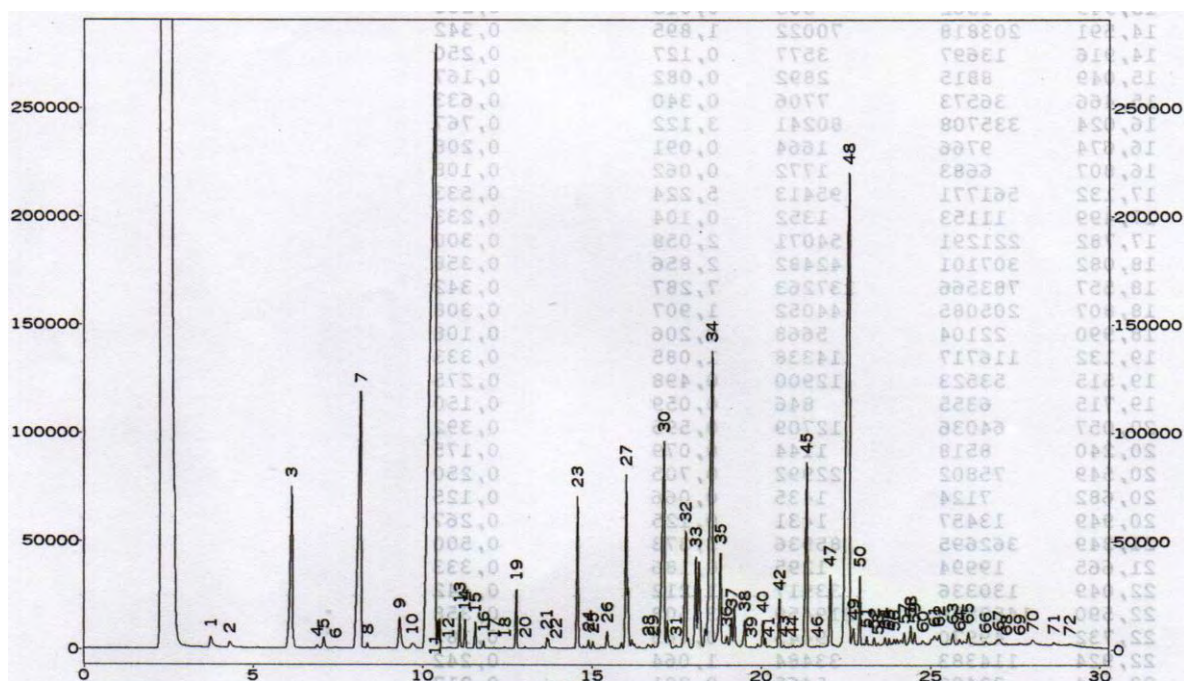
Figura 18. Perfil cromatográfico del AE *Lepechinia vulcanicola* (Matico), extraído mediante MWH (W=80%, T=90 min). Columna DB-WAX.



Fuente: esta investigación

⁴⁶ Base de datos pherobase y NIST [Citado 03 de febrero de 2013] Disponible en internet: <http://www.pherobase.com>

Figura 19. Perfil cromatográfico del AE *Lepechinia vulcanicola* (Salvarrial Blanco), extraído mediante MWHD (W=80%, T=90 min). Columna DB-WAX.



Fuente: esta investigación

Tabla 11. Compuestos mayoritarios presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola* (Matico), columna DB-WAX.

| Señal | T _r | I _k | I _{kt} | Compuesto |
|-------|----------------|----------------|-----------------|----------------------|
| 3 | 6,100 | 1014 | 1027 | alfa-pineno |
| 7 | 8,124 | 1097 | 1113 | beta-pineno |
| 9 | 9,049 | 1137 | 1128 | delta-2-careno |
| 12 | 10,258 | 1190 | 1212 | limoneno |
| 24 | 14,574 | 1421 | 1431 | 1-octen-3-ol |
| 28 | 15,999 | 1538 | 1551 | linalol |
| 33 | 17,099 | 1593 | 1608 | beta-cariofileno |
| 34 | 17,741 | 1643 | 1649 | aromadendreno |
| 35 | 18,182 | 1679 | 1661 | aromadendreno (allo) |
| 36 | 18,524 | 1706 | - | prenil limoneno |
| 37 | 18,774 | 1726 | 1720 | alfa-terpineol |
| 38 | 19,207 | 1761 | 1674 | alfa-farneceno |
| 45 | 21,357 | 1949 | 2028 | ledol |
| 47 | 22,040 | 2010 | 1999 | oxido de cariofileno |
| 48 | 22,532 | 2055 | - | thujopsan-2-alfa-ol |
| 50 | 22,907 | 2089 | 1931 | palustrol |

Fuente: esta investigación

Señal = Numeral de la señal en el perfil cromatográfico; T_r = Tiempo de retención en minutos; I_k = Índice de Kovàts experimental; I_{kt} = Índice de Kovàts teórico.

Tabla 12. Compuestos mayoritarios presentes en el AE de Lepechinia vulcanicola (Salvarrial Blanco). Columna DB-WAX.

| Señal | T_r | I_k | I_{kt} | Compuesto |
|-------|--------|-------|----------|----------------------|
| 3 | 6,150 | 1016 | 1027 | alfa-pineno |
| 7 | 8,591 | 1117 | 1113 | beta-pineno |
| 11 | 10,383 | 1195 | 1212 | limoneno |
| 23 | 14,591 | 1423 | 1431 | 1-octen-3-ol |
| 27 | 16,024 | 1520 | 1551 | linalol |
| 30 | 17,132 | 1595 | 1608 | beta-cariofileno |
| 32 | 17,782 | 1646 | 1649 | aromadendreno |
| 33 | 18,082 | 1670 | 1661 | aromadendreno (allo) |
| 34 | 18,557 | 1709 | - | prenil limoneno |
| 35 | 18,807 | 1729 | 1720 | alfa-terpineol |
| 37 | 19,132 | 1755 | 1674 | alfa-farneceno |
| 45 | 21,349 | 1896 | 1931 | palustrol |
| 47 | 22,049 | 2011 | 1999 | oxido de cariofileno |
| 48 | 22,590 | 2060 | - | thujopsan-2-alfa-ol |
| 50 | 22,924 | 2090 | 2028 | ledol |

Fuente: esta investigación

Señal = Numeral de la señal en el perfil cromatográfico; T_r = Tiempo de retención en minutos; I_k = Índice de Kovàts experimental; I_{kt} = Índice de Kovàts teórico.

Los principales aportes al realizar el análisis con columna DB-WAX, son los siguientes:

❖ Se confirmó la presencia de algunos compuestos: En AEM: alfa-pineno, beta-pineno, delta-2-careno, limoneno, aromadendreno, aromadendreno (allo), alfa-farneceno, prenil limoneno, ledol, tujopsan-2-alfa-ol y palustrol.

En AESB: alfa-pineno, beta-pineno, limoneno, linalol, aromadendreno, alfa-farneceno, oxido de cariofileno, tujopsan-2-alfa-ol y palustrol.

❖ Se identificó compuestos, que no habían sido identificados mediante el uso de columna apolar: En AEM: 1-octen-3-ol, beta-cariofileno, oxido de cariofileno y alfa-terpineol.

En AESB: 1-octen-3-ol, beta-cariofileno, aromadendreno (allo), prenil limoneno, alfa-terpineol y ledol.

❖ El compuesto delta-2-careno se detectó en AEM, pero no en AESB. Esta es una de las principales diferencias entre los AEs.

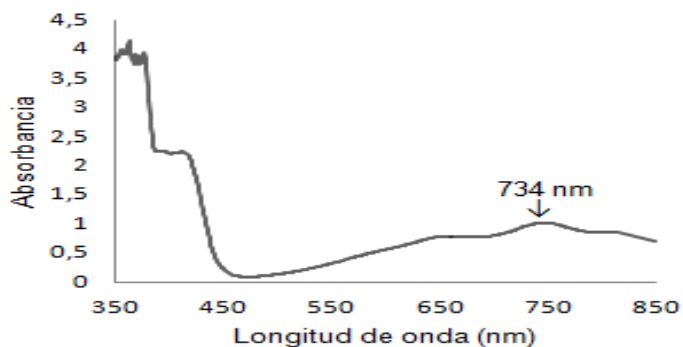
4.4. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

4.4.1. Actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC).

4.4.1.1. Determinación de la longitud de onda. Para la determinación de los datos espectrofotométricos se empleó un espectrofotómetro UV-VIS Merck 300, con un rango de señal 190-900 nm. La formación del catión-radical ABTS^{•+} se puede evidenciar a través de su máximo de absorción a longitudes de onda de 645, 734 y 815 nm.

Para determinar la longitud de onda de mayor absorbancia (adecuada para realizar las mediciones requeridas en el método), se realizó un barrido por la región ultravioleta y visible (UV-VIS) del espectro, esto se observa en la gráfica 10.

Gráfica 10. Espectro de absorción del catión-radical ABTS^{•+}.



Fuente: esta investigación.

La solución de ABTS^{•+} presentó su máximo de absorción a una longitud de onda de 734 nm, longitud de onda apropiada para los análisis de actividad antioxidante³².

4.4.1.2. Curva de calibración. La curva de calibración (gráfica 11) se construyó a partir de los promedios de los valores de absorbancia, se calculó un promedio de absorbancia por tratamiento. Los resultados se presentan en la tabla 13.

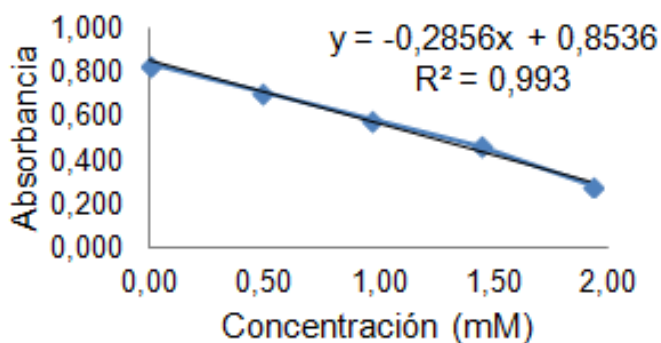
Tabla 13. Absorbancia final de las soluciones de Trolox.

| C | A | S | %CV |
|----------|----------|----------|------------|
| 0,00 | 0,843 | 0,0068 | 0,809 |
| 0,48 | 0,717 | 0,0041 | 0,567 |
| 0,96 | 0,589 | 0,0071 | 1,212 |
| 1,44 | 0,467 | 0,0083 | 1,780 |
| 1,92 | 0,282 | 0,0053 | 1,874 |

Fuente: esta investigación.

C = Concentración (mM); A = Absorbancia (promedio); S = Desviación estándar; %CV = Porcentaje coeficiente de variación.

Gráfica 11. Curva de calibración de soluciones trolox a 734 nm.



Fuente: esta investigación.

La medición de los resultados se hizo por triplicado. Los datos de absorbancia de las soluciones de ABTS^{•+} se muestran en la tabla 14 (página 64). Para proporcionar un alto grado de confianza y calidad de los resultados del método analítico, se calculó los parámetros estadísticos establecidos en el literal 3.5.1.

❖ Linealidad y rango: la variación de la absorbancia con respecto a la concentración de trolox resultó lineal en el rango: 0 a 1,92 mM. Ésta curva de calibración presenta un coeficiente de correlación (r) de 0,996 y un coeficiente de determinación (r^2) de 0,993, lo que demuestra una buena linealidad del sistema y un alto grado de correlación entre los datos.

❖ Precisión: para comprobar la variabilidad del ensayo, se determinó los coeficientes de variación (ecuación 6, página 38). El valor establecido fue inferior al 3%, valor que está debajo del límite establecido para determinaciones espectrofotométricas³⁹.

Además, los intervalos de confianza, proporcionaron resultados aceptables dentro de la técnica de análisis. Los intervalos de confianza se calcularon de acuerdo con la ecuación 7 (página 38).

Tabla 14. Absorbancia de soluciones de ABTS•+ a diferentes concentraciones de trolox.

| ÍTEM | C | A | S | %CV | IC |
|--------|------|-------|-------|-------|-------------|
| BLANCO | 0,00 | 0,844 | 0,007 | 0,789 | 0,837-0,849 |
| | | 0,842 | 0,009 | 1,029 | |
| | | 0,842 | 0,008 | 0,928 | |
| TROLOX | 0,48 | 0,716 | 0,004 | 0,529 | 0,713-0,720 |
| | | 0,718 | 0,006 | 0,847 | |
| | | 0,716 | 0,003 | 0,449 | |
| TROLOX | 0,96 | 0,589 | 0,008 | 1,382 | 0,582-0,595 |
| | | 0,588 | 0,008 | 1,384 | |
| | | 0,589 | 0,008 | 1,425 | |
| TROLOX | 1,44 | 0,468 | 0,010 | 2,107 | 0,459-0,474 |
| | | 0,466 | 0,010 | 2,146 | |
| | | 0,466 | 0,009 | 1,826 | |
| TROLOX | 1,92 | 0,283 | 0,007 | 2,408 | 0,278-0,287 |
| | | 0,282 | 0,006 | 2,215 | |
| | | 0,283 | 0,005 | 1,815 | |

Fuente: esta investigación.

C = Concentración (mM); A = Absorbancia (cada dato es un promedio de tres mediciones); S = Desviación estándar; %CV = Porcentaje coeficiente de variación; IC = Intervalo de confianza (95%).

❖ Exactitud: Para determinar la exactitud del ensayo se procedió a estimar el porcentaje de error relativo de la curva de calibración (%Er), los valores calculados fueron óptimos y presentan valores inferiores al 6%, los datos se aprecian en la tabla 15, e indican la buena exactitud del método.

Tabla 15. Concentraciones experimentales de soluciones de trolox.

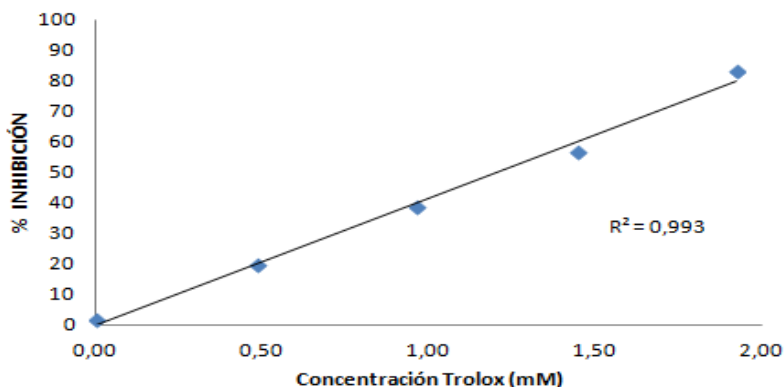
| C | A | C _e | %Er |
|------|-------|----------------|-------|
| 0,00 | 0,843 | 0,038 | ----- |
| 0,48 | 0,717 | 0,479 | 0,208 |
| 0,96 | 0,589 | 0,927 | 3,438 |
| 1,44 | 0,467 | 1,355 | 5,903 |
| 1,92 | 0,282 | 2,000 | 4,167 |

Fuente: esta investigación.

C = Concentración aceptada como real (mM); A = Absorbancia promedio; C_e = Concentración experimental; %Er = Porcentaje de error relativo de la curva de calibración.

4.4.1.3. Determinación de la actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) y actividad antioxidante total (AAT). La gráfica 12 muestra la capacidad antioxidante del trolox. Se observa la relación lineal entre la concentración de trolox y el porcentaje de inhibición, es decir, el aumento progresivo del porcentaje de inhibición con respecto a la concentración de trolox utilizada. Las sustancias en estudio presentaron un porcentaje de inhibición de 24,5% para AEM y de 13,7% para AESB. Se tuvo en cuenta que la cantidad inicial de ABTS^{•+} fue de 7,2E-3 mmol.

Gráfica 12. Grado de inhibición del catión-radical ABTS^{•+}, en función de la concentración (mM) de trolox.



Fuente: Esta investigación.

La actividad antioxidante de: ácido ascórbico, AEM y AESB se calculó tomando como base los datos y la ecuación de la recta de calibrado, que se indican en la tabla 16.

Tabla 16. Datos necesarios para calcular TEAC y ATT.

Ecuación de calibrado: $A_{734nm} = -0,2856 [Trolox] + 0,8536$

| Sustancia | A | S | %CV | C ₁ | C ₂ | C ₃ |
|-----------------|-------|-------|-------|----------------|----------------|----------------|
| Acidó ascórbico | 0,385 | 0,017 | 4,361 | 1,641 | 1,667 | 2,93E-4 |
| AEM | 0,667 | 0,030 | 4,599 | 0,653 | - | 7,20E-2 |
| AESB | 0,741 | 0,012 | 1,649 | 0,394 | - | 4,70E-2 |

Fuente: Esta investigación.

A = Promedio de absorbancia; S = Desviación estándar (n=9); %CV = Porcentaje coeficiente de variación; C₁ = Concentración (mmol trolox/L solución); C₂ = Concentración (mmol sustancia/L solución); C₃ = Concentración (kg sustancia/L solución).

En la tabla 17 se indica la actividad antioxidante (valores teóricos y experimentales) para cada una de las sustancias estudiadas.

Tabla 17. Actividad antioxidante del AE de *Lepechinia vulcanicola* (Matico y Salvarrial Blanco) y de ácido ascórbico.

| Sustancia | TEAC (mmol trolox/mmol sustancia) | | AAT (mmol trolox/kg sustancia) |
|-----------------|--------------------------------------|------------|-----------------------------------|
| | Experimental | Reportado* | |
| Ácido ascórbico | 0,984±0,013 | 0,990 | 5599,9±0,013 |
| AEM | - | - | 9,047±0,023 |
| AESB | - | - | 8,423±0,009 |

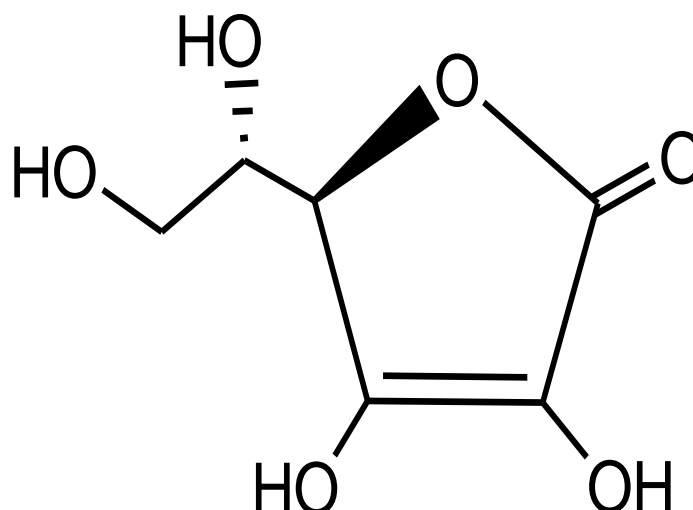
Fuente: Esta investigación.

* Re, R. y colaboradores 1999.

En el caso del ácido ascórbico se tiene que el valor de TEAC evaluado experimentalmente concuerda con el dato reportado en la literatura³². Esto brinda una buena fiabilidad del método.

Por otro lado, de la tabla 17 es posible inferir que el ácido ascórbico es un buen antioxidante, ya que una sustancia es considerada un buen antioxidante cuando presenta un TEAC muy próximo o mayor a 1 mmol trolox/mmol sustancia⁵. Esta característica del ácido ascórbico es consecuencia de su estructura molecular (figura 20), ya que ésta presenta grupos con propiedades reductoras, por ejemplo: el grupo hidroxilo, el cual puede ceder fácilmente electrones y estabilizarse mediante el sistema conjugado que presenta la molécula⁴⁷.

Figura 20. Estructura molecular del ácido ascórbico.

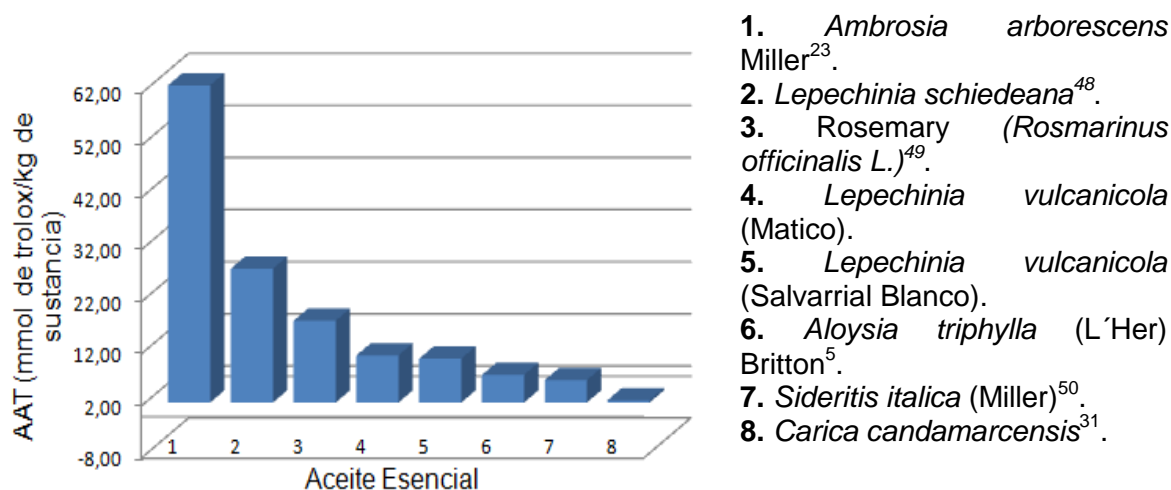


Fuente: Devi y colaboradores (2007).

En cuanto a los extractos AEM y al AESB, se puede apreciar que en comparación con el ácido ascórbico, presentan menor actividad antioxidante. Las causas de esto podrían ser que los grupos sustituyentes de los compuestos presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola*, no tienen la capacidad de donar electrones tan fácilmente, ya que no poseen un sistema resonante tan efectivo como el que posee el ácido ascórbico.

⁴⁷ Devi, R.; ARUMUGHAN, C., Antiradical efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran. . En: Food and Chemical Toxicology. Vol 45: 2014–2021p. 2007.

Gráfica 13. Comparación de la actividad antioxidante del AE de *Lepechinia vulcanicola*, Matico y Salvarrial Blanco, con otros aceites esenciales.



Fuente: Esta investigación.

Sin embargo al comparar las propiedades antioxidantes de AEM (AAT=9,047 mmol trolox/kg sustancia) y AESB (AAT=8,423 mmol trolox/kg sustancia), con la de otros AEs, se tiene que el AE de *Lepechinia vulcanicola*, presenta una actividad antioxidante similar a la de otros aceites reconocidos por sus propiedades antioxidantes.

Esto se puede evidenciar en la gráfica 13, en la cual se muestra la capacidad antioxidante de varios AEs expresada como AAT. En la tabla 18 (página 68), se registra los compuestos mayoritarios de los AEs de las especies vegetales de la gráfica 13, según esto los AEs con alto contenido en compuestos cuya estructura les posibilite formar un gran número de estructuras resonantes, son los que presentan mayor valor de capacidad antioxidante.

⁴⁸ PUERTAS, M.; HILLEBRAND, S.; STASHENKO, E.; WINERHALTER, P., In Vitro radical scavenging activity of essential oils from columbian plants. En: Journal of Flavour and Fragrance. Vol. 17: 380p. 2002.

⁴⁹ ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E., Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, lackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. . En: Food Chemistry. Vol. 110: 76–82p. 2008.

⁵⁰ BASILE, A.; SENATORE, F., Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. . En: Journal of Ethnopharmacology. Vol. 107: 240–248p. 2006.

Teniendo en cuenta lo mencionado en el anterior párrafo y observando las estructuras moleculares de los componentes del AE de *Lepechinia vulcanicola* (ver anexos E y F), la actividad antioxidante del AE de esta especie vegetal, puede originarse por la presencia de compuestos como: mirceno, limoneno, linalol, farneceno y curcumeno. Las diferencias encontradas entre los AEs (AEM y AESB) pueden radicar en el efecto de la composición química del AE, es por ello que se debe tener en cuenta el efecto sinérgico que los componentes del AE pueden tener sobre la actividad antioxidante²⁶. Posiblemente los diferentes valores de TEAC para AEM (AAT=9,047 mmol trolox/kg sustancia) y AESB (AAT=8,423 mmol trolox/kg sustancia), se evidencian por la presencia de delta-2-careno identificado únicamente en AEM y de gama-curcumeno y bulnesol identificados únicamente en AESB.

Tabla 18. Especie vegetal y componentes mayoritarios de su aceite esencial.

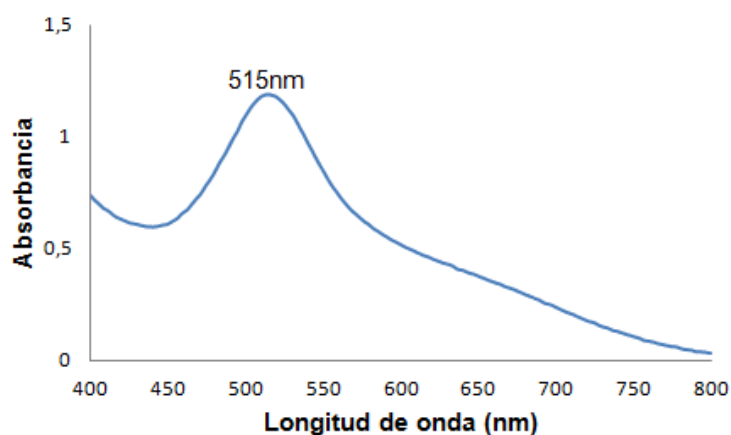
| Especie vegetal | Componentes mayoritarios del AE | Parte de la planta |
|--|--|---------------------------|
| <i>Ambrosia arborescens</i> Miller ²³ . | Limoneno Cis-crisanteneol Isoborneol | Hojas |
| <i>Lepechinia schiedeana</i> ⁴⁸ . | Ledol Careno Alfa-cadinol | Hojas |
| Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) ⁴⁹ . | Ácido carnosónico Ácido rosmarínico Sesamol | Hojas |
| <i>Lepechinia vulcanicola</i> (Matico). | Limoneno Prenil limoneno Thujopsan-2-alfa-ol | Hojas |
| <i>Lepechinia vulcanicola</i> (Salvarrial Blanco). | Thujopsan-2-alfa-ol Limoneno Palustrol | Hojas |
| <i>Aloysia triphylla</i> (L'Her) Britton ⁵ . | Limoneno Neral Geranial | Hojas |
| <i>Sideritis italica</i> (Miller) ⁵⁰ . | Para-metoxi acetofenona Ácido palmítico Nonanal | Hojas |
| <i>Carica candamarcensis</i> ³¹ . | Caprilato de etilo Caprilato de butilo Butirato de etilo | Frutos |

Fuente: Esta investigación.

4.4.2. Evaluación de la eficiencia anti-radical (DPPH).

4.4.2.1. Determinación de la longitud de onda. Para la determinación de los datos espectrofotométricos se empleó un espectrofotómetro UV-VIS Merck 300, con un rango de señal 190-900 nm. Con el fin de determinar la longitud de apropiada para los análisis, se realizó un barrido por la región visible del espectro, generando la gráfica 14 (página 69).

Gráfica 14. Espectro de absorción del radical DPPH.



Fuente: esta investigación.

La solución de DPPH[•] presentó su máximo de absorción a una longitud de onda de 515 nm. Una longitud de onda apropiada para el análisis de eficiencia anti-radical, además coincide con la reportada en la literatura³⁶.

4.4.2.2. Curva de calibración. La curva de calibración (gráfica 15, página 70) se construyó a partir de los promedios de los valores de absorbancia obtenidos en las repeticiones, se calculó un promedio de absorbancia por tratamiento. Los resultados se presentan en la tabla 19.

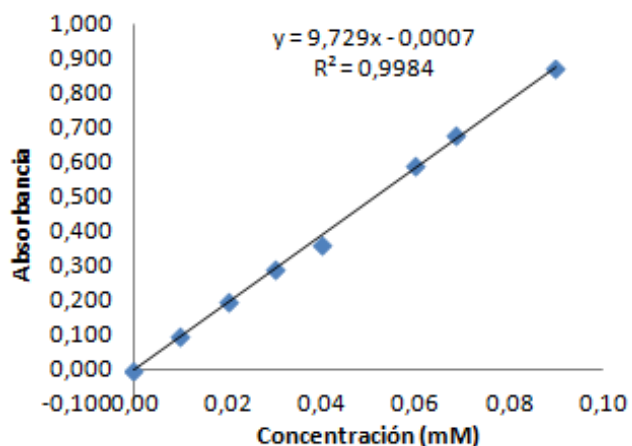
Tabla 19. Absorbancia final de las soluciones de DPPH•.

| C | A | S | %CV |
|----------|----------|----------|------------|
| 0,01 | 0,100 | 0,00109 | 1,083 |
| 0,02 | 0,198 | 0,00110 | 0,558 |
| 0,03 | 0,292 | 0,00179 | 0,613 |
| 0,04 | 0,361 | 0,00175 | 0,484 |
| 0,06 | 0,591 | 0,00058 | 0,098 |
| 0,07 | 0,679 | 0,00077 | 0,113 |
| 0,09 | 0,870 | 0,00123 | 0,141 |

Fuente: esta investigación.

C = Concentración mM en DPPH•; A = Absorbancia promedio; S = Desviación estándar; %CV = Porcentaje coeficiente de variación.

Gráfica 15. Curva de calibración de soluciones DPPH• a 515 nm.



Fuente: esta investigación.

La medición de datos se realizó por triplicado. Los datos de absorbancia de las soluciones de DPPH• se presentan en la tabla 20. Para confirmar la calidad de los resultados, se calculó los parámetros estadísticos indicados en el literal 3.5.1.

Tabla 20. Absorbancia de soluciones de DPPH•.

| C | A | S | %CV | IC |
|----------|----------|----------|------------|-------------|
| 0,01 | 0,101 | 0,002 | 1,507 | 0,099-0,101 |
| | 0,097 | 0,001 | 1,186 | |
| | 0,102 | 0,001 | 0,564 | |
| 0,02 | 0,205 | 0,001 | 0,282 | 0,197-0,198 |
| | 0,190 | 0,002 | 0,912 | |
| | 0,198 | 0,001 | 0,505 | |
| 0,03 | 0,292 | 0,002 | 0,593 | 0,290-0,293 |
| | 0,289 | 0,003 | 1,058 | |
| | 0,294 | 0,001 | 0,196 | |
| 0,04 | 0,322 | 0,004 | 1,090 | 0,360-0,362 |
| | 0,371 | 0,001 | 0,155 | |
| | 0,389 | 0,001 | 0,297 | |
| 0,06 | 0,621 | 0,001 | 0,093 | 0,591-0,592 |
| | 0,579 | 0,001 | 0,100 | |
| | 0,574 | 0,001 | 0,101 | |
| 0,07 | 0,697 | 0,001 | 0,083 | 0,678-0,679 |
| | 0,677 | 0,001 | 0,085 | |
| | 0,663 | 0,001 | 0,174 | |
| 0,09 | 0,868 | 0,001 | 0,115 | 0,869-0,871 |
| | 0,878 | 0,002 | 0,174 | |
| | 0,863 | 0,001 | 0,134 | |

Fuente: esta investigación.

C = Concentración mM en DPPH•; A = Absorbancia promedio de tres mediciones; S = Desviación estándar; %CV = Porcentaje coeficiente de variación; IC = Intervalos de confianza.

❖ Linealidad y rango: se verificó la linealidad del sistema, mediante la construcción de una curva de calibración de absorbancia vs concentración (gráfica 15, página 70) en el rango entre 0,01 y 0,09 mM, alcanzando un adecuado coeficiente de correlación lineal ($r=0,9992$) y coeficiente de determinación ($r^2=0,9984$), lo que demuestra una buena linealidad del sistema y un alto grado de correlación entre los datos.

❖ Precisión: los coeficientes de variación presentan un valor menor al 2%, el cual está debajo del límite establecido para determinaciones espectrofotométricas⁴². Mediante el test Student⁴⁰ se calcularon los intervalos de confianza con un nivel

del 95% (tabla 20, página 70); cuyo resultado es aceptable dentro de esta técnica, comprobando así la precisión del método.

❖ Exactitud: Para determinar la exactitud del ensayo se procedió a estimar el porcentaje de error relativo de la curva de calibración (%Er), los valores calculados fueron óptimos y presentan valores inferiores al 7,5%, los datos se aprecian en la tabla 21, e indican la buena exactitud del método.

Tabla 21. Exactitud del método DPPH.

| C | A | C_e | %Er |
|----------|----------|----------------------|------------|
| 0,01 | 0,100 | 0,0102 | 2,00 |
| 0,02 | 0,198 | 0,0202 | 1,00 |
| 0,03 | 0,292 | 0,0299 | 0,30 |
| 0,04 | 0,361 | 0,0370 | 7,50 |
| 0,06 | 0,591 | 0,0607 | 1,16 |
| 0,07 | 0,679 | 0,0697 | 0,43 |
| 0,09 | 0,870 | 0,0893 | 0,78 |

Fuente: esta investigación.

C = Concentración aceptada como real (mM en DPPH^{*}); A = Absorbancia promedio; C_e = Concentración experimental (mM en DPPH^{*}); %Er = Porcentaje de error relativo de la curva de calibración.

4.4.2.3. Determinación de la eficiencia anti-radical. El DPPH^{*} reacciona con una sustancia antioxidante para formar la molécula estable DPPH₂. Esta reacción puede ser evaluada midiendo la absorbancia del medio de reacción a una longitud de onda de 515 nm (esquema 3, página 31).

Con el fin de relacionar los valores de absorbancia obtenidos y la capacidad anti-radical de las sustancias estudiadas, se determinaron los valores de EC₅₀, T_{EC50} y la eficiencia anti-radical. En la tabla 22, se muestra los datos necesarios para realizar los cálculos. El ácido ascórbico se utilizó como sustancia de referencia, para comprobar la funcionalidad del método.

Tabla 22. Concentración, % DPPH[•] remanente y tiempo en el estado estacionario de la sustancia de referencia, AEM y AESB.

| Sustancia | Absorbancia | Concentración | %DPPH[•] remanente | Tiempo |
|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------------------|---------------|
| Ácido ascórbico | 0,361 | 107,19 | 40 | 45 |
| | 0,145 | 142,89 | 16,1 | 70 |
| | 0,052 | 174,75 | 5,8 | 110 |
| AEM | 0,901 | 13811 | 99,7 | 195 |
| | 0,892 | 17964,7 | 98,7 | 215 |
| | 0,872 | 24922,1 | 96,5 | 240 |
| AESB | 0,939 | 20664,5 | 97,5 | 120 |
| | 0,964 | 25818,2 | 96,4 | 150 |
| | 0,949 | 32294,9 | 95,2 | 170 |

Fuente: esta investigación.

Concentración en g de antioxidante/kg DPPH[•]; Tiempo en segundos.

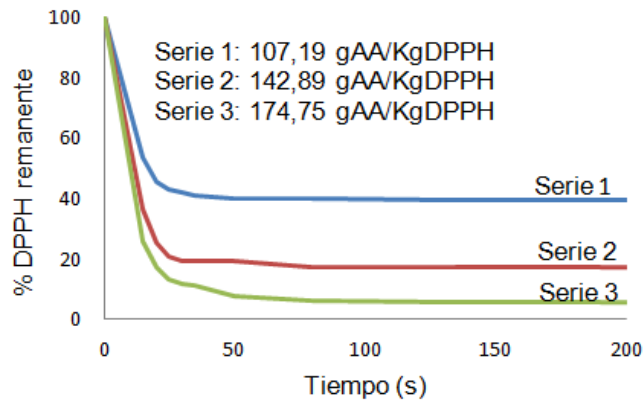
El % de DPPH[•] remanente se estableció mediante la ecuación 4 (página 32).

La concentración de DPPH[•] en el medio de reacción, fue determinada a partir de la ecuación de la curva de calibración (gráfica 15, página 70).

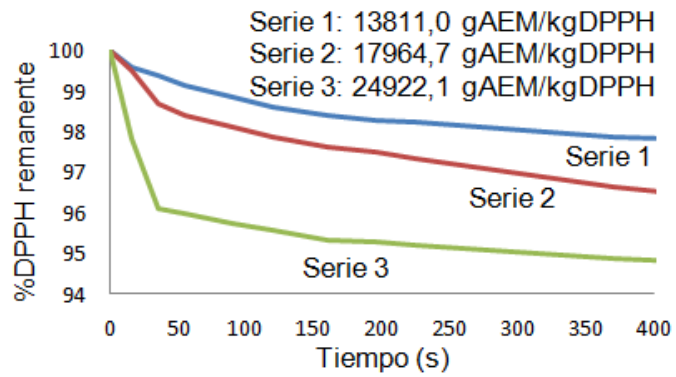
En la gráfica 16 (página 73), se muestra el comportamiento cinético del ácido ascórbico, AEM y AESB. Se observa que un aumento en la concentración de la sustancia utilizada como antioxidante, incrementa la velocidad de reacción, esto debido a que las colisiones efectivas entre los reactivos son directamente proporcionales a sus concentraciones. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de la reacción disminuye por la disminución de los sustratos, hasta llegar a un punto en donde el sistema se puede considerar en equilibrio, de estas gráficas se obtuvo el tiempo de estabilización de la reacción.

Gráfica 16. Comportamiento cinético de ácido ascórbico, AEM Y AESB.

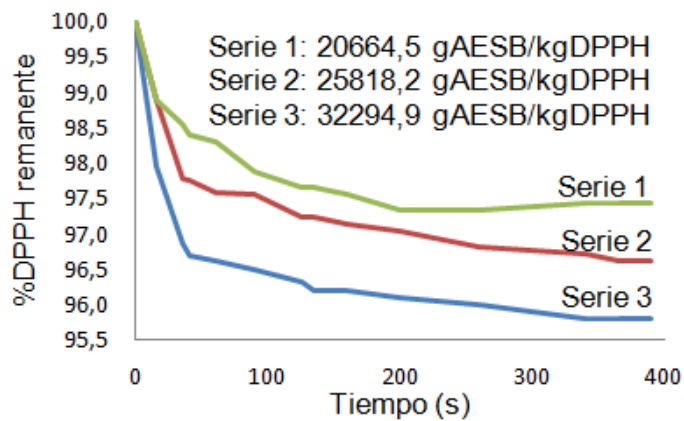
a). Ácido ascórbico (AA).



b). Aceite esencial Matico (AEM).



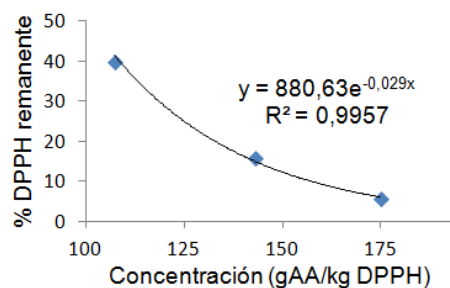
c). Aceite esencial Salvarrial Blanco (AESB).



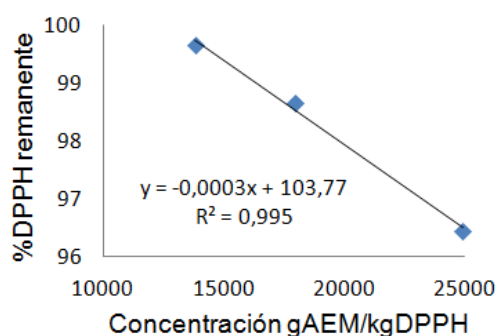
Fuente: esta investigación.

Gráfica 17. Disminución de la concentración del DPPH• en función de la cantidad de ácido ascórbico, AEM ó AESB.

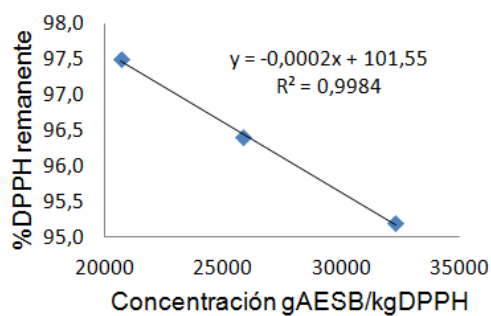
a). Ácido ascórbico (AA).



b). Aceite esencial Matico (AEM).



c). Aceite esencial Salvarrial Blanco (AESB).

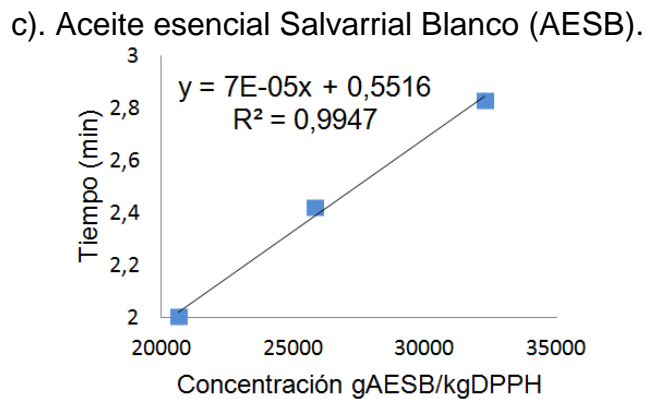
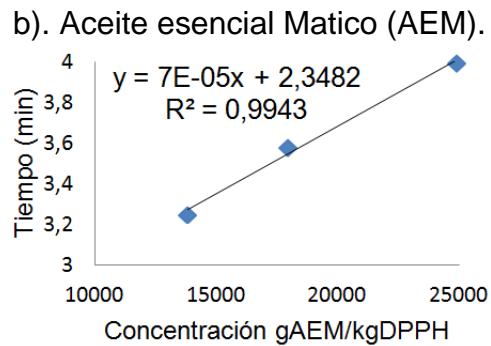
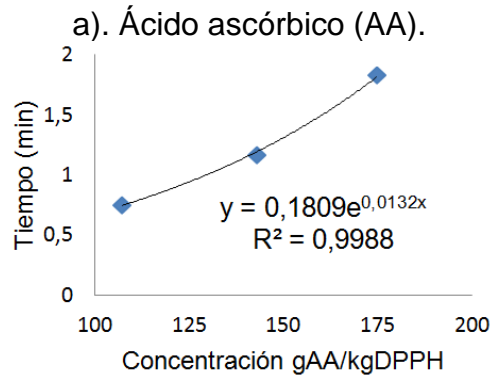


Fuente: esta investigación.

El parámetro EC_{50} se calculó graficando % DPPH• remanente Vs concentración de cada una de las sustancias empleadas como antioxidante (gráfica 17). El parámetro T_{EC50} se cálculo al graficar tiempo en el estado estacionario Vs

concentración de cada una de las sustancias empleadas como antioxidante (gráfica 18, página 75). Con el EC_{50} y el T_{EC50} es posible calcular la eficiencia anti-radical, los datos se registran en las tablas 23 y 24 (página 76).

Gráfica 18. Variación del tiempo en el estado de equilibrio en función de la cantidad de ácido ascórbico, AEM ó AESB.



Fuente: esta investigación.

Para el cálculo de EC_{50} y T_{EC50} , hay que tener en cuenta que en las gráficas 17 y 18: los datos del ácido ascórbico se comportan en forma exponencial (relación: $\ln y = bx + \ln a$) y que los datos para AEM y AESB se comportan en forma lineal (relación: $y = bx + a$).

Con esta relación y considerando la clasificación que indica la literatura³⁶, < 5 min (rápido), 5-30 min (intermedio), > 30 min (bajo), sobre la cinética de un compuesto antioxidante, se tiene que:

En el caso del ácido ascórbico y de acuerdo a la gráfica 17 (a) (página 74), la concentración de antioxidante que logra reducir a la mitad la concentración inicial del radical ($EC_{50}=98,92$ g antioxidante / kg de DPPH*) es un valor que concuerda con los reportados en la literatura. Considerando la clasificación sobre el comportamiento cinético de compuestos antioxidantes y teniendo en cuenta las gráficas 16 (a) (página 73) y 18 (a) (página 75), se puede establecer que el ácido ascórbico entra en el grupo de los antioxidantes rápidos ($T_{EC50}=0,668$ min).

Tabla 23. EC_{50} y su clasificación cinética.

| Sustancia | EC_{50} (g antioxidante / kg de DPPH) | | T_{EC50} (minutos) | | Cls |
|-----------------|--|------------------|-------------------------|------------|------------|
| | Exp | Rep | Exp | Rep | |
| Ácido ascórbico | 98,92 | 76±7* 120,6** | 0,668 | 1,15±0,08* | Rápido |
| AEM | 179233,33 | - | 14,89 | - | Intermedio |
| AESB | 257750,00 | - | 18,59 | - | Intermedio |

Fuente: esta investigación.

Cls = Clasificación según Sánchez; Exp = Valor experimental; Rep = valor reportado; *valor reportado por Sánchez³⁶; ** valor reportado por Brand-Williams³⁴.

Para AEM (gráfica 17 (b), página 74) y AESB (gráfica 17(c), página 74), el EC_{50} de cada sustancia es un valor superior en comparación con el ácido ascórbico y en cuanto a la clasificación cinética los dos AEs serían antioxidantes intermedios (gráficas 16 (b), página 73; 16 (c), página 73; 18 (b), página 75; 18 (c), página 75).

Teniendo en cuenta el parámetro eficiencia anti-radical ($1/EC_{50} * T_{EC50}$) los compuestos antioxidantes se clasifican³⁶ como: bajos ($EA \leq 1 \times 10^{-3}$); medios (EA entre $1E-3$ y $5E-3$); altos (EA entre $5E-3$ y $10E-3$) y muy altos ($EA > 10E-3$).

Para el caso del ácido ascórbico, éste presenta una eficiencia anti-radical muy alta (1,51E-2), en cuanto a la actividad anti-radical que presentó AEM (3,75E-7) y AESB (2,09E-7) fue baja. Esto significa, que se necesita una concentración alta de AE para disminuir a la mitad la concentración del radical DPPH[•]. En la tabla 24 se resumen los valores de eficiencia anti-radical encontrados y su clasificación según Sanchez³⁶.

Tabla 24. Eficiencia anti-radical.

| Sustancia | EA | | Cls |
|-----------------|---------|----------|----------|
| | Exp | Rep | |
| Ácido ascórbico | 1,51E-2 | 1,144E-2 | Muy alta |
| AEM | 3,75E-7 | - | Baja |
| AESB | 2,09E-7 | - | Baja |

EA = Eficiencia anti-radical; Cls = Clasificación según Sánchez³⁶; Exp = Valor experimental; Rep = Valor reportado por Sánchez³⁶.

Fuente: esta investigación.

La baja actividad del AE de *Lepechinia vulcanicola*, se pueden atribuir a la limitada capacidad que los compuestos presentes en el AE tienen para donar hidrógeno que reduzca el radical DPPH[•]. Posiblemente la capacidad anti-radical se deba a los siguientes compuestos: ledol, palustrol, linalol, thujopsan-2-alfa-ol, bulnesol. Este tipo de compuestos presentan características reductoras debido a la presencia del grupo hidroxilo en su estructura, el cual puede actuar como donador de hidrógeno. Por otro lado, el AEM presentó una cinética de reacción mayor a la de AESB, esto puede ser debido al efecto sinérgico de los componentes de cada aceite.

CONCLUSIONES

La extracción del AE de *Lepechinia vulcanicola* (Matico y Salvarrial Blanco) se realizó por medio de la técnica MWHD, bajo el siguiente tratamiento de extracción: 80% de la potencia total del horno microondas y un tiempo de extracción de 90 minutos.

El rendimiento de la extracción fue de 0,46% para AEM y de 0,58% para AESB.

El estado físico de cada AE fue dependiente de la región de cultivo, siendo AEM líquido, mientras que AESB fue sólido, lo cual puede ser atribuido a su diferente composición química.

En cuanto a la identificación de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de *Lepechinia vulcanicola*, se concluye que:

En el AEM se identificaron 13 compuestos, siendo limoneno el compuesto con mayor concentración 408 mg/kg material vegetal seco. La principal familia de compuestos fue la de los monoterpenos hidrocarburos con un 45,4% de abundancia.

En el AESB se identificaron 12 compuestos, siendo thujopsan-2-alfa-ol el compuesto con mayor concentración 802 mg/kg material vegetal seco. La principal familia de compuestos fue la de los sesquiterpenos oxigenados con un 48,5% de abundancia.

El delta-2-careno con una concentración de 76 mg/kg material vegetal seco, se encuentra dentro de los compuestos mayoritarios y tan solo fue identificado para AEM. El gama-curcumeno y el bulnesol con una concentración de 110 y 46 mg/kg material vegetal seco, respectivamente, se encuentran dentro de los compuestos mayoritarios y tan solo fueron identificados para AESB.

La actividad antioxidante del AE de *Lepechinia vulcanicola* (AEM con AAT=9,047 y EAR=3,75E-7, AESB con AAT=8,423 y EAR=2,09E-7), fue menor que la observada para el ácido ascórbico (AAT=5599,9 y EAR=1,51E-2).

El AE de *Lepechinia vulcanicola*, presenta buena actividad antioxidante en comparación con otros AEs. Se presume que los compuestos responsables de la actividad antioxidante, son aquellos que tengan la capacidad de formar un amplio número de estructuras resonantes, tales como: mirceno, limoneno, linalol, farneceno y curcumeno.

La diferencia en la AAT entre AEM y AESB, posiblemente se deba al efecto sinérgico que pudiesen ejercer los siguientes compuestos: delta-2-careno, gama-curcumeno y bulnesol.

RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones futuras en donde se incluya como variable la época de recolección del material vegetal, con el fin de determinar las diferencias en la composición del AE y su efecto sobre la capacidad antioxidante.

Realizar investigaciones sobre la actividad antioxidante del AE presente en los tallos de la especie vegetal *Lepechinia vulcanicola*.

Evaluar la actividad antioxidante mediante diferentes métodos de determinación, por ejemplo: análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP), determinación de la actividad antioxidante por tiocianato férrico (FTC), entre otros.

Evaluar la actividad antioxidante de diferentes extractos de la planta *Lepechinia vulcanicola*, por ejemplo: extractos etenolicos.

Investigar la actividad biológica del AE de *Lepechinia vulcanicola*. Esto es importante, debido a que el rendimiento en AE de la especie vegetal es alto (alrededor del 0,5%) y de presentar una actividad biológica importante, sería una buena perspectiva para la comercialización del AE, por ejemplo: se podría investigar el efecto que el AE tiene sobre la *salmonella* (una de las bacterias causantes del deterioro de los alimentos).

BIBLIOGRAFÍA

Adams, R. Identification of essential oil components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy. En: Ediciones allured publishing corporation. (2004).

Aguirre-Crespo, F.; Vergara-Galicia, J.; Villalobos-Molina, R.; López-Guerrero, J.; Navarrete-Vázquez, G.; Estrada-Soto, S., Ursolic acid mediates the vasorelaxant ctivity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. En: Life Sciences. Vol. 79: 1062–1068p. 2006.

Ávalos, A.; Pérez, E., Metabolismo secundario de plantas. EN: Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. Vol. 2: 119–145p. 2009.

Avila, J.; Muñoz, J.; Martínez, A.; Garcia, A.; Martínez, G.; Peñalosa, I., In vitro anti-*Vibrio cholerae* activity of essential oil from *Lepechinia caulescens*. En: Fitoterapia. Vol. 76: 104–107p. 2005.

Base de datos pherobase y NIST [Citado 03 de febrero de 2013] Disponible en internet: <http://www.pherobase.com>.

Base de datos chemical information, ChemIDplus Lite [Citado julio- 2013]. Disponible en internet: <http://sis.nlm.nih.gov/chemical.html>.

Base de datos pubchem [Citado julio-2013]. Disponible en internet: <http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M., Biological effects of essential oils – A review. En: Food and Chemical Toxicology. Vol. 46: 446–475 p. 2008.

Bektas, T.; Degerli, S.; Arslan, S.; Malatyali, E.; Sarikurkcu, C., Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. En: Fitoterapia. Vol. 82: 237–246p. 2011.

Benavides, A.; Hurtado, N.; Jimenez, J. Caracterización química del aceite esencial presente en las hojas de altamisa (*Ambrosia arborescens* miller) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y determinación de su capacidad antioxidante. Trabajo de grado, Químico. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. 2011. 94p.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C., Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. En: *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* Vol. 28: 25-30p. 1995.

Bruneton, J. Aceites esenciales. En: *Farmacognosia Factores de variabilidad de los aceites esenciales.* Acribia, S.A. Zaragoza: España. (2001); p. 488-491.
Castillo, B.; Gonzáles, R., Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. En: *Revista Cubana Farm.* Vol. 30: 4-6p. 1997.

Castillo, P., Estudio químico y de actividad antioxidante en *Lepechinia meyenii* (Walp.). Tesis, M.Sc. Química. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú. 2004. 109p.

Celis, C.; Stashenko, E., Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyllanthus dulcis*, especies de la familia *Verbenaceae*. Trabajo de grado, Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. 2007. 136p.

Consultor en plantas aromáticas medicinales, Dr. José Vitelio Pineda. naturamediceuropa@gmail.com.

Devi, R.; Arumugan, C., Antiradical efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran. . En: *Food and Chemical Toxicology.* Vol 45: 2014–2021p. 2007.

Díaz, O.; Stashenko, E.; Martínez, J., Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Her) Britton, cultivada en tres regiones de Colombia. Trabajo de grado, Químico. Bucaramanga: Universidad industrial de Santander. Escuela de

Química. Laboratorio de Cromatografía, CENIVAM. 2007. 149p.

Encarnación-Dimayuga, R.; Almada, G.; Virgen, M., Minimum antimicrobial inhibitory concentration of carnosol and of the ethanol extract from *Lepichinia hastata* (Lamiaceae). En: *Phytomedicine*, Vol. 5(4): 301–305p. 1998.

Fernández, J.; Rivera-Díaz, O., Las labiadas (familia Labiatae). En: Instituto de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. 680p.

Gulcin, I.; Huyut, Z.; Elmastas, M.; Aboul-Enein, H., Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. En: *Arabian Journal of Chemistry*. Vol 3: 43–53p. 2010.

Herbociencia [Citado julio-2013] Disponible en internet: <http://www.herbotecnia.com.ar/c-biblio015-02.html>

Hilgert, N., Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. En: *Journal of Ethno pharmacology*. Vol. 76: 11–34p. 2001.

Hoja técnica de seguridad [Citado julio-2013] Disponible en internet: <http://www.mpbio.com/docs/msds/ansi/es/198790-ES-ANSI.pdf>.

Huber, L., Buenas Prácticas De Laboratorio Y Buenas Prácticas De Fabricación Actuales. En: Hewlett-Packard Company, Miami, 1994. p. 160.

Javad, S.; Abdolrasoul, H.; Zahra, D.; Hossein, B., GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. EN: *Food Chemistry*. Vol. 115: 1524–1528p. 2009.

Jimenez, J.; Villarreal, J.; Hurtado, N.; Cruz, S., Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del Motilon (*Hyeronima macrocarpa*). Trabajo de grado, Químico. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. 2008. 104p.

Jocteur, G., Les Huiles Essentielles à l'approche de l'hiver: Une alternative naturelle pour booster votre conseil. Francia, Conférence du Vendredi 9 de Novembre 2007.

Kizil, S., Determination of essential oil variations of *Thymbra spicata var. spicata L* naturally growing in the wild flora of East Mediterranean and Southeastern Anatolia regions of Turkey. En: Industrial Crops and Products. Vol. 32: 593–600p. 2010.

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.

Kuskoski, M.; Asuero, A.; Troncoso, A., Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpa de frutos. En: Ciencia Tecnología Alimentos, Campinas. Vol. 25 (4): 726-732p. 2005.

Legarda, L.; Lagos, T., Diseño de experimentos agropecuarios. En: San Juan de Pasto: Unigraf 2001.

Mejía, C.; Hurtado, N., Extracción, fraccionamiento y valoración de la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de pulpa de *Carica candamarcensis*. Trabajo de grado, Químico. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. 2012. 118p.

Miller, J.C.; Miller, J.N., Estadística para química analítica. En: Addison-Wesley Iberoamericana. 2a ed. 1993. pág. 23 8

Monsalve, L.; Stashenko, E., Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas de *lippia alba* (mill) n.e brown, provenientes de diferentes regiones de Colombia. Trabajo de grado, Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. 2007. 141p.

Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. En: Lebensm.-Wiss. u.-Technol. Vol. 28: 213-219p. 2003.

Msaada, K.; Taarit, M.; Hosni, K.; Hammami, M.; Marzouk, B., Regional and maturational effects on essential oils yields and composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits. En: Scientia Horticulturae. Vol. 122: 116–124p. 2009.

Palá, J.; Pérez, J.; Velasco, A., Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “*eryngium*” I, en la península ibérica. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2002.

Parejo, I.; Caprai, E.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Jáuregui, O.; Codina, C., Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. En: Journal of Ethno pharmacology. Vol. 94: 175–184p. 2004.

Perez-Hernandez, N.; Ponce-Monter, H.; Medina, J.; Joseph-Nathan, P., Spasmolytic effect of constituents from *Lepechinia caulescens* on rat uterus. En: Journal of Ethno pharmacology. Vol. 115: 30–35p. 2008.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: Free Radical Biology & medicine. Vol. 26: 1231-1237p. 1999.

Rendón, J.; Orozco, J.; Montoya, C., Estandarización y verificación de la determinación de colesterol en leche y sus derivados por cromatografía de gases-fid. Trabajo de grado, Químico. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Programa de Química Industrial. 2010. 145p.

Rojas, L.; Usubillaga, A.; Cegarra, J.; Borregales, E.; Carrero, S., Composición Química y Actividad Antimicótica del Aceite Esencial de la *Lepechinia schiedeana* (Schlecht)Vatke. En: Revista de la facultad de farmacia. Vol. 46 (1): 27-30p. 2004.

Rojas, R.; Bustamante, B.; Bauer, J.; Fernández, I.; Albán, J.; Lock, O., Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. En: Journal of Ethno pharmacology. Vol. 88: 199–204p. 2003.

Rosero, A.; Benavides, O.; Arturo, D., Caracterización de los componentes mayoritarios del aceite esencial de hojas y tallo de la planta salvielugo del

galeras (*Lepechinia vulcanicola*), Por medio de CG/EM. Trabajo de grado, Químico. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. 2013. 141p.

San Juan de Pasto [En línea] Colombia [Citado 03 de febrero de 2012] Disponible en internet: <http://www.pasto.gov.co>.

Sanchez, C.; Larrauri, J.; Saura-Calixto, F., A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. En: J Sci Food Agric. Vol. 76: 270-276p. 1998.

Torres, J.; Benavides, O., Caracterización de los compuestos mayoritarios del aceite esencial del fruto de mortiño (*vaccinium floribundum H.B.K.*) en sus diferentes estados de maduración. Trabajo de grado, Químico. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. 2010. 118p.

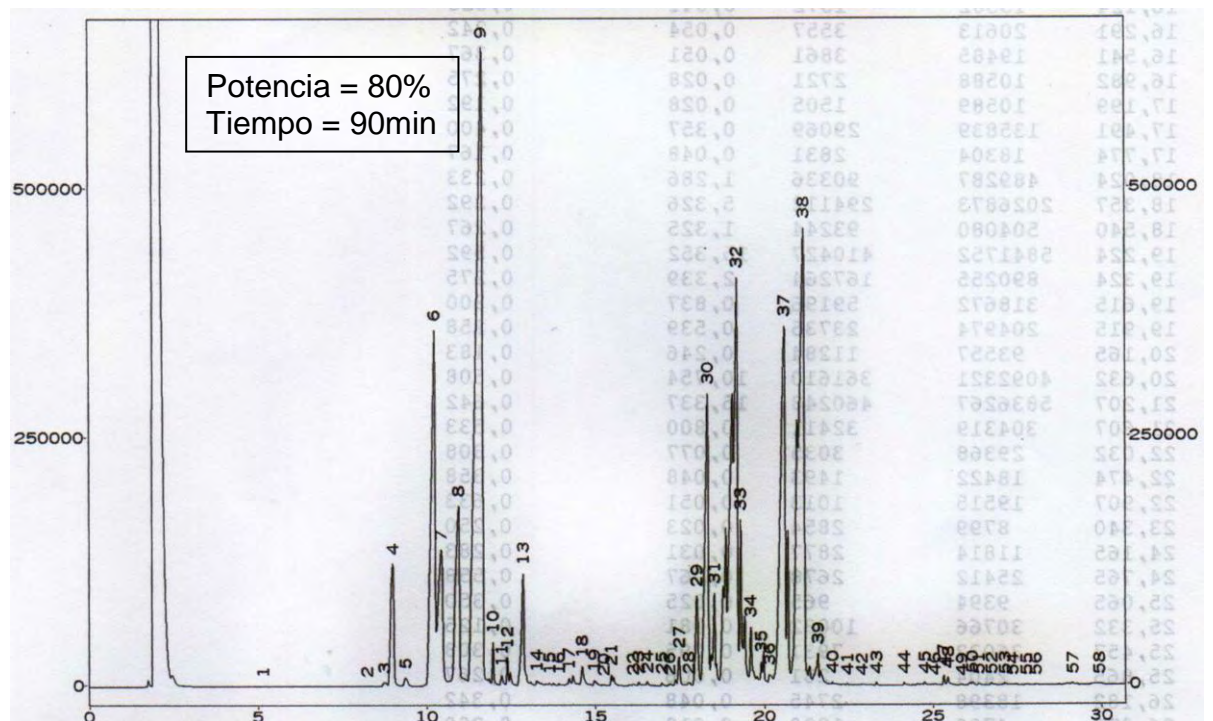
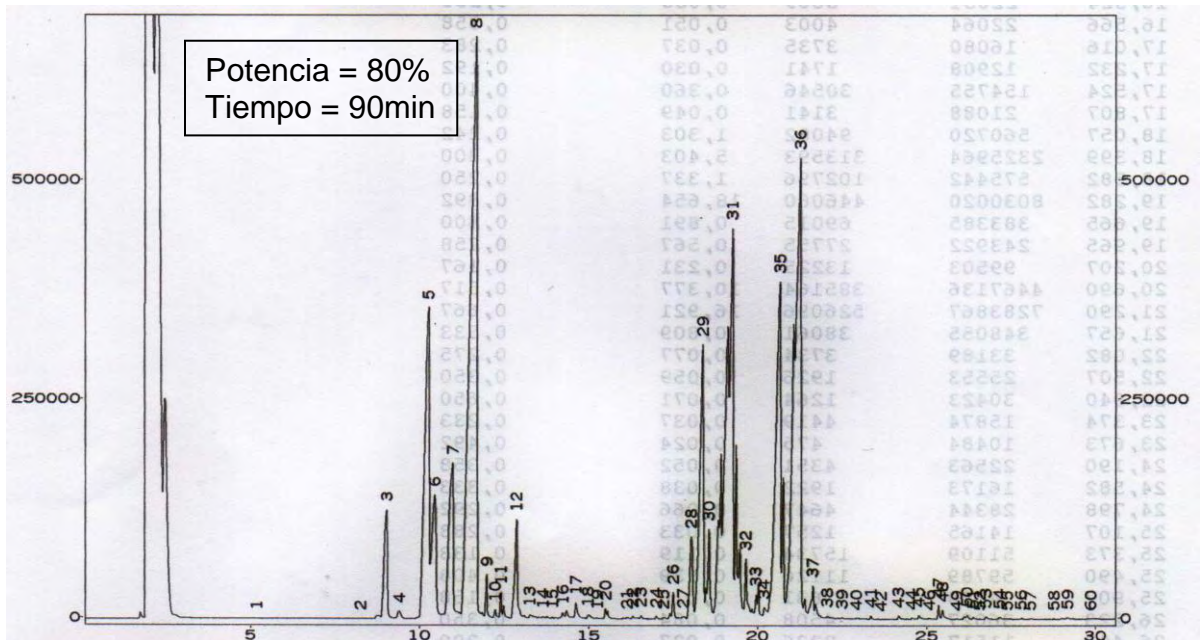
Williams, DH. & I, Fleming. Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. En: McGraw-Hill. Ed. Publishing Co. Londres, (1966); p. 288-291.

Yacuanquer [En línea] Colombia [Citado 03 de febrero de 2012] Disponible en internet: <http://yacuanquer-narino.gov.co>.

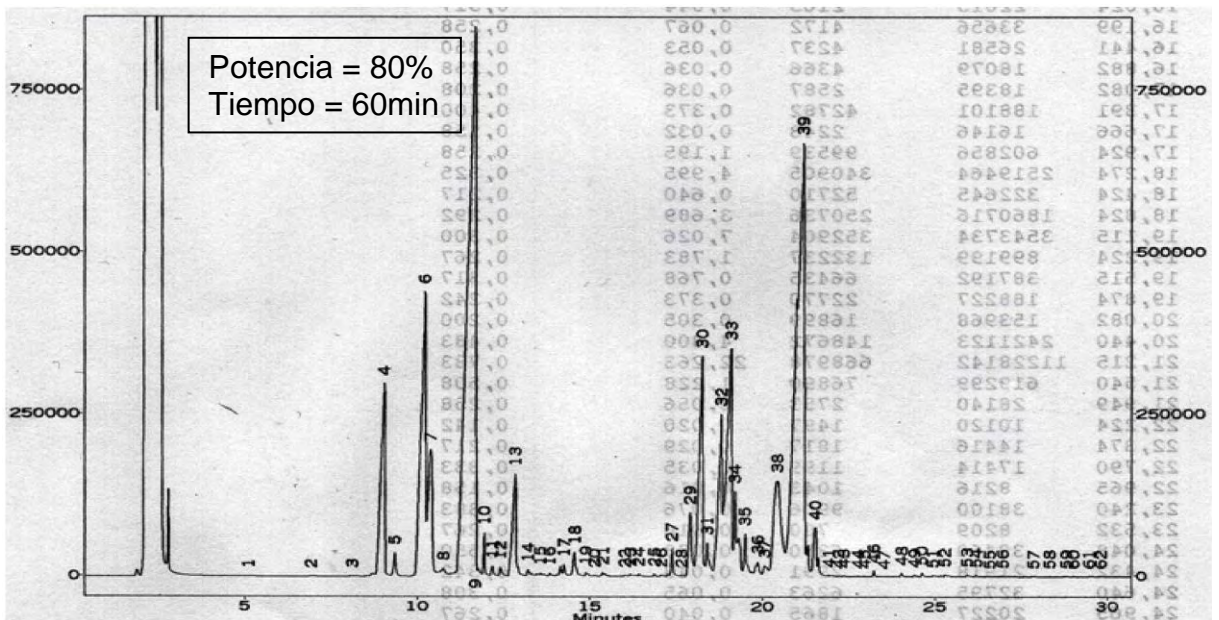
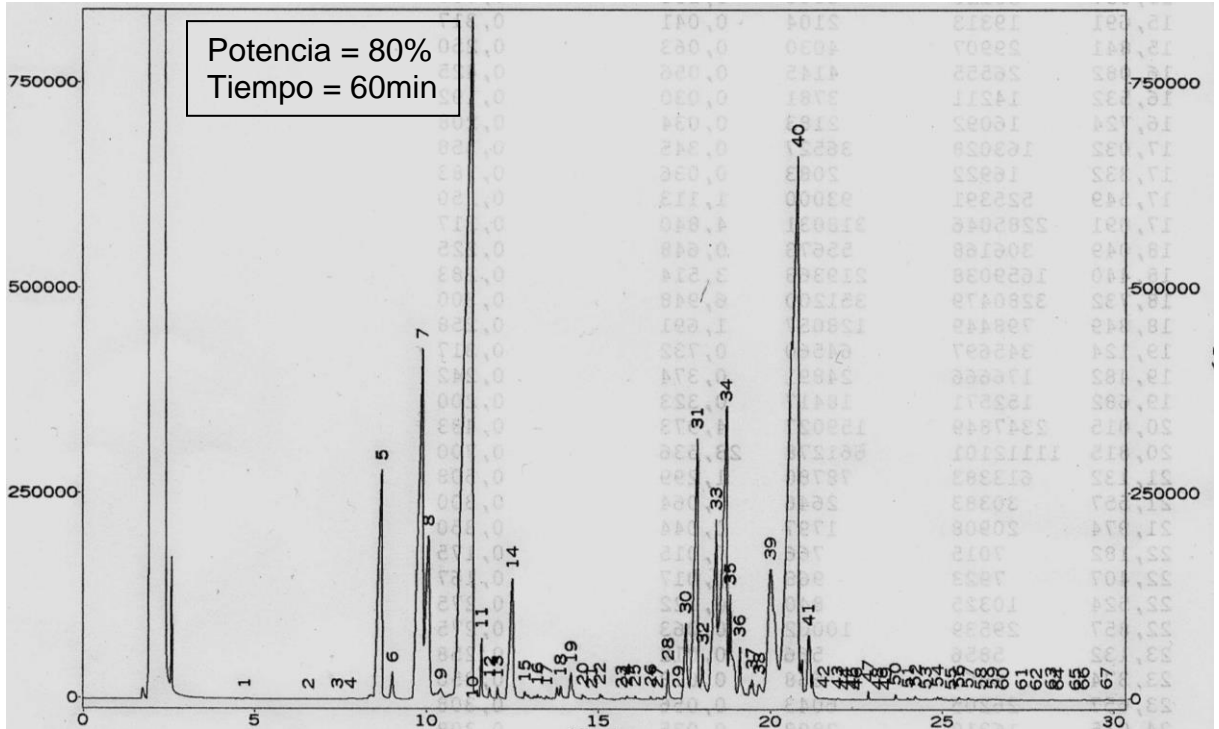
Zulueta, A.; Esteve, M.; Frígola, A., Orac and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. En: Food Chemistry. Vol. 114: 310-316p. 2009.

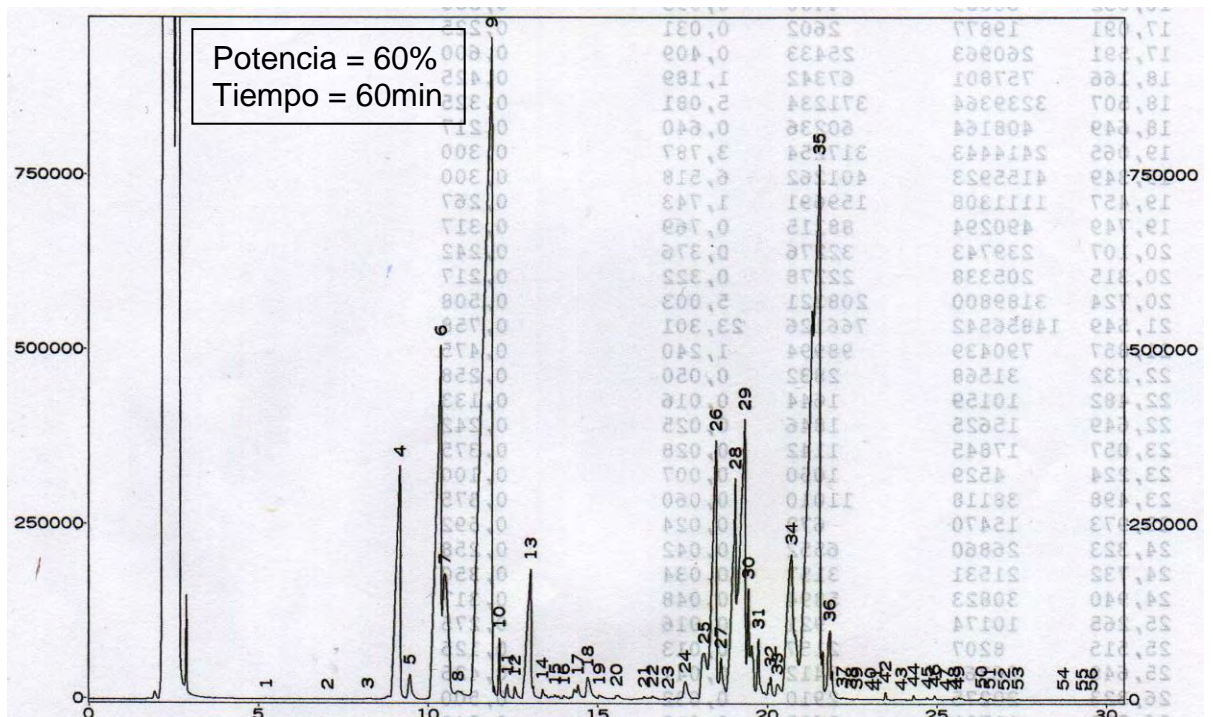
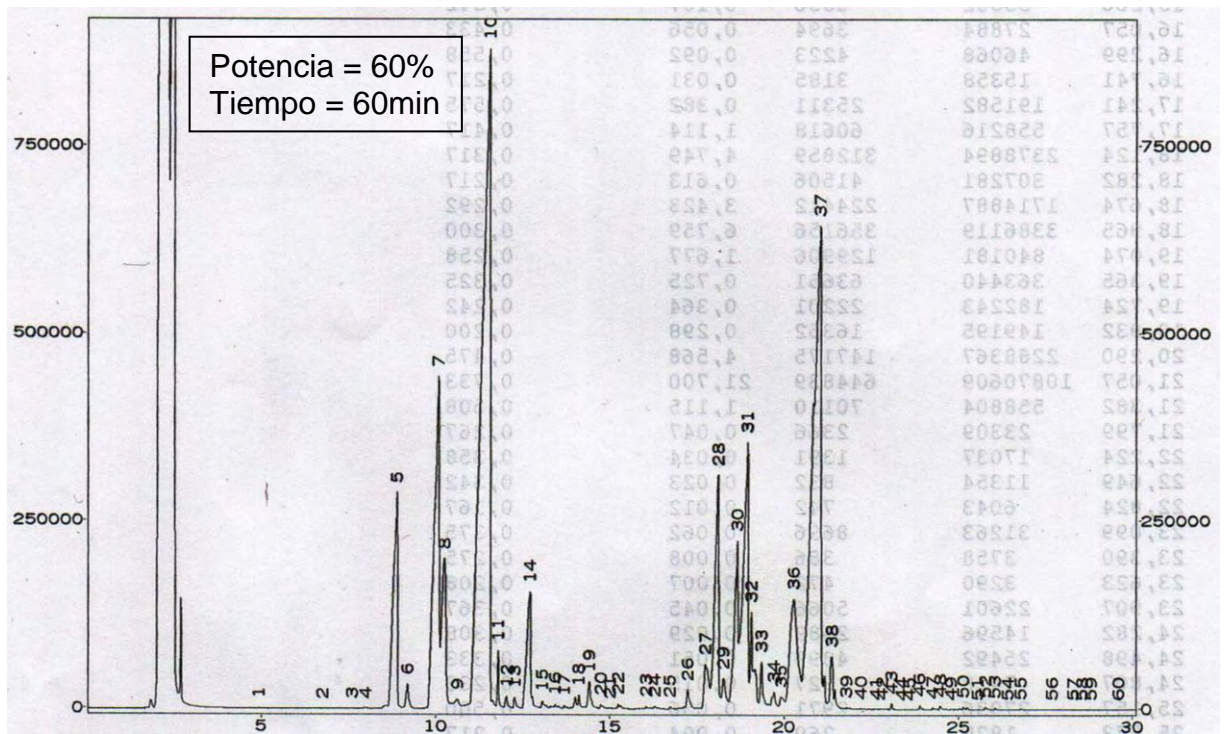
ANEXOS

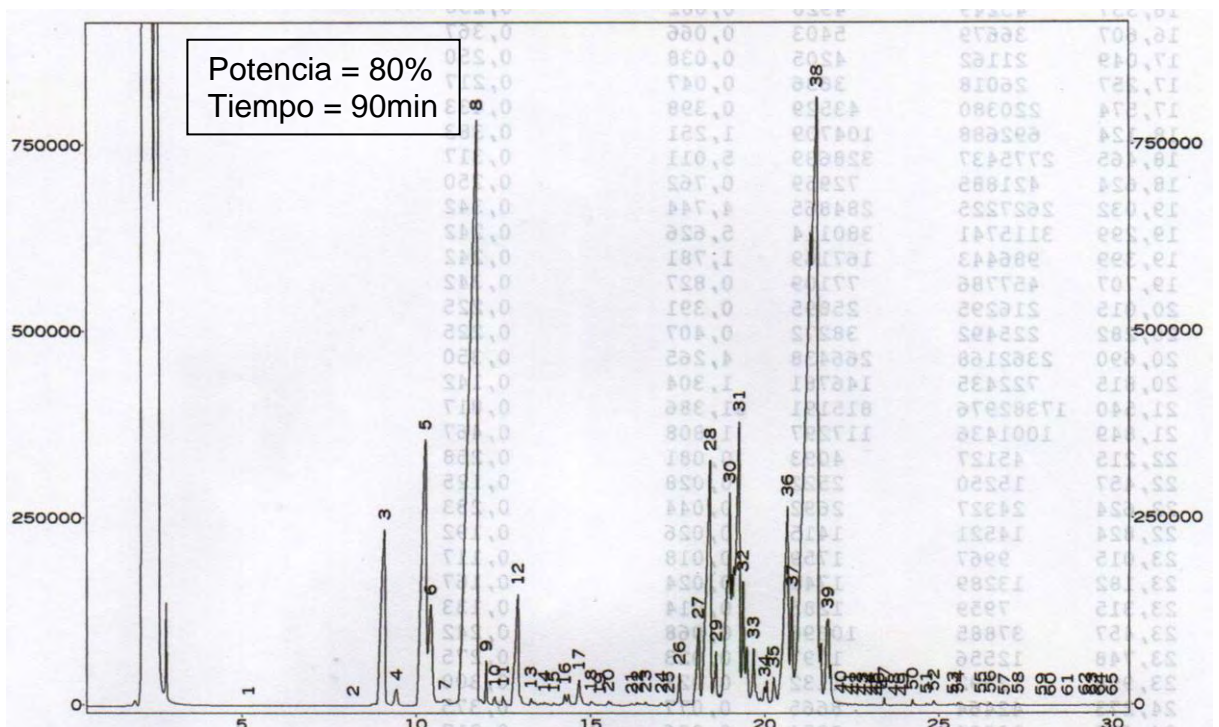
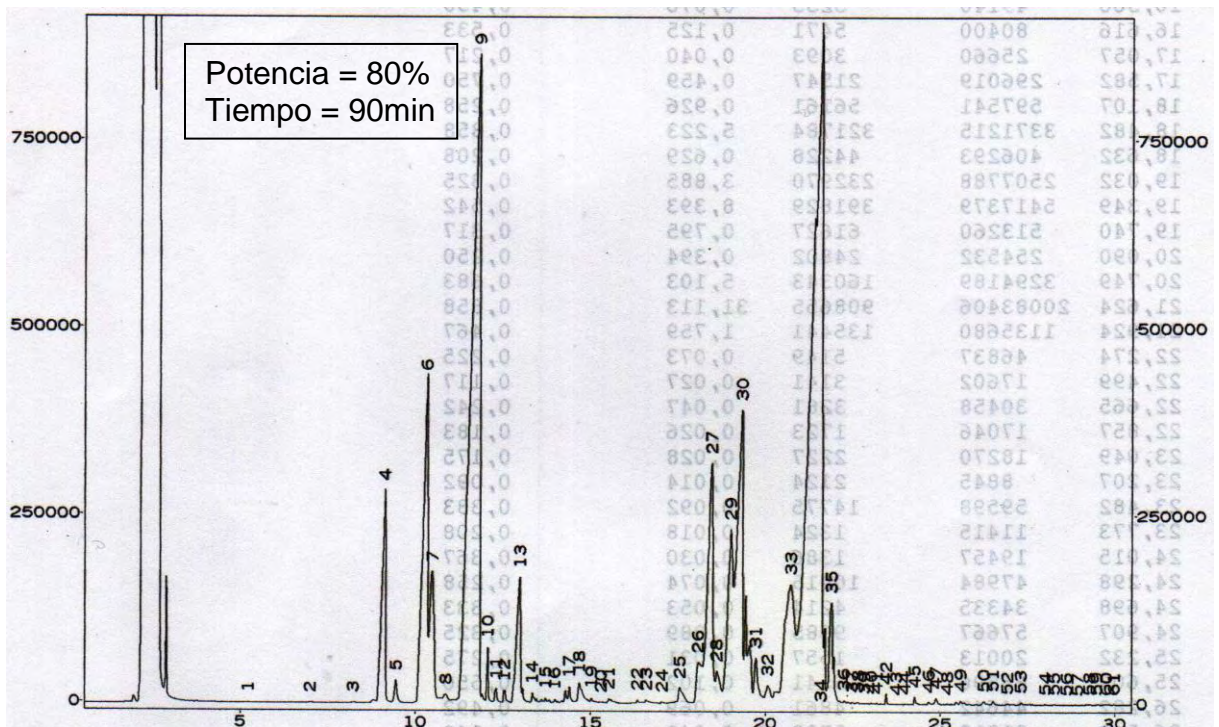
Anexo A. Perfiles cromatográficos de *Lepechinia vulcanicola*, Matico. Zona de cultivo: Gualmatán.

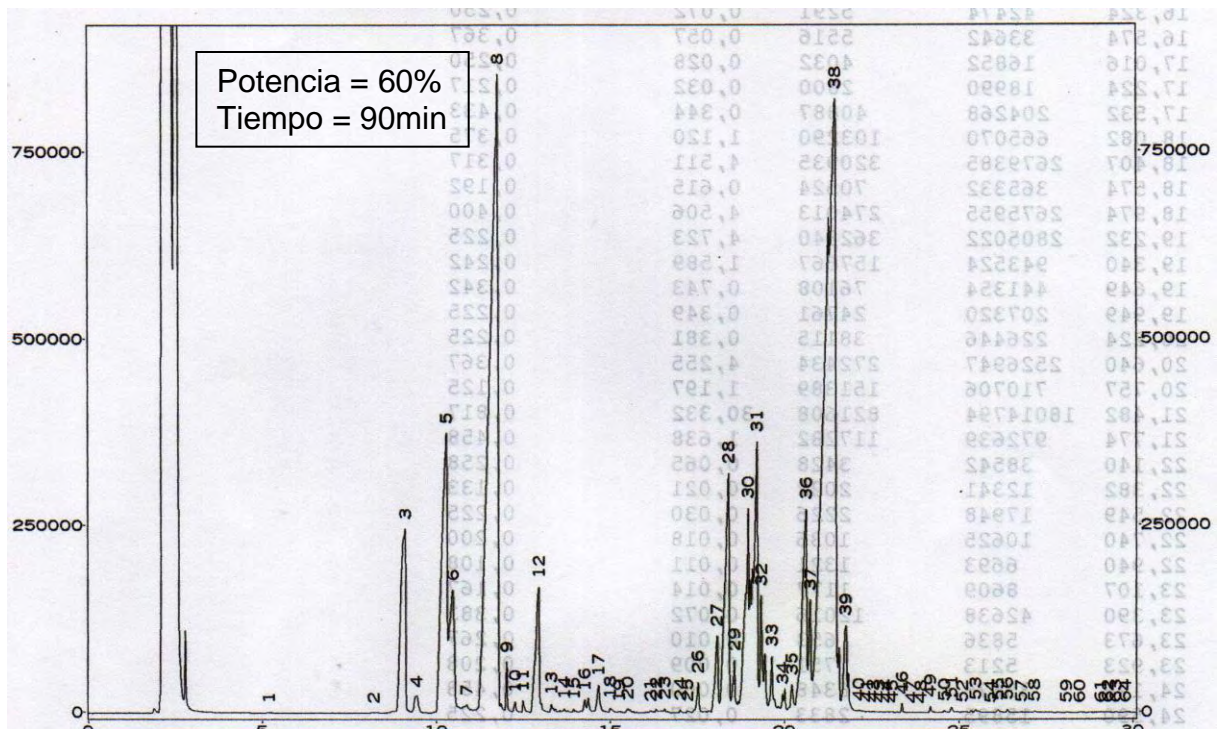
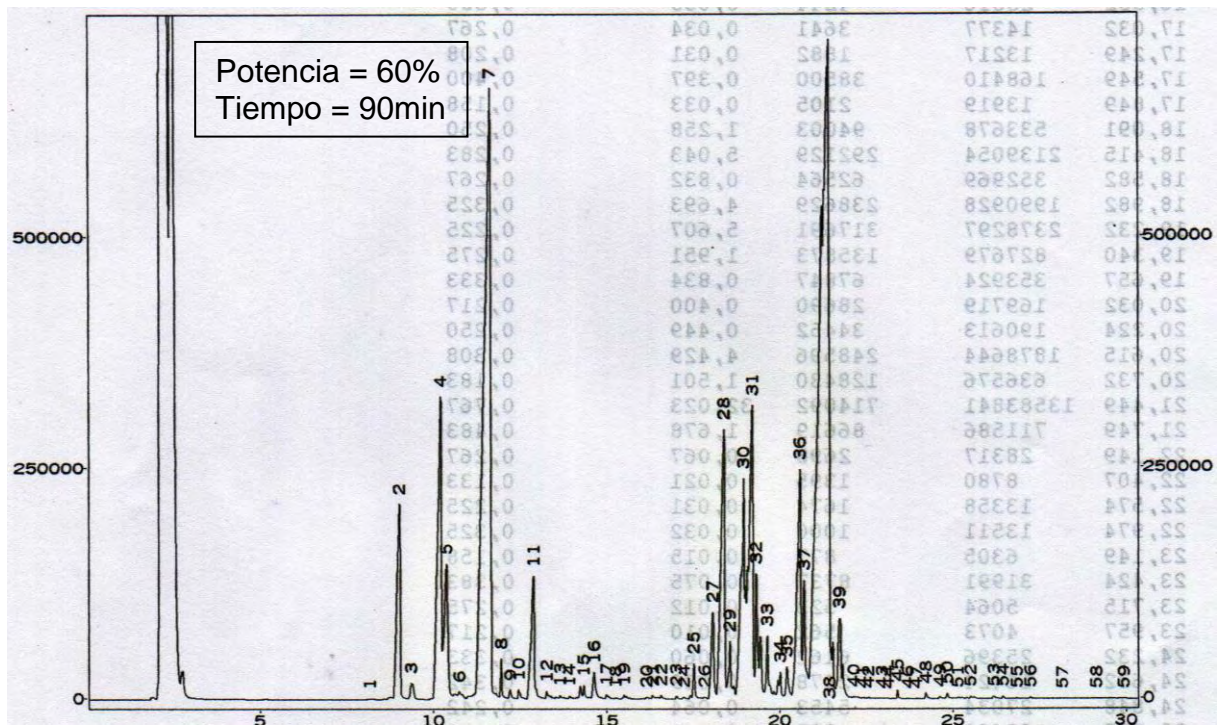


Anexo B. Perfiles cromatográficos de *Lepechinia vulcanicola*, Salvarrial Blanco. Zona de cultivo: Yacuanquer.

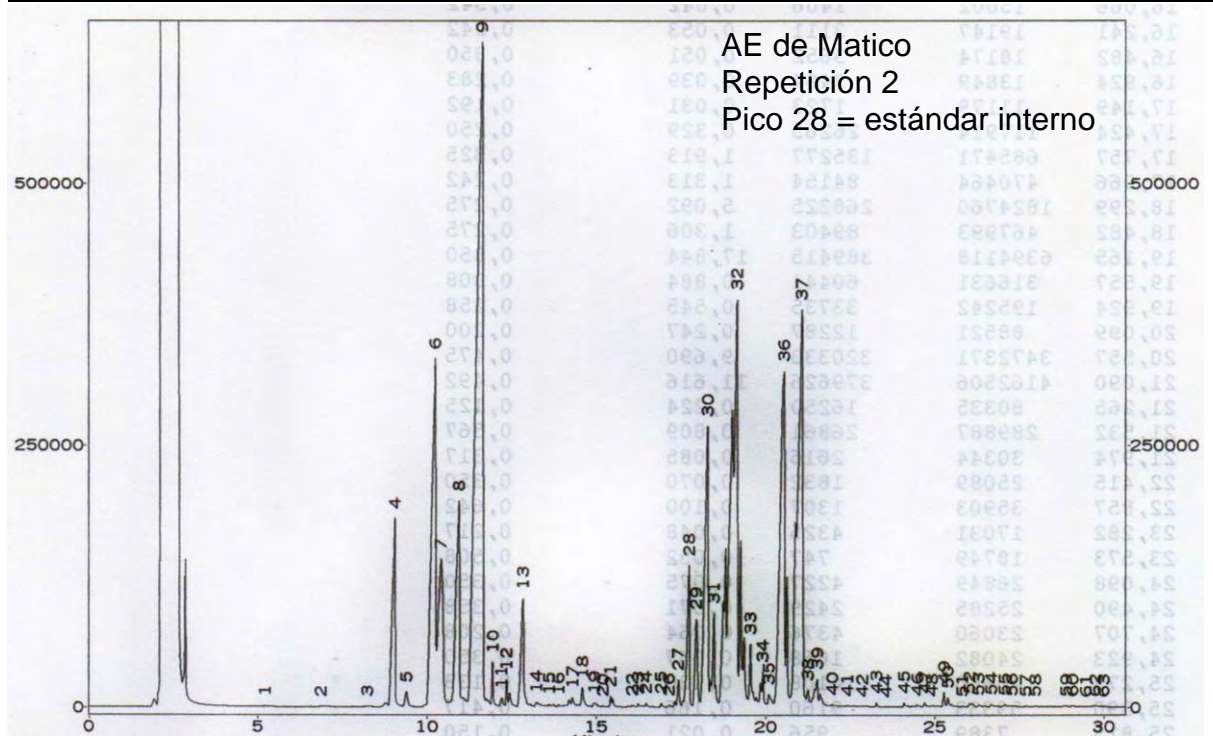
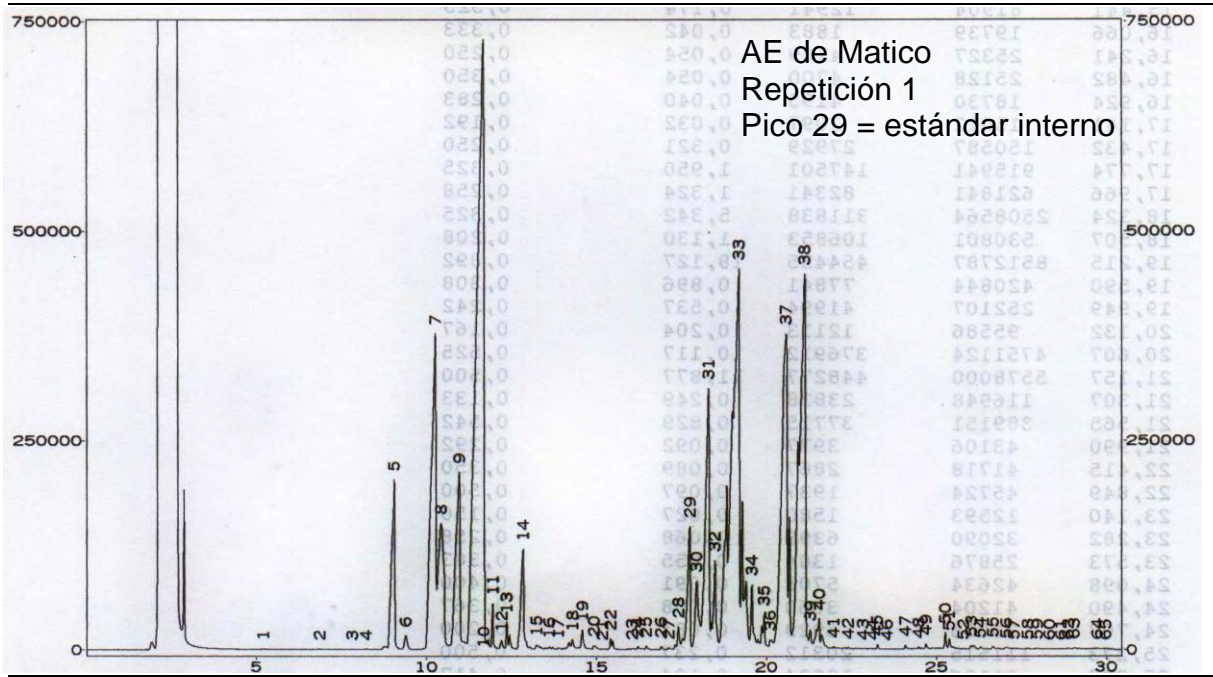


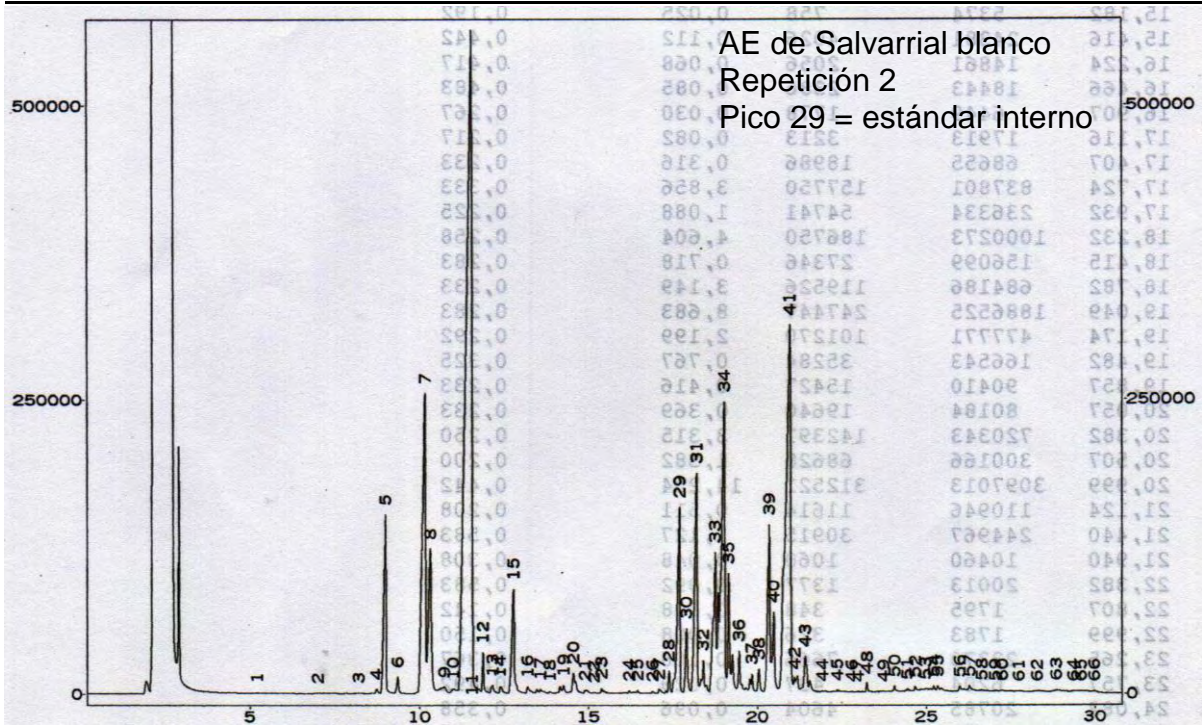
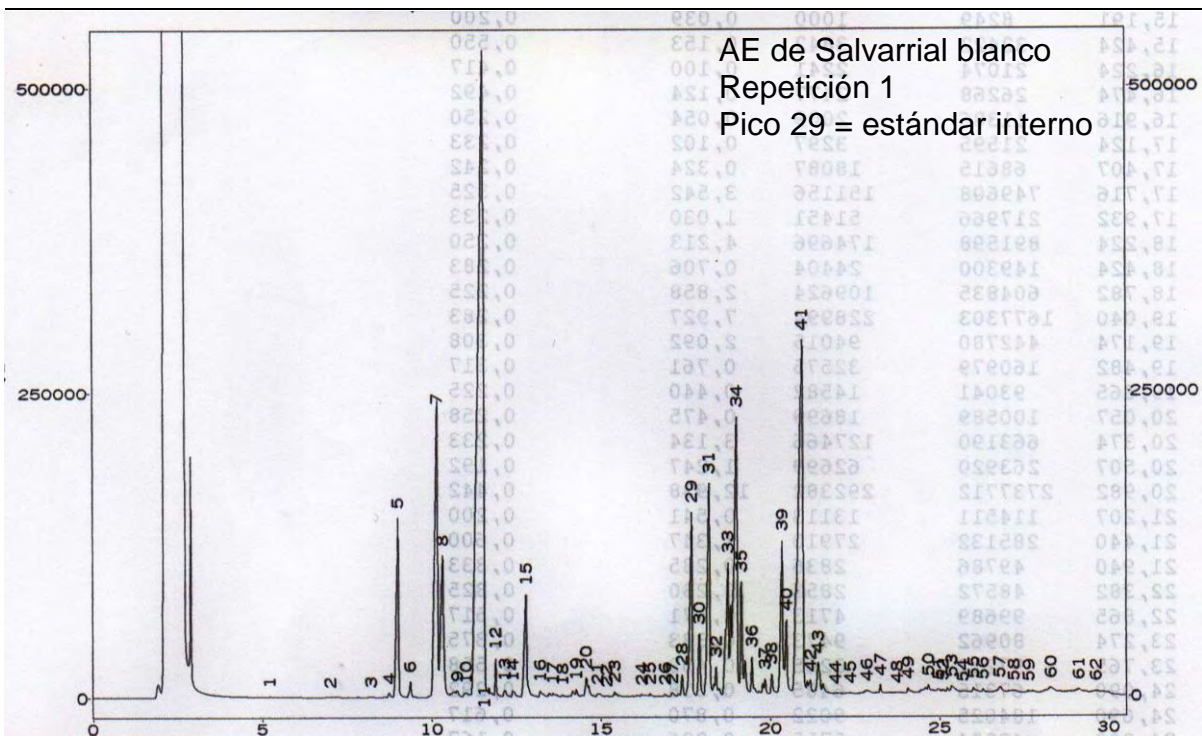


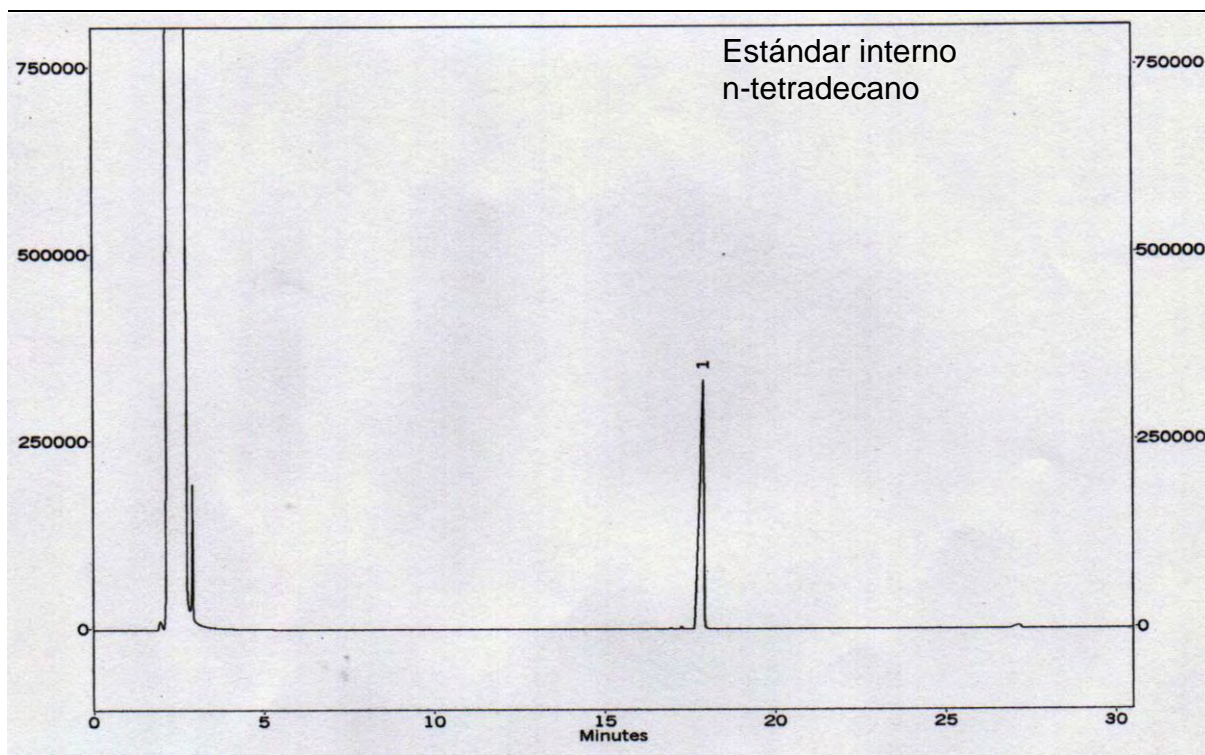




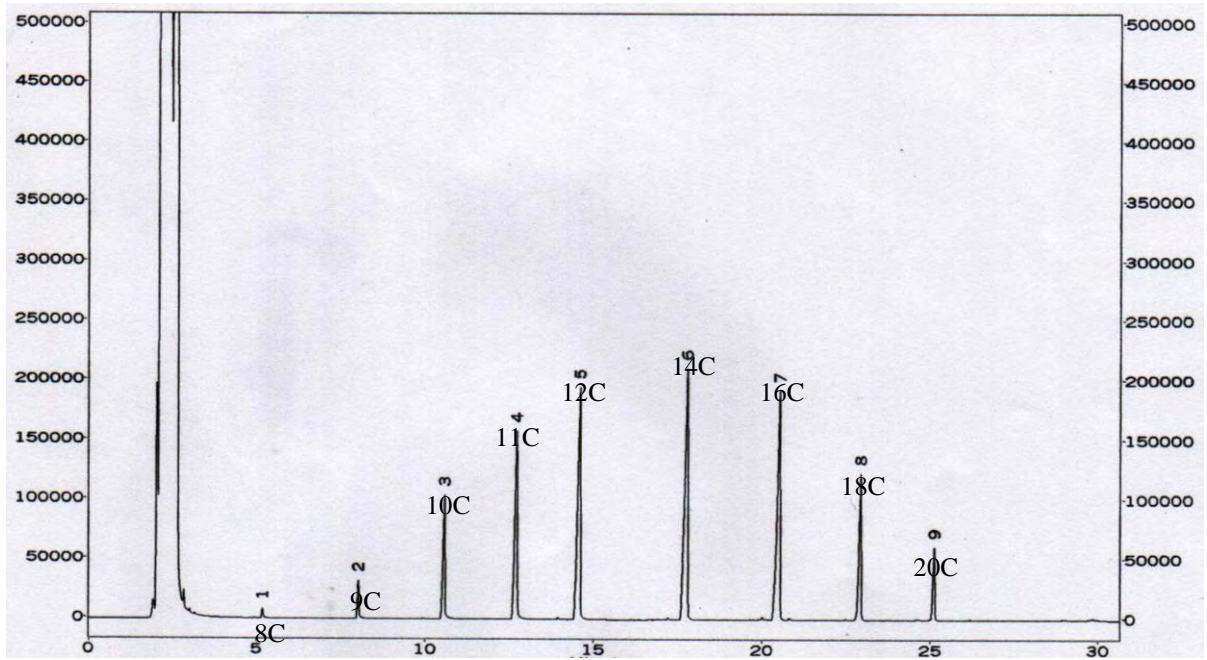
Anexo C. Perfiles cromatográficos con estándar interno.



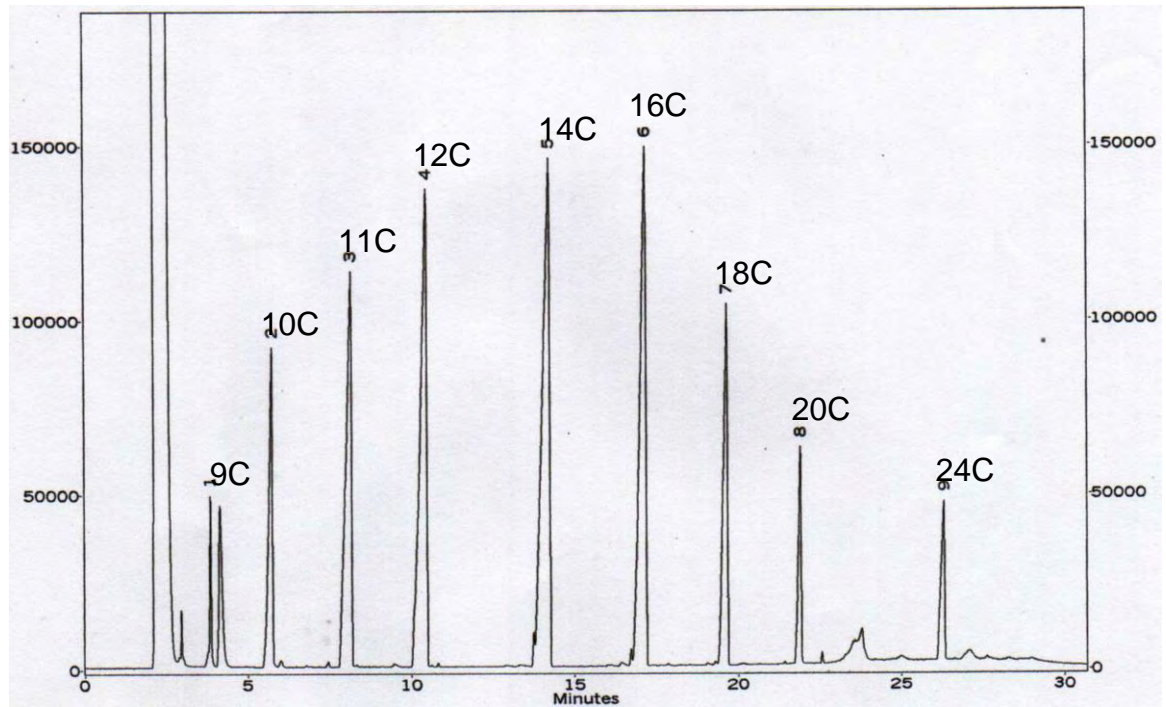




Anexo D. Perfiles cromatográficos de parafinas columna DB-5 y columna DB-wax.

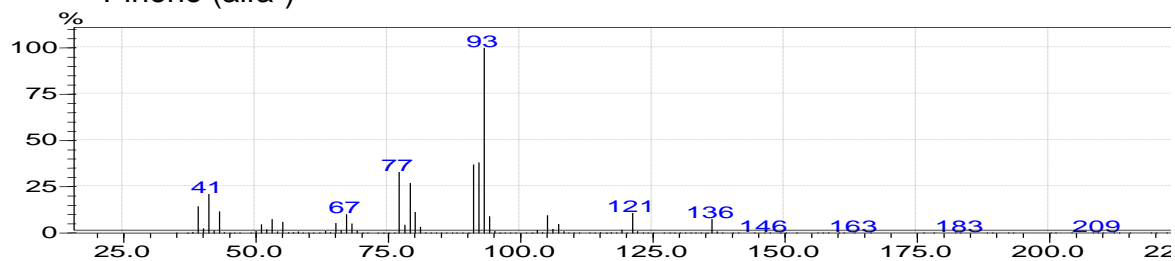


b. DB-WAX.

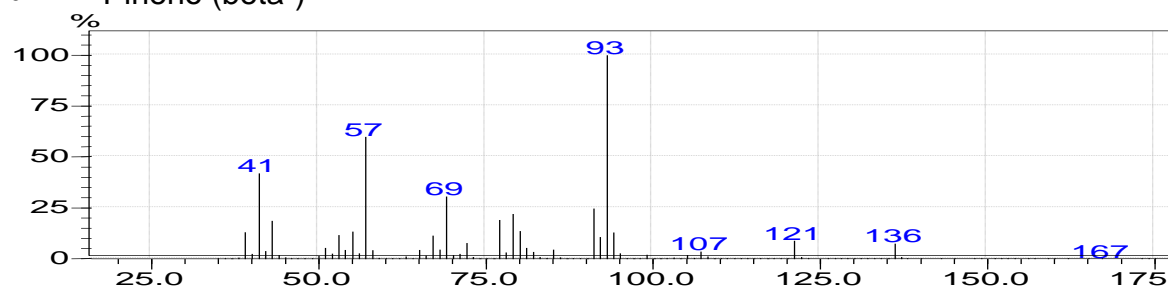


Anexo E. Espectros de masas experimentales de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de Matico.

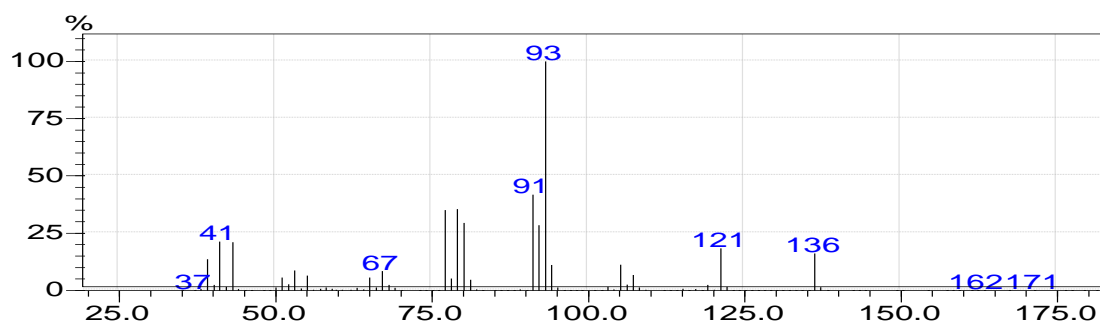
- Pineno (alfa-)



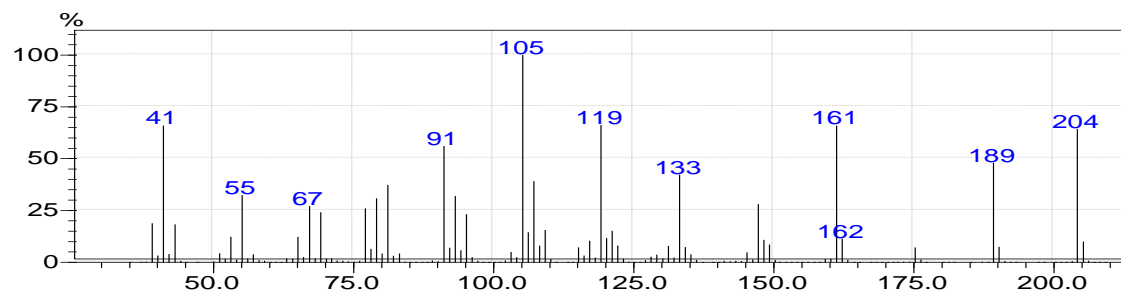
- Pineno (beta-)



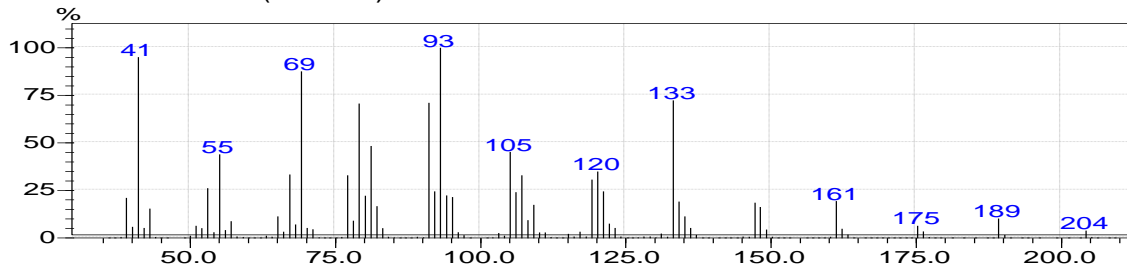
- Careno (delta-2-)



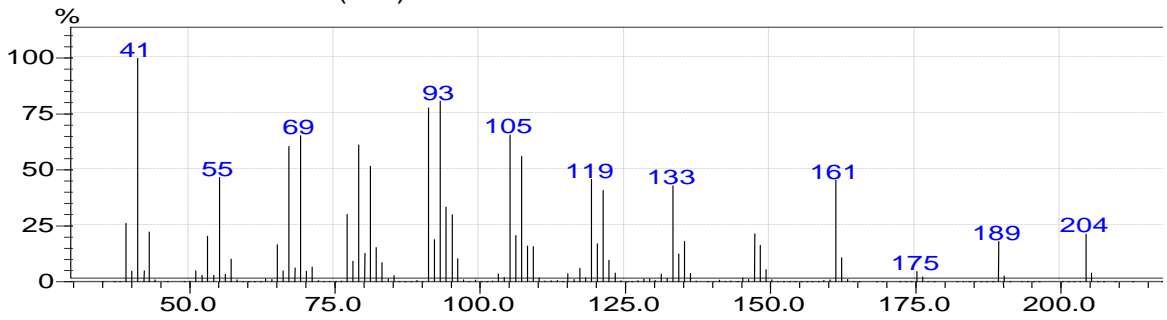
- Aromadendreno



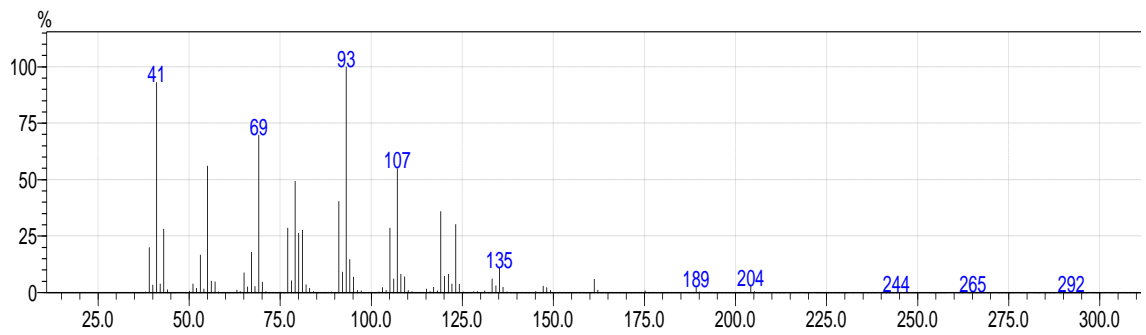
- Farneseno (E-beta-)



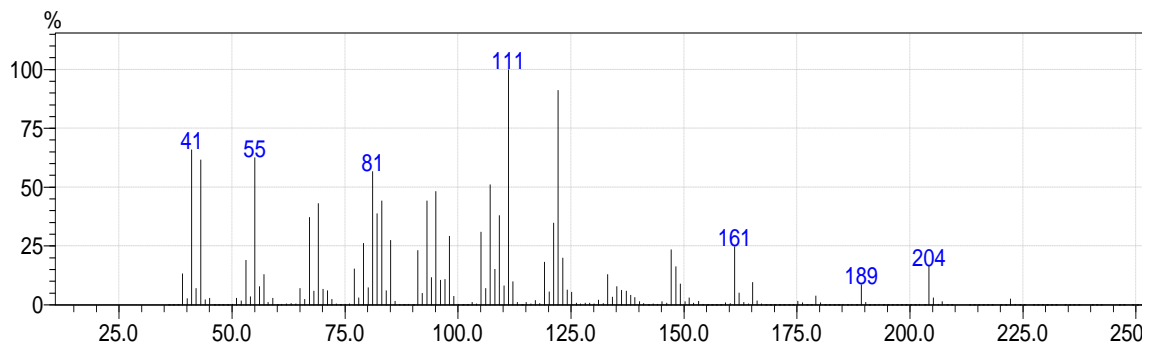
- Aromadendreno (allo)



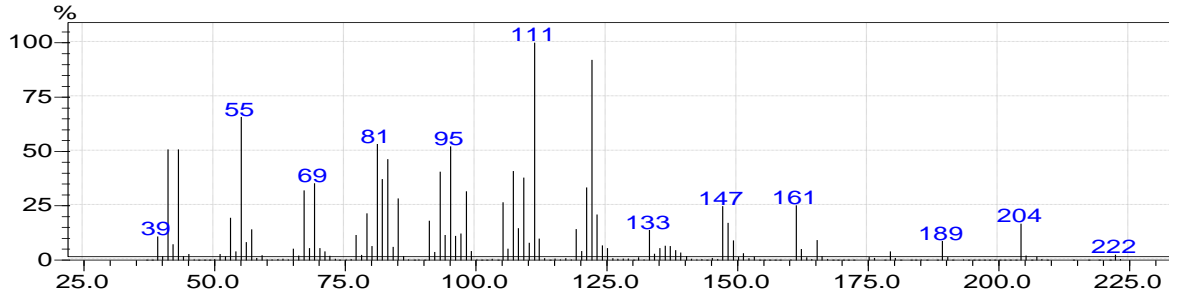
- Prenil limoneno (trans)



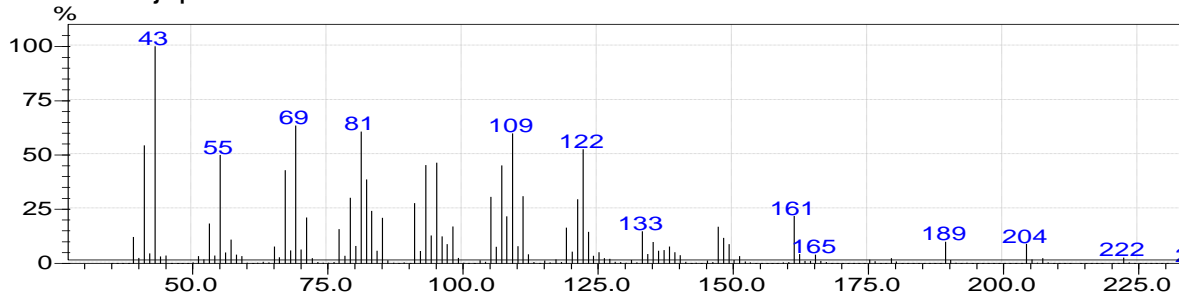
- Palustrol



• Ledol

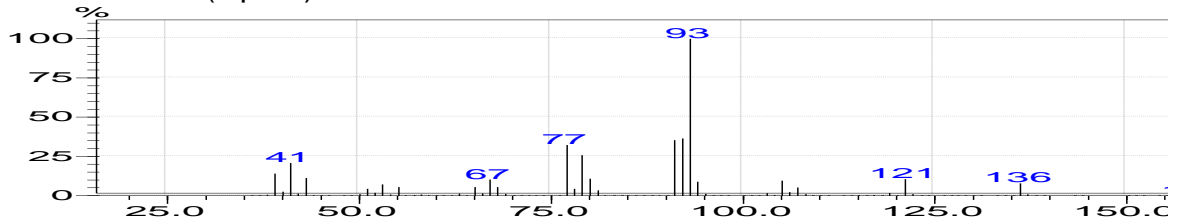


• Thujopsan-2-alfa-ol

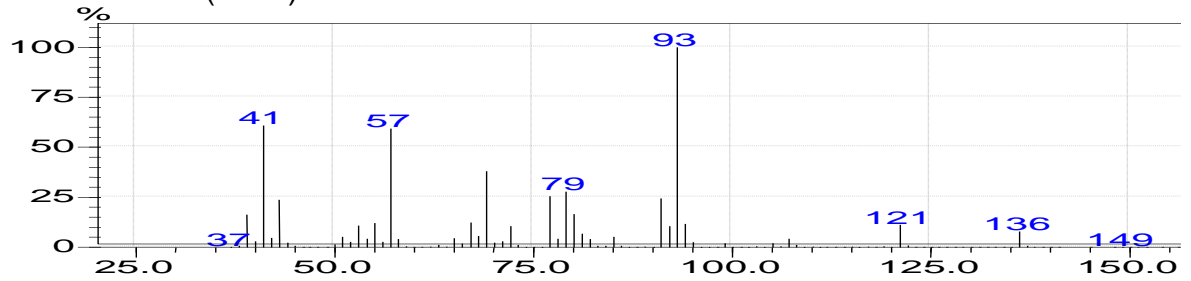


Anexo F. Espectros de masas experimentales de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de Salvarrial Blanco.

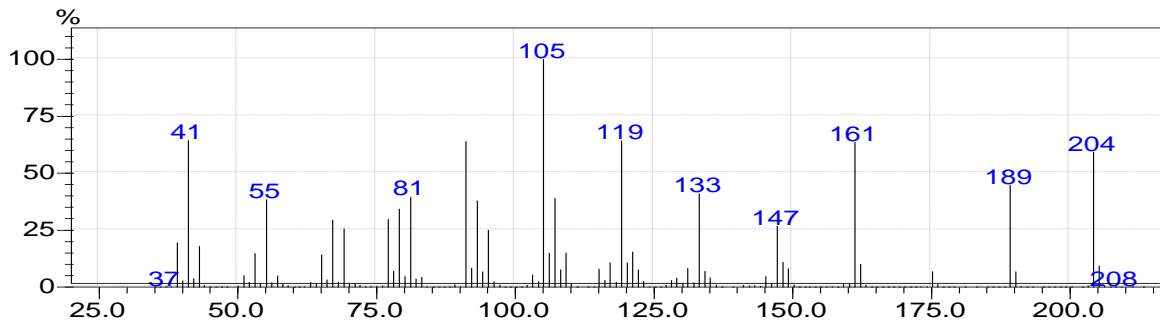
• **Pineno (alpha-)**



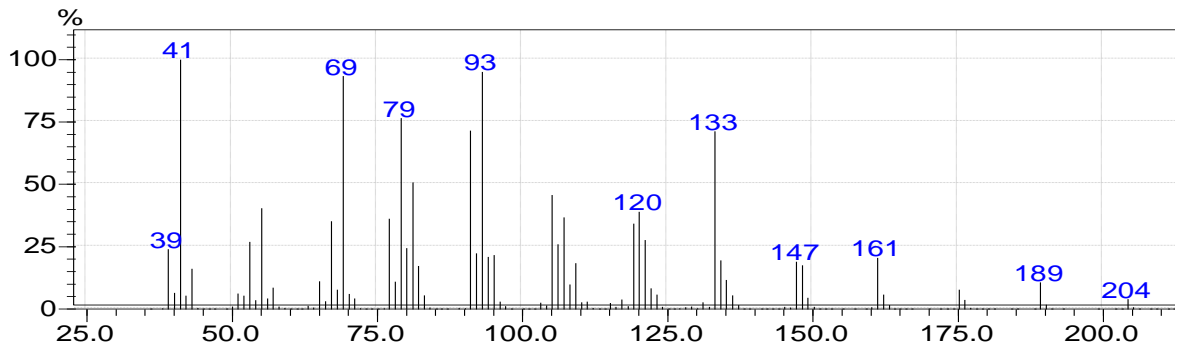
• **Pineno (beta-)**



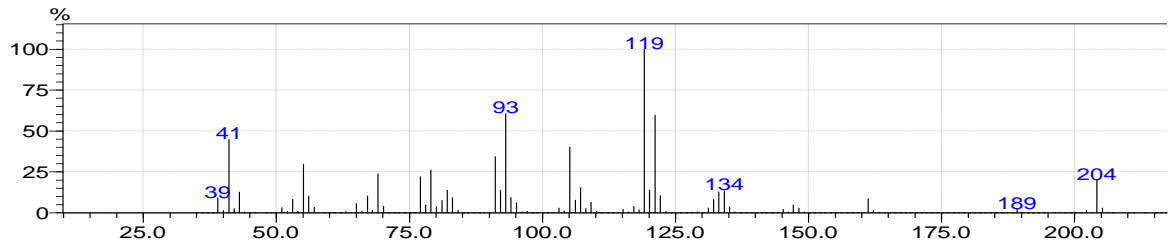
• **Aromadendreno**



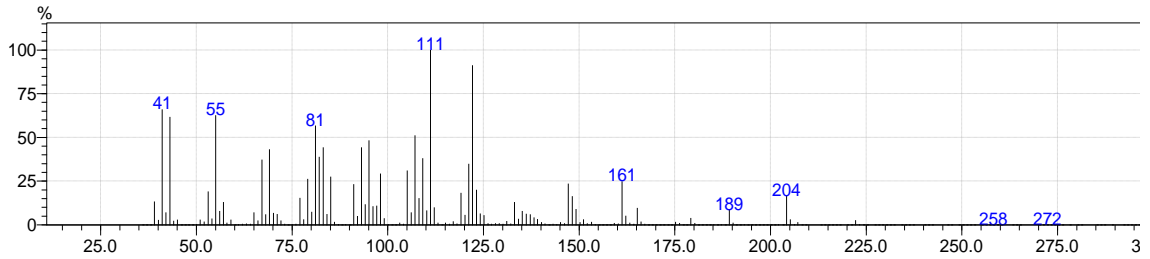
• **Farneseno (E-beta-)**



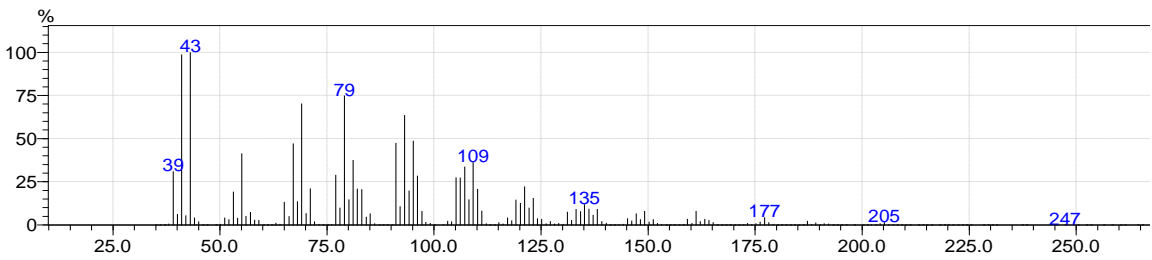
- Curcumeno (gama-)



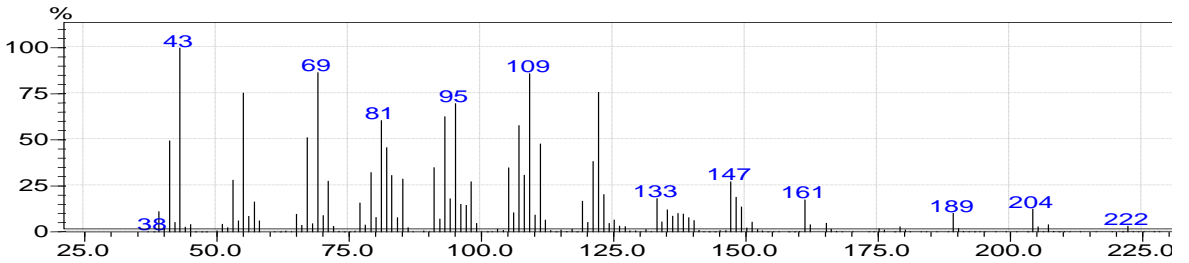
- Palustrol



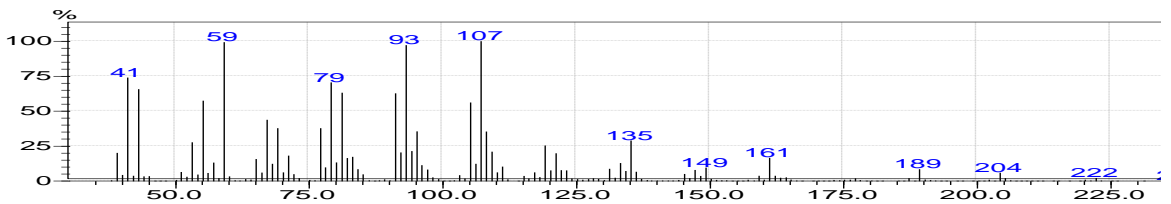
- Oxido de carifileno



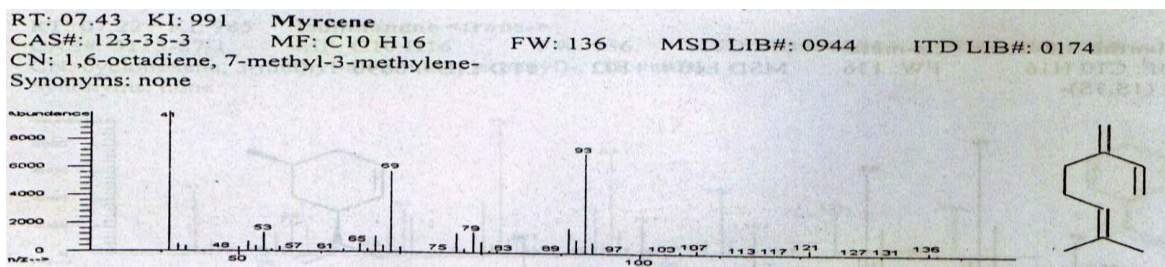
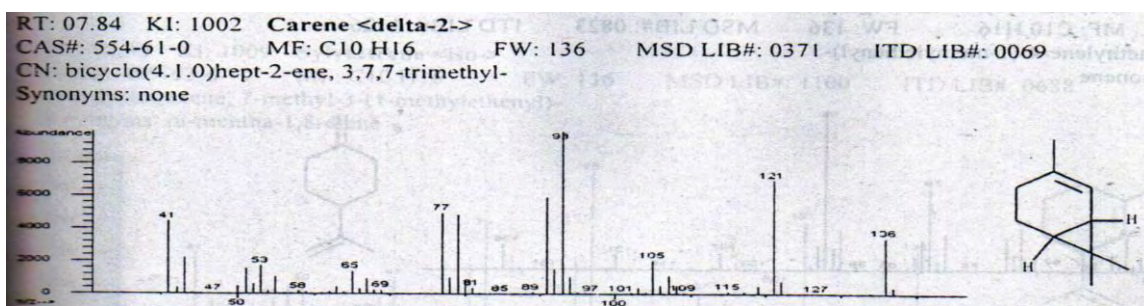
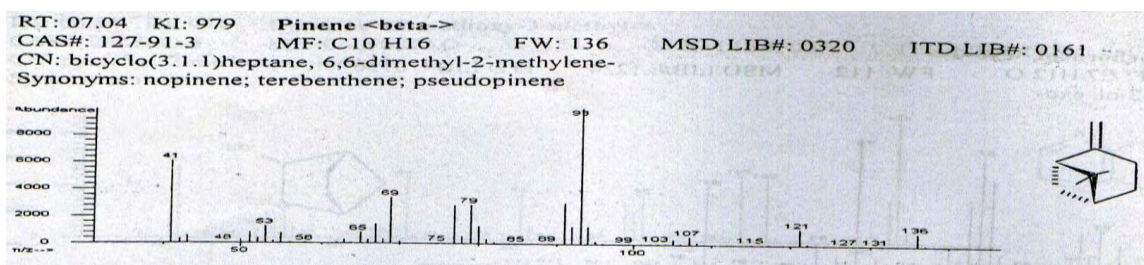
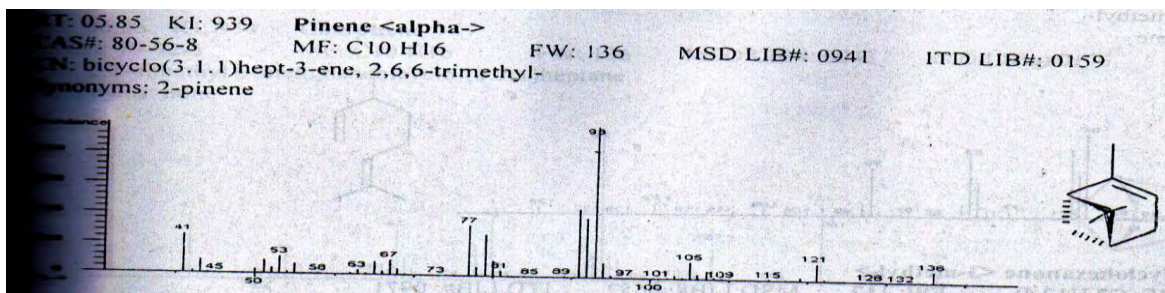
- Thujopsanol (alpha-2)



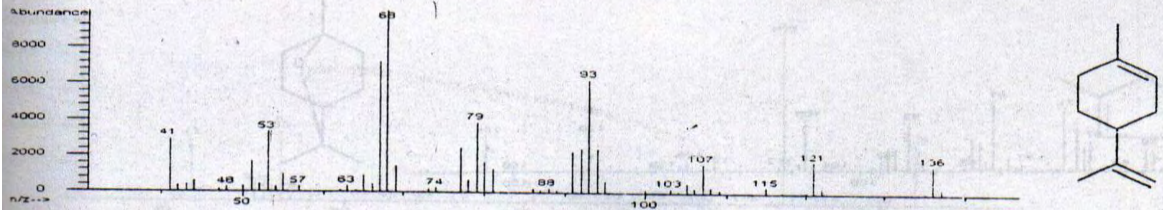
- Bulnesol



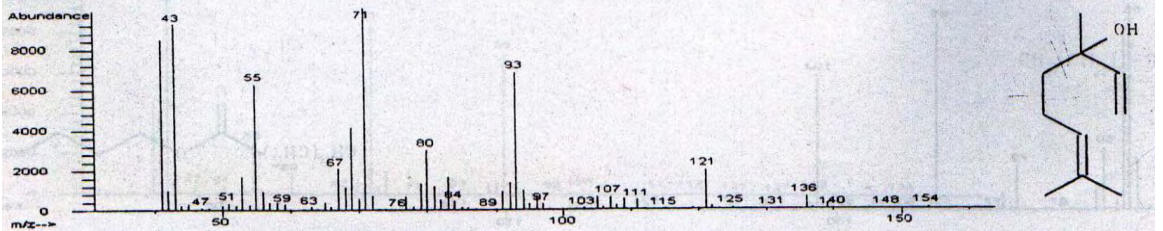
Anexo G. Espectros de masas teóricos (base de datos Adams, R. 2004) de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de Matico y Salvarrial Blanco.



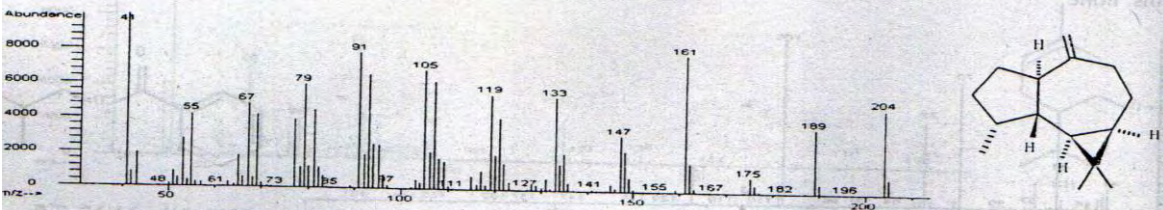
RT: 08.69 KI: 1029 **Limonene**
 CAS#: 138-86-3 MF: C₁₀H₁₆ FW: 136 MSD LIB#: 0171 ITD LIB#: 0113
 CN: methyl-4-(1-methylethenyl)cyclohexene<1->
 Synonyms: cajeputene; cinene; kautschin; nesol; p-mentha-1,8-diene; dipentene



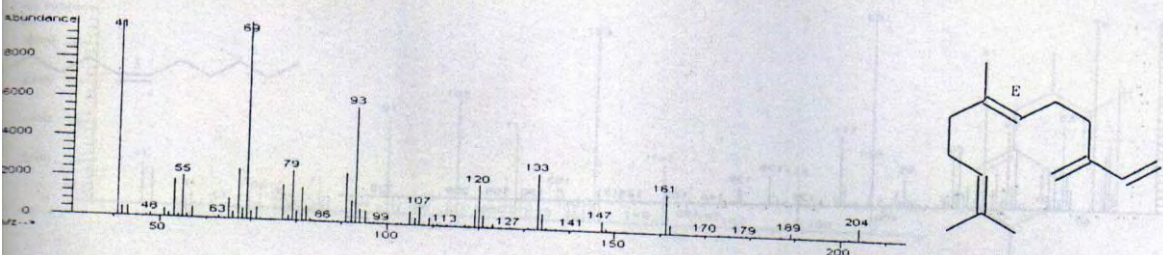
RT: 11.32 KI: 1097 **Linalool**
 CAS#: 78-70-6 MF: C₁₀H₁₈O FW: 154 MSD LIB#: 0322 ITD LIB#: 0167
 CN: dimethyl-1-6-octadien-3-ol<3,7->
 Synonyms: none



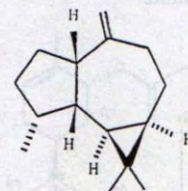
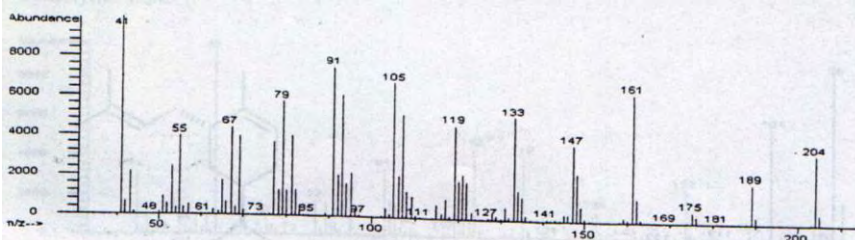
RT: 26.27 KI: 1441 **Aromadendrene**
 CAS#: 489-39-4 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 1028 ITD LIB#: 0242
 CN: 1H-cycloprop(e)azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, (1aR-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.))-
 Synonyms: none



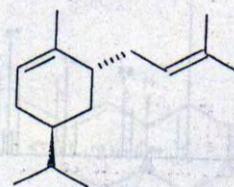
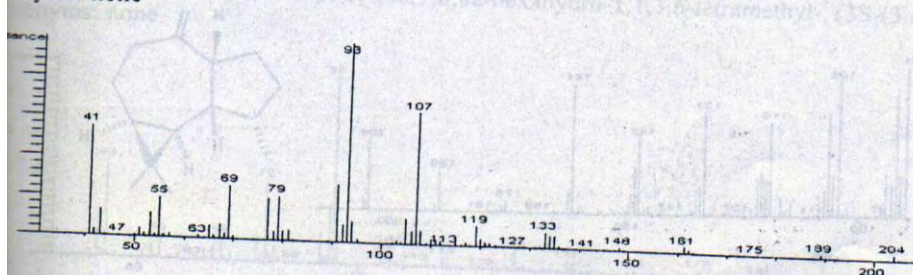
RT: 26.92 KI: 1457 **Farnesene <(E)-beta->**
 CAS#: 18794-84-8 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 0376 ITD LIB#: 0373
 CN: 1,6,10-dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-, (E)-
 Synonyms: trans-beta-farnesene



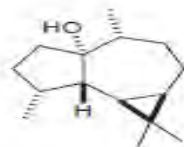
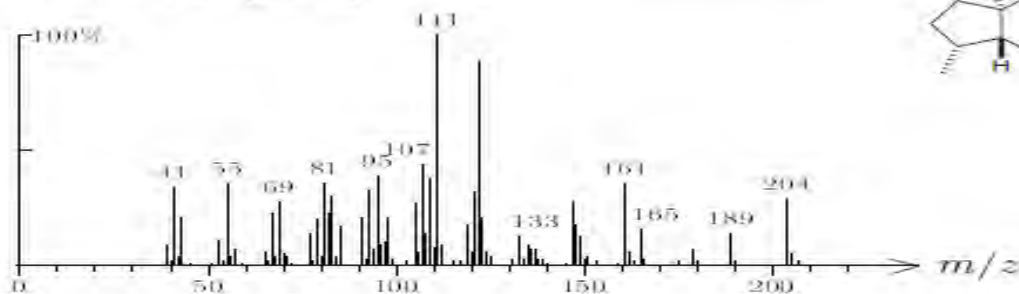
RT: 27.07 KI: 1460 **Aromadendrene** <allo->
 CAS#: 25246-27-9 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 0485 ITD LIB#: 0241
 CN: 1H-cycloprop(e)azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, (1R-(1a.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.))-
 Synonyms: none



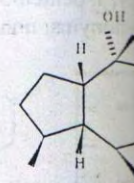
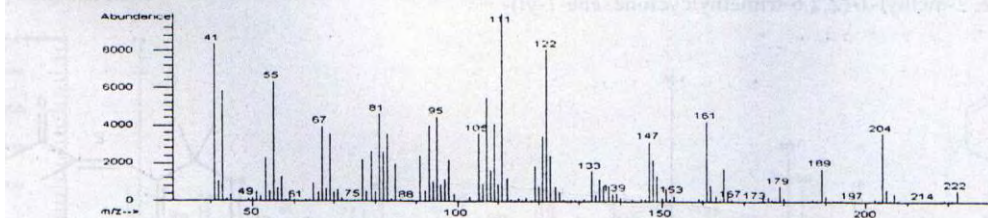
RT: 27.04 KI: 1460 **Prenyl limonene** <trans->
 S#: 000-00-0 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 1391 ITD LIB#: 1523
 Synonyms: none



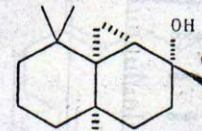
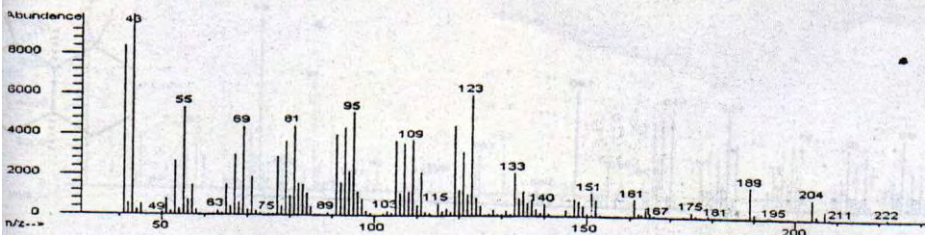
1569 C₁₅H₂₆O 222 538 005986-49-2
palustrol (sesquiterpenoid)



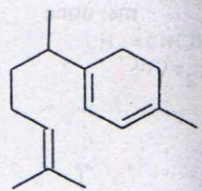
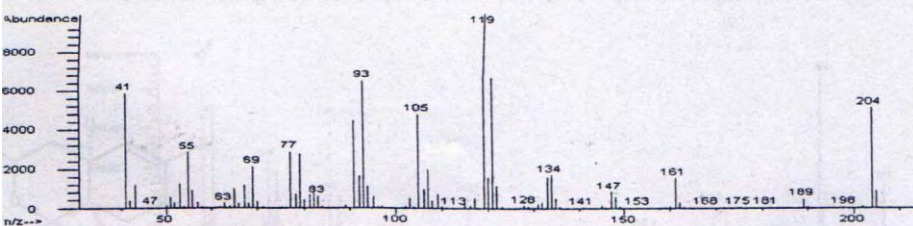
RT: 31.56 KI: 1569 **Ledol**
 CAS#: 577-27-5 MF: C₁₅H₂₆O FW: 222 MSD LIB#: 0004 ITD LIB#: 0433
 CN: 1H-cycloprop(e)azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, (1aR-(1a.alpha.,4.alpha.,7.alpha.,7b.beta.,7b.alpha.))-
 Synonyms: none



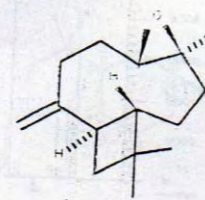
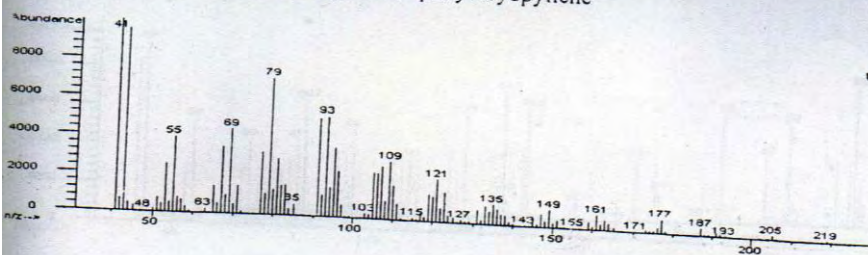
RT: 32.34 KI: 1587 **Thujopsan-2-alpha-ol**
 CAS#: 78392-83-3 MF: C₁₅H₂₆O FW: 222 MSD LIB#: 0516 ITD LIB#: 1232
 CN: cyclopropa(d)naphthalene-2-ol, decahydro-2,4a,8,8-tetramethyl-, (1aR-(1a.alpha.,2.beta.,4a.beta.,8aS*))-
 Synonyms: none



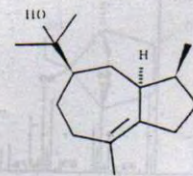
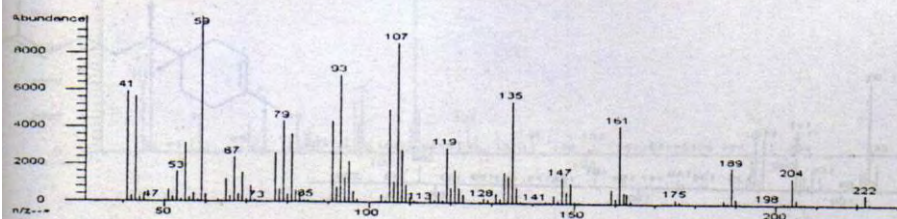
RT: 28.04 KI: 1483 **Curcumene <gamma->**
 CAS#: 28976-68-3 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 0795 ITD LIB#: 0546
 CN: 1,3-cyclohexadiene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-
 Synonyms: none



RT: 32.16 KI: 1583 **Caryophyllene oxide**
 CAS#: 1139-30-6 MF: C₁₅H₂₄O FW: 220 MSD LIB#: 0861 ITD LIB#: 0101
 CN: 5-oxatricyclo(8.2.0.0_{4,6})dodecane, 4,12,12-trimethyl-9-methylene-, (1R-(1R*,4R*,6R*,10S*))-
 Synonyms: beta-caryophyllene epoxide; epoxyaryophyllene



RT: 35.60 KI: 1672 **Bulnesol**
 CAS#: 22451-73-6 MF: C₁₅H₂₆O FW: 222 MSD LIB#: 1166 ITD LIB#: 0613
 CN: 5-azulenemethanol, 1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-.alpha.,alpha.,3,8-tetramethyl-, (3S-(3.alpha.,3a.beta.,5.alpha.))-
 Synonyms: guai-1(10)-en-11-ol



Anexo H. Características y aplicaciones más representativas de algunos de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *Lepechinia vulcanicola*.

Las diferentes propiedades biológicas de los aceites esenciales están relacionadas con su composición química, es por ello que debemos empezar revisando algunos aspectos generales sobre los mono terpenos y los sesquiterpenos, familias a las que pertenecen los compuestos identificados en esta investigación.

Monoterpeno: Se caracterizan por presentar 10 átomos de carbono y por lo tanto dos unidades de isopreno. Presentan gran variabilidad de hidrocarburos, alcoholes, aldehidos y otros compuestos oxigenados que, en conjunto, engloban gran cantidad de isómeros no sólo funcionales sino también de posición y geométricos. Están considerados como una de las más grandes familias de productos naturales⁵¹.

Se han identificado como producto del metabolismo secundario de los vegetales, aunque no exclusivos de ellos. Son bastante frecuentes en representantes de familias de angiospermas como: *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myristicaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae* y *Rubiaceae*. Se han descrito también en hongos y plantas no vasculares, aunque en menor medida, y en organismos animales como el coleóptero de la familia *Silphidae*, *Necrodes surinamensis Fabricius*, que excreta un compuesto monoterpénico por su glándula anal que repele a posibles competidores y depredadores⁵¹.

Entre las propiedades terapéuticas, tenemos que los monoterpenos pueden actuar como descongestionantes respiratorios y circulatorios (ej: aceite esencial de pino silvestre), también se utilizan para aliviar trastornos digestivos (ej: limoneno presente en el AE de limón amarillo o jugo de mandarina), también son dermocausticos (ej: la cortisona, 50% de dilución en adultos máximo)⁵².

⁵¹ Palá, J.; Pérez, J.; Velasco, A., Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "*eryngium*" I, en la península ibérica. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2002.

⁵² Jocteur, G., Les Huiles Essentielles à l'approche de l'hiver: Une alternative naturelle pour booster votre conseil. Francia, Conférence du Vendredi 9 Novembre 2007.

Sesquiterpeno: Se caracterizan por poseer 15 átomos de carbono y por tanto tres unidades de isopreno. Aunque por regla general la mayoría de ellos presentan una unión regular “cabeza-cola”, existen algunos que son el resultado de transposiciones en esta estructura.

Aparecen ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en los aceites esenciales, al igual que los monoterpenos, pero con mayor frecuencia que estos en hongos, plantas no vasculares e incluso en algunas bacterias como *Streptomyces*. Este grupo presenta gran variabilidad natural pudiendo encontrar hidrocarburos, alcoholes, cetonas y sus derivados, ésteres, glicósidos y alcaloides sesquiterpénicos⁵¹.

Aunque se les han atribuido diversas funciones como hormonas vegetales y como antibióticos de origen fúngico, al igual que los monoterpenos pueden actuar como alelopáticos. No son metabólicamente inertes, se sintetizan y catabolizan rápidamente en el metabolismo vegetal. La producción y acumulación de este tipo de compuestos, en cantidades considerables, suelen estar relacionados con la presencia de estructuras secretoras especializadas, como las glándulas de aceite⁵¹.

A continuación se habla puntualmente sobre algunos compuestos, entre los cuales se tiene:

Limoneno: su nombre sistemático es 1-Metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexano, su fórmula molecular es C₁₀H₁₆, su peso molecular 136,23 g/mol⁴⁶. El limoneno es un monoterpeno hidrocarburado, se le conoce también como dipenteno, cajetupeno, linoneno. Presenta un punto de ebullición de 176 °C⁵³. Se emplea en la producción de p-cimeno, como disolvente de resinas, en pigmentos y tintas, en la fabricación de adhesivos y en la obtención de carvona. Últimamente, la demanda del compuesto se debe a su aplicación como disolvente biodegradable⁵. Entre otras aplicaciones se lo utiliza como parte de insecticidas, pesticidas y repelente de insectos en animales, es un ingrediente activo de varios campos para el control de garrapatas y pulgas⁵⁴. Además hay reportes en los que se indica que presenta actividad como antiinflamatorio, antiséptico, antiviral, herbicida, insecticida. También se reporta que tiene actividad anti cancerígena en el cáncer mamario⁵.

⁵³ Base de datos chemical information, ChemIDplus Lite [Citado julio- 2013] Disponible en internet: <http://sis.nlm.nih.gov/chemical.html>.

⁵⁴ Base de datos pubchem [Citado julio-2013]. Disponible en internet: <http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

Thujopsan-2-alfa-ol: su fórmula molecular es $C_{15}H_{26}O$, su peso molecular es de 222,37 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un sesquiterpeno oxigenado y puede estar relacionado con la capacidad inhibitoria en el crecimiento de hongos.

Ledol: su fórmula molecular es $C_{15}H_{26}O$, su peso molecular: 222,37 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un sesquiterpeno oxigenado, se le conoce también como ledum camfor, posee un punto de ebullición de 292°C⁵³ y un punto de fusión de 102-

3°C¹¹. Puede causar irritaciones en la piel y/o dermatitis, puede producir irritaciones en el sistema respiratorio.

Alfa-pineno: su nombre sistemático: es 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno, su fórmula molecular es $C_{10}H_{16}$ y tiene un peso molecular de 136,23 g/mol⁴⁶. Es un monoterpeno hidrocarburado, punto de ebullición de 155.9°C. Utilizado en la fabricación de alcanfor, insecticidas, disolventes, plastificantes, bases de perfume, aceite de pino sintético, pueden ser irritantes para la piel y las membranas mucosas⁵³.

Beta-pineno: su nombre sistemático es 6,6-dimetil-2-metilenbicyclo[3.1.1]heptano, su fórmula molecular $C_{10}H_{16}$ y tiene un peso molecular de 136,23 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un monoterpeno hidrocarburado, punto de ebullición de 166°C. De acuerdo a estudios de bioactividad se lo utiliza como antiinflamatorio⁵⁴, presenta actividad como antiséptico, antiespasmódico, herbicida⁵³.

Los alfa y beta pinenos son estimulantes de las gónadas (suprarrenales), poseen actividad antiséptica.

E-beta-farneseno: su nombre sistemático es E-3,7,11-trimetil-1,3,6,10-dodecatetraeno, su fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ y tiene un peso molecular de 204,35 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un sesquiterpeno hidrocarburado, su punto de fusión es 25°C⁵³. Este compuesto es producido por una serie de tejidos de las plantas en respuesta a la herbivoría, heridas de defensa, patógenos y es una feromona sexual en ratones. También es considerado como una feromona de alarma de áfidos, en la papa silvestre (*S. barthaultii*), se produce este compuesto a partir de sus tricomas como una defensa contra los áfidos⁵⁴ y en la manzana se dice que este compuesto es un componente natural, el cual se oxida y perjudica la poscosecha de estas⁵⁴.

Delta-2-careno: su nombre sistemático es 3,7,7-trimetilbicyclo[4.1.0]hept-2-eno, su fórmula molecular $C_{10}H_{16}$ y tiene un peso molecular de 136,33 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un monoterpeno hidrocarburado, conocido como careno, su punto de fusión es 166,5°C⁵³. De acuerdo a ensayos de bioactividad a presentado a actividad antiespasmódica¹.

Mirceno: su nombre sistemático es 7-Metil-3-metileno-1,6-octadieno, su fórmula molecular $C_{10}H_{16}$ y tiene un peso molecular de 136,23 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un monoterpeno hidrocarburado, su punto de fusión es 167°C⁵³. Este compuesto es utilizado en la fabricación de alcoholes de terpeno, polímeros y resinas, en la fabricación de perfumes, y como agente aromatizante. Compuestos monoterpenicos similares en estructura al mirceno (limoneno, pineno, terpineno, terpinoleno) se ha demostrado que son fácilmente biodegradables⁵⁴.

Linalol: su nombre sistemático es 2,6-dimetil-2,7-octadien-6-ol, su fórmula molecular $C_{10}H_{18}O$ y tiene un peso molecular de 154,25 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un monoterpeno oxigenado, su punto de fusión es 197°C⁵³. El compuesto presenta actividad analgésica, anestésica, antibacterial, anticonvulsionante, antiséptico, antiespasmódico, antibacterial⁵⁴.

Aromadendreno: su nombre sistemático es 1,1,7-trimetil-4-metilenedecahidro-1H-ciclopropa[e]asuleno, su fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ y tiene un peso molecular de 204,35 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un sesquiterpeno hidrocarburado⁵⁴.

Allo aromadendreno: su nombre sistemático es (7S)-decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno-1H-ciclopropa[e]asuleno, su fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ y tiene un peso molecular de 204,35 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un sesquiterpeno hidrocarburado, es inhibidor del crecimiento en células humanas y muy utilizado para medir la proliferación celular⁵³, también se reporta que tiene alto valor agregado agregado en las industrias farmacéutica, cosmetológica y de perfumes.

Palustrol: su nombre sistemático es decahidro-1,1,4,7-tetrametil-1H-ciclopropa[e]asulen-4a-ol, su fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$ y tiene un peso molecular de 222,37 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un sesquiterpeno oxigenado.

Oxido de cariofileno: su fórmula molecular $C_{15}H_{24}O$ y tiene un peso molecular de 220,35 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un sesquiterpeno oxigenado.

Gama-curcumeno: su nombre sistemático es 1-metil-4-((R)-6-metilhept-5-en-2-il)-ciclohexa-1,3-dieno, su fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ y tiene un peso molecular de 204,35 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un sesquiterpeno hidrocarburado.

Bulnesol: su nombre sistemático es 2-(3,8-Dimethyl-1,2,3,3alpha,4,5,6,7-octahydro-5-azulenyl)-propan-2-ol, su fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$ y tiene un peso molecular de 222,37 g/mol⁴⁶. Este compuesto es un sesquiterpeno oxigenado.

Anexo I. Certificado de identificación taxonómica.



Universidad de Nariño
HERBARIO PSO

San Juan de Pasto, 10 de Octubre de 2013.

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

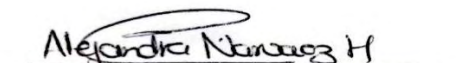
Por medio de la presente, el HERBARIO (PSO) DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO, certifica que las plantas conocidas con el nombre común de MATICO (cultivada en el corregimiento de Gualmatán) y SALBARRIAL BLANCO (cultivada en el municipio de Yacuanquer), pertenecen a la misma especie vegetal, siendo su nombre científico: *Lepechinia vulcanicola* J.R.I. Wood. Esta especie, se encuentra registrada en la base de datos de la siguiente manera:

Número de Inclusión (ID): 39557
Colector: Fernández, Alonso J.L.
Fecha de colección: 31 de agosto de 1999.

Este certificado se expide por solicitud del estudiante Yorlin Betancourt identificado con C.C. 5205573 de Chachagui, adscrito al Programa de Química de la Universidad de Nariño como requisito para su trabajo de grado.

Atentamente,


MARTHA SOFÍA GONZALEZ I.
Directora Herbario PSO


ALEJANDRA NARVAEZ HERRERA.
Técnico Herbario - PSO