



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DE
ESPECIES DEL GÉNERO *SALVIA* RECOLECTADAS EN EL
ESTADO DE OAXACA POR LA TÉCNICA ACOPLADA DE
EC-MEFS-CG-EM-TV. DETERMINACION DEL EFECTO DE
LOS EXTRACTOS METANÓLICOS SOBRE EL
CRECIMIENTO DE LA BACTERIA CARIOGÉNICA *S.*
MUTANS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

DIANA GABRIELA ALVARADO MENDOZA



México D. F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado

Presidente:	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Vocal:	Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. suplente:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Diana Gabriela Alvarado
Mendoza



Lista de Abreviaturas.....	iii
Lista de Tablas.....	iv
Lista de Figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Generalidades del género salvia.....	3
2.1.1 Usos etnobotánicos de especies del género salvia.....	3
2.1.2 Química del género salvia.....	5
2.2 Caries dental.....	5
2.2.1 <i>Placa dental</i>	5
2.2.1.1 Biopelícula.....	6
2.3 <i>Streptococcus mutans</i>	6
2.3.1 Generalidades.....	6
2.3.1.1 Patogenicidad.....	6
2.4 Microextracción en fase sólida.....	7
2.4.1 Procedimiento de la microextracción en fase sólida.....	9
2.4.2 Etapa de extracción.....	9
2.4.3. Extracción directa o por inmersión.....	9
2.4.4 Extracción por espacio de cabeza (HS-SPME).....	9
2.4.5 Extracción con protección de membrana.....	10
2.4.6 Etapa de desorción.....	11
2.4.7 Desorción térmica.....	11
2.4.8 Por desorción con solvente orgánico.....	11
2.4.9 Ventajas y desventajas de la SPME.....	12
2.5 Cromatografía de gases.....	12
2.6 Espectrometría de masas.....	13
2.7 Índice de Kovats.....	13
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	14
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	16
4.1 Procedimientos generales.....	16





4.1.1 Material vegetal y procedimiento de extracción.....	16
4.1.2 Microextracción en fase sólida	16
4.1.3 Cromatografía de gases.....	17
4.1.4 Identificación de los compuestos volátiles.....	19
4.1.5 Ensayo biológico.....	19
4.1.6 Preparación de los extractos.....	19
4.1.7 Microorganismo de prueba.....	21
4.1.8 Determinación de la actividad mínima inhibitoria.....	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	46
7. PERSPECTIVAS.....	47
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48



Lista de Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
μL	Microlitro
CAR	Carboxen
CW	Carbowax
DB-5	5%-fenil-polimetilsiloxano
DVB	Divinilbenceno
g	Gramo
GC	Cromatografía de Gases
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HS	Head Space
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
MS	Espectrometría de Masas
GTF's	Glucosiltransferasas
NaCl	Cloruro de Sodio
DMSO	Dimetilsulfóxido
PDMS	Polidimetilsiloxano
PFTBA	Perfluoroterbutilamina
PTFE	Politetrafluoroetileno
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CHX	Gluconato de Clorhexidina
SPME	Micro Extracción en Fase Sólida
TLC	Cromatografía de Capa Fina
TOF	Tiempo de Vuelo
USP	Farmacopea de los Estados Unidos

Lista de Tablas

	Contenido	Página
Cuadro 1	Usos de especies del género salvia en la medicina tradicional mexicana.	4
Cuadro 2	Condiciones de análisis optimizadas.	18
Cuadro 3	Condiciones optimizadas para el análisis de las muestras.	18
Cuadro 4	Peso exacto de las once muestras de salvias.	20
Cuadro 5	Peso de cada uno de los extractos de salvias.	20
Cuadro 6	Controles para el ensayo biológico.	22
Cuadro 7	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M1 mediante la metodología de Kovats.	25
Cuadro 8	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M1-2 mediante la metodología de Kovats.	26
Cuadro 9	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M3 mediante la metodología de Kovats.	27
Cuadro 10	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M4 mediante la metodología de Kovats.	27
Cuadro 11	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M5 mediante la metodología de Kovats.	30

	Contenido	Página
Cuadro 12	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M6 mediante la metodología de Kovats.	32
Cuadro 13	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M7 mediante la metodología de Kovats.	34
Cuadro 14	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M8 mediante la metodología de Kovats.	34
Cuadro 15	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M8-1 mediante la metodología de Kovats.	35
Cuadro16	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M9 mediante la metodología de Kovats.	36
Cuadro 17	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M9-1 mediante la metodología de Kovats.	38
Cuadro 18	Compuestos volátiles identificados en la muestra de salvia M10 mediante la metodología de Kovats.	40
Cuadro 19	Compuestos volátiles mayoritarios identificados en las muestras de salvia	42
Cuadro 20	Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) obtenidas para las especies de salvia evaluadas.	44

Lista de Figuras

	Contenido	Página
Figura 1	Micrografía electrónica de barrido de la bacteria cariogénica <i>Streptococcus mutans</i> .	7
Figura 2	Esquema del dispositivo comercial de SPME.	8
Figura 3	Etapa de absorción de los analitos en la fibra de HS/SPME.	10
Figura 4	Métodos de extracción en SPME	11
Figura 5	Microextracción en fase sólida por el método de espacio de cabeza.	17

1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas con fines terapéuticos ha sido una parte fundamental desde las antiguas civilizaciones hasta la actualidad, ya que un gran número de especies vegetales son utilizadas para tratar diversos padecimientos.

El primer registro de plantas medicinales en México data de 1552, cuando misioneros europeos se dedicaron a recopilar información y a registrar plantas curativas utilizadas en territorios conquistados por los españoles en el nuevo mundo [1].

El género salvia (*Lamiaceae*) es conocido comúnmente como “sage” y posee usos ornamentales, medicinales y gastronómicos.

Muchas de estas especies son utilizadas para tratar enfermedades gastrointestinales, neurológicas y respiratorias [2]. Cabe señalar que algunas de estas especies son de gran importancia económica debido a su uso como condimento o a su uso en la perfumería.

La caries dental es una de las enfermedades infecciosas más frecuentes en humanos la valorización de la flora microbiana es importante para el desarrollo de la caries dental. *Streptococcus mutans* es considerado como el principal agente etiológico de la caries dental en humanos y su presencia es valorada como un factor importante de riesgo para la formación de caries.

Las plantas son consideradas una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos que pudieran representar una alternativa a los productos químicos comúnmente utilizados para combatir la caries dental. Está bien establecido que

muchos de los metabolitos producidos por las plantas presentan propiedades contra los patógenos orales [3].

La determinación de los compuestos volátiles representa un gran reto en el análisis de plantas. Debido a su condición volátil es útil usar Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas (GC-MS) para el análisis de dichos compuestos, ya que permite separar los constituyentes de una mezcla compleja y así obtener el espectro de masas de cada uno de ellos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades sobre el género salvia

El género salvia es considerado el género más diverso de la familia *Lamiaceae*, abarca alrededor de 1000 especies distribuidas alrededor del mundo. México es considerado como una de las áreas con mayor diversidad del género en el mundo con aproximadamente 300 especies [4]. Este género se divide en 4 subgéneros: *Calosphace*, *Leonia*, *Salvia* y *Sclarea* [5]. Esta subdivisión considera las características morfológicas y la distribución geográfica de las especies del género.

La mayor diversidad de especies del género salvia se presenta en las zonas montañosas de México principalmente en los siguientes estados Oaxaca (63 especies), Guerrero (51 especies), Puebla (50 especies), Jalisco (49 especies) y Michoacán (48 especies) [6].

En el presente trabajo se estudiaron once muestras de salvias recolectadas en el estado de Oaxaca (México).

2.1.1 Usos etnobotánicos de especies del género salvia.

Numerosas especies del género salvia han sido utilizadas en la medicina tradicional para tratar diversos padecimientos.

Por ejemplo la infusión de salvia es muy utilizada desde tiempos antiguos y en la actualidad debido a las propiedades antibacterianas y gastrointestinales que posee [7].

Algunos de los usos que tienen las especies del género salvia en la medicina tradicional mexicana se muestran a en la cuadro 1 [7-8, 10-12].

Cuadro 1. Usos de especies del género salvia en la medicina tradicional mexicana.

Especie	Nombres populares	Usos	Referencia
<i>Salvia coccinea</i>	Sajanich humal, mirto, cimarron	Disentería, infecciones en los ojos, sangrado nasal	10,11
<i>S. adenophora</i>	Mirto	Diarrea	10
<i>S. amarissima</i>	Ñadri (otomí)	Reumas	10
<i>S. divinorum</i>	Pastora	Rituales de adivinación, diarrea, dolor de cabeza y reumatismo	7
<i>S. elegans</i>	Mirto, Jetcho, deni	Tos, insomnio, sarampión.	10
<i>S. fulgens</i>	Mirto	Insomnio	10
<i>S. hispanica</i>	Chía	Dolor	12
<i>S. mexicana</i>	Marrubio	Cólicos, diarrea	10
<i>S. microphylla</i>	Mirto	Dolor de estómago, empacho, problemas menstruales, cólico, diarrea, insomnio y disminución de la ansiedad.	10,12
<i>S. shannoni</i>	Monte amargo	Malaria	8
<i>S. regia</i>	Aretillo	Resfriado	10

2.1.2 Química del género salvia

Las especies del género salvia poseen una composición química bastante diversa, entre sus metabolitos secundarios han sido aislados compuestos fenólicos, flavonoides y principalmente compuestos terpenoides.

2.2 Caries dental

La caries dental es una enfermedad infecciosa, crónica, transmisible que se caracteriza por la desmineralización de los tejidos dentales, debido a la acción de los ácidos orgánicos, producidos por el metabolismo de las bacterias adheridas al esmalte de los dientes [13]. Este proceso en consecuencia puede provocar la formación de una cavidad si no se interviene a tiempo.

La caries dental constituye una de las enfermedades más frecuentes en los humanos, por lo que es considerado un problema de salud pública.

2.2.1 Placa dental

La caries dental tiene su origen en la existencia de una placa dentobacteriana previa, definida como una masa blanda, translúcida y muy adherente, que se acumula sobre la superficie de los dientes, formada casi exclusivamente por la saliva, bacterias y restos de alimentos que se depositan sobre los dientes [14].

La formación de la placa dentobacteriana ocurre en dos etapas. En la primera etapa ocurre la deposición reversible de diversas bacterias orales a la superficie dental, seguido de la acción de las Glucosiltransferasas (GTF's), las cuales forman una capa de polímeros de glucosa insolubles a partir de sacarosa, que promueven la adhesión irreversible de las bacterias. En la segunda etapa los

microorganismos acidogénicos producen ácido láctico por medio de la fermentación de azúcares como la fructosa, lo que provoca finalmente el ataque del esmalte de los dientes y la formación de la caries dental [15].

2.2.1.1 Biopelícula

El termino biopelícula o biofilm es definido como agrupamientos de células bacterianas adheridas a una superficie y encerradas en una matriz adhesiva excretada por las células. Las biopelículas atrapan nutrientes para el crecimiento microbiano y ayudan a evitar que se desprendan las células superficiales expuestas a corrientes de líquidos. En las biopelículas pueden convivir solo una especie o más especies de bacterias [16]. La comunicación célula a célula es indispensable para la formación y mantenimiento de la biocapa.

2.3 *Streptococcus mutans*

2.3.1 Generalidades

Es una bacteria Gram positiva, anaerobio facultativo, que normalmente se encuentra en la cavidad bucal humana, forma parte de la placa dentobacteriana, cuya pared celular contiene adhesinas que se adhieren a través de receptores específicos a la película adquirida salival [17].

2.3.1.1 Patogenicidad

La patogenicidad de este microorganismo radica en que se encuentra principalmente en los surcos y pequeñas fisuras de los dientes, produce dextrano, un polisacárido extraordinariamente adherente que utiliza para fijarse en la superficie (Figura 1). *Streptococcus mutans* produce dextrano solamente cuando existe sacarosa debido a la acción de la enzima dextransucrasa:

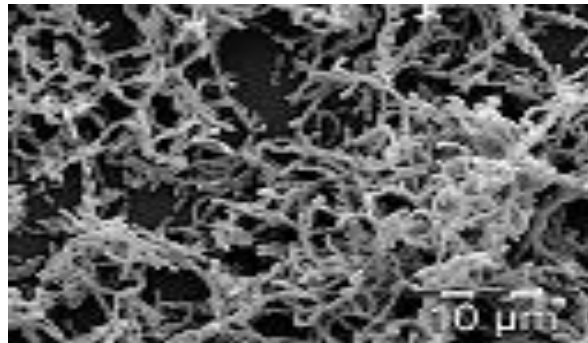
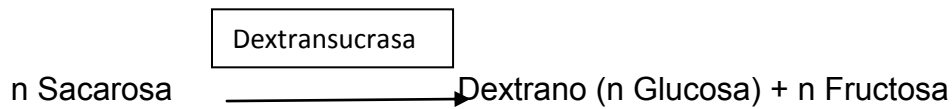


Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*. Obtenida de <http://www.odont.uio.no/iob/english/about/organization/units/biofilm/>

La susceptibilidad a la caries dental varía de un individuo a otro, y está influenciada tanto por los rasgos genéticos del individuo, como por la dieta y otros factores externos. La sacarosa, por ejemplo muy cariogénica porque sirve como sustrato de la dextransucrasa, y forma parte de la dieta de la mayoría de los individuos de los países desarrollados [16].

2.4 Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica analítica de preparación de muestra desarrollada por Belardi y Pawliszyn en 1989. Esta técnica se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida recubierta de una fase adsorbente de naturaleza polimérica, la fibra se expone a la muestra a analizar durante un tiempo determinado, seguido de la desorción de la fibra de un modo directo en el inyector de un cromatógrafo de gases [18]. El pequeño tamaño que posee la fibra seguida de su geometría cilíndrica permite incorporarla dentro de la aguja de una jeringa de esta manera

se favorece su manipulación y la protección de la fibra cuando ésta no se utiliza ya que permanece dentro de la aguja de la jeringa como se muestra en la Figura 2.

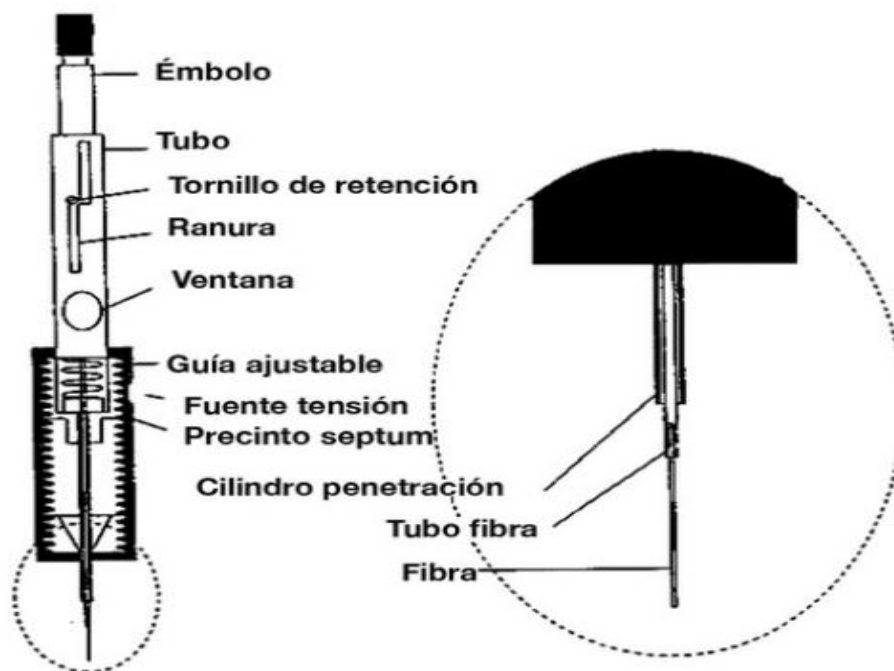


Figura 2. Esquema del dispositivo comercial de SPME

<http://www.sevi.net/xoops233/modules/news/article.php?storyid=121&llamada=anteriores>

El transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hacia la fibra polimérica comienza en el momento en que la fibra se expone a la misma. La extracción se considera completa cuando se alcanza el equilibrio de distribución, por lo que no se trata de una técnica en la cual se produzca una extracción exhaustiva de los analitos, ésta solo se logra alcanzar cuando se tiene una mínima cantidad de muestra o cuando los analitos presentan gran afinidad a la fibra polimérica.

2.4.1 Procedimiento de la microextracción en fase sólida.

El proceso de microextracción en fase sólida (SPME) consta de dos etapas. La primera etapa consiste en la extracción en donde la fibra recubierta por un adsorbente se pone en contacto con la muestra que se encuentra contenida en un vial durante un tiempo determinado y temperatura determinada, en esta etapa se produce la adsorción de los analitos en la fibra polimérica. La siguiente etapa es la etapa de desorción en la cual se introduce la fibra en el inyector de un sistema analítico (Cromatógrafo de gases) donde los analitos son desorbidos térmicamente.

a) Etapa de extracción:

Para el proceso de microextracción en fase sólida (SPME) la muestra se introduce en el interior de un vial herméticamente cerrado mediante un séptum, posteriormente se perfora el séptum y se introduce la jeringa en el vial. Empujando el émbolo se expone la fibra a la muestra el tiempo previamente establecido. Una vez finalizado el tiempo de extracción, se devuelve la fibra al interior de la jeringa. Hay tres formas de realizar la extracción de SPME [19].

I Extracción directa o por inmersión. En esta técnica de extracción se introduce la fibra directamente en la muestra líquida, produciéndose la migración de los analitos desde la matriz hasta la fibra. Presenta la desventaja de que disminuye mucho la vida media de la fibra y dificulta la reproducibilidad de extracción [20].

II Extracción en espacio de cabeza (HS-SPME). En esta técnica la fibra se expone a la fase gaseosa que queda por encima de la muestra, de tal modo que los analitos pasaran de la muestra a la fase gaseosa, y posteriormente estos

migrarán de la fase gaseosa al recubrimiento polimérico de la fibra. Las principales ventajas de este método de extracción es que se alarga la vida útil de la fibra ya que se evitan interferencias con otros componentes de la muestra. Por este motivo es el método de extracción más empleado para obtener los analitos (compuestos volátiles y semivolátiles.) En términos generales, se puede decir que el volumen del espacio de cabeza tiene que ser lo más pequeño posible, ya que el rendimiento de la extracción disminuye cuando aumenta el volumen del espacio de cabeza por efecto de la dilución [21]

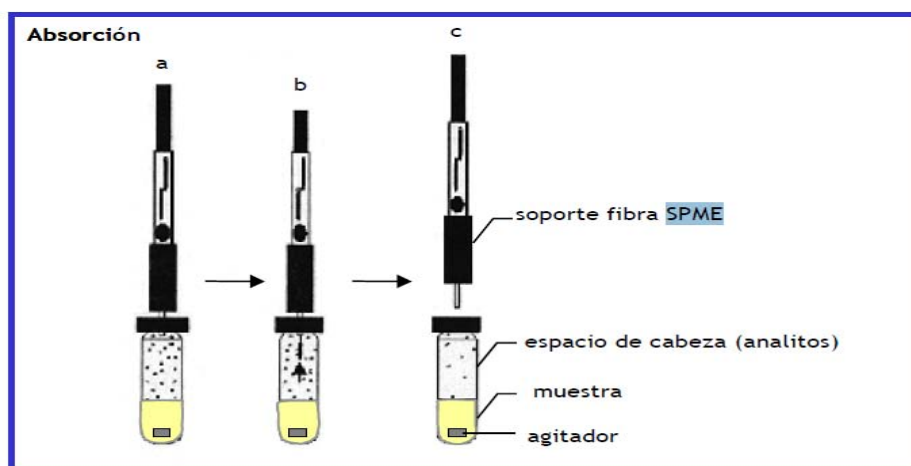


Figura 3. Etapa de absorción de los analitos en la fibra de HS/SPME.

III Extracción con protección de membrana

En este tipo de extracción se coloca una membrana semipermeable alrededor de la fibra. Este método es útil cuando se quiere extraer compuestos con baja volatilidad, el proceso de extracción es más lento que en la inmersión directa debido a que los analitos deben difundir a través de la membrana antes de llegar a la fibra [19].

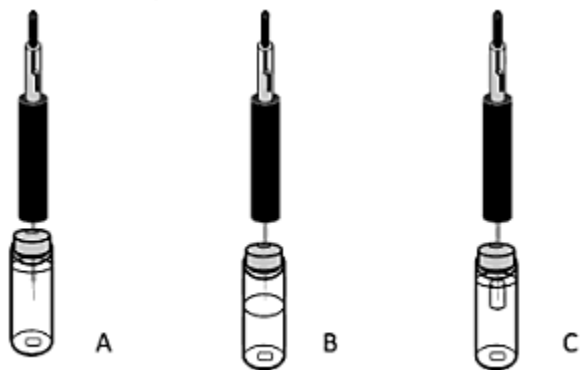


Figura 4. Métodos de extracción en SPME A) Extracción directa o por inmersión. B) Extracción con espacio de cabeza. C) Extracción con protección de membrana.

Obtenido de

<http://books.google.com.mx/books?id=2JxbiSyy011C&pg=PA31&dq=microextracci%C3%B3n+enfase+solida&hl=es&sa=X&ei=pRBnUYWXYmrQHV54DIBw&ved=0CEAQ6AEwAw#v=onepage&q=microextracci%C3%B3n%20en%20fase%20solida&f=false>

B) Etapa de desorción: En esta etapa los analitos que quedaron retenidos en la fibra son liberados.

I) Por desorción térmica: La fibra se inserta en el inyector del cromatógrafo de gases, este se encuentra a una temperatura bastante elevada, para que al bajar el émbolo de la jeringa, de forma instantánea se desorban los analitos entrando a la columna cromatográfica en forma gaseosa. [22].

II) Por adición de un solvente orgánico: Se utiliza cuando se tienen analitos termolábiles o poco volátiles, y por tanto no se pueden desorber directamente a las altas temperaturas del inyector del cromatógrafo. [23].

2.4.1.1 Ventajas y desventajas de la técnica SPME

Esta técnica presenta una serie de ventajas, ya que es una técnica muy simple, presenta un bajo costo, puede ser automatizada, requiere de pequeños volúmenes de muestra para llevar a cabo el análisis y generalmente no requiere el uso de disolventes orgánicos. Otra ventaja que presenta es la posibilidad de utilizarse con todos los tipos de muestras, ya sean gaseosas como por ejemplo aire o aliento, líquidas como aguas o bebidas, o sólidas como sedimentos, alimentos, etc. Además, se puede aplicar a la determinación de compuestos de diferente volatilidad y polaridad.

Como inconveniente se puede mencionar que debido a la limitada capacidad de las fibras (la cantidad de recubrimiento es muy pequeña) en ocasiones no se obtienen límites de detección bajos [24].

2.5 Cromatografía de gases

En la cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia de que se reparten entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. Al efectuar una separación cromatográfica de gases la muestra se vaporiza y se inyecta una pequeña cantidad de la muestra a separar en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte.

Los componentes separados, emergerán de la columna a intervalos discretos y pasaran a través de algún sistema de detección adecuado [25]. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito, su única función es transportar este último a través de la columna.

2.6 Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica que permite la medición de la relación masa/carga de iones derivados de moléculas, se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas de acuerdo a su relación masa/carga. La espectrometría de masas proporciona información tanto cualitativa (estructura) como cuantitativa (masa molecular) de los moléculas analizadas previamente convertidas en iones, posteriormente los iones se aceleran en un campo eléctrico de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Una vez en contacto con el detector, se generan señales que son registradas en el sistema informático y representado en un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de señales en función de su relación m/z [26].

2.7 Índice de Kovats

E. Kovats propuso por primera vez el índice de retención en 1958 para identificar solutos a partir de los cromatogramas. Es un método que sirve para determinar tiempos de elución relativa de los diferentes compuestos de la muestra comparándolos con los tiempos de retención de una serie homóloga de hidrocarburos saturados, de tal forma que esto ayuda a la identificación de los componentes de una mezcla [27].

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En los últimos años el uso indiscriminado y la automedicación de antibióticos han ocasionado la aparición de bacterias multirresistentes, lo que conlleva a la disminución de la eficacia en los tratamientos, por este motivo es de suma importancia buscar alternativas a partir de fuentes naturales que permitan combatir eficazmente las enfermedades infecciosas producidas por estas bacterias.

La caries es una enfermedad infecciosa que afecta a miles de personas alrededor del mundo, debido a que los programas de salud se enfocan a la corrección y no a la prevención del problema; diversos estudios han demostrado que los productos naturales son considerados una fuente importante de compuestos bioactivos utilizados para combatir la caries dental.

Debido a que en la actualidad existe muy poca información acerca de los compuestos volátiles de la especie salvia, se decidió hacer esta investigación, debido a que el género salvia representa una opción viable para el desarrollo de nuevos tratamientos para combatir diversas enfermedades debido a las propiedades antimicrobianas, gastrointestinales, neurológicas y respiratorias que posee.

Con base en las consideraciones anteriores el objetivo del presente proyecto de investigación consiste en determinar la composición de compuestos volátiles de once muestras de salvia recolectadas en el Estado de Oaxaca, y determinar la actividad biológica sobre la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*. Para cumplir con el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- ❖ Realizar una búsqueda exhaustiva de las diferentes publicaciones sobre el género salvia.

- ❖ Establecer las mejores condiciones analíticas de extracción para las once muestras de salvias utilizando la técnica MEFS-EC-CG-EM-TV (HS-SPME-GC-MS-TOF)

- ❖ Realizar la determinación de los componentes volátiles de las once muestras de salvias utilizando la técnica de MEFS-EC-CG-EM-TV (HS-SPME-GC-MS-TOF)

- ❖ Implementar la metodología de Kovats para la identificación de los compuestos volátiles presentes en las once muestras de salvias.

- ❖ Determinar la actividad biológica de los compuestos mayoritarios identificados en las once muestras de salvias.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Procedimientos generales.

4.1.1 Material vegetal y procedimiento de extracción.

Las once muestras de salvias fueron recolectadas manualmente en Oaxaca, México.

4.1.2 Microextracción en fase sólida.

Para realizar la microextracción se empleó la fibra de divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS 2cm 50/30 μ m); la cual fue activada siguiendo las instrucciones del fabricante (Supelco). Previo a cada proceso de microextracción se realizó una corrida blanco. Para realizar cada una de las microextracciones se emplearon aproximadamente 5g de cada una de las once muestras de salvias, 5mL de agua y 20mg de NaCl, los cuales fueron colocados en un vial de 40mL con séptum de politetrafluoroetileno (PTFE). El vial una vez cerrado herméticamente fue sometido a agitación, a una temperatura de entre 45-50°C y la fibra para la microextracción se expuso en el espacio de la cabeza del vial para la adsorción de los analitos durante 90 minutos (Figura 5). Después de ello, se retiró la fibra del vial para introducirla dentro del inyector del cromatógrafo por 3 minutos para su desorción y análisis. Este proceso se realizó por triplicado.



Figura 5. Microextracción en fase solida por el método de espacio de cabeza.

4.1.3 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas.

Para la realización del análisis se empleó el espectrómetro de masas con analizador másico de tiempo de vuelo (TOF), marca LECO, modelo Pegasus 4D, acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent, modelo 6890N equipado con una columna capilar DB-5 (5%fenil-polimetilsiloxano) con dimensiones de 10m x 0.18mm x 0.18 μ m. La temperatura del inyector se mantuvo a 300°C; utilizando como gas acarreador Helio (Praxair, 5.0) a un flujo de 1mL/min. La temperatura del horno se programó a 40°C (durante 3 minutos) y se incrementó a 20°C/min hasta los 300°C durante 5 minutos. Las inyecciones fueron realizadas mediante el modo de inyección “splitless” (sin división).

En el espectrómetro de masas se utilizó ionización electrónica a 70 eV, la temperatura de la cámara de ionización fue de 200°C y de la línea de transferencia, 250°C. Se programó una velocidad espectral de 20 espectros/seg. El barrido de masas fue de 33-400u (unidades de masa atómica).

Cuadro 2. Condiciones de análisis optimizadas.

Microextracción en fase sólida (HS-SPME)	Microfibra utilizada	2cm 50/30µm DVB/CAR/PDMS Marca Supelco Lote P340030 No. Cat. 573-48- U
	Tiempo de exposición de la fibra	90 minutos
	Temperatura de la muestra	45-50 °C (baño de agua)
	Posición de la fibra en la extracción	En fase gaseosa (Headspace)
	Tiempo de desorción en el inyector	3 minutos

Cuadro 3. Condiciones optimizadas para el análisis de las muestras

Cromatografía de gases (GC)	Marca y modelo del equipo	LECO Pegasus 4D
	Técnica analítica	CG-EM-TOF
	Temperatura del inyector	300°C
	Cromatógrafo de gases	Agilent 6890N
	Columna capilar (fase)	DB5 10 ×0,18mm di × 0,18µm
	Programación de la temperatura del horno	40°C (3 minutos), 20°C/minuto hasta 300°C (5 minutos)
	Tipo de inyección	Splitless (sin división de flujo)
	Gas acarreador	Helio, Praxair, grado 5.0 (ultra Alta Pureza)
	Flujo del gas acarreador	1ml/minuto
Espectrometría	Temperatura de la línea de transferencia	250°C
	Tipo de ionización	Ionización electrónica (IE)
	Analizador másico	Tiempo de vuelo (TOF)

de masas (MS)	Adquisición espectral	20 espectros/segundo
	Retraso/encendido del filamento	0 minutos
	Intervalo de masas	33-400u
	Temperatura de la cámara de ionización	200°C
	Compuesto de calibración	Perfluorterbutilamina (PFTBA)

4.1.4 Identificación de los compuestos volátiles.

La identificación de los compuestos volátiles se realizó mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca electrónica NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) así como en la comparación de sus índices de retención con los valores de la literatura y las co-inyecciones de hexanal puro, benzaldehído y heptanal que se adquirieron en Sigma Aldrich.

4.1.5 Ensayo biológico

4.1.6. Preparación de los extractos

La preparación de los extractos se realizó pesando en una balanza analítica el material vegetal de las once muestras de salvias. En el Cuadro 4 se muestra el peso exacto de las once muestras de salvias.

Cuadro 4. Peso exacto de las muestras de salvias.

Muestra	Peso (g)
M1	6.03
M1-2	4.30
M3	16.73
M4	7.59
M5	5.53
M6	12.89
M7	12.23
M8	18.40
M8-1	11.66
M-9	11.81
M10	8.23

Una vez ya pesado el material vegetal este se sometió a una maceración con metanol durante una semana. Una vez transcurrida la semana los extractos se filtraron, posteriormente se concentraron los extractos en un rotaevaporador. En el Cuadro 5 se muestra el peso exacto de cada una de los extractos de salvias utilizados para realizar el bioensayo.

Cuadro 5. Peso de cada uno de los extractos utilizados para el bioensayo.

Muestra	Extracto (mg)
M1	8.000
M1-2	7.900
M3	8.800
M4	8.000
M5	10.06
M6	8.000
M7	8.100
M8	8.000
M8-1	8.300
M-9	8.100
M-10	8.000

Una vez pesados los extractos se procedió a realizar una dilución de cada uno de los extractos, la dilución se realizó empleando 200µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y 800µl de agua desionizada.

4.1.7. Microorganismo de prueba

El microorganismo de prueba utilizado para determinar la actividad antibacteriana de los once extractos de salvas, fue *Streptococcus mutans*(ATC 10449), quien es el principal agente causal de las caries. Para el crecimiento óptimo de la bacteria, se utilizó como medio de cultivo el caldo de la infusión de cerebro-corazón (BHI).

4.1.8. Determinación de la actividad mínima inhibitoria

La actividad antibacteriana de los extractos, se determinó mediante un ensayo de microdilución en placa de 96 pozos. Se utilizó una cepa de *Streptococcus mutans* conservada en glicerol a – 64°C. Previamente, se incubó el cultivo bacteriano por 24h, en caldo BHI, para reactivar la cepa, después se resembró, en caldo BHI, y se cultivó por 4 horas, posteriormente, la suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro (marca Agilent), a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. En cada pozo se colocó el medio de cultivo (100µL), y en el primer canal se adicionó el compuesto de prueba (100µL), del cual se realizaron diluciones seriadas. Después se agregó medio de cultivo con 1% de sacarosa (80µL). Posteriormente se adicionó 1×10^6 UFC/mL de *Streptococcus mutans* (20µL). La CMI se determinó por duplicado para cada extracto. Finalmente, las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. En una incubadora marca Labnet. En el Cuadro 6 se muestran los controles utilizados para el ensayo biológico.

Cuadro 6. Controles para el ensayo biológico

Control	Medio de cultivo	Compuesto de prueba	Condiciones
Control de disolvente	con inóculo	-	37°C
Control negativo	con inóculo	-	37°C
Blanco	sin inóculo	-	37°C
Control positivo	sin inóculo	gluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12%	37°C

La bacteria *S. mutans* se incubó en condiciones aerobias. El valor de CMI para *S. mutans* se determinó como la concentración mínima del compuesto de prueba que inhibe el crecimiento bacteriano en el pozo de dilución.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aceites esenciales son productos apreciados desde la antigüedad debido a sus propiedades medicinales. No obstante, el interés por sus aplicaciones terapéuticas ha experimentado un notable incremento en las últimas décadas [28]. Los aceites esenciales son mezclas complejas de sustancias orgánicas volátiles de origen vegetal. Algunas de las propiedades terapéuticas que poseen los aceites esenciales son: antimicrobiana, expectorante, espasmolítica, carminativa, antiinflamatoria, analgésica, sedante, etc. [32-33].

Debido a que en la actualidad se siguen empleando las plantas medicinales para tratar diversos padecimientos, hay gran interés en la investigación de los compuestos activos utilizando diversas técnicas analíticas. Primeramente se busca el aislamiento de los aceites esenciales para posteriormente hacer su caracterización mediante diversas técnicas analíticas tal como la cromatografía de gases (CG), la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), ambas acopladas a la espectrometría de masas [29].

Estos métodos analíticos son útiles para el análisis de matrices sencillas, debido a que involucran diversos procesos tales como la preparación de la muestra, la separación, la detección y el análisis de datos, cabe mencionar que la preparación de la muestra conlleva pasos adicionales como lo son la extracción, la concentración, el fraccionamiento y el aislamiento de los analitos. Si se quisieran analizar matrices complejas mediante estas técnicas analíticas, sería un inconveniente ya que se consumiría gran cantidad de tiempo. Debido a este inconveniente, se ha buscado desarrollar métodos analíticos prácticos y confiables que permitan el análisis de matrices complejas tal y como lo son los materiales vegetales, algunos de los métodos utilizados para el análisis de matrices complejas son la extracción con disolventes orgánicos, la destilación con arrastre de vapor, estos métodos requieren grandes volúmenes de muestra y de disolvente [29]. Además estos métodos causan una pérdida parcial de los analitos debido a

que en el proceso la temperatura volatiliza algún de los compuestos presentes en la muestra, como es en el caso de la destilación [30, 31].

Debido a todos estos inconvenientes, se desarrolló la microextracción en fase sólida (SPME) por Pawliszyn y colaboradores en 1990 [29]. Esta técnica analítica solo consta de dos pasos la extracción y la desorción de los analitos. Se utiliza una fibra de sílica recubierta en su exterior por diferentes fases estacionarias, este método presenta varias ventajas tal y como lo es el ahorro de tiempo ya que la extracción y la concentración se llevan a cabo en el recubrimiento de la fibra, requiere de pequeñas cantidades de muestra. Por los motivos mencionados anteriormente es una técnica analítica práctica y útil para el análisis de matrices complejas.

Las plantas almacenan y emiten una mezcla compleja de compuestos lipofílicos de bajo peso molecular; denominados compuestos orgánicos volátiles. Su principal aplicación es agrícola ya que suelen utilizarse para el control de plagas (insecticidas), o para la producción de aromas y fragancias [32].

Cabe señalar que cada vez existen más pruebas de que los compuestos orgánicos volátiles representan una fuente de nuevos fármacos que han sido poco explotados y que aún existe una gran parte sin explotar. Debido a esto la farmacopea Europea enumera menos de cuarenta plantas que producen aceites esenciales con aplicaciones farmacéuticas, mientras que la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) solo enumera 10 [28-32].

Dioscórides padre de la fitoterapia dedicó su primer libro de materia médica a plantas aromáticas medicinales. El uso medicinal de los aceites esenciales incluye la aplicación tópica, la inhalación y la ingestión oral.

Los aceites esenciales que contienen compuestos orgánicos volátiles fueron los primeros agentes antimicrobianos tópicos y gastrointestinales utilizados en la antigüedad. Es importante destacar que el efecto antimicrobiano puede no ser lo suficientemente específico, mientras que los antibióticos tienen objetivos

específicos los compuestos orgánicos volátiles pueden provocar alteraciones no específicas en las membranas de los microorganismos [28].

Los compuestos volátiles de las once muestras de salvas se determinaron utilizando la técnica de HS-SPME-CG-EM-TOF utilizando una fibra gris (DVB/CAR/PDMS). En los Cuadros 7-18 se resumen los compuestos separados en las once muestras de salvas, las abundancias relativas y los tiempos de retención para cada uno de los compuestos separados en una columna DB-5. En la muestra M-1 se logró la identificación de seis compuestos. Los compuestos mayoritarios presentes fueron: octanal (30.05%), *n*-hexanol (4.814%) y la 3-octanona (28.88%). En el Cuadro 7 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro 7. Compuestos volátiles identificados en la muestra M1 mediante la metodología de Kovats

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
1	(2Z)-hexenol	1.81	171.60	867	867	EM/IR	98	C ₆ H ₁₀ O
2	<i>n</i> -hexanol	4.81	173.90	870	870	EM/IR	98	C ₆ H ₁₀ O
3	octanal	30.05	299.20	1009	1007	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
4	3-octanona	28.88	300.30	1011	----	EM	128	C ₈ H ₁₆ O

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

Cuadro 7. Compuestos volátiles identificados en la muestra M1 mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
5	1-hexanol, 2-etil	4.55	306.35	1022	1024	EM/IR	130	C ₈ H ₁₈ O
6	(2E)-octen-1-ol	0.32	329.45	1065	1064	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
7	ácido propanoico 2-metil-, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil ester	0.22	564.65	160	-----	EM	286	C ₁₆ H ₃₀ O ₄

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

En la muestra M1-2 se logró la identificación de seis compuestos. Los compuestos mayoritarios son los siguientes: 1-nonen-3-ol (81.055%), 3-octanol (8.7347%), y propil-ciclopropano (5.40%). En el Cuadro 8 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro 8. Compuestos volátiles identificados en la muestra M1-2 mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
1	ciclopentanol	1.62	61.01	762	765	EM/IR	86	C ₅ H ₁₀ O
2	(2Z)-hexen-1-ol	1.81	194.86	890	886	EM/IR	100	C ₆ H ₁₂ O
3	propil-ciclopropano	5.40	197.71	892	-----	EM	84	C ₆ H ₁₂
4	1-nonen-3-ol	81.06	295.56	1002	-----	EM	142	C ₉ H ₁₈ O
5	3-octanol	8.73	303.41	1016	-----	EM	130	C ₈ H ₁₈ O
6	ácido propanoico-2-metil-1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil ester	1.39	564.71	1602	-----	EM	286	C ₁₆ H ₃₀ O ₄

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

En la muestra M3 se logró la identificación de cuatro compuestos. Los compuestos mayoritarios fueron los siguientes: 2-octanol (73.95%), (3S)-etil-4-metilpentanol (19.79%) y el ácido propanoico-2-metil-,1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil éster (5.36%). En el Cuadro 9 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro9. Compuestos volátiles identificados en la muestra la M3 mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
1	ciclopentanol	0.91	60.58	762	765	EM/IR	86	C ₅ H ₁₀ O
2	2-octanol	73.95	302.63	1015	1010	EM/IR	130	C ₈ H ₁₈ O
3	(3S)-etil-4-metilpentanol	19.79	318.68	1045	-----	EM	318	C ₈ H ₁₈ O
4	ácido propanoico -2-metil- 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil ester	5.36	564.83	1602.8	-----	EM	286	C ₁₆ H ₃₀ O ₄

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

En la muestra M-4 se logró la identificación de 47 compuestos. Los compuestos mayoritarios presentes fueron el [S-(E,E)]-1,6-1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)-Ciclodecadieno (5.79%), el (1 α ,4 β ,8 α)- 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4-metileno-1-(1-metiletil)- naftaleno (5.255%) y el alloaromadendreno (4.79%) En el Cuadro 10 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro10. Compuestos volátiles identificados en la muestra M4 mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
1	3-metil-3-Buten-1-ol	0.31	57.38	758.56	757	EM/IR	86	C ₅ H ₁₀ O
2	(n)- 1-pentanol	0.15	76.53	776.82	775	EM/IR	88	C ₅ H ₁₂ O
3	(R*,R*)- α -(1-aminoetil)-benceno metanol	0.90	87.53	787.3	-----	EM	151	C ₉ H ₁₃ NO
4	2-metil-4-pental	0.33	110.68	809.37	-----	EM	98	C ₆ H ₁₀ O
5	2-hexenal	0.71	166.53	862.61	860	EM/IR	98	C ₆ H ₁₀ O

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico

Cuadro10. Compuestos volátiles identificados en la muestra M4 mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
6	(2Z)-hexenol	0.97	174.38	870.1	867	EM/IR	100	C ₆ H ₁₂ O
7	(2E)-hexen-1-ol	1.95	176.08	871.72	874	EM/IR	100	C ₆ H ₁₂ O
8	1-hexanol	1.68	197.38	892	-----	EM	102	C ₆ H ₁₄ O
9	α-pineno	0.83	242.13	941.02	939	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
10	β-pineno	0.30	277.98	981.43	979	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
11	2-octanona	2.04	291.78	996.99	991	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
12	p-cimeno	0.55	301.38	1012.8	1015	EM/IR	151	C ₉ H ₁₃ NO
13	3-octanol	0.71	302.88	1015.6	-----	EM	98	C ₆ H ₁₀ O
14	1-metil-3-(1-metiletil)-benceno	0.11	314.98	1037.9	1033	EM/IR	98	C ₆ H ₁₀ O
15	limoneno	0.53	316.23	1040.2	1039	EM/IR	100	C ₆ H ₁₂ O
16	eucaliptol	0.52	317.03	1041.7	1044	EM/IR	100	C ₆ H ₁₂ O
17	(3S)-etil-4-metilpentanol	0.52	319.03	1045.4	-----	EM	102	C ₆ H ₁₄ O
18	γ-terpineno	0.36	328.33	1062.5	1062	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
19	trans-hidratodepineno	0.37	361.93	1124.5	1122	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
20	neo-allo-ocimeno	0.65	375.08	1148.8	1144	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
21	(3Z)-3,7- dimetil-3,6-octadienal	0.15	383.88	1165	1164	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
22	2-metil-2-octen-4-ol	0.07	391.33	1178.7	-----	EM	130	C ₈ H ₁₈ O
23	2-metil-5-(1-metiletenil)ciclohexanona	0.14	398.83	1192.6	1192	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
24	1,2,3-trimetil-ciclopenteno	0.14	399.08	1193	-----	EM	136	C ₁₀ H ₁₆
25	2 -metil-5-(1 - metiletil)-trans-ciclohexanona	0.10	402.88	1200.1	1199	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
26	3-ciclohexen-1-ol, 4-metil-1- (1 -metiletil)-acetato	0.17	447.03	1302.2	1299	EM/IR	130	C ₈ H ₁₈ O
27	α-cubeno	0.12	461.78	1336.3	1336	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
28	β-bourboneno	1.19	466.58	1347.4	1347	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
29	4-etenil-4-metil-3-(1-metiletenil)-1-(1-metiletil)-, (3R-trans)-ciclohexeno	2.77	468.23	1351.3	1347	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

Cuadro10. Compuestos volátiles identificados en la muestra M4 mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
30	α -copaeno	0.35	472.58	1361.3	1361	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
31	2,4,4-trimetil-3-(3-metilbutil)ciclohex-2-enona	0.35	472.98	1362.2	-----	EM	142	C ₉ H ₁₈ O
32	cariofileno	0.75	491.18	1405	1406	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
33	aromadendreno	0.72	1426.00	1423	1426	EM/IR	110	C ₈ H ₁₄
34	humuleno	0.22	509.93	1455.3	1455	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
35	alloaromadendreno	4.49	512.33	1461.7	1461	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
36	seichelleno	0.83	514.08	1466.4	-----	EM	108	C ₄ H ₄ N ₄
37	[S-(E,E)]-1,6-1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)Ciclododecadieno	5.79	518.53	1478.3	1477	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
38	(1 α ,4 β ,8 α)-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4-metileno-1-(1-metiletil)-naftaleno	5.25	519.53	1481	1485	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
39	(1S-cis)-1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	3.19	523.18	1490.8	1494	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
40	2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol	3.37	531.43	1512.9	1512	EM/IR	206	C ₁₄ H ₂₂ O
41	1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetil-naftaleno	1.24	543.23	1544.5	-----	EM	174	C ₁₃ H ₁₈
42	β -calacoreno	0.35	549.88	1562.3	1563	EM/IR	200	C ₁₅ H ₂₀
43	óxido-cariofieno	0.17	555.98	1578.6	1577	EM/IR	220	C ₁₅ H ₂₄ O
44	[1S-(1 α ,4 α ,8 α)]-1,2,4,5,8,8-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	0.17	556.23	1579.3	-----	EM	204	C ₁₅ H ₂₄
45	cadala-1(10),3,8-trieno	0.17	557.63	1583.1	-----	EM	202	C ₁₅ H ₂₂
46	cadina-1(10),6,8-trieno	0.35	563.33	1598.3	-----	EM	202	C ₁₅ H ₂₂
47	ácido propanoico-2-metil-, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil ester	0.35	564.33	1601.2	-----	EM	286	C ₁₆ H ₃₀ O ₄

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

En la muestra M-5 se logró la identificación de 26 compuestos. Los compuestos mayoritarios presentes en la especie M-5 fueron alcoholes como el (2Z)-hexen-1-ol (8.36%), cicloalcanos como el propil-ciclopropano (8.11%), y el alioaromadendreno (8.1755%). En el Cuadro 11 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro 11. Compuestos volátiles identificados en la muestra M5 mediante la metodología de Kovats.

1	1,4-hexadieno	6.12	180.16	875.61	-----	EM	82	C ₆ H ₁₀
2	(2Z)-hexen-1-ol	8.36	200.31	894.82	-----	EM	100	C ₆ H ₁₂ O
3	propil ciclopropano	8.11	203.16	897.53	-----	EM	84	C ₆ H ₁₂
4	β-pineno	0.28	277.21	980.57	980	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
5	mirceeno	1.34	290.81	995.9	990	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
6	< δ-3->Careno	0.31	300.71	1011.6	1011	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
7	p-cimeno	2.97	315.16	1038.2	1034	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
8	limoneno	2.89	316.01	1039.8	1039	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
9	2-etil-1-hexanol	0.31	323.46	1053.5	-----	EM	130	C ₈ H ₁₈ O
10	γ-terpineno	0.73	327.81	1061.6	1062	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
11	1-metil-4-(1-metiletilideno)-ciclohexeno	1.05	349.21	1101	-----	EM	136	C ₁₀ H ₁₆
12	cis-1-metil-4-(1-metiletil)-2-ciclohexen-1-ol	0.17	361.81	1124.3	1124	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
13	α-cubebeno	0.22	461.31	1335.3	1336	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
14	α-copaeno	0.61	481.76	1382.6	1380	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
15	cariofilleno	1.40	490.76	1403.9	1400	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
16	[1R-(1R*,4Z,9S*)]-biciclo[7.2.0]undec-4-eno, 4,11,11-trimetil-8-metileno	0.70	497.66	1422.4	1418	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

Cuadro 11. Compuestos volátiles identificados en la muestra M5 mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
17	Cedreno	0.70	498.21	1423.9	-----	EM	204	C ₁₅ H ₂₄
23	humuleno	0.78	509.96	1455.4	1455	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
18	alloaromadendreno	8.18	512.36	1461.8	1461	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
19	[S-(E,E)]-1,6-ciclodecadieno, 1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)	4.30	519.51	1480.9	1480	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
20	γ-muroлено	3.54	525.21	1496.2	1494	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
21	(1S-cis)- 1,2,3,5,6,8-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	3.54	526.01	1498.4	1502	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
22	(1α,4β,8α) 1,2,3,4,4,5,6,8-octahidro-7-metil-4-metileno-1-(1-metiletil)-naftaleno	7.52	531.76	1513.8	1513	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
23	α-muroлено	3.24	533.21	1517.7	1518	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
24	1,2,4,5,6,8-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	0.91	547.66	1556.4	-----	EM	204	C ₁₅ H ₂₄
25	β-calacoreno	0.28	549.86	1562.3	1563	EM/IR	200	C ₁₅ H ₂₀
26	α-vatireno	0.25	563.71	1599.4	-----	EM	202	C ₁₅ H ₂₂

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

En la muestra M6 se logró la identificación de 29 compuestos. Los compuestos mayoritarios fueron el [4R-(4α,7α,8β)]-decahidro-4a-metil-1-metileno-7-(1-metiletenil)-naftaleno(6.44%), cicloalcanos como propil ciclopropano (5.75%) y el 3,4-bis(1,1-dimetiletil)-2,2,5,5-tetrametil-hexano(5.95%). En el Cuadro 12 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro12. Compuestos volátiles identificados en la muestra M6 mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
1	<i>tert</i> -butil 2-cloro-3-(4-cloro-2-vinil-1,3-oxazol-5-Il)-1H-indol-1-carboxilato	0.24	57.36	758.55	-----	EM	378	C ₁₈ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O ₃
2	(R*,R*)- α-(1-aminoetil)-bencenometanol	1.44	90.76	790.39	-----	EM	151	C ₉ H ₁₃ NO
3	(2E)-hexen-1-ol	4.83	176.16	871.8	874	EM/IR	100	C ₆ H ₁₂ O
4	3,4-bis(1,1-dimetil-etil)-2,2,5,5-tetrametil-hexano	5.95	194.16	888.96	-----	EM	254	C ₁₈ H ₃₈
5	Propilciclopropano	5.75	197.11	891.77	-----	EM	84	C ₆ H ₁₂
6	α-pineno	0.65	236.56	934.74	935	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
7	β-mirceno	0.33	274.76	977.81	978	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
8	α-fellandreno	0.28	300.66	1011.5	1011	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
9	1-metil-3-(1-metiletil)-benceno	1.18	314.66	1037.3	1037	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
10	limoneno	1.09	315.86	1039.5	1039	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
11	2-etil-1-hexanol	0.22	323.76	1054.1	-----	EM	130	C ₈ H ₁₈ O
12	(1E)-3,7-dimetil-3,6octatrieno	1.45	328.11	1062.1	1061	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
13	<i>cis</i> -1-metil-4-(1-metiletil)-2-ciclohexen-1-ol	0.18	362.16	1124.9	1124	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
14	(2E,4Z)-2,6-dimetil-6 octatrieno	1.53	374.21	1147.2	1146	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
15	biciclo[3.1.0] 6-isopropilideno-1-metil-hexano	0.87	466.06	1346.2	-----	EM	136	C ₁₀ H ₁₆
16	β-bourboneno	0.87	466.56	1347.4	1347	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
17	ylangeno	0.72	481.86	1382.8	1377		204	C ₁₅ H ₂₄
18	β-cubebeno	1.38	484.96	1390	1385	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
19	α-bourboneno	1.40	488.21	1397.5	1394	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
20	cariofilleno	0.87	490.71	1403.8	1400	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

Cuadro 12. Compuestos volátiles identificados en la muestra M6 mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
21	[1R-(1R*,4Z,9S*)]-biciclo[7.2.0]undec-4-eno, 4,11,11-trimetil-8-metileno	0.49	497.01	1420.7	1418	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
22	Humuleno	1.54	507.36	1448.4	1447	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
23	(1S-cis)-1,2,3,5,6,8-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	3.46	511.16	1458.6	1454	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
24	[4R-(4 α ,7 α ,8 β)]-decahidro-4 α -metil-1-metileno-7-(1-metiletenil)-naftaleno	6.44	518.66	1478.7	1479	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
25	[S-(E,E)]-1,6-1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)ciclododecadieno	3.45	524.51	1494.3	1496	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
26	α -farneseno	2.40	530.71	1511	1511	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
27	β -bisaboleno	2.40	531.06	1511.9	1512	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
28	8-(2-Acetiloxiran-2-il)-6,6-dimetilocta-3,4-dien-2-one	3.63	534.96	1522.3	-----	EM	236	C ₁₄ H ₂₀ O ₃
29	trimetil-1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-naftaleno	1.59	542.91	1543.6	-----	EM	174	C ₁₃ H ₁₈

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

En la muestra M-7 se logró la identificación de 10 compuestos. Los compuestos mayoritarios son alquenos como el 2,3-octanodieno (24.427%), alcoholes 1-nonen-3-ol (23.844%), aldehídos como el hexanal (11.17%). En el Cuadro 13 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro 13. Compuestos volátiles identificados en la muestra M7 mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
1	3-metil-Butanal	5.01	50.68	752.17	-----	EM	86	C ₅ H ₁₀ O
2	(3Z)-hexenal	4.60	110.83	809.51	-----	EM	98	C ₆ H ₁₀ O
3	hexanal	11.17	112.53	811.14	810	EM/IR	100	C ₆ H ₁₂ O
4	2-mercapto-etilamina	11.17	114.23	812.76	-----	EM	77	C ₂ H ₇ NS
5	2-hexenal	9.55	168.98	864.95	865	EM/IR	98	C ₆ H ₁₀ O
6	2,3-octanodieno	24.43	294.13	999.64	993	EM/IR	142	C ₈ H ₁₄ O ₂
7	1-nonen-3-ol	23.84	294.73	1000.5	-----	EM	142	C ₉ H ₁₈ O
8	2-octanol	0.59	302.88	1015.6	1010	EM/IR	130	C ₈ H ₁₈ O
9	(3E)-hexen-1-ol, acetato	3.80	304.73	1019	1018	EM/IR	142	C ₈ H ₁₄ O ₂
10	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	0.83	362.48	1125.5	-----	EM	154	C ₁₀ H ₁₈ O

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

En la muestra M-8 se logró la identificación de 8 compuestos. Los compuestos mayoritarios fueron alcoholes como 3-metil-3-buten-1-ol (39.83%), aldehídos como pentanal (41.965%), terpenos como α -pineno (5.535%). En el Cuadro 14 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro 14. Compuestos volátiles identificados en la muestra M8 mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
1	3-metil 3-buten-1-ol	39.83	48.14	749.76	746	EM/IR	86	C ₅ H ₁₀ O
2	pentanal	41.97	50.04	751.57	-----	EM	86	C ₅ H ₁₀ O
3	hexanal	1.01	111.64	810.29	810	-----	100	C ₆ H ₁₂ O
4	α -pineno	5.53	241.74	940.58	940	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
5	camfeno	3.64	255.74	956.37	955	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
6	β -pineno	2.08	277.69	981.11	981	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

Cuadro 14. Compuestos volátiles identificados en la muestra M8 mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
7	1-hexen-3-ol	5.19	293.59	999.04	-----	EM	100	C ₆ H ₁₂ O
8	3-etil-2-metil-2-pentanol	0.74	367.29	1134.4	-----	EM	130	C ₈ H ₁₈ O

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

En la muestra M8-1 se logró la identificación de 10 compuestos. Los compuestos mayoritarios fueron aldehídos como pentanal (56.90%), octanal (16.120%) y alcoholes como el 1-pentanol (12.45%). En el Cuadro 15 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro 15. Compuestos volátiles identificados en la muestra de M8-1 mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
1	pentanal	56.90	48.46	750.06	-----	EM	86	C ₅ H ₁₀ O
2	1-pentanol	12.45	74.21	774.61	778	EM/IR	88	C ₅ H ₁₂ O
3	N-carbobenciloxi-cisteinilcisteina	3.25	86.46	786.28	-----	EM	358	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅ S ₂
4	α-pineno	3.61	241.21	939.98	939	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
5	camfeno	1.55	255.11	955.65	955	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
6	β-pineno	1.51	277.36	980.74	980	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
7	octanal	16.20	291.96	997.2	997	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
8	5,5-dimetil-1,3-hexadieno	1.26	398.71	1192.4	-----	EM	110	C ₈ H ₁₄
9	2,6,10,14-tetrametil-heptadecano	2.79	440.26	1286.6	-----	EM	296	C ₂₁ H ₄₄

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

Cuadro 15. Compuestos volátiles identificados en la muestra M8-1 mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
10	ácido propanoico, 2-metil-, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil ester	0.48	564.06	1600.4	-----	EM	286	C ₁₆ H ₃₀ O ₄

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

En la muestra M-9 fueron identificados 27 compuestos. Los compuestos mayoritarios fueron aldehídos como octanal (24.338%), el 1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetil-naftaleno(4.6047%) y el aromadendreno (3.89%) En el Cuadro 16 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro 16. Compuestos volátiles identificados en la muestra M9 mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
1	1-pentanol	0.08	77.16	777.42	778	EM/IR	88	C ₅ H ₁₂ O
2	α-pineno	2.42	241.66	940.49	940	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
3	camfeno	0.79	0.79	255.362	955	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
4	β-pineno	0.39	277.81	981.25	981	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
5	octanal	24.34	292.96	998.33	997	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
6	8-metil-1,8-nonanediol	0.52	366.86	1133.6	-----	EM	174	C ₁₀ H ₂₂ O ₂
7	β-bourboneno	1.54	465.96	1346	1347	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
8	α-cubebeno	0.74	472.16	1360.4	1361	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
9	ylangeno	0.68	481.61	1382.2	1378	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
10	copaeno	1.78	484.41	1388.7	1384	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

Cuadro 16. Compuestos volátiles identificados en la muestra M9 mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
12	cariofileno	0.59	491.06	1404.7	1406	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
14	humuleno	2.54	505.76	1444.1	1442	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
15	[S-(E,E)]-1,6-1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)-ciclododecadieno	2.54	506.31	1445.6	1450	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
16	aromadendreno	3.89	510.06	1455.6	1460	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
17	3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	2.69	516.61	1473.2	-----	EM	136	C ₁₀ H ₁₆
19	(1 α ,4 β ,8 α)-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4-metileno-1-(1-metiletil)-naftaleno	0.43	525.21	1496.2	1496	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
20	(1S-cis)-1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	3.32	530.36	1510	1509	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
21	β -bisaboleno	1.74	531.76	1513.8	1512	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
22	1,2,3,4-tetrahydro-1,1,6-trimetil-naftaleno	4.60	542.01	1541.2	-----	EM	174	C ₁₃ H ₁₈
23	β -calacoreno	0.52	549.71	1561.9	1560	EM/IR	200	C ₁₅ H ₂₀
24	ácido propanoico, 2-metil-, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil ester	0.55	563.86	1599.8	-----	EM	286	C ₁₆ H ₃₀ O ₄
25	α -bisabolol	2.01	591.21	1686.1	1688	EM/IR	222	C ₁₅ H ₂₆ O
26	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano-	0.95	601.91	1719.9	-----	EM	296	C ₂₁ H ₄₄
27	isopropil miristato	0.61	642.81	1851.3	-----	EM	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

En la muestra M9-1 se logró la identificación de 24 compuestos. Los compuestos mayoritarios fueron terpenos como alloaromadendreno (10.61%), [*S-(E,E)*]-1,6-1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)-ciclododecadieno(9.17%) y selina-3,7(11)-dieno (5.435%) En el Cuadro 17 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro17. Compuestos volátiles identificados en la muestra M9-1 mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Metodo de identificación	Peso	Fórmula
1	(2 <i>E</i>)-hexen-1-ol	0.12	177.80	873.36	874	EM/IR	100	C ₆ H ₁₂ O
2	α-pineno	0.51	241.90	940.76	939	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
3	β-pineno	0.24	277.85	981.29	979	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
4	3-octanona	2.34	293.90	999	999	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
5	octanal	2.34	299.65	1009.6	1007	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
6	3-octanol	1.38	306.85	1022.9	-----	EM	130	C ₈ H ₁₈ O
7	eucaliptol	0.24	319.85	1046.9	1044	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
8	borneol	0.20	362.20	1125	1130	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
9	β-bourboneno	1.49	466.80	1347.9	1347	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
10	α-cubebeno	0.35	472.65	1361.5	1360	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
11	α-copaeno	0.79	482.65	1384.6	1380	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
12	[1 <i>S</i> -(1α,2β,4β)]- 1-etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletetil)-ciclohexano	2.09	486.05	1392.5	1392	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
13	cariofilleno	1.58	489.30	1400	1400	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
14	alloaromadendreno	10.61	507.35	1448.4	1451	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
15	[<i>S-(E,E)</i>]-1,6-1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)-ciclododecadieno	9.17	511.50	1459.5	1460	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
16	humuleno	2.93	516.15	1471.9	1474	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
17	(1α,4β,8α)-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4-metileno-1-(1-metiletil)naftaleno	3.52	521.55	1486.4	1483	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

Cuadro17. Compuestos volátiles identificados en la muestra M9-1 mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
18	α -muroleno	3.36	527.40	1502.1	1502	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
19	(1S-cis)-1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	3.36	528.60	1505.3	1505	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
20	(1 α ,4 β ,8 α)-1,2,3,4,4,5,6,8-octahidro-7-metil-4-metileno-1-(1-metiletil)-naftaleno	2.27	534.00	1519.8	1518	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
21	1,2,4,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	5.09	536.40	1526.2	1526	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
22	Selina-3,7(11)-dieno	5.43	544.60	1548.2	1547	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
23	β -calacoreno	0.40	552.10	1568.3	1566	EM/IR	200	C ₁₅ H ₂₀
24	α -calacoreno	0.13	558.20	1584.6	1580	EM/IR	200	C ₁₅ H ₂₀

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

En la muestra M-10 se logró la identificación de 26 compuestos. Los compuestos mayoritarios fueron aldehídos como octanal (15.45%), alcoholes como 1-octen-3-ol (19.133%), y cetonas como la 3,6-dimetil-4-octanona (15.26%). En el Cuadro 18 se muestran los compuestos identificados.

Cuadro18. Compuestos volátiles identificados en la muestra M10 mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Método de identificación	Peso	Fórmula
1	3-metil-butanal	5.48	50.19	751.71	-----	EM	86	C ₅ H ₁₀ O
2	hexanal	2.08	109.99	808.72	810	EM/IR	100	C ₆ H ₁₂ O
3	2-hexenal	1.10	167.59	863.63	860	EM/IR	98	C ₆ H ₁₀ O
4	α-pineno	0.15	241.74	940.58	940	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
5	3,6-dimetil-4-octanona	15.26	294.54	1000.2	-----	EM	156	C ₁₀ H ₂₀ O
6	octanal	15.45	296.34	1003.5	1003	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
7	1-octen-3-ol	19.13	308.94	1026.7	-----	EM	128	C ₈ H ₁₆ O
8	2-etil-1-hexanol	5.91	314.19	1036.4	1034	EM/IR	130	C ₈ H ₁₈ O
9	3,3,6-trimetil-1,5-heptadien-4-ona	0.06	317.29	1042.2	1044	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
10	(S)-3-etil-4-metilpentanol	1.10	324.24	1055	-----	EM	130	C ₈ H ₁₈ O
11	(1E)-3,6-3,7-dimetil octatrieno	0.14	329.99	1065.6	1061	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
12	(2E)-octen-1-ol	0.14	330.79	1067.1	1067	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
13	cis-1-metil-4-(1-metiletil)-2-ciclohexen-1-ol	2.84	364.29	1128.9	1129	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
14	3,7-dimetil-3-octanol	0.11	368.49	1136.6	1134	EM/IR	158	C ₁₀ H ₂₂ O
15	2,3-dimetil-1,4-hexadieno	0.01	400.14	1195	-----	EM	110	C ₈ H ₁₄
16	3,7-dimetil-,formate - 2,6-octadien-1-ol	0.07	446.94	1302	1301	EM/IR	182	C ₁₁ H ₁₈ O ₂
17	β-bourboneno	0.22	466.04	1346.2	1347	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
18	α-copaeno	0.13	484.29	1388.4	1385	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
19	cariofilleno	1.29	502.69	1435.9	1435	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
20	aromadendreno	0.88	509.89	1455.2	1452	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
21	[S-(E,E)]-1,6-ciclodecadieno, 1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)	1.09	517.94	1476.8	1477	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
22	hexadecano	0.35	531.74	1513.7	-----	EM	226	C ₁₆ H ₃₄
23	(1S-cis)- 1,2,3,5,6,8-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	0.35	539.69	1535	1534	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

Cuadro18. Compuestos volátiles identificados en la muestra M10 mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Area	T.R. (s)	(a) RI e	(b) RI t	Metodo de identificación	Peso	Fórmula
24	1,2,3,4-tetrahidro-1,6,8-trimetil-naftaleno	0.35	541.74	1540.5	-----	EM	174	C ₁₃ H ₁₈
25	ácido propanoico, 2-metil-, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil ester	0.34	564.04	1600.3	-----	EM	286	C ₁₆ H ₃₀ O ₄
26	1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno	0.13	598.74	1709.9	-----	EM	198	C ₁₅ H ₁₈

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5; (a): Índice de retención experimental redondeado; (b): Índice de retención teórico.

Cuadro19. Compuestos volátiles mayoritarios identificados en las muestras de salvias mediante la metodología de Kovats.

	M1	M1-2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M8-1	M9	M9-1	M10
Compuestos mayoritarios.												
octanal	30.05%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	16.1%	24.3%	0%	15.4%
<i>n</i> -octanona	28.8%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>n</i> -hexanol	4.8%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1-Nonen-3-ol	0%	81.0%	0%	0%	0%	0%	23.8%	0%	0%	0%	0%	0%
3-octanol	0%	8.7%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
propil-ciclopropano	0%	5.3%	0%	0%	8.1%	5.75%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
2-octanol	0%	0%	73.9%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
(3S)-etil-4-metilpentanol	0%	0%	19.7%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
ácido propanoico 2-metil-,1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil ester	0%	0%	5.3%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
(1 α ,4 β ,8 α)-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4-metileno-1-(1-metiletil)-naftaleno	0%	0%	0%	5.25%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
[S-(E,E)]-1,6-1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)-ciclododecadieno	0%	0%	0%	5.7%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	9.17%	0%
alloaromadendreno	0%	0%	0%	4.7%	8.1%	0%	0%	0%	0%	0%	10.6%	0%
(2Z)-hexen-1-ol	0%	0%	0%	0%	8.3%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
[4R-(4 α ,7 α ,8 β)]-decahidro-4a-metil-1-metileno-7-(1-metiletenil)-naftaleno	0%	0%	0%	0%	0%	6.4%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
3,4-bis(1,1-dimetiletil)-2,2,5,5-tetrametilhexano	0%	0%	0%	0%	0%	5.95%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
2,3-Octanodieno	0%	0%	0%	0%	0%	0%	24.4%	0%	0%	0%	0%	0%
Hexanal	0%	0%	0%	0%	0%	0%	11.1%	0%	0%	0%	0%	0%
Pentanal	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	41.9%	56.8%	0%	0%	0%
3-metil-3-Buten-1-ol	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	39.8%	0%	0%	0%	0%
α -Pino	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	5.3%	0%	0%	0%	0%
1-pentanol	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	12.4%	0%	0%	0%
1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetil-naftaleno	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	4.6%	0%	0%
aromadendreno	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	3.8%	9.1%	0%
selina-3,7(11)-diene	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	5.4%	0%
1-octen-3-ol	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	19.1%
3,6-dimetil-4-octanona	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	15.2%

Para poder realizar la identificación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de Salvias se utilizó la técnica de cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Para el análisis de los compuestos volátiles, se incluyó el cálculo de índices de retención (IR), el análisis de los espectros de masas y la inyección de los compuestos estándares.

Para la identificación de los compuestos volátiles mediante la metodología de Kovats, se utilizaron como estándares externos una mezcla de hidrocarburos constituida por una serie homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₂₄), el proceso de elución se realizó utilizando las mismas condiciones cromatográficas que para las muestras.

Como se puede observar en el Cuadro 19 los compuestos mayoritarios presentes en las especies de salvias fueron principalmente alcoholes y aldehídos, uno de los aldehídos mayoritarios fue el octanal, este aldehído se identificó en proporciones elevadas en las muestras M-1, M8-1, M-9 y en M-10, este aldehído se ha encontrado como compuesto volátil en frutas, verduras, flores, y muchas especies de árboles, se utiliza principalmente en la industria alimentaria como saborizante y en la industria de la perfumería, en la preparación de aceites sintéticos de cítricos [35].

El pentanal se identificó también en proporciones elevadas en las muestras M8 y M8-1, este aldehído se ha encontrado como compuesto volátil en diversas especies de plantas y se utiliza principalmente como agente saborizante en la industria de alimentos [35].

Otro de los compuestos mayoritarios fue el 2-octanol, se identificó en proporción elevada en la muestra M-3, este alcohol se utiliza principalmente en la industria de la perfumería y en la industria de los cosméticos [35-36].

Cabe señalar que en las especies de salvias analizadas también se encontraron compuestos terpenoides aunque en menor proporción. El monoterpeno que se encontró con mayor frecuencia fue el α -pineno (M-4, M-6, M-8, M8-1, M-9 M9-1,

M-10). Este compuesto se encuentra presente en los aceites de numerosas especies de árboles de las coníferas en particular el pino, también se encuentra en los aceites esenciales del romero, eucalipto y de la cáscara de naranja. El α -pineno es un broncodilatador en los seres humanos y parece ser un antibiótico de amplio espectro [37-38]. La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas, son compuestos fenólicos, terpenos, aldehídos y cetonas es por esta razón que las especies de salvas estudiadas presentaron actividad antimicrobiana con la bacteria *S. mutans* [32].

Por último, se evaluó el efecto de los extractos de salvas sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans*, se utilizó el método de microdilución en placa de 96 pozos. Los resultados de esta evaluación se resumen en la cuadro 20.

Cuadro 20. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) obtenidas para las especies de salvas evaluadas.

Muestra evaluada	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
M1	250
M1-2	500
M3	>1000
M4	>1000
M5	>1000
M6	>1000
M7	>1000
M8	250
M8-1	250
M9	>1000
M9-1	>1000
M10	250
CHX ^a	0.012

^aGluconato de clorhexidina

Los resultados de esta evaluación indican que las muestras M1, M1-2, M8, M8-1 y M10 presentaron las mejores CMI con un rango de 250 a 500 $\mu\text{g/mL}$, estas concentraciones pueden considerarse medianamente activas al compararlas con la CMI obtenida por el gluconato de clorhexidina (0.012 $\mu\text{g/mL}$) que se utilizó como

control positivo; mientras que las fracciones restantes presentaron concentraciones por encima de la concentración límite de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se desarrolló y se optimizó el método analítico para la extracción, separación, concentración y el análisis de los compuestos volátiles de las muestras de salvas, utilizando la técnica acoplada FG-MEFS-CG-EM-TV por sus siglas en español.

El análisis de las doce muestras de salvas recolectadas en el Estado de Oaxaca mediante la técnica FG-MEFS-CG-EM-TV permitió la identificación de 223 compuestos.

Los compuestos mayoritarios identificados en las muestras de salvas fueron aldehídos y alcoholes, estos compuestos se utilizan principalmente como agentes saborizantes en la industria de los alimentos.

Unos de los compuestos identificados en casi todas las muestras fue el monoterpeno α -pineno. La abundancia de este compuesto fue notablemente diferente en las muestras analizadas y su presencia puede explicar parcialmente la actividad antibacteriana encontrada para las muestras de salvia.

El nonenol fue el compuesto con mayor abundancia en las muestras analizadas con una abundancia de 81% en la muestra M1-2. Por otra parte, el pentanal fue el compuesto que se encontró en mayor proporción en las muestras M8 y M8-1 con una abundancia de 41.9% y 56.8%.

Las muestras M1, M1-2, M8, M8-1 y M10 presentaron las mejores CMI's con un rango de 250 a 500 $\mu\text{g/mL}$, mientras que las fracciones restantes tuvieron concentraciones por encima de la concentración límite de 1000 $\mu\text{g/mL}$

PERSPECTIVAS

1. Realizar una nueva recolección de las especies de salvias con mayor actividad biológica con la finalidad de aislamiento de los compuestos responsables de la actividad antibacteriana.
2. Recolectar e identificar una mayor cantidad de especies de salvias con la finalidad de determinar los compuestos característicos de cada una de ellas.
3. Determinar la actividad del extracto metanólico de las salvias sobre bacterias responsables de infecciones de la cavidad oral y del tracto digestivo.

Referencias Bibliográficas.

- 1) Salanki, A.; Kutty, S.K. **Plant –derived compounds in clinical trials.** Drugs. Discov. Today 2008, 13: 161-171.
- 2) Newman, D.J.; G.m; Sander, K. M. **Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002;** J. Nat. Prod. 2003, 66:1022-1037.
- 3) Angelis, D.;Leite, M.F.; Sousa, J.P.B.; Alonso, L; Polizello, A.C.M.; Groppo, M; Aires; C.P.; Spadaro, A.C.C. **Inhibiting effects of *Dorstenia asaroides* extracts on cariogenic properties of *Streptococcus mutans*.**Clinical microbiology. 2012,31-36.
- 4) Cornejo, G.; Ibarra, G. **Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacan, México.** 2010.
- 5) Benthán, G.; Labiate in Betham, G. and Hooker J.D. **Genera Plantarum 1986,** 2 1160-1223, Reve and Co. London.
- 6) Espejo. A.; Ramamoorthy. **Revisión Taxonómica de *Salvia* sección *Sigmoideae* (Lamiaceae).** Acta Botanica Mexicana, Num 23, 1993, 65-102.
- 7) Dieringer, G.T.; Ramamoorthy; Tenorio, L.P. **Floral visitors and their behavior to sympatic *Salvia* species (Lamiaceae) in Mexico.** Acta Botanica Mexicana 1999, 75-83.
- 8) Prisinzano, T.E.; **Natural products as tools for neuroscience:Discovery and development of new agents to treat drugs abuse,** J. Nat. Prod. 2009,72:581-587.
- 9) Clebsch, B. **The new book of *Salvias*,** Timber Press 2003,269.
- 10)Aguilar, A.; Camacho, J.R.; Chino, S.; Jácquez, P.; Lopez, M.E. **Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social, Instituto Mexicano del Seguro Social,México, D.F.** 1994,107-110.
- 11)**Flora medicinal Indígena de México,** Instituto Nacional Indigenista 1994, Vol. 1, Tomo 3, 1228,1292.

- 12) **Flora medicinal Indígena de México**, Instituto Nacional Indigenista 1994, Vol 1, Tomo 2, 672, 696, 738, 928.
- 13) Pakhomov, G. N. **Oral Health Programme. Division of Non-communicable Diseases**. World Health Organization, 1997, 27-32.
- 14) Urzua, I.; Stanke, F. **Nuevas Estrategias en la cariología: Factores de riesgos y tratamiento**. 1999, 13-30; 39-45; 50-52: 59-61.
- 15) Chung, J. Y.; Choo, J.H; Lee, M. H; Hwang, J.K. **Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans***. Phytomedicine Vol. 13, 2006, 261-266.
- 16) Madigan, M.; Martinko, J. ; Parker, J. Brock **Biología de los microorganismos** , 10^a edición, Pearson educación 2003.
- 17) Sierralta, J. **Efecto del extracto acuoso de *Chenopodium ambrosioides* (paico) sobre el crecimiento e inhibición del factor de adherencia de *S. mutans* in vitro**. Facultad de Odontología , Lima Peru. 2005.
- 18) Sporkert, F.; Pragst, F. **Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds**. Science International, 2000, 129-148.
- 19) Lord, H.; Pawliszyn, J. **Evolution of solid-phase microextraction technology**. Journal of Chromatography. A. 2000, 885: 153-193.
- 20) Alpendurada, M.F. **Solid-phase microextraction a promising technique for simple preparation in environmental analysis**. Journal of Chromatography A. 2000, 889: 3-14.
- 21) Arthur, C.L.; Pawliszyn. **Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical**. Fibers Analytical Chemistry. 1990, 62: 2145-2148.
- 22) Constant, M. **Headspace gas chromatography profiles of fruitflavored malt beverages using solid-phase microextraction**. J. Am. Soc. Brew. Chem. 1997. 1997, 55: 112-118.
- 23) Aranda, R.; Kruss, P. ; Burk, R.C. **Assessment of polycrystalline graphites as sorbents for solid-phase microextraction of nonionic surfactants**. Journal of Chromatography A. 2000, 888: 35-41.
- 24) Fries, E.; Puttmann, W. **Improvement of HS-SPME for analysis of volatile organic compounds (VOC) in water samples by simullane**

- ous direct fiber cooling an freezing analyte solution.** Analytical Bioanalytical Chemistry, 2006 386: 1449-1506.
- 25) Skoog. Douglas A.; Holler, F. James; Crouch, Stanley R. **Principios de análisis instrumental**, 6a edición. Cengage Learning. Mexico 2008. 788-800.
- 26) Rubinson, J.; Rubinson, N. **Análisis instrumental**. Editorial Prentice Hall. Madrid, 2000, 782.
- 27) Barquero Quiros, Miram. **Principios y Aplicaciones de la cromatografía de gases**. 1ª edición. Editorial de Costa Rica. Costa Rica, 2006, 28-30.
- 28) Cañigueral, S.; Vila, R. **Los aceites esenciales en fitoterapia**. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Vol 6, num 5, Universidad de Chile, 2007, 146.
- 29) Fries, Elke y Püttmann, Wilhelm. **Improvement of HS-SPME for analysis of volatile organic compounds (VOC) in water samples by simultaneous direct fiber cooling and freezing analyte solution**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 286: 1497-1503.
- 30) Zenkevich, I. **Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation Application of the modified method of double internal standard**. Journal of Chromatography, 2006, 1150, 117-23
- 31) King, A. J., **The application of solid-phase micro-extraction (SPME) to the analysis (PAHs)**. Environmental Geochemistry and Health, 2003, 25, 69-75.
- 32) Marrero, D. D., Morales, R. C., Gonzalez, C. V., Sierra, P. R., **Determinación por CG-EM de los componentes del aceite de semillas de *Salvia coccinea***. Revista CENIC Ciencias Químicas, 2013, 44:93-95.
- 33) Pisseri, F., **Essential oils in medicine: principles of therapy**. Parassitologia 2008, 50:9-91.
- 34) Pauli. A., Schilcher, H., **Handbook of Essential Oils: Science, Technology; and Applications**, editado por K.H.C Baser y G. Buchebauer (Taylor & Francis, Boca Raton, 2010). 2010
- 35) NCBI Pub Chem Substance.
- 36) Maryadale, J. O., **The merck index**, Merck Research Laboratories An encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals. Fourteenth edition, 2006.

- 37) Russo, E. B, **Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects**, *British Journal of Pharmacology* 2011, **163** (7): 1344–1364
- 38) Nissen L, Zatta A, Stefanini I, Grandi S, Sgorbati B, Biavati B, **Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (Cannabis sativa L.)**, *Fitoterapia* 2010, 81:413-419.