



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis químico por microextracción en fase sólida (HS-SPME-GC/MS-TOF) y por CG/EM de los componentes volátiles, así como del extracto de metanol de la planta medicinal *Santolina chamaecyparissus* L. (Asteraceae).

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

TANIA ANAID URRUTIA LÓPEZ



MÉXICO, CDMX.

AÑO 2018



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: Profesora: **MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS**
VOCAL: Profesor: **GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI**
SECRETARIO: Profesor: **ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ**
1er. SUPLENTE: Profesor: **MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO**
2do. SUPLENTE: Profesor: **MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, DIVISION
DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

SUSTENTANTE:

TANIA ANAID URRUTIA LÓPEZ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de estudiar y pertenecer a la “máxima casa de estudios”.

A los profesores de la UNAM que desde mi bachillerato y durante mis estudios profesionales me han aportado conocimientos valiosos que han sido fundamentales para mi desarrollo académico.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) por el apoyo económico otorgado a través del proyecto IN225017, a cargo de la Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

Especialmente agradezco a la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por todo el apoyo brindado y dedicación para la realización de este trabajo.

A los honorables miembros del jurado por sus pertinentes observaciones para el enriquecimiento de este trabajo.

Al personal técnico de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros para los análisis espectroscópicos, particularmente a la M. en C. Rosa Isela del Villar, M. en C. Nayelli López Balbiaux y a la Q. Marisela Gutiérrez.

A la Q. Georgina Duarte Lisci por el apoyo analítico y la asesoría brindada para el análisis de los componentes volátiles de la materia prima de esta tesis.

Especiales agradecimientos a los I.Q. Ramiro del Carmen y Roberto Díaz por la asistencia técnica informática.



ÍNDICE

Lista de abreviaturas	V
Lista de tablas	VI
Lista de figuras	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Características del género <i>Santolina</i>	2
2.1.1 Género <i>Santolina</i>	2
2.1.2 Distribución y hábitat.....	2
2.1.3 Composición química.....	3
2.2 Características de la especie <i>Santolina chamaecyparissus</i> L.....	3
2.2.1 Clasificación taxonómica.....	3
2.2.2 Descripción.....	4
2.2.3 Nombres comunes.....	5
2.2.4 Usos.....	5
2.2.5 Aceite esencial.....	5
2.3 Métodos analíticos y tratamiento de la muestra.....	10
2.3.1 Cromatografía de gases.....	10
2.3.2 Espectrometría de masas.....	11
2.3.3 Cromatografía de gases – Espectrometría de masas.....	12
2.3.4 Microextracción en fase sólida (SPME).....	13
2.3.4.1 Fundamentos teóricos de la SPME.....	14
2.3.4.2 Procedimiento de la SPME.....	15
2.3.4.3 Índice de retención de Kovats.....	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. OBJETIVOS	18
5. PARTE EXPERIMENTAL	19
5.1 Material y equipo utilizado.....	19
5.2 Recolección e identificación del material vegetal.....	20
5.3 Extracción.....	20



5.3.1 Obtención del extracto orgánico.....	20
5.3.2 Obtención del aceite esencial.....	20
5.4 Análisis químico del extracto de metanol.....	20
5.4.1 Fraccionamiento cromatográfico.....	20
5.4.2 Reacción general de acetilación.....	21
5.5 Determinación de los compuestos volátiles por microextracción en fase sólida (HS-SPME-EM-TOF) de las partes aéreas de <i>Santolina chamaecyparissus</i>	22
5.5.1 Acondicionamiento del cromatógrafo de gases.....	22
5.5.2 Preparación de las muestras para su análisis por SPME	23
5.5.3 Procesamiento de datos para el análisis por SPME.....	23
5.5.4 Identificación de los compuestos volátiles.....	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
6.1 Análisis del extracto de metanol.....	25
6.2 Obtención del aceite esencial.....	30
6.3 Determinación de los compuestos volátiles por microextracción en fase sólida (HS-SPME-EM-TOF) de las partes aéreas de <i>S.</i> <i>chamaecyparissus</i>	32
7. CONCLUSIONES.....	35
8. REFERENCIAS.....	36



LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Acetona-d6	Acetona deuterada
°C	Grado Celsius
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CG	Cromatografía de gases
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CHCl ₃	Cloroformo
DB-5	Fenil-polimetilsiloxano (5%)
DVB	Divinilbenceno
EM	Espectrometría de masas
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HP	<i>Head space</i> (Espacio de cabeza)
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IE	Ionización por impacto electrónico
IR	Espectro en el Infrarrojo
IK	Índice de Retención de Kovats
IK _e	Índice de Retención de Kovats experimental
IK _t	Índice de Retención de Kovats teórico
J	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m/z	Relación masa/carga
NaCl	Cloruro de sodio



NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
Na₂SO₄	Sulfato de sodio
(NH₄)₄Ce(SO₄)₄·2H₂O	Sulfato cérico amoniacal
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología)
nm	Nanómetro
PDMS	Polidimetilsiloxano
PFTBA	Perfluorotributilamina
ppm	Partes por millón
RMN¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
s	segundo
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
TOF	<i>Time of flight</i> (Tiempo de vuelo)
TR	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
μm	Micrómetro

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de <i>Santolina chamaecyparissus</i>	3
Tabla 2.	Componentes identificados en el aceite esencial de <i>S. chamaecyparissus</i>	8
Tabla 3.	Condiciones del equipo para el análisis de las muestras	22
Tabla 4.	Resultados del fraccionamiento cromatográfico del extracto de metanol de <i>S. chamaecyparissus</i> .	26
Tabla 5.	Compuestos identificados en el aceite esencial por CG/EM.	31
Tabla 6.	Compuestos volátiles identificados por HS-SPME-GC-SM-TOF	33



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	4
Figura 2.	Esquema general de un cromatógrafo de gases.	11
Figura 3.	Diagrama de bloques de un espectrómetro de masas.	12
Figura 4.	Componentes del soporte manual y fibra para la SPME.	14
Figura 5.	Representación del proceso de adsorción/desorción de los analitos en el dispositivo SPME.	15
Figura 6.	Esquema general del proceso de fraccionamiento del extracto de metanol.	21
Figura 7.	Estructuras de los compuestos presentes en el extracto de metanol de <i>S. chamaecyparissus</i> .	26
Figura 8.	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 1 .	27
Figura 9.	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 2 .	28
Figura 10.	Espectro en el IR del compuesto 3 .	29
Figura 11.	Espectro de RMN- ¹ H de la mezcla 3 .	30
Figura 12.	Cromatograma de gases del aceite esencial de <i>S. chamaecyparissus</i> (hidrodestilación).	32
Figura 13.	Cromatograma de gases de los compuestos volátiles de <i>S. chamaecyparissus</i> detectados por SPME.	34



1. INTRODUCCIÓN

El ser humano siempre ha tratado de encontrar alternativas para tratar diversas enfermedades en los recursos que le ofrece la naturaleza, por eso el uso de las plantas medicinales data de épocas muy remotas en la historia de la humanidad y ha formado parte de la cultura de las personas. No sólo ha atendido sus problemas de salud, sino que se ha alimentado con lo que la naturaleza provee y muy especialmente en esos tiempos donde las plantas eran su recurso más cercano y abundante (Melgarejo-López *et al.*, 2008). Así, logró adquirir el conocimiento sobre los productos naturales de forma empírica y éste se ha ido transmitiendo de generación en generación, por lo que actualmente es necesario aplicar el método científico para el estudio de las plantas tradicionales de interés medicinal (Osuna-Torres *et al.*, 2005).

La medicina tradicional es un recurso terapéutico sustentable, factible e integral que tiene gran uso costumbrista en nuestra nación. La organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el valor de esta práctica terapéutica haciendo énfasis en que el 80% de las dificultades de salud de los países en desarrollo son resueltos, mediante el uso de plantas medicinales; por lo tanto, resulta imprescindible concebir hoy a estas plantas no solo como alternativa para el tratamiento de las enfermedades más comunes sino también como una opción socioeconómica, fundamentalmente para los países de menores posibilidades económicas (Soriano-Almazán, 2016).

De tal manera que es de suma importancia realizar estudios para conocer el contenido metabólico de las plantas medicinales para garantizar el uso adecuado y seguro por parte de la población. Por lo que en esta tesis se presenta el estudio del extracto de metanol de *Santolina chamaecyparissus*, una planta de interés medicinal, además del análisis de sus componentes volátiles y aquellos presentes en el aceite esencial mediante la técnica de microextracción en fase sólida (HP-SPME-TOF) y CG/EM.



2. ANTECEDENTES

2.1 Características del género *Santolina*

2.1.1 Género *Santolina*

El género *Santolina* (familia Asteraceae) comprende especies ampliamente distribuidas en el área del mediterráneo. De acuerdo a una revisión hecha por Tundis en 2018, la lista de plantas incluye a 103 de las más reconocidas especies. Sin embargo, de éstos, sólo 20 son especies aceptadas (*Santolina africana* Jord. & Fourr., *S. benthamiana* Jord. & Fourr., *S. canescens* Lag., *S. chamaecyparissus* L., *S. córcega* Jord. & Fourr., *S. decumbens* Mill., *S. elegans* Boiss. Ex DC., *S. etrusca* (Lacaita) Marchi & D'Amato, *S. insularis* (Gennari ex Fiori) Arrigoni, *S. magonica* Romo, *S. melidensis* Rodr.Oubiña & S.Ortiz, *S. neapolitana* Jord. & Fourr., *S. oblongifolia* Boiss., *S. pectinata* Lag., *S. pinnata* Viv., *S. rosmarinifolia* L., *S. semidentata* Hoffmanns. & Link, *S. tincloria* "Molina", *S. villosa* Mill., y *S. virens* Mill.). Es un género taxonómicamente complejo que consiste en especies de plantas cuya clasificación ha sido revisada varias veces.

S. chamaecyparissus L., *S. pectinata* Lag. y *S. viridis* W. son las más distribuidas. Con el creciente interés en los metabolitos secundarios bioactivos de *Santolina* spp., se han llevado a cabo varios estudios relacionados con la investigación de la composición fitoquímica y las propiedades biológicas de las especies de este género (Tundis *et al.*, 2018).

2.1.2 Distribución y hábitat

El género *Santolina* es originario de Europa meridional, crece silvestre en la parte centro-occidental de la región mediterránea, sobre todo en los campos de cultivo de secano (almendros, olivos, etc.), especialmente cuando dejan de ser labrados, en barbechos, pastizales, orillas de caminos, pistas forestales, junto con romeros, tomillos y aliagas. Se enrarece hasta desaparecer en todo el oeste y noroeste de la península.



Se desarrolla en los collados y laderas pedregosas y arcillosas, principalmente sobre materiales ricos en bases, en suelos calcáreos y silíceos, desde el nivel del mar hasta cerca de los 2000 m de altura (Giner y Ríos, 2000). En cultivo, se utiliza con fines ornamentales principalmente en América del Norte (Villarino, 1999).

2.1.3 Composición química

En las últimas décadas, los estudios fitoquímicos sobre especies de *Santolina* revelaron la presencia de varias clases de constituyentes. Se ha descubierto la presencia de terpenoides, en particular los sesquiterpenos tipo eudesmano y de tipo germacrano, los triterpenos de tipo dammarano, los heterociclos de acetileno, los acetilenos tipo espirocetalenol-éter, los flavonoides y las cumarinas como metabolitos secundarios comunes del género (Tundis *et al.*, 2018).

2.2 Características de la especie *Santolina chamaecyparissus* L.

2.2.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica fue obtenida de la biblioteca *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Santolina chamaecyparissus*

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Santolina</i>
Especie	<i>Santolina chamaecyparissus</i>



2.2.2 Descripción

S. chamaecyparissus L. es una planta perenne, con numerosos tallos leñosos rectos que alcanzan hasta 60 cm de altura. Desprende un intenso olor aromático que recuerda al de la manzanilla. Los tallos floridos son simples. Las hojas son verdes a cano-tormentosas, angostas y lineales, y están profundamente divididas desde la base hasta el vértice en lóbulos cortos, no superiores a 2 mm de longitud y dispuestos en varias filas. Son escasas en la parte superior del tallo, y ausentes en la parte apical. Los capítulos son terminales, hemiesféricos y subglobulosos, sobre pedúnculos un poco hinchados en el vértice. Todos los capítulos son iguales, carecen de flores liguladas, comunes en otras especies; las flores son amarillas, gamopétalas, tubuladas y con cinco dientes en su extremo (Giner y Ríos, 2000).



Figura 1. *Santolina chamaecyparissus* L.



2.2.3 Nombres comunes

En el área mediterránea *S. chamaecyparissus* L. es denominada popularmente como: Santolina, Abrótano hembra, Cipresillo, Lino Santo, Hierba piojera, Manzanilla basta, guardarropa, hierba de San Juan (Figura 1) (Giner-Pons, 2000).

2.2.4 Usos

S. chamaecyparissus L. se cultiva en Europa, Asia y África, debido a las propiedades antihelmínticas, antiespasmódicas y emenagógicas de las infusiones preparadas a partir de sus hojas y flores. Esta hierba también es útil en el tratamiento de infecciones oculares, en la estimulación de la cicatrización de tejidos y en el alivio de las picaduras de insectos (Ahuja *et al.*, 2005; López *et al.*, 2008).

De acuerdo a una revisión hecha por Meriem y colaboradores (2018), la planta se utiliza comúnmente como té de "manzanilla" para los trastornos digestivos en Navarra y otras áreas del Mediterráneo; además, las inflorescencias son usadas principalmente en la medicina popular mediterránea por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antisépticas, antiespasmódicas, bactericidas, fungicidas, digestivas y vulnerarias, y se utilizan en fitoterapia para diferentes tipos de dermatitis. Por otra parte y de acuerdo al mismo autor, el aceite esencial tiene propiedades contra la candidiasis, y encuentra algunos usos limitados en perfumería y cosmética.

2.2.5 Aceite esencial

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles producidas por organismos vegetales y aisladas únicamente por medios físicos (por compresión y destilación, p. ej.) de una planta completa o de alguna de sus partes. Los principales compuestos contenidos en los aceites esenciales son derivados de tres rutas biosintéticas: la ruta del ácido mevalónico que produce sesquiterpenos, la del metil-eritritol (DOXP) que produce mono y diterpenos y la vía metabólica del



ácido siquímico (fenilpropanoides). Sin embargo, es casi incontable el número de sustancias sencillas por lo que puede haber una tremenda variación en la composición de los aceites esenciales. Muchas de estas sustancias volátiles tienen diversas funciones ecológicas, y pueden actuar como mensajeros internos, como sustancias de defensa contra herbívoros o como atrayentes de insectos polinizadores (Harrewijn *et al.*, 2001). Los aceites esenciales son acumulados con su contenido volátil en estructuras anatómicas especializadas que pueden ser células secretoras, cavidades/ductos o tricomas glandulares, sin embargo algunos volátiles de las esencias de flores son producidos e inmediatamente liberados por capas de la epidermis de los pétalos (Franz, 2010).

Por otra parte, el estudio de los compuestos volátiles y aceites esenciales provenientes de plantas es muy importante ya que en muchos casos éstos tienen actividades terapéuticas como antibacterianas, antioxidantes, antiespasmódicas, expectorantes entre otras por lo que se les dan aplicaciones tanto en aromaterapia como en la medicina tradicional (Pauli, 2010).

Normalmente, los aceites esenciales contienen alrededor de 100 o más compuestos químicos, la mayoría en concentraciones por debajo del 1%, incluso algunos de los compuestos se presentan en menor concentración. Algunos aceites esenciales contienen uno o más compuestos mayoritarios, y las propiedades terapéuticas y toxicológicas de los aceites se atribuyen a estos constituyentes. También, otros compuestos presentados en menor concentración pueden ser importantes. La composición de un aceite esencial varía de acuerdo a las condiciones ambientales y de crecimiento de la planta, de las partes empleadas de la planta y de la extracción y almacenamiento. Los componentes mayoritarios de un aceite esencial pueden presentar diferencias químicas de la misma especie de planta. Los componentes de un aceite esencial son en su mayoría volátiles los cuales pueden ser sensibles a los efectos de luz, calor, aire y humedad por lo que deben ser almacenados en un lugar frío y oscuro.

Incluso cuando se almacenan correctamente, la composición del aceite esencial puede cambiar durante el almacenamiento de modo que los análisis cualitativos y



cuantitativos sólo se relacionan con la composición del aceite en el momento de la prueba. También existe la posibilidad de que se produzca adulteración y contaminación durante el procesamiento. La contaminación puede ser detectada usando técnicas analíticas establecidas como la cromatografía de gas/espectrometría de masas (CG/EM).

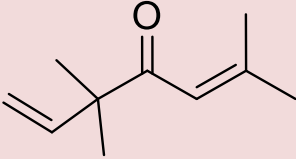
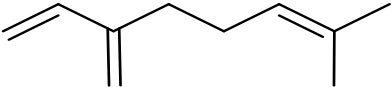
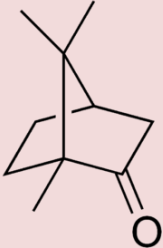
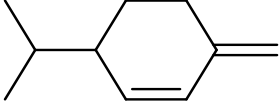
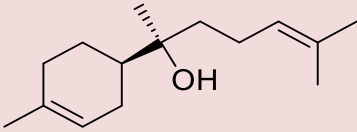
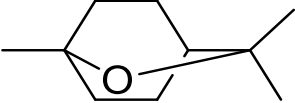
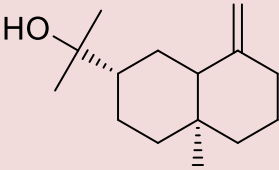
Para la preparación de la muestra y la obtención del aceite esencial, el método de hidrodestilación, o la extracción con disolventes orgánicos o la microextracción en fase sólida son técnicas muy comunes, entre otros. Hay que enfatizar que tanto la hidrodestilación como la extracción con disolventes orgánicos son métodos que consumen demasiado tiempo así como grandes volúmenes de muestra y disolventes y por otra parte pueden causar pérdida de algún analito debido a las condiciones de temperatura.

De acuerdo a Heinrich (2014), los aceites esenciales deben en todos los casos ser referenciados por el nombre latino binomial de la especie de la planta de la cual derivan y debido a que éstos pueden ser producidos en diferentes órganos, las partes empleadas de las plantas deben ser precisamente especificadas y algunas veces se necesitaría una mayor especificación para definir el quimiotipo de una planta en particular (Heinrich *et al.*, 2004).

Varias especies de *Santolina* han sido estudiadas para establecer la composición química de sus aceites esenciales. *S. chamaecyparissus* es una de las más investigadas. Estudios realizados demuestran que la composición química varía, según el origen geográfico de la planta (Tundis *et al.*, 2018) y algunos de los compuestos identificados se resumen en la Tabla 2.

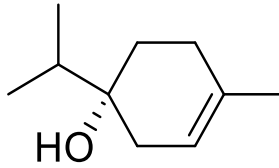


Tabla 2. Componentes identificados en el aceite esencial de *S. chamaecyparissus*.

Nombre	Estructura	País de origen de la planta
artemisia cetona		Francia, Turquía, India, Siria, Italia,
mirreno		Francia, India, Siria, Italia.
alcanfor		Turquía, Argelia, España.
β -felandreno		Turquía, Siria, Italia.
α -bisabolol		Turquía.
1,8 cineol		España, Túnez.
β -eudesmol		Túnez.

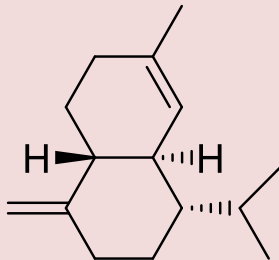


Terpinen-4-ol



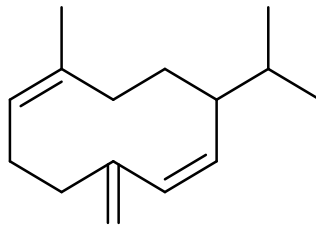
Túnez, España.

γ -cadineno



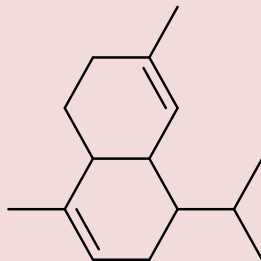
Túnez.

germacreno D



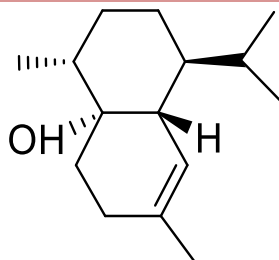
India.

α -amorfeno



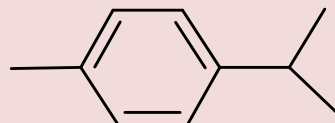
Siria.

cubenol

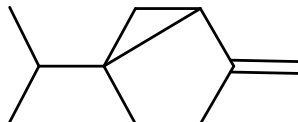


Argelia.

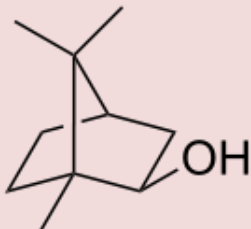
p-cimeno



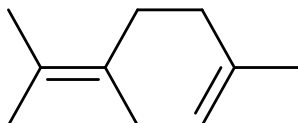
Argelia.

**sabineno**

Argelia, Italia.

borneol

España.

terpinoleno

España.

2.3 Métodos analíticos y tratamiento de la muestra

2.3.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) es una de las técnicas más versátiles y comunes en los laboratorios, se usa para la determinación de compuestos orgánicos volátiles (Gary, 2000). Esta técnica de separación está basada en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria (fase de la columna) y otra móvil (gas acarreador); esta separación se lleva a cabo por adsorción y depende de la afinidad de los analitos por la fase estacionaria (Skoog, 2008).

La muestra se inyecta rápidamente con una microjeringa a través de un tapón septum de goma de silicona; se volatiliza en el inyector y pasa a la columna en fase gaseosa. El puerto de inyección es principalmente usado en dos modos: Split y Splitless. En el modo Split solo una pequeña fracción de la muestra es dirigida hacia la columna y el resto se desecha; es utilizado para muestras relativamente concentradas. El modo Splitless se emplea cuando la muestra tiene concentraciones traza por lo que toda la muestra contenida en el inyector pasa por la columna (Harris, 2007; Skoog, 2008).



El puerto de inyección y el detector se mantienen a una temperatura mayor que la columna para evaporar rápidamente la muestra líquida y evitar que ésta se condense en el detector. La fase estacionaria se encuentra en las paredes internas de la columna y su composición le confiere una determinada polaridad. La separación se efectúa a medida que los componentes volatilizan y se equilibran con el gas acarreador y la fase estacionaria. El gas acarreador es un gas químicamente inerte que debe encontrarse en forma pura, como argón, helio o nitrógeno. Los analitos de la muestra que ya fueron separados se detectan automáticamente cuando salen de la columna, mediante diversos detectores (Gary, 2000; Harris, 2007).

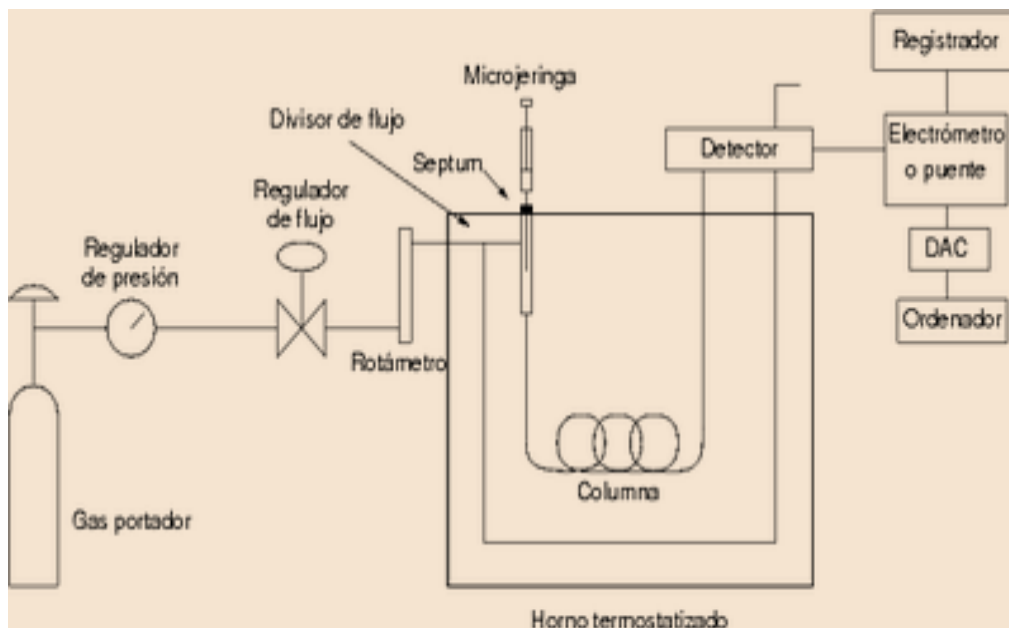


Figura 2. Esquema general de un cromatógrafo de gases.

2.3.2 Espectrometría de masas

Es una técnica instrumental que produce, separa y detecta iones en fase gaseosa. La muestra se introduce en un sistema de admisión, que trabaja en condiciones de vacío y a alta temperatura. La muestra se evapora y arrastra hacia la fuente de ionización. Las moléculas del analito suelen ser neutras y se deben ionizar, lo que habitualmente se logra bombardeando con electrones de alta energía



en una fuente de impacto electrónico. Los iones se separan en el espectrómetro al ser acelerados a través de un separador de masas. La separación se realiza de acuerdo con las relaciones de masa a carga (m/z) de los iones. Finalmente los iones separados se detectan y el sistema de análisis de datos genera una gráfica de intensidad de los iones contra el valor de m/z (Gary, 2000).

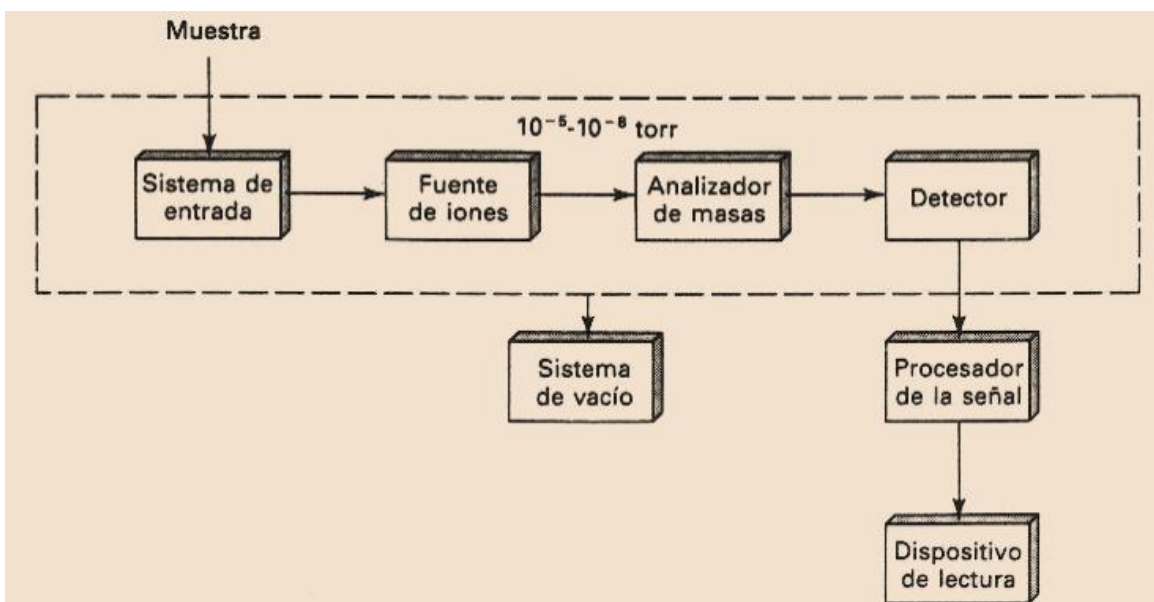


Figura 3. Diagrama de bloques de un espectrómetro de masas

2.3.3 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas

La detección de un máximo cromatográfico a un determinado tiempo de retención sugiere, pero no garantiza la presencia de un determinado compuesto. La probabilidad de que la identificación sea positiva depende de factores como el tipo y la complejidad de la muestra y de los procedimientos de preparación de la muestra. Por lo que la cromatografía de gases acoplada a masas combina la capacidad de separación de la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas, haciendo posible el análisis y cuantificación de compuestos en mezclas complejas con un alto grado de eficiencia.



2.3.4 Microextracción en fase sólida (SPME)

Es una técnica rápida, barata y libre de disolventes para la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles (Wejnerowska *et al.*, 2007), se obtienen resultados confiables, no requiere gran tiempo de análisis ni grandes cantidades de muestra. Está basada en la extracción de analitos de una muestra (puede ser sólida, gaseosa o líquida) mediante la utilización de una fase sólida de sílice fundida que está recubierta de un material adsorbente generalmente polimérico, seguida de la desorción de analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico. La fibra debido a su tamaño pequeño y geometría cilíndrica se puede incorporar en una jeringa para facilitar su manipulación y protegerla (Peñalver Hernando, 2002).

Como con otras técnicas de separación de componentes volátiles de plantas, el análisis de los metabolitos también se lleva a cabo por el método de CG/EM. En estos casos la identificación de los componentes volátiles se basa en el espectro de masas y en la determinación del índice de retención utilizando estándares externos que son una mezcla de hidrocarburos constituida por una serie homóloga de n-alcános. La elución en el cromatógrafo de gases de esta mezcla de hidrocarburos se lleva a cabo en las mismas condiciones cromatográficas utilizadas para las muestras analizadas, ya sea el aceite esencial o los componentes volátiles extraídos por SPME.

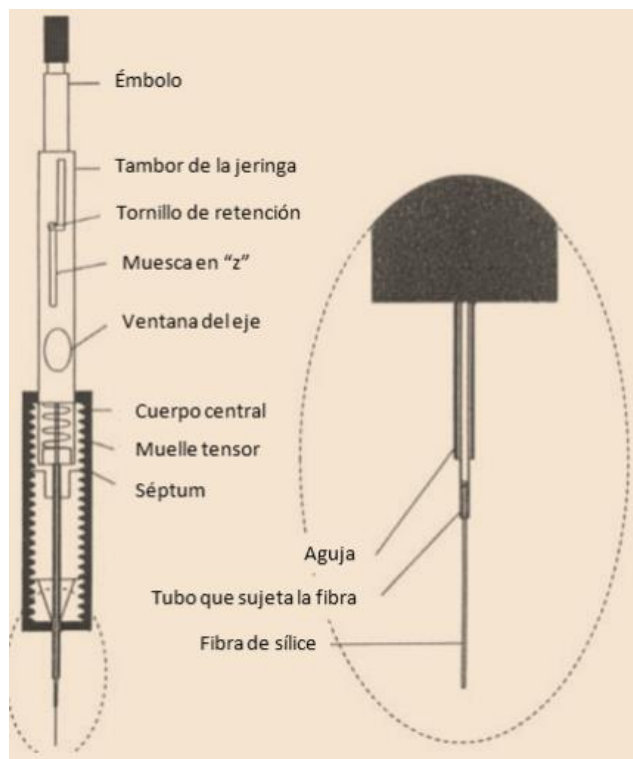


Figura 4. Componentes del soporte manual y fibra para la SPME.

2.3.4.1 Fundamentos teóricos de la SPME

La extracción se basa en el reparto del analito entre la fase orgánica en la fibra de sílice fundida y la muestra (Mahdi-Moein *et al.*, 2014). El transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración del analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra.

La microextracción en fase sólida puede ser usada por inmersión directa de la fibra dentro de la muestra para extraer los analitos o por introducción de la fibra en un *headspace* "espacio de cabeza" para extraer los componentes volátiles presentes en la fase gaseosa (Mahdi-Moein *et al.*, 2014).



2.3.4.2 Procedimiento de la SPME

Esta técnica consta de dos etapas:

- a) Etapa de extracción: Con la fibra retraída se pasa la aguja a través del septum del vial con la muestra, a continuación se expone la fibra a la fase gaseosa y se permite la exposición por un tiempo y temperatura definida, para facilitar una migración de los analitos desde la muestra a la fibra, hasta que se alcanza el equilibrio. Se retrae la fibra dentro de la aguja y se remueve del vial.
- b) Etapa de desorción: Se puede realizar térmicamente en el caso de CG o con el uso de disolventes en HPLC. En la CG se inserta el dispositivo SPME en el puerto de inyección, se expone la fibra por un tiempo, se retrae y se retira, Figura 5 (Lucio-Gutiérrez, 2005).

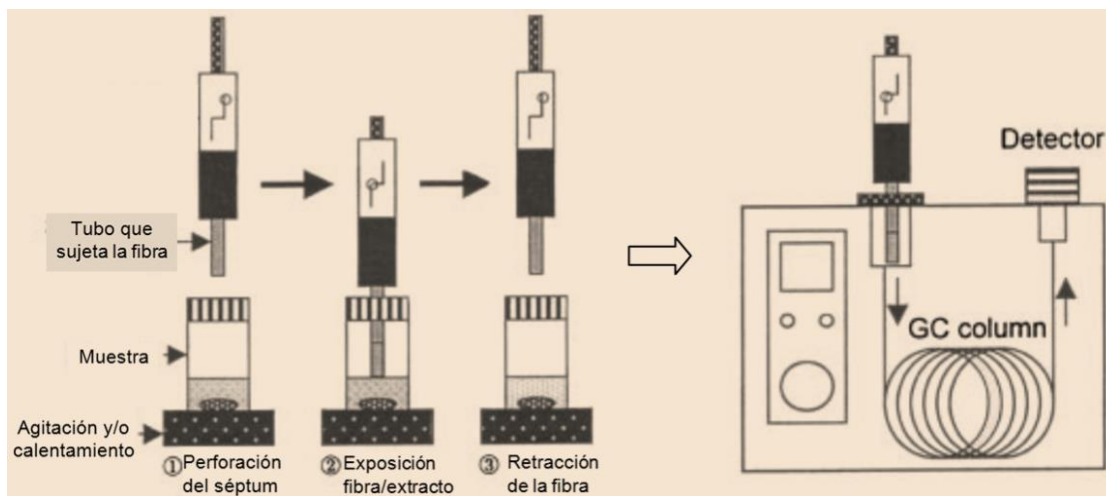


Figura 5. Representación del proceso de adsorción/desorción de los analitos en el dispositivo SPME.

2.3.4.3 Índice de retención de Kovats

Es un método que permite determinar los tiempos de elución relativos de los diferentes compuestos en cromatografía de gases, de forma que ayuda a identificar positivamente los componentes de una mezcla. El método aprovecha la relación lineal entre los valores del logaritmo del tiempo de retención, $\log(t_r')$, y los tiempos



de retención de una serie homologa de hidrocarburos saturados (C-8 a C-24). El valor del índice de Kovats suele representarse por I en las expresiones matemáticas. Su aplicación se limita a los compuestos orgánicos (Hernández *et al.*, 2014).

Para la cromatografía isotérmica, el índice de Kovats viene dado por la ecuación:

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{\log(t'_{r(\text{desconocido})}) - \log(t'_{r(n)})}{\log(t'_{r(N)}) - \log(t'_{r(n)})} \right]$$

En el caso de temperatura programada en cromatografía de gases, se puede calcular un índice similar utilizando directamente los valores, en lugar de sus logaritmos.

$$I = \frac{(t_{r(\text{desconocido})}) - (t_{r(n)})}{\log(t_{r(N)}) - \log(t_{r(n)})} * (100 \times z) + (100 \times n)$$

Donde:

I : Índice de retención de Kovats

n : Número de átomos de carbono de los alcanos pequeños

N : Número de átomos de carbono de los alcanos grandes

Z : Diferencia del número de átomos de carbono entre el alcano pequeño y el grande

t_r : Tiempo de retención (ajustado)



3. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día la medicina tradicional es considerada y reconocida como un recurso fundamental para la salud de los seres humanos, es un componente esencial para las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar, y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta.

Las plantas medicinales forman parte muy importante de las estrategias que utiliza la población para el tratamiento de enfermedades. Esta práctica resulta de la gran diversidad botánica existente en el planeta y de su aprovechamiento por parte de la gran diversidad de grupos étnicos y de la necesidad de contar con recursos accesibles para la salud. Es por ello, que es de gran importancia el estudio integral de esas plantas a las cuales se les han atribuido propiedades medicinales, mediante métodos adecuados para poder aislar, purificar e identificar la amplia gama de sustancias químicas que contienen, para posteriormente confirmar su eficacia y seguridad por medio de pruebas y ensayos apropiados. *S. chamaecyparissus* es una planta que se utiliza en los países del mediterráneo con fines medicinales, en México se ha introducido como una planta ornamental y actualmente es de amplia distribución en nuestro país. En estudios previos a éste en el laboratorio 111 de la Facultad de Química se ha analizado el contenido metabólico de los extractos de hexano y de acetona, sin embargo había quedado como perspectiva completar el estudio mediante el análisis del contenido metabólico del extracto de metanol, entre otros, para documentar los parámetros de composición para un eventual control de calidad de la planta, por lo que en el presente estudio se justifica continuar con su investigación química, incluyendo el del contenido de componentes volátiles.



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Aislar e identificar a los componentes mayoritarios presentes en el extracto de metanol de las partes aéreas de la planta medicinal *Santolina chamaecyparissus*, así como analizar el contenido de compuestos volátiles.

4.2 Objetivos particulares

- ✓ Revisar en la literatura científica los antecedentes de estudios químicos sobre la planta medicinal *S. chamaecyparissus*.
- ✓ Preparar el extracto orgánico de metanol de las partes aéreas de la planta objeto de estudio por medio de la técnica de maceración.
- ✓ Realizar el aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto de metanol por métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos.
- ✓ Analizar la composición del aceite esencial obtenido mediante un proceso de hidrodestilación, por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas.
- ✓ Identificar a los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de la planta de estudio por el método de microextracción en fase sólida (HS-SPME-GC-MS-TOF), utilizando el índice de retención de Kovats y los espectros de masas y corroborar con la base de datos NIST.



5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material y equipo utilizado

Cromatografía en columna abierta (CCA)

Para la cromatografía en columna abierta se utilizaron como fase estacionaria Gel de sílice 60 marca Merck (malla 0.063-0.200 mm) y como fase móvil una mezcla de disolventes de polaridad creciente. Las cromatografías preparativas se realizaron en placas Merck de 1 mm de grosor y una superficie de 20 x 20 cm.

Cromatografía en capa fina (CCF)

Los análisis por cromatografía en capa fina se llevaron a cabo en cromatofolios de Silica gel 60 F254. Como reveladores cromatográficos se utilizaron una cámara con lámpara en el UV Spectroline modelo ENF-260C con las longitudes de onda de 254 y 365 nm y solución cromógena de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ al 1% con H_2SO_4 2N seguido de calentamiento en parrilla (100 °C).

Espectroscopía de RMN

Los espectros de RMN de ^1H se determinaron a 400 ó 600 MHz y a 100 y 125 MHz para ^{13}C . Como disolventes se emplearon CDCl_3 , CD_3OD , acetona- d_6 .

Análisis por microextracción en fase sólida

Todos los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases marca Agilent, modelo 6890N equipado con una columna capilar DB-5 (5% fenil-polimetilsiloxano), con dimensiones de 10 mm x 0.18 mm x 0.18 μm , acoplado a un espectrómetro de masas con analizador másico de tiempo de vuelo (TOF), marca LECO modelo Pegassus 4D, utilizando el método de ionización por impacto electrónico a 70eV. Se utilizó el programa Chroma TOF.



5.2 Recolección e identificación del material vegetal

El material vegetal empleado para este trabajo se recolectó en el pedregal de Ciudad Universitaria en junio de 2016. La identificación botánica fue determinada por el Dr. Robert Bye Boettler en el Instituto de Biología de la UNAM y el M. en C. Ramiro Ríos del Departamento de Botánica de la FES Zaragoza, UNAM. Una muestra de referencia se conserva en el laboratorio 111 del Departamento de Farmacia con el número de colecta SC-14-06-16.

5.3 Extracción

5.3.1 Obtención del extracto orgánico

Las partes aéreas del material vegetal fueron sometidas a secado a temperatura ambiente. El material vegetal seco se fragmentó con la ayuda de unas tijeras en pequeños pedazos y se sometió a un proceso de maceración a temperatura ambiente, por periodos de 24 h con hexano, acetona y metanol (consecutivamente y por triplicado). Se obtuvo un total de 20.0 g de extracto de metanol.

5.3.2 Obtención del aceite esencial

50 g del material vegetal previamente fragmentado se sometieron a un proceso de hidrodestilación con 850 mL de agua desionizada, con la finalidad de obtener la fracción volátil (aceite esencial) de la planta en estudio. El aceite recolectado se analizó mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM).

5.4 Análisis químico del extracto de metanol

5.4.1 Fraccionamiento cromatográfico

El fraccionamiento del extracto de metanol se realizó mediante una cromatografía en columna abierta. Para ello se adsorbieron 10.0 g del extracto de metanol en 11.0 g de gel de sílice. La muestra se aplicó en una columna de vidrio



que contenía 200 g de gel de sílice. La elución se realizó con mezclas de disolventes de polaridad creciente de CHCl_3 -acetona y CHCl_3 -MeOH. Se recolectaron fracciones de aproximadamente 80 mL cada una, reuniendo un total de 314 fracciones primarias. La composición de los eluatos se detectó por medio de cromatografía en capa delgada, en placas de aluminio (2.5 x 7.0 cm) recubiertas de gel de sílice. Los compuestos se visualizaron con luz UV a 254 y 365 nm y se empleó sulfato cérico amoniacal como revelador. Las fracciones fueron agrupadas con base en su similitud en la cromatografía en capa fina en seis fracciones secundarias (F1-1 a F1-6). En la Figura 1 se muestra un esquema de análisis fitoquímico de *S. chamaecyparissus*.

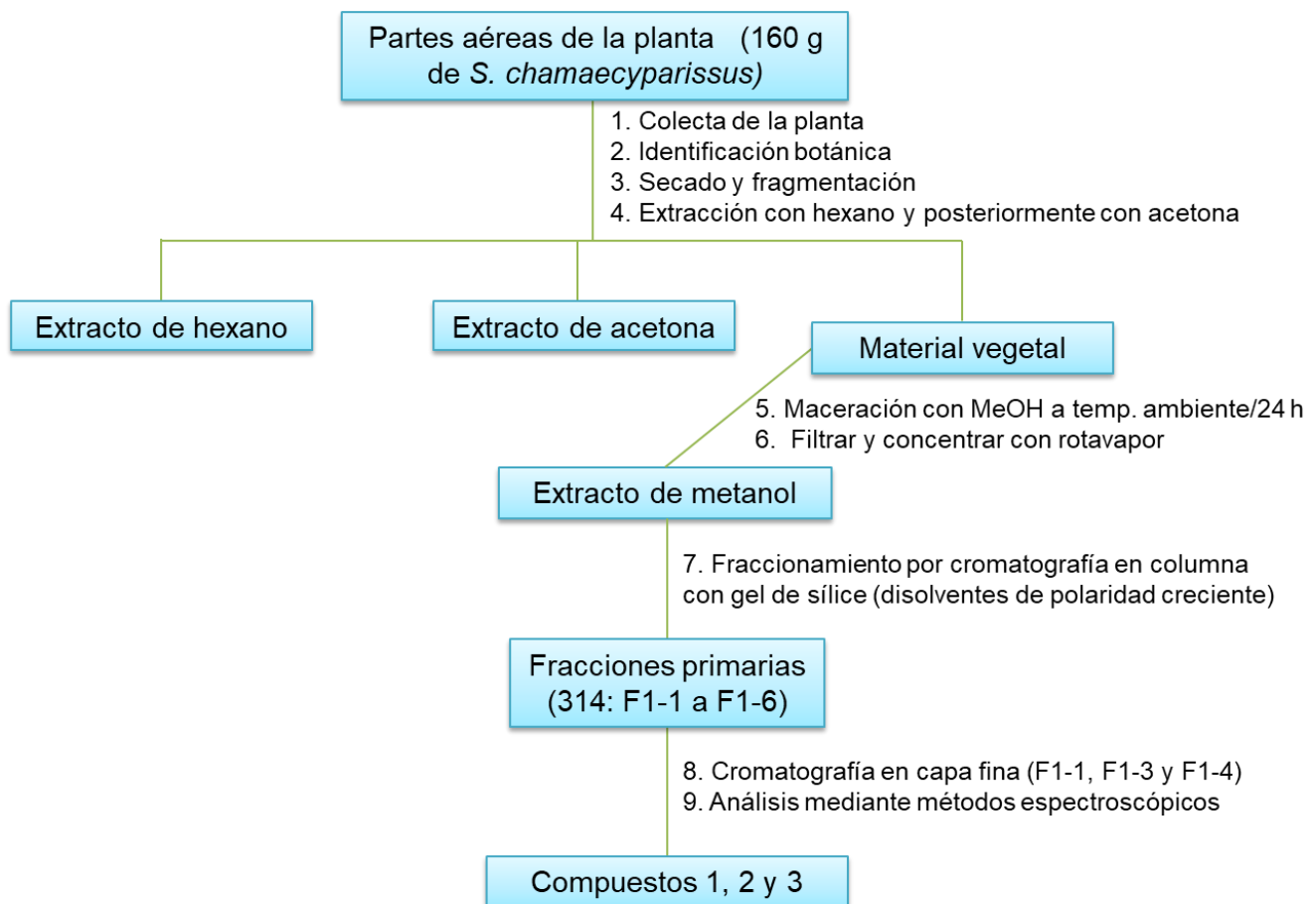


Figura 6. Esquema general del proceso de fraccionamiento del extracto de metanol.



5.4.2 Reacción general de acetilación

A 100 mg del compuesto o fracción se agregaron 1.0 mL de anhídrido acético y 0.3 mL de piridina, la mezcla anterior se mantuvo con agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se añadieron 5.0 g de agua/hielo y se aciduló con una solución de HCl al 10%. La solución anterior se extrajo con tres porciones de 15 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se extrajo con tres porciones de 5 mL cada una de solución saturada de NaHCO₃ y se realizó un lavado por duplicado con porciones de 5 mL de H₂O. Por último, el extracto orgánico se secó con Na₂SO₄ anhidro y por evaporación del disolvente se obtuvieron los compuestos acetilados.

5.5 Determinación de los compuestos volátiles por microextracción en fase sólida (HS-SPME-EM-TOF) de las partes aéreas de *S. chamaecyparissus*.

Se utilizó una fibra para microextracción (gris) con las siguientes características: 2 cm-50/30 um DVB/Carboxen/PDMS Stable flex, marca Supelco.

5.5.1 Acondicionamiento del cromatógrafo de gases

Se acondicionó el equipo de cromatografía de gases con las condiciones mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones del equipo para el análisis de las muestras.

Técnica analítica	CG-EM-TOF
Temperatura del inyector	300°C
Programa de temperatura del horno	40 °C (por 3 min), aumentando 20 °C cada minuto hasta los 300 °C
Tipo de inyección	Split (con división de flujo) 1:20
Gas acarreador (fase móvil) y flujo	Helio (Praxair), grado 5.0 (Ultra Alta Pureza)
Temperatura línea de transferencia	250 °C
Tipo de ionización	Ionización por impacto electrónico (IE)



Analizador másico	Tiempo de vuelo (TOF)
Adquisición espectral	20 espectros / segundo
Retraso del encendido del filamento	3 minutos
Intervalo de masas	33-400 um
Temperatura de la cámara de ionización	200 °C.
Compuesto de calibración	PFTBA

5.5.2 Preparación de las muestras para su análisis por SPME

10 mg de las partes aéreas de *S. chamaecyparissus* fragmentadas con tijeras en pedazos de aproximadamente 2 mm fueron colocados en un vial con tapa de silicón, se adicionaron 5 mL de agua HPLC y se añadió NaCl. Posteriormente, la jeringa con la resina libre de analitos se preparó subiendo el émbolo, y se colocó en una base que permitía sostener la jeringa sobre el vial conteniendo la muestra. Se perforó la tapa del vial (silicón) con la jeringa y se bajó la fibra por medio del émbolo, cuidando que ésta no tocara la solución contenida en el vial y se dejó expuesta por 10 minutos, sin calentamiento ni agitación. Una vez transcurrido el tiempo, se retrajo cuidadosamente la fibra con el émbolo, se sacó la jeringa del vial y se introdujo la aguja de la misma (conteniendo a la fibra) en el inyector del CG para la desorción de los compuestos adsorbidos.

5.5.3 Procesamiento de datos para el análisis por SPME

Una vez realizado el procedimiento de acuerdo con el punto 5.5.2, se procedió al análisis de los datos. Para ello, se utilizó el programa Chroma TOF (incluido en el equipo) obteniendo diferentes parámetros derivados del análisis de la muestra; los más relevantes son: % de área, tiempo de retención, peso molecular, índice de retención de Kovats experimental (IK_e) y el espectro de masas de cada compuesto volátil de la muestra. Se obtiene además un listado de compuestos resultado de la comparación de los espectros obtenidos experimentalmente con los que se tienen en la base de datos del equipo (NIST, 2002).



5.5.4 Identificación de los compuestos volátiles de las partes aéreas de *S. chamaecyparissus*.

Posterior a la eliminación de aquellos compuestos interferentes (disolventes, silanoides, etc.) dentro del listado de compuestos obtenido por el equipo, se procedió a confirmar la identidad de cada uno de ellos, correlacionando su índice de retención de Kovats experimental (IK_e) y su espectro de masas con el reportado en la literatura (Adams, 2007 y de la biblioteca electrónica del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología NIST, 2018).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de ser una especie de origen mediterráneo, *S. chamaecyparissus* se ha extendido geográficamente en nuestro país con una amplia delimitación geográfica; el espécimen que se estudió en este trabajo fue colectado en la zona pedregosa de Ciudad Universitaria. En investigaciones previas de esta especie, se prepararon y estudiaron los extractos de hexano y de acetona (Navarro, 2018), por lo que quedó como perspectiva de ese trabajo el estudio del extracto de metanol el cual fue analizado en este trabajo de tesis.

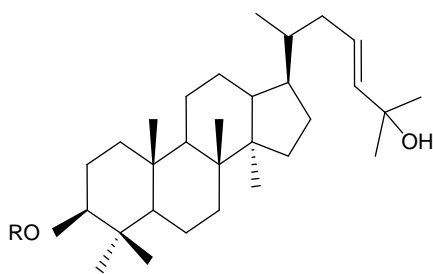
6.1 Análisis del extracto de metanol

El procedimiento para analizar el extracto de metanol fue complicado (Figura 6) debido a que presentaba gran complejidad en su contenido metabólico y porque parte de los compuestos separados por cromatografía en columna se oxidaron con el paso del tiempo, sin embargo, por posteriores cromatografías de las fracciones primarias (F1-3, F1-4 y F1-5) se aislaron tres compuestos en mezcla con compuestos minoritarios. Así, de la fracción F1-3 fue posible detectar una sustancia de tipo terpenoide e identificar su estructura de manera probable basándose en métodos espectroscópicos (Tabla 4 y Figura 7) como un glicósido triterpenoide (**1**) de acuerdo con las numerosas señales singulete que fueron evidentes en la zona del espectro de RMN-¹H (δ_H 0.91 a 2.05) y las señales para átomos de hidrógeno unidos a carbonos base de oxígenos como una parte glucosídica (Figura 8). Dada la escasa cantidad obtenida de este compuesto no fue posible realizar experimentos posteriores para corroborar su identidad. Triterpenoides de tipo dammarano han sido identificados en especies europeas de *S. chamaecyparissus* (De Pascual, 1986).

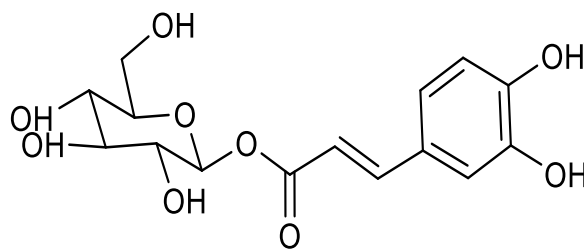


Tabla 4. Resultados del fraccionamiento cromatográfico del extracto de metanol de *S. chamaecyparissus*.

Fracción	Proporción de disolventes (v/v)	Resultado
F1-3	CHCl ₃ /acetona (70:30)	Glicósido terpenoide (1)
F1-4	CHCl ₃ /MeOH (50:50)	Glucósido del ácido cafeico (2)
F1-5	CHCl ₃ /MeOH (20:80)	Compuestos glicosídicos (3) (mezcla)



(1) R= azúcar



(2)

Figura 7. Estructuras de los compuestos presentes en el extracto de metanol de *S. chamaecyparissus*.

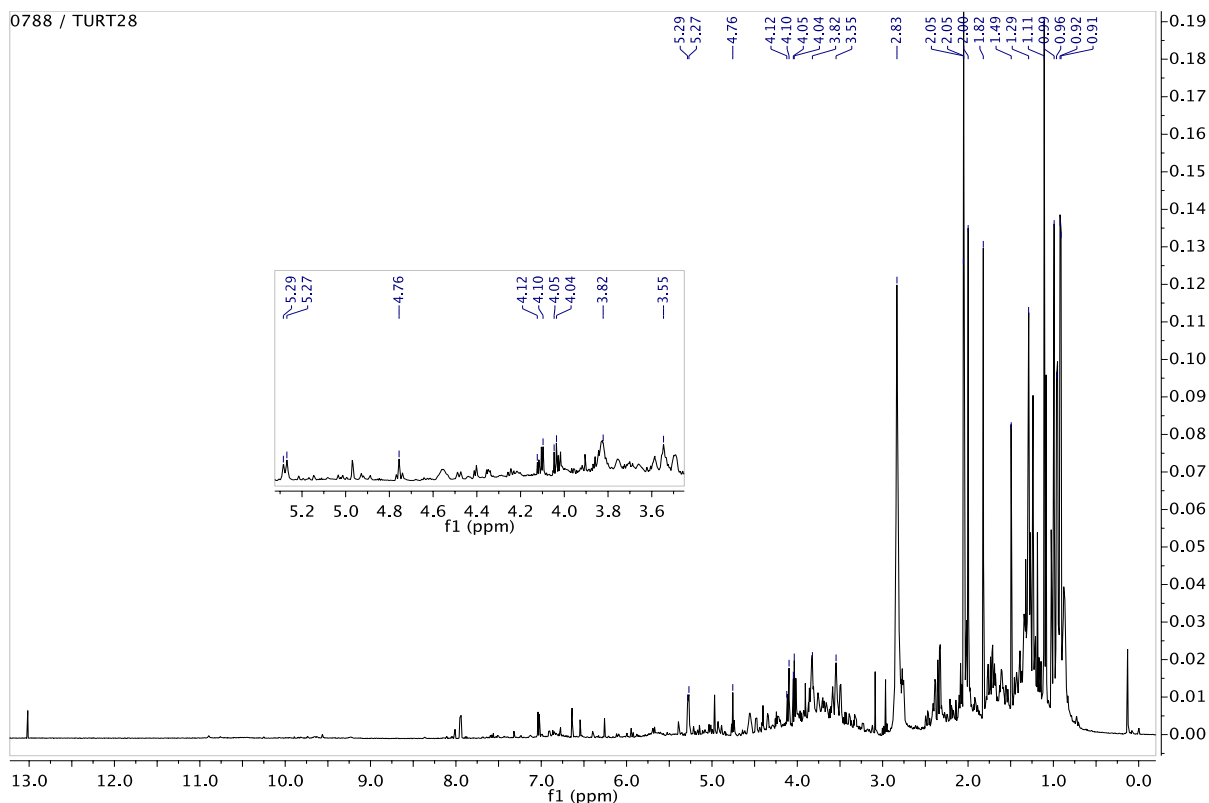


Figura 8. Espectro de RMN-¹H del compuesto 1.

Por otra parte, en la fracción F1-4 precipitó un sólido amarillento en muy pequeña cantidad. Las señales observadas en su espectro de RMN-¹H se describen a continuación. En δ_H 7.56 y 6.30 se observan un par de señales dobles acopladas entre sí con una constante de acoplamiento (J) de 16 Hz asignables a los hidrógenos vinílicos con disposición *trans* de una cadena alifática. En δ_H 7.1, 7.025 y 6.84 se observaron señales singulete, doble de dobles y doble con J de 8 Hz, asignadas a un anillo bencénico 1,3,4-trisustituído. De δ_H 2.7 a 4.2 y en 4.7 (doblete) se observaron señales para hidrógenos en carbonos base de oxígeno. Integrada la información anterior se propuso para el compuesto 2 la estructura de un glucósido del ácido caféico (Figuras 7 y 9).

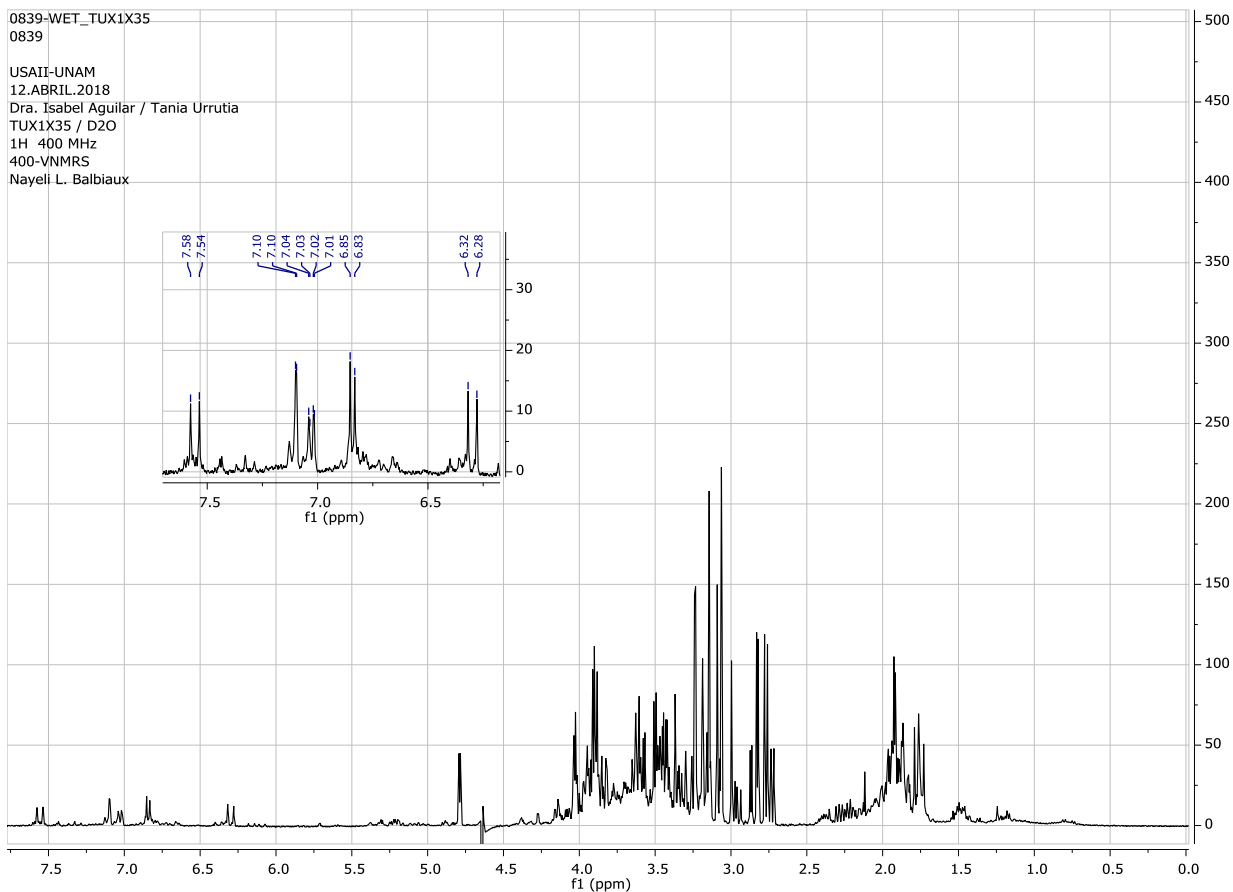


Figura 9. Espectro de RMN-¹H del compuesto **2**.

Finalmente, en la fracción F1-5 precipitó un sólido grisáceo de composición compleja visualizada por cromatografía en capa fina; al analizar su espectro en el IR se apreció la presencia de gran número de grupos hidroxilo (3352 nm) (Figura 10).

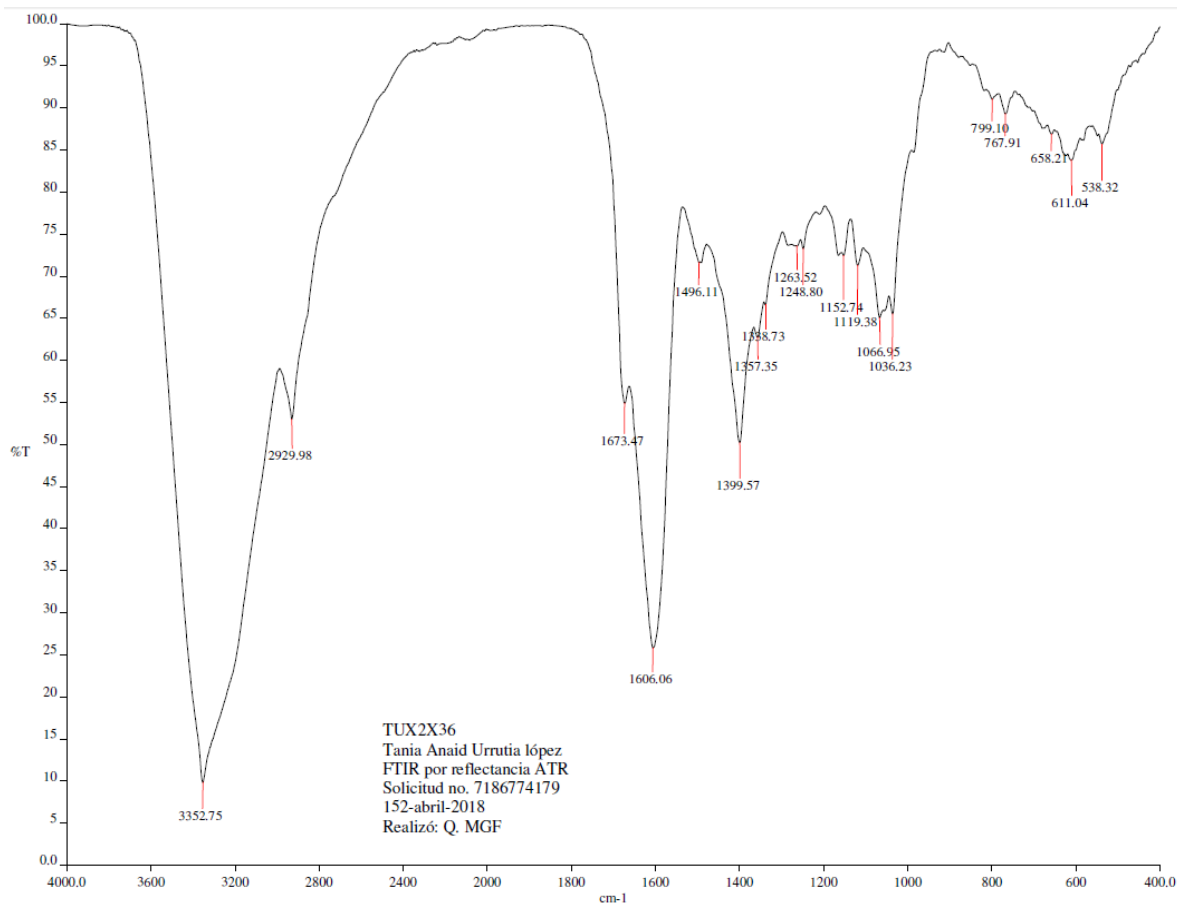
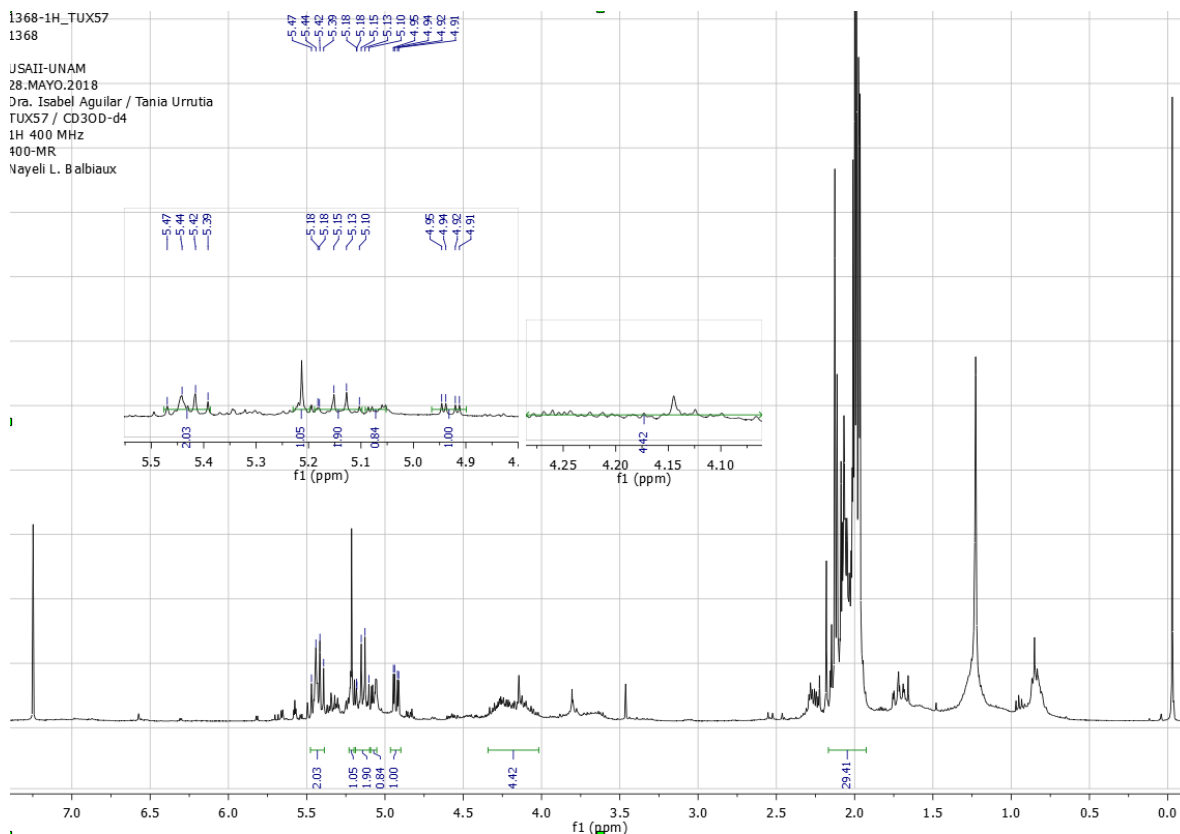


Figura 10. Espectro en el IR del compuesto **3**.

El compuesto sólido (**3**) fue sometido a una reacción de acetilación y como producto se obtuvo nuevamente una mezcla de compuestos, por lo que se propone la presencia de una mezcla de azúcares en este precipitado. La Figura 11 muestra el espectro de RMN-¹H del sólido sometido a acetilación en donde se aprecian numerosas señales intensas en la zona de δ_H 2 ppm de probables grupos metilo de grupos acetato. En la zona de δ_H 4 a 5 ppm se observan señales probables de hidrógenos en carbonos base de oxígeno pertenecientes al núcleo de azúcares acetilados (Figura 11).

Figura 11. Espectro de RMN-¹H de la mezcla 3.

6.2 Obtención del aceite esencial

El método práctico de análisis involucró procesos de muestreo, preparación de la muestra, separación, detección de componentes y un análisis de datos. La identificación de los constituyentes individuales se realizó utilizando cromatografía de gases (GC) acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM) la cual como ya se mencionó es una técnica adecuada para separar e identificar compuestos volátiles. Para la preparación de la muestra, se utilizó el método de hidrodestilación, así como la microextracción en fase sólida. La hidrodestilación de las partes aéreas de *S. chamaecyparissus* y posterior análisis de sus componentes por CG/EM mostró la presencia de 12 componentes mayoritarios. Los datos están resumidos en la Figura 8 y en la Tabla 5 en donde se muestran los compuestos separados, las abundancias



relativas, los índices de retención de Kovats y los tiempos de retención para cada uno de ellos. En la Tabla 5 se puede observar además, que los compuestos mayoritarios son artemisia cetona (26.27%), β -felandreno (17.06%), 3,4-dimetil-1,5-ciclooctadieno (17.06%), mirceno (7.99%) y longiverberona (7.09%).

Tabla 5. Compuestos identificados en el aceite esencial por CG/EM.

Nombre	Fórmula	IK _e	IK _t (Adams, NIST)	Área %	TR (s)
Artemisia cetona	C ₁₀ H ₁₆ O	1061	1062	26.279	399.5
β -felandreno	C ₁₀ H ₁₆	1026.5	1025	17.06	381.35
3,4-dimetil-1,5-ciclooctadieno	C ₁₀ H ₁₆	1026.2	NI	17.06	381.15
Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	986.3	987	7.9972	357.75
Longiverberona	C ₁₅ H ₂₂ O	1660.8	1658.2	7.0916	654.55
β -Pineno	C ₁₀ H ₁₆	972.56	973	4.5044	348.1
Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	969.85	971	4.4729	346.2
Terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	1089.6	1089	3.0075	414.6
4,6,6-Trimetil-2-(3-metilbuta-1,3-dienil)-3-oxatriciclo[5.1.0.0(2,4)]octano	C ₁₅ H ₂₂ O	1604.9	NI	2.848	635.9
Camfeno	C ₁₀ H ₁₆	944.71	946	2.5486	328.55
Isoterpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	1083.4	1084	2.5481	411.3
Alcanfor	C ₁₀ H ₁₆ O	1145.3	1146	2.1643	443.95

*NI: No Identificado

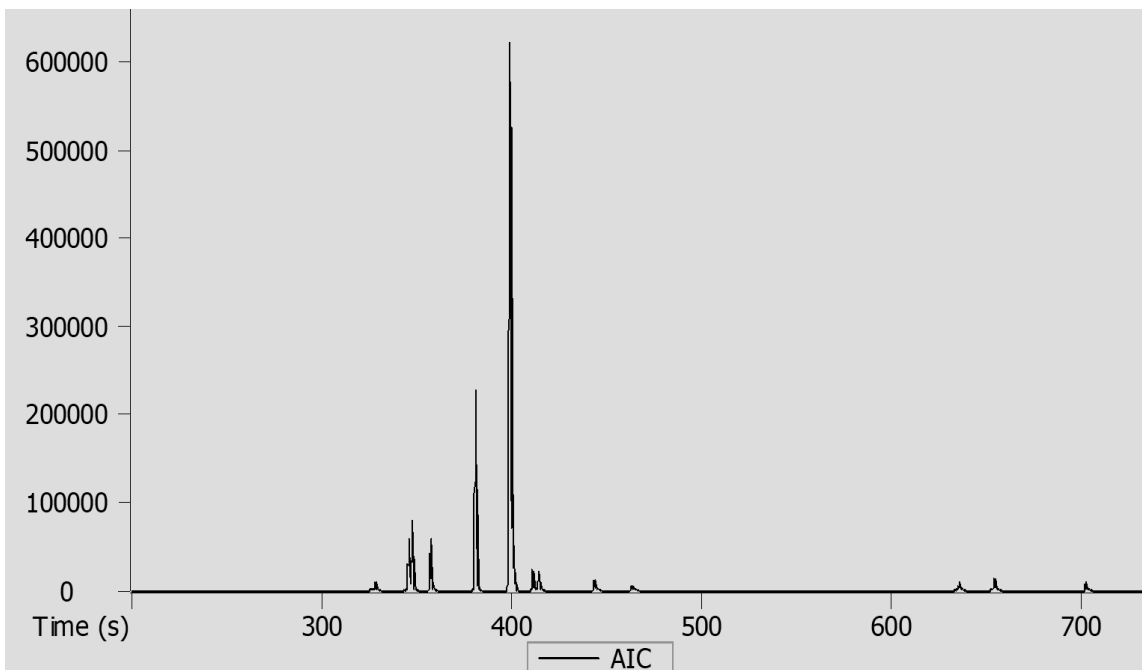


Figura 12. Cromatograma de gases del aceite esencial de *S. chamaecyparissus* (hidrodestilación).

6.3 Determinación de los compuestos volátiles por microextracción en fase sólida (HS-SPME-EM-TOF) de las partes aéreas de *Santolina chamaecyparissus*.

En la Figura 13 se muestra el cromatograma obtenido del análisis por SPME.

Por medio de este experimento se detectó una serie de compuestos (25) que fueron identificados por la comparación de su índice de retención con el del contenido en las bases de datos según Adams (2007) y los datos de NIST (2018). Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 6 y se puede apreciar que por la técnica de análisis por SPME el compuesto mayoritario fue el 2,7-nonadieno (14.3%), seguido del β -felandreno (14.16%), el 1(*R*)-4a,5,6,7,8-hexahidro-3,5,5,9-tetrametil-2H-benzocicloheptano (10.68%), el α -longipineno (6.12%), el β -pineno (5.14%) y el camfeno (4.07%).



Tabla 6. Compuestos volátiles identificados por HS-SPME-GC-SM-TOF.

Nombre	Fórmula	IK experimental	IK teórico (Adams, NIST)	Área %	TR (s)
2,7-nonadieno	C ₉ H ₁₆	1024.5	NI	14.312	380.252
β-felandreno	C ₁₀ H ₁₆	1025	1025	14.167	380.552
(R)-1H-2,4a,5,6,7,8-hexahidro-3,5,5,9-tetrametil-benzociclo heptano	C ₁₅ H ₂₄	1477	NI	10.684	587.852
α-Longipineno	C ₁₅ H ₂₄	1355.5	1352	6.1275	539.652
β-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	971.13	973	5.1498	347.102
Camfeno	C ₁₀ H ₁₆	943.36	946	4.0759	327.602
Terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	1088.2	1088	3.7579	413.852
α-felandreno	C ₁₀ H ₁₆	996.63	998	3.4582	365.002
β-mirceno	C ₁₀ H ₁₆	985.02	986	3.3559	356.852
D Germacreno	C ₁₅ H ₂₄	1485.6	1485	2.9472	591.102
o-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	1018.9	1020	2.8287	377.302
Alcanfor	C ₁₀ H ₁₆ O	1143.9	1143	2.736	443.202
δ-Elemeno	C ₁₅ H ₂₄	1338	1338	2.509	532.152
Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	968.36	971	2.6153	345.152
1,5-Heptadiene, 2,5-dimetil-3-metilene-	C ₁₀ H ₁₆	922.84	NI	2.3844	313.202
α-Tujona	C ₁₀ H ₁₆	922.2	925	2.3836	312.752
ç-Elemeno	C ₁₅ H ₂₄	1501.1	NI	2.2287	596.952
α-terpineno	C ₁₀ H ₁₆	1010	1012	2.1829	372.652
Aromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	1466.2	1463	1.7468	583.802
Artemisia trieno	C ₁₀ H ₁₆	928.61	929	1.7046	317.252
Artemisia alcohol	C ₁₀ H ₁₈ O	1081.9	1083	1.5455	410.502
Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	1423.2	1424	1.492	567.552
γ-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	1056.9	1055	1.1089	397.352
Santolina trieno	C ₁₀ H ₁₆	902.05	903	0.8172	298.602
α-Ylangeno	C ₁₅ H ₂₄	1373	1375	0.7859	547.202

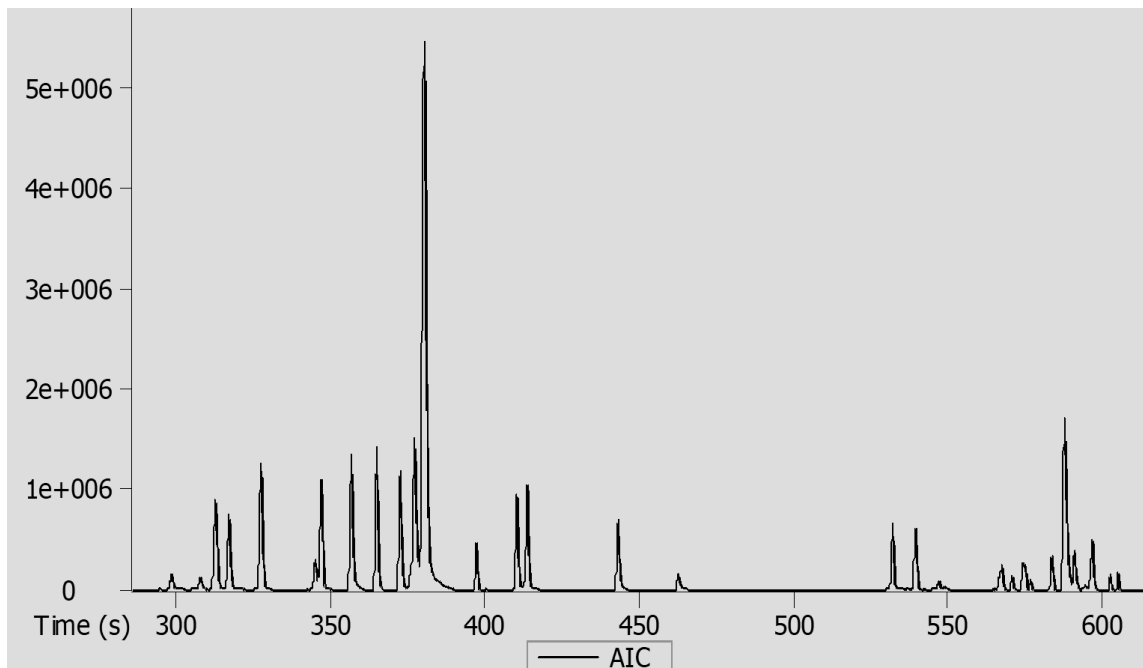


Figura 13. Cromatograma de gases de los compuestos volátiles de *S. chamaecyparissus* detectados por SPME.

Como se puede apreciar al comparar los resultados obtenidos del análisis de los compuestos volátiles por destilación y por microextracción en fase sólida (Tablas 5 y 6), los componentes identificados por ambos métodos son β -felandreno, β -pineno, mirceno, camfeno, sabineno y alcanfor.



7. CONCLUSIONES

El extracto de metanol de *S. chamaecyparissus* está constituido en su mayoría por mezclas complejas de carbohidratos, así como de glucósidos de compuestos terpenoides y de ácidos fenólicos.

La fracción volátil de *S. chamaecyparissus* obtenida tanto por hidrodestilación como por la técnica de microextracción en fase sólida está constituida por numerosos componentes dentro de los cuales la artemisia cetona y el β -felandreno son los mayoritarios.

La técnica por SPME es de mayor permite una mejor detección de compuestos volátiles (25) a diferencia de la técnica de hidrodestilación (12). Esto puede ser debido a que la detección es más directa en el método por SPME.

La técnica por SPME es más amigable con el ambiente puesto que emplea una menor cantidad de muestra y de disolventes.



8. REFERENCIAS

1. Adams, R.P.; González Elizondo, M.S.; González Elizondo, M.; Slinkman, E., (2006). *DNA fingerprinting and terpenoid analysis of Juniperus blancoi var. huehuentensis (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico*, Biochem. Syst. Ecol., 34, 3, 205-211.
2. Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. U.S.A.: Allured Publishing Corporation.
3. Adams, R.P.; Morris, J.A.; Pandey, R.N.; Schwarzbach, A.E., (2005). *Cryptic speciation between Juniperus deltoides and Juniperus oxycedrus (Cupressaceae) in the Mediterranean*, Biochem. Syst. Ecol., 33, 8, 771-787.
4. Ahuja, A., Bakshi, S.K., Sharma, S.K., Thappa, R.K., Agarwal, S.G., Kichlu, S.K., Paul, R., Kaul, M.K., (2005). *Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of Santolina chamaecyparissus L. (cotton lavender)*. Flavour and Fragrance Journal 20, 403-406.
5. Ament K.; Kant M.R.; Sabelis M.W.; Haring M.A.; Schuurink R.C., (2004). *Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants*, Plant Physiol., 135, 1, 483-495.
6. Asfaw, N.; Licence, P.; Novitskii, A.; Poliakoff, M., (2005). *Green Chemistry in Ethiopia: the cleaner extraction of essential oils from Artemisia afra: a comparison of clean technology with conventional methodology*, Green Chem., 7, 5, 352-356.
7. Blázquez, M. A.; Pérez, I.; Boira, H. (2003). *Essential oil analysis of Teucrium libanitis and T. turredanum by GC and GC-MS*, Flavour Fragr. J., 18, 6, 497-501.
8. De Pascual Teresa, J., Bellido, I. S., González, M. S & Vicente, S. (1985) *Tetracyclic triterpenes and nerolidol derivatives from Santolina oblongifolia*. Phytochemistry, 1(25), 185-190.



9. Franz, C., Novak, J. Sources of essential oils in Handbook of esencial oils. Hüsñü Can Baser, K., Buchbauer, G., Eds. CRC Press, Boca Ratón (2010).
10. Gary, D. C. *Química Analítica*. (2000). México: Mc Graw Hill. Pág. 574-577 y 593-601.
11. Giner-Pons, R., Rios-Cañavate, J. (2000). *Santolina chamaecyparissus*. Revista de fototerapia, 1(1), 27-34.
12. Harrewijn, P., Oosten, A. M., Piron, P. G. M. (2001). Natural terpenoids as messengers. Dordrecht: Kluwer academic publishers
13. Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. España: Reverté. Capítulos 23 y 24.
14. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., y Williamson, E. M. (2004). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 6 edición. Hungary: Churchill Livingstone. Pág. 192.
15. Hernández, S. R., Lami, I. L., Pino, A. J. y Martínez, Y. (2014). *Caracterización de extractivos en alcohol-benceno solubles en acetona del bagazo de la caña de azúcar mediante cromatografía gaseosa-espectrometría de masas*. Centro azúcar 42, 42-50.
16. Integrated Taxonomic Information System. https://www.itis.gov/ftp_download.html. 16 de Agosto de 2018
17. López, V., Akerreta, S., Casanova, E., García-Mina, J.M., Caverro, R.Y., Calvo, M.I., (2008). *In vitro antioxidant and anti-rhizopus activities of Lamiaceae herbal extracts*. Pharmaceutical Biology 46, 602-609.
18. Mahdi-Moein, M., Said, R., Bassyouni, F., Abdel-Rehim, M. (2014). *Solid Phase Microextraction and Related Techniques for Drugs in Biological Samples*. Journal of Analytical Methods in Chemistry.



19. Melgarejo, L. N., Álvarez, B. G. y Abad, A. A. (2008). *Plantas medicinales: guía para su uso en la atención primaria de la salud*. Disponible en internet: <https://ebookcentral.proquest.com>
20. Meriem, D., Abderrahmane, B., Moufida, A., Lekhmici, A. (2018). *In vitro and in vivo Antioxidant, Antihemolytic and Anti-inflammatory Activities of Santolina chamaecyparissus*. Extracts. *Pharmacognosy Communications*, 8(1), 15-24.
21. Merle, H.; Morón, M.; Blázquez, A.; Boira, H., (2004). *Taxonomical contribution of essential oils in mandarins cultivars*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 32, 5, 491-497.
22. Merkle, S., Kleeberg, K., Fritsche, J. (2015). *Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis- A review*. *Chromatography*; 2, 293-381.
23. Moreira, D.L.; Sousa, P.O.; Pereira, N.A.; Cardoso, G.L., (2001). *Effect of leaf essential oil from Piper solmsianum C. DC. in mice behavior*, *An. Acad. Bras. Cienc.*, 73, 1, 1-7.
24. Navarro, L. *Análisis químico de Santolina chamaecyparissus L. (Asteraceae), una planta de interés medicinal*. Tesis de licenciatura en QFB. UNAM (2018)
25. NIST National Institute of Standards and Technology. Versión 2002
26. NIST National Institute of Standards and Technology (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>). Consultado en agosto de 2018.
27. Osuna-Torres, L., Tapia-Pérez, M., Aguilar-Contreras, A. (2005). *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales*, Universidad de Barcelona, p. 17.



28. Pauli, A., Schilcher, H. (2010). Handbook of essential oils: Science, technology and applications, edited by K.H.C.Baser and G.Buchbauer (Taylor and Francis, Boca Ratón).
29. Senatore, F.; de Feo, V. (1999). *Chemical composition of the essential oil from Tagetes mandonii Sch. Bip. (Asteraceae)*, Flavour Fragr. J.: 14, 1, 32-34.
30. Skoog D. A., Holler F. J. (2008). *Principios de análisis instrumental*. España, Madrid: Cengage Learning. Capítulos 26 y 27.
30. Soria N, Ramos P. *Uso de plantas medicinales en la atención primaria de Salud en Paraguay: algunas consideraciones para su uso seguro y eficaz*. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2015; 13 (2):8-17.
31. Soriano-Almazán, D. F. y Altamirano Álvarez, T. A. (2016). *Elaboración de un catálogo sobre conocimiento e importancia de las plantas medicinales, para su revalorización por parte de la comunidad de Tlazala, Municipio de Isidro Fabela, Estado de México*. Tesis para obtener el grado de Licenciatura.
32. Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Pérez-Álvarez, J. A., Sendra, E., Fernández-López, J. (2012). *Chemical characterization and antibacterial activity of two aromatic herbs (Santolina chamaecyparissus and Sideritis angustifolia) widely used in the folk medicine*. Journal of Food Safety, 32, 426-434.
33. Tzakou, O.; Harvala, C.; Galati, E.M.; Sanogo, R., (2000). *Essential oil composition of Nepeta argolica Borey et Chaub. subsp. argolica*, Flavour Fragr. J., 15, 2, 115-118.
34. Tundis, R., Loizzo M. R. (2018). *A Review of the Traditional Uses, Phytochemistry and Biological Activities of the Genus Santolina*. Planta Med. 84, 627-637.



35. Vas, G., y Vékey, K. (2004). *Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*. J. Mass Spectrom, 39: 233-254.
36. Villarino, V. (1999). *Las plantas de extractos: Bases para un plan de Desarrollo del Sector*: Fundación Alfonso Martín Escudero, pág. 30.
37. Wejnerowska, G., Gaca, J., (2008). *Application of Headspace Solid-Phase Microextraction for Determination of Chloro-Organic Compounds in Sewage Samples*. 18: 543-550.
38. Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Santos, A.S.; Silva, M.H.L.; Maia, J.G.S., (1998). *Essential oils of Lippia alba (Mill.) N. E. Br growing wild in the Brazilian Amazon*, Flavour Fragr. J., 13, 1, 47-48.