FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE QUÍMICA DE METABOLITOS BIOACTIVOS
LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA

EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE GC-MS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Lampayo medicinalis* F. PHIL (VERBENACEAE) CON POTENCIAL ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Unidad de Investigación II para optar al Título de Químico Farmacéutico

Diego Emiliano Castillo Carvallo

Director: Dra. Waleska Vera Quezada

2022

FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE QUÍMICA DE METABOLITOS BIOACTIVOS
LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA

EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE GC-MS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Lampayo medicinalis* F. PHIL (VERBENACEAE) CON POTENCIAL ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Unidad de Investigación II para optar al Título de Químico Farmacéutico

Diego Emiliano Castillo Carvallo

Director: Dra. Waleska Vera Quezada

2022

Dedicatoria

A toda mi familia por el inmenso apoyo que me han brindado en todos estos años de estudio y en especial a mi madre por todo su amor y cariño incondicional perfectamente mantenido a través del tiempo

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos

Agradecimientos

A mis padres María y Miguel por la comprensión, apoyo y fuerza brindada durante toda mi vida. los quiero mucho

A toda mi familia, cada uno de ellos ha contribuido a ser lo que soy, han forjado mi forma de ser, y los quiero por su cariño y preocupación constante

A mi directora de tesis Dra. Waleska Vera Quezada quien fue una guía importante en este arduo trabajo

A mis codirectores Mauricio e Iván por su apoyo teórico-práctico de este trabajo

Al Laboratorio de Cromatografía de la Farmacopea Chilena por el uso del equipamiento. También, al Centro de Investigación Farmacopea Chilena, CIFAR-UV.

A la profesora Marcela Escobar por su apoyo teórico-práctico de este trabajo, en especial en HPLC.

A la profe Gabriela, del laboratorio de productos naturales de la universidad de Chile por su apoyo teórico practico para cuantificación de polifenoles y flavonoides.

Agradezco el apoyo económico brindado por el proyecto UVA20993, INICI-UV: “Extracción, identificación, y caracterización de metabolitos secundarios de hojas de *Lampayo medicinalis* F. Phil""

A todos los profesores que fueron guías durante mi paso por la universidad, por los conocimientos adquiridos y madurez lograda

A todos mis amigos que han sido un gran apoyo durante estos años, en especial a Constanza Ahumada y a Fernando Robles que siendo sincero no sé qué sería de mí en esta carrera sin ellos.

Y a todos quienes colaboraron de una u otra forma a ser lo que soy, a conseguir este logro y emprender nuevos desafíos.

Resumen

El ser humano ha buscado formas de mantenerse sano y durante mucho tiempo, mediante la observación, ha logrado encontrar en la naturaleza ciertas plantas de ayuda, al trascurrir de los años esta sabiduría pasaría a llamarse medicina tradicional. En Chile existe el libro “Listado de medicamento herbarios tradicionales” donde de 103 plantas medicinales no todas tienen estudios que avalen sus propiedades. En él la especie *Lampayo medicinalis* de la familia Lampayo, del género Verbenáceas, el cual es un arbusto del norte de Chile que está poco estudiado y se le atribuyen propiedades biológicas por la medicina tradicional local. Debido al poco conocimiento químico de esta especie es que en esta unidad de investigación se estudió y comparó la composición química de *L. medicinalis* mediante el análisis de sus metabolitos utilizando técnicas de maceración en etanol/agua y hexano, para la obtención de extractos no-volátiles, y headspace dinámico, para la obtención de extractos volátiles, analizados por HPLC-DAD-FLU y GC-MS, respectivamente. Además, se realizó la cuantificación de polifenoles y flavonoides del extracto hidroetanólico. El análisis del extracto hexánico total no permitió identificar metabolitos, sin embargo, de una fracción se logró purificar y caracterizar un compuesto de tipo iridoide, cuya familia química es reconocida por presentar importantes actividades biológicas. Además, se obtuvo un extracto hidroetanólico con 15 metabolitos encontrados, pero no identificados, al comparar con estándares disponibles, y con un alto contenido total de polifenoles y flavonoides comparado con otras especies del mismo género. A partir del extracto volátil se establece un quimiotipo de variedad de monoterpenos y mayoritariamente compuesto de trans-anetol. En conclusión, fue posible determinar parcialmente y de manera preliminar la composición no-volátil y volátil de las hojas de lampayo, siendo esta investigación un avance en el estudio de la composición química de esta especie, principalmente en lo que respecta al trabajo con maceración en hexano y a la determinación de metabolitos volátiles.

Abstract

The human being has sought ways to stay healthy and for a long time, through observation, has managed to find certain helpful plants in nature, over the years this wisdom would come to be called traditional medicine. In Chile there is the book "List of traditional herbal medicines" where of 103 medicinal plants not all have studies that support their properties. In it, the species Lampayo medicinalis of the Lampayo family, of the Verbenaceae genus, which is a shrub from northern Chile that is little studied and is attributed biological properties by local traditional medicine. Due to the little chemical knowledge of this species, in this research unit the chemical composition of L. medicinalis was studied and compared by analyzing its metabolites using maceration techniques in ethanol/water and hexane, to obtain non-chemical extracts. volatile, and dynamic headspace, to obtain volatile extracts, analyzed by HPLC-DAD-FLU and GC-MS, respectively. In addition, the quantification of polyphenols and flavonoids of the hydroethanolic extract was carried out. The analysis of the total hexane extract did not allow metabolites to be identified, however, from a fraction it was possible to purify and characterize an iridoid-type compound, whose chemical family is recognized for presenting important biological activities. In addition, a hydroethanolic extract was obtained with 15 metabolites found but not identified, when compared with available standards, and with a high total content of polyphenols and flavonoids compared to other species of the same genus. From the volatile extract, a chemotype of a variety of monoterpenes is established, mainly composed of trans-anethole. In conclusion, it was possible to partially and preliminarily determine the non-volatile and volatile composition of lampayo leaves, this research being an advance in the study of the chemical composition of this species, mainly with regard to work with maceration in hexane and the determination of volatile metabolites.

Glosario de términos

Actividad biológica: Corresponde al efecto generado de un determinado compuesto químico sobre las células.

Columna capilar Rtx-5MS: Columna cromatográfica de baja polaridad, compuesta de difenil dimetil polisiloxano.

Cromatografía de gases: Técnica de separación de sustancias en la cual una muestra eluye por el flujo de un gas móvil inerte

Espectroscopía infrarroja: Técnica basada en la absorción de energía infrarroja del espectro electromagnético, para la identificación de enlaces y compuestos presentes en una muestra.

Espectrometría de masas: Técnica analítica utilizada para identificar y cuantificar compuestos desconocidos mediante la ionización de una muestra.

Índice de Kovats: Índice de retención que describe el comportamiento de retención de un compuesto de interés comparativamente al de una mezcla de hidrocarburos saturados de diferente número de carbonos.

Metabolito secundario: Compuestos químicos provenientes del metabolismo primario de las plantas que cumplen funciones de interacción de ésta con su entorno.

Modo splitless: Tipo de inyección en la cromatografía gaseosa, en la cual la totalidad de la muestra es dirigida a la columna, manteniéndose a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra.

Quimiotipo: Identificación química de un extracto de una planta o un aceite esencial.

Abreviaciones

MHT: medicamentos herbarios tradicionales

TG: tricoma glandular

COVs: compuestos orgánicos volátiles

MS: metabolito secundario

GLVs: green leafy volatiles

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

DPPH: Difenilpicrihidrazilo

FRAP: Poder Antioxidante/Reductor Férrico

EHL: extracto hidroalcohólico de lampayo

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

1H NMR: resonancia magnética nuclear de protón

13C NMR: resonancia magnética nuclear de carbono

GC-MS: cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masa

HPLC-DAD-FL: cromatografía liquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos y detector de fluorescencia

DCM: diclorometano

FT-IR: espectroscopia infrarroja con transformador fourier

IKs: índices de Kovats

CPT: contenido de polifenoles totales

CFT: contenido de flavonoides totales

mg EAG / g ES: miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramos del extracto seco

mg EQ / g ES: miligramos equivalentes de quercetina por gramos de extracto seco

Índice

1. Introducción 1

1.1. Antecedentes generales 1

1.2. Origen y clasificación de compuestos orgánicos emitidos por especies vegetales 2

1.3. Familia Verbenácea 4

1.4. *Lampayo medicinalis* 6

1.4.1. Características generales 6

1.4.2. Antecedentes químicos y actividad biológica 6

1.5. Técnicas de muestreo y caracterización de metabolitos secundarios 8

2. Objetivos 10

2.1. Objetivo general 10

2.2. Objetivos específicos 10

3. Materiales y métodos 10

3.1. Obtención del material vegetal 10

3.2. Análisis botánico de la cutícula de las hojas 11

3.3. Maceración dinámica para colectar no-COVs 12

3.3.1. Maceración en etanol: 12

3.3.2. Maceración en hexano: 12

3.4. Headspace dinámico para colectar COVs 12

3.5. Caracterización química de los extractos no-COVs y COVs de *Lampayo medicinalis*. 13

3.5.1. Extractos no-COVS de *L. medicinalis*. 13

3.5.1.1. Caracterización del extracto hidroetanólico y hexánico por espectroscopia FT-IR. 13

3.5.1.2. Caracterización del extracto hidroetanólico mediante HPLC-DAD-FL. 14

3.5.1.3. Caracterización del extracto hexánico mediante GC-MS. 15

3.5.2. Determinación del contenido total de polifenoles y flavonoides en el extracto hidroetanólico. 16

3.5.2.1. Estimación del contenido de polifenoles totales (CPT) mediante el método de Folin-Ciocalteu. 16

3.5.2.2. Estimación del contenido de flavonoides totales (CFT) mediante el método de $AlCl_3$. 16
3.5.3. Extracto COVS de *L. medicinalis*. 17
3.5.3.1. Caracterización del extracto volátil mediante GC-MS. 17
4. Resultados y Discusión. 17
4.1. Rendimientos de maceraciones dinámicas para colectar no-COVs 17
4.1.1. Rendimiento maceración en etanol 18
4.1.2. Rendimiento maceración en hexano 19
4.2. Espectroscopia FT-IR de extractos no-COVs de *L. medicinalis* 21
4.2.1. Espectroscopia FT-IR de extracto hexánico total 21
4.2.1.1. Espectroscopia FT-IR de la fracción 1 22
4.2.1.2. Espectroscopia FT-IR de la fracción 2 24
4.2.2. Espectroscopia FT-IR del extracto en hidroetanólico 26
4.3. HPLC-DAD-FL del extracto hidroetanólico de *L. medicinalis* 27
4.4. Caracterización de MS de lampayo mediante GC-MS en extracto hexánico y extracto volátil. 29
4.4.1. Caracterización del extracto hexánico mediante GC-MS y sus fracciones 29
4.4.1.1 Extracto hexánico total 29
4.4.1.2. Fracción 1 30
4.4.1.3. Fracción 2 32
4.4.2. Caracterización del extracto volátil mediante GC-MS. 33
4.4.2.1. Identificacion y abundancia relativa de COVs de Lampayo 33
4.5. Contenido total de polifenoles y flavonoides en el extracto hidroetanólico 41
4.5.1. Contenido de polifenoles totales (CPT) mediante el método de Folin-Ciocalteu 41
4.5.2. Contenido de flavonoides totales (CFT) mediante el método de $AlCl_3$. 43
5. Consideraciones Finales 44
6. Conclusiones 45
7. Bibliografía 46
8. **Anexos** 57

Índice de figuras

Figura 1. Resumen de las distintas rutas metabólicas para la producción de compuestos emitidos por las plantas.....3
Figura 2. Fotografía de Lampayo medicinalis. Imagen obtenida de Medicamentos Herbarios Tradicionales 103 especies, 2009. 6
Figura 3. Compuestos químicos encontrados en el extracto hidroalcohólico de L. medicinalis.....7
Figura 4. Tipos de sistemas de recolección de muestra por headspace dinámico.. 9
Figura 5. Sistema de colecta de volátiles. Muestreador de aire conectado a trampa adsorvente, ensamblado en bolsa de polivinilacetato con filtro de aire de carbón. Dentro se observan hojas de lampayo.....13
Figura 6.Cromatograma de estándares utilizados en el análisis por HPLC-DAD-FL.....14
Figura 7. Extracto hidroetanólico de lampayo obtenido. 18
Figura 8. Extracto hexánico de lampayo obtenido. 19
Figura 9. De izquierda a derecha, se observan las fx 1, 2 y 3 secas. Luego de evaporación rotatoria y dejar bajo campana para eliminar el solvente. 19
Figura 10. De izquierda a derecha se observan lo Rf de corrida de TLC en 30/70% de Acetato de etilo: hexano. Fracciones 1, 2 y 3 mostraron Rf de 0,93, 0,85 y 0,74 respectivamente. 20
Figura 11. Espectro de absorbancia FT-IR de extracto total en hexano. 21
Figura 12. Espectro de absorbancia FT-IR de fracción 1.....23
Figura 13. Espectro de absorbancia FT-IR de fracción 2.....25
Figura 14. Espectro de absorbancia FT-IR de extracto hidroetanólico. 26
Figura 15. Cromatograma HPLC de extracto hidroetanólico de L. medicinalis.....28
Figura 16.Cromatograma de fluorescencia HPLC de extracto hidroetanólico de L. medicinalis.....29
Figura 17. Cromatograma del extracto hexánico de L. medicinalis.....29
Figura 18.Cromatograma de fracción 1. Las señales con marcas rojas son compuestos que se pueden atribuir a plantas. 31
Figura 19. Cromatograma de fracción 2. Los compuestos con marcas rojas son compuestos que se pueden atribuir a plantas.....32
Figura 20.Estructura molecular de dihidroactinidioide.....32
Figura 21.Cromatogramas GC-MS de COVs de L. medicinalis (n=3).....34
Figura 22.Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. 42
Figura 23.Curva de calibración de quercetina para la determinación de contenido de flavonoides totales mediante el método AlCl3.....43
Figura 24. Compracion botanica para identificacion de lampayo de herbolaria con lamapyo de referencia Voucher VALPL_PLV:2283.....58

Índice de tablas

Tabla 1. Algunos géneros de plantas medicinales que son de la familia de las Verbenáceas endémicas chilenas. 5
Tabla 2. Ficha técnica de L. medicinalis 11
Tabla 3. Parámetros cromatográfícos en relación con la fase móvil, tiempo y porcentajes de la fase. 15
Tabla 4. Cantidad de macerado resultante según solvente y fracciones 20
Tabla 5. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del extracto total en hexano. 22
Tabla 6. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción de fracción 1. 23
Tabla 7. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción de fracción 2. 25
Tabla 8.Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción de extracto hidroetanólico. 27
Tabla 9.Características del cromatograma GC-MS del extracto hexánico 30
Tabla 10. Características del cromatograma GC-MS a fracción 1. 31
Tabla 11. Analisis cuantitativo de la composicion de volatiles de lampayo (n=3) 35

1. Introducción

1.1. Antecedentes generales

Desde tiempos inmemoriales la naturaleza es una vasta fuente de recursos, de los cuales el ser humano utiliza en su beneficio para satisfacer sus necesidades primitivas como alimentarse y reproducirse para la supervivencia de la especie. Pero, a su vez es un desafío coexistir en un habitad inhóspito, potencialmente peligroso que sería la causa de heridas, dolencias y enfermedades. En este contexto nace la necesidad de distinguir que elementos de la naturaleza son de utilidad en algún tratamiento con relación a curar las dolencias y enfermedades para prolongar la vida. Con el tiempo se desarrolló el conocimiento necesario para utilizar minerales, animales y plantas en beneficio de la humanidad (Cortez Gallardo et al., 2004). Dentro de los reinos de la naturaleza que contribuyen hasta hoy en disminuir síntomas y/o prevenir enfermedades, destaca el reino vegetal. Actualmente, se sabe que las plantas contienen variadas moléculas, debido a sus complejos metabolismos y mecanismos para enfrentar su entorno, que son las que posiblemente ayudaron al humano durante milenios (Avello & Cisternas, 2010).

Cada región del mundo desarrolló su propia forma única y característica para curar a partir de plantas medicinales debido a que utilizan especies endémicas. Con el tiempo estas terapias locales fueron llamadas “medicina tradicional” debido a que describían parámetros farmacológicos modernos como sus usos, forma de preparación, administración y dosis (Avello & Cisternas, 2010). Adicionalmente, se conoce la “medicina alternativa”, la que consta principalmente de métodos fuera de la corriente biomédica, tales como la homeopatía, la meditación, entre otros. Y, por último, se conoce la “medicina convencional”, que corresponde a la medicina contemporánea/sintética (Bodeker & Kronenberg, 2002).

La inmensa cantidad de flora junto con el conocimiento ancestral de las poblaciones nativas hace que la “medicina tradicional”, en relación al uso de las plantas medicinales, tome importancia. Pero, este saber necesita ser integrado con el fin de poder ser utilizado de manera óptima en relación a las propiedades medicinales que aportan (Organismo Andino de Salud, 2014). Es así que con el tiempo, organizaciones e instituciones mundiales como la OMS han puesto interés en divulgar estudios que confirmen la eficacia y seguridad del uso de recursos vegetales (Avello & Cisternas, 2010).

En Chile, dado su extenso territorio, los pueblos originarios son diversos, sus culturas y experiencias también lo son, pero tienen en común que poseen conocimientos, habilidades y prácticas relacionadas con el uso de plantas para el cuidado de la salud, a esto se le conoce como “etnomedicina”, y contempla el uso de plantas medicinales con sus respectivas propiedades curativas comparables con la terapia convencional (Madaleno & Delatorre-Herrera, 2013). A mediados de 1990, se realizó un catastro de las plantas medicinales utilizadas empíricamente por la población chilena, pesquisando alrededor de 460 diferentes especies vegetales de las cuales sólo unas 130 tenían alguna validación científica. El Listado de Medicamentos Herbarios Tradicionales (MHT), definido en esa época, contiene actualmente 103 diferentes especies vegetales y es una realidad materializada mediante la Resolución Nº 548 (Ministerio de Salud, 2009).

1.2. Origen y clasificación de compuestos orgánicos emitidos por especies vegetales

Tal como se describió previamente, la etnomedicina corresponde al uso medicinal de las plantas para el cuidado de la salud, con el fin de comprobar sus propiedades curativas y relacionarlas a los compuestos químicos que estas presentan.

Las plantas tienen en sus órganos aéreos, específicamente en sus células epidérmicas, unas estructuras llamadas tricomas glandulares (TG). Estos poseen la característica de producir, almacenar y en algunos casos secretar productos fitoquímicos como compuestos volátiles, semi volátiles y no volátiles (Liu et al., 2018).

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son productos naturales líquidos lipofílicos con bajo peso molecular y alta presión de vapor a temperatura ambiente, estas propiedades físicas les permiten atravesar las membranas celulares y así ser liberados al entorno cercano (Pichersky et al., 2006). En cambio, los compuestos orgánicos no volátiles (no-COVs) tienen estructura química más compleja y son de mayor peso molecular, en su mayoría se almacenan normalmente como metabolitos unidos a las células (Wink, 1997).

La biosíntesis de estos compuestos depende de la energía proporcionada por el metabolismo primario, está directamente relacionada con la concentración de cualquier metabolito secundario (MS) y divergen de las vías metabólicas primarias.

Dependiendo de su origen, los MS se pueden clasificar en terpenoides, fenilpropanoides / bencenoides, derivados de ácidos grasos y derivados de aminoácidos (Figura 1) (Dudareva et al., 2013).

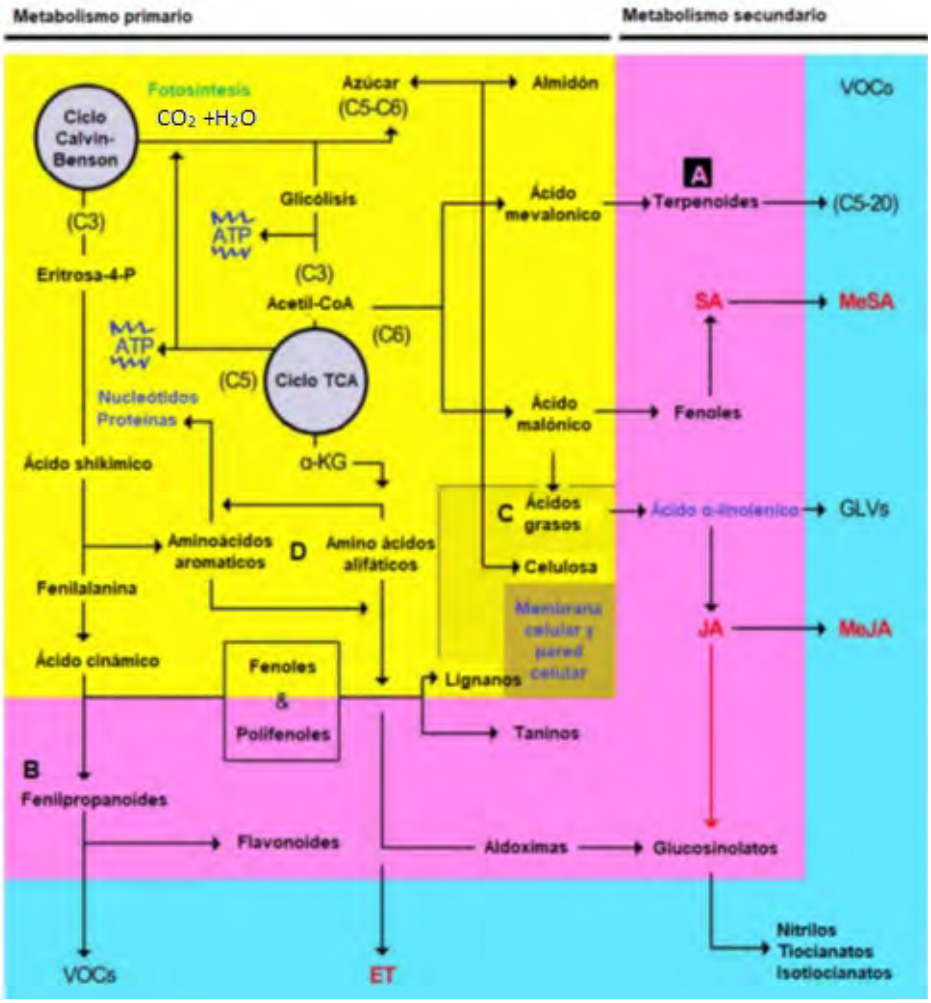


Figura 1. Resumen de las distintas rutas metabólicas para la producción de compuestos emitidos por las plantas. Adaptada de Papazian, 2017. Se puede apreciar el metabolismo primario (amarillo), el secundario (rosado) y los compuestos orgánicos volátiles (celeste). Además, las vías biosintéticas de los terpenoides (A), fenilpropanoides / bencenoides (B), derivados de ácidos grasos (C) y derivados de aminoácidos (D).

La biosíntesis de terpenoides está asociada a la ruta metabólica del ácido mevalónico y del metileritritol fosfato. Dentro de esta familia se tienen compuestos del tipo monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos), tetraterpenos (30 carbonos) y politerpenos (> a 8 unidades isopreno). A la vista de esta variedad de compuestos, es de esperar que tengan un gran valor fisiológico y comercial, en especial como aromatizantes, en el uso agrícola o por sus propiedades medicinales tales como anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc. (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009)

En cuanto a los compuestos de tipo fenilpropanoides / bencenoides se tiene al fenilacetaldehído, 2-feniletanol, benzoato de feniletilo, benzoato de bencilo, alcohol bencílico, benzaldehído, benzoato de metilo, cinamato de metilo y eugenol por nombrar algunas moléculas sencillas, como también flavonoides y polímeros complejos, tales como

taninos y lignina (Dudareva et al., 2013). Estos MS de tipo fenólicos derivan de la ruta del ácido shikímico, específicamente a partir de fenilalanina (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009)

Los compuestos derivados de ácidos grasos provienen del ácido linoleico el cual es un ácido insaturado de 18 carbonos. Mediante diversas modificaciones enzimáticas se producen varios compuestos entre ellos el ácido jasmónico, alcoholes y aldehídos de cadena carbonada de 6 a 9 unidades saturados e insaturados los que comúnmente se les llaman “volátiles de hoja verde”, por sus siglas en inglés GLVs (Dudareva et al., 2013).

Los alcaloides son una gran familia de moléculas que derivan de algunos aminoácidos, estos se biosintetizan a partir de lisina, tirosina y triptófano. Dan lugar a compuestos que a dosis altas son tóxicos y a dosis bajas tienen valor terapéutico. Algunos ejemplos son la morfina, nicotina, cafeína, atropina, por nombrar algunos (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009). También existen otros compuestos que derivan de alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina o intermediarios de su biosíntesis, que sufren modificaciones enzimáticas que dan lugar a compuestos alfa-ketoácidos los cuales pueden llegar a ser reducidos a cetonas, aldehídos, ésteres, ácidos y alcoholes (Dudareva et al., 2013).

Por último, están los glucósidos que son sustancias no reductoras que por hidrólisis liberan una o más azúcares y un componente no azucarado llamado aglicón. Existen diversas formas de clasificar estos compuestos. Aquí se nombrarán 3 grandes grupos, las saponinas que en su forma aglicón son hidrofóbicas y al agregarle azúcares (hidrofílicos) adquieren la propiedad de detergente similar al jabón. Los glicósidos cardiacos son similares a las saponinas, pero tiene en su estructura una lactona. y los glicósidos cianógenos son compuestos nitrogenados que no son tóxicos, pero cuando se degradan liberan cianuro de hidrógeno el cual es una sustancia tóxica y volátil (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009).

1.3. Familia Verbenácea

Es una familia de 34 géneros con 1200 especies, en general tiene las siguientes características: son de tamaño de arbustos o árboles pequeños con algunas lianas; tienen hojas generalmente opuestas, enteras o divididas; flores zigomorfas (solo un plano de simetría bilateral) a subactinomorfas (simetría radial), dispuestas en inflorescencias racimosas (Atkins, 2012).

Las verbenáceas y géneros que derivan de esta familia se le asocian propiedades medicinales (Tabla 1).

Tabla 1. Algunos géneros de plantas medicinales que son de la familia de las Verbenáceas endémicas chilenas.

	Familia *Verbenaceae*		
Género	**Nombre común / Nombre científico**	**Propiedad medicinal**	**Referencia**
Acantholippia	Rica-rica o Kore / *Acantholippia deserticola*	Calmar el dolor de estómago. Tratar problemas renales. Utilidad en los trastornos circulatorios. Estimulante de la leche materna.	(Ministerio de Salud, 2009; Organismo Andino de Salud, 2014; De Mosbach, 1992)
Verbena	Verbena / *Verbena litoralis*	Utilidad en casos de fiebres, diarreas, úlceras estomacales y dolencias hepáticas. La decocción se utiliza para lavar y cicatrizar heridas.	(Ministerio de Salud, 2009; Organismo Andino de Salud, 2014; De Mosbach, 1992)
Aloysia	Cedrón / *Aloysia citrodora*	Utilidad en afecciones gastrointestinales. Se emplea como calmante en el sistema nervioso. Utilidad en los resfriados febriles.	(Ministerio de Salud, 2009; Madaleno & Delatorre-Herrera, 2013; De Mosbach, 1992)

Dentro de la familia Verbenacea se tiene el género Lampayo, el cual tiene varias especies, los más descritos son *Lampayo medicinalis* de Chile, *Lampayo hieronymi* y *Lampayo castellani* de Argentina y Bolivia. Se distribuyen en llanos y faldas de la Cordillera de Los Andes donde colindan estos países (Marticorena & Villagrán, 2000). Las propiedades que se le atribuyen a este género son de uso tradicional mediante infusiones de las hojas para mitigar dolores de huesos, afecciones a la próstata, padecimientos renales y de las vías urinarias, también en trastornos hepáticos y biliares (Ministerio de Salud, 2009; Organismo Andino de Salud, 2014; De Mosbach, 1992). En este contexto, y en relación con los antecedentes descritos, es que, como objetivo de esta unidad de investigación, se estudió la especie *L. medicinalis*.

1.4. *Lampayo medicinalis*

1.4.1. Características generales

Lampayo medicinalis conocido como “lampaya” o “lampayo” (Figura 2), crece en la cordillera de Tarapacá en áreas extremadamente áridas, con lluvias muy escasas. Es un arbusto bajo, de corteza rojiza, hojas lisas y gruesas, y de flores tubuladas violáceas (Ministerios de Salud, 2009).

En los últimos años, existen algunos estudios que buscan demostrar las propiedades medicinales en el lampayo, pero cuando se publicó la “Resolución Nº 548” los efectos terapéuticos para esta especie eran sólo parte del uso y conocimiento tradicional y local (Ministerios de Salud, 2009).

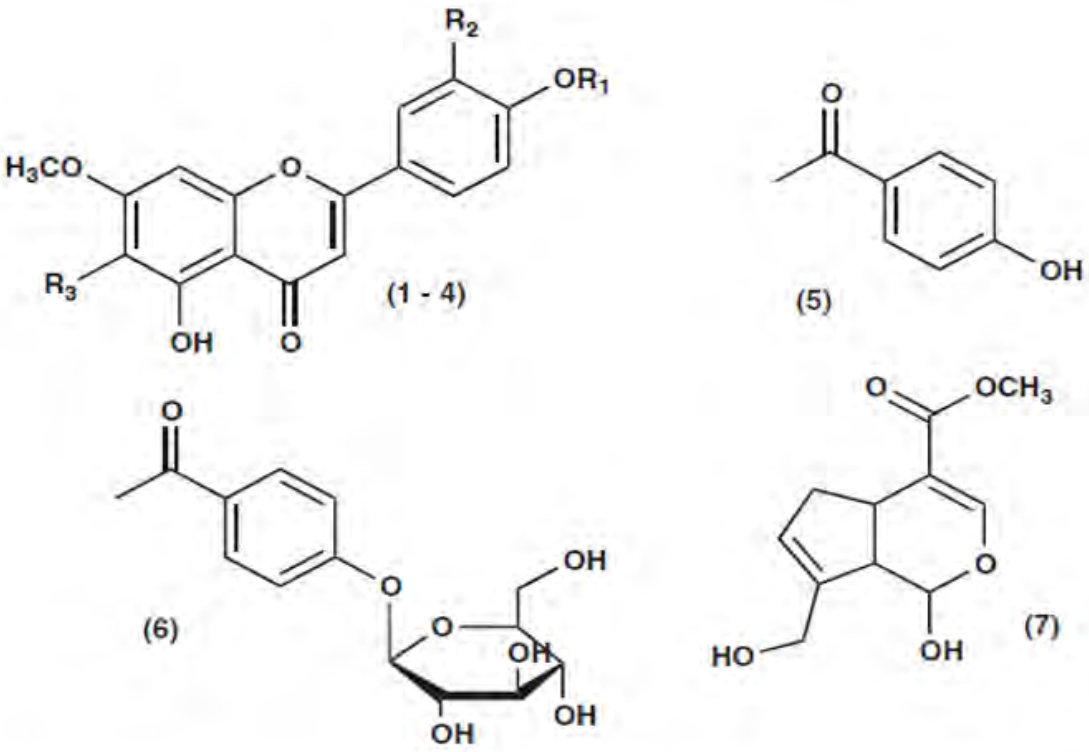


Figura 2. Fotografía de Lampayo medicinalis. Imagen obtenida de Medicamentos Herbarios Tradicionales 103 especies, 2009.

1.4.2. Antecedentes químicos y actividad biológica

Algunos autores han propuesto la caracterización química y su relación con la actividad biológica para lampayo. Se conocen 7 compuestos químicos que han sido identificados en

un extracto hidroetanólico de lampayo (EHL), estos son: 5–hidroxi −7,4′–dimetoxiflavona (**1**), 5–hidroxi–7,3′,4′-trimetoxiflavona (**2**), 5,4′-dihidroxi–7,3′-dimetoxiflavona (**3**), 5,4′–dihidroxi–6,7,3′-trimetoxiflavona (**4**), *p*-hidroxiacetofenona (**5**), 4–O–β–D–glucopiranosil acetofenona (**6**) y genipín (**7**) (Figura 3). Los compuestos del **1-4** son flavonoides los que tienen las propiedades de secuestrar especies reactivas de oxígeno, quelantes de hierro, inhibición de las enzimas lipooxigenasa, ciclo oxigenasa, mieloperoxidasa y NADPH oxidasa. Además, el extracto fue analizado mediante los siguientes ensayos: ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y DPPH (Difenilpicrihidrazilo), ensayo FRAP (Poder Antioxidante/Reductor Férrico), método de blanqueo de β-caroteno, método de fosfomolibdato y ensayo de hexacianoferrato (III). Estos ensayos evidenciaron el alto poder recolector de especies reactivas de oxígeno, alta actividad antioxidante y mediana actividad reductora. Además, al medir el contenido de fenoles y flavonoides, los autores reportan una alta concentración de estos (Morales & Paredes, 2014).



Compuestos	R_1	R_2	R_3
1	CH_3	H	H
2	CH_3	OCH_3	H
3	H	OCH_3	H
4	H	OCH_3	OCH_3

Figura 3. Compuestos químicos encontrados en el extracto hidroalcohólico de L. medicinalis. Adaptada de Morales 2014. (El EHL fue fraccionado en distintos solventes, se utilizó la fracción con acetato de etilo para hacer una columna cromatográfica en sílice y así aislar estos compuestos).

Otro estudio reveló que una dosis de 3000 mg/kg de un extracto hidroalcohólico de lampayo resultó no mortal en ratas, sin cambios de comportamientos, con una evaluación de estructuras histológicas normales (hígado, riñón, corazón, pulmones, ovarios y testículos), lo que sugiere que la administración oral de EHL o es tóxica en este modelo. Además, se estudió la actividad antinflamatoria induciendo edema en ratas mediante carragenano. Esto reveló que el EHL inhibía significativamente el edema en un 61% (300 mg / Kg), comparado con indometacina (10 mg / Kg) con un 49%, a las dos horas. La actividad antiinflamatoria se explicaría por la presencia de flavonoides (Morales et al., 2014).

Otro estudio demostró que la extracción hidroetanólica de lampayo es capaz de restaurar la activación vía IRS-1 / Akt / AS160, que están relacionadas con la sensibilidad a la insulina y la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 tratados con ácido palmítico para simular un estado de resistencia a la insulina (Ormazabal et al., 2020).

Por último, un estudio en células HepG2 tratadas con ácido oleico y ácido palmítico, para simular un estado de enfermedad del hígado graso no alcohólico, usó un extracto hidroetanólico de lampayo, lo que resultó en la disminución de gotas lipídicas y triglicéridos, también disminuyendo la expresión de DGAT2 que es una enzima que cataliza la etapa final para la síntesis de triglicéridos (Ormazabal et al., 2021).

1.5. Técnicas de muestreo y caracterización de metabolitos secundarios

En cuanto al estudio de los metabolitos secundarios de plantas medicinales existen diferentes técnicas de obtención de estos, tales como maceración, infusión percolación, extracción soxhlet, decocción, extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido, microextracción en fase sólida, headspace dinámico y estático, entre otros (Azwanida, 2015).

En el caso de las técnicas de muestreo reportadas para obtener diversos MS en lampayo, se ha utilizado de preferencia la maceración. (Garrido et al., 2013; Morales & Paredes, 2014). En esta unidad de investigación se utilizaron, a fin de abordar un perfil más amplio de MS (volátiles y no-volátiles): maceración y headspace dinámico.

La *maceración* es una técnica utilizada ampliamente en la investigación de plantas medicinales. Esta implica remojar los materiales vegetales (gruesos o en polvo) en un recipiente con tapa con un solvente, dejándolos a temperatura ambiente por un período mínimo de tres días con agitación frecuente (Handa et al., 2008). El procesado tiene como objetivo ablandar y romper la pared celular de la planta para liberar los fitoquímicos solubles. Después de tres días, la mezcla se prensa o se cuela por filtración. La elección de los disolventes determinará el tipo de compuesto extraído de las muestras (Azwanida, 2015). Este método de extracción es sencillo, pero produce residuos orgánicos; la alteración de la temperatura y la elección del solvente mejoran el proceso de extracción (Azwanida, 2015).

El *headspace dinámico* es la técnica comúnmente utilizada para el análisis de COVs (Tholl et al., 2006). Este método de muestreo utiliza una corriente de aire continua que fluye a través de un recipiente para incrementar el tamaño de muestra, mientras tanto los analitos son capturados por una matriz adsorbente, el aire recircula por el recipiente de manera de

capturar la mayor cantidad de analito posible (Figura 4). La toma de muestra con este método conserva la planta intacta sin destruirla en comparación con métodos con solventes por lo que ofrece un muestreo más realista del perfil constitutivo de volátiles emitidos por las plantas. Pero, los dispositivos que se utilizan para recolectar deben ser inertes para no retener volátiles y no producir daño a las plantas, esto podría causar contaminación de la muestra o alterar el análisis de volátiles (Tholl et al., 2006).

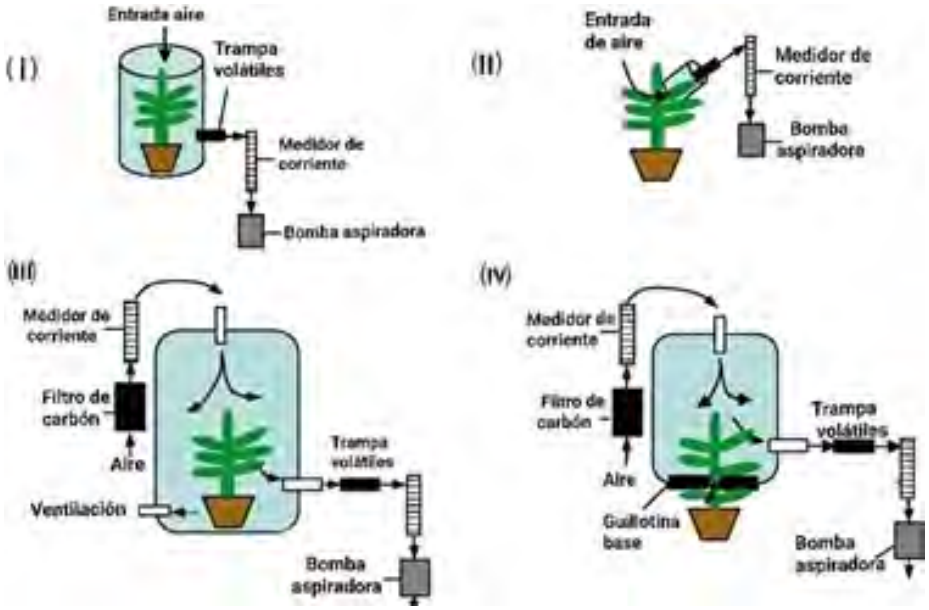


Figura 4. Tipos de sistemas de recolección de muestra por headspace dinámico. Adaptado de Tholl et al 2006. (I: pull simple para recolección de toda la planta con aire del entorno; II: pull para recolección de una sola hoja; III: push-pull para recolección de toda la planta con aire filtrado; IV: push-pull modificado para recolección de una parte específica de la planta con aire filtrado).

Para la detección de compuestos fitoquímicos que existen en las plantas es necesario buscar el órgano de ésta que tenga la mayor concentración de MS y, los TG, son el candidato perfecto. Técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), resonancia magnética nuclear de protón y carbono (^{1}H y ^{13}C NMR), cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masa (GC-MS), entre otras, son utilizadas para elucidar las estructuras químicas de estos metabolitos (Killeen et al., 2016; Ghosh et al., 2014; Schilmiller et al., 2010; Agati et al., 2002).

En cuanto a esta investigación se trabajó con GC-MS, la cual se fundamenta en separar, identificar y cuantificar *moléculas volátiles* basado en la relación masa/carga (m/z) en matrices líquidas o sólidas después de su ionización (Schneck et al., 2015). Además, el análisis de *moléculas no volátiles* se realizó con cromatografía liquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos y detector de fluorescencia (HPLC-DAD-FL), la cual se fundamenta en la separación y análisis de compuestos químicos en una mezcla, y para que esto sea posible es necesario que participe una fase móvil (liquida, su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria), fase estacionaria (sólida o película líquida soportada en un sólido inerte) y la muestra de interés. Las fuerzas químicas y físicas que

actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla (Suárez & Morales, 2018). Además, los detectores acoplados al HPLC (DAD-FL) permiten analizar las moléculas de la muestra aprovechando sus propiedades físicas de emisión y absorción de la radiación emitida por una fuente de luz (Barquero, 2004).

Es por tanto que, el conocimiento de los diferentes metabolitos secundarios de una especie vegetal permitirá proponer un quimiotipo que incluya sustancias volátiles y no volátiles que se relacionen o den sustento a sus propiedades terapéuticas reconocidas por la medicina *tradicional*.

Por lo tanto, las preguntas de investigación de este proyecto fueron: ¿Cuál es la composición química de los extractos volátiles y no-volátiles de las hojas de *L. medicinalis*? ¿Cuál es el quimiotipo predominante en los diferentes extractos de *L. medicinalis* que podría relacionarse con sus propiedades medicinales? En relación con ello se propuso que la utilización de dos técnicas de muestreo permitirá obtener un perfil químico más amplio de los compuestos emitidos de las hojas de *L. medicinalis* los que podrían tener relación con sus actividades biológicas reportadas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Estudiar y comparar la composición química de hojas de *L. medicinalis* mediante el análisis de sus metabolitos volátiles y no volátiles.

2.2. Objetivos específicos

- Obtener el extracto volátil y no volátil de *L. medicinalis* mediante headspace dinámico y maceración dinámica, respectivamente.
- Identificar los compuestos volátiles y no-volátiles emitidos por *L. medicinalis* mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida con detección con arreglo de diodos y fluorescencia (HPLC-DAD-FL).
- Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto hidroetanólico de *L. medicinalis* mediante el método de Folin-Ciocalteu y $AlCl_3$, respectivamente.

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención del material vegetal

El material seco de lampayo fue comprado en Australia Herbolaria®, Santiago de Chile. A continuación, se detallan algunos datos de la ficha técnica (Tabla 2):

Tabla 2. Ficha técnica de L. medicinalis.

PROCESO	Cosecha manual de la planta - traslado y deshidratado a horno industrial a temperatura de 60º por 7 horas. Control de parámetros organolépticos, humedad y niveles de pureza - selección-envasado -producto terminado.
ALMACENAMIENTO	Almacenamiento en recipientes bien cerrados, en lugar fresco y seco, a temperatura ambiente (15-25 °C).

El material vegetal se almacenó en el Laboratorio de Química de Metabolitos Bioactivos en un lugar fresco, seco y con baja luminosidad.

3.2. Análisis botánico de la cutícula de las hojas

El material vegetal fue identificado taxonómicamente por la botánica Mag. Pamela Ramírez, curadora del Herbario de VALPL de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Playa Ancha.

Se utilizó el método de Schultze (Dizeo de Strittmater, 1973; Albornoz, s/a). Este es un método que se aplicó bajo campana, ya que la reacción genera gases tóxicos. Los pasos fueron los siguientes:

En un vaso precipitado se colocaron 3 g de cristales de $KClO_3$ y 30 mL de HNO_3. Luego se colocó el material vegetal en la solución. El material vegetal se dejó en esta solución por 4 días, al final del proceso se aplicó calor por 5 min hasta que se generaron burbujas, esto se hizo dos veces. En medio de la reacción, se pinchaba el material con la aguja histológica hasta que su consistencia fue blanda y pulposa. Una vez listo el material se interrumpió la reacción y se trasladó a una cápsula con NH_3 (una vez) y posteriormente se lavó con agua destilada. A continuación, se trasladó el material a una cápsula de Petri nueva con agua, se observó bajo lupa con detalle los restos del mesófilo que quedaron y se limpió con un pincel muy fino, ayudándose siempre de una pinza y aguja para sostener el material. Una vez limpia la muestra, se colocó el material vegetal en un portaobjetos, estirándolo suavemente con el pincel y la aguja, se agregó una gota de safranina diluida para colorear y se escurrió el excedente.

Finalmente, se agregó una gota de gelatina (colapez), previamente mezclada con glicerina, sobre el material vegetal estirado y coloreado y se colocó con el cubreobjetos. La muestra se selló con esmalte de uñas transparente, esparciendo con la brocha por los bordes del cubreobjetos.

La observación y comparación de los tejidos se realizó en un microscopio con los diferentes oculares, en 4x, 10x y 40x, para distinguir con detalle el tipo de estomas, el tipo de células epidérmicas y epinervias en algunos casos, así como los distintos tipos de pelos y glándulas que se presentaron.

Los resultados de este experimento se encuentran en la sección anexos (Figura 24).

3.3. Maceración dinámica para colectar no-COVs

Se utilizó la metodología adaptada de Morales & Paredes (2014). Para este trabajo se obtiene el porcentaje de rendimiento con siguiente ecuación:

$$\%\ Rendimiento = [\ \mathrm{ES\ (g)}\ x\ 100\ ]\ x\ M^{-1}\ \mathrm{(g)}$$

dónde: ES = masa del extracto seco y M = masa del material vegetal de partida

3.3.1. Maceración en etanol:

Se usaron 600 g de material vegetal, el que fue macerado en una mezcla de etanol 99% (J.T.Baker®) / agua (1:1, v / v, 1000 mL) por una semana, se agitó por 15 min cada día, a temperatura ambiente. La mezcla se filtró con papel filtro Whatman No. 2, luego el solvente fue evaporado en un Rotavapor Dragonlab RE-100 Pro y el extracto acuoso fue liofilizado en Liofilizador VirTis Benebtop K. El extracto seco fue almacenado a 4 °C para posteriores ensayos de caracterización.

3.3.2. Maceración en hexano:

Se usaron 500 g de material vegetal, el que fue macerado en hexano (J.T.Baker®, 2000 mL) por una semana, se agitó por 15 min cada día, a temperatura ambiente. La mezcla se filtró con papel filtro Whatman No. 2, luego el solvente fue evaporado en un Rotavapor Dragonlab RE-100 Pro, obteniendo un extracto seco que fue almacenado a 4 °C para posteriores ensayos de caracterización.

3.3.2.1. Cromatografía en columna del extracto hexánico:

2,5935 g del extracto seco fue suspendido en diclorometano (DCM) para ser fraccionado en una columna cromatográfica en silica gel (Merck) la cual fue eluida en gradiente ascendente de polaridad de acetato de etilo:hexano (ambos calidad técnica, previamente destilados) (30:70 a 46:54 v/v), colectando las fracciones obtenidas. Las fracciones obtenidas se analizaron cualitativamente usando TLC las que eluyeron en una mezcla de acetato de etilo / hexano (70/30 %) y se revelaron con lámpara UV y H_2SO_4 al 10%.

Las fracciones impuras se eluyeron nuevamente en una columna cromatográfica, utilizando las mismas condiciones descritas previamente.

3.4. Headspace dinámico para colectar COVs

Se empleó la metodología adaptada de Knudsen et al., 1993, y se realizó por triplicado. Consistió en que el material vegetal de *L. medicinalis* (100 g) se aisló usando bolsas de polivinilacetato (215 mm x 80 mm) las que se sellaron con cinta masking. Estas tuvieron dos conexiones, una para colocar la matriz adsorbente (100 mg de HayesepQ®; Analytical Research Systems Inc., Bellefonte, PA., USA) que estuvo contenida en un tubo de vidrio empacado con lana de vidrio en los extremos, y otra para colocar un filtro de carbón activo

(también empacado con lana de vidrio) usado como filtro del aire circulante. El tubo que contenía la trampa adsorbente se conectó a un muestreador de aire portátil (Micro Air Sampler Supelco PAS-500) manteniendo un flujo de aire de 200 mL x min^{-1} por 24 horas bajo condiciones de laboratorio. El montaje para este método se puede observar en la figura 5.

Adicionalmente, se realizó un muestreo de aire circulante bajo las condiciones de trabajo en el laboratorio. Esta muestra fue considerada como un blanco o control de aireación.

En ambos casos, las trampas de volátiles fueron desorbidas usando *n*-hexano (SupraSolv; Merck) con un volumen final de 1.0 mL de extracto. Los extractos se mantuvieron a -18 °C hasta su análisis por GC-MS.



Figura 5. Sistema de colecta de volátiles. Muestreador de aire conectado a trampa adsorvente, ensamblado en bolsa de polivinilacetato con filtro de aire de carbón. Dentro se observan hojas de lampayo.

3.5. Caracterización química de los extractos no-COVs y COVs de *Lampayo medicinalis*.

3.5.1. Extractos no-COVS de *L. medicinalis*.

3.5.1.1. Caracterización del extracto hidroetanólico y hexánico por espectroscopia FT-IR.

A partir de los extractos hidroetanólicos y hexánicos de *L. medicinalis*, se tomó una pequeña muestra (una punta de espátula), se llevaron a tubos eppendorf y se agregó un pequeño volumen de DCM (aprox. 0,3-0,5 mL). De estas soluciones se tomaron entre 2 a 4 gotas, las cuales se depositaron directamente sobre la celda de vidrio de muestreo. Esta celda se fijó en un portaceldas y se colocó en el equipo de espectroscopia infraroja con transformador fourier (FT-IR). Además, se realizaron espectros FT-IR con algunas fracciones del extracto hexánico (3). En todos los casos, los espectros se obtuvieron con el equipo Nicolet iS5 (Thermo Scientific), utilizando el software OMNIC 9.1.27. Para todos los espectros se realizaron previamente blancos (background), utilizando la celda limpia, sin

muestra, con el objetivo de eliminar la interferencia natural que tiene el haz infrarrojo con el aire ambiente (Mondragón Cortez, 2020).

3.5.1.2. Caracterización del extracto hidroetanólico mediante HPLC-DAD-FL.

La identificación y cuantificación de este extracto se realizó utilizando un método de cromatografía líquida de alta resolución, adaptado de Celis-Plá et al. (2018).

A partir del extracto hidroetanólico de *L. medicinalis*, se preparó 5 mL de una solución de 1000 ppm en metanol / agua y se filtró por un filtro Millipore 0,22 µm previo a su inyección en el cromatógrafo.

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución con autosampler modelo SIL20AC, horno de columna modelo CTO-20AC, desgasificador modelo DGU-20A5, bomba modelo LC-20AD y detector de arreglo de diodos SPD M20A, Shimadzu.

La identificación de los polifenoles se realizó por comparación de los tiempos de retención y espectros de absorción de estándares (190- 800 nm) de floroglucinol, ácido gálico, ácido cafeico, rutina, ácido cinámico, quercetina y camferol con las señales cromatográficas detectadas en las muestras. Los tiempos de retención de los estándares (en el mismo orden citados) fueron: 4,49; 4,98;18,91; 25,42; 25,74; 35,00 y 42,12 min (Figura 6).

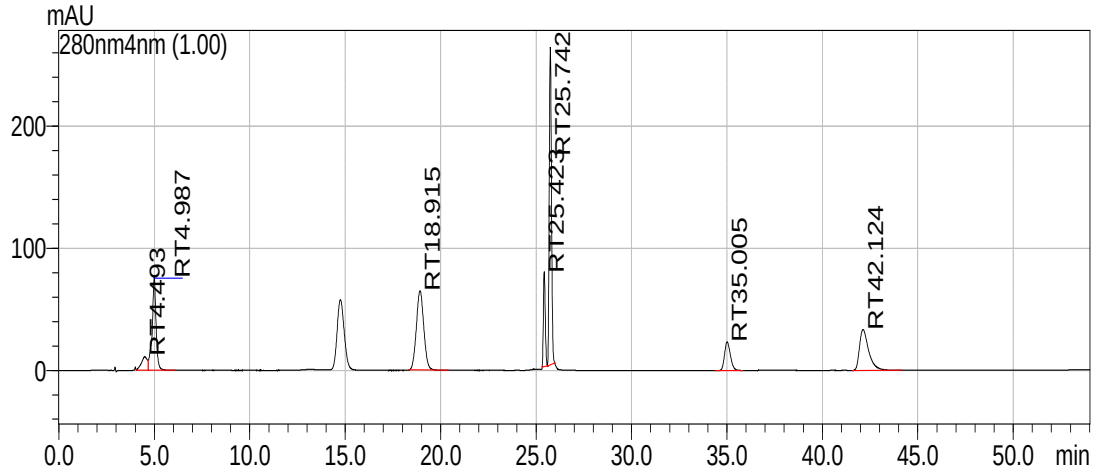


Figura 6.Cromatograma de estándares utilizados en el análisis por HPLC-DAD-FL. (Por orden de elución aparecen floroglucinol, ácido gálico, ácido cafeico, rutina, ácido cinámico, quercetina y camferol. La señal cromatográfica que se muestra sin tiempo de retención corresponde a la elución conjunta de ácido clorogénico y el ácido 3,4 hidroxibenzoico).

La separación cromatográfica se realizó sobre un volumen de muestra de 20 µL (volumen de inyección), en una columna RP18 InertSustain (4,6 mm, 250 mm, 5µm), protegida por una precolumna Nucleodur C18 Gravity, en un horno a 30°C, detectándose los analitos a una longitud de onda de trabajo de 280 nm. La fase móvil consistió en acetonitrilo (CH_3CN) y ácido fosfórico (H_3PO_4) al 1% en agua HPLC. La elución de los analitos se realizó en gradiente (ver tabla 3).

Tabla 3. Parámetros cromatográfícos en relación con la fase móvil, tiempo y porcentajes de la fase.

Tiempo (min)	**Fase móvil (%)**	
	CH_3CN	H_3PO_4
0	10	90
12,0	12	88
16,0	12	88
16,01	15	85
18,00	15	85
18,01	30	70
30,0	30	70
30,01	35	65
36,0	35	65
36,01	10	90
45,0	10	90
45,01	0	100
54,0	0	100

3.5.1.3. Caracterización del extracto hexánico mediante GC-MS.

El análisis se realizó usando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GCMS QP 2010 Plus, Shimadzu) equipado con una columna capilar Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm id x 0.25 µm df). Helio fue usado como gas portador con un flujo de 1.0 mL min-1. La adquisición del espectro de masas se realizó en un rango de 35 a 500 m/z, con modo full scan a una frecuencia de 1.56 scan/s, con una ionización por impacto electrónico a 70 eV y una línea de transferencia a 280 °C. Las condiciones cromatográficas fueron 50 °C por 5 min y un aumento de 8 °C/min hasta 280 °C los que se mantuvieron por 15 min.

A partir del extracto hexánico se preparó una disolución 1000 ppm (en hexano) de la cual se inyectó 1 µL en modo split. También, se inyectaron algunas fracciones del extracto hexánico (fx 1, fx 2 y fx 3), de las cuales se prepararon soluciones de 1000 ppm en hexano, siendo inyectadas en el mismo modo y con igual volumen.

Un estándar de alcanos C_7-C_{30} 10 ng/mL (Supelco) se utilizó para calcular los índices de Kovats (IKs) (ver ecuación 1). Los compuestos se identificaron por comparación de IKs y espectro de masas (MS), con la literatura (librerías de espectros Wiley y NIST), considerando un Match bibliográfico del 70%.

La cuantificación de cada analito se realizó mediante el método de normalización de área, considerando la suma de las áreas de los MS detectables como el 100% y luego relacionando el área de cada metabolito con el área total de todas las señales.

Ecuación 1. Índice de Kovats para un programa de temperatura

$$IK = \left[\frac{t_{r\,(desconocido)} - t_{r\,(n)}}{t_{r\,(N)} - t_{r\,(n)}}\right] \times (100 \times z) + (100 \times n)$$

Donde IK= índice de retención de Kovats; n = número de átomos de carbono en el alcano más pequeño; N = número de átomos de carbono en el alcano más grande; z = diferencia del número de átomos de carbono entre alcano más pequeño y el más grande; t_r = tiempo de retención.

3.5.2. Determinación del contenido total de polifenoles y flavonoides en el extracto hidroetanólico.

3.5.2.1. Estimación del contenido de polifenoles totales (CPT) mediante el método de Folin-Ciocalteu.

La CPT del extracto hidroetanólico de *L. medicinalis* se determinó por el método de Folin-Ciocalteu adaptado de Kumar et al., 2020. Este método se fundamenta en la capacidad de reducir el Mo VI a Mo V lo que resulta en que el reactivo de color amarillo adquiere un color azul que se mide con espectrofotómetro (Oranday Cárdenas & Verde Star, 2016).

En primer lugar, se construyó una curva de calibrado con una solución madre acuosa de ácido gálico de concentración 500 μg / mL. A partir de ella, se prepararon soluciones de concentración 20, 30, 40, 50, 60 y 70 ($\mu g/mL$). Se tomaron 100 μL de cada punto de la curva, se les adicionó 100 μL del reactivo Folin Ciocalteu (en oscuridad; hasta 2 min) y se agregó 800 μL de carbonato de sodio al 5% p/v (acuoso) a un tubo eppendorf. Los tubos con cada punto de la curva fueron agitados y se colocaron un baño ultrasonido por 20 min a 40°C. Se realizó un blanco con 100 μL de agua, 100 μL de reactivo Folin Ciocalteu y 800 μL de carbonato de sodio al 5%.

Para la estimación del contenido de polifenoles totales del extracto seco hidroalcohólico de lampayo, se masó 6,1 mg y se aforó a 1000 μL con una mezcla de metanol al 99% / agua (1:1). Luego se pipetearon 100 μL y se agregaron 100 μL mezcla 1:1 metanol/agua (fd = 2). Luego, se tomaron 25 μL y se llevó a un volumen final de 200 μL con la mezcla 1:1 etanol/agua (fd = 8). Posteriormente, se tomaron 10 μL y se llevó a un volumen de 200 μL con la misma mezcla (fd = 20). Y finalmente, se tomaron 100 μL de la dilución final, más 100 μL del reactivo Folin-Ciocalteu y 800 μL de carbonato de sodio al 5% p/v, los que se agregaron a la cubeta de medida (fd = 10).

La medición de la curva de calibrado como las muestras del extracto de lampayo se realizaron en triplicado en un espectrofotómetro Spectronic R20 Genesys TM131 a una longitud de onda de 740 nm. La cantidad de compuestos fenólicos presentes en la muestra se extrapoló del promedio de las curvas de calibrado del ácido gálico. El CPT se expresó como mg EAG / g ES (miligramos de equivalentes de ácido gálico en relación con los gramos del extracto seco de lampayo).

3.5.2.2. Estimación del contenido de flavonoides totales (CFT) mediante el método de $AlCl_3$.

La estimación del contenido de flavonoides totales del extracto hidroetanólico de *L. medicinalis* se determinó por el método colorimétrico $AlCl_3$ adaptado de Kumar et al, (2020). Este método se fundamenta en la formación de un complejo coloreado entre el ion aluminio y los grupos carbonilo e hidroxilo presentes en flavonas y flavonoles (Shraim et al., 2021).

En este método se utilizó un espectrómetro de 96 pocillo el cual se acondicionó a 25°C.

Primeramente, se construyó una curva de calibrado con una solución madre de quercetina (Sigma) de concentración 200 μg / mL. A partir de ella, se prepararon soluciones de concentración 20, 40, 80, 100, 150 y 180 ($\mu g/mL$). Se tomaron 30 μL de cada punto de la curva, se le adiciono 10 μL de $AlCl_3$ (Sigma) al 10%, 10 μL de acetato de sodio (Sigma) 1M y luego rellenar con 250 μL de agua. Se realizó un blanco con 30 μL de metanol, 10 μL de $AlCl_3$ al 10%, 10 μL de acetato de sodio 1M y 250 μL de agua.

Para la estimación del contenido de flavonoides totales del extracto seco hidroalcohólico de lampayo, se preparó una solución de esta a una concentración de 1,73 mg / mL. Para la medición se rellenaron los pocillos en este orden: 30 μL de muestra de extracto de hidroetanólico de lampayo, 10 μL de $AlCl_3$, 10 μL acetato de sodio 1 M y 250 μL de agua (fd=10). Esto se dejó reaccionando por 30 min y protegido de la luz. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia contra el blanco del ensayo a 465 nm. Esto se realizó por triplicado.

La cantidad de flavonoides totales presentes en la muestra se extrapolo del promedio de las curvas de calibrado de quercetina. El CFT se expresó como mg EQ / g ES (miligramos equivalentes de quercetina por gramos de extracto seco de lampayo).

3.5.3. Extracto COVS de *L. medicinalis*.

3.5.3.1. Caracterización del extracto volátil mediante GC-MS.

El análisis se realizó usando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GCMS QP 2010 Plus, Shimadzu) equipado con una columna capilar Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm id x 0.25 µm df). Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que se describieron en la sección 3.5.1.3. Al igual que en el análisis de los extractos no-volátiles, se determinó los IKs y la identificación se realizó por comparación de estos y de los espectros de masas con literatura.

Para la cuantificación de los compuestos volátiles, y con el fin de proponer un quimiotipo representativo, a 100 µL de los extractos volátiles (n=3) se les agregó 10 µL de estándar interno (4-clorobenzoato de 4-alil-2- metoxifenilo; 100 ppm en DCM) para estimar la abundancia/proporción relativa de cada metabolito secundario. El análisis se realizó por integración del área bajo la curva de cada señal en relación con el perfil cromatográfico total y su relación con el estándar interno, reportándose como porcentaje de emisión. Para ello, se utilizó el software GCMS Labsolutions (Shimadzu).

4. Resultados y Discusión.

4.1. Rendimientos de maceraciones dinámicas para colectar no-COVs

4.1.1. Rendimiento maceración en etanol

Del extracto etanólico seco de *L. medicinalis*, se obtuvo un rendimiento de 7,63 % (45,7811 g; ver figura 7) considerando una masa inicial de 600 g. Este fue de color cafe, olor característico, parecido a infusión de té concentrado, y de textura sólida (Tabla 2).



Figura 7. Extracto hidroetanólico de lampayo obtenido.

Garrido et al. (2013) reportaron rendimientos de distintas técnicas de extracción de *L. medicinalis* en donde obtuvieron un 33,9% en maceración en metanol, 10,9% en maceración en agua, 32,8% por decocción y 23,3% por infusión. Se puede apreciar que la técnica con mayor rendimiento es la maceración. Este autor sin embargo no reporta la cantidad de material vegetal inicial utilizado.

Morales & Paredes (2014), en su estudio del extracto de *L. medicinalis* y su evaluación de la actividad antioxidante, no muestran un apartado de rendimiento, pero si informan la cantidad inicial de material vegetal de 4,2 Kg y la cantidad de extracto seco obtenida después de una maceración con etanol / agua (1:1; v/v), que fue de 1,02 Kg por lo tanto se puede inferir un rendimiento de 24,29%.

En este trabajo no se obtuvo un porcentaje de rendimiento cercano a los reportados por estos autores, pero hay que tener en consideración que no se utilizó el mismo solvente, si se compara con Garrido et al. (2013) y, además, no se utilizó la misma cantidad de material vegetal, si se compara con Morales & Paredes (2014).

Para este tipo de extractos hay que tener en cuenta la capacidad de los disolventes para extraer los compuestos desde el material vegetal, a la temperatura o al tiempo de extracción (Azwanida, 2015). Sin embargo, un punto importante a discutir es la procedencia y tratamiento del material vegetal. En el caso de los autores mencionados, se informa que el material vegetal se obtuvo mediante recolección manual en la región de Antofagasta en la localidad de Turi a 3077 metros de altura sobre el nivel del mar (Garrido et al., 2013) y en Socaire a 3230 metros de altura sobre el nivel del mar (Morales & Paredes., 2014), en cambio en esta investigación se trabajó con material seco comercial, adquirido de Australis Herbolaria®, que, si bien ha sido certificado botánicamente para validar la identidad de la especie, se desconoce la data y lugar exacto de colecta, como también la totalidad del

tratamiento para su posterior comercialización (parte de esta información se obtuvo de la ficha técnica del producto).

4.1.2. Rendimiento maceración en hexano

Del extracto hexánico seco de *L. medicinalis,* se obtuvo un rendimiento de 1,01% (5,068 g; ver figura 8) considerado una masa inicial de 500 g. Este fue de color amarillo, olor característico, refrescante, parecido al anís, y textura solida- cerosa (Tabla 4).



Figura 8. Extracto hexánico de lampayo obtenido.

Además de la cromatografía en columna se obtuvieron 3 fracciones las cuales se asignaron como fx 1, fx 2 y fx 3 por su orden de salida (Figura 9). En donde la fx 1 obtuvo un 50% de rendimiento, y las fracciones 2 y 3 tuvieron un rendimiento más bajo (1,29% y 2,00%, respectivamente). En la sección 4.4 se esclarece la purificación de estas fracciones.

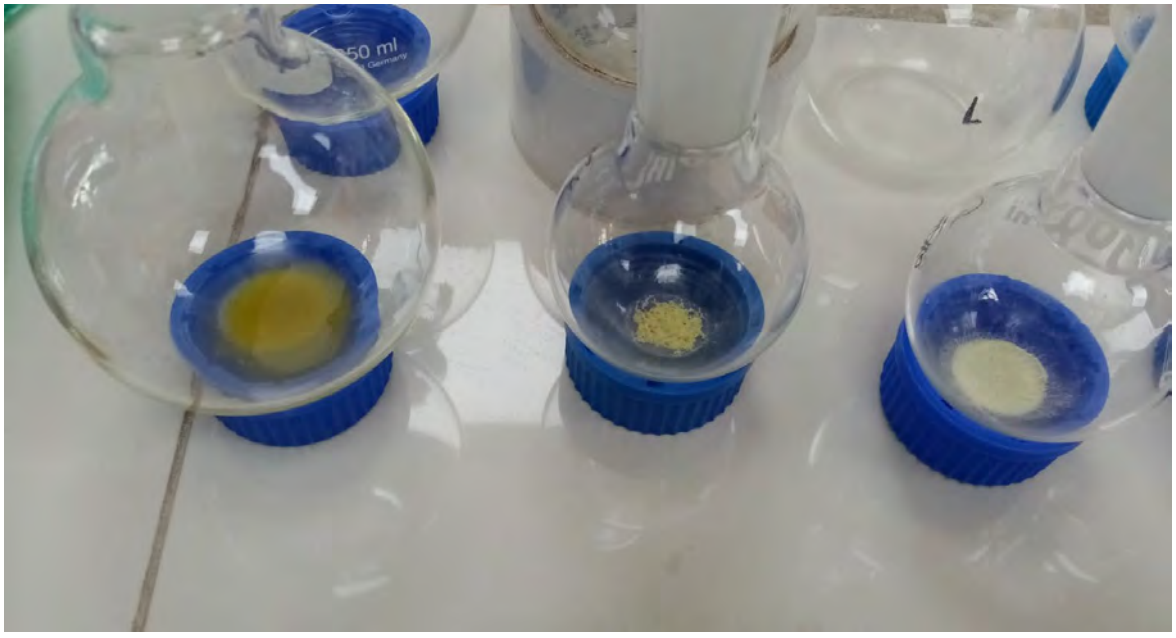


Figura 9. De izquierda a derecha, se observan las fx 1, 2 y 3 secas. Luego de evaporación rotatoria y dejar bajo campana para eliminar el solvente.

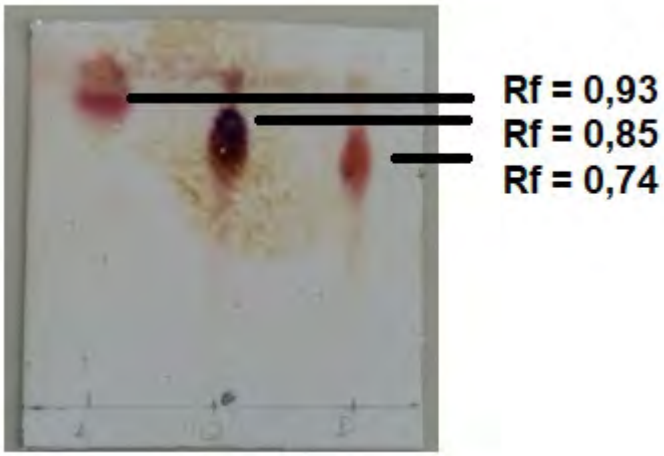


Figura 10. De izquierda a derecha se observan lo Rf de corrida de TLC en 30/70% de Acetato de etilo: hexano. Fracciones 1, 2 y 3 mostraron Rf de 0,93, 0,85 y 0,74 respectivamente.

Para *L. medicinalis* no hay estudios respecto a extractos hexánicos, por tanto, no se han reportado hasta la fecha, compuestos de mediana a baja polaridad, pero como se puede apreciar el rendimiento del extracto es más bajo en comparación con los compuestos más polares. Esto podría dar indicio de que la composición de MS apolares es inferior en comparación con los polares, o que podría ser adecuado hacer una maceración con un solvente de polaridad intermedia, como diclorometano.

Tabla 4. Cantidad de macerado resultante según solvente y fracciones.

Solvente	Rendimiento (%)	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Características
Hexano	1,01	500	5,068	Color: amarillo opaco con puntos blancos Olor: parecido al anís Textura: sólido, mantecoso
Fracciones (fx)				
1	49,57	2,5935	1,2857	Color: amarillo claro Olor: parecido al anís Textura: cerosa
2	1,29	2,5935	0,0334	Color: blanco Olor: sin olor Textura: sólido
3	2,00	2,5935	0,0519	Color: amarillo Olor: sin olor Textura: sólido
Etanol	7,63	600	45,7811	Color: cafe

	Olor: infusión de té concentrado Textura: sólido

4.2. Espectroscopia FT-IR de extractos no-COVs de *L. medicinalis*

4.2.1. Espectroscopia FT-IR de extracto hexánico total

Se obtuvo previamente a la muestra el espectro del blanco (background), para eliminar interferencia del ambiente. El espectro de absorbancia obtenido de la muestra hexánica total de *L.medicinalis* muestra 6 señales de intensidad media (1-6) y una señal intensa (7) (Figura 11). Dentro de las señales destacables, las señales 5 y 7 (1696 y 1270 cm^{-1}) son características del grupo funcional cetona por el estiramiento y la tensión del carbonilo (señales teóricas ~1715 y 1300-1100 cm^{-1}, respectivamente). Las señales 2, 3 y 4 (2989, 2924 y 2849 cm^{-1}) son de enlaces de tipo carbono-hidrogeno sp^3 y la señal 1 (3053 cm^{-1}) carbono-hidrógeno sp^2. Estos tipos de frecuencias podrían ser de un grupo funcional alcano y alqueno, al comparar con los valores teóricos (Tabla 5).

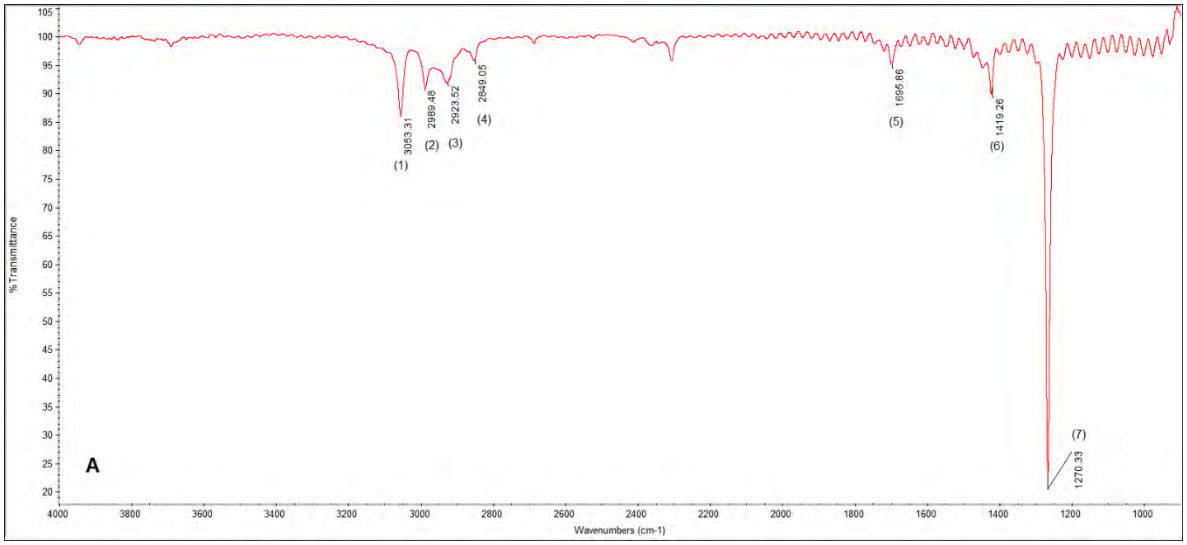
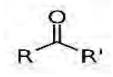


Figura 11. Espectro de absorbancia FT-IR de extracto total en hexano.

La señal 5 (1696 cm^{-1}) también puede ser atribuible a grupos carbonilo de aldehídos y ésteres, cuyas frecuencias teóricas están entre los 1715-1750 cm^{-1}, esta señal no está dentro de este rango, por lo que es factible que sea una cetona por las razones antes mencionadas, pero este espectro es de un extracto completo por lo que las señales podrían verse desplazadas o solapadas. En este contexto, para validar estos resultados, se requieren de técnicas de separación, por ejemplo, Cromatografía por Columna, y pruebas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono, por mencionar algunas.

Tabla 5. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del extracto total en hexano.

Grupo funcional	Frecuencia $cm^{-1(e)}$	Intervalo de frecuencia $cm^{-1(t)}$	Enlace	Tipo de vibración
Cetona 	1696 (5)	~1715	C=O	Estiramiento del carbonilo
	1270 (7)	1300-1100	C=O	Tensión del carbonilo
Éster 	1696 (5)	1750-1735	C=O	Estiramiento del carbonilo
		1210-1160	C-C(O)-O	Estiramientos simétricos y asimétricos
Alcanos (solo C-H)	2989 (2), 2924 (3), 2849 (4)	2950-2800	sp^3 C-H	Tensión enlace simple sp^3
Alquenos (solo C-H)	3053 (1)	>3000 ó ~3000	sp^2 C-H	Tensión enlace doble sp^2

[e]: dato experimental

[t]: intervalo teórico

4.2.1.1. Espectroscopia FT-IR de la fracción 1

Se obtuvo previamente a la muestra el espectro del blanco (background), para eliminar interferencia del ambiente. El espectro de absorbancia obtenido de la fracción 1 hexánica muestra 11 señales (Figura 12). Dentro de las señales destacables, las señales 5 y 10 (1730, 1264 cm^{-1}) son características del grupo funcional cetona por el estiramiento y la tensión del carbonilo teórico (~1715 y 1300-1100 cm^{-1}, respectivamente). Las señales 2, 3 y 4 (2960, 2930 y 2849 cm^{-1}) son de enlaces de tipo carbono-hidrógeno sp^3 y la señal 1 (3058 cm^{-1}) carbono-hidrógeno sp^2, estos tipos de frecuencias podrían ser de un grupo funcional alcano y alqueno, al comparar con el intervalo de frecuencia teórico (Tabla 6).

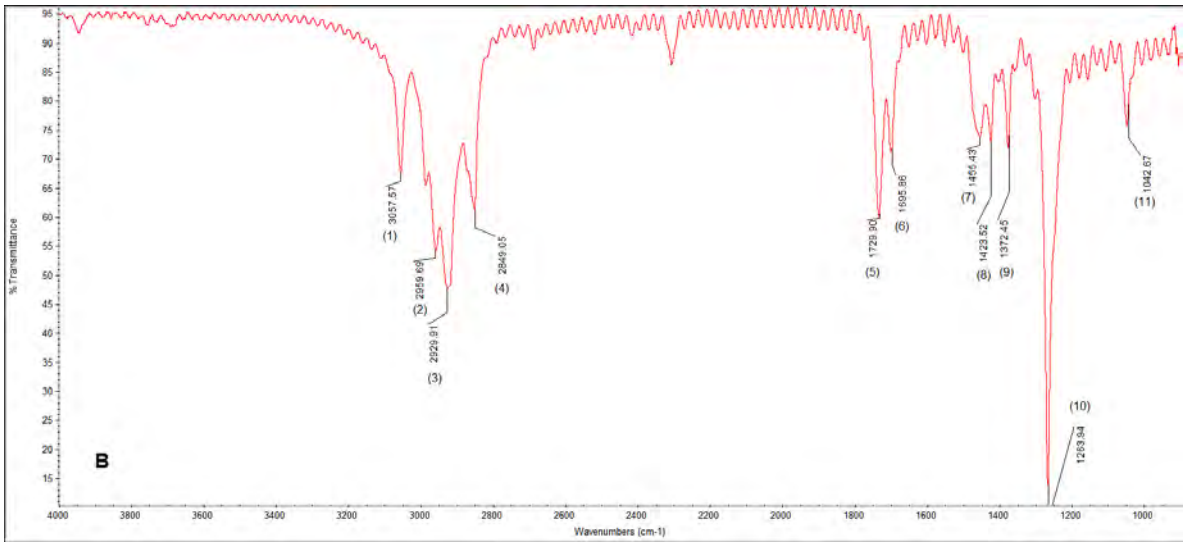
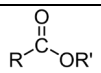


Figura 12. Espectro de absorbancia FT-IR de fracción 1.

La señal 1 (3058 cm^{-1}) también puede ser indicativo de que exista un anillo aromático (C-Hsp^2), la frecuencia teórica se encuentra entre los 3020 y 3000 cm^{-1}. La señal 1 no está dentro de este rango, pero si se relaciona el resultado del espectro FT-IR con la placa cromatográfica (TLC), considerando que esta evidenció más de una señal al revelarla luego de su elución (Rf =0.9; figura 10), se puede presumir que en el espectro FT_IR, las diferentes señales y/o su desplazamiento en cuanto al rango de frecuencias teóricos, se puede relacionar con diferentes grupos funcionales, no presentes en una misma molécula, sino más bien, porque dicha fracción tiene más de un MS. Por tanto, a partir de esta investigación se propone purificar la fracción 1. Dado que el rendimiento de la fracción es bajo, y esto puede conllevar a una pérdida del material en una columna cromatográfica, se postula la realización de placas preparativas para aislar estos compuestos y así optimizar el rendimiento de los metabolitos puros que se logren obtener.

Tabla 6. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción de fracción 1.

Grupo funcional	**Frecuencia cm^{-1}(e)**	**Intervalo de frecuencia cm^{-1}(t)**	**Enlace**	**Tipo de vibración**
Cetona 	1730 (5)	~1715	C=O	Estiramiento del carbonilo
	1264 (10)	1300-1100	C=O	Tensión del carbonilo
Éster	1730 (5)	1750-1735	C=O	Estiramiento del carbonilo

		1210-1160	C-C(O)-O	Estiramientos simétricos y asimétricos
Aromático 	3058 (1)	3020-3000	sp^2 C-H	Tensión de enlace simple sp^2
		~ 1600 y ~ 1475	C=C	Tensión de doble enlace
Alcanos (solo C-H)	2960 (2) 2930 (3) 2849 (4)	2950-2800	sp^3 C-H	Tensión enlace simple sp^3
Alquenos (solo C-H)	**3058 (1)**	>3000 ó ~3000	sp^2 C-H	Tensión enlace doble sp^2

[e]: dato experimental

[t]: intervalo teórico

4.2.1.2. Espectroscopia FT-IR de la fracción 2

Se obtuvo previamente a la muestra el espectro del blanco (background), para eliminar interferencia del ambiente. El espectro de absorbancia obtenido de la fracción 2 hexánica muestra 8 señales (Figura 13). Dentro de las señales destacables están las señales 2 y 3 (2926, 2853 cm^{-1}) ya que están en el intervalo de frecuencia teórico de los enlaces del tipo carbono-hidrogeno sp^3. Las señales 4 y 8 (1698 y 1262 cm^{-1}) podrían ser del grupo funcional cetona por el estiramiento y la tensión del carbonilo teórico (~1715 y 1300-1100 cm^{-1}, respectivamente) (Tabla 7). La señal 1 (3400 cm^{-1}) se podría atribuir a la tensión del hidroxilo de los grupos funcionales alcohol y ácido carboxílico, pero este tipo de señal es característica por ser amplia e intensa por lo que se atribuye a contaminación con agua (humedad). Sin embargo, para validar este resultado, se requieren otras pruebas espectroscópicas, tales como ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN, por mencionar algunas, siempre y cuando se logren aislar cada uno de los MS que forman parte de esta fracción. Por otro lado, más adelante se mostrará el espectro FT-IR del extracto hidroalcohólico de *L. medicinalis*, donde si se observan señales en el intervalo del 3400-3300 cm^{-1} o 3400-2400 cm^{-1}, podrían atribuirse a señales de tensión del enlace O-H (de alcohol o ácido carboxílico, respectivamente), correlacionando además con la señal carbonílica para diferenciar entre cada grupo funcional.

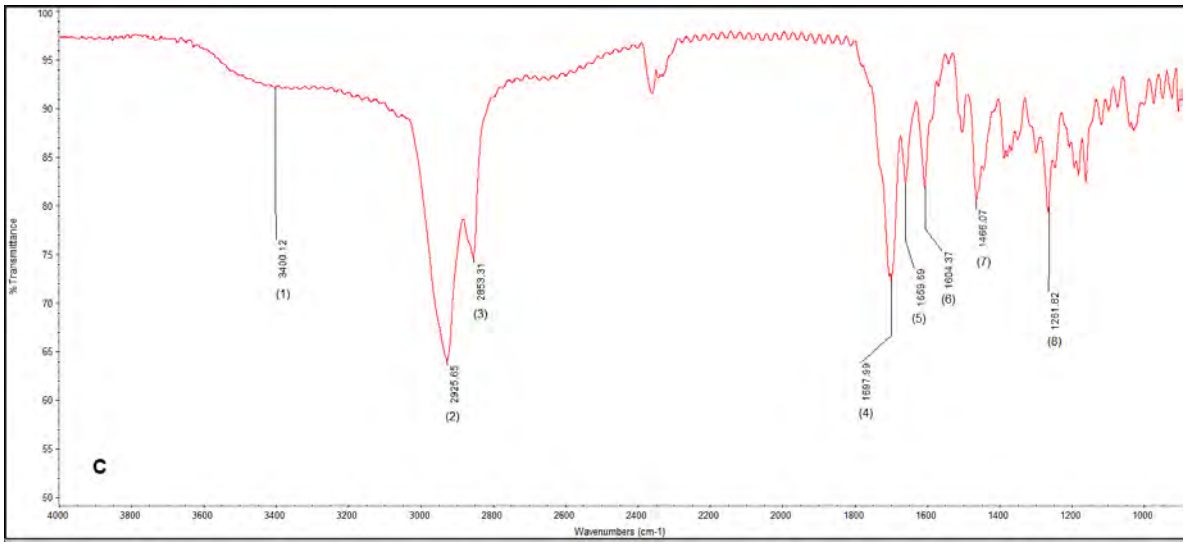
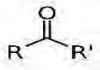


Figura 13. Espectro de absorbancia FT-IR de fracción 2.

Si se relaciona el resultado FT-IR con la placa cromatográfica (TLC) realizada a esta fracción se puede considerar que las señales emitidas son de una única estructura química, ya que en la TLC evidenció un único compuesto en elución (Rf =0,85).

Tabla 7. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción de fracción 2.

Grupo funcional	**Frecuencia cm^{-1}(e)**	**Intervalo de frecuencia cm^{-1}(t)**	**Enlace**	**Tipo de vibración**
Cetona 	**1698 (4)**	~1715	C=O	Estiramiento del carbonilo
	1262 (8)	1300-1100	C=O	Tensión del carbonilo
Éster 	**1698 (4)**	1750-1735	C=O	Estiramiento del carbonilo
		1210-1160	C-C(O)-O	Estiramientos simétricos y asimétricos
Alcanos (solo C-H)	2926 (2) 2853 (3)	2950-2800	sp^3 C-H	Tensión enlace simple sp^3

[e]: dato experimental

[t]: intervalo teórico

Es importante mencionar que la fracción 3 estaba impura, resultado que fue verificado mediante la realización de una TLC. La purificación y análisis de la fracción 3 no se realizó, por temas de tiempo y actividades a cumplir, relacionadas con los objetivos propuestos en

esta unidad de investigación, pero se proyecta la realización de columnas cromatográficas sucesivas que puedan variar parámetros de elución y/o uso de solventes, para luego realizar su análisis cromatográfico. Todo esto con el fin de potenciar la búsqueda de MS que permitan dilucidar mayormente la composición química de esta especie.

4.2.2. Espectroscopia FT-IR del extracto en hidroetanólico

Se obtuvo previamente a la muestra el espectro del blanco (background), para eliminar interferencia del ambiente. El espectro de absorbancia obtenido del extracto hidroetanólico muestra 11 señales (Figura 14). Dentro de las señales destacables están las señales 1,10 y 11 (3349, 1094 y 1047cm^{-1}) ya que están en el intervalo de frecuencia teórico para el grupo funcional alcohol con la señal característica típica, amplia e intensa, entre 3400- 3300 cm^{-1} (Tabla 8). Este resultado podría relacionarse con el espectro FT-IR de la fracción 2 que se mostró en la sección 4.2.1, lo que permitiría concluir que el grupo funcional en análisis correspondería a un alcohol, y no a un ácido carboxílico. Sin embargo, tal como se mencionó, la validez final de estos resultados debe relacionarse con la purificación de cada MS del extracto y su posterior análisis por pruebas espectroscópicas. La señal 3 (2926 cm^{-1}) es del tipo carbono-hidrogeno sp^3. La señal 4 y una señal no registrada justo al lado de esta (2879 y aproximadamente 2700 cm^{-1} (4´)) podrían pertenecer a la tensión del enlace simple entre el carbono del carbonilo y el hidrógeno del grupo funcional aldehído por las frecuencias teóricas que este tiene (~ 2850 y ~ 2750 cm-1), además la señal no reportada después de la señal 5 (5´) que es aproximadamente 1700 cm^{-1} podría ser del carbonilo de este grupo funcional.

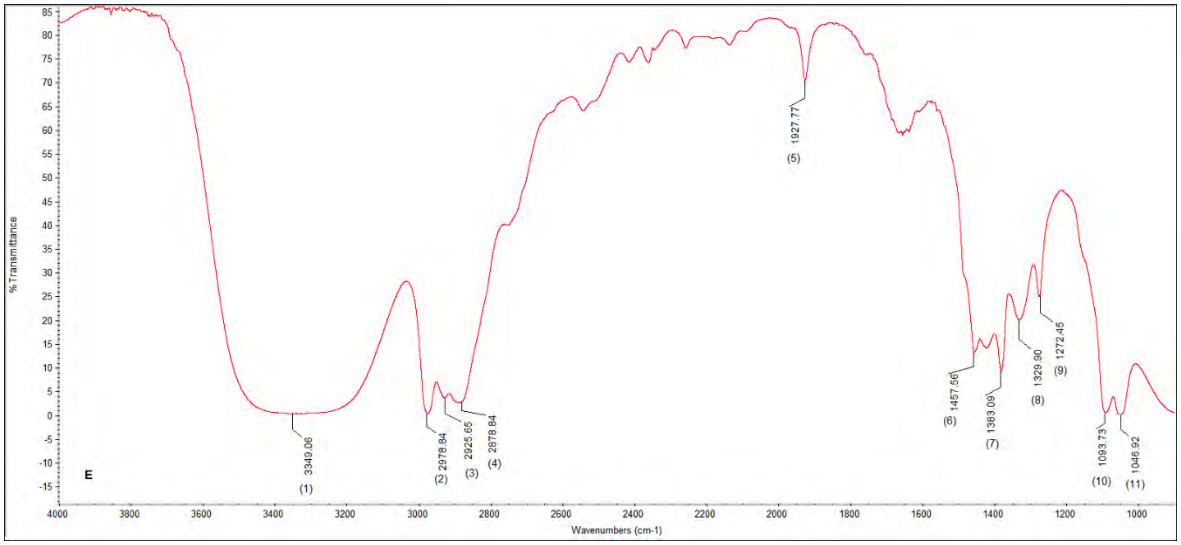
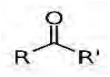


Figura 14. Espectro de absorbancia FT-IR de extracto hidroetanólico.

La señal teórica para el carbonilo del aldehído es característicamente aguda, pero en este espectro no lo es, esto puede deberse a que se está analizando el extracto total hidroetanólico, por lo que las señales pueden estar modificadas, en frecuencia y/o intensidad, por el entorno molecular, considerando las densidades electrónicas de las diversas moléculas presentes. En este contexto, para validar estos resultados, se requiere de una separación por columna cromatográfica o el uso de placas preparativas y, pruebas

espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono, y Espectrometría de Masas, para un mejor análisis y caracterización.

Tabla 8.Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción de extracto hidroetanólico.

Grupo funcional	Frecuencia $cm^{-1(e)}$	Intervalo de frecuencia cm^{-1}(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcohol 	3349(1)	3400 – 3300	O-H	Tensión del hidroxilo
	1094(10), 1047 (11)	1260 -1100	C-O	Tensión de enlace carbono - oxígeno
Aldehído 	2879 (4) y 2700 aprox (4´)	~ 2850 y ~ 2750	C-H	Tensión de enlace simple
	1700 aprox (5´)	~ 1725	C=O	Tensión del carbonilo
Cetona 	**1700 aprox (5´)**	~1715	C=O	Estiramiento del carbonilo
	1272 (9)	1300-1100	C=O	Tensión del carbonilo
Alcanos (solo C-H)	2926(3), 2879(4)	2950-2800	sp^3 C-H	Tensión enlace simple sp^3

[e]: dato experimental

[t]: intervalo teórico

4.3. HPLC-DAD-FL del extracto hidroetanólico de *L. medicinalis*

Luego de la corrida de la muestra mediante fase reversa y posterior manejo del software, se obtuvo el cromatograma con los compuestos de la muestra, los tiempos de retención y los espectros de absorbancia y emisión (fluorescencia) de cada uno de los MS de la muestra. La fase reversa (fase estacionaria hidrófoba) con gradiente en aumento de polaridad en la fase móvil, hace que la elución de los compuestos ocurra del menos polar al más polar en comparación con los mismos compuestos de la muestra.

La muestra del extracto mostró el siguiente cromatograma (ver figura 15). De los cuales 3 son compuestos menos polares (tiempos de retención más bajos) que el resto ya que la mayoría eluyó después de los 25 min. Se destacan 15 señales relacionadas cada una a un compuesto. Estos compuestos tienen sus respectivos espectros de absorbancias y de emisión.

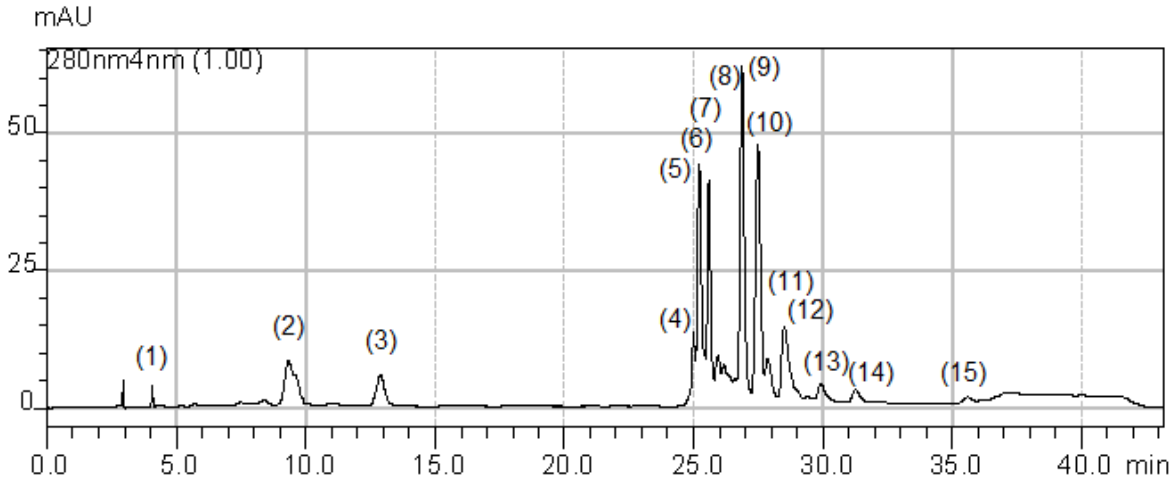


Figura 15. Cromatograma HPLC de extracto hidroetanólico de L. medicinalis

Para analizar estos resultados primeramente se compararon los tiempos de retención experimentales (ver en anexos) con los patrones internos disponibles en el Laboratorio de Cromatografía, de la Farmacopea Chilena. La comparación mostró que los MS de esta muestra no coinciden con ningún tiempo de retención de los estándares, por lo que se concluye que el extracto hidroetanólico de lampayo no contiene floroglucinol, ácido gálico, ácido cafeico, rutina, ácido cinámico, quercetina y camferol. Es por esto que, se propone realizar una hidrólisis ácida al extracto hidroetanólico de lampayo que elimine los compuestos glicosilados que podrían estar interfiriendo con los resultados (Markham et al., 2012). También, se podría estandarizar un nuevo método de separación cromatográfica de compuestos de polaridad media a alta, no-volátiles, que son parte del extracto alcohólico de lampayo. Esto se podría potenciar con el análisis por HPLC-MS, aprovechando la separación del cromatógrafo y la selectividad, sensibilidad y precisión en la determinación de la masa molecular de cada analito. Todo esto permitirá una mejor elucidación estructural de los MS presentes en el extracto.

Luego se observaron los espectros de absorbancia experimentales de la muestra para compararlos con los de los patrones internos (ver anexos). Para identificar las moléculas los espectros obtenidos del extracto deben ser idénticos con los patrones en cuanto a la forma de la curva y la máxima longitud de onda. Como resultado de esta comparación, no hubo coincidencias, pero si similitudes en las máximas longitudes de onda de algunos compuestos. Esto puede relacionarse con que los compuestos de la muestra estén glicosilados lo que podría desplazar las longitudes de onda y cambiar la forma de la curva, o también por la similitud estructural con los patrones internos (Markham et al., 2012).

Además, se hizo un espectro de fluorescencia a la misma muestra (ver figura 16). El espectro mostró que algunos compuestos presentes en el extracto absorben y emiten luz. Este es un método para identificar flavonoides en el cual se corrobora la identidad de un compuesto verificando si solo absorbe o emite luz o ambas. Sin embargo, la identidad de los metabolitos no pudo ser determinada por comparación (Markham et al., 2012).

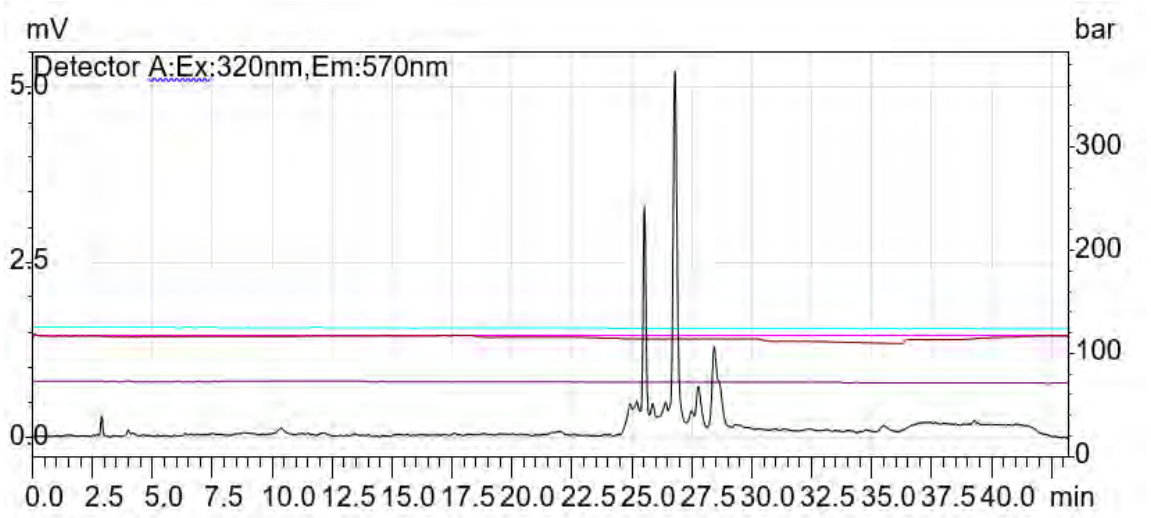


Figura 16.Cromatograma de fluorescencia HPLC de extracto hidroetanólico de L. medicinalis.

4.4. Caracterización de MS de lampayo mediante GC-MS en extracto hexánico y extracto volátil.

4.4.1. Caracterización del extracto hexánico mediante GC-MS y sus fracciones

4.4.1.1 Extracto hexánico total

Luego de la corrida cromatográfica de la muestra y posterior uso del software, se obtuvo un cromatograma que mostró la elución de diferentes compuestos según la afinidad que tenían por la fase estacionaria, esto representado en los diferentes tiempos de retención. Para poder cuantificar la cantidad de estos compuestos (expresado como % de abundancia relativa), se trabajó con el área bajo la curva de cada señal (Figura 17).

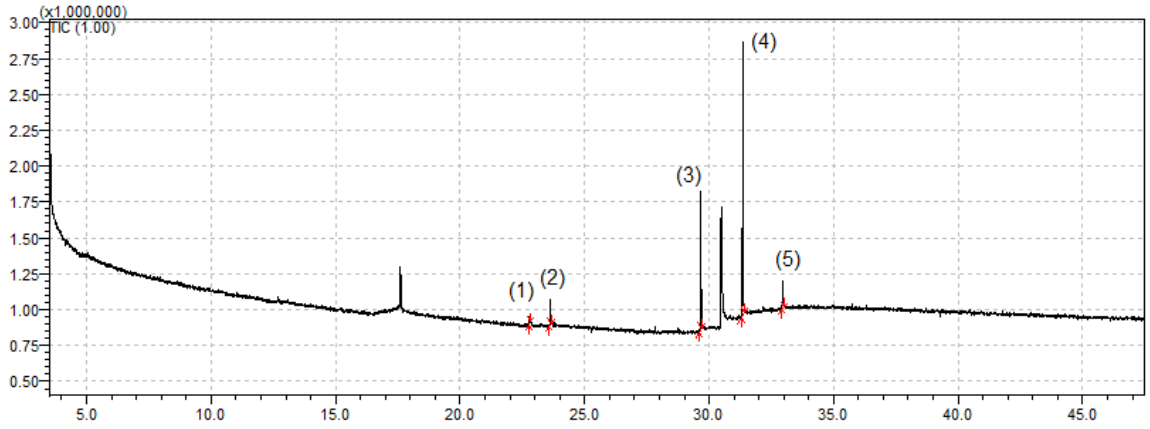


Figura 17. Cromatograma del extracto hexánico de L. medicinalis. Las señales con marcas rojas son compuestos que se pueden atribuir a plantas.

Para analizar el cromatograma se utilizó un estándar de alcanos C_7-C_{30} para calcular los índices de Kovats experimentales de los compuestos en la muestra. Se identificaron 5 compuestos, los cuales tienen match bibliográfico alto (Tabla 9).

Para la identificación de los compuestos se propuso la comparación de los índices de Kovats experimentales con los teóricos. Sin embargo, esto no se pudo lograr ya que no se encontraron los IK teóricos para estos compuestos. Por lo tanto, la identificación tentativa se realizó sólo en base a la librería NIST que ofrecía el software del equipo, aprovechando el alto porcentaje de similitud entre los espectros de masas, experimental y teórico.

Es de considerar que la técnica de macerado en hexano no propicia la recolección de compuestos volátiles, esto sumado a que para obtener el extracto total se requiere del uso del rotavapor, el cual puede volatilizar este tipo de metabolitos que son analizados por GC-MS. No obstante, de manera preliminar, la técnica permitió tener un acercamiento a los posibles metabolitos a encontrar en el extracto. En relación con los compuestos indicados como no identificados (NI), como es el caso de algunos alcanos, se pueden atribuir a algunos de los compuestos que forman parte de las ceras epicuticulares de las hojas de las plantas (Eglinton & Hamilton, 1967).

Tabla 9.Características del cromatograma GC-MS del extracto hexánico.

Nombre compuesto	**Tiempo de retención (min)**	**Área**	**% Área**	**% Similitud**	**IK exp.**	**IK teó.**
Benzoato de 2-propenilo	22.799	86936	1.38	83	1907	Nr
1,4-difenil-1,4-butanodiona	23.621	345548	5.47	83	1945	Nr
Alcano NI	29.658	1800844	28.52	96	2251	Nr
Alcano NI	31.351	3660112	57.96	96	2347	Nr
Alcano NI	32.957	421278	6.67	91	2439	Nr

NI = no identificado; Nr = No reportado; IK = índice de Kovats; exp. = experimental; teó. = teórico.

4.4.1.2. Fracción 1

Luego de elución de la fx 1 y posterior manejo del software, se obtuvo un cromatograma de la cual se utilizaron los datos de tiempos de retención y áreas bajo la curva de cada uno de los MS eluidos (Figura 18).

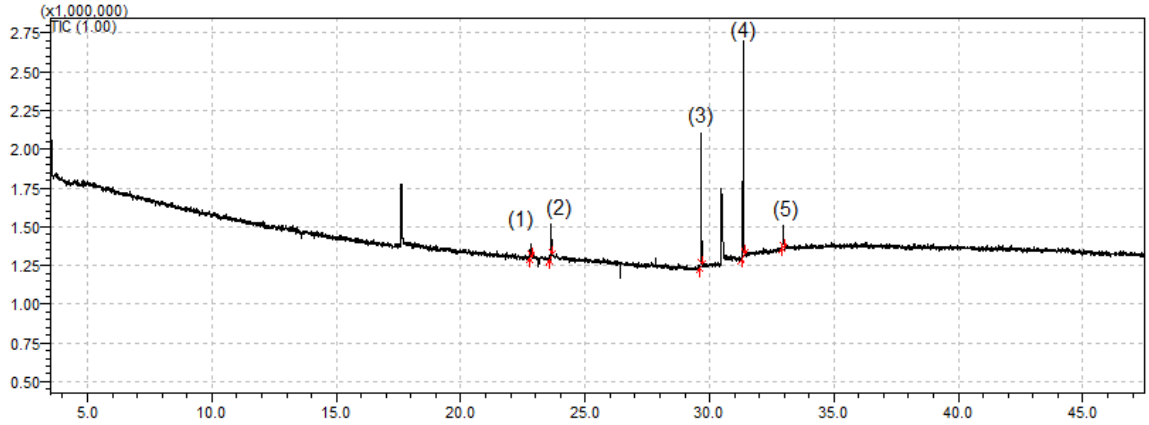


Figura 18.Cromatograma de fracción 1. Las señales con marcas rojas son compuestos que se pueden atribuir a plantas.

Para analizar el cromatograma se calcularon los índices de Kovats experimentales de los compuestos en la muestra. Se identificaron 5 compuestos, los cuales tienen match bibliográfico superiores al 80% (Tabla 10).

Tabla 10. Características del cromatograma GC-MS a fracción 1.

Nombre compuesto	**Tiempo de retención**	**Área**	**% Área**	**Similitud %**	**IK exp**	**IK teo**
Benzoato de 2-propenilo	22.808	243230	4.64	86	1907	Nr
1,4-difenil-1,4-butanodiona	23.627	494408	9.44	84	1945	Nr
Alcano NI	29.655	1538708	29.38	96	2251	Nr
Alcano NI	31.350	2653302	50.67	96	2347	Nr
Alcano NI	32.958	307425	5.87	92	2439	Nr

Esta fracción es impura, dado el número de MS observados en la elución. Además, este mismo resultado se validó con la TLC realizada. Sin embargo, la fx 1 presentó los mismos MS que el extracto hexánico total (caracterizados sólo por la coincidencia del MS con la base de datos), lo que significa que la columna cromatográfica realizada no fue eficiente en su separación. En un futuro se propone modificar el gradiente de eluyentes utilizados y con ello potenciar Rf diferenciados que permitan una mejor separación cromatográfica (esto debido a que en la placa TLC realizada los Rf eran similares (Figura 14)). Además, es también factible realizar más de una columna cromatográfica con las sub-fracciones que se

obtienen y/o modificar algunos parámetros experimentales, tales como el largo y diámetro de la columna, o cambiar, en una ventana más amplia, la polaridad de los eluyentes utilizados ya sea de manera individual o en mezclas.

4.4.1.3. Fracción 2

Luego de la elución de la muestra y posterior uso del software, se obtuvo el siguiente cromatograma (ver figura 19), el que muestra sólo dos señales.

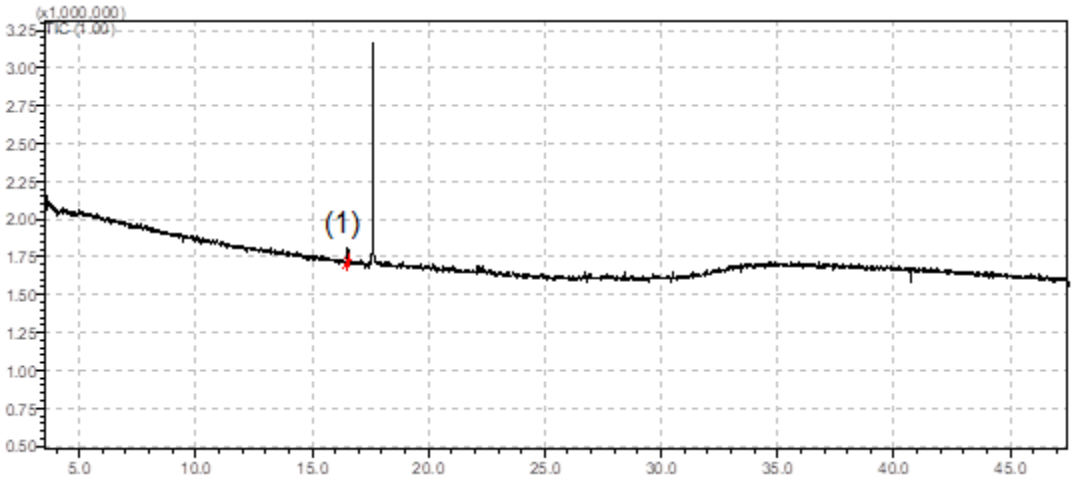


Figura 19. Cromatograma de fracción 2. Los compuestos con marcas rojas son compuestos que se pueden atribuir a plantas.

El compuesto marcado en rojo tiene un IK experimental de 1532. Además, la comparación del espectro de masas experimental con la base de datos del software y el % de similitud entre ellos (90%), se pudo proponer la identidad de este MS. Gracias, también, a la comparación con el IK teórico, 1537 (Mebazaa et al., 2009) se puede indicar que esta señal corresponde a dihidroactinidioide (Figura 20), MS que reporta propiedades como neuroprotectoras, antinflamatorias, antitumorales, hepatoprotectoras, hipoglicemiantes y hipolipidemiante (Kouda & Yakushiji, 2020), las que podrían relacionarse con las propiedades medicinales atribuibles a lampayo en el libro MHT (Ministerios de Salud, 2009).

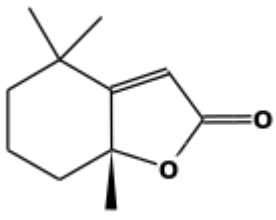


Figura 20.Estructura molecular de dihidroactinidioide.

La segunda señal que se observa en el cromatograma corresponde a un derivado de ftalato, el cual es un contaminante que apareció en diferentes eluciones, por lo que se puede afirmar que no es parte de la fracción 2, sino más bien, de la columna cromatográfica utilizada (producto del proceso de sangrado), lo que permite concluir que la fx 2 está pura, con un MS bastante prometedor en el área terapéutica.

En cuanto a la fracción 3, tal como ya se mencionó, esta evidenció la presencia de más de un MS al realizar la TLC y por temas de tiempos de trabajo experimental, el análisis GC-MS no fue realizado.

4.4.2. Caracterización del extracto volátil mediante GC-MS.

4.4.2.1. Identificacion y abundancia relativa de COVs de Lampayo

Cada colecta de compuestos orgánicos volátiles (COVs) de hojas secas de lampayo (N=3) fue comparada con un blanco de aireación (muestreo aire-ambiente) para verificar la presencia de contaminantes, en caso de que hubieren, que no formaran parte de la muestra. Todos los MS que se informan corresponden a la muestra de la especie vegetal analizada, cuyos cromatogramas fueron analizados con el sofware del equipo (Figura 21).

Primeramente se estableció como criterio de inclusión, compuestos con un match bibliografico del software de 70% o más, a esos compuestos se les calculó el índice de Kovats y se compararon con IK teóricos. Otro criterio fue considerar IK teóricos comparables con IK experimentales, siempre y cuando ambos valores no difirieran en más de 10 unidades. Junto con ello, se comparó el espectro de masas del analito detectado en comparación con la base de datos y similitud otorgada por el software del equipo.

Además, con el fin de establecer un quimiotipo de los compuestos volátiles de lampayo es que se definió como compuestos mayoritarios a aquellos que tuvieron un porcentaje de abundancia relativa mayor al 5%.

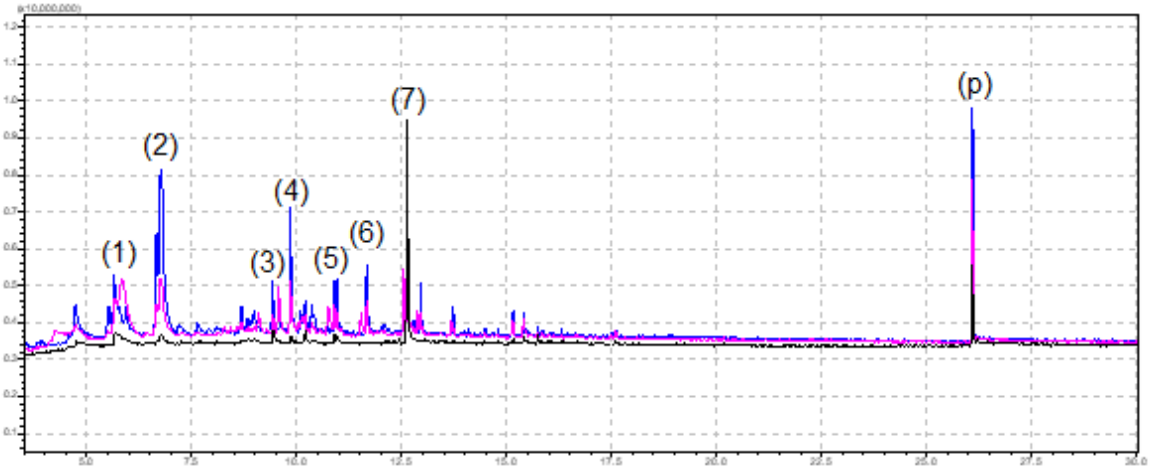


Figura 21.Cromatogramas GC-MS de COVs de L. medicinalis (n=3). En distintos colores, cada una de las corridas de muestra (azul, violeta y negro). En números, el posicionamiento, en términos de tiempo de retención, de los compuestos mayoritarios (p= patron interno)

Un total de 74 compuestos volatiles fueron identificados, los cuales se pueden apreciar en la tabla 11. Los compuestos mayoritarios, por orden de tiempo de retencion corresponden a: un compuesto no identificado (NI) con un 12,47 % de abundancia relativa (a.r.) (1) con IK igual a 995, limoneno con un 6,32 % de a.r. (2), un compuesto NI con un 9,12 % de a.r. (3) y de IK igual a 1139, *trans* mentona con un 7,99 % de a.r. (4), aldehído NI con un 5,03 % de a.r. (5), *cis*- anetol con un 7,05 % de a.r. (6) y *trans*-anetol con un 31,11 % de a.r. (7). De los compuestos que se identificaron 2 están dentro de la clasificación de terpenos en específico monoterpenos (2 y 5) y 2 terpenos con anillo aromático (6 y 7) en específico el anetol con sus dos estereoisómeros cis y trans.

Tabla 11. Análisis cuantitativo de la composición de volátiles de lampayo (n=3)

N°	IR exp[a]	IR exp[b]	IR exp[c]	**IR teo**	% s[a]	% s[b]	% s[c]	Compuesto quimico	X1	X2	X3	$\bar{x}$	S.E.	Id	Ref
1	ND	ND	949	-	ND	ND	79	alcohol NI	ND	ND	0,48	**-**	**-**	**A**	
2	ND	955	955	960	ND	96	97	benzaldehído	ND	1,88	3,75	2,82	1,88	**A,B**	(Edris et al., 2007)
3	ND	983	984	-	ND	-	-	NI	ND	1,09	3,08	2,09	1,56	**-**	
4	990	ND	988	986	92	ND	95	6-metil-5-hepten-2-ona	2,21	ND	4,43	3,32	2,21	**A,B**	(Mebaza a et al., 2009)
5	ND	989	ND	-	ND	-	ND	NI	ND	1,07	ND	**-**	**-**	**-**	
6	ND	990	ND	-	ND	75	ND	NI	ND	0,15	ND	**-**	**-**	**-**	
7	ND	ND	993	993	ND	ND	94	2-pentil-furano	ND	ND	0,55	**-**	**-**	**A,B**	(Mebaza a et al., 2009)
8	ND	995	ND	-	ND	-	ND	NI	ND	**12,47**	ND	**-**	**-**	**-**	
9	ND	ND	999	1000	ND	ND	95	decano	ND	ND	1,62	**-**	**-**	**A,B**	
10	ND	1025	1025	1026	ND	96	96	1-metil-2-(1-metiletil)benceno	ND	2,57	5,61	4,09	2,81	**A,B**	(Shellie et al., 2002)
11	1029	1029	1029	1028	89	90	94	limoneno	1,62	1,00	16,34	**6,32**	8,68	**A,B**	(Hudaib & Aburjai, 2007)
12	ND	1030	ND	1030	ND	87	ND	eucaliptol	ND	0,66	ND	**-**	**-**	**A,B**	(Hudaib et al., 2002)
13	ND	ND	1045	-	ND	ND	74	cetona NI	ND	ND	1,47	**-**	**-**	**A**	
14	ND	1047	ND	-	ND	71	ND	éster NI	ND	1,13	ND	**-**	**-**	**A**	
15	ND	1061	1061	1058	ND	83	83	2-octenal	ND	1,93	0,86	1,39	0,97	**A,B**	(Watcharananun

															et al., 2009)
16	ND	ND	1071	1071	ND	ND	83	acetofenona	ND	ND	0,76	-	-	**A,B**	(Xu et al., 2007)
17	ND	ND	1077	1076	ND	ND	90	3,5-octadien-2-ona	ND	ND	0,33	-	-	**A,B**	(Engel et al., 2002)
18	ND	1084	ND	-	ND	-	ND	NI	ND	1,19	ND	-	-	-	
19	ND	ND	1105	1104	ND	ND	79	nonanal	ND	ND	0,91	-	-	**A,B**	(Watcharananun et al., 2009)
20	ND	ND	1091	1091	ND	ND	95	1-metil-4-(1-metiletenil)benceno	ND	ND	0,27	-	-	**A,B**	(Shellie et al., 2003)
21	ND	ND	1095	1093	ND	ND	96	2-nonanona	ND	ND	0,38	-	-	**A,B**	(Cajka et al., 2007)
22	ND	1096	ND	1099	ND	85	ND	*cis* 2-tetrahidro-4-metil-2-(2-metil-1-propenil)-2H-pirano (*cis* rose oxide)	ND	0,71	ND	-	-	**A,B**	(Shang et al., 2001)
23	ND	1099	1099	1100	ND	94	91	undecano	ND	0,95	2,17	1,56	1,09	**A,B**	
24	ND	1106	ND	-	ND	-	ND	NI	ND	0,57	ND	-	-	-	
25	ND	ND	1108	-	ND	ND	89	cetona NI	ND	ND	0,40	-	-	**A**	
26	ND	1112	1112	1115	ND	87	92	*trans* 2-tetrahidro-4-metil-2-(2-metil-1-propenil)-2H-pirano (*trans* rose oxide)	ND	0,37	1,26	0,82	0,65	**A,B**	(Setkova et al., 2007)
27	ND	1117	ND	-	ND	-	ND	NI	ND	3,47	ND	-	-	-	

28	ND	ND	1141	1141	ND	ND	78	alcanfor	ND	ND	1,16	**-**	**-**	**A,B**	(Wang et al., 2005)
29	ND	ND	1130	-	ND	ND	95	terpeno NI	ND	ND	0,13	**-**	**-**	**A**	
30	1133	1132	1132	1135	ND	94	95	1-(4-metill-3-ciclohexen-1-il)etanona	5,08	3,04	4,24	4,12	1,03	**A,B**	(Qiao et al., 2008)
31	ND	1139	ND	-	ND	-	ND	NI	ND	**9,12**	ND	**-**	**-**	**-**	
32	1153	1151	1151	1153	95	96	91	*trans* mentona	2,95	9,66	11,3	**7,99**	4,44	**A,B**	(Mebaza a et al., 2009)
33	ND	1164	1162	1165	ND	97	97	*cis* mentona	ND	1,21	1,48	1,34	0,79	**A,B**	(Dugo et al., 2004)
34	ND	1171	1171	1169	ND	89	93	3-metilundecano	ND	0,13	0,30	0,22	0,15	**A,B**	(Kotowska et al., 2012)
35	ND	1174	1174	1175	ND	78	95	4-metil-1-(1-metiletil)-3-ciclohexenol	ND	0,13	0,25	0,19	0,12	**A,B**	(Skaltsa et al., 2001)
36	ND	1177	1177	1176	ND	93	84	mentol	ND	1,18	1,12	1,15	0,67	**A,B**	(Agnihotri et al., 2005)
37	ND	1183	ND	-	ND	79	ND	alcohol NI	ND	0,41	ND	**-**	**-**	**A**	
38	ND	1192	ND	-	ND	-	ND	NI	ND	1,11	ND	**-**	**-**	**-**	
39	ND	ND	1192	1195	ND	ND	87	2-metil-5-(1-metiletenil)ciclohexanol	ND	ND	0,24	**-**	**-**	**A,B**	(Hudaib & Aburjai, 2007)
40	ND	1193	ND	-	ND	96	ND	terpeno NI	ND	0,69	ND	**-**	**-**	**A**	
41	1199	1199	1199	1200	76	95	97	dodecano	2,47	2,41	2,70	2,53	0,15	**A,B**	
42	1202	1202	1202	1199	94	98	98	estragol	1,32	1,33	2,79	1,81	0,85	**A,B**	(Mondello et al., 2002)

43	ND	1207	ND	1208	ND	91	ND	decanal	ND	0,46	ND	**-**	**-**	**A,B**	(Watcharananun et al., 2009)
44	ND	1232	ND	-	ND	84	ND	aldehído NI	3,22	ND	ND	**-**	**-**	**A**	
45	ND	1239	1239	-	ND	83	84	aldehido NI	ND	4,27	5,78	**5,03**	3,00	**A**	
46	ND	ND	1259	1261	ND	ND	78	3-metil-6-(1-metiletil)-7-oxabiciclo[4.1.0] heptan-2-ona	ND	ND	0,39	**-**	**-**	**A,B**	(Bader et al., 2003)
47	ND	ND	1262	-	ND	ND	-	NI	ND	ND	0,19	**-**	**-**	-	
48	ND	ND	1266	-	ND	ND	-	NI	ND	ND	0,25	**-**	**-**	**-**	
49	1280	ND	ND	-	95	ND	ND	alcano NI	0,55	ND	ND	**-**	**-**	**A**	
50	ND	1286	ND	1286	ND	97	ND	*cis* anetol	**7,05**	ND	ND	**-**	**-**	**A,B**	(Zhao et al., 2009)
51	1290	1290	1290	1290	88	97	98	*trans* anetol	75,85	6,39	11,10	**31,11**	38,81	**A,B**	(Mebaza a et al., 2009)
52	ND	1295	ND	-	ND	90	ND	alcano NI	ND	0,65	ND	**-**	**-**	**A**	
53	ND	ND	1296	1294	ND	ND	89	acetato de 5-metil-2-propan-2-ilciclohexilo	ND	ND	0,33	**-**	**-**	**A,B**	(Duarte et al., 2005)
54	ND	1299	1299	1300	ND	93	94	tridecano	ND	0,27	0,41	0,34	0,21	**A,B**	
55	ND	1304	ND	-	ND	-	ND	NI	ND	2,65	ND			**-**	
56	ND	1308	1308	1305	ND	82	83	isoascaridol	ND	2,18	3,89	3,03	1,95	**A,B**	(Mohottalage et al., 2007)
57	ND	1351	ND	1350	ND	90	ND	acetato de 1-mentilo	ND	1,02	ND	**-**	**-**	**A,B**	(Mockute & Judzent

															iene, 2003)
58	ND	1354	1354	-	ND	89	90	NI	ND	0,67	1,84	1,25	0,93	-	
59	ND	ND	1376	1377	ND	ND	89	copaeno	ND	ND	0,29	-	-	A,B	(Hudaib et al., 2002)
60	ND	1397	1399	1400	ND	84	95	tetradecano	ND	0,96	0,39	0,67	0,48	A,B	
61	ND	ND	1411	1410	ND	ND	69	α-cedreno	ND	ND	0,13	-	-	A,B	(Shellie et al., 2002)
62	ND	ND	1419	-	ND	ND	82	alquino ramificado NI	ND	ND	0,21	-	-	A	
63	1442	1441	1442	1441	98	95	95	benozoato de 3-metilbutilo	1,73	2,57	1,61	1,97	0,52	A,B	(Leela et al., 2009)
64	1458	1457	1458	1456	90	95	94	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	0,97	1,83	1,21	1,34	0,44	A,B	(Xian et al., 2006)
65	ND	ND	1461	-	ND	ND	82	cicloalcano NI	ND	ND	0,25	-	-	A	
66	1479	1478	1479	1478	90	91	93	2,4a,5,6,9a-hexahidro-3,5,5,9-tetrametil(1H) benzociclohepteno	2,60	0,44	0,47	1,17	1,24	A,B	(Mevy et al., 2006)
67	1486	1486	1486	1486	91	72	83	1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metilbenceno	0,13	0,21	0,26	0,20	0,06	A,B	(Adams et al., 2005)
68	ND	1494	ND	-	ND	-	ND	NI	ND	0,23	ND	-	-	-	
69	1495	ND	ND	-	72	ND	ND	alcano ramificado NI	0,53	ND	ND	-	-	A	

70	1499	ND	1498	1500	86	ND	88	pentadecano	0,42	ND	0,14	0,28	0,21	**A,B**	
71	ND	1516	1516	-	ND	74	80	sesquiterpeno NI	ND	0,42	0,30	0,36	0,22	**A**	(Hudaib & Aburjai, 2007)
72	1518	ND	ND	1518	80	ND	ND	2,6-di-(1,1-dimetilletil)-4-metilfenol	1,01	ND	ND	**-**	**-**	**A,B**	(Liu et al., 2007)
73	1541	ND	ND	-	84	ND	ND	alcano ramificado NI	0,71	ND	ND	**-**	**-**	**A**	
74	ND	1598	1599	1600	ND	87	89	hexadecano	ND	0,19	0,13	0,16	0,10	**A,B**	

IRexp = Índice de retención experimental calculado en columna Rtx-5MS. IRteo = Índice de retención teórico. ND = Compuesto no detectado. NI = Compuesto no identificado. $\bar{x}$ = Promedio de abundancia relativa (%) del compuesto. S.E. = Error estándar. % s = porcentaje de similitud. Id= identificacion por A = espectro de masas (base de datos) y B =Indice de Kovats. En negrita los compuestos que confoman el quimiotipo de lampayo.

A partir del análisis de los % de abundancia relativa de cada MS volátil de lampayo, se propone que el quimiotipo volátil corresponde a anetol, caracterizado por *Cis* y *trans* anetol con un 7,05 y 31,11 % a.r. respectivamente, COVs que se producen a partir de las rutas metabólicas del ácido shikímico y mevalonato.

Los monoterpenos, en general, presentan actividad antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, anticancerígenas, antiarrítmicas, antiagregantes, anestésicas locales, antinociceptivas, antiinflamatorias, antihistamínicas y antiespasmódicas. Los monoterpenos actúan también como reguladores del crecimiento, calor, transpiración, inhibidores de tumores, inhibidores de la fosforilación oxidativa, repelentes de insectos, atrayentes de felinos y caninos y antidiabéticos (Koziol et al., 2014). Mientras que quimiotipo encontrado, anetol, tiene propiedades antioxidantes, antibacteriano, antifúngico (Freire et al., 2005; Kosalec et al., 2005), antiinflamatorio (Chainy et al., 2000), y anestésico (Ghelardini et al. 2001; Yang et al. 2010).

En cuanto a los compuestos que se detectaron una vez y son abundantes, tales como el compuesto n° 8, 31 y 50 de la tabla 11, se recomienda aumentar el número de muestreos para así mejorar y validar la metodologia y los resultados de caracterizacion e identificacion de COVs para lampayo.

Existen disitintos factores que puedan estar afectando tanto al material vegetal como al muestreo mismo y su resultado. Entre ellos, es de considerar que el muestreo (N=3) se realizó en diferentes días, con varibilidad de temperatura y humedad relativa. También es de considerar que el material vegetal fue comprado en Australis Herbolaria®, los cuales en la ficha técnica del producto especifican un tratamiendo térmico para su secado y posterior almacenamiento, lo cual puede afectar la composoción química de la especie. Es por esto que se recomienda, para futuros ensayos, utilizar el material vegetal *in situ* o recién cortado para la recoleccion de volátiles, considerando, sin embargo que esto último, en términos de daño mecánico, puede afectar la composición constitutiva de MS, por activación de la ruta del ácido jasmónico (Dudareva et al., 2013).

4.5. Contenido total de polifenoles y flavonoides en el extracto hidroetanólico

4.5.1. Contenido de polifenoles totales (CPT) mediante el método de Folin-Ciocalteu

Se obtuvo previamente una curva calibrado de ácido gálico, en concentraciones entre 20 y 70 μg / mL para determinar CTP del extracto hidroetanólico de lampayo (EELM). Se sometió la curva de calibración a pruebas de regresión lineal y de carencia de ajuste con un R^2 de 0,9914 (Figura 22).

De las absorbancias obtenidas de EELM y al extrapolarlas en la curva de calibrado es que el CPT presentó 19,6 ± 1,9 mg EAG / g ES.

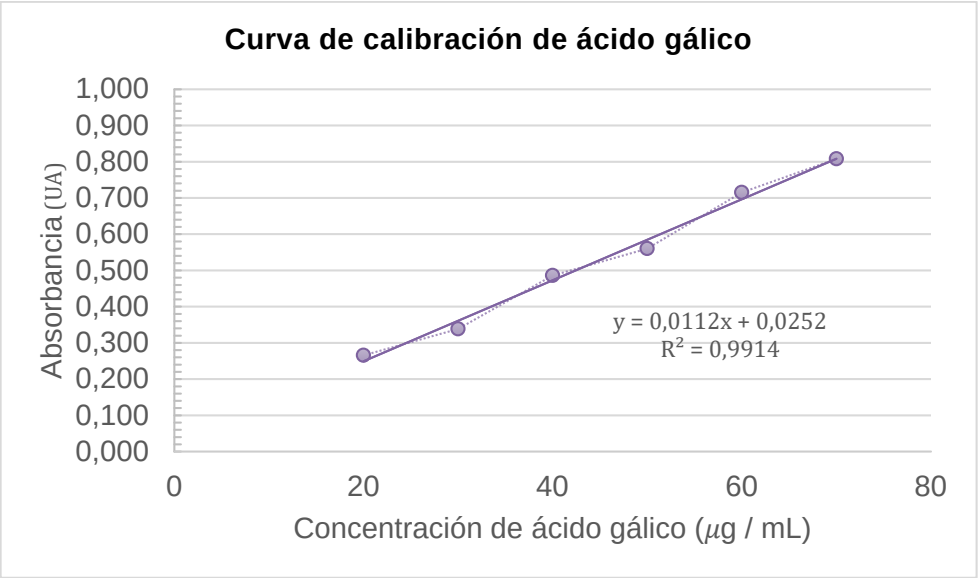


Figura 22.Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Garrido et al. (2013) estudiaron la presencia de polifenoles en hojas de *L. medicinalis* en varios extractos obtenidos mediante distintas técnicas como maceración en metanol y agua, decocción e infusión, reportando el mayor contenido de polifenoles en un macerado metanólico (58,08 ± 340,0 mg EAG/g ES) en comparación con las otras extracciones (18,85 ± 62,8 mg EAG/g ES para macerado en agua; 9,36 ± 355,2 mg EAG/g ES decocción y 37,28 ± 287,5 mg EAG/g ES para infusión).

Morales y Paredes (2014) también estudiaron la presencia de polifenoles en un extracto hidroetanólico de *L. medicinalis* reportando 49,18 ± 0,86 mg EAG / g ES.

Cabe destacar que ambos estudios mencionados estudiaron la presencia de polifenoles mediante el mismo método de Folin-Ciocalteu.

En comparación, los CPT mencionados son diferentes al obtenido en este trabajo, exceptuando en el macerado en agua. Esto puede deberse a varios factores experimentales, por ejemplo, Garrido et al. (2013) recolectaron la planta en marzo de 2011, sólo utilizaron las hojas, las que secaron a temperatura ambiente para luego molerlas. Los autores no reportan la cantidad de material vegetal utilizado, sólo indican que la extracción se hizo por maceración con metanol. Además, Morales y Paredes (2014) no reportan cuando recolectaron la planta, sin embargo, indican, también, que utilizan sólo las hojas de esta especie, las que secaron a temperatura ambiente para luego molerlas. Los autores reportan una masa vegetal inicial de 4,2 Kg indicando una maceración en una mezcla de etanol / agua (1:1; v/v, 10 L). En cambio, en esta investigación se utilizó 600 g de hojas y tallos de lampayo sin triturar ni moler, obteniendo el material vegetal seco de la empresa Australis Herbolaria®, Santiago de Chile. El proveedor indica, en la ficha técnica, que las hojas fueron secadas en un horno industrial a temperatura de 60°C por 7 horas. Y en cuanto al método de extracción, esta investigación utilizó una maceración hidroetanólica (1:1; v/v, 2 L).

Por tanto, la variabilidad de procedencia del material vegetal (*in situ* o comercial), como la fecha de muestreo, el procesamiento de la matriz vegetal, y la elección de una técnica de obtención de extractos en algún disolvente o mezcla en particular, potenciará una variación en la determinación de los MS que se encuentren presentes. No obstante, esta investigación evidencia un alto contenido de polifenoles, comparable con *Verbena officinalis* (12,5 mg EAG/g ES) o *Lippia javanica* (14,8 mg ESG/g ES), ambas especies correspondientes a la familia de las verbenáceas, al igual que lampayo (Rehecho et al., 2011; Hikanga et al., 2010). Este resultado para lampayo es importante considerando que la matriz vegetal está seca y con una data de colecta indeterminada. Por lo tanto, estos resultados permiten concluir que el extracto de lampayo podría ser un potencial candidato antiinflamatorio, antialérgico, antiaterogénico, antitrombótico y antimutagénico (Gorzynik-Debicka et al., 2018), debido al alto valor de CPT encontrado. Para futuras investigaciones, se postula comparar la variabilidad del CPT de extractos hidroalcohólicos de lampayo, considerando dos experimentos: i) CPT a partir del material colectado en campo y secado a temperatura ambiente dentro de un periodo de 1 semana y ii) CPT del material colectado en campo, secado a 60 °C por 7 horas, dentro de un periodo de 1 a 3 meses (simular las condiciones comerciales). Con esto se podría validar el uso terapéutico que se le da al lampayo comercial (seco y almacenado por largos periodos) en relación con lo descrito en el libro de MHT (Ministerio de Salud, 2009).

4.5.2. Contenido de flavonoides totales (CFT) mediante el método de $AlCl_3$.

Se obtuvo previamente una curva de calibrado de quercetina, en concentraciones entre 2 y 15 μg / mL para determinar el CFT del EELM. Se sometió la curva de calibración a pruebas de regresión lineal y de carencia de ajuste con un R^2 de 0,9994 (Figura 23).

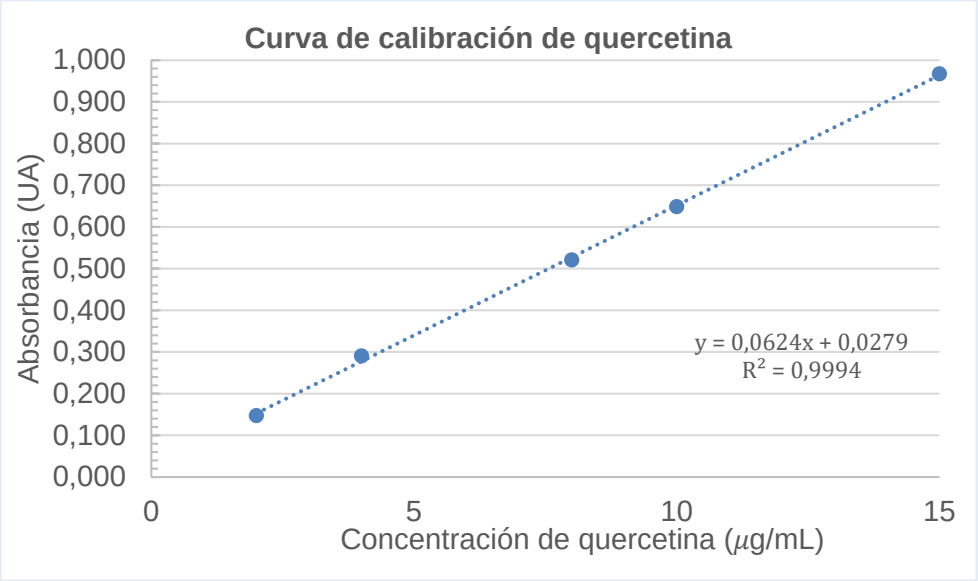


Figura 23.Curva de calibración de quercetina para la determinación de contenido de flavonoides totales mediante el método AlCl3.

De las absorbancias obtenidas de EELM y al extrapolarlas en la curva de calibrado es que el CFT presentó 16,5 ± 0,3 mg EQ / g ES.

Garrido et al. (2013) estudiaron la presencia de flavonoides en hojas de *L. medicinalis* en varios extractos obtenidos mediante distintas técnicas como maceración en metanol y agua, decocción e infusión, reportando el mayor contenido de flavonoides en una decocción (1,36 ± 5,5 mg EQ/g ES) en comparación con las otras extracciones (1,16 ± 10,8 mg EQ/ g ES para macerado metanólico; 0,51 ± 2,2 mg EQ/g ES para macerado en agua y 0,73 ± 2,3 mg EQ/g ES para infusión).

Morales y Paredes (2014) también estudiaron la presencia de flavonoides en un extracto hidroetanólico de *L. medicinalis* reportando 0,06 ± 6,13 mg EQ / g ES.

Cabe destacar que ambos estudios mencionados estudiaron la presencia de flavonoides mediante el mismo método $AlCl_3$.

El valor de CFT obtenido en esta investigación difiere considerablemente de los valores reportados, sin embargo, tal como se discutió en la sección de determinación del CPT, algunos factores experimentales pueden incidir en el valor obtenido.

Si se compara con otras especies de la misma familia, el CFT de *Lantana rhodesiensis*, por ejemplo, presenta un valor de 50,09 ± 1,9 mg EQ / g ES, considerando el estudio en un macerado en metanol /agua (1:1; v/v; 1,5 L), con un material vegetal inicial de 100 g (Nea et al., 2021). Por lo tanto, el valor del CFT del extracto de lampayo, en comparación con otros estudios que han utilizado diversas técnicas y solventes, como también en otras especies de su misma familia, permite concluir que este resultado es promisorio para relacionar la actividad biológica que pueda presentar el extracto y que sustente el uso que se le da en la medicina tradicional. Dentro de las diferentes actividades biológicas que se pueden asociar a un alto contenido de flavonoides, se tiene el potencial antioxidante, antiinflamatorio, antianginoso, inmunomodulador, antibacteriano, antiviral y antifúngico (Marques et al., 2020).

5. Consideraciones Finales

Los diferentes extractos obtenidos por las metodologías mencionadas permitieron realizar un estudio preliminar de los compuestos químicos que presentan las hojas secas de lampayo. El extracto hidroetanólico presentó mayor rendimiento que el hexánico y los muestreos mediante headspace permitieron determinar preliminarmente el perfil de metabolitos volátiles de esta especie. El extracto volátil de lampayo demostró tener gran variedad de compuestos, de los cuales los mayoritarios, 2 no fueron identificados, 3 son monoterpenos y 2 fenilpropanoides. De los compuestos identificados algunos sólo aparecían en una muestra, por lo que se proyecta un mayor número de muestreo para una identificación más representativa del quimiotipo de compuestos volátiles de lampayo. Sin embargo, es posible postular un quimiotipo preliminar para el extracto volátil, el cual sería representativo para anetol.

El extracto hexánico mostró según TLC varios compuestos los cuales se intentaron separar por columna para su posterior análisis en GC-MS. Se obtuvo sólo una fracción pura, por lo que se proyecta la futura realización de columnas cromatográficas sucesivas para purificar el extracto total. Por otro lado, la técnica de caracterización permitió tener un acercamiento

a analitos apolares. Se postula la utilización de HPLC-MS para una mejor interpretación del perfil de metabolitos no-volátiles. Lo más importante a destacar es el iridoide aislado, el que se postula con importantes actividades biológicas.

El extracto hidroetanólico, mediante HPLC-DAD-FL, demostró tener 15 compuestos en alta proporción, los cuales no se pudieron identificar con los estándares disponibles. Además, la cuantificación total de polifenoles y flavonoides demostró tener altas cantidades de estos en comparación con otras especies del mismo género, lo que demuestra la presencia de este tipo de MS los cuales tienen reconocida actividad antioxidante.

6. Conclusiones

Se cumplió parcialmente el estudio de la composición química de los distintos extractos de *L. medicinalis* debido a que no se pudieron identificar y comparar con exactitud los compuestos de las maceraciones, pero si la de los volátiles. Se cumplió en su totalidad la obtención de extractos volátiles y no volátiles de *L. medicinalis*. En cuanto a la cuantificación de polifenoles y flavonoides se cumplió en su totalidad con buenos resultados.

7. Bibliografía

Adams, R., Morris, J., Pandey, R., & Schwarzbach, A. (2005). Cryptic speciation between Juniperus deltoides and Juniperus oxycedrus (Cupressaceae) in the Mediterranean. *Biochem. Syst. Ecol*, *33*(8), 771-787. https://doi.org/10.1016/j.bse.2005.01.001

Agati, G., Galardi, C., Gravano, E., Romani, A., & Tattini, M. (2002). Flavonoid Distribution in Tissues of Phillyrea latifolia L. Leaves as Estimated by Microspectrofluorometry and Multispectral Fluorescence Microimaging. *Photochemistry and Photobiology*, *76*(3), 350-360. https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760350FDITOP2.0.CO2

Agnihotri, V., Agarwal, S., Dhar, P., Thappa, R., Baleshwar, Kapahi, B., Saxena, R., & Qazi, G. (2005). Essential oil composition of Mentha pulegium L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Fragr*, *20*(6), 607-610. https://doi.org/10.1002/ffj.1497

Amparo Blázquez, M., Pérez, I., & Boira, H. (2003). Essential oil analysis of Teucrium libanitis and T. turredanum by GC and GC-MS. *Flavour Fragr*, *18*(6), 497-501. https://doi.org/10.1002/ffj.1256

Atkins, S. (2012). Verbenaceae. In *Flowering Plants · Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae Including Avicenniaceae)* 7, 449-468. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18617-2_25

Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, *2*(3), 119-145. https://eprints.ucm.es/id/eprint/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf

Avello, M. L., & Cisternas, I. F. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica de Chile*, *138*, 1288-1293. http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872010001100014

Azwanida, N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, *4*(196). DOI:10.4172/2167-0412.1000196

Bader, A., Flamini, G., Cioni, P., & Morelli, I. (2003). Essential oil composition of Achillea santolina L. and Achillea biebersteinii Afan. collected in Jordan. *Flavour Fragr*, *18*(1), 36-38. https://doi.org/10.1002/ffj.1147

Barquero, M. (2004). *Mecanismos Y Aplicaciones de la Cromatografía Líquida de Alto Desempeño* (1st ed.). Editorial Universidad de Costa Rica.

Bodeker, G., & Kronenberg, F. (2002). A Public Health Agenda for Traditional, Complementary, and Alternative Medicine. *American journal of public health*, *92*(10), 1582–1591. doi:10.2105/ajph.92.10.1582

Cajka, T., Hajslova, J., Cochran, J., Holadova, K., & Klimankova, E. (2007). Solid phase microextraction - comprehensive two dimensional gas chromatography - time-of-flight mass spectrometry for the analysis of honey volatiles. *J. Sep. Sci*, *30*(4), 534-546. https://doi.org/10.1002/jssc.200600413

Celis-Plá, P., Brown, M., Santillán-Sarmiento, A., Korbee, N., Sáez, C., & Figueroa, F. (2018). Ecophysiological and metabolic responses to interactive exposure to nutrients and copper excess in the brown macroalga Cystoseira tamariscifolia. *Marine Pollution Bulletin*, *128*, 214–222. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.005

Chainy, G., Manna, S., Chaturvedi, M., & Aggarwal, B. (2000). Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-jB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. *Oncogene*, *19*(25), 2943–2950. doi: 10.1038/sj.onc.1203614

Cortez Gallardo, V., Macedo Ceja, J., Hernández Arroyo, M., Arteaga Aureoles, G., Espinosa Galván, D., & Rodríguez Landa, J. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes

y su relacion con las ciencias médicas. *Revista Biomédicina*, *15*(2), 123-136. http://www.uady.mx/sitios/biomedic/revbiomed/pdf/rb041527.pdf

de Mösbach, E. W. (1992). *Botánica Indígena de Chile* (C. Aldunate & C. Villagran, Eds.).

Duarte, M., Figueira, G., Sartoratto, A., Rehder, V., & Delarmelina, C. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, *97*(2), 305-311. https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.016

Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, (198), 16-32. DOI: 10.1111/nph.12145

Dugo, P., Mondello, L., Zappia, G., Bonaccorsi, I., Cotroneo, A., & Russo, M. (2004). The composition of the volatile fraction and the enantiomeric distribution of five volatile components of faustrime oil (Monocitrus australatica x Fortunella sp. x Citrus aurantifolia). *J. Essent. Oil Res*, *16*(4), 328-333. https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698734

Edris, A., Chizzola, R., & Franz, C. (2007). Isolation and characterization of the volatile aroma compounds from the concrete headspace and the absolute of Jasminum sambac (L.) Ait. (Oleaceae) flowers grown in Egypt. *Eur. Food Res. Technol*. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0623-y

Eglinton, G., & Hamilton, R. J. (1967). Leaf epicuticular waxes. *Science*, *156*(3780), 1322–1335. https://doi.org/10.1126/science.156.3780.1322

Engel, E., Baty, C., Le Corre, D., Souchon, I., & Martin, N. (2002). Flavor-active compounds potentially implicated in cooked cauliflower acceptance. *J. Agric. Food Chem*, *50*(22), 6459-6467. https://doi.org/10.1021/jf025579u

Freire, R., Morais, S., Catunda, F., & Pinheiro, D. (2005). Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. *Biorg Med Chem*, *13*, 4353–4358. doi: 10.1016/j.bmc.2005.03.058

Garrido, G., Ortiz, m., & Pozo, p. (2013). Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de Lampaya medicinalis F. Phil. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, *1*(1), 30-38. https://www.researchgate.net/publication/258224408

Ghelardini, C., Galeotti, N., & Mazzanti, G. (2001). Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. *Planta Med*, *67*(6), 564–566. DOI:10.1055/S-2001-16475

Ghosh, B., Westbrook, T. C., & Jones, D. (2014). Comparative structural profiling of trichome specialized metabolites in tomato (Solanum lycopersicum) and S. habrochaites: acylsugar profiles revealed by UHPLC/MS and NMR. *Metabolomics*, *10*, 496–507. https://doi.org/10.1007/s11306-013-0585-y

Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino, A., Knap, N., Wozniak, M., & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int J Mol Sci*, *19*(3), 686. DOI: 10.3390/ijms19030686

Handa, S. S., Khanuja, S. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* (1st ed.). United Nations Industrial Development Organization and the International Center for Science and High Technology.

Hudaib, M., & Aburjai, T. (2007). Volatile components of Thymus vulgaris L. from wild-growing and cultivated plants in Jordan. *Flavour Fragr*, *22*(4), 322-327. https://doi.org/10.1002/ffj.1800

Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A., & Cavrini, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (Thymus vulgaris L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *J. Pharm. Biomed. Anal*, *29*(4), 691-700. https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00119-X

Killeen, D. P., Watkins, O. C., Sansom, C. E., Andersen, D. H., Gordon, K. C., & Perry, N. B. (2016). Fast Sampling, Analyses and Chemometrics for Plant Breeding: Bitter Acids,

Xanthohumol and Terpenes in Lupulin Glands of Hops (Humulus lupulus). *Phytochemical Analysis*, *28*(1), 50-57. https://doi.org/10.1002/pca.2642

Knudsen, J. T., Tollsten, L., & Bergström, G. (1993). Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*, *33*(2), 253-280. https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85502-I

Kosalec, I., Pepeljnjak, S., & Kustrak, D. (2005). Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (Pimpinella anisum L., Apiaceae). *Acta Pharm*, *55*(4), 377–385.

Kotowska, U., Zalikowski, M., & Isidorov, V. (2012). HS-SPME/GC-MS analysis of volatile and semi-volatile organic compounds emitted from municipal sewage sludge. *Environ. Monit. Asses.*, *184*(5), 2893-2907. https://doi.org/10.1007/s10661-011-2158-8

Kouda, R., & Yakushiji, F. (2020). Recent Advances in Iridoid Chemistry: Biosynthesis and Chemical Synthesis. *Chemistry, an Asian journal*, *15*(22), 3771–3783. https://doi.org/10.1002/asia.202001034

Koziol, A., Stryjewska, A., Librowski, T., Salat, K., Gawel, M., Moniczewski, A., & Lochyński, S. (2014). An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *14*(14), 1156–1168. https://doi.org/10.2174/1389557514666141127145820

Kumar, S., Arya, M., Mahadevappa, P., & Giridhar, P. (2020). Influence of photoperiod on growth, bioactive compounds and antioxidant activity in callus cultures of Basella rubra. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111937

Leela, N., Vipin, T., Shafeekh, K., Priyanka, V., & Rema, J. (2009). Chemical composition of essential oils from aerial parts of Cinnamomum malabatrum (Burman f.) Bercht Presl. *Flavor Fragr. J*, *24*(1), 13-16. https://doi.org/10.1002/ffj.1910

Linstrom, P. (1997). NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database 69 [Data set]. National Institute of Standards and Technology. https://doi.org/10.18434/T4D303

Liu, Y., Jing, S.-X., Luo, S.-H., & Li, S.-H. (2018). Non-volatile natural products in plant glandular trichomes: chemistry, biological activities and biosynthesis. *Natural Product Report*. DOI: 10.1039/c8np00077h

Liu, Y., Xu, X., & Zhou, G. (2007). Comparative study of volatile compounds in traditional Chinese Nanjing marinated duck by different extraction techniques. *Int. J. Food Sci. Technol*, *42*(5), 543-550. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01264.x

Madaleno, I.M., & Delatorre-Herrera, J. (2013). Medicina Popular de Iquique, Tarapacá. *IDESIA*, *31*(1), 67-78. DOI: 10.4067/S0718-34292013000100009

Markham, K. R., Thomas, M. B., & Mabry, T. (2012). *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-88458-0

Marques, M., Sales, F., Cunha, J., da Silva, D., Rodrigues, J., Ferreira, K., Barbosa, T., Costa, L., Almeida, L., Ribeiro, J., & Mendes, S. (2020). Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Natural Product Research Formerly Natural Product Letters*, *34*(5), 692-705. DOI: 10.1080/14786419.2018.1493588

Marticorena, C., & Villagran, C. (2000). Lampaya hieronymi Moldenke (Verbenaceae), nueva para la flora de Chile. *Gayana Bot*, *57*(2), 157-159. https://www.biodiversitylibrary.org/page/29877815#page/51/mode/1up

Mebazaa, R., Mahmoudi, A., Fouchet, M., Dos Santos, M., Kamissoko, F., Nafti, A., Ben Cheikh, R., Rega, B., & Camel, V. (2009). Characterization of volatile compounds in Tunisian fenugreek seeds. *Food Chem*, *115*(4), 1326-1336. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.066

Mebazaa, R., Mahmoudi, A., Fouchet, M., Dos Santos, M., Kamissoko, F., Nafti, A., Ben Cheikh, R., Rega, B., & Camel, V. (2009). Characterization of volatile compounds in Tunisian fenugreek seeds. *Food Chem*, *115*(4), 1326-1336. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.066

Mevy, J., Bousquet-Melou, A., Greff, S., Millogo, J., & Fernandez, C. (2006). Chemical composition of the volatile oil of Laggera aurita Schulz from Burkina-Faso. *Biochem. Syst. Ecol*, *34*(11), 815-818. https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.06.005

Ministerios de Salud. (2009). *Medicamentos Herbarios Tradicionales 103 Especies vegetales*. http://www.seremisalud15.cl/docs/Listado_Medicamentos_Herbarios_Tradicionales.pdf

Mockute, D., & Judzentiene, A. (2003). The myrtenol chemotype of essential oil of Tanacetum vulgare L. var. vulgare (tansy) growing wild in the Vilnius region. *Chemija*, *14*(2), 103-107. https://www.researchgate.net/publication/312889541_The_myrtenol_chemotype_of_essential_oil_of_Tanacetum_vulgare_L_var_vulgare_tansy_growing_wild_in_the_Vilnius_region

Mohottalage, S., Tabacchi, R., & Guerin, P. (2007). Components from Sri Lankan Piper betle L. leaf oil and their analogues showing toxicity against the housefly, Musca domestica. *lavour Fragr. J*, *22*(2), 130-138. https://doi.org/10.1002/ffj.1770

Molina, G. M., Peña, L. M., Mata, B. D., Escalante, F., González, S., Torres, V., Martínez, H., & Said, S. (2011). Flourensia cernua: Hexane Extracts a Very Active Mycobactericidal Fraction from an Inactive Leaf Decoction against Pansensitive and Panresistant Mycobacterium tuberculosis. *Evid Based Complement Alternat Med*, *2011*. DOI:10.1155/2011/782503

Mondello, L., Zappia, G., Cotroneo, A., Bonaccorsi, I., Chowdhury, J., Yusuf, M., & Dugo, G. (2002). Studies on the essential oil-bearing plants of Bangladesh. Part VIII. Composition of some Ocimum oils O. basilicum L. var. purpurascens; O. sanctum L. green; O. sanctum L. purple; O. americanum L., citral type; O. americanum L., camphor type. *Flavour Fragr*, *17*(5), 335-340. https://doi.org/10.1002/ffj.1108

Mondragón Cortez, P. (2020). *Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas* (1st ed.). D.R. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.

https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5f89fd7801268.pdf#:~:text=El%20cap%C3%ADtulo%20seiscomprende%20de%20manera%20general%20el%20an%C3%A1lisis,los%20enlaces%20at%C3%B3micos%20provenientes%20de%20la%20muestra%20estudiada.

Morales, G., & Paredes, A. (2014). Antioxidant activities of Lampaya medicinalis extracts and their main chemical constituents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*(259). DOI:10.1186/1472-6882-14-259

Morales, G., Paredes, A., Olivares, A., & Bravo, J. (2014). Acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extract from Lampaya medicinalis Phil in rats. *Biological Research*, *47*(6). DOI:10.1186/0717-6287-47-6

Nea, F., Bitchi, M., Genva, M., Ledoux, A., Tchinda, A., Damblon, C., Frederich, M., Tonzibo, Z., & Fauconnier, M. (2021). Phytochemical Investigation and Biological Activities of Lantana rhodesiensis. *Molecules*, *26*(4), 846. DOI: 10.3390/molecules26040846

Oranday Cárdenas, M., & Verde Star, M. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica* (C. Rivas Morales, Ed.). OmniaScience. DOI: 10.3926/oms.313

Organismo Andino de Salud. (2014). *Plantas Medicinales de la Subregión Andina* (1st ed.).

Ormazabal, P., Herrera, K., Cifuentes, M., Paredes, A., Morales, G., & Cruz, G. (2020). Protective effect of the hydroalcoholic extract from Lampayamedicinalis Phil. (Verbenaceae) on palmitic acid- impaired insulinsignaling in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity Research & Clinical Practice*, *14*, 573-579. https://doi.org/10.1016/j.orcp.2020.11.001

Ormazábal, P., Yuri, G., Sanhueza, S., Cifuentes, M., Herrera, K., Paredes, A., & Morales, G. (2021). Effect of the hydroalcoholic extract of the plant Lampaya medicinalis Phil. (Verbenaceae) on in vitro-induced steatosis in human hepatocytes. *Revista Chilena de Endocrinología*, *14*(1), 7-13. http://www.revistasoched.cl/1_2021/01.html

Papazian, S. (2017). Black Mustard and The Butterfly Effect. Metabolomics of Plant-Insect Interactions under Multiple Stress Conditions. 10.13140/RG.2.2.11256.44805

Pellati, F., Benvenuti, S., Yoshizaki, F., Bertelli, D., & Rossi, M. (2005). Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of the volatile compounds of Evodia species fruits. *J. Chromatogr. A*, *1087*(1-2), 265-273. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.01.060

Pichersky, E., Noel, J., & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Plant Volatiles*, *311*, 808-811. DOI:10.1126/science.1118510

Qiao, Y., Xie, B., Zhang, Y., Zhang, Y., Fan, G., Yao, X., & Pan, S. (2008). Characterization of aroma active compounds in fruit juice and peel oil of Junchen sweet orange fruit (Citrus sinensis (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. *Molecules*, *13*(6), 1333-1344. https://doi.org/10.3390/molecules13061333

Rehecho, S., Hidalgo, O., García-Iñiguez, M., Navarro, I., Astiasarán, I., Ansorena, D., Yolanda, R., & Calvo, M. (2011). Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of Verbena officinalis L. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(4), 875-882. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.035.

Schilmiller, A., Shi, F., Kim, J., Charbonneau, A. L., Holmes, D., Jones, D., & Last, R. (2010). Mass spectrometry screening reveals widespread diversity in trichome specialized metabolites of tomato chromosomal substitution lines. *The Plant Journal*, *62*(3), 391-403. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04154.x

Schneck, N. A., Lowenthal, M., Phinney, K., & Lee, S. B. (2015). Current trends in magnetic particle enrichment for mass spectrometry-based analysis of cardiovascular protein biomarkers. *Nanomedicine*, *10*(3), 433–446. https://doi.org/10.2217/nnm.14.188

Setkova, L., Risticevic, S., & Pawliszyn, J. (2007). Rapid headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic?time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction II: Classification of Canadian and Czech ice wines using statistical

evaluation of the data. *J. Chromatogr. A*, *1147*(2), 224-240. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.052

Shang, C., Hu, Y., Deng, C., & Hu, K. (2001). Rapid determination of volatile constituents of Michelia alba flowers by gas chromatography - mass spectrometry with solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, *942*(1-2), 283-288. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01382-6

Shellie, R., Marriott, P., Zappia, L., Mondello, L., & Dugo, G. (2003). Interactive use of linear retention indices on polar and apolar columns with an MS-Library for reliable characterization of Australian tea tree and other Melaleuca sp. oils. *J. Essent. Oil Res*, *15*(5), 305-312. https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9698597

Shellie, R., Mondello, L., Marriott, P., & Dugo, G. (2002). Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, *970*(1-2), 225-234. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00653-2

Shellie, R., Mondello, L., Marriott, P., & Dugo, G. (2002). Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, *970*(1-2), 225-234. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00653-2

Shikanga, E., Combrinck, S., & Thierry, R. (2010). South African Lippia herbal infusions: Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany*, *76*, 567-571. DOI:10.1016/j.sajb.2010.04.010

Shraim, A., Ahmed, T., Rahman, M., & Hijji, Y. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT - Food Science and Technology*, *150*, 111932. DOI:10.1016/j.lwt.2021.111932

Skaltsa, H., Mavrommati, A., & Constantinidis, T. (2001). A chemotaxonomic investigation of volatile constituents in Stachys subsect. Swainsonianeae (Labiatae). *Phytochemistry*, *57*(2), 235-244. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00003-6

Suarez, D., & Morales, Y. (2018). Principios básico de la cromatografía liquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Semilleros: Formación Investigativa*, *4*(1), 7-14. http://hdl.handle.net/20.500.11839/7731

Tayoub, G., Schwob, I., Bessiere, J., Masotti, V., Rabier, J., Ruzzier, M., & Viano, J. (2006). Composition of volatile oils of Styrax (Styrax officinalis L.) leaves at different phenological stages. *Biochem. Syst. Ecol*, *34*(9), 705-709. https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.05.008

Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Rose, U. S.R., & Schnitzler, J.-P. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, *45*, 540-560. DOI:10.1111/j.1365-313X.2005.02612.x

Wang, Y., Finn, C., & Qian, M. (2005). Impact of Growing Environment on Chickasaw Blackberry (Rubus L.) Aroma Evaluated by Gas Chromatography Olfactometry Dilution Analysis. *J. Agric. Food Chem*, *53*(9), 3563-3571. https://doi.org/10.1021/jf048102m

Watcharananun, W., Cadwallader, K., Huangrak, K., Kim, H., & Lorjaroenphon, Y. (2009). Identification of predominant odorants in Thai desserts flavored by smoking with Tian Op, a traditional Thai scented candle. *J. Agric. Food Chem*, *57*(3), 996-1005. https://doi.org/10.1021/jf802674c

Wink, M. (1997). Compartmentation of Secondary Metabolites and Xenobiotics in Plant Vacuoles. *Advances in Botanical Research*, *25*, 141-169. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60151-2

Xian, Q., Chen, H., Zou, H., & Yin, D. (2006). Chemical composition of essential oils of two submerged macrophytes, Ceratophyllum demersum L. and Vallisneria spiralis L. *Flavour Fragr. J*, *21*(3), 524-526. https://doi.org/10.1002/ffj.1588

Xu, X., Van Stee, L., Williams, J., Beens, J., Adahchour, M., Vreuls, R., Brinkman, U., & Lelieveld, J. (2003). Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere. *Atmos. Chem. Phys.*, *3*(3), 665-682. https://doi.org/10.5194/acp-3-665-2003

Xu, Y., Fan, W., & Qian, M. (2007). Characterization of Aroma Compounds in Apple Cider Using Solvent-Assisted Flavor Evaporation and Headspace Solid-Phase Microextraction. *J. Agric. Food Chem*, *55*(8), 3051-3057. https://doi.org/10.1021/jf0631732

Yang, J., Yang, C., Chang, H., Yang, C., Wang, S., Hsieh, M., & Chuang, L. (2010). Chemical composition and antibacterial activities of Illicium verum against antibiotic-resistant pathogens. *J Med Food*, *13*(5), 1254–1262. DOI: 10.1089/jmf.2010.1086.

Yusuf, O., & Bewaji, C. (2011). GC-MS of volatile components of fermented wheat germ extract. *J. Cereals Oilseeds*, *2*(3), 38-42. https://doi.org/10.5897/JCO.9000008

Zhao, C., Zeng, Y., Wan, M., Li, R., Liang, Y., Li, C., Zeng, Z., & Chau, F. (2009). Comparative analysis of essential oils from eight herbal medicines with pungent flavor and cool nature by GC-MS and chemometric resolution methods. *J. Sep. Sci*, *32*(4), 660-670. https://doi.org/10.1002/jssc.200800484

8. Anexos

Identificación botánica: anatomía foliar

Para aclarar problemas taxonómicos de algunas plantas cuando no se tiene el material de referencia completo, es que varios estudios recomiendan analizar la epidermis de las hojas como un método para poder comparar las estomas y su distribución, así como las ornamentaciones que pueda tener y de esa forma determinar la especie correcta (Villaseñor, 1975).

El estudio de las cutículas de lampaya de (fig A-F) de las muestras de herbolaria (A-C) comparado con la muestra de referencia de *Lampayo medicinalis* Phil. (Voucher VALPL_PLV:2283), demostró que efectivamente las muestras de herbolaria corresponden a *Lampayo medicinalis* Phil. La cutícula de esta especie es muy gruesa, a tal punto que no

permitió observar si existen o no células anexas rodeando a las estomas. Es anfiestomática, epidermis abaxial y adaxial presentan estomas. La cantidad de estomas en ambas caras es muy amplia (fig. A y D), las células oclusivas presentan reborde cuticular a nivel del ostíolo y se encuentran hundidas con respecto a las epidérmicas que las rodean (fig. C y F) (Esau, 1982).

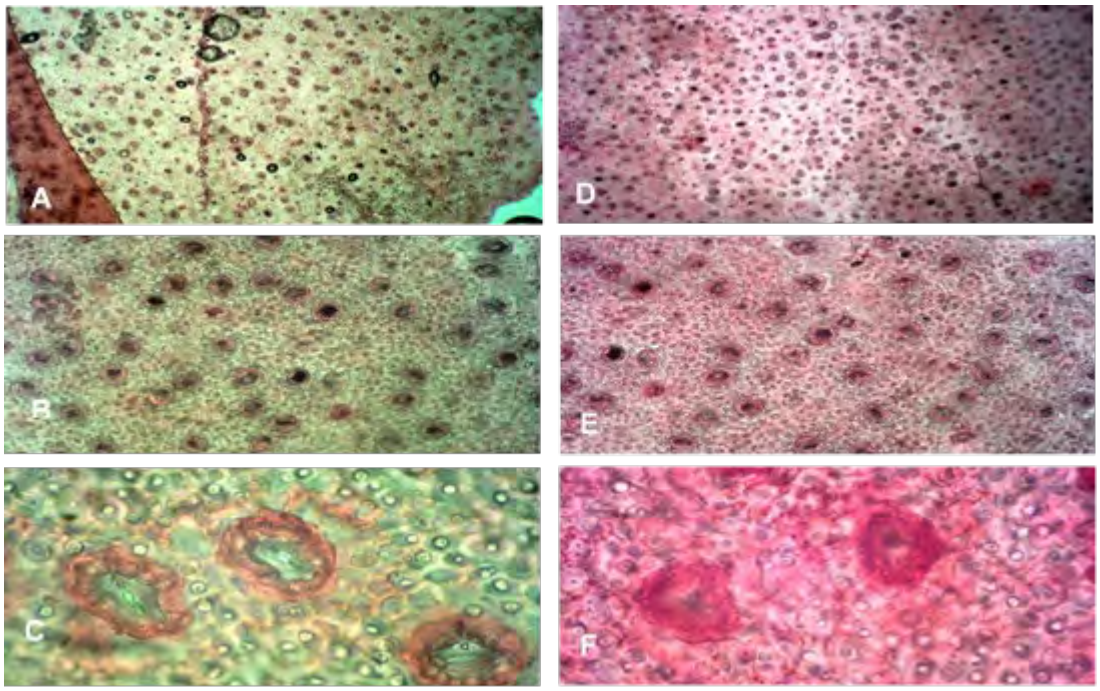


Figura 24. A(4x), B(10X) y C(40X) Lampayo medicinalis Phil. (Lampaya de herbolaria). D(4x), E(10X) y F(40X) Lampayo medicinalis Phil. (Lampaya de referencia Voucher VALPL_PLV:2283)

Tiempos de retencion de HPLC-FLU

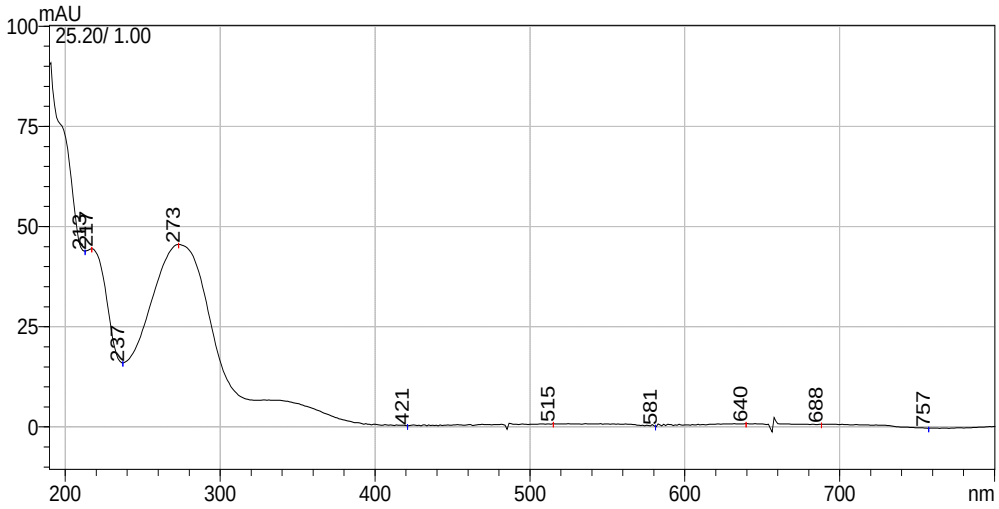
RT2.885	2.885	0.00000	Detector A - Ch1	1	1871	308	V
2.800	3.083	1.1143					
RT10.352	10.352	0.00000	Detector A - Ch1	2	1533	86	V
10.150	10.708	0.9133					
RT24.920	24.920	0.00000	Detector A - Ch1	3	6515	437	SSS
24.542	25.017	3.8812					
RT25.199	25.199	0.00000	Detector A - Ch1	4	7243	461	V
25.017	25.325	4.3148					
RT25.517	25.517	0.00000	Detector A - Ch1	5	30640	3250	V
25.325	25.733	18.2526					
RT25.849	25.849	0.00000	Detector A - Ch1	6	5650	418	V
25.733	26.025	3.3655					
RT26.400	26.400	0.00000	Detector A - Ch1	7	8783	426	V
26.025	26.508	5.2324					
RT26.787	26.787	0.00000	Detector A - Ch1	8	65233	5163	V
26.508	27.283	38.8601					
RT27.488	27.488	0.00000	Detector A - Ch1	9	4091	289	V
27.283	27.600	2.4370					
RT27.769	27.769	0.00000	Detector A - Ch1	10	9841	629	V

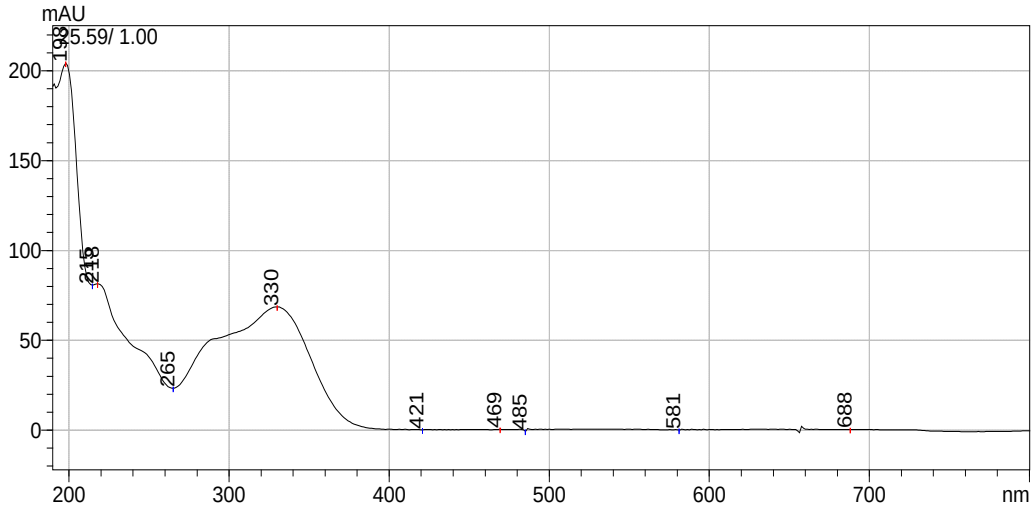
27.600	28.108	5.8626					
RT28.428	28.428	0.00000	Detector A - Ch1	11	25301	1182	SV
28.108	29.158	15.0719					
RT35.471	35.471	0.00000	Detector A - Ch1	12	1165	92	V
35.267	35.583	0.6941					

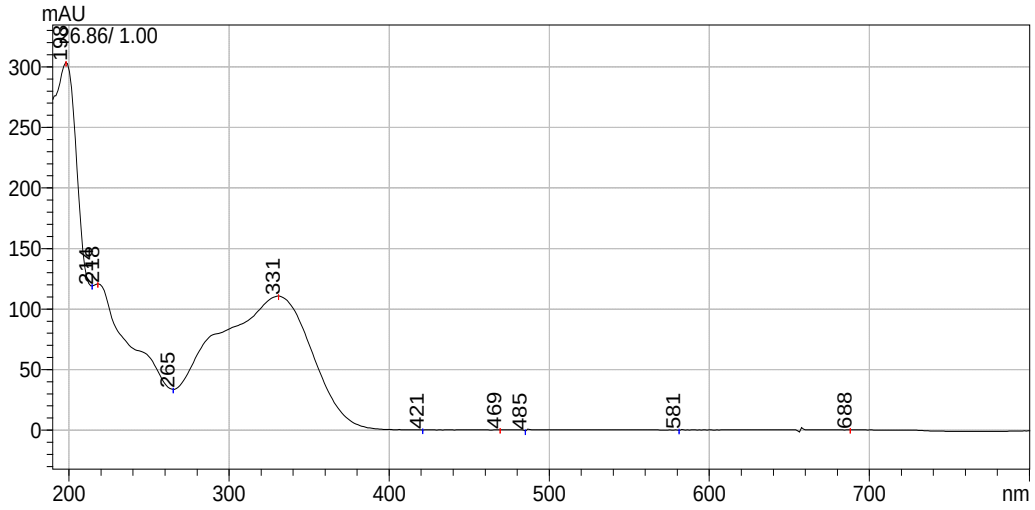
Tiempos de retencion de HPLC

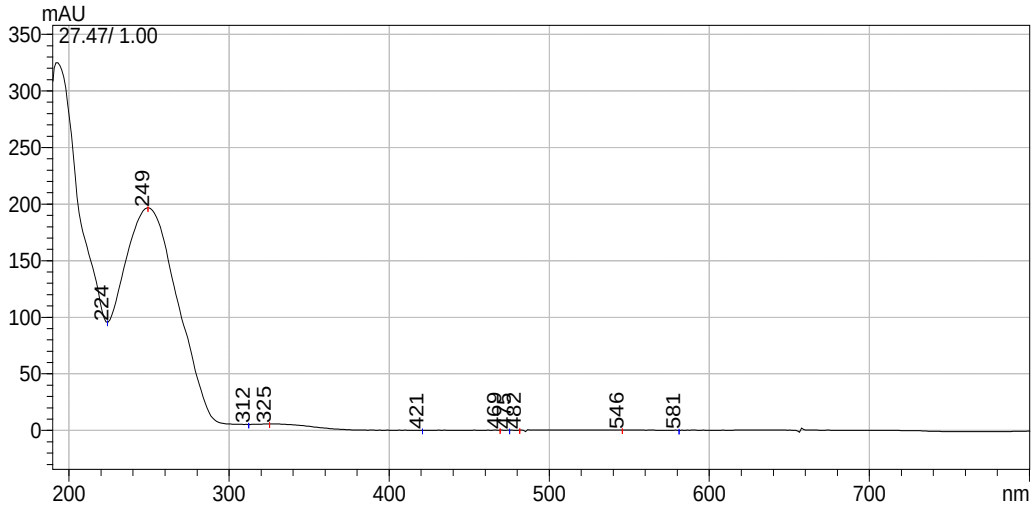
RT2.726	2.726	0.00000	Ch1 280nm	1	6874
RT2.936	**2.936**	0.00000	Ch1 280nm	2	17683
RT3.089	3.089	0.00000	Ch1 280nm	3	3816
RT3.221	3.221	0.00000	Ch1 280nm	4	2826
RT3.543	3.543	0.00000	Ch1 280nm	5	7881
RT4.051	**4.051**	0.00000	Ch1 280nm	6	14725
RT5.711	5.711	0.00000	Ch1 280nm	7	4871
RT6.997	6.997	0.00000	Ch1 280nm	8	1041
RT7.489	7.489	0.00000	Ch1 280nm	9	6414
RT8.385	8.385	0.00000	Ch1 280nm	10	14881
RT9.325	**9.325**	0.00000	Ch1 280nm	11	241719
RT11.063	11.063	0.00000	Ch1 280nm	12	7760
RT12.874	**12.874**	0.00000	Ch1 280nm	13	126481
RT15.470	15.470	0.00000	Ch1 280nm	14	5532
RT24.982	**24.982**	0.00000	Ch1 280nm	15	116477
RT25.209	**25.209**	0.00000	Ch1 280nm	16	546996
RT25.584	**25.584**	0.00000	Ch1 280nm	17	369485
RT25.924	**25.924**	0.00000	Ch1 280nm	18	110607
RT26.158	**26.158**	0.00000	Ch1 280nm	19	150607
RT26.613	26.613	0.00000	Ch1 280nm	20	42029
RT26.856	**26.856**	0.00000	Ch1 280nm	21	724365
RT27.469	**27.469**	0.00000	Ch1 280nm	22	643816
RT27.849	**27.849**	0.00000	Ch1 280nm	23	134736
RT28.500	**28.500**	0.00000	Ch1 280nm	24	307725
RT29.395	29.395	0.00000	Ch1 280nm	25	19358
RT29.909	**29.909**	0.00000	Ch1 280nm	26	62312
RT31.254	**31.254**	0.00000	Ch1 280nm	27	39207
RT35.584	**35.584**	0.00000	Ch1 280nm	28	16274
RT36.160	36.160	0.00000	Ch1 280nm	29	1555
RT37.054	**37.054**	0.00000	Ch1 280nm	30	13185
RT38.855	38.855	0.00000	Ch1 280nm	31	3389
RT39.352	39.352	0.00000	Ch1 280nm	32	2951

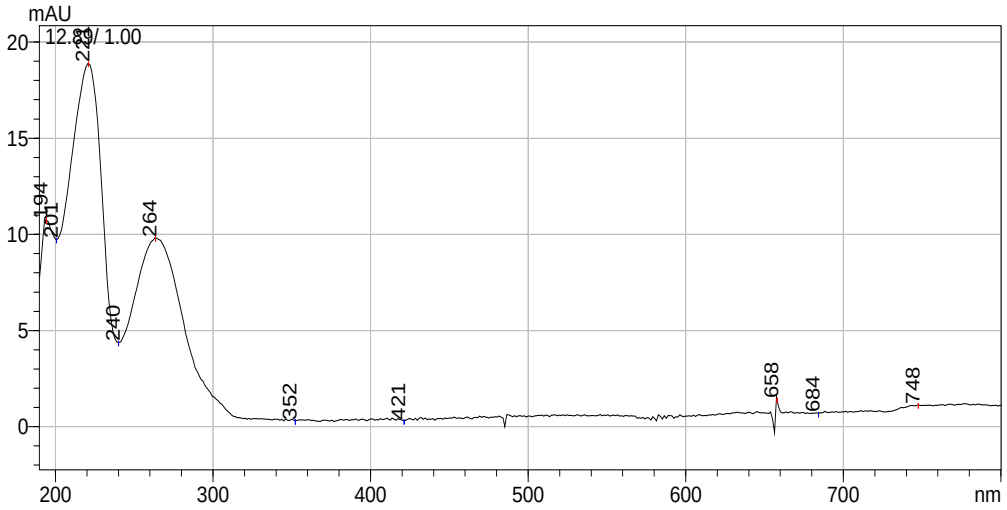
Algunos espectros de absorbancia mediante HPLC, compuestos no identificados


mAU
25.20/ 1.00
100
75
50
25
0
213
217
237
273
421
515
581
640
688
757
200
300
400
500
600
700
nm


mAU
25.59/ 1.00
198
200
150
100
50
0
215
218
265
330
421
469
485
581
688
200
300
400
500
600
700
nm


mAU
26.86/ 1.00
198
300
250
200
150
100
50
0
214
218
265
331
421
469
485
581
688
200
300
400
500
600
700
nm





Cálculos para la cuantificación de polifenoles

[]	ABS Curva 1	ABS Curva 2	ABS Curva 2n
20	0,270	0,260	0,266
30	0,304	0,412	0,299
40	0,475	0,562	0,420
50	0,550	0,660	0,470
60	0,596	0,789	0,760
70	0,644	0,913	0,866

promedio
0,265
0,338
0,486
0,560
0,715
0,808

R	0,9914

	muestra 1	muestra 2	muestra 3

pendiente	0,0112
interseccion	0,0252

UA	0,421	0,460	0,504
UA	0,333	0,478	0,443
UA	0,430	0,453	0,459
promedio	0,395	0,464	0,469

	ug EAG / mL			**ug EAG / gES**	desviacion estandar
1	33,02349	10567,52	10,56752	1732,38	193,9036
2	39,1905	12540,96	12,54096	2055,895	193,9036
3	39,63739	12683,96	12,68396	2079,338	193,9036
fd	**320**				

fd cubeta	10

ug EAG/g ES	ug EAG/g ES *10	mg EAG/ g ES	
1732,38	17323,8	17,3	mg Eq ag/ g de extracto seco
2055,895	20558,95	20,6	
2079,338	20793,38	20,8	

Promedio	19,6
DS	1,9

Cálculos para cuantificación de Flavonoides

Curva de calibración			
Curva (ug/mL)	Absorbancia (curva 1)	Absorbancia (curva 2)	Absorbancia (curva 3)
2	0,133	0,155	0,153
4	0,285	0,29	0,295
8	0,527	0,505	0,529
10	0,645	0,643	0,657
15	0,991	0,943	0,967

Gráfico	
Curva (ug/mL)	Promedio curvas
2	0,147
4	0,290
8	0,520
10	0,648
15	0,967

Muestra	Absorbancia	Interpolación curva	Conc*Fd placa	ug Eq Q /g ES	mgEq Q/ g ES
n1	0,203	2,81	28,06	16220,2	16,220
n2	0,209	2,90	29,02	16776,0	16,776
n3	0,206	2,85	28,54	16498,1	16,498

Promedio	16,5
DS	0,3