

**DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES POR CG-EM DE
EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Mentha* Y *Minthostachys* OBTENIDOS POR
EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE) Y EVALUACIÓN DE SU
BIOACTIVIDAD**



ALEJANDRA DANIELA SOLARTE SARASTY

JUAN DAVID FIGUEROA ALEGRIA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2017

DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES POR CG-EM DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Mentha* Y *Minthostachys* OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE) Y EVALUACIÓN DE SU BIOACTIVIDAD

Trabajo de grado, presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

ALEJANDRA DANIELA SOLARTE SARASTY

JUAN DAVID FIGUEROA ALEGRIA

Dra. MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA

Grupo de investigación en Biotecnología, Calidad Medioambiental y Seguridad Agroalimentaria (**BICAMSA**)
Departamento de Química
UNIVERSIDAD DEL CAUCA

Co-directores:

Dra. María Luz Sanz Murias
Científico Titular
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental, CSIC-UAM
Madrid, España

Dra. Ana Cristina Soria Monzón
Investigadora Ramón y Cajal
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental, CSIC-UAM
Madrid, España

Dra. Ana Isabel Ruíz Matute
Contratada Postdoctoral
Instituto de Química Orgánica General (IQOG), CSIC-UAM
Madrid, España

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Popayán, 2017

Nota de aceptación

Director _____

Dra. MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA

Jurado _____

Dr. FERNANDO JOSÉ HERNÁNDEZ

Jurado _____

Dr. JUAN CARLOS ARGOTI

CONTENIDO

RESUMEN	I
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	III
2. OBJETIVOS	IV
2.1. OBJETIVO GENERAL	IV
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	V
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	6
3.1. Género <i>Mentha</i> spp.	6
3.1.1. <i>Mentha spicata</i> L.	6
3.1.2. <i>Mentha pulegium</i> L.	7
3.2. Componentes químicos en el género <i>Mentha</i> spp.	9
3.3. Género <i>Minthostachys</i> Grisebach (Benth).	9
3.3.1. <i>Minthostachys mollis</i> K.	10
3.4. Componentes químicos en el género <i>Minthostachys</i>	10
3.5. Empleo de la Técnica de Extracción Asistida por Microondas (MAE) en la obtención de extractos de plantas	11
3.5.1. Empleo del Extracto Seco (ES) en el análisis de extractos de plantas	12
3.6. Análisis de la composición química de extractos de plantas por cromatografía de gases espectrometría de masas (CG-EM)	12
3.6.1. Determinación de carbohidratos en extractos de plantas por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)	13
3.7. Actividad antimicrobiana de los géneros <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i>	14
3.7.1 <i>Salmonella typhimurium</i>	14
3.7.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	15
3.7.3 <i>Candida albicans</i>	15
3.7.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.7.5 <i>Escherichia coli</i>	16
3.8. Actividad plaguicida de los géneros <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i>	17
3.8.1. <i>Tecia solanivora</i> , Povolny. “Polilla Guatemalteca”	17

3.9. Actividad antioxidante de los géneros <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i>	18
3.9.1 Ensayo de capacidad captadora del radical DPPH	18
3.9.2 Método de Folin-Ciocalteu para determinar el Contenido Total de Polifenoles (CTP)	19
4. METODOLOGÍA	20
4.1. Obtención de extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i>	20
4.1.1. Descripción de las muestras de trabajo	20
4.1.2 Tratamiento de las muestras	20
4.2. Preparación de extractos etanólicos por MAE	21
4.3. Determinación del extracto seco (ES) de los extractos etanólicos obtenidos por MAE y del rendimiento	22
4.4. Análisis de la composición química de los extractos etanólicos por CG-EM	23
4.4.1 Condiciones de trabajo del CG-EM	23
4.4.2 Identificación de los compuestos principales de los extractos etanólicos obtenidos por MAE mediante CG-EM	23
4.4.3 Cuantificación por CG-EM de los extractos etanólicos obtenidos por MAE	24
4.5. Determinación del contenido de carbohidratos de los extractos etanólicos obtenidos por MAE, mediante CG-EM, empleando la técnica de derivatización por oximación-sililación	24
4.5.1. Derivatización de extractos etanólicos por oximación-sililación	24
4.5.2. Condiciones de trabajo programadas en el CG-EM, para el análisis de carbohidratos	25
4.5.3. Identificación y cuantificación de carbohidratos en los extractos derivatizados por CG-EM	25
4.6. Actividad antioxidante de los extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> obtenidos por MAE	25
4.6.1 Método de capacidad de captación del radical DPPH	26
4.6.2 Determinación por CTP	26
4.7. Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos obtenidos por MAE de <i>Mentha</i>	27
4.8. Determinación de la actividad bio-plaguicida de los extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> contra <i>Tecia solanivora</i>, Povolny	27

4.8.1. Efecto por aplicación tópica de extractos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> obtenidos por MAE contra <i>T. solanivora</i> . (Ensayo 1)	29
4.8.2. Efecto sobre la alimentación y el desarrollo biológico de <i>T. solanivora</i> por aplicación tópica de los extractos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> por MAE (Ensayo 2)	30
4.8.3. Evaluación del efecto por exposición en ambiente saturado sobre <i>T. solanivora</i> (Ensayo 3)	31
4.8.4. Evaluación del efecto de la contracción por exposición en ambiente saturado de extractos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> por MAE contra <i>T. solanivora</i> (Ensayo 4)	32
4.8.5. Determinación de la concentración Letal Media (CL ₅₀) del aceite esencial de <i>Mintostachys mollis</i> contra <i>T. solanivora</i> (Ensayo 5)	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1. Obtención de extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i>	33
5.2. Determinación del extracto seco (ES) de los extractos etanólicos obtenidos por MAE	33
5.3. Análisis de la composición química de los extractos etanólicos por CG-EM	34
5.3.1 Identificación de los compuestos principales de los extractos etanólicos obtenidos por MAE mediante CG-EM	35
5.3.2 Cuantificación por CG-EM de los extractos etanólicos obtenidos por MAE	37
5.3.3. Análisis multivariante de clasificación de los extractos etanólicos obtenidos por MAE	44
5.4 Determinación del contenido de carbohidratos en los extractos etanólicos obtenidos por MAE, mediante CG-EM, empleando la técnica de derivatización por oximación-sililación	50
5.5 Actividad antioxidante de los extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> obtenidos por MAE	53
5.6 Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos obtenidos por MAE de <i>Mentha</i>	56
5.7 Determinación de la actividad bio-plaguicida de los extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> contra <i>Tecia solanivora</i>, Povolny	58
5.7.1 Efecto por aplicación tópica de extractos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> obtenidos por MAE contra <i>T. solanivora</i> (Ensayo 1)	58
5.7.2 Efecto sobre la alimentación y el desarrollo biológico de <i>T. solanivora</i> por aplicación tópica de los extractos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> por MAE (Ensayo 2)	59
5.7.3 Evaluación del efecto por exposición en ambiente saturado sobre <i>T. solanivora</i> (Ensayo 3)	60

5.7.4 Evaluación del efecto de la contracción por exposición en ambiente saturado de extractos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> por MAE contra <i>T. solanivora</i> (Ensayo 4)	61
5.7.5. Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) del aceite esencial de <i>Mintostachys mollis</i> contra <i>T. solanivora</i> (Ensayo 5)	62
6. CONCLUSIONES	63
7. BIBLIOGRAFÍA	65
8. Anexos	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dibujo botánico de <i>Mentha spicata</i> L.	6
Figura 2. Mapa de distribución de <i>Mentha spicata</i> L., en la península ibérica	7
Figura 3. Mapa de distribución de <i>Mentha spicata</i> L., en Colombia	7
Figura 4. Dibujo botánico de <i>Mentha pulegium</i> L.	8
Figura 5. Mapa de distribución de la <i>Mentha pulegium</i> L., en la península Ibérica	8
Figura 6. Mapa de distribución de la <i>Mentha pulegium</i> L., en Colombia	8
Figura 7. Monoterpenos reportados en los géneros <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i>	9
Figura 8. Dibujo botánico de <i>Minthostachys mollis</i>	10
Figura 9. Secado de las muestras de estudio	21
Figura 10. Tratamiento previo de las muestras	21
Figura 11. Preparación de extractos etanólicos por MAE	22
Figura 12. Derivatización de extractos etanólicos	25
Figura 13. Colecta de adultos de <i>T. solanivora</i> en cultivo de papa	28
Figura 14. Cría de <i>T. solanivora</i> en laboratorio: A) Tarrina para reproducción del insecto; B) Huevos de <i>T. solanivora</i> depositados sobre papel filtro, visto desde un estereoscopio; C) Larva de primer instar de <i>T. solanivora</i> visto desde un estereoscopio	28
Figura 15. Ensayo para determinar el efecto por aplicación tópica de extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i>	30
Figura 16. Efecto por aplicación tópica de extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> sobre la alimentación y desarrollo larval	31
Figura 17. Determinación de ES (%): A). Extractos etanólicos obtenidos por MAE; B). Extracto seco a 20 h	33
Figura 18. TIC de los extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> con zoom en 1.000.000 de cuentas de los extractos; (*) indica el pico base y su intensidad entre paréntesis; (**) indica el EI ₂ ; (***) indican el EI ₁	35
Figura 19. Perfil cromatográfico para la mezcla de alcanos C10-30	35
Figura 20. Isomeración del Hedicariol a Elemol inducida por calentamiento en el CG-EM	36
Figura 21. Análisis multivariante de clasificación mediante Mapa de calor de los extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i>	44

Figura 22. Contenido de carbohidratos de los extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i>	50
Figura 23. Ensayos de actividad antioxidante; a). Ensayo de DPPH; b). Ensayo CTP	53
Figura 24. Comparación de la actividad antioxidante obtenida por los métodos CTP y DPPH en extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> ($\mu\text{mol/g}$)	56
Figura 25. Prueba de bioactividad de los extractos etanólicos de <i>Mentha</i> por el método de difusión en agar: A) ensayo de actividad antimicrobiana; (B) ensayo de extractos puros; (C) ensayos de extractos concentrados 15 veces	57
Figura 26. Gráfica de CL_{50} para la determinación de la actividad bio-plaguicida de <i>M. mollis</i> contra adultos de <i>T. solanivora</i>	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras de estudio y ubicación geográfica.	20
Tabla 2. Condiciones de trabajo programadas en el CG-EM para el análisis de compuestos volátiles en los extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i>	23
Tabla 3. Estándares utilizados para la cuantificación de los componentes principales de los extractos etanólicos de <i>Mentha</i> y <i>Minthostachys</i> por CG-EM	24
Tabla 4. Determinación del efecto a nivel tópico sobre <i>T. solanivora</i> . Denominando con; Control (A); Blanco (B); Positivo (C); 5 ppm; (D); 50 ppm (E); 1000 ppm (G); 5000 ppm (H)	29
Tabla 5. Propiedades organolépticas y volumen total de los extractos etanólicos obtenidos por MAE; Volumen de extraco (mL) (\pm s) y Rendimiento de extracción (%) (\pm s)	33
Tabla 6. Composición química determinada por CG-EM del extracto MSE; Cuantificación en mg/g _{muestra} \pm s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g _{ES} \pm s; Porcentaje de similitud del espectro de masas con la literatura (%*); n=3	38
Tabla 7. Composición química determinada por CG-EM del extracto MSC; Cuantificación en mg/g _{muestra} \pm s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g _{ES} \pm s; del espectro de masas con la literatura (%*); n=3	39
Tabla 8. Composición química determinada por CG-EM del extracto MPE; Cuantificación en mg/g _{muestra} \pm s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g _{ES} \pm s; Porcentaje de similitud del espectro de masas con la literatura (%*); n=3	40
Tabla 9. Composición química determinada por CG-EM del extracto MPC; Cuantificación en mg/g _{muestra} \pm s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g _{ES} \pm s; Porcentaje de similitud del espectro de masas con la literatura (%*); n=3	41
Tabla 10. Composición química determinada por CG-EM del extracto MMJB; Cuantificación en mg/g _{muestra} \pm s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g _{ES} \pm s; Porcentaje de similitud del espectro de masas con la literatura (%*); n=3	42
Tabla 11. Composición química determinada por CG-EM del extracto MMTJ; Cuantificación en mg/g _{muestra} \pm s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g _{ES} \pm s; Porcentaje de similitud del espectro de masas con la literatura (%*); n=3	43
Tabla 12. Actividad antioxidante por el método de DPPH en μ mol Trolox/g de ms (\pm s) y CTP en mgEAG/100g de ms (\pm RSD)	53
Tabla 13. Resultados del diseño experimental aplicado sobre <i>T. solanivora</i> , evaluando la aplicación tópica de extractos obtenidos por MAE; Control (A); Blanco (B); Positivo (C); 5 ppm (D); 50 ppm (E); 1000 ppm (G); 5000 ppm (H); signo negativo (-) indica individuo vivo y signo positivo (+) indica individuo muerto. El ensayo se realizó durante 24h	59
Tabla 14. Resultados del diseño experimental aplicado sobre <i>T. solanivora</i> , evaluando el efecto sobre la inhibición y desarrollo por aplicación tópica de extractos obtenidos por MAE; Control (A); Blanco (B); Positivo (C); 5 ppm (D); 50 ppm (E); 1000 ppm (G); 5000 ppm (H); signo negativo (-) indica individuo vivo y	

signo positivo (+) indica que el individuo muerto. El ensayo se realizó a 24 h 60

Tabla 15. Resultados del diseño experimental aplicado sobre *T. solanivora*, evaluando el efecto por exposición en ambiente saturado de extractos obtenidos por MAE; signo negativo (-) indica individuo vivo y signo positivo (+) individuo muerto. El ensayo se realizó a 24 h 61

Tabla 16. Resultados del diseño experimental aplicado sobre *T. solanivora*, evaluando el efecto de la concentración por exposición en ambiente saturado de extractos obtenidos por MAE; signo negativo (-) indica individuo vivo y signo positivo (+) indica que el individuo muerto. El ensayo se realizó a 24 h 61

ÍNDICE DE ACRONIMOS Y ABREVIATURAS

MAE	Extracción Asistida por Microondas
CG-EM	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
DPPH	1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo
CTP	Contenido Total de Polifenoles
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
EU	Extracción asistida por Ultrasonidos
SX	Extracción por Soxhlet
HD	Hidrodestilación
HD-MAE	Hidrodestilación con Asistencia de Microondas
IR	Índice de Retención
NIST	National Institute of Standards Technology
DV	Destilación por Arrastre de Vapor
t_R	Tiempo de Retención
CL ₅₀	Concentración Letal media
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
BTH	Butilhidroxitolueno
MSE	<i>Mentha spicata</i> Española
MSC	<i>Mentha spicata</i> Colombiana
MPE	<i>Mentha pulegium</i> Española
MPC	<i>Mentha pulegium</i> Colombiana
MMJB	<i>Minthostachys mollis</i> del Jardín Botánico
MMTJ	<i>Minthostachys mollis</i> de Tunja
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid
CAUP	Herbario Cauca Popayán
ES	Extracto Seco
ms	Muestra Seca
I^T	Índice de Retención Lineal
EI	Estándar Interno
EAG	Equivalente de ácido gálico
TEAC	Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox
Uv-vis	Espectrofotometría de Ultravioleta Visible
TSA	Agar Trypticase de Soya
PDA	Agar de Patata y Dextrosa
s	Desviación Estándar
RSD	Desviación Estándar Relativa
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
AE	Aceite Esencial
DDMP	2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona
HMF	Hidroximetilfurfural
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar

RESUMEN

En este trabajo, se reporta por primera vez la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles presentes en extractos etanólicos, obtenidos por medio de la extracción asistida por microondas (MAE), de las especies *Mentha spicata*, *Mentha pulegium*, tanto Colombianas como Españolas y de *Minthostachys mollis* Colombianas, empleando la técnica de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) y teniendo como principal interés, los compuestos mayoritarios de la fracción volátil, donde se encontró como componentes principales, Carvona, *p*-Mentona, Pulegona, Isomentona y Óxido de Piperitona. Posteriormente, se realizó un análisis multivariante de clasificación, que permitió comparar las muestras por especies y por regiones, con respecto a su composición y proporción. Se encontraron características similares entre la muestra de *Minthostachys mollis* (MMJB) y las muestras de *Mentha spicata* (MSC y MSE) con respecto a la proporción de componentes principales, mientras que las muestras de *Mentha pulegium* (MPC y MPE) y de *Minthostachys mollis* (MMTJ) presentaron similitud por su contenido alto en Pulegona, por último se encontraron diferencias entre las muestras analizadas de *Minthostachys mollis* (MMJB y MMTJ) de las cuales, una presentó un alto contenido en Óxido de Piperitona, mientras que la otra en Pulegona e Isomentona.

Utilizando la técnica de derivatización por sililación, se identificaron y cuantificaron por primera vez, los carbohidratos presentes en los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys*, mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), encontrándose la presencia de Sacarosa, Glucosa, Fructosa y Mio-inositol.

Adicional al estudio de composición de los extractos, se realizó la evaluación de la bioactividad. Para ello, se midió la capacidad antioxidante, por el método de la Capacidad Captadora del Radical 1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) y determinando el Contenido Total de Polifenoles (CTP) por el método de Follin-Ciocalteu, encontrando que en ambos métodos la muestra de *Mentha spicata* Colombiana presentó la mayor actividad antioxidante, mientras que la menor actividad se determinó en la muestra de *Mentha pulegium* Española.

Por primera vez se evaluó la actividad antimicrobiana de estos extractos etanólicos, frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Candida albicans*, por el método de difusión en agar, donde los resultados más importantes fueron proporcionados por las muestras de *Mentha spicata* que

presentaron un efecto ligeramente bacteriostático sobre *Escherichia coli*. La falta de actividad se atribuye a la baja concentración de los componentes terpénicos, responsables de la actividad según la literatura.

Posteriormente, se estudió por primera vez la actividad plaguicida de los extractos etanólicos, frente a la *Tecia solanivora*, una importante plaga que ataca los cultivos de papa; se observó que dichos extractos no ocasionaron efectos por aplicación tópica ni por exposición en un ambiente saturado sobre larvas de primer instar (estadio). Finalmente, se evaluó por primera vez, la actividad plaguicida del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre adultos de *Tecia solanivora*, mediante el ensayo de concentración letal media (CL₅₀) encontrando una alta actividad bioplaguicida.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, existe un particular y creciente interés por encontrar compuestos provenientes de fuentes naturales, que presenten bioactividad, para emplearlos en industrias como la alimentaria (agentes conservantes), farmacéutica (agentes antimicrobianos), el sector agrícola (como bioplaguicidas), entre otras. Debido a lo anterior, se ha estudiado de manera exhaustiva la fracción volátil (aceites esenciales) de plantas, que cumplan con esas características; sin embargo, la extracción convencional de estos aceites presenta desventajas, como son los largos tiempos de extracción, alto consumo de energía y rendimientos muy bajos, lo cual lo convierte en un proceso costoso.

Adicionalmente, se carece de estudios que evalúen la bioactividad de extractos de fracciones polares de plantas aromáticas como en los géneros *Mentha* y *Minthostachys*, que permitan extraer una amplia gama de compuestos mediante la implementación de técnicas novedosas no convencionales como la extracción asistida por microondas (MAE), metodología amigable con el medio ambiente. Culturalmente se reporta que estas plantas presentan propiedades curativas, repelentes y antioxidantes, entre otras, que se proyectan como la solución a la demanda de compuestos bioactivos, que puedan llegar a sustituir a las sustancias sintéticas, algunas de las cuales se han llegado a relacionar con enfermedades en los humanos.

Por otra parte, se deben aunar esfuerzos por parte de la academia, para solucionar problemáticas que afectan la sociedad, como por ejemplo la causada por la polilla *Tecia solanivora*, que afecta a los cultivos de papa, generando pérdidas económicas importantes en los productores de este tubérculo e incrementan el precio del alimento, que es de gran demanda en nuestro país. A pesar de los reportes etnobotánicos que existen sobre el uso tradicional de plantas aromáticas como la *Minthostachys mollis* para el control de esta plaga, no existe estudios en la bibliografía, que permitan corroborar su contribución al control eficaz de esta plaga, que hasta el momento carece de métodos de control eficientes.

En este trabajo se prepararán mediante la técnica de MAE, extractos etanólicos de las especies *M. spicata*, *M. Pulegium* y *M. mollis*. Posteriormente se identificará y cuantificará los compuestos volátiles presentes en los extractos por la técnica de CG-EM. La identificación se realizará utilizando los índices de retención y los fragmentogramas, que se compararán con las bases de datos NITS y Wiley. Para la cuantificación se empleará la técnica de estándar interno. Se determinarán los carbohidratos presentes en las muestras de igual manera por CG-EM, por lo cual se realizará una derivatización por oximación-sililación; cuantificándolos por el método de estándar interno.

Se determinará la actividad antioxidante de los extractos de forma directa por el método de capacidad captadora del radical DPPH utilizando Trolox como patrón y de forma indirecta estimando el contenido de polifenoles por el método CTP utilizando ácido gálico como patrón. Se evaluará la actividad antimicrobiana de los extractos por el método de difusión en agar frente a *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *C. albicans*. Finalmente estudiará la actividad bioplagueicidad de los extractos sobre el lepidóptero *T. solanivora* mediante los ensayos de: efecto por aplicación tópica; efecto por aplicación tópica y desarrollo biológico; exposición en ambiente saturado; efecto de la concentración por exposición en ambiente saturado y se determinará la CL₅₀ del aceite esencial de *M. mollis*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los componentes principales de extractos etanólicos obtenidos por la extracción asistida por microondas (MAE) de especies del género *Mentha* y *Minthostachys* por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) y la evaluación de su bioactividad.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Emplear la metodología de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) en la determinación de los compuestos volátiles presentes en extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys*, con un método previamente optimizado
- Comparar las características de las muestras analizadas de Colombia y España, con base en su composición química.
- Medir la actividad antioxidante de los extractos etanólicos mediante el método de capacidad captadora del radical 1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) y la evaluación del Contenido Total de Polifenoles (CTP).
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Mentha* en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Candida albicans*.
- Evaluar la actividad plaguicida de los extractos etanólicos de las muestras de *Mentha* y *Minthostachys* sobre la *Tecia solanivora*.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1. Género *Mentha* spp.

Las *Menthas* son plantas aromáticas ampliamente conocidas y distribuidas por el mundo, conocidas desde la antigüedad, por las culturas egipcia, romana y griega, quienes las utilizaron por sus propiedades organolépticas y medicinales en el tratamiento de náuseas, bronquitis, flatulencias, problemas del hígado y como analgésicos, entre otros. Hacen parte de la familia Lamiaceae y está compuesta por cerca de 19 especies naturales y 13 híbridos [1].

Actualmente es de interés su estudio, debido a las propiedades que presentan las diferentes fracciones obtenidas, dentro de las cuales destacan su uso como insecticida, sus propiedades antibacterianas, antifúngicas e incluso anticancerígenas. En Colombia existen dos especies de *Mentha*: *Mentha spicata* y *Mentha pulegium* [2].

3.1.1. *Mentha spicata* L.

Conocida en Colombia como hierbabuena, presenta tallos con pelos dispersos, hojas arqueadas ó lisas de 18-78 x 9-33 mm, rugosas por el haz, con una forma que puede variar de ovalada a lanceolada, con el borde algo dentado, como se ve en la figura 1.



Figura 1. Dibujo botánico de *Mentha spicata* L.[3].

En el envés presenta nervios marcados, además de glándulas de formas esféricas. Sus hojas son verdes pero con una tonalidad más clara en el envés y una más oscura en el haz, que suelen estar apoyadas sobre el tallo, pero presentan un peciolo menor a 1 mm. [3].

Se distribuye a lo largo de la península Ibérica (figura 2), cultivada en huertos, corrales de las casas y en antejardines [4].



Figura 2. Mapa de distribución de *Mentha spicata* L., en la península ibérica [5].

En Colombia, la *Mentha spicata* ocupa un lugar importante entre las hierbas aromáticas cultivadas para exportación, incluso en Cundinamarca (figura 3), es una de las plantas con mayor venta en el mercado interno; la producción total es de 2.000 g/m², aunque una vez seleccionado el material tipo exportación, puede disminuir a 1.200 g/m² [6].



Figura 3. Mapa de distribución de *Mentha spicata* L., en Colombia [7].

3.1.2. *Mentha pulegium* L.

Es una hierba perenne, es decir, de vida larga (más de 2 años), con tallos de 15 a 45 cm ascendentes, ramificados y algo leñosos; presenta hojas con forma elíptica, algunas veces pelosas, con dimensiones de 8,5-30 × 6-13,5 mm, con nervios más o menos marcados, atenuados en la base. Tiene inflorescencias en tallos erguidos, brácteas similares a las hojas culinarias, generalmente curvas hacia abajo y lanceoladas de 2-4 mm; cáliz de color púrpura con pelos densos y rígidos y sus flores son minúsculas, pediceladas en glomérulos, que algunas veces son pedunculados (ver figura 4) [3].



Figura 4. Dibujo botánico de *Mentha pulegium* L. [8].

Esta menta es nativa de África, Asia y Europa [1]. Se distribuye por toda la península ibérica (ver figura 5) y habita normalmente prados húmedos, en orillas de arroyos y acequias. Está asilvestrada en América, por lo cual se encuentra en este continente [3].



Figura 5. Mapa de distribución de la *Mentha pulegium* L., en la península Ibérica [9].

En Colombia se puede encontrar en los Andes y la Amazonía (como se observa en la figura 6); el Jardín Botánico José Celestino Mutis de Bogotá, tiene registros de especímenes colectados en Boyacá, Cundinamarca y Putumayo [10].

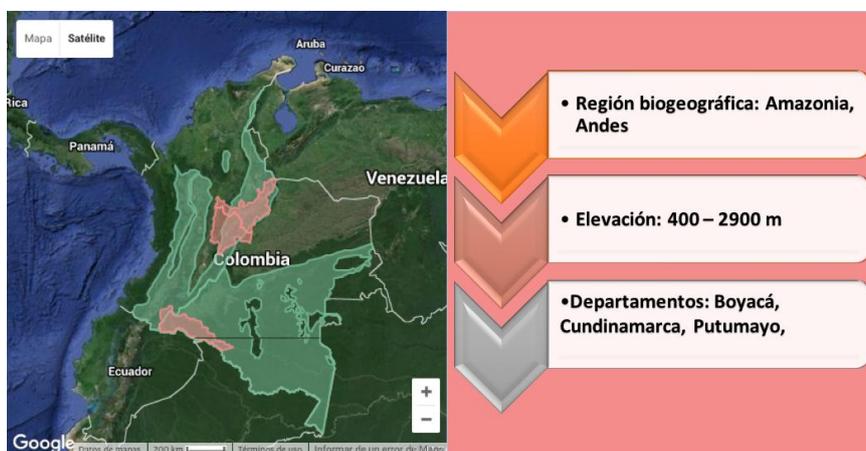


Figura 6. Mapa de distribución de la *Mentha pulegium* L., en Colombia [11].

3.2. Componentes químicos en el género *Mentha* spp.

Las *Menthas* son plantas aromáticas ampliamente distribuidas por el mundo, su aroma característico y sus propiedades medicinales, se atribuyen principalmente a compuestos químicos derivados de monoterpenos, presentes en sus aceites esenciales.

Los aceites de *Mentha spicata* suelen ser ricos en Carvona (cetona monoterpénica con propiedades antisépticas) en proporciones del 50-65% de los monoterpenos totales [12]. Además, también se encuentran Limoneno y 1,8-Cineol (ver figura 7) [13] [14], los cuales pueden variar en sus proporciones, lo cual determina los quimiotipos; es así, como se puede encontrar un constituyente de estos aceites como es el *m*-Cimeno (2,77%), en mayor proporción que el 1,8-Cineol (2,52%) [15]; en ella, se han encontrado compuestos importantes por su actividad antioxidante en extracciones con solventes polares como el agua, etanol y metanol. En extractos acuosos se ha encontrado ácido cinámico [16], flavonoides como Eriodictiol, Hesperitina, Apigenina y Luteolina [17] [18], ácidos polifenólicos como ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido rosmarínico [19].

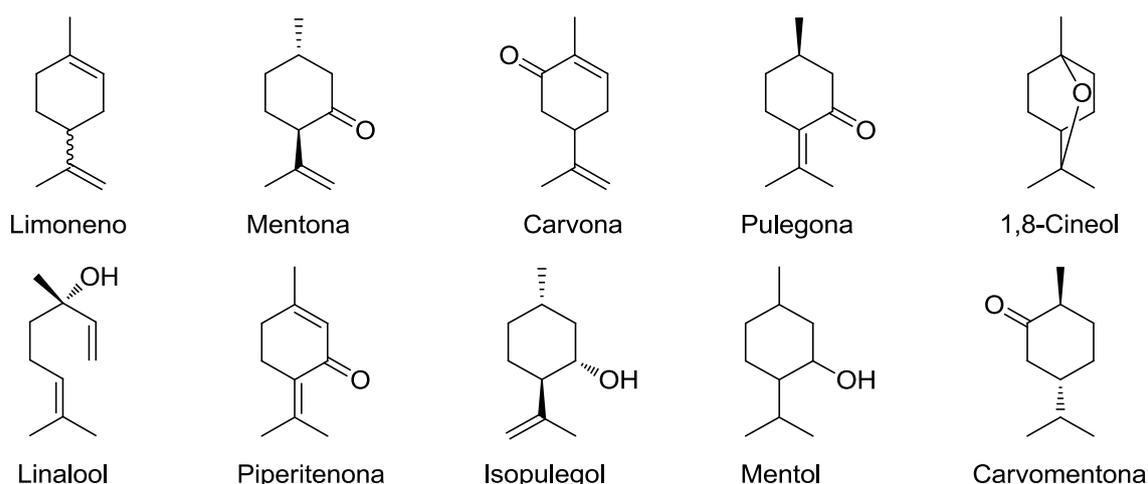


Figura 7. Monoterpenos reportados en los géneros *Mentha* y *Minthostachys*

3.3. Género *Minthostachys* Grisebach (Benth).

El género *Minthostachys* (Benth), está compuesto por 17 especies de arbustos aromáticos trepadores, endémicos y restringidos a los Andes de América del sur, desde Venezuela hasta el norte de Argentina. En estas regiones se ha utilizado como condimento o té, además de sus decocciones a las cuales se atribuyen propiedades medicinales. Debido a las propiedades farmacológicas de los aceites esenciales de especies de este género, en Argentina y Perú se extraen a escala industrial [20]. En Colombia se han reportado las especies *Minthostachys septentrionalis* Schmidt-Leb., *Minthostachys mollis* (HBK) Griseb, *Minthostachys mollis* var. *mollis* y *Minthostachys mollis* var. *hybrida* Schmidt-Leb. [21].

3.3.1. *Minthostachys mollis* K.

Es un subarbusto aromático, perenne de hasta 2 m de altura, que crece entre los 1000 y 3500 m.s.n.m. Presenta tallos ascendentes, leñosos en base, con hojas opuestas, aovadas y agudas, con dimensiones de 1-5 x 1-3 cm y peciolo de 0,5-1 cm de largo (ver figura 8).



Figura 8. Dibujo botánico de *Minthostachys mollis*.

Las flores son numerosas, en verticilastros, con cáliz tubular de 13 nervaduras poco acentuadas en el fruto, el cual está formado por 4 clusas elipsoides, finamente reticuladas y pardas. Los órganos aéreos desaparecen durante la época más fría y seca del invierno, para brotar nuevamente con las lluvias de la primavera.

3.4. Componentes químicos en el género *Minthostachys*

Son numerosos los estudios realizados a los aceites esenciales obtenidos de estas plantas, por lo que se conocen sus quimiotipos y componentes principales. En 2004, Calle y colaboradores, estudiaron la composición del aceite de *Minthostachys mollis* recolectada en Ubaque-Cundinamarca-Colombia, por cromatografía en capa delgada (CCD), encontrando alcoholes, terpenos, ácidos carboxílicos, compuestos carbonílicos y fenólicos. Al analizar el aceite por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), determinaron que los componentes principales fueron: Pulegona (30,20%) y Mentona (29,2%). También obtuvieron fracciones fenólicas (16,81%), terpénicas (82,93%) y ácidas (0,26%). En la fracción fenólica encontraron Timol (6,2%), Carvacol (3,5%), Diosfenol e Isoeugenol. En la fracción terpénica Pulegona (30,20%), Mentona (29,2%), Cariofileno (5,0%), Linalol, Mentol, Isopulegol, Piperitenona (ver figura 7), Verbenona, Carvomentona y Cadineno [22].

Sin embargo, hay un desconocimiento de la composición y de las propiedades de las fracciones más polares extraídas de estas plantas, siendo por ello, importante su investigación.

3.5. Empleo de la Técnica de Extracción Asistida por Microondas (MAE) en la obtención de extractos de plantas

Es una técnica alternativa que puede emplearse para asistir un método convencional como la hidrodestilación (HD) ó adaptarse a un equipo para establecerlo como un método independiente [23]. Actualmente, se está comenzando a emplear para la obtención de extractos a partir de plantas y ofrece beneficios como son la reducción considerable del tiempo y energía, el empleo o no de solventes, además de que genera calor de una forma más homogénea y eficaz que las técnicas convencionales; para ello, debe emplearse un equipo apropiado que permita controlar parámetros tales como potencia, temperatura y presión, entre otros [24].

Dai y colaboradores en 2010, compararon la extracción asistida por microondas (MAE) con la extracción asistida por ultrasonidos (EU) y la extracción por soxhlet (SX) a temperatura ambiente y de reflujo, para la obtención de Mentol, Mentofurano y Mentona, partiendo de hojas secas de *Mentha piperita*. Evaluaron el rendimiento de extracción de las técnicas y parámetros, como el tiempo de extracción, la relación disolvente muestra y el tipo de solvente. Encontraron diferencias significativas entre los métodos MAE y SX a temperatura de reflujo, con respecto a EU y diferencias significativas entre el segundo y tercer método mencionado a temperatura ambiente. Esto les permitió ver que el mayor rendimiento de extracción fue para MAE, sin embargo no se encontró diferencias entre este y SX a temperatura de reflujo. Los rendimientos superiores de MAE y SX a temperatura de reflujo se atribuyen a una liberación más efectiva de los aceites esenciales contenidos en tricomas glandulares de las hojas de menta, por difusión acelerada al aumentar la temperatura; además en MAE se pueden degradar las glándulas por presión acumulada, dando como resultado una rápida liberación de los componentes de interés y una disminución en el tiempo de extracción, lo que la hace una técnica más eficiente en comparación con las técnicas convencionales [25].

Lucchesi y colaboradores en 2004, realizaron la extracción de los aceites esenciales de plantas aromáticas, entre ellas de *Mentha crispera* por MAE. La extracción fue realizada en ausencia de solvente, a una potencia de 500 W y partiendo de material vegetal fresco (250 g). Al comparar los resultados con la HD, obtuvieron que a 30 minutos de extracción, los aceites esenciales fueron cualitativa y cuantitativamente similares a los obtenidos por HD empleando de 4 a 5 horas de extracción y partiendo del doble de material vegetal fresco (500 g), aunque con compuestos oxigenados más valiosos y menos compuestos monoterpénicos, planteando un ahorro sustancial de costos, en términos de tiempo, energía y material vegetal de MAE con respecto a HD, por lo cual además de rentable se puede

considerar como una técnica verde para la obtención de aceites esenciales a partir de plantas aromáticas [26][27].

En estudios realizados por Torrenegra y colaboradores en 2015, se comparó la extracción de aceite esencial en etanol de hojas de *Minthostachys mollis* recolectados en el municipio de Pamplona, Norte de Santander-Colombia, la cual se obtuvo por medio de dos técnicas: la clásica hidrodestilación por arrastre de vapor (AV) y la hidrodestilación por arrastre de vapor con asistencia de microondas (AV-MAE); evaluaron la composición de ambos aceites por CG-EM, encontrando en AV, compuestos principales como: Acetato de Eudesmol (22,44%) y Acetato de Isolongifolol (21,75%), mientras que en HD-MAE se encontró Timol (73,36%) y Carvacrol (10,94%). Por medio de este estudio, se comprobó que MAE, fue más efectiva en la extracción de metabolitos secundarios (volátiles), proporcionando un porcentaje de rendimiento mayor que el convencional [28].

3.5.1. Empleo del Extracto Seco (ES) en el análisis de extractos de plantas

El extracto seco son un conjunto de sustancias que bajo determinadas condiciones físicas, no se volatilizan por evaporación del solvente empleado en su producción y que se determinan por medio de un análisis gravimétrico. La determinación del extracto seco se ha empleado en el análisis de extractos provenientes de plantas, por ser una medida del rendimiento de la extracción empleada y porque además permite indicar con precisión el contenido de principios activos presentes en los mismos [29].

Gallo y colaboradores en 2012, estudiaron un extracto hidroalcohólico de *Valeriana officinalis*, proveniente de Soria-Argentina. Mediante la determinación del extracto seco compararon diferentes procesos y encontraron la mejor formulación farmacéutica para realizar comprimidos de esta planta medicinal [30].

En *Mentha* spp, Lagarto Parra y colaboradores en 1999, estudiaron la toxicidad de extractos de *Mentha spicata*, *Mentha arvensis*, *Mentha citrata* y *Mentha piperita*, en ratones; los resultados se expresaron en base al extracto seco, no encontrando efectos tóxicos de los extractos por ingestión [31].

3.6. Análisis de la composición química de extractos de plantas por cromatografía de gases espectrometría de masas (CG-EM)

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas es una técnica separativa, que permite la resolución de mezclas complejas como son los aceites esenciales y los extractos obtenidos a partir de plantas, permitiendo la identificación tentativa de los compuestos desconocidos presentes en la mezcla, mediante la información que suministra el espectro de masas, catalogada como la “huella digital”, de un analíto en

cuestión, junto con el cálculo de los índices de retención (IR), que permiten llegar a obtener una identificación presunta, por comparación con los datos reportados en la literatura, como por ejemplo, la librería del National Institute of Standards and Technology (NIST) [32].

El análisis de extractos obtenidos de plantas naturales es complejo debido a la cantidad de compuestos presentes en las mismas, por ello se puede utilizar la técnica de estándar interno para su cuantificación. Pontin y colaboradores en 2015 realizaron extracciones con solventes de diferentes polaridades de *Allium sativum*, (Ajo) encontrando monoterpenos, diterpenos y un triterpeno, que fueron cuantificados utilizando como estándar interno un n-alcano alifático (n-hexadecano) [33]. Al igual que Cardenas y Duarte en 2007 identificaron y cuantificaron 47 metabolitos secundarios (terpenoides) en *Lippia alba* utilizando como patrón interno el alcano alifático n-decano [34].

Gavahian y colaboradores en 2015, identificaron mediante la técnica de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), 34 compuestos presentes en el aceite esencial de *Mentha piperita*, obtenido por dos metodologías diferentes: HD y la destilación al vapor (DV), comparando los espectros de masas y los índices de retención con la literatura [35].

De igual forma Hossain y colaboradores en 2014, determinaron la composición química del extracto de *Mentha piperita*, obtenido por SX en metanol, del cual realizaron un fraccionamiento con diferentes solventes (Hexano, Cloroformo, Acetato de Etilo y Butanol); los compuestos fueron identificados mediante la CG-EM, comparando los espectros de masas y los tiempos de retención (t_R) obtenidos, con la las librerías NIST y Wiley [36].

3.6.1. Determinación de carbohidratos en extractos de plantas por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)

Los carbohidratos son compuestos químicos constituidos por los elementos Carbono, Hidrógeno y Oxígeno; estos son biosintetizados por las plantas mediante la fotosíntesis y presentan una gran diversidad de grupos funcionales, que les permite cumplir diferentes funciones biológicas en los organismos vivos. Ruiz-Matute y colaboradores (2011), señalan que algunos de estos compuestos no sólo aportan un valor nutritivo en la dieta de los seres humanos, sino que pueden aportar beneficios para la salud.

La CG-EM, ha sido ampliamente utilizada para la determinación de carbohidratos de bajo peso molecular, ya que permite tener, entre otras características, alta resolución, alta sensibilidad y la posibilidad de obtener información estructural. Debido a las características químicas de los carbohidratos para su análisis por esta técnica, es necesario convertirlos en derivados volátiles y para ello se han desarrollado gran variedad de técnicas de derivatización [37].

Rodríguez-Sánchez y colaboradores en 2011, determinaron los carbohidratos presentes en un extracto acuoso de *Morus alba*, por CG-EM, empleando diferentes técnicas de derivatización como son: sililación, acetilación, oximación-acetilación y oximación-sililación, encontrando que esta última permitía obtener los mejores resultados, mientras que la técnica de oximación-acetilación fue descartada por realizar una derivatización incompleta de los carbohidratos, lo cual generaba resultados inexactos [38].

3.7. Actividad antimicrobiana de los géneros *Mentha* y *Minthostachys*

Las especies de los géneros *Mentha* y *Minthostachys* se han estudiado ampliamente, reportándose que presentan importante actividad biológica [39][40].

La actividad biológica de la *Mentha*, contra diferentes microorganismos que deterioran los alimentos y que afectan a la industria alimentaria, hacen indispensable el uso de conservantes; es por ello que se hace necesario por parte de la industria, buscar alternativas naturales al uso de conservantes sintéticos, que son objeto de polémica, debido a la presión ejercida por parte de los consumidores y autoridades reguladoras [41], que hacen necesario estudiar los extractos naturales, que puedan combatir a los microorganismos patógenos que más afectan a la salud de las personas y que son transmitidas en los alimentos. A continuación, se hará un breve comentario acerca de esos microorganismos:

3.7.1 *Salmonella typhimurium*

Pertenece al género *Salmonella*, cuyo hábitat principal es el tracto intestinal de los seres humanos y animales. Se caracterizan por ser bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, que no forman esporas. Pueden resistir períodos largos de tiempo en ambientes con sustratos orgánicos a temperaturas entre los 7 y 45 °C y a temperaturas de refrigeración y congelación. Se puede inactivar a un pH inferior a 5 y a temperaturas superiores a los 60 °C [42]. Causa salmonelosis, cuyos síntomas son: molestias gastrointestinales (vómitos, náuseas y diarreas), que pueden complicarse al extenderse la infección, causando complicaciones renales y hepáticas, cuando no es tratada a tiempo.

En la literatura son pocos los reportes sobre el uso del género *Mentha* contra la *Salmonella typhimurium*. Kanatt y colaboradores en 2005, estudiaron un extracto de *Mentha spicata* contra la *Salmonella typhimurium*, encontrando que no tenía actividad biológica contra esta especie, pero si buena actividad antioxidante, por ello, la utilizaron en una mezcla con quitosano, la cual mostró actividad antimicrobiana pero pobre actividad antioxidante, para tratar productos cárnicos, encontrando que el extracto de menta no afectaba la actividad del

quitosano, por lo cual la mezcla protegía a estos alimentos del deterioro oxidativo y microbiano [43].

3.7.2 *Listeria monocytogenes*

Es una bacteria patógena gram-positiva, causante en el hombre de la infección denominada listeriosis, que se transmite por los alimentos; se considera una enfermedad grave, debido a que puede provocar encefalitis, septicemia, meningitis e incluso aborto. Ataca principalmente a niños recién nacidos, mujeres embarazadas, pacientes inmunodeprimidos, debilitados, de edad avanzada e incluso puede desarrollarse en individuos normales. Puede afectar a otros vertebrados como las aves [44]. Puede proliferar en un amplio rango de valores de pH (desde 4,1 hasta 9,6), a altas concentraciones de sal (10%) y a bajas actividades de agua, que junto con su capacidad para formar biopelículas, le permite crecer no solo en alimentos, sino también en los equipos utilizados para el procesamiento de los mismos [45].

Moosavy y colaboradores en 2013, estudiaron el efecto antibacterial del aceite esencial de *Mentha spicata* contra la *Listeria monocytogenes* en queso de cabra tradicional Lighvan, inoculando *Listeria monocytogenes* en la leche de cabra cruda y agregando el aceite esencial en concentraciones de 2 y 2,5% (v/p); durante un tiempo de maduración del queso de 60 días, se encontraron diferencias significativas entre la muestra control y los dos tratamientos aplicados ($p < 0,002$), demostrando que el aceite de *Mentha spicata* tiene efecto sobre la proliferación de esta bacteria; adicionalmente no se encontraron diferencias significativas entre las dos concentraciones evaluadas ($p > 0,05$) [46].

3.7.3 *Candida albicans*

Un grupo importante de patógenos en la piel son los hongos, entre los cuales predomina la *Candida*, que comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas. Se clasifican como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un desarrollo predominantemente unicelular [47]. El tratamiento de infecciones por *Candida albicans* se enfrenta a una serie de problemas, incluyendo el número limitado de agentes antifúngicos eficaces y su toxicidad, la resistencia que presentan a los antifúngicos usados comúnmente, y la falta de disponibilidad de agentes antifúngicos eficaces de bajo costo [48]. Con el fin de resolver la disminución de medicamentos necesarios para tratar la candidiasis, se busca el empleo de la medicina tradicional, derivada de plantas, que permita el uso de agentes de origen vegetal nuevos y activos contra *Candida albicans* [49], caracterizadas porque se obtienen a partir de fuentes renovables en la naturaleza, a diferencia de las drogas sintéticas que se

obtienen a partir de fuentes no renovables de materias primas básicas, tales como fósiles y productos petroquímicos [50].

Erturk en 2006, estudió el efecto de extractos etanólicos de varias plantas, entre ellas de *Mentha piperita* recolectadas en Turquía, frente a la *Candida albicans*, encontrando una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 5 mg/mL y un halo inhibitorio de 20 mm, que muestra una alta actividad antifúngica con respecto a extractos obtenidos de *Rhus coriaria*, *Dianthus coryophyllum* y *Piper nigrum*, a la misma concentración [51].

3.7.4 *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria anaerobia facultativa gram-positiva, productora de coagulasa y catalasa, que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo. Puede producir enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y mucosas relativamente benignas (tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis), hasta enfermedades de riesgo vital (como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía). El reto de las cepas de *Staphylococcus aureus* sobre la salud, es la resistencia que puede presentar a múltiples antibióticos, sobre todo a la meticilina, por lo cual es necesario encontrar productos de fuentes naturales que permitan el control de este tipo de bacterias.

3.7.5 *Escherichia coli*

Es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, que coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y es considerado un microorganismo de flora normal, que puede ser patógeno y causar daño, con diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea [52].

Los seres humanos pueden contraer la infección mediante el consumo de alimentos y agua directamente contaminados con heces o como consecuencia de la contaminación cruzada con otras fuentes alimentarias, durante el crecimiento, la cosecha y poscosecha (hortalizas), la recolección (leche) o el sacrificio de animales y el faenado de la canal (carne), el transporte, la elaboración, la preparación y por el contacto humano directo durante la preparación de los alimentos [53].

Estudios realizados por Moosavy y Shavisi en 2013, determinaron el efecto antimicrobiano del aceite de *Mentha spicata*, (recolectada en Kashan-Iran), sobre *Escherichia coli*, variando parámetros como pH, temperatura y concentración de NaCl, encontrando que se favorecía la sensibilidad de la bacteria a una temperatura de 14 °C, un pH de 7 y una concentración de 4 g/100mL de NaCl [46].

3.8. Actividad plaguicida de los géneros *Mentha* y *Minthostachys*

En la literatura se ha reportado extensamente la actividad insecticida y plaguicida de extractos naturales obtenidos a partir de plantas aromáticas [40][15][22][48][51], por ello, son considerados como alternativas viables para el control de diferentes insectos que causan enfermedades y deterioran los alimentos. Esta actividad se ha atribuido a sustancias biosintetizadas por las plantas, que les permite defenderse de estímulos ambientales, como es el caso de insectos depredadores. En general, estos compuestos químicos son de naturaleza lipófila, lo que les permite penetrar membranas celulares e interrumpir funciones metabólicas, bioquímicas y fisiológicas [1].

Para estudiar estas actividades, se han utilizado diferentes ensayos, que buscan cuantificar la dosis o la cantidad de extracto que puede reducir, por ejemplo, en un cincuenta por ciento, la población de un insecto en un tiempo determinado.

La concentración letal media (CL₅₀), se ha utilizado ampliamente en el estudio de la actividad plaguicida de extractos, suministrados por aplicación tópica, por aspersión y por vía respiratoria (aérea). Kedia y colaboradores en 2014, estudiaron el aceite esencial de *Mentha spicata*, contra la plaga *Callosobruchus chinensis*, que afecta a las legumbres durante su almacenamiento, evaluaron su efecto por fumigación y determinaron una concentración letal media (CL₅₀) de 0,003 µL/mL_{aire}, adicionalmente, encontraron que el aceite tenía efecto fitotóxico sobre todas las etapas de su desarrollo [15].

3.8.1. *Tecia solanivora*, Povolny. “Polilla Guatemalteca”

La *Tecia solanivora* es la plaga principal que afecta en nuestro país, al cultivo y almacenamiento del tubérculo producido por la *Solanum tuberosum* L., conocida tradicionalmente como “papa”. Este insecto, pertenece a las polillas de la familia de las Gelichiidae del orden de los Lepidópteros. Su ciclo de vida varía de 42-95 días, dependiendo principalmente de la temperatura del ambiente; sufre metamorfosis completa (holometábolo), en el cual se distinguen cuatro estadíos principales de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto; las condiciones del ambiente, determinan la duración de cada uno de los estados [54].

Desde 1956, existen reportes de esta plaga en Centroamérica, cuando comenzaron a realizar daños en Guatemala; más tarde se encontró en Panamá y fue reportada en nuestro país en 1985 en el departamento de Norte de Santander [54].

Actualmente, para controlar a esta plaga, se emplean insecticidas sintéticos, con los cuales se suelen realizar de 12 a 24 aplicaciones por cultivo, lo que hace que en Colombia, el cultivo de papa sea considerado como el de mayor demanda de plaguicidas químicos.

Dentro de las estrategias de control biológico, se ha hecho énfasis en el uso de Baculovirus, como el estudio realizado por Espinel-Correal y colaboradores en 2010, que obtuvieron dos aislamientos de Baculovirus que denominaron VG0001 y GV005 como los más promisorios para el control de esta plaga [55]. También se han empleado feromonas, en trampas en las cuales se impregnan pequeños cauchos con esta sustancia y que posteriormente se colocan en el interior de recipientes plásticos, que contienen una mezcla de agua y jabón; esto permite atraer a los machos y estimar qué tan grande es la población de este insecto en el cultivo, permitiendo al agricultor estimar cuándo, es necesario fumigar [56].

Debido a que es necesario encontrar tratamientos alternativos más efectivos, asequibles, económicos y amigables con el ambiente para el control de esta plaga, se propone en este trabajo estudiar el efecto de los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys*, sobre la *Tecia solanivora*.

3.9. Actividad antioxidante de los géneros *Mentha* y *Minthostachys*

Las sustancias antioxidantes son capaces de proteger de la oxidación a lípidos y biomoléculas, evitando así que compuestos benignos y comunes en alimentos se transformen en compuestos del tipo mutagénico y carcinogénico. Es por ello que encontrar antioxidantes provenientes de fuentes naturales, se ha convertido en una prioridad en el campo alimenticio. Entre los métodos más utilizados para determinar la actividad antioxidante se tiene el método de la capacidad captadora del radical DPPH y la evaluación del contenido total de polifenoles (CTP), por el método de Folin-Ciocalteu.

3.9.1 Ensayo de capacidad captadora del radical DPPH

Este método fue propuesto por Blois en 1985, en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre 1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), para aceptar un átomo de hidrógeno, proveniente de una molécula de cisteína; la reducción del radical se observa mediante el cambio de color de violeta a amarillo en soluciones alcohólicas, que pueden medirse mediante el uso de un espectrofotómetro. El método ha sido ampliamente utilizado por numerosos autores, que han ido realizando adaptaciones del mismo a la matriz alimentaria de la que quieren obtener información, modificando la concentración del radical, el tiempo de incubación, y la relación radical/muestra, entre otros [57].

Abdelli y colaboradores en 2016, estudiaron la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Mentha pulegium* a diferentes concentraciones, disuelto en metanol proveniente de Bouria-Algeria, empleando Butilhidroxitolueno (BTH) y Vitamina C, como patrones positivos, para comparar dicha actividad. Encontraron un potencial antioxidante significativo, atribuido a sus

componentes de monoterpenos oxigenados de Pulegona y Mentol, pero menor actividad que la encontrada para los patrones positivos [58].

Stagos y colaboradores en 2012, analizaron 24 extractos preparados de diferentes especies de la familia Lamiaceae; midieron la actividad antioxidante utilizando el método de capacidad captadora del radical DPPH, encontrando una mayor actividad antioxidante en el extracto etanólico de la especie *Mentha microphylla*, comparado con el extracto acuoso (29 y 22 µg/mL DPPH), respectivamente [59].

3.9.2 Método de Folin-Ciocalteu para determinar el Contenido Total de Polifenoles (CTP).

El método Folin-Ciocalteu, es un método comúnmente utilizado por las industrias alimenticias, debido a su simplicidad, disponibilidad comercial de reactivos y por ser un procedimiento ya estandarizado. El ensayo se basa en la capacidad de los compuestos fenólicos y polifenólicos, de reducir un ion de molibdeno, del reactivo de Folin (que es una mezcla de ácido fosfomolibdico y ácido fosfotúngstico), por medio de una reacción de transferencia de electrones, lo cual genera un cambio de coloración de amarillo a azul. El método no es del todo selectivo, ya que el reactivo de Folin reacciona con cualquier sustancia reductora [60]. A pesar de ello, es uno de los métodos más utilizados para la determinación de actividad antioxidante, pues es un método preciso, sensible y que permite la modificación parámetros como el volumen de la muestra a analizar (ensayos a microescala), concentración de reactivos, tiempo de reacción y modo de expresar los resultados, aunque el patrón recomendado es el ácido gálico [60].

Chaquilla y colaboradores en 2005, determinaron el contenido de fenoles totales del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, proveniente de la región Apurímac-Perú, expresándolo en base al contenido de ácido gálico y encontrando que este aceite esencial es una fuente importante de compuestos químicos con actividad antioxidante, atribuible a compuestos fenólicos como el Timol [61].

Por otra parte, Benabdallah y colaboradores en 2016, estudiaron la actividad antioxidante de extractos etanólicos de seis especies de mentas: *Mentha aquatica*, *Mentha arvensis*, *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Mentha rotundifolia* y *Mentha villosa*, del norte de Algeria usando el método del contenido total de polifenoles (CTP). Encontraron que la *Mentha aquatica* presentaba el mayor contenido de compuestos fenólicos, mientras que el menor fue para la *Mentha villosa*. La actividad de estos extractos fue importante, por lo cual concluyeron que tenían un gran potencial para ser utilizados como conservantes alimenticios [62].

4. METODOLOGÍA

4.1. Obtención de extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys*

4.1.1. Descripción de las muestras de trabajo

Se estudiaron seis (6) muestras en total, conformadas por tres especies (*M. spicata*, *M. pulegium* y *M. mollis*), de las cuales dos pertenecen al género *Mentha* (*M. spicata* y *M. pulegium*) y la otra al género *Minthostachys* (*M. mollis*); todas las muestras están relacionadas taxonómicamente ya que pertenecen a la tribu mentheae. Fueron recolectadas en regiones y países diferentes de la siguiente manera: las muestras del género *Mentha* en España y Colombia, mientras que las muestras del género *Minthostachys* originarias de América, fueron recolectadas solo en Colombia, una en la ciudad de Bogotá y la otra en la ciudad de Tunja. Las siglas, con las cuales serán nombradas en el transcurso de este trabajo, las coordenadas y ubicación, se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Muestras de estudio y ubicación geográfica.

NOMBRE COMÚN	ESPECIE	PROCEDENCIA	SIGLA	REGIÓN	COORDENADA	ALTITUD (M.S.N.M.)
Menta	<i>M. spicata</i>	Colombiana	MSC	Los Robles (Popayán)	02° 23' 33,0" O, 76° 39' 25,80" N	1798
	<i>M. spicata</i>	Española	MSE	Zona rural de la comunidad de Madrid	40° 24' 59" N, 3° 42' 09" O	665
	<i>M. pulegium</i>	Colombiana	MPC	Loma larga (Jámbalo) Cauca	76° 20' 23,12" O, 02° 45' 47,22" N	2476
	<i>M. pulegium</i>	Española	MPE	El Espinar (Segovia)	40° 43' 07" N, 04° 14' 52" O	1191
Muña	<i>M. mollis</i>	Colombiana	MMJB	Jardín Botánico José Celestino Mutis, Bogotá	74° 06' 0,29" O, 04° 40' 7,77" N	2557
	<i>M. mollis</i>	Colombiana	MMTJ	Zona rural Tunja (Boyacá)	05° 32' 13,20" O, 73° 22' 44,29" N	3016

Las muestras, recolectadas durante los meses de Agosto-October del 2015, fueron identificadas por el Dr. Ramón Morales, botánico del Real Jardín Botánico de Madrid, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y se guardó un ejemplar en el Herbario CAUP de la Universidad del Cauca, proceso que se encuentra en veeduría, con códigos de colectas #81-85, de Yordy W. Polindara. La determinación de la altitud y las coordenadas de la zona de muestreo; se realizó mediante el empleo de un GPS Garmin 64sc (Olathe, Kansas, USA).

4.1.2 Tratamiento de las muestras

El secado de las muestras se llevó a cabo en un cuarto oscuro de 1,5 x 2 m, acondicionado para mantener una humedad baja y constante como se indica en la figura 9, utilizando un deshumidificador marca Whirpool modelo #AD40DSR1 (Benton Harbor, Michigan, USA). En este proceso, el material vegetal fue seleccionado, separando las hojas sanas de tallos y

raíces; las hojas se secaron sobre papel aluminio, durante tres (3) días y transcurrido este tiempo, las hojas tomaron un aspecto rugoso y una textura crujiente, pero conservaron el color.

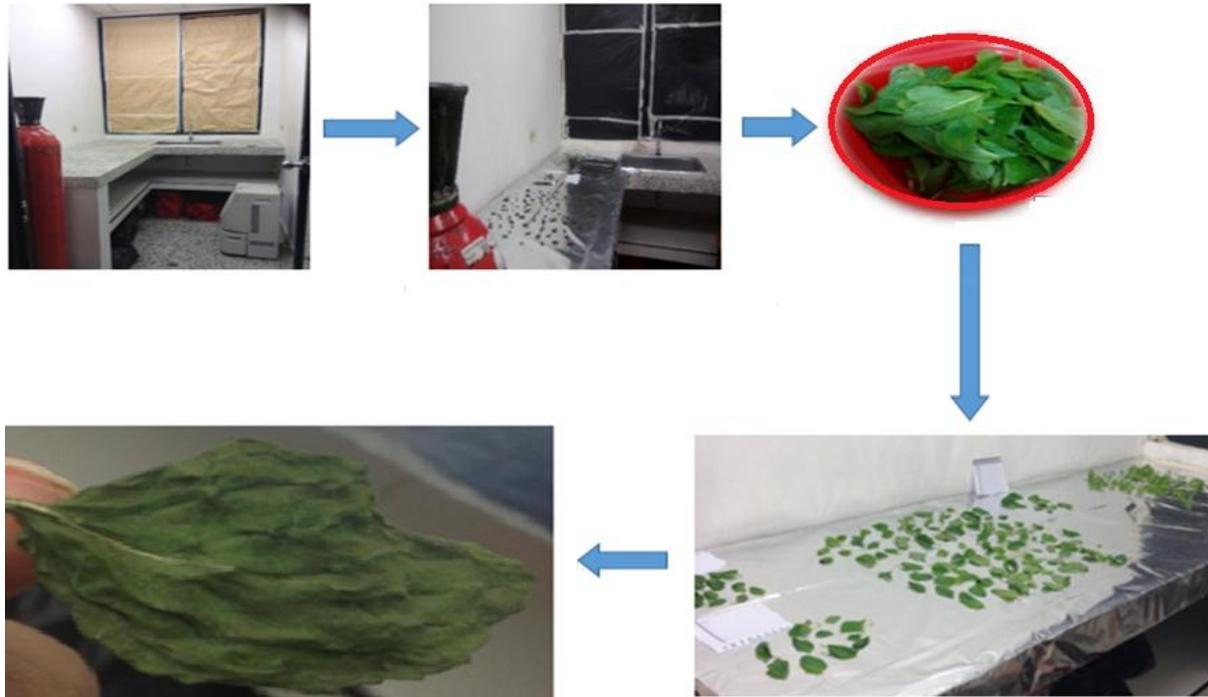


Figura 9. Secado de las muestras de estudio.

El material vegetal seco fue triturado en un molinillo Delhi marca Moulinex (Alençon, Francia) hasta obtener un polvo fino, el cual fue tamizado en un tamiz Advantech No. 35 (Taipei, República de China), de tamaño de malla de 500 μm , como se indica en la figura 10. Las muestras resultantes, fueron transferidas a viales de vidrio debidamente rotulados y se conservaron en un desecador protegido de la luz ambiental.



Figura 10. Tratamiento previo de las muestras.

4.2. Preparación de extractos etanólicos por MAE

En la Figura 11, se ilustra el proceso de obtención de extractos etanólicos por MAE. El método fue previamente optimizado en el CSIC.

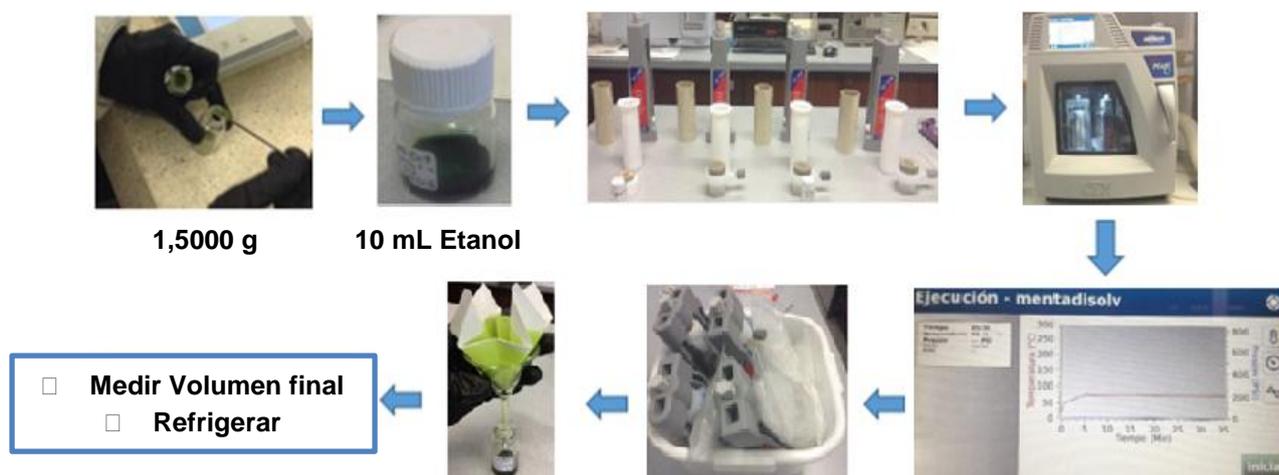


Figura 11. Preparación de extractos etanólicos por MAE.

Los extractos etanólicos de las seis muestras, se prepararon utilizando un equipo de microondas CEM Mars 6 con tecnología one touch (Matthews, Carolina del Norte, USA) y con sonda para control de temperatura. La cantidad de muestra utilizada fue de 1,5000 g (\pm 0,0001) de muestra triturada y tamizada, la cual fue depositada en recipientes de teflón del equipo, junto con 10 mL de etanol. Los recipientes fueron sellados inmediatamente tras agregar el disolvente.

Las condiciones programadas para la extracción fueron: Temperatura inicial: 22 °C; Temperatura final: 100 °C; Tiempo de rampa: 7 min; Tiempo de mantenimiento: 30 min; Potencia: 900 W. Estas condiciones fueron optimizadas previamente por el CSIC.

Una vez transcurrido el tiempo de extracción, los recipientes fueron retirados del microondas y colocados en una bandeja provista de bolsas con hielo durante 5 min; posteriormente fueron transferidos a vasos con hielo por otros 5 min. A continuación se destaparon los recipientes de extracción y su contenido se filtró a gravedad, para separar el material vegetal, del extracto. Los volúmenes se midieron con micro-pipetas y se colocaron en viales de vidrio cubiertos con parafilm y papel aluminio y se refrigeraron para su posterior análisis.

4.3. Determinación del extracto seco (ES) de los extractos etanólicos obtenidos por MAE y del rendimiento de extracción

Para esta determinación, se acondicionaron viales de vidrio, calentándolos a 105 °C en un horno HERAEUS INSTRUMENTS D-6450 Hanau (Hanau, Alemania) por 2 h, para eliminar rastros de humedad y grasa. Posterior al calentamiento se dejaron enfriar en un desecador que contenía sílica activada.

Los viales acondicionados se pesaron en una balanza analítica METTLER TOLEDO SX (Columbus, Ohio, USA); después se agregó en cada vial 300 μ L de extracto etanólico

obtenido por MAE y fueron calentados en el horno a 105 °C por 17 h. Pasado este tiempo, se depositaron en el desecador hasta temperatura ambiente y se registró su peso. A continuación fueron calentados de nuevo en el horno y se realizó el mismo procedimiento durante 20 h, tiempo en el cual se obtuvo un peso constante del extracto seco. El rendimiento se calcula con la ecuación 1 (anexo 1).

4.4. Análisis de la composición química de los extractos etanólicos por CG-EM

La composición química de los extractos etanólicos obtenidos por MAE, fue determinada por la técnica CG-EM, utilizando un cromatógrafo Agilent 5973 (Santa Clara, California, USA), acoplado a un espectrómetro de masas con sistema de ionización por impacto electrónico, con inyección manual. Los procedimientos utilizados se describen a continuación.

4.4.1 Condiciones de trabajo del CG-EM

Para identificar y cuantificar los compuestos químicos presentes en los extractos estudiados, se utilizaron condiciones de trabajo previamente optimizadas y se ajustó la cantidad de muestra a inyectar (4, 3, 2 y 1 µL) eligiéndose como volumen de inyección 1 µL dejando igual volumen de aire antes y después de este. Los componentes mayoritarios se determinaron utilizando Split 50:1 (flujo: 36,5 mL/min) y para los compuestos que se encuentran en menor proporción se utilizó Split 20:1 (flujo: 36,4 mL/min); las condiciones programadas en el equipo se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de trabajo programadas en el CG-EM para el análisis de compuestos volátiles en los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys*.

INYECTOR		COLUMNA		HORNO (RAMPA)	
CONDICIÓN	VALOR	CONDICIÓN	VALOR	CONDICIÓN	VALOR
Gas portador	He	Presión (psi)	4,07	Temperatura inicial (°C)	60
Temperatura (°C)	300	Flujo (mL/min)	0,7	Tiempo a temperatura inicial (min)	0
Presión (psi)	4,07	Columna	ZB-5	Temperatura final (°C)	250
Flujo total (mL/min)	13,4	Longitud (m)	30	Tiempo a temperatura final (min)	60
				Rampa (°C/min)	6

4.4.2 Identificación de los compuestos principales de los extractos etanólicos obtenidos por MAE mediante CG-EM

La identificación de los compuestos presentes en los extractos etanólicos, se realizó mediante la técnica de CG-EM. Los espectros de masa de los compuestos se compararon con las librerías de espectros Wiley 9 (Hoboken, New Jersey, USA), NIST (Gaithersburg, Maryland, USA) y se corroboró con los Índices de Retención (IR) reportados en la literatura.

Para la determinación de estos IR, se inyectó una mezcla de alcanos (C10-C30), en cada una de las condiciones de trabajo utilizadas en el CG (ver tabla 2). Los IR se calcularon con la ecuación 2 (anexo 2)

4.4.3 Cuantificación por CG-EM de los extractos etanólicos obtenidos por MAE

La cuantificación multicomponente se realizó mediante la técnica de estándar interno (EI). Se utilizaron dos EI, por extracto etanólico analizado. Los EI utilizados fueron n-alcenos, que se seleccionaron al superponer los espectros de las muestras con el de una mezcla de alcanos. Se seleccionaron los n-alcenos que no presentaban interferencia con los picos del cromatograma de los extractos analizados. El primer estándar interno (EI₁), se utilizó con el fin de cuantificar los compuestos mayoritarios y el segundo estándar interno (EI₂) para los demás compuestos presentes en menor proporción.

Para ello, se tomaron 475 µL de extracto etanólico, al cual se agregaron 30 µL de EI₁ y 20 µL de EI₂. Los EI utilizados para cada extracto y su concentración se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Estándares utilizados para la cuantificación de los componentes principales de los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys* por CG-EM.

EXTRACTOS	ESTÁNDARES INTERNOS			
	EI ₁	(mg/mL)	EI ₂	(mg/mL)
MSC	C20	1,7000	C18	0,9525
MSE	C20	1,7000	C18	0,9525
MPC	C19	10,7500	C15	1,9225
MPE	C19	10,7500	C15	1,9225
MMJB	C19	10,7500	C15	1,9225
MMTJ	C19	10,7500	C15	1,9225

La cuantificación se realizó utilizando las áreas de los picos cromatográficos obtenidas por integración manual y las ecuaciones 3-6 (Anexo 3). Los resultados fueron analizados con el software TIBCO Spotfire Cloud (Somerville, Massachusetts, USA), mediante análisis multivariante de clasificación (mapa de calor).

4.5. Determinación del contenido de carbohidratos de los extractos etanólicos obtenidos por MAE, mediante CG-EM, empleando la técnica de derivatización por oximación-sililación

Para la determinación de carbohidratos por CG-EM, se realizó una derivatización por oximación-sililación utilizando β-Fenilglucocido como EI.

4.5.1. Derivatización de extractos etanólicos por oximación-sililación

La derivatización se llevó a cabo por una sililación que se describe en la figura 12.

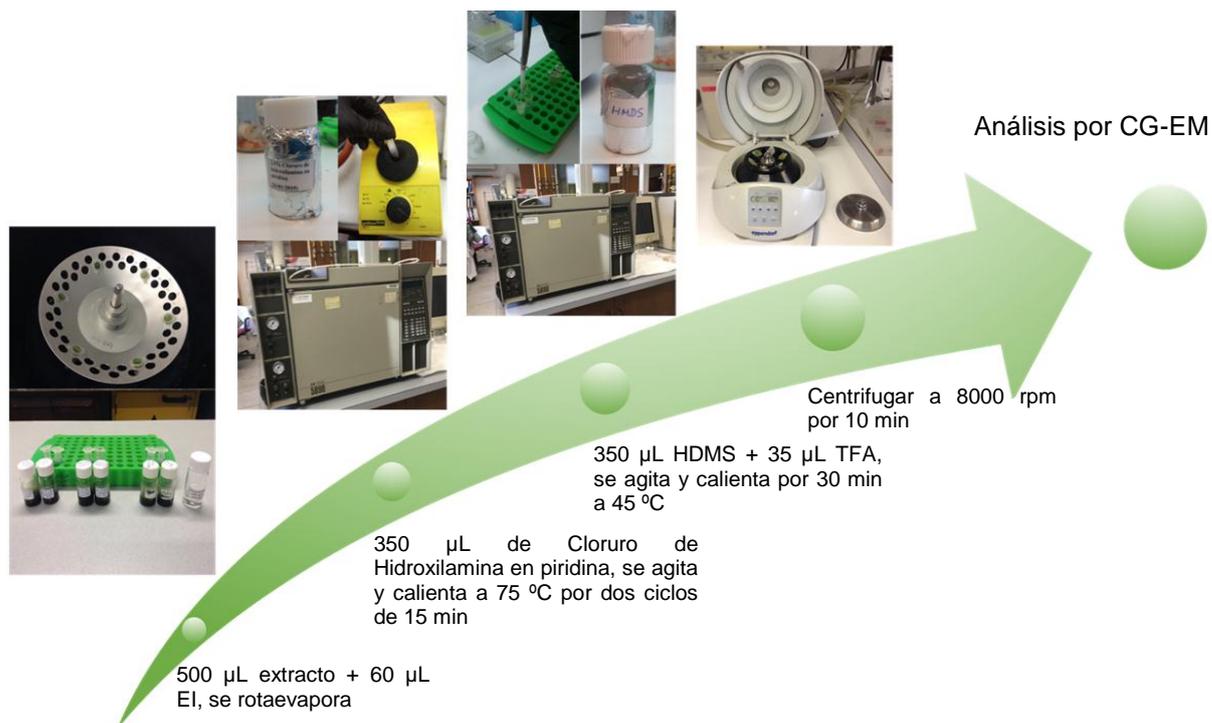


Figura 12. Derivatización de extractos etanólicos

4.5.2. Condiciones de trabajo programadas en el CG-EM, para el análisis de carbohidratos

Para realizar el análisis de los carbohidratos presentes en los extractos etanólicos previamente derivatizados por CG-EM, se utilizaron condiciones previamente optimizadas en el CSIC, similares a las reportadas en la tabla 2.

4.5.3. Identificación y cuantificación de carbohidratos en los extractos derivatizados por CG-EM

La identificación se realizó por comparación con la librería de espectros Wiley y NITS. En este caso se tomó en cuenta que los carbohidratos al derivatizarse se rompen y se elimina el carbono anomérico, por lo que se obtienen monosacáridos y sus respectivos isómeros E y Z. Por este motivo, se cuantifica utilizando las ecuaciones 3-6, pero teniendo en cuenta que las áreas de los dos isómeros se suman. La estadística de los resultados fue calculada con el software IBM SPSS Statistics 23 (Armonk, New York, USA)

4.6. Actividad antioxidante de los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys* obtenidos por MAE

Para determinar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos, se realizaron dos ensayos: el evaluación de capacidad de captación del radical DPPH y el método de Folin-Ciocalteu CTP, cuyos procedimientos se describen a continuación.

4.6.1 Método de capacidad de captación del radical DPPH

Para este método se preparó una solución de DPPH en metanol a $[1 \times 10^{-3} \text{ M}]$; se tomaron de esta 45 μL y se depositaron en posillos de una microplaca. A continuación se agregó 50 μL de extracto o de patrón Trolox, según el caso. Se mantuvieron en la oscuridad por 30 min a 40 °C y se realizó la lectura en un lector de absorbancia UV-vis Biotek ELx800, a una longitud de onda de 540 nm. Los extractos se agregaron en dilución 1:40 en etanol. Con el antioxidante sintético Trolox, se realizó una curva de calibrado en concentraciones de 40, 80, 90, 120 y 130 $\mu\text{g/mL}$. Se incluyeron además blancos para el color (extractos con metanol) y blanco de reacción (solución de DPPH y etanol). Los resultados se reportan en capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC). El procedimiento se realizó por triplicado.

Primero se construyó la curva de Trolox, graficando absorbancia vs concentración. Se realiza la resta de la absorbancia en cada blanco correspondiente. Por medio de la ecuación de la curva, se calcula la concentración equivalente en Trolox de cada muestra medida. Posteriormente se realiza la equivalencia a las unidades correspondientes con la ecuación 7 (Anexo 4).

4.6.2 Determinación por CTP

Esta determinación se realizó utilizando el reactivo de Folin-Ciocateu. Se tomaron 100 μL del reactivo de Folin, de disolvente y de extracto o patrón según el caso. Se agitó en vortex para homogenizar y posteriormente se dejó reposar la solución por 5 min. Luego se agregaron 700 μL de una solución acuosa de carbonato de sodio al 7,5% (m/v). Se agitó suavemente y se incubó en oscuridad por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó por 3 min a 13000 rpm y se pasaron 250 μL de cada solución a los pocillos de la microplaca para leer la absorbancia a 750 nm en un lector de absorbancia UV-vis Biotek ELx800. Con el patrón de ácido gálico (AG), se realizó una curva de calibración a concentraciones de 0,01, 0,02, 0,05, 0,08 y 0,10 mg/mL. Se utilizaron además blancos de muestra, de patrón y cada determinación se realizó por triplicado. Los resultados se reportan en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra.

Para realizar los cálculos se determinó la concentración en Equivalentes de ácido gálico (EAG), por interpolación de las absorbancias de los extractos en la curva de calibración del patrón. Se realizaron las correcciones correspondientes con los blancos de extracto y de patrón. El cálculo se realizó empleando la ecuación 8 (Anexo 5).

4.7. Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos obtenidos por MAE de *Mentha*

Con el fin de evaluar la posible aplicación de los extractos etanólicos obtenidos por MAE como conservantes alimenticios, se determinó la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar, frente a cinco (5) microorganismos patógenos comunes que afectan a los alimentos.

Los organismos analizados fueron: Gram (+): *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*; Gram (-): *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y el organismo fúngico *Candida albicans*. Estos ensayos se realizaron en colaboración del departamento de biología vegetal (botánica) de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Los cultivos se realizaron en cajas de Petri previamente esterilizadas y rotuladas. El medio de cultivo utilizado fue agar tripticasa soya (TSA) a excepción de la *C. albicans* en la cual se utilizó agar de patata y dextrosa (PDA). Los microorganismos se inocularon colocando 100 µL de una disolución 0,5 de estándar McFarland, repartiéndolo con un asa de siembra previamente esterilizada sobre el medio de cultivo. Posteriormente se colocaron discos de papel de 9 mm de diámetro sobre el cultivo y se agregó el extracto puro y concentrado 15 veces. Para facilitar la difusión de los extractos en el medio de cultivo inoculado, se refrigeró por 15 min a 4 °C en una nevera. Luego se incubaron a 37 °C durante 24 h. Finalmente cada cultivo fue revisado y se evaluó la inhibición con base a los discos de papel y sus alrededores, observando si las bacterias habían colonizado o no estas zonas. El efecto se cuantifica midiendo el diámetro en milímetros de la zona de inhibición [63].

4.8. Determinación de la actividad bio-plaguicida de los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys* contra *Tecia solanivora*, Povolny.

La evaluación de la posible actividad insecticida de los extractos de *Mentha* y *Minthostachys* sobre la *T. solanivora*, fue llevada a cabo por medio de los ensayos que se presentan en esta sección, donde se prueba el efecto por aplicación tópica y por exposición en ambiente saturado (vía respiratoria).

Para realizar los ensayos, inicialmente se hicieron muestreos capturando especímenes adultos de *T. solanivora*, en depósitos de “papa” del barrio Bolívar en la ciudad de Popayán. Se determinó que estos especímenes no eran viables debido a la contaminación que sufrían como resultado de procesos de fumigación que se realizan en estos lugares. Por ello los especímenes de *T. solinavora*, fueron recolectados directamente de cultivos de papa situados en zona rural de Totoró (Cauca-Colombia), en el mes de Mayo del 2016 (figura 13).



Figura 13. Colecta de adultos de *T. solanivora* en cultivo de papa.

Previamente se habían determinado que en las condiciones ambientales del laboratorio de investigación BICAMSA de la Universidad del Cauca, los insectos podían reproducirse y completar su desarrollo, manteniéndose en tarrinas de plástico cubiertas con toldillo, alimentándose con melasa (mezcla obtenida por el calentamiento de miel y azúcar) y con un algodón impregnado con agua potable (figura 14). Los insectos se mantenían en un ambiente oscuro recibiendo en promedio 8 h de luz.

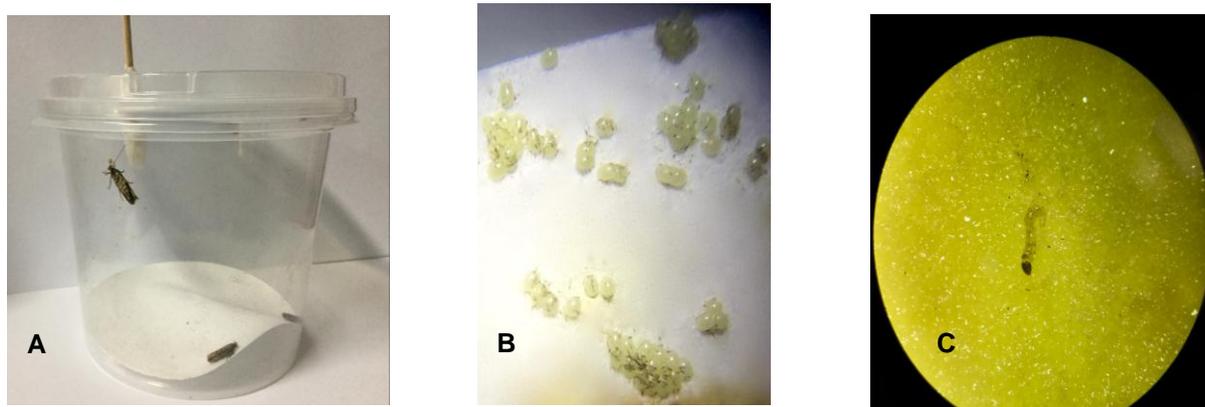


Figura 14. Cría de *T. solanivora* en laboratorio: A) Tarrina para reproducción del insecto; B) Huevos de *T. solanivora* depositados sobre papel filtro, visto desde un estereoscopio; C) Larva de primer instar de *T. solanivora* visto desde un estereoscopio.

Los extractos utilizados en esta determinación, fueron secados en un rotaevaporador a 30 °C por 12 h. Previamente se habían constatado por comparación cualitativa superponiendo TIC del extracto puro y del extracto seco reconstituido en etanol, que este proceso de secado no afectaba la composición volátil del extracto. Para realizar los ensayos se prepararon las soluciones de extracto en una mezcla etanol-agua al 10%, debido a que los extractos no fueron completamente solubles en agua.

Para realizar una comparación con los métodos actuales, utilizados para tratar la *T. solanivora*, se utiliza como control positivo un plaguicida comercializado con registro INVIMA

para combatir esta plaga en Colombia, que tiene como principio activo el acetiltiofosforamidato de O,S-Dimetilo “Acefato”.

Previo a los ensayos, se estableció cuándo considerar a las larvas como muertas. Se encontró que las larvas pierden su actividad motora, su color se oscurece y dependiendo del tiempo, su tamaño se reduce notablemente, presumiblemente por deshidratación.

Las larvas fueron manipuladas utilizando un pincel de pelo de camello y se utilizaron larvas que no excedían las 4 h de recién emergidas de los huevos.

4.8.1. Efecto por aplicación tópica de extractos de *Mentha* y *Minthostachys* obtenidos por MAE contra *T. solanivora*. (Ensayo 1)

Para determinar el efecto de los extractos por vía tópica, se realizó un diseño experimental completamente aleatorio con el fin de encontrar una concentración letal media (LC₅₀) a 24 h. Para ello, se utilizó un total de 120 larvas de primer instar de segunda generación, cultivadas en laboratorio.

Se aplicaron 20 µL de solución a cada larva sobre un papel filtro; 20 s después se transfirieron a recipientes estériles para orina debidamente rotulados y fueron sellados con papel parafilm. El diseño incluyó un control negativo (sin estímulo), un blanco de solvente (etanol al 10%) y un control positivo (solución de plaguicida comercial). Los tratamientos aplicados con el rotulo respectivo y el orden trabajado se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Determinación del efecto a nivel tópico sobre *T. solanivora*. Denominando con; Control (A); Blanco (B); Positivo (C); 5 ppm (D); 50 ppm (E); 1000 ppm (G); 5000 ppm (H)

MUESTRA	CONTROL (A)	BLANCO (B)	POSITIVO (C)	ppm				
				5 (D)	50 (E)	500 (F)	1000 (G)	5000 (H)
MMJB (1)	A11	B11	C11	D11	E11	F11	G11	H11
	A12	B12	C12	D12	E12	F12	G12	H12
	A13	B13	C13	D13	E13	F13	G13	H13
MMTJ (2)	A21	B21	C21	D21	E21	F21	G21	H21
	A22	B22	C22	D22	E22	F22	G22	H22
	A23	B23	C23	D23	E23	F23	G23	H23
MSE (3)	A31	B31	C31	D31	E31	F31	G31	H31
	A32	B32	C32	D32	E32	F32	G32	H32
	A33	B33	C33	D33	E33	F33	G33	H33
MSC (4)	A41	B41	C41	D41	E41	F41	G41	H41
	A42	B42	C42	D42	E42	F42	G42	H42
	A43	B43	C43	D43	E43	F43	G43	H43
MPC (5)	A51	B51	C51	D51	E51	F51	G51	H51
	A52	B52	C52	D52	E52	F52	G52	H52
	A53	B53	C53	D53	E53	F53	G53	H53

El conteo de larvas muertas fue realizado 24 h después de realizado el ensayo. Se registró con un menos (-) las larvas que sobrevivieron al estímulo determinado y con un mas (+) las larvas que murieron. El procedimiento se resume en la figura 15.

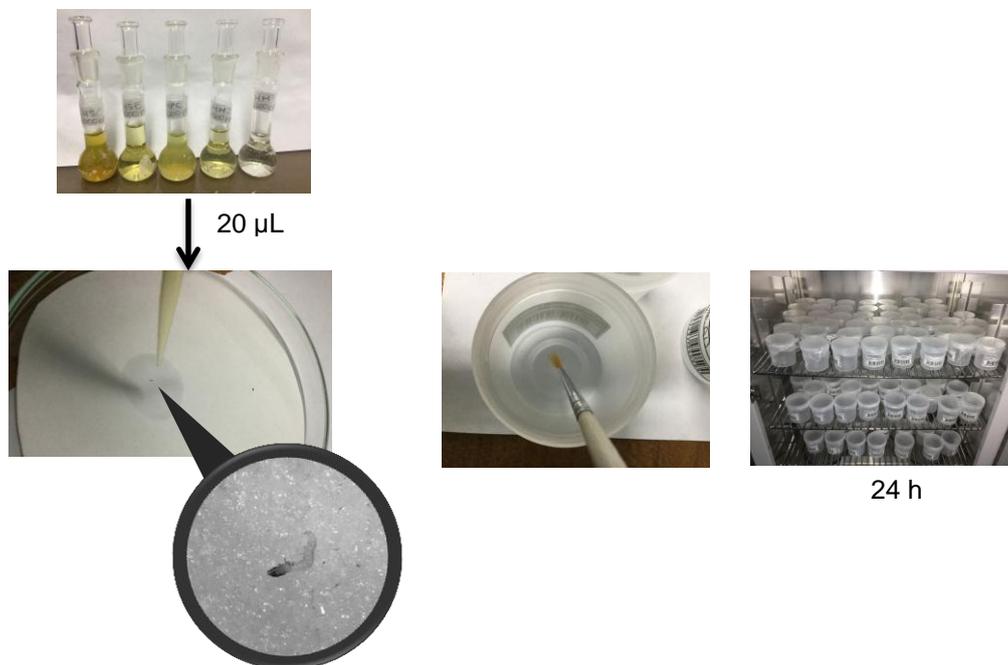


Figura 15. Ensayo para determinar el efecto por aplicación tópica de extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys*.

4.8.2. Efecto sobre la alimentación y el desarrollo biológico de *T. solanivora* por aplicación tópica de los extractos de *Mentha* y *Minthostachys* por MAE (Ensayo 2)

Se evaluó el efecto sobre la alimentación y el desarrollo biológico de larvas de primer instar de *T. solanivora*, por aplicación tópica de los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys*. Para ello se utilizaron 120 larvas de primer instar de tercera generación y se utilizó un modelo experimental aleatorio por bloques que se resume en la tabla 4.

A cada larva se le aplicaron 20 µL de extracto, se dejaron por 20 s en reposo y se colocaron sobre una papa amarilla (*Solanum phureja*) de aproximadamente 3 cm de diámetro, que se encontraba en el interior de un recipiente estéril para orina. En las primeras 24 h, los recipientes de ensayo fueron tapados con parafilm para posteriormente cubrirse con toldillo. Durante el tiempo que duró la prueba, los recipientes de ensayo se guardaron en el interior de una estufa, donde se mantuvieron protegidas de la iluminación ambiental y de otros posibles insectos invasores. Todos los bloques se hicieron el mismo día para garantizar una homogeneidad en las condiciones ambientales. Se revisaron periódicamente y una vez las larvas comenzaron a emerger de las papas, se retiró respectivamente el tubérculo. El ensayo finalizó cuando emergieron los adultos de *T. solanivora*. Cada extracto se utilizó en concentraciones de 5, 50, 500, 1000 y 5000 ppm. El control positivo fue utilizado a

5000 ppm. Se realizaron blancos de solvente y un control negativo al cual no se aplicó tratamiento, el procedimiento se resume en la figura 16.

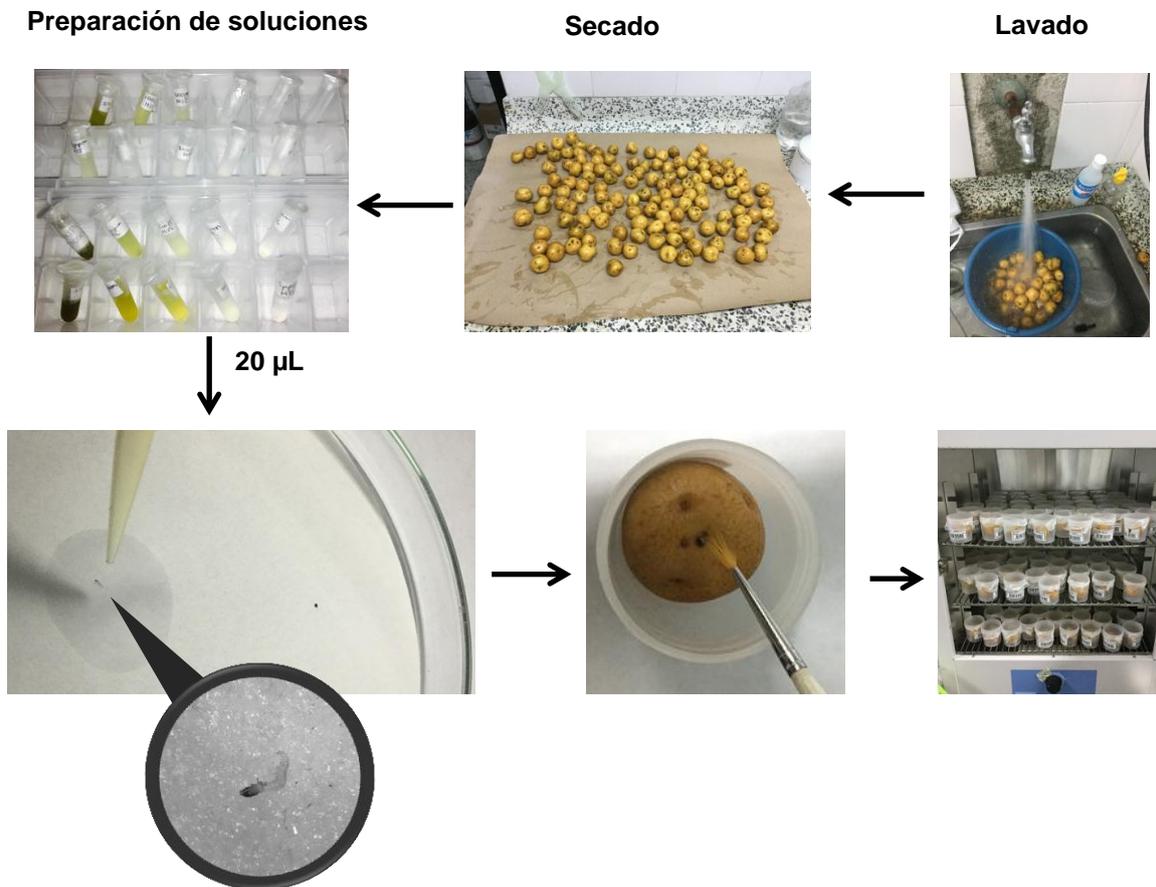


Figura 16. Efecto por aplicación tópica de extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys* sobre la alimentación y desarrollo larval.

4.8.3. Evaluación del efecto por exposición en ambiente saturado sobre *T. solanivora* (Ensayo 3)

Para determinar el efecto por exposición en ambiente saturado (vía respiratorio) de los extractos sobre la *T. solanivora*, se aplicó un diseño experimental aleatorio. Se utilizaron 60 larvas de primer instar de *T. solanivora* de cuarta generación.

En cuadrados de papel filtro de 2 cm de vértice, se colocaron $50 \mu\text{L}$ de extracto. Para evitar interferencias por parte del etanol, se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se transfirieron a recipientes estériles para orina debidamente rotulados; a continuación, cada larva se colocó sobre el papel impregnando y se sellaron herméticamente con papel parafilm. El mismo procedimiento se realizó para el blanco del solvente y para el control positivo (solución de plaguicida). Como control de referencia, se colocaron larvas sobre el papel filtro sin tratamiento alguno. Todos los extractos y el control positivo estaban a 5000 ppm. El conteo de larvas muertas fue realizado a las 24 h.

4.8.4. Evaluación del efecto de la contracción por exposición en ambiente saturado de extractos de *Mentha* y *Mintostachys* por MAE contra *T. solanivora* (Ensayo 4)

Con el fin de corroborar el efecto de la concentración por exposición en un ambiente saturado sobre larvas de primer instar de *T. solanivora*, se realizó un ensayo, comparando el aceite esencial de *M. mollis* (MMJB) obtenido por hidrodestilación utilizando un equipo tipo Clevenger por 3 h, con el extracto etanólico a 5000 ppm y con un extracto saturado de MMJB utilizando el procedimiento descrito en el ensayo 3. Nuevamente el conteo de larvas muertas fue realizado a 24 h y se utilizó un control al cual no se le suministró tratamiento alguno.

4.8.5. Determinación de la concentración Letal Media (CL₅₀) del aceite esencial de *Mintostachys mollis* contra *T. solanivora* (Ensayo 5)

Se determinó la LC₅₀ en ambiente saturado del aceite esencial (AE) de la muestra MMJB, obtenido por hidrodestilación en *T. solanivora*. Para ello, se utilizaron adultos de *T. solanivora* de quinta generación. Se realizó un diseño aleatorio con un total de 77 individuos, a los cuales se les aplicaron siete (7) tratamientos que incluían: un control, blanco de solvente (etanol), concentraciones de 2,2, 5,0, 7,0, 8,0, 10,0, 12,0, 15,0 y 20,0% del AE en etanol; como control negativo se utilizó el plaguicida comercial en su concentración recomendada (3,5 g/250 mL). El ensayo fue realizado a 24 h en un recipiente plástico de 500 cm³ sellado herméticamente; se colocó un individuo por recipiente. Se aplicaron 20 µL de cada tratamiento en discos de papel filtro de 2 cm de diámetro y una vez impregnado el disco, se colocó en el recipiente plástico y se dejó evaporar el solvente, para finalmente colocar el insecto a evaluar.

Los resultados fueron analizados mediante el software Bioestat 5.3 (Amazonas, Brasil).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Obtención de extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys*

En este trabajo por primera vez se reporta el estudio de extractos etanólicos obtenidos por MAE de especies *M. spicata*, *M. pulegium* y *M. mollis*.

Los extractos etanólicos obtenidos por MAE, presentaron un coloración verde y un olor mentolado, el volumen de extracto obtenido se reporta en la tabla 5, el cual varía en función de la adsorción de solvente por parte de la muestra seca. De igual manera se reporta el rendimiento de extracción el cual fue mayor para la muestra MPC.

Tabla 5. Propiedades organolépticas y volumen total de los extractos etanólicos obtenidos por MAE; Volumen de extraco (mL) (\pm s) y Rendimiento de extracción (%) (\pm s).

MUESTRA	VOLUMEN DE EXTRACTO (mL)	RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN (%)
MSC	4,82 (\pm 0,33)	5,73 (\pm 0,19)
MSE	4,36 (\pm 0,26)	4,51 (\pm 0,29)
MPC	5,30 (\pm 0,33)	6,04 (\pm 0,21)
MPE	4,61 (\pm 0,56)	4,75 (\pm 0,34)
MMJB	4,58 (\pm 0,33)	3,64 (\pm 0,10)
MMTJ	6,18 (\pm 0,55)	5,26 (\pm 0,37)

La coloración de los extractos que se puede apreciar en la figura 17 A, varia en intensidad y puede atribuirse presumiblemente a la presencia de clorofilas, que es propio de extractos naturales preparados a partir de hojas [64].

5.2. Determinación del extracto seco (ES) de los extractos etanólicos obtenidos por MAE

Se realizó el proceso de secado durante 20 h; los cambios físicos se observan en la figura 17. El cambio de color se puede atribuir a la degradación las clorofilas, las cuales pierden el ion Mg^{2+} , pasando a feofitina y posteriormente se degradan hasta feoforbidos y clorinas [65].

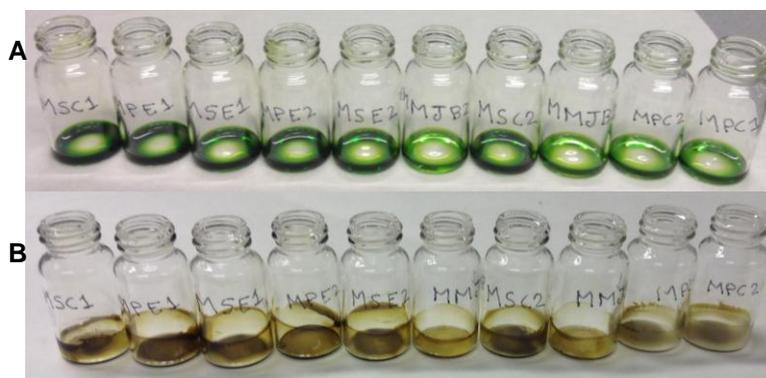
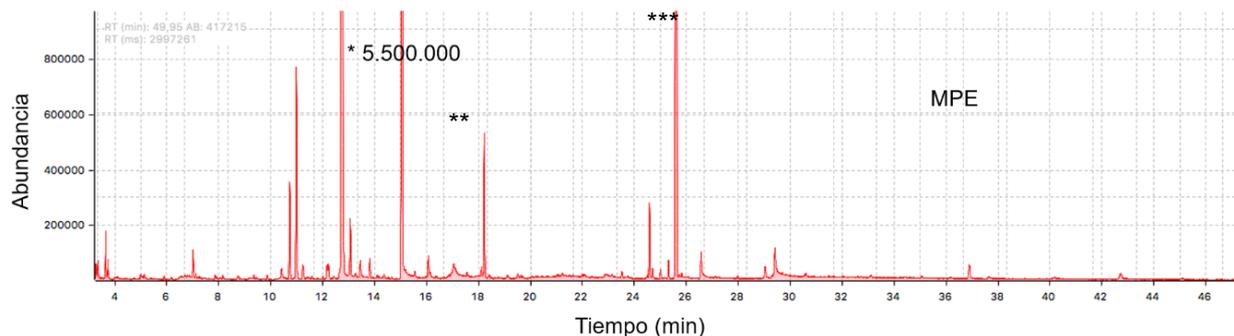
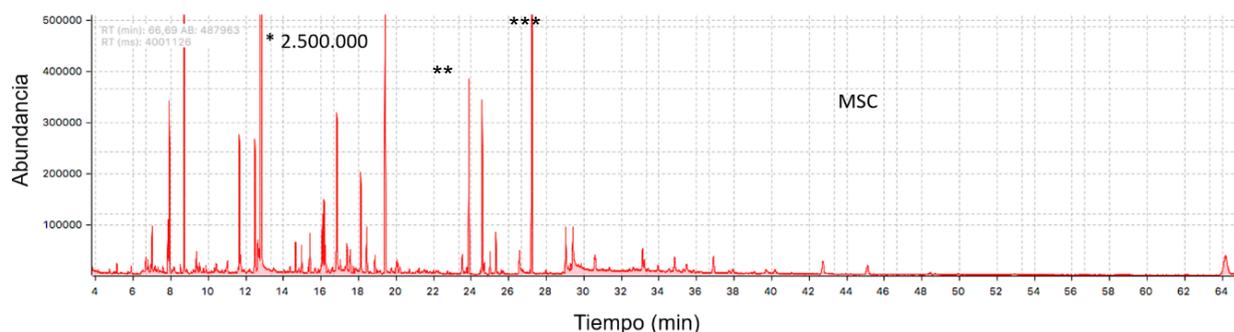
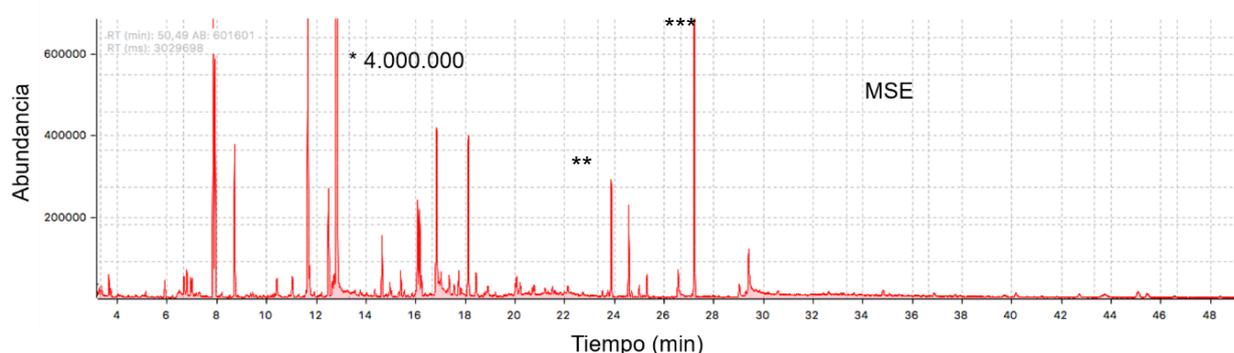


Figura 17. Determinación de ES (%): A). Extractos etanólicos obtenidos por MAE; B). Extracto seco a 20 h

Este proceso se realizó con el fin de poder cuantificar los compuestos químicos presentes en los extractos obtenidos, lo cual permite su dosificación para el estudio posterior de actividad bioplaguicida y para otras futuras aplicaciones.

5.3. Análisis de la composición química de los extractos etanólicos por CG-EM

Los extractos se analizaron en el CG-EM en fase reversa, utilizando las condiciones de trabajo previamente optimizadas (sección 4.4.1.). Se evaluó la resolución y la intensidad de las señales. Se encontró que los espectros tienen en general hasta 50 picos cromatográficos, de los cuales entre uno y tres son de gran intensidad como puede apreciarse en la figura 18.



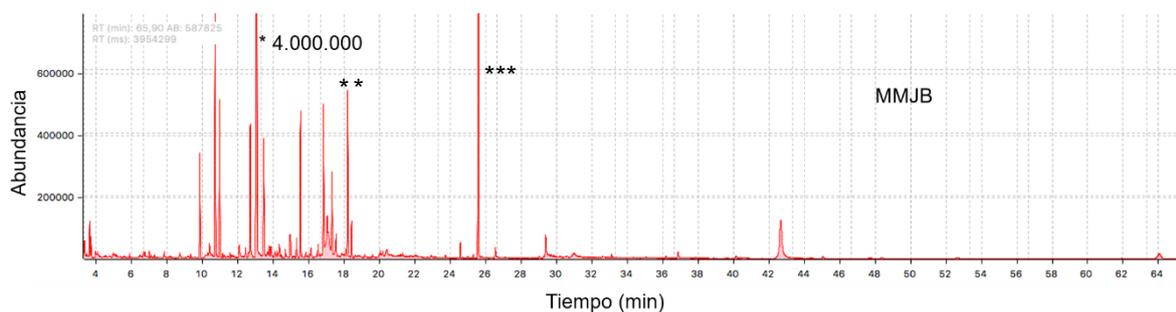
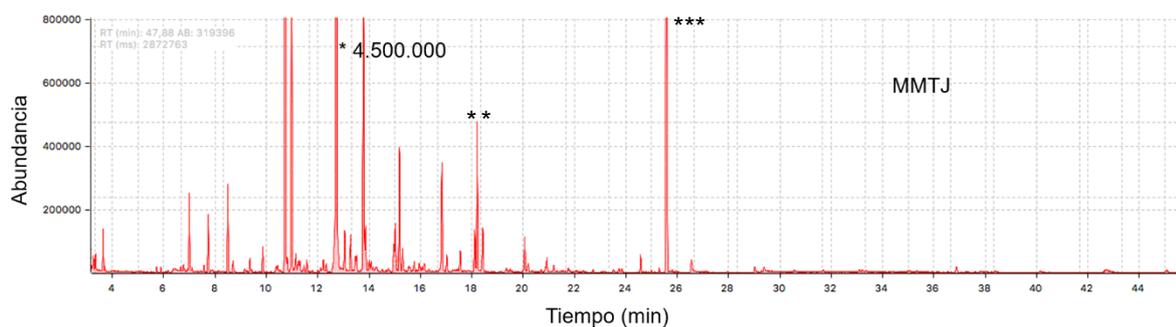
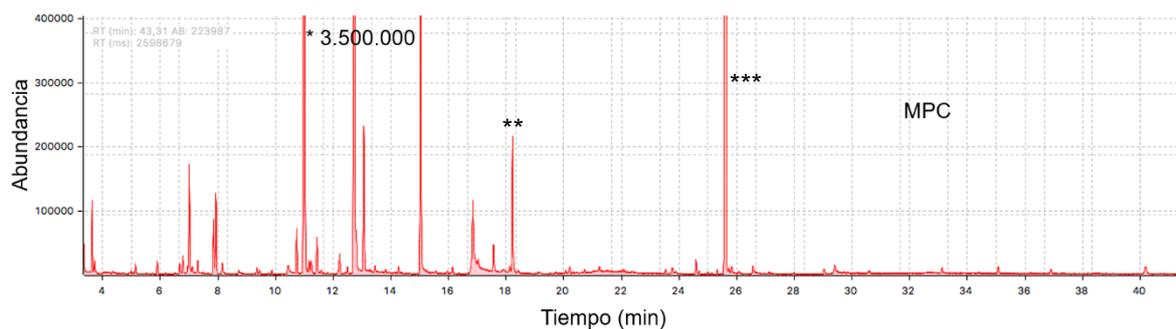


Figura 18. TIC de los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys* con zoom en 1.000.000 de cuentas de los extractos; (*) indica el pico base y su intensidad entre paréntesis; (**) indica el EI₂; (***) indican el EI₁.

5.3.1 Identificación de los compuestos principales de los extractos etanólicos obtenidos por MAE mediante CG-EM

En la figura 19 se muestra el TIC de la mezcla de alcanos de C10-C30.

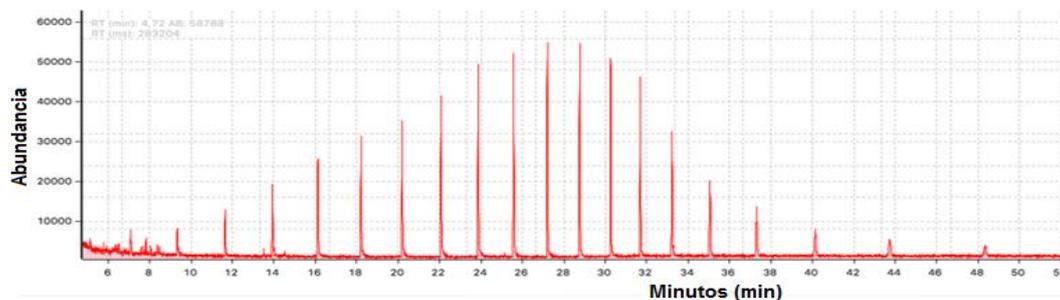


Figura 19. Perfil cromatográfico para la mezcla de alcanos C10-30.

Tanto los compuestos principales o mayoritarios y los presentes en pequeñas cantidades, se pueden apreciar en las tablas (6-11) en la sección 5.3.2; en ellas, se puede ver como los compuestos principales tienen una proporción de hasta un 53% de la fracción volátil del extracto.

La comparación de los espectros obtenidos por CG-EM de los extractos y el respectivo espectro de masas reportado en literatura para los compuestos mayoritarios, se muestran en los anexos 6-11. La comparación con los índices de retención se pueden apreciar en las tablas 6-11.

En los compuestos identificados en las muestras MSE, MSC, MPE, MMJB y MMJ se reporta por primera vez la presunta presencia de vitamina E que es un antioxidante natural, que protegen de la oxidación de especies reactivas de oxígeno, las cuales deterioran las células [66]. Este compuesto fue eluido a un t_R de 64min, se encontró en los extractos MMTJ, MPE, MSE, MMJB y MSC, en un porcentaje de 0,09, 0,17, 0,39, 1,14, 2,82% de la fracción volátil respectivamente, teniendo para el extracto MSC un porcentaje de aproximación del espectro de masas con la base de datos Wiley del 95%.

Dentro de los compuestos principales se detectó Elemol, siendo el compuesto más probable de encontrar en el análisis de la muestra, debido a que uno de los isómeros estructurales, el Hedicariol, presenta un espectro prácticamente igual con un IR muy similar al Elemol, pero se ha reportado en la literatura que el Hedicariol se puede isomerizar a Elemol por calentamiento en el CG-EM (ver figura 20), a una temperatura de 174 °C como reporto Ichiro Hattan y colaboradores en 2016; para los extractos etanólicos analizados, el compuesto eluye en un t_R de 19,424 min y a una temperatura de 177 °C [67].

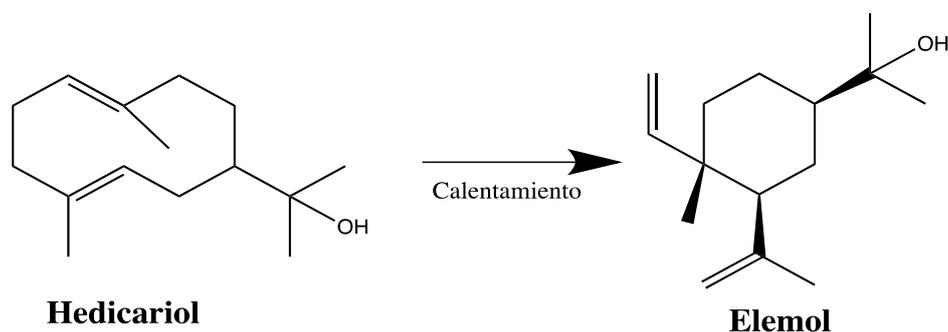


Figura 20. Isomeración del Hedicariol a Elemol inducida por calentamiento en el CG-EM [67].

Los compuestos identificados, son parte de la familia de los monoterpenos, los cuales son biosintetizados por las rutas metabólicas que se muestran en la Anexo 12, en las cuales se puede apreciar como el Isopentildifosfato y el Dimetilalildifosfato forman al Geranildifosfato, este es el precursor para la formación de los monoterpenos y de él se forma el Limoneno,

que es esqueleto estructural para la formación de monoterpenos como el Óxido de Piperitona y Mentona [68].

5.3.2 Cuantificación por CG-EM de los extractos etanólicos obtenidos por MAE

Mediante la técnica de estándar interno, se cuantificaron los compuestos volátiles presentes en los extractos etanólicos obtenidos por MAE. La composición de los extractos fue reportada en base al ES y al material de partida (hojas secas); estas se muestran en las tablas 6-11, junto con su porcentaje de abundancia en el extracto respectivo.

En la muestra MSE se cuantificaron 48 compuestos de los cuales se identificaron tentativamente 44, encontrándose como compuestos principales con base a su proporción en los extractos son; Carvona (47,68%), Limoneno (6,24%) y Dihidrocarveol (5,47%) como se muestra en la tabla 6. En MSC se cuantificaron e identificaron tentativamente 50 compuestos siendo los principales Carvona (33,99%), Elemol (9,47%) y cis-Hidratosabineno (7,14%) reportados en la tabla 7. En MPE se cuantificaron 24 compuestos de estos 23 fueron identificados tentativamente, presentándose Pulegona (54,44%) y Piperitenona (30,75%) como los compuestos principales, como se ve en la tabla 8. Para la MPC se cuantificaron e identificaron tentativamente 26 compuestos de los cuales *p*-Mentona (46,30%) y Pulegona (34,70%) se encontraron en mayor proporción como se muestra en la tabla 9. En MMJB se cuantificaron e identificaron 29 compuestos, siendo Óxido de Piperitona (52,21%) e Isomentona (10,24%) los compuestos principales, reportados en la tabla 10. Por último, en MMTJ se identificaron 38 compuestos, de los cuales se identificaron presuntamente 37, encontrándose, como compuestos principales Pulegona (37,76%) e Isomentona (25,86%), como se observa en la tabla 11.

Tabla 6. Composición química determinada por CG-EM del extracto MSE; Cuantificación en mg/g_{muestra} ± s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g_{ES} ±s; Porcentaje de similitud del espectro de masas con la literatura (%*); n=3

Pico	Nombre del Compuesto	mg/g muestra	%	mg/g ES	%*	IR Calculado	IR Literatura	Referencia
1	2,5-Dimetiltetrahidrofurano	0,0084 (±0,0040)	0,14	0,1752 (±0,0719)	64,7			Luo y Agnew, 2001
2	α-Pineno	0,0173 (±0,0015)	0,29	0,3640 (±0,0056)	91		727	Adams, y col., 2006
3	Sabineno	0,0252 (±0,0059)	0,42	0,5282 (±0,0852)	87		939	da Silva y col., 1999
4	β-Pineno	0,0260 (±0,0004)	0,43	0,5481 (±0,0315)	95		972	Choi, 2003
5	β-Mirceno	0,0167 (±0,0014)	0,28	0,3521 (±0,0039)	72		981	Medina y col., 2005
6	3-Octanol	0,0179 (±0,0023)	0,30	0,3761 (±0,0213)	90		992	Javidnia y col., 2004
7	Limoneno	0,3772 (±0,0563)	6,23	7,9227 (±0,6155)	93	1032,8	1032	Gauvin y col., 2004
8	1,8-Cineol	0,2516 (±0,0178)	4,16	5,2993 (±0,0076)	96	1036,1	1036	Martins y col., 2007
9	γ-Terpineno	0,0025 (±0,0005)	0,04	0,0517 (±0,0063)	76	1062,0	1062	Adams y col., 2006
10	cis-Hidratosabineno	0,1740 (±0,0284)	2,87	3,6532 (±0,3345)	58	1071,3	1070	Varda-Uenlue, 2002
11	Dihidroximaltol	0,0270 (±0,0073)	0,45	0,5657 (±0,1125)	97,6	1145,8	1149	Boylston y Viniyard, 1998
12	α-Terpineol + Endoborneol	0,0339 (±0,0049)	0,56	0,7119 (±0,0514)	--	1172,8	1173, 1171	Gkinis y col., 2003, Angioni y col., 2006
13	Dihidrocarveol	0,3307 (±0,0455)	5,46	6,9488 (±0,4573)	61,4	1199,5	1195 / 995	Gallori, 2001 / Setzer y col., 2006
14	Dihidrocarvona	0,0391 (±0,0068)	0,65	0,8206 (±0,0836)	91	1202,6	1994	Andriamaharavo, 2014
15	trans-Dihidrocarvona	0,0066 (±0,0014)	0,11	0,1374 (±0,0192)	93	1210,9	1200	Leffingwell, 2005
16	Carveol	0,1359 (±0,0213)	2,24	2,8530 (±0,2441)	72	1236,0	1217	Adams y col., 2005
17	Pulegona	0,0272 (±0,0035)	0,45	0,5714 (±0,0329)	64	1246,4	1235	Stashenko y col., 2004
18	Carvona	2,8831 (±0,4238)	47,62	60,5610 (±4,5631)	97	1270,9	1249	Barauskiene y col., 2005
19	Endobornil Acetato	0,0072 (±0,0018)	0,12	0,1516 (±0,0273)	64	1270,9	1288	Zoghbi y col., 1998
20	4-Vivilguaiacol	0,0190 (±0,0114)	0,31	0,3935 (±0,2113)	58,7	1318,6	1317	Steinhaus y Schieberle, 2007
21	trans-Dihidrocarvil Acetato	0,0710 (±0,0093)	1,17	1,4915 (±0,0885)	59	1331,9	1329,8	Andriamaharavo, 2014
22	C15H24	0,0190 (±0,0009)	0,31	0,4012 (±0,0091)	--	1346,4	--	--
23	Piperitenona	0,0071 (±0,0015)	0,12	0,1486 (±0,0205)	--	1349,3	1347	Stashenko y col., 2004
24	Isoeugenol	0,0094 (±0,0043)	0,16	0,1956 (±0,0775)	94	1362,4	1362	Rao y col., 2000
25	Carvilacetato	0,0307 (±0,0043)	0,51	0,6448 (±0,0449)	80	1366,5	1364	Zhao y col., 2009
26	Óxido de Piperitenona	0,0100 (±0,0013)	0,16	0,2096 (±0,0126)	--	1373,2	1369	Vagionas y col., 2007
27	β-Bourboneno	0,1216 (±0,0173)	2,01	2,5556 (±0,1803)	86	1397,4	1397	Cardenal y col., 2006
28	β-Elemeno	0,1011 (±0,0144)	1,67	2,1240 (±0,1494)	97	1401,1	1401	Pellati y col, 2005
29	cis-Jasmono	0,0260 (±0,0052)	0,43	0,5441 (±0,0710)	98	1404,6	1404	Rout y col., 2007
30	trans-Cariofileno	0,2457 (±0,0369)	4,06	5,1604 (±0,4052)	94	1434,0	1434	Mahattanatawee y col.,2005
31	Calareno	0,1333 (±0,0769)	2,20	2,7563 (±1,4210)	43	1442,6	1442	Barauskiene y col.,2003
32	cis-Muurola-4(14),5-dieno	0,0403 (±0,0090)	0,67	0,8447 (±0,1286)	90	1458,3	1459	Maia y col.,2000
33	α-Humuleno	0,0153 (±0,0028)	0,25	0,3208 (±0,0364)	96	1468,0	1468	King y Knight., 1992
34	C15H24	0,0288 (±0,0026)	0,48	0,6057 (±0,0121)	--	1476,7	--	-
35	γ-Cadineno	0,0133 (±0,0015)	0,22	0,2787 (±0,0108)	42	1481,5	1480	Marongiu y col.,2006
36	epi-Biclosesquifelandreno	0,1896 (±0,0253)	3,13	3,9850 (±0,2454)	93	1494,9	1482	Skaltsa, 2003
37	Germacreno B / γ-Elemeno	0,0354 (±0,0068)	0,58	0,7417 (±0,0899)	58/50	1510,6	1516 / 1511	Marongiu y col., 2004 / Cardeal ycol., 2006
38	Espatulenol	0,0251 (±0,0035)	0,42	0,5279 (±0,0365)	70	1593,1	1593	Zourai y col., 2010
39	NI	0,0101 (±0,0011)	0,17	0,2115 (±0,0083)	--	1626,8	--	--
40	NI	0,0123 (±0,0017)	0,20	0,2592 (±0,0166)	--	1630,2	--	--
41	Loliolide	0,0077 (±0,0009)	0,13	0,1626 (±0,0074)	76	1780,2	1784	Andriamaharavo, 2014

42	Neofitadieno	0,1544 (±0,0981)	2,55	3,1852 (±1,8373)	99	1841,0	1840	Kukic y col., 2006
43	Neofitadieno	0,0213 (±0,0140)	0,35	0,4397 (±0,2642)	93	1865,7	1855	Um y col., 1992
44	Neofitadieno	0,0419 (±0,0268)	0,69	0,8649 (±0,5015)	91	1883,9	1881	Kukic y col., 2008
45	Ácido hexadecanoico	0,0668 (±0,0332)	1,10	1,3864 (±0,5987)	98	1960,0	1960	Maia y col., 2000
46	Tetrametil-2-hexadecen-1-ol,	0,0258 (±0,0077)	0,43	0,5392 (±0,1229)	38	2216,8	2148	Saroglou y col., 2006
47	Metilester del ácido 5,8,11 heptadecatrienoico	0,1412 (±0,0507)	2,33	2,9426 (±0,8549)	90	2242,3	2130	Lazar y col., 2000
48	Vitamina E	0,0238 (±0,0014)	0,39	0,5007 (±0,0061)	57	--	--	--

Tabla 7. Composición química determinada por CG-EM del extracto MSC; Cuantificación en mg/g_{muestra} ±s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g_{ES} ±s; Porcentaje de similitud del espectro de masas con la literatura (%*); n=3

Pico	Nombre Compuesto	mg/g muestra	%	mg/g _{ES}	%*	IR Calculado	IR Literatura	Referencia
1	2,5-dimetiltetrahidrofurano	0,0066 (±0,0016)	0,20	0,1086 (±0,0228)	42		727	Luo y Agnew, 2001
2	α-Pineno	0,0059 (±0,0010)	0,18	0,0979 (±0,0123)	91		939	Adams y col., 2006
3	Sabineno	0,0128 (±0,0020)	0,39	0,2116 (±0,0249)	87		972	da Silva y col., 1999
4	β-Pineno	0,0087 (±0,0015)	0,26	0,1434 (±0,0192)	95		981	Choi, 2003
5	β-Mirceno	0,0031 (±0,0007)	0,10	0,0519 (±0,0100)	73		992	Medina y col., 2005
6	3-Octanol	0,0299 (±0,0049)	0,91	0,4929 (±0,0634)	90		995	Javidnia y col., 2004
7	α-Terpineno	0,0043 (±0,0005)	0,13	0,0712 (±0,0050)	70	1020,7	1020	Lopes y col., 2004
8	Limoneno	0,0424 (±0,0083)	1,29	0,6993 (±0,1128)	93	1032,9	1032	Lopes y col., 2004
9	1,8 Cineol	0,1439 (±0,0080)	4,38	2,3758 (±0,3788)	96	1036,2	1036	Novak y col., 2001
10	γ-Terpineno	0,0068 (±0,0005)	0,21	0,1117 (±0,0048)	76	1062,3	1062	Adams., 1965
11	cis-Hidratosabineno	0,2350 (±0,0368)	7,15	3,8813 (±0,4707)	58	1071,3	1071	Pripdeevech y col, 2010
12	Linalool	0,0160 (±0,0024)	0,49	0,2637 (±0,0299)	90	1100,7	1100	Liu y col., 2006
13	Bencenetanol	0,0034 (±0,0008)	0,10	0,0561 (±0,0116)	69	1117,2	1118	Fadel y col., 2006
14	3-Ocatnil acetato	0,0057 (±0,0015)	0,17	0,0945 (±0,0203)	89	1122,3	1122	Cavar y col., 2010
15	1-Propil -2-pirrolidona	0,0032 (±0,0028)	0,10	0,0524 (±0,0048)	64	1142,0	1119	PubChem database
16	Dihidroximaltol	0,0074 (±0,0004)	0,23	0,1228 (±0,0028)	78	1146,1	1149	Boylston y Viniyard, 1998
17	cis-Dihidrocarveol	0,1131 (±0,0033)	3,44	1,8690 (±0,1417)	49	1199,5	1196	Chaverri y col , 2011
18	trans-Dihidrocarvona	0,0124 (±0,0054)	0,38	0,2052 (±0,0335)	93	1202,6	1202	Macchioni y col, 2003
19	Carveol	0,1116 (±0,0048)	3,40	1,8458 (±0,0500)	72	1235,9	1234	Edris y col., 2003
20	Pulegona	0,0058 (±0,0011)	0,18	0,0958 (±0,0166)	64	1246,3	1245	Topu y col., 2005
21	Carvona	1,1156 (±0,0250)	33,95	18,4669 (±0,1338)	97	1250,1	1249	Barauskiene y col., 2005
22	trans-Dihidrocarvil acetato	0,0239 (±0,0015)	0,73	0,3954 (±0,0325)	59	1332,0	1329	Andriamaharavo, 2014
23	Eugenol	0,0045 (±0,0025)	0,14	0,0744 (±0,0036)	61	1362,6	1362	Rao y col., 2000
24	2-Metil-5(1-metiletil)- 2-ciclohexen-1-ol-acetato	0,0315 (±0,0024)	0,96	0,5210 (±0,0362)	87	1366,6	1339	Stashenko y col., 2003
25	β-Bourboneno	0,0400 (±0,0006)	1,22	0,6614 (±0,0656)	96	1397,6	1397	Cardenal y col., 2006
26	β-Elemeno	0,0489 (±0,0103)	1,49	0,8081 (±0,0503)	--	1401,3	1401	Pellati y col, 2005
27	cis-Jasmono	0,0169 (±0,0083)	0,52	0,2803 (±0,0080)	96	1404,9	1404	Rout y col., 2007
28	trans-Cariofileno	0,1554 (±0,0002)	4,73	2,5661 (±0,3229)	98	1434,2	1434	Mahattanatawee y col.,2005
29	Calareno	0,0092 (±0,0030)	0,28	0,1513 (±0,0186)	43	1442,9	1442	Feizbaksh y col., 2003
30	β-Farneseno	0,0234 (±0,0015)	0,71	0,3875 (±0,0284)	58	1459,9	1459	Lopes y col., 2004
31	α-Humuleno	0,0253 (±0,0524)	0,77	0,4175 (±0,0254)	96	1468,3	1468	King y Knight., 1992
32	(Allo)-Aromadendreno	0,0060 (±0,0011)	0,18	0,0997 (±0,0058)	80	1476,3	1476	Tzakou y col., 1997
33	epi-Biciclosesquiphelandreno/Germacrene	0,0876 (±0,0083)	2,67	1,4475 (±0,1192)	93/21	1495,2	1491/1493	Loizzo y col., 2007 / Himanen y col., 2005
34	Elixene/Germacrene	0,0437 (±0,0182)	1,33	0,7214 (±0,1110)	58/40	1510,9	1511/1510	Cardenal y col., 2006 / Vilaseca y col., 2004
35	Germacrene B	0,0161 (±0,0014)	0,49	0,2675 (±0,0134)	55	1533,0	1535	Basta y col., 2006
36	Elemol/Hediciariol	0,3107 (±0,0033)	9,46	5,1446 (±0,1330)	91/90	1560,7	1560/1559	Farsam y col., 2007 / Krauze-Baranowicz y

								col., 2002
37	Isololiolido	0,0187 (±0,0182)	0,57	0,3102 (±0,0362)	53	1780,3	1784	Andriamaharavo, 2014
38	Neofitadieno	0,1485 (±0,0014)	4,52	2,4433 (±0,7803)	99	1841,4	1840	Kucic y col., 2006
39	3,7,11,15-tetrametil-2-Hexadeceno	0,0096 (±0,0033)	0,29	0,1594 (±0,0132)	93	1848,1	1830	Watanabe y col., 2008
40	Neofitadieno isomero II	0,0224 (±0,0079)	0,68	0,3689 (±0,1235)	93	1866,2	1862	Pubchem database
41	Neofitadieno isomero III	0,0419 (±0,0033)	1,27	0,6879 (±0,2775)	46	1884,3	1881	Pubchem data base
42	Ácido hexadecanoico	0,0321 (±0,0079)	0,98	0,5310 (±0,0042)	98	1957,7	1957	Berdague y col., 1991
43	Fitol	0,0365 (±0,0033)	1,11	0,6051 (±0,0769)	91	2217,3	2148	Saroglou y col., 2006
44	Ácido heptatrienoico, metilester	0,0566 (±0,0079)	1,72	0,9357 (±0,0983)	87	2242,9	2106	Rout y col., 2005
45	Neofitadieno	0,0165 (±0,0033)	0,50	0,2737 (±0,0645)	90	2493	--	--
46	Neofitadieno	0,0235 (±0,0012)	0,71	0,3883 (±0,0067)	60	2682	--	--
47	Eugenol	0,0091 (±0,0020)	0,28	0,1496 (±0,0271)		2722	--	--
48	Eugenol	0,0136 (±0,0014)	0,41	0,2252 (±0,0144)		2784	--	--
49	Fitolacetato	0,0273 (±0,0027)	0,83	0,4523 (±0,0609)	44,4	2833	--	--
50	Vitamina E	0,0927 (±0,0112)	2,82	1,5323 (±0,1310)	95	3511	--	--

Tabla 8. Composición química determinada por CG-EM del extracto MPE; Cuantificación en mg/g_{muestra} ±s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g_{ES} ±s; Porcentaje de similitud del espectro de masas con la literatura (%*); n=3

Pico	Nombre Compuesto	mg/g muestra	%	mg/g _{ES}	%	IR Calculado	IR Literatura	Referencia
1	α-Pineno	0,0051 (±0,0003)	0,07	0,0886 (±0,0048)	87		939	Adams y col., 2006
2	β-Pineno	0,0036 (±0,0005)	0,05	0,0636 (±0,0086)	90		981	Choi, 2003
3	3-Octanol	0,0412 (±0,0023)	0,56	0,7184 (±0,0401)	77,8		999	Javidnia y col., 2004
4	Limoneno	0,0133 (±0,0023)	0,18	0,2317 (±0,0053)	96	1032,8	1032	Gauvin y col., 2004
5	1,8-Cineol	0,0100 (±0,0020)	0,13	0,1738 (±0,0342)	82,7	1046,1	1046	Bouzouita y col., 2003
6	Bencenacetaldhido	0,0106 (±0,0008)	0,14	0,1845 (±0,0133)	91	1073,1	1072	Aaslyng y col., 1998
7	Undecano	0,0068 (±0,0010)	0,09	0,1189 (±0,0167)	91	1100,1	1100	Holldobler, 2004
8	3-Octanilacetato	0,0061 (±0,0001)	0,08	0,1071 (±0,0016)	81,9	1122,3	1122	Cavar y col., 2010
9	6-metil-2,2-dihidro-3,5-dihidroxi- 4H-piran-4-ona	0,0244 (±0,0019)	0,33	0,4265 (±0,0327)	97,6	1146,1	1149	Boylston y Viniyard, 1998
10	Isomentona	0,1663 (±0,0050)	2,25	2,9027 (±0,0880)	98	1159,6	1159	Tepe y col., 2005
11	p-Mentona	0,3596 (±0,0108)	4,87	6,2768 (±0,1883)	98	1170,6	1172	Cardenal y col., 2006
12	1,3,4-Trimetil 3-Ciclohexen-4-carboxaldhido,	0,0340 (±0,0017)	0,46	0,5933 (±0,0297)	60	1170,7	1171	Tepe y col., 2005
13	α-Terpineol	0,0049 (±0,0002)	0,07	0,0862 (±0,0039)	78	1181,3	1181	Usubillaga y col., 2001
14	Pulegona	4,0240 (±0,0531)	54,44	70,2365 (±0,9260)	97	1224,5	1224	Basta y col., 2007
15	Piperitenona	0,0998 (±0,0026)	1,35	1,7419 (±0,0452)	96	1246,3	1248	Bozin y col., 2006
16	Isopiperitenona	0,0339 (±0,0008)	0,46	0,5912 (±0,0141)	88	1261,3	1266	Alma y col., 2004
17	Piperitenona	2,2726 (±0,0780)	30,75	39,6657 (±1,3619)	90	1294,3	1297	Sardashti y col., 2013
18	epi-Biciclosesquifelandreno/ Germacreno D	0,0197 (±0,0001)	0,27	0,3440 (±0,0009)	55/48	1495,2	1498 / 1490	Cardenal y col., 2006 / Mumm y col., 2004
19	Neofitadieno	0,0986 (±0,0375)	1,33	1,7216 (±0,6537)	99	1841,6	1842	Povolo y col., 2006
20	Neofitadieno	0,0273 (±0,0038)	0,37	0,4760 (±0,0661)	86	1884,6	1881	Pubchem data base
21	Ácido hexadecanoico	0,0625 (±0,0061)	0,85	1,0903 (±0,1057)	98	1960,5	1960	Maia y col., 2000
22	Neofitadieno	0,0349 (±0,0086)	0,47	0,6094 (±0,1505)	83	2682	--	--
23	Mezcla	0,0199 (±0,0070)	0,27	0,3468 (±0,1230)	--	2733	--	--
24	Vitamina E	0,0125 (±0,0040)	0,17	0,2180 (±0,0706)	53	--	--	--

Tabla 9. Composición química determinada por CG-EM del extracto MPC; Cuantificación en mg/g_{muestra} ±s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g_{ES} ±s; Porcentaje de similitud del espectro de masas con la literatura (%*); n=3

Pico	Nombre del Compuesto	mg/g _{muestra}	%	mg/g _{ES}	%*	IR Calculado	IR Literatura	Referencia
1	2,5-Dietiltetrahydrofurano	0,0052 (±0,0009)	0,15	0,1153 (±0,0277)	65		901	Su y col., 2009
2	α-Pineno	0,0081 (±0,0009)	0,24	0,1802 (±0,0318)	91		939	Adams y col., 2006
3	Sabineno	0,0060 (±0,0010)	0,18	0,1346 (±0,0316)	97		972	da Silva y col., 1999
4	β-Pineno	0,0104 (±0,0012)	0,31	0,2327 (±0,0408)	90		981	Choi, 2003
5	β-Mirceno	0,0036 (±0,0000)	0,11	0,0801 (±0,0055)	56		912	Medina y col., 2005
6	3-Octanol	0,0548 (±0,0063)	1,62	1,2216 (±0,2171)	83		999	Javidnia y col., 2004
7	Limoneno	0,0294 (±0,0035)	0,87	0,6545 (±0,1197)	94	1032,9	1032	Gauvin y col., 2004
8	1,8-Cineol	0,0432 (±0,0056)	1,28	0,9625 (±0,1850)	97	1036,3	1036	Novak y col., 2001
9	Bencenacetaldhido	0,0070 (±0,0002)	0,21	0,1552 (±0,0054)	91	1046,3	1046	Pino y col., 2004
10	Hidratosabineno (<i>trans/cis</i>)	0,0018 (±0,0001)	0,05	0,0390 (±0,0050)	32/25	1071,4	1071	Southwell, 2002 /Pripdeevch y col., 2010
11	Undecano	0,0039 (±0,0014)	0,12	0,0879 (±0,0366)	74	1100,2	1100	Holldobler, 2004
12	Dihroximaltol	0,0077 (±0,0009)	0,23	0,1713 (±0,0084)	98	1146,6	1149	Boylston y Viniyard, 1998
13	Isomentona	0,0250 (±0,0007)	0,74	0,5562 (±0,0511)	95	1159,8	1159	Tepe y col., 2005
14	p-Mentona	1,5667 (±0,1915)	46,30	34,9105 (±6,4766)	98	1170,7	1172	Cardenal y col., 2006
15	Mentol (isómero)	0,0081 (±0,0006)	0,24	0,1801 (±0,0252)	52	1178,0	1178	Zhao y col., 2009
16	(-)-Mentol	0,0227 (±0,0014)	0,67	0,5050 (±0,0642)	91	1190,1	1191	Singh y col., 2005
17	Pulegona	1,1744 (±0,1147)	34,70	26,1485 (±4,2146)	95	1246,3	1245	Topcu y col., 2005
19	Carvona	0,0221 (±0,0008)	0,65	0,4921 (±0,0496)	50	1249,4	1249	Baranauskiene y col., 2005
20	Piperitona	0,0846 (±0,0078)	2,50	1,8835 (±0,2935)	94	1261,2	1262	Avatoy col., 2004
21	Isopiperitenona	0,0042 (±0,0004)	0,12	0,0935 (±0,0146)	82	1277,6	1272	Vagionas y col., 2007
22	Terpinoleno / Canfeno	0,0041 (±0,0004)	0,12	0,0904 (±0,0156)	--	1314,4	1089 / 1097	Adams y col., 2005 / Chung, 1993
23	5-Isopropenil-2,3-dimetil-2-ciclopenten-1-ona	0,1724 (±0,0084)	5,09	3,8325 (±0,4316)	--	1349,6	-	-
24	<i>trans</i> -Cariofileno	0,0969 (±0,0181)	2,86	2,1643 (±0,5397)	91	1434,4	1431	Baranauskiene y col., 2003
25	α-Humuleno	0,0173 (±0,0013)	0,51	0,3860 (±0,0527)	96	1468,8	1460	Baranauskiene y col., 2003
26	Germacreno D/α-Muuroleno	0,0042 (±0,0002)	0,12	0,0925 (±0,0007)	40/32	1495,0	1492/1495	Vazques y col., 2011/Blazquez y col., 2003

Tabla 10. Composición química determinada por CG-EM del extracto MMJB; Cuantificación en mg/g_{muestra} ±s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g_{ES} ±s; Porcentaje de similitud del espectro de masas con la literatura (%*); n=3

Pico	Nombre del Compuesto	mg/g _{muestra}	%	mg/g _{ES}	%*	IR Calculado	IR Literatura	Referencia
1	α -Pinoeno	0,0057 (\pm 0,0008)	0,15	0,1078 (\pm 0,0079)	91		939	Adams y col., 2006
2	β -Pinoeno	0,0121 (\pm 0,0011)	0,33	0,2307 (\pm 0,0049)	81		981	Choi, 2003
3	3-Octanol	0,0076 (\pm 0,0012)	0,20	0,1433 (\pm 0,0137)	86		995	Javidnia y col., 2004
4	Limoneno	0,0123 (\pm 0,0006)	0,33	0,2337 (\pm 0,0055)	94	1032,62	1032	Lopes y col., 2004
5	Bencenacetaldhido + NI	0,0047 (\pm 0,0007)	0,13	0,0899 (\pm 0,0193)	70	1047,67	1047	Steinhaus y col., 2007
6	3-Octanilacetato	0,1237 (\pm 0,0205)	3,34	2,3438 (\pm 0,2254)	82	1122,15	1122	Carvar y col., 2010
7	Dihidroximaltol	0,0254 (\pm 0,0007)	0,68	0,4826 (\pm 0,0211)	97	1145,51	1149	Boylston y Viniyard, 1998
8	Isomentona	0,3806 (\pm 0,0669)	10,27	7,2064 (\pm 0,7676)	98	1159,54	1159	Tepe y col., 2005
9	<i>p</i> -Mentona + <i>p</i> -Mentol	0,2066 (\pm 0,0368)	5,58	3,9123 (\pm 0,4261)	91	1170,29	1160 / 1171	Vilaseca y col., 2004 / Boix, Victorio y col., 2010
10	Mentol (isómero)	0,0047 (\pm 0,0010)	0,13	0,0893 (\pm 0,0131)	64	1177,63	1173	Pino y col., 2005
11	α -Terpineol	0,0044 (\pm 0,0016)	0,12	0,0825 (\pm 0,0246)	78	1196,33	1196	Nickavar y col., 2002
12	2,3-Dihidrobencofurano	0,0352 (\pm 0,0078)	0,95	0,6754 (\pm 0,1949)	64	1218,47	1219	Miyazawa y col., 2011
13	Pulegona	0,1882 (\pm 0,0369)	5,08	3,5617 (\pm 0,4522)	94	1245,90	1245	Topcu y col., 2005
14	Oxido de Piperitona	1,9323 (\pm 0,1254)	52,16	36,7289 (\pm 0,1805)	94	1260,82	1259	Slavkovska y col., 2005
15	Neomentilacetato	0,1835 (\pm 0,0323)	4,95	3,4741 (\pm 0,3709)	91	1279,25	1278	Singh y col., 2005
16	Timol	0,0167 (\pm 0,0011)	0,45	0,3178 (\pm 0,0008)	81	1292,67	1292	Benkaci-Ali y col., 2007
17	Carano	0,0156 (\pm 0,0015)	0,42	0,2966 (\pm 0,0008)	40	1297,50	--	Udarov y col., 1987
18	Carvacrol	0,0278 (\pm 0,0030)	0,75	0,5320 (\pm 0,0008)	64	1318,68	1314	Sotomayor, 2004
19	Piperitenona	0,0227 (\pm 0,0029)	0,61	0,4299 (\pm 0,0008)	83	1347,85	1347	Agnihotri y col., 2005
20	α -Copaeno	0,0073 (\pm 0,0005)	0,20	0,1386 (\pm 0,0008)	94	1387,12	1387	Cardeal y col., 2006
21	<i>Trans</i> -Cariofileno	0,2044 (\pm 0,0264)	5,52	3,8757 (\pm 0,0008)	95	1433,93	1431	Baranauskiene y col., 2003
22	α -Humuleno	0,0379 (\pm 0,0012)	1,02	0,7213 (\pm 0,0008)	96	1468,28	1468	King y knight, 1992
23	γ -Cadineno, <i>epi</i> -Biclosesquifelandreno	0,0148 (\pm 0,0005)	0,40	0,2810 (\pm 0,0008)	70/91	1494,77	1494 / 1491	Biondi y col., 2006 / Loizzo y col., 2007
24	Elixeno / Germacreno, B/D	0,0546 (\pm 0,0074)	1,47	1,0347 (\pm 0,0008)	64/40	1510,69	1511 / 1515	Cardeal y col., 2006 / Guilliard y col., 2001
25	Neofitadieno	0,0084 (\pm 0,0027)	0,23	0,1611 (\pm 0,0008)	58	1884,08	1881	Pubchem database
26	Ácido hexadecanóico	0,0242 (\pm 0,0013)	0,65	0,4619 (\pm 0,0008)	95	1959,30	1959	Jovanovic y col., 2005
27	Ácido esteárico	0,0844 (\pm 0,0004)	2,28	1,6085 (\pm 0,0008)	45	2241,52	2200	Beaulieu y Grimm, 2001
28	Neofitadieno (isómero)	0,0166 (\pm 0,0007)	0,45	0,3161 (\pm 0,0008)	38	2681	--	--
29	Vitamina E	0,0424 (\pm 0,0048)	1,14	0,8048 (\pm 0,0008)	91	--	--	--

Tabla 11. Composición química determinada por CG-EM del extracto MMTJ; Cuantificación en mg/g_{muestra} ±s con Abundancia en %; Cuantificación en mg/g_{ES} ±s; Porcentaje de similitud del espectro de masas con la literatura (%*); n=3

Pico	Nombre Compuesto	mg/g muestra	%	mg/g _{ES}	%*	IR Calculado	IR Literatura	Referencia
1	α -Tujeno	0,0134 (±0,0009)	0,11	0,3673 (±0,0261)	91		933	Wong y col., 2006
2	α -Pineno	0,0108 (±0,0003)	0,09	0,2959 (±0,0087)	91		939	Adams y col., 2006
3	Sabineno	0,0107 (±0,0020)	0,09	0,2938 (±0,0542)	70		972	da Silva y col., 1999
4	β -Pineno	0,0206 (±0,0013)	0,17	0,5661 (±0,0347)	91		981	Choi, 2003
5	3-Octanol	0,1713 (±0,0116)	1,42	4,7071 (±0,3177)	90		992	Javidnia y col., 2004
6	Decano	0,0083 (±0,0004)	0,07	0,2274 (±0,0111)	30		999	Adams y col., 1995
7	α -Terpineno	0,0148 (±0,0012)	0,12	0,4055 (±0,0340)	96	1020,34	1020	Lopes y col., 2004
8	Cimeno	0,1279 (±0,0047)	1,06	3,5139 (±0,1305)	95	1027,73	1027	Oliveira y col., 2006
9	γ -Terpineno	0,1994 (±0,0079)	1,65	5,4783 (±0,2181)	97	1061,82	1060	Zhao y col., 2006
10	Hidratosabineno	0,0319 (±0,0043)	0,26	0,8759 (±0,1177)	93	1070,97	1070	Varda-Uenlue, 2002
11	3-Nonanol	0,0047 (±0,0006)	0,04	0,1283 (±0,0152)	78	1095,43	1099	Usai y col., 2003
12	Linanol	0,0448 (±0,0044)	0,37	1,2310 (±0,1220)	72	1100,52	1100	Liu y col., 2006
13	3-Octanil acetato	0,0583 (±0,0033)	0,48	1,6007 (±0,0913)	72,5	1122,11	1122	Cavar y col., 2010
14	Isomentona	3,0572 (±0,0090)	25,30	83,9957 (±0,2479)	98	1159,63	1159	Tepe y col., 2005
15	Isopulegol	0,0363 (±0,0019)	0,30	0,9964 (±0,0517)	64	1163,26	1165	Singh y col., 2005
16	Mentol + <i>p</i> -Mentona (traza)	0,9944 (±0,0362)	8,23	27,3220 (±0,9937)	93/--	1170,42	1171/ 1172	Boix y col., 2010/Cardeal y col., 2006
17	Isomero del Mentol	0,0512 (±0,0016)	0,42	1,4071 (±0,0434)	91	1177,63	1177	Radulovic y col., 2010
18	α -Terpineol	0,0306 (±0,0027)	0,25	0,8420 (±0,0741)	86	1196,20	1196	Nickavar y col., 2002
19	Pulegona	4,4644 (±0,0487)	36,94	122,6594 (±1,3388)	97	1246,29	1245	Topcu y col., 2005
20	Piperitona	0,0999 (±0,0074)	0,83	2,7438 (±0,2024)	95	1260,82	1260	El-Massry y col., 2002
21	NI	0,0879 (±0,0032)	0,73	2,4154 (±0,0874)	--	1270,91	--	--
22	Carano	0,0363 (±0,0060)	0,30	0,9963 (±0,1651)	83	1279,07	--	--
23	Timol	0,7803 (±0,0100)	6,46	21,4395 (±0,2738)	59	1292,98	1292	Benkaci-Ali y col., 2007
24	Carvacrol	0,0245 (±0,0017)	0,20	0,6736 (±0,0460)	93	1303,11	1303	Zaibunnisa y col., 2009
25	Piperitenona	0,1417 (±0,0060)	1,17	3,8942 (±0,1648)	81	1349,27	1349	Andriamaharavo, 2014
26	Timil acetato	0,2908 (±0,0034)	2,41	7,9900 (±0,0928)	94	1356,71	1357	Chorianopoulos y col., 2006
27	Eugenol	0,0589 (±0,0037)	0,49	1,6170 (±0,1007)	98	1362,33	1362	Rao y col., 2000
28	<i>trans</i> -Cariofileno	0,3165 (±0,0163)	2,62	8,6952 (±0,4466)	99	1433,93	1434	Lis-Balchin y col., 2000
29	α -Humuleno/ β -Silineno	0,0515 (±0,0010)	0,43	1,4162 (±0,0281)	96	1468,28	1468	King y knight, 1992
30	γ -Cadineno/ <i>epi</i> -Bicilosquifelandreno	0,1072 (±0,0013)	0,89	2,9459 (±0,0363)	70/93	1495,01	1494 / 1491	Biondi y col., 2006 / Loizzo y col., 2007
31	Germacreno	0,1135 (±0,0009)	0,94	3,1193 (±0,0253)	81	1510,69	1515	Cardeal y col., 2006 / Guilliard y col., 2001
32	<i>p</i> -Terbutilcatecol	0,0185 (±0,0002)	0,15	0,5082 (±0,0050)	78	1557,59	--	--
33	Espatuleno	0,0961 (±0,0007)	0,80	2,6409 (±0,0198)	90	1593,09	1593	Zouari y col., 2010
34	4-Etil-6-metil-2-metoxi fenol	0,0516 (±0,0032)	0,43	1,4178 (±0,0875)	87	1638,71	-	-
35	Neofitadieno	0,0458 (±0,0026)	0,38	1,2571 (±0,0707)	99	1841,08	1837	Robinson, 2006
36	Ácido hexadecanoico	0,0427 (±0,0036)	0,35	1,1733 (±0,0979)	97	1959,61	1959	Jovanovic y col., 2005
37	Neofitadieno	0,0206 (±0,0020)	0,17	0,5652 (±0,0554)	53	2681	--	--
38	Vitamina E	0,0107 (±0,0020)	0,09	0,2949 (±0,0549)	9	--	--	--

5.3.3. Análisis multivariante de clasificación de los extractos etanólicos obtenidos por MAE

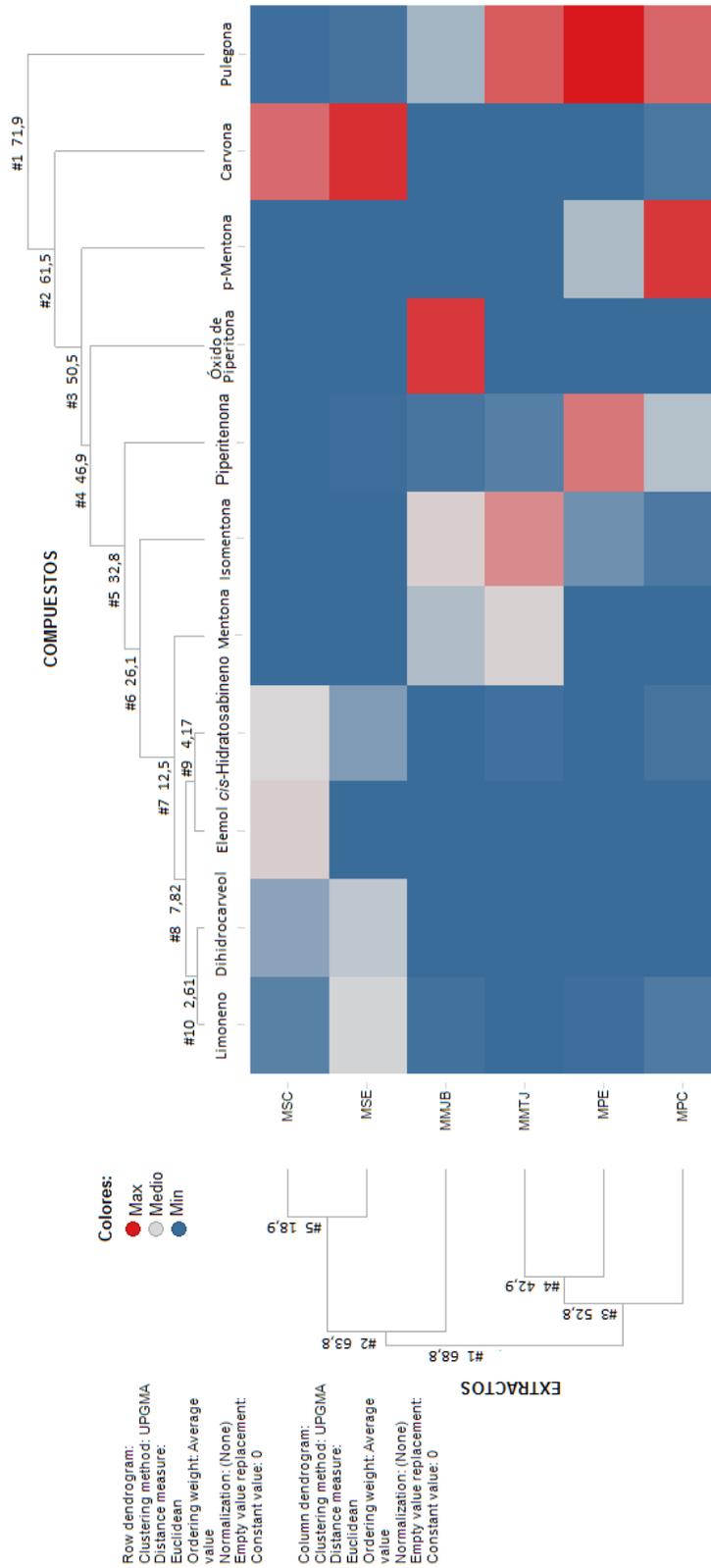


Figura 21. Análisis multivariante de clasificación mediante Mapa de calor de los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys*.

El análisis multivariante de clasificación (mapa de calor), muestra relaciones jerárquicas mediante dendogramas (ver figura 21) que permiten agrupar tanto los compuestos mayoritarios como los extractos según su semejanzas.

El análisis muestra como los extractos se clasifican en cuatro grupos, de los cuales los extractos MSE y MSC están en el mismo grupo unidos en el nodo 5 del dendograma izquierdo del mapa de calor, siendo las muestras que más semejanzas tienen entre sí con respecto a los demás extractos, lo cual se demuestra al tener una menor distancia euclidiana (18,9). Estos extractos son ricos en Carvona (33,95-47,62%) que es un monoterpene oxigenado quiral caracterizado por sus propiedades aromatizantes, antibacteriales, antiespasmódicas y carminativas. Tiene aplicaciones como insecticida contra la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, como agente antimicrobiano, genotóxico y en las industrias Alimentaria (saborizante), de perfumería y cosmética [34]. De Carvalho y colaboradores en 2006 reportan que puede inhibir la brotación en la papa (*Solanum tuberosum*), ayudando a preservar y mantener la calidad del producto durante los periodos de almacenamiento y transporte [69]. Priscilla y colaboradores en 2009 estudiaron extractos volátiles de *M. spicata*, obtenidos por extracción con SFC y SX, encontrando que los extractos obtenidos eran ricos en Carvona, la extracción por SX con Etanol y Hexano como solvente, presentaron las mayores cantidades de este compuesto (44,13-41,61%), mientras que en la extracción por SFC utilizando etanol al 15% se encontró un 46,58%, estos resultados son coherentes con lo encontrado en los extractos de estudio analizados en este trabajo [70].

Otro de los compuestos mayoritarios encontrados en estas muestras fue el Limoneno, el cual se emplea como disolvente, humectante y dispersante ya que no se considera tóxico. Este monoterpene cíclico, presenta propiedades antioxidantes, como lo registró Gastaldi y colaboradores en 2016, quienes atribuyen dicha actividad en el aceite esencial de *Solidago chilensis*, al alto contenido de este compuesto [71].

Aggarwal y colaboradores en 2001 determinaron la eficacia de Carvona y Limoneno presentes en la *M. spicata* contra un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas [72].

Adicionalmente se encontró Dihidrocarveol (5,47%) en MSE, este es un terpenoóide que puede presentar actividad antimicrobiana, como lo reporta Reddy y colaboradores en 2015, quienes evaluaron el aceite esencial de fruta de colina *Comiphora caudata* frente a varios microorganismos como *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, entre otros, encontrando una actividad antimicrobiana fuerte, debida al Dihidrocarveol como constituyente mayoritario [73]. Por lo cual

se propuso estudiar en la sección 5.6 la actividad de estos extractos contra diferentes microorganismos.

En MSC se encontró Elemol (9,46%), el cual es un sesquiterpeno, estos compuestos pueden actuar como antibióticos, presentan actividades farmacológicas, citotóxicas, antimicrobianas, antiinflamatorias, entre otras [74]. También se encontró *cis*-Hidratosabineno (7,15%), este es un monoterpeno bicíclico que puede presentar propiedades antioxidantes como las reportadas por Quiroga en 2013, quien evaluó dicho compuesto puro sobre aceite de canola, y semillas de girasol; presentando un efecto protector al deterioro oxidativo [75]. Estos compuestos, junto con la Carvona, hacen parte de la composición principal de MSC, por lo cual se espera que este extracto, presente de igual manera una alta actividad antioxidante, y posiblemente una actividad antimicrobiana.

Almeida y colaboradores en 2009, obtuvieron extractos etanólicos de *M. spicata* por medio de SX y SFC, mediante la primera técnica consiguieron un porcentaje de rendimiento de extracción del 23,33%, el cual es de 4-5 veces mayor que el obtenido por MAE, lo cual se debe en parte al gran volumen de solvente empleado en SX, el cual está en relación 1:30 y los tiempos prolongados de extracción (6 horas para este caso) con calentamiento a temperatura de ebullición. Por medio de la segunda técnica, en un tiempo de 3 horas, obtuvieron un porcentaje de rendimiento de 2,39%, el cual es de 2-3 veces menor que los obtenidos en este trabajo para las muestra MSE y MSC, que fueron de forma correspondiente 4,75 y 6,04% (ver tabla 5. El método utilizado en este trabajo es más eficiente, pues en el mismo tiempo en que se realiza la extracción por SFC y SX se podrían realizar 6 y 12 extracciones de 30 minutos de forma correspondiente empleando MAE [70].

El análisis multivariante agrupa las muestras MMTJ y MPE con el nodo 4, indicando que sus semejanzas son menores que las de las muestras mencionadas anteriormente, pero, superiores que las muestras restantes, con una distancia euclidiana de 42,9. Estas dos muestras contienen cada una dos componentes mayoritarios, teniendo en común un alto contenido en Pulegona (37,76 y 54,44% de forma correspondiente), indicado por el color rojo del mapa de calor.

La Pulegona es un monoterpeno que se caracteriza por presentar actividad insecticida, aunque también presenta actividad antimicrobiana y antioxidante, como reporta Abdelli y colaboradores en 2016, quienes evaluaron la actividad del aceite esencial de *M. pulegium*, cuyo componente principal fue la Pulegona. Obtuvieron buenos resultados al evaluar el poder plaguicida frente a

la *Sitophilus granarius* (por método directo, inhalación e ingestión), actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, *E. coli*, *S. tryphimurium*, entre otros y actividad antioxidante con IC_{50} de $69,60 \pm 1,72 \mu\text{g/mL}$ [58].

La Piperitenona es uno de los compuestos mayoritarios presentes en MPE (30,75%), es un monoterpeno cíclico insaturado cetónico, el cual se ha utilizado como aromatizante y presenta importancia sintética por ser el precursor de la Mentona y el Mentol, que son compuestos ampliamente utilizados en la industria [76]. Adicionalmente Linio y colaboradores en 2012, reportan propiedades antifúngicas e inhibitorias de este compuesto sobre la acetilcolinesterasa [77].

En la muestra MMTJ también se encontró Isomentona (25,30%) como componente principal, se ha reportado actividad antioxidante de este compuesto, en trabajos como el de Derwich y colaboradores en 2011, que estudiaron el aceite esencial de *M. piperita* de la región de Meknes (Morocco), encontrando que posee una alta actividad de eliminación de radicales libres, siendo la Isomentona uno de los constituyentes que contribuyen a dicha actividad [78]. Por lo anteriormente mencionado, se esperaría que el extracto de MMTJ y MPE presenten una buena actividad insecticida y antioxidante.

Arauco en 2010 obtuvo extractos etanólicos de *M. mollis* por SX y SFC ricos en Pulegona, siendo para SX de 10,92% mientras que para SFC de 32,08-42,62%, estos porcentajes fueron similares a los encontrados en la muestra MMTJ. También encontró Mentona en porcentajes de 4,21% para SX y de 3,84-6,96% para SFC, aunque no encontró Isomentona entre los componentes principales, a diferencia de lo reportado en este trabajo. El autor obtuvo un rendimiento de extracción de 3,029% para SFC y 0,6% para SX, siendo inferiores al obtenido en este trabajo por MAE que fue de 5,26% que es casi el doble que SFC y aproximadamente nueve veces superior al reportado para SX [79].

Reis-Vasco y colaboradores en 1999 realizaron extracción por SFC de *M. pulegium*, encontrando contenidos de Pulegona de 78-79%, el cual es alto en comparación al obtenido para MPE, debido a que el sistema SFC suele extraer además de los compuestos volátiles, otros componentes no polares y ceras cuticularas, por ello el sistema se optimizó con el fin de obtener solo los compuestos volátiles realizado una separación fraccionada en el equipo de extracción. El rendimiento de extracción de SFC obtenido por los autores fue de 2,43%, el cual es dos veces menor que el presentado por la técnica empleada en este trabajo. [80].

Según el dendograma del análisis multivariante en el nodo 3, se relacionan las muestras del nodo 4 (MPE y MMTJ) con MPC a una distancia euclidiana de 52,8. Siendo MPC rica en *p*-Mentona (46,30%) y Pulegona (34,70%), representados en el mapa de calor por recuadros de color rojo.

La Mentona es un monoterpeno del cual se ha demostrado sus propiedades antifúngicas, al igual que la Pulegona. Cano en 2007 mostró el efecto directo de estos dos compuestos mayoritarios del aceite esencial de *M. mollis* proveniente del distrito de Huacrapuquio (Perú), mediante el método de difusión en agar, determinando actividad antimicótica, frente a las cepas de: *C. albicans* y por el método de dilución en tubo, la inhibición del crecimiento fúngico de: *Trichophytun tonsurans*, *Trichophytun mentagophytus* y *Microsporun canis* [81]. Por lo tanto se esperaba que MPC, presente actividad antifúngica e insecticida y actividad antioxidante también.

Mata y colaboradores en 2007 estudiaron extractos etanólicos de *M. spicata* (ricos en Carvona) y *M. pulegium* (ricos en Pulegona), donde compararon el potencial antioxidante de estos frente a extractos acuosos de esas mismas plantas, encontrando que el contenido de polifenoles en el extracto etanólico era superior hasta en un 25%. Adicionalmente encontraron que el extracto etanólico presentaba un efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica similar al acuoso de *M. pulegium* y 10 veces mayor que el aceite esencial de la misma. Para *M. spicata* encontraron que el extracto etanólico tenía un efecto 3 veces superior al del extracto acuoso y 15 veces superior al del aceite esencial, siendo la tercera parte de la actividad mostrada por el patrón antioxidante BTH. También se encontró que el extracto etanólico de *M. pulegium* presenta actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa, lo cual hace suponer que estos extractos tienen potencial como antioxidantes naturales y posiblemente en alimentos funcionales [82], por ello en la sección 5.6 se realizó la evaluación de la posible actividad antioxidante de los extractos etanólicos obtenidos en este trabajo por MAE.

Debido a que aunque en el dendograma tanto MPC como MPE se encuentren en un mismo grupo, estas se hallan un poco alejadas entre sí, lo que indica que a pesar de que son muestras de la misma especie, posiblemente estas no presenten una actividad muy similar al momento de evaluarlas.

Por último en el análisis se relacionó a MMJB con las muestras del nodo 5 (MSE, MSC), pero esta semejanza es menor a la de las ya mencionadas con una distancia euclidiana de 63,8. Esta muestra es rica en Óxido de piperitona (52,16%), la cual es un monoterpeno con presunta

actividad repelente, citotóxica, antibacteriana y antifúngica según los estudios de Oumzil y colaboradores en 2002 y de Mohamed y colaboradores en 2008 [83] [84].

A este compuesto se le atribuyó la actividad antimicótica presentada por las fracciones volátiles de *M. mollis*, frente a *C. krusei*, y el efecto citotóxico frente a células de riñón de mono verde africano (Vero ATCC CCL-81), en los estudios realizados a plantas de la familia *Labiatae* por Zapata y colaboradores en 2009 [85].

De igual manera en MMJB se encuentra junto Isomentona de la cual se ha reportado una importante actividad antioxidante como se mencionó anteriormente [78]. Por lo tanto, según su componenets químicos principales, se espera que este extracto presente una buena actividad antioxidante, semejante a la de los extractos MSC y MSE.

Por otra parte en el dendograma superior del mapa de calor (figura 21), se ven agrupaciones y relaciones directas entre los compuestos químicos del Limoneno al cis-Hidratosabineno, indicando semejanzas en las concentraciones de los mismos, la proximidad entre estas muestras se corrobora por sus bajas distancias euclidianas que van de 2,61 en el nodo 10 a 7,82 en el nodo 8. Por otra parte en estos compuestos se pueden apreciar que en el mapa tienen una coloración mayoritariamente azul y algunas coloraciones blancas lo cual indica que los valores de estas son mínimos, comparados con los demás, por ello aparecen agrupados, lo cual indica que no contribuyen a la discriminación o diferenciación entre los extractos, al igual que la mezcla de Mentol-Mentona que se relaciona directamente con los compuestos anteriores a una distancia de euclidiana de 12,5 en el nodo 7. Los compuestos Isomentona y Piperitenona se alejan de los compuestos mencionados anteriormente, ya que en el mapa se pueden observar en tonalidades rojas, lo cual indica que estos si tienen una contribución mayor en la discriminación de las muestras, las distancias euclidianas son respectivamente 26,1 y 32,8 en los nodos 6 y 5. Por último se observa que los compuestos que más contribuyen en la diferenciación de los extractos son los comprendidos desde Óxido de Piperitona hasta Pulegona los cuales presentan los valores máximos representados en el mapa de calor en color rojo, siendo Pulegona el que menos semejanza tiene con los demás compuestos teniendo una distancia euclidiana de 71,9 en el nodo 1.

Debido a las actividades anteriormente mencionadas, atribuidas a los compuestos principales presentes en estos extractos, se propuso estudiar la actividad antioxidante, antimicrobiana y bioplaguicida en las secciones (5.6), (5.7) y (5.8) de forma correspondiente, esperando con ello obtener resultados que permitan asignar posibles aplicaciones a estos extractos.

5.4 Determinación del contenido de carbohidratos en los extractos etanólicos obtenidos por MAE, mediante CG-EM, empleando la técnica de derivatización por oximación-sililación

En los extractos de *Mentha* y *Minthostachys* obtenidos por MAE, se identificaron y cuantificaron los carbohidratos; Fructosa, Glucosa, Mio-inositol y Sacarosa, siendo este último el componente mayoritario. Los resultados se muestran en el gráfico de barras de la figura 22 y los datos se adjuntan en el anexo 13. La metodología utilizada fue una derivatización vía formación de oximas, seguida de una trimetil-sililación, esta metodología fue estudiada por Rodriguez-Sanchez en 2011, quien reportó una derivatización total sobre los grupos hidroxilo de los carbohidratos con porcentajes de recuperación de 91 al 95% [86].

En la literatura no se encontraron datos sobre cuantificación e identificación de carbohidratos en extractos etanólicos de *Mentha* por lo cual se reportan por primera vez, datos sobre este tipo de análisis.

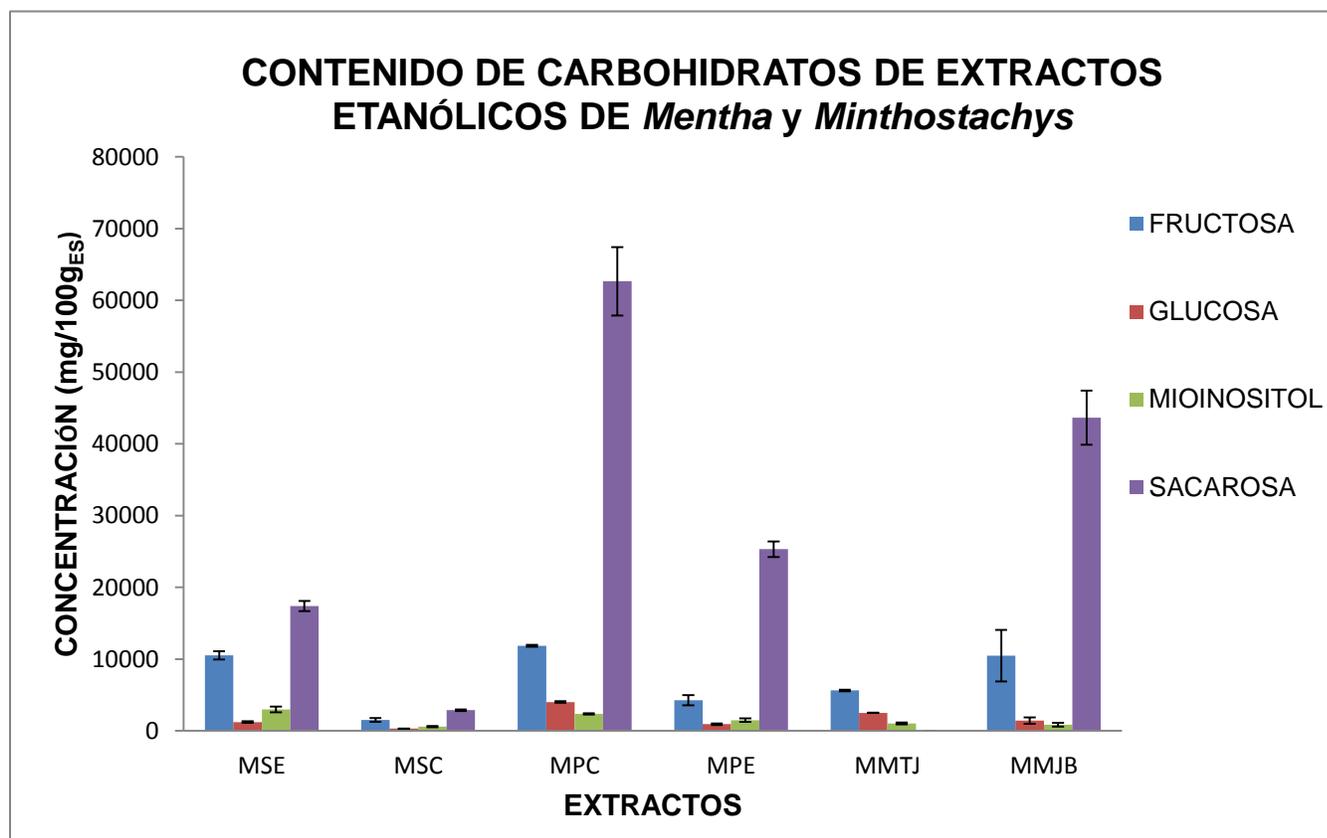


Figura 22. Contenido de carbohidratos de los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys*.

La muestra MPC presenta el mayor contenido de sacarosa (11856,80 mg/100g_{ES}), mientras que en MMTJ, no se encontró este carbohidrato. Estos resultados se corroboran con los reportados por Uribe y colaboradores en 2016, en hojas de *Mentha piperita*, en las cuales encontraron Fructosa (359,37 mg/100g_{ms}), Glucosa (604,85 mg/100g_{ms}) y como carbohidrato predominante la Sacarosa (3051,33 mg/100g_{ms}) [87].

Los carbohidratos son producidos en las plantas por el proceso de fotosíntesis y son utilizados como precursores de metabolitos secundarios, por ello, es coherente encontrarlos en proporciones mayores a las de estos últimos. A pesar de que los carbohidratos tienen una baja solubilidad en etanol, el proceso de disolución se favorece por temperatura (100 °C) y por la asistencia de microondas, como se realizó en este trabajo [88][89].

Por otra parte, se encontró en todas las muestras el compuesto Mio-inositol en proporciones que van de 14489,66 mg/100g_{ES} en MPE a 583,52 mg/100g_{ES} en MSC; en general, los Inositoles se encuentran en alimentos de origen vegetal y se considera al Mio-inositol como un compuesto de importancia para organismos biológicos, pues es el precursor de fosfatidilinositol, del ácido fólico y del ácido ascórbico o vitamina C. Además, participa en la formación de la pared celular, en la transducción de señales y como antioxidante. Estudios recientes lo consideran como un compuesto anticancerígeno, hipolipidémico e incluso como un agente antidiabético. Por ello se cree que el consumo de este, es beneficioso para la salud [90].

El contenido de Mio-inositol de las muestras MSE y MPC expresados en mg por gramos de muestra seca, se reporta en el anexo 14, y corresponden a 1,41 y 1,07, que son comparables al encontrado en cítricos como kiwi y en la variedad de melón “catalupo” (1,36 – 3,55 mg/g_{ms}), que son considerados como relativamente altos (superiores a 1 mg/g); el contenido de la muestra MPE (0,85 mg/g) es moderado, mientras que el de las muestras MSC (0,35 mg/g), MMTJ (0,37 mg/g) y MMJB (0,45 mg/g) se consideran como bajos pues son menores a 0,5 mg/g [89]. Se tiene como factor discriminante que en la *M. spicata* el contenido de Mio-inositol de la muestra española MSE, es mucho mayor que en la muestra colombiana MSC, mientras que esta relación es contraria en las muestras de la *M. pulegium*. Los extractos analizados del género *Minthostachys*, junto con el extracto de *M. spicata* MSC, presentan contenidos de Mio-inositol menores a los encontrados en las demás muestras del género *Mentha*, lo cual se comprueba por las diferencias significativas encontradas (ver anexo 13). Por ello, los extractos MSE y MPC, tendrían un efecto más beneficioso para la salud en base al contenido de Mio-inositol.

Por otra parte en las muestras de *M. mollis* el contenido de carbohidratos fue menor que en las mentas, en la muestra MMTJ no se detectó presencia de sacarosa, lo cual es coherente con lo reportado por Ambuludi y Cepeda en 2015 quienes estudiaron un extracto etanólico de *M. mollis*, encontrando entre los carbohidratos principalmente Fructosa en un 17% glucosa en un 5%, Mio-inositol 0,52% y no se encontró presencia de Sacarosa [91].

Las hojas de *Mentha* y sus aceites han sido estudiados para la formulación de alimentos como en el trabajo realizado por Belščak-Cvitanović en el año 2015, en el cual se estudiaron diferentes formulaciones para la producción de chocolates bajos en azúcar y con perfil bioactivo mejorado, en el cual la formulación que incluía hojas de *Mentha* y *Stevia*, tuvieron los mejores niveles de aceptabilidad en cuanto a la sensación en la boca, dulzura, aroma, contenido alto de polifenoles y capacidad antioxidante. Los extractos estudiados en este trabajo debido a su composición química, tendrían propiedades beneficiosas para este tipo de formulaciones, ya que la muestra MPC y MSE presentan altos contenidos de carbohidratos en especial de sacarosa y fructosa, este último carbohidrato tiene un poder edulcorante mayor que la sacarosa, además presentan en su composición volátil como compuestos predominantes Carvona y Mentona los cuales contribuirían en propiedades de aceptabilidad importantes para los consumidores como es en la dulzura, puestos que se ha observado que la presencia de estos aromas dulces en soluciones que carecen de sabor aumenta este atributo. Por otra parte en estos extractos hay altos contenidos de Mio-inositol que como ya se mencionó aporta propiedades beneficiosas para la salud [92]. De igual forma tendrían aplicación en bebidas nutracéuticas como en la propuesta por Chuquizuta y colaboradores en el año 2014, los cuales utilizaron *Mentha piperita* como aromatizante en una bebida nutracéutica, para lo cual utilizaron su aceite esencial, en este caso los extracto obtenidos en este trabajo presentaría mayores ventajas pues además de aportar al aroma de la bebida presentarían una mayor solubilidad que el aceite esencial y tendrían el potencial de aportar propiedades funcionales como actividad antioxidante y el aporte de Mio-inositol que es un nutriente importante en la dieta humana [93].

Por otra parte en los extractos MMJB, MPC, MSE y MPE, se encontró y cuantificó el compuesto Dihidroximaltol (DDMP) en el análisis por CG-EM; como se observa en las tablas 6-11, este compuesto se ha relacionado con la reacción de Maillard, la cual ocurre por calentamiento de azúcares en presencia de aminoácidos (proteínas) en los alimentos [94]. La cantidad encontrada en los extractos es baja y se encuentra en un porcentaje de 0,23-0,68, lo cual puede indicar que el calentamiento aplicado en el microondas no degrada de forma significativa

a los carbohidratos presentes en la muestra. Por otra parte, no se identificó el compuesto generado principalmente en esta reacción, el HMF (Hidroximetilfurfural) [95].

5.5 Actividad antioxidante de los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys* obtenidos por MAE

La actividad antioxidante de los extractos etanólicos obtenidos por MAE, fue estudiada mediante los ensayos del CTP y de captación del radical DPPH. Los resultados de actividad antioxidante se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Actividad antioxidante por el método de DPPH en $\mu\text{mol Trolox/g}$ de ms ($\pm s$) y CTP en $\text{mgEAG}/100\text{g}$ de ms ($\pm\text{RSD}$).

EXTRACTO	DPPH ($\mu\text{mol Trolox}/\text{g}_{\text{ms}}$)	CTP ($\text{mgEAG}/100\text{g}_{\text{ms}}$)
MPC	35,27 ($\pm 3,40$) ^a	441,02 ($\pm 3,66$) ^a
MPE	15,39 ($\pm 0,71$) ^b	244,02 ($\pm 10,95$) ^b
MSC	47,01 ($\pm 0,61$) ^c	714,67 ($\pm 3,89$) ^d
MSE	42,03 ($\pm 0,13$) ^c	664,39 ($\pm 3,52$) ^{c,d}
MMJB	35,71 ($\pm 0,25$) ^a	611,18 ($\pm 9,63$) ^c
MMTJ	16,55 ($\pm 1,43$) ^b	326,88 ($\pm 7,71$) ^b

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), $n=3$

Para analizar los datos del ensayo DPPH, se construyó el gráfico de barras (Figura 23 a), en donde se puede observar cómo las muestras MSE y MSC, tienen los porcentajes de actividad antioxidante más altos, en un rango entre 42,03 a 47,01 μmol de Trolox por gramo de muestra seca. Las muestras MPE y MMTJ, muestran la actividad antioxidante más baja, comparada con el patrón de Trolox.

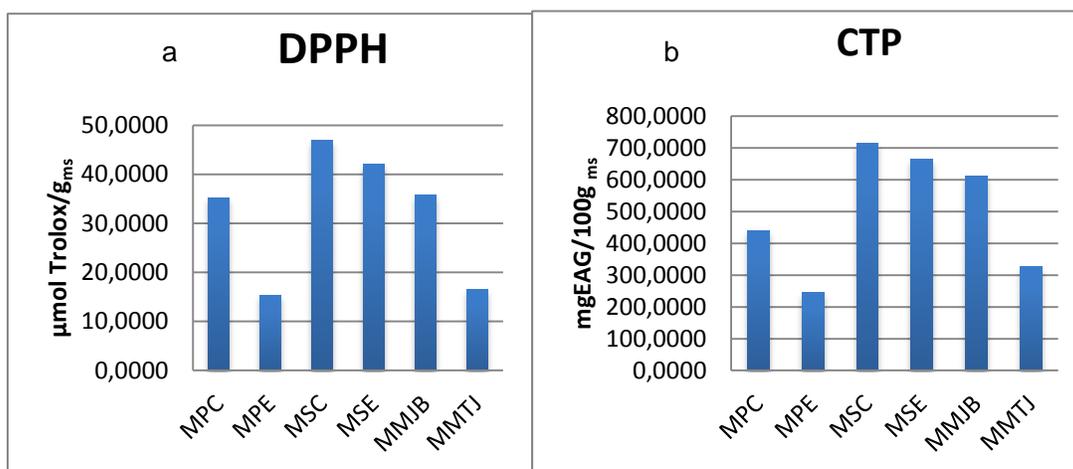


Figura 23. Ensayos de actividad antioxidante; a). Ensayo DPPH; b). Ensayo CTP.

Palié y colaboradores en 2015, investigaron la actividad antioxidante de extractos de *M. pulegium*, con solventes de diferentes polaridades, preparados por percolación y encontraron una relación entre la polaridad y la actividad antioxidante, reportando un valor de 25,07 µg de Trolox por gramo de extracto seco, en los extractos etanólicos MPC y MPE analizados en este trabajo, se encontraron valores de 35,27 y 15,39 µmol Trolox/g_{ms} (tabla 12), que equivalen a 207,77 y 71,43 µg de Trolox por gramo de extracto seco respectivamente, que es de 2,8 a 8,3 veces superior a la reportada por estos autores, lo cual se puede atribuir a la metodología de extracción utilizada en este trabajo [96]. La actividad de los extractos de *M. pulegium*, fue similar a la de *M. mollis* como se puede observar en la Figura 23 (a), las muestras MPE y MMTJ, presentaron actividades similares de 15,3914 y 16,5580 µmol equivalente de Trolox/g respectivamente; esto corrobora las predicciones realizadas en la sección 5.3.3, con base a los resultados del análisis multivariante realizado

La actividad antioxidante en los extractos de *M. mollis*, es de 1,7 a 2,5 veces mayor a la reportada por Torrenegra y colaboradores en 2015, para extractos acuosos preparados por cocción que fue de 0,27 µmol Trolox por mg de extracto seco [97], mientras que en los extractos etanólicos analizados MMTJ y MMJB, se encontraron valores respectivos de 16,55 y 35,71 µmol Trolox/g_{ms}, que corresponden a 0,68 y 0,45 µmol Trolox por mg de extracto seco.

La actividad antioxidante se ha relacionado con la presencia de polifenoles, por ello se realizó el ensayo CTP. El contenido de polifenoles encontrado por este método se reporta en la tabla 12. Los resultados obtenidos para CTP y DPPH, se pueden comparar mediante los gráficos de barras de la Figura 23 (a) y (b), en ellos se evidencia un comportamiento similar en los resultados obtenidos. Los extractos muestran diferencias significativas entre las muestras de *M. pulegium* Colombiana (MPC) y española (MPE), siendo mayor en la muestra colombiana; por otra parte en las muestras de *M. mollis*, MMJB presentó mayor actividad que MMTJ. En las muestras de *M. spicata* no se encontraron diferencias significativas y presentaron la actividad más alta en ambos ensayos, lo cual indicaría que hay una mayor cantidad de polifenoles en estos extractos, con respecto las demás muestras.

La muestra MMJB presenta una actividad comparable a la presentada por el extracto de MSE, ya que no hay diferencias significativas según la tabla 12 para el ensayo de CTP. Una relación similar se obtuvo en el dendograma vertical izquierdo del mapa de calor de la figura 21, el cual relacionó indirectamente a la muestra MMJB con las muestras MSC y MSE.

Elmastaş y colaboradores en 2015, realizaron un estudio analizando la actividad antioxidante de diferentes genotipos de *M. spicata*, preparando extractos en una mezcla etanol/cloroformo; el contenido más alto encontrado para el ensayo de CTP fue de 28,27 $\mu\text{gEAG/g}_{\text{ms}}$, una cantidad de 240 a 258 veces menor que la obtenida en los extractos analizados de MSC (7292,57 $\mu\text{gEAG/g}_{\text{ms}}$) y MSE (6779,58 $\mu\text{gEAG/g}_{\text{ms}}$), lo cual indica una clara diferencia atribuible a la metodología de extracción empleada en este trabajo.[98].

Los resultados obtenidos para el del ensayo CTP, de los extractos analizados pueden explicarse por la presencia de compuestos polifenólicos como los reportados por Kivilompolo y Hyotylainen en 2007 en *M. spicata*, quienes encontraron los ácidos gálico, clorogénico, cafeico, vanílico, ciríngico, cumárico ferúlico, y rosmarínico. Además, Dorma y colaboradores en 2003, reportaron también flavonoides como la Eriocitrina, Luteolina, Cinarósido, Isoroifolina y Apigenina [19]. En *M. Pulegium*, Proestos y colaboradores en 2005, identificaron los ácidos cafeico, vanílico, ferúlico, y flavonoides como Apigenina, Luteonina, Naringina y Catequina [99]. Por otra parte en *M. mollis*, algunos estudios como los de Yapuchura en 2010 encontró ácido cafeico, flavonas del tipo Eriodicitol y del tipo Apigenina [100], mientras que Ambuludi y Cepeda en 2015 reportaron la presencia de Lactato de catequilo, y el flavonoide Rutina [91].

En el ensayo CTP se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu, que es reducido por los polifenoles presentes en los extractos, no obstante, puede ser reducido por azúcares como Fructosa y Sacarosa y por ello se puede sobreestimar este contenido de polifenoles cuando estos carbohidratos están presentes en las muestras analizadas [101]. Para verificar si esto ocurría con los extractos estudiados debido a la presencia de Fructosa y Sacarosa determinadas en las muestras (sección 5.3.4), se compararon DPPH y CTP en relación al contenido de moles equivalentes de antioxidante; los resultados se ilustran en el gráfico de barras de la figura 24, en el cual se puede ver cómo presentan una relación muy similar, indicando que no hay sobreestimación por la interferencia de azúcares reductores en el ensayo CTP.

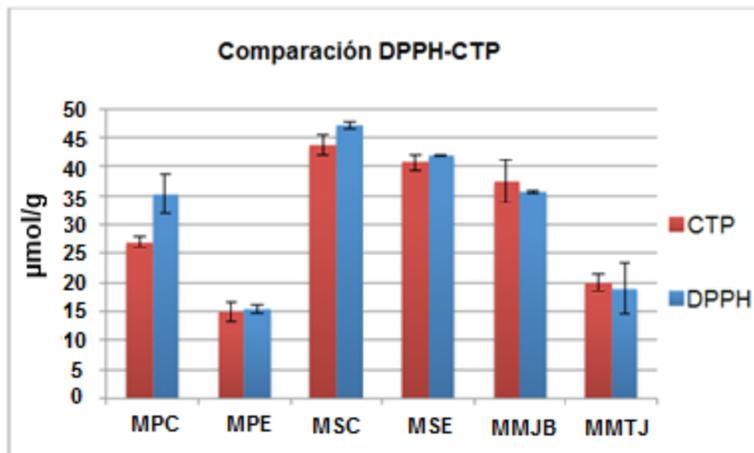


Figura 24. Comparación de la actividad antioxidante obtenida por los métodos CTP y DPPH en extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys* ($\mu\text{mol/g}$).

En la literatura se ha reportado la incidencia negativa de radicales libres sobre los procesos biológicos. Se han asociado con enfermedades inflamatorias, degenerativas, cardiovasculares y el cáncer, entre otras. Por ello, es importante encontrar sustancias de origen natural como los extractos evaluados en este trabajo, que puedan ser utilizados para prevenir los efectos patógenos que causan estas sustancias sobre el organismo.

Pensando en este uso potencial de los extractos, se realizó a continuación el estudio de la actividad antimicrobiana.

5.6 Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos obtenidos por MAE de *Mentha*

En los extractos etanólicos de *Mentha* se encontraron compuestos monoterpénicos, a los cuales se les atribuyen propiedades antimicrobianas (sección 5.3), por tal razón se evaluó su actividad frente a diferentes microorganismos comunes que afectan la salud de los seres humanos.

De los extractos evaluados en este ensayo, solo MSE y MSC (concentrados 15 veces), tuvieron un efecto bacteriostático contra *E. coli*. Esta actividad se puede atribuir en especial al monoterpéno Carvona que es el componente mayoritario presente en ambas muestras 47,68 y 33,99% de forma correspondiente (ver figura 25).

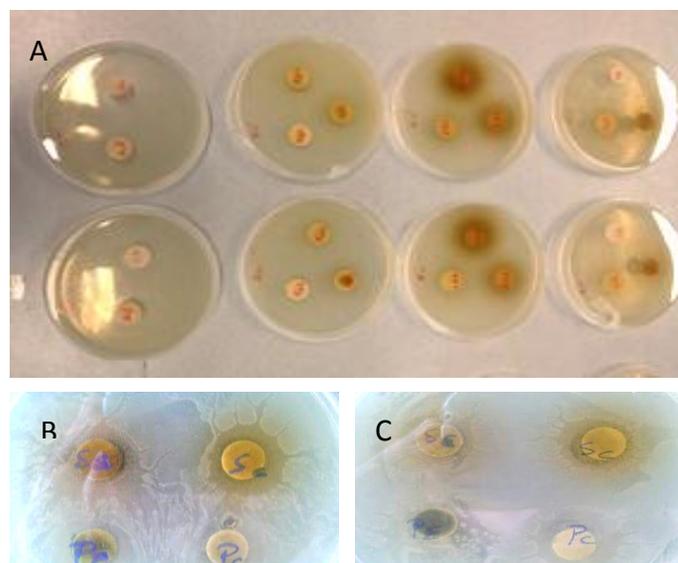


Figura 25. Prueba de bioactividad de los extractos etanólicos de *Mentha* por el método de difusión en agar: A) ensayo de actividad antimicrobiana; (B) ensayo de extractos puros; (C) ensayos de extractos concentrados 15 veces.

Este resultado se corrobora con lo reportado por Neelima y colaboradores en 2014, quien evaluó la actividad antimicrobiana de extractos; acuoso, clorofórmico y etanólico de *M. spicata*, contra *E. coli*, encontrando actividad en todos los extractos, siendo la actividad del extracto etanólico (basado en la zona de inhibición) hasta cinco veces superior a la del extracto acuoso pero la mitad de la mostrada por el extracto cloroformico [102].

Los resultados de actividad antimicrobiana encontrada, junto con los obtenidos para la actividad antioxidante potencian el posible uso de los extractos MSE y MSC como conservantes en alimentos, protegiéndolos del deterioro químico y de la contaminación con esta bacteria patógena.

La falta de actividad de los demás extractos evaluados puede atribuirse a la baja concentración en la que se encuentran los compuestos terpénicos a los que se les atribuye este tipo de bioactividad, en comparación con los aceites esenciales en los cuales si se reporta actividad.

Abdelli y colaboradores en 2016, encontraron un efecto antimicrobiano en el aceite esencial de la *M. pulegium* frente a *S. aureus* y *E. coli*, generando halos de inhibición de 23 y 28 mm respectivamente. El aceite esencial presentaba Pulegona como componente mayoritario en un 70% en peso que corresponden a 700 mg/g, mientras que en los extractos estudiados este compuesto se encuentra en 26,1485 y 70,2365 mg/g_{ES} en MPC y MPE de forma correspondiente, lo cual explicaría la falta de actividad [58].

Roldan y colaboradores en 2010, encontraron en el aceite esencial de *Ocimum basilicum*, una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 10 mg/mL frente a *S. typhimurim*, favorecido por su concentración alta en Carvona de 61,53% y en Limoneno 12,58% en peso que corresponden a 615,3 y 125,8 mg/g_{ES}, mientras que en los extractos estudiados, MSC contiene estos mismos compuestos en cantidades de 18,46 y 0,6993 mg/g_{ES} y MSE 60,5610 y 7,9227 mg/g_{ES}, siendo insuficientes para generar un efecto antimicrobiano apreciable [103].

Debido a que la composición de las muestras de *M. mollis* es similar a las de la *M. pulegium* y dado que estas no presentaron ningún tipo de efecto ante los microorganismos, no se consideró necesaria la evaluación de su bioactividad contra estos patógenos.

5.7 Determinación de la actividad bio-plaguicida de los extractos etanólicos de *Mentha* y *Minthostachys* contra *Tecia solanivora*, Povolny

Debido a las importantes actividades bio-plaguicidas que se han reportado en la literatura para especies del género *Mentha* y al uso tradicional que dieron culturas como la Inca en América a la *Minthostachys mollis*, para el control de la plaga *T. solanivora* que afecta gravemente los cultivos de papa en el país, se estudiaron por primera vez los extractos etanólicos obtenidos por MAE frente a la *T. solanivora*.

Para ello primero se determinó mediante ensayos previamente realizados en el laboratorio de BICAMSA, que se utilizarían larvas de primer instar de *T. solanivora* para las pruebas, ya que estas sobrevivían en ausencia de alimento hasta 48 h después de emerger de los huevos. Debido a que se quería estudiar únicamente el efecto del extracto, no se alimentó al insecto durante los ensayos 1, 3, 4 y 5, que se realizaron a 24 h. Igualmente se encontró que un volumen de aplicación de 20 µL era suficiente para impregnarlos.

5.7.1 Efecto por aplicación tópica de extractos de *Mentha* y *Minthostachys* obtenidos por MAE contra *T. solanivora* (Ensayo 1)

Los resultados para el diseño aplicado en la evaluación del efecto por aplicación tópica de los extractos etanólicos obtenidos por MAE, se muestran en la tabla 13. Se encontró que en el blanco y el control no hubo respuesta (mortalidad) ante el estímulo aplicado, es decir, los individuos estaban vivos y activos 24h después de comenzar el experimento; esta respuesta negativa puede validar el experimento, pues indican que los insectos no se ven afectados por no alimentarlos, por las condiciones ambientales, ni por el efecto combinado de la no alimentación y la aplicación del solvente.

Tabla 13. Resultados del diseño experimental aplicado sobre *T. solanivora*, evaluando la aplicación tópica de extractos obtenidos por MAE; Control (A); Blanco (B); Positivo (C); 5 ppm (D); 50 ppm (E); 1000 ppm (G); 5000 ppm (H); signo negativo (-) indica individuo vivo y signo positivo (+) indica individuo muerto. El ensayo se realizó durante 24 h.

MUESTRA	CONTROL (A)	BLANCO (B)	POSITIVO (C)	ppm					TOTAL MUERTOS
				5 (D)	50 (E)	500 (F)	1000 (G)	5000 (H)	
MMJB (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	-	-	-	-	-	-	+	-	1
MMTJ (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	-	-	-	-	-	-	-	-	0
MSE (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	-	-	-	-	-	-	-	-	0
MSC (4)	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	-	-	+	-	-	-	-	-	1
	-	-	-	-	-	-	-	-	0
MPC (5)	-	-	-	-	-	-	-	+	1
	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	-	-	-	-	-	-	-	-	0
TOTAL MUERTOS	0	0	1	0	0	0	1	1	3

Por otra parte, se encontró una respuesta negativa en el plaguicida utilizado como control positivo a una concentración de 5000 ppm; esto puede atribuirse a que los plaguicidas están enfocados en erradicar la polilla en su etapa adulta, por ello, puede variar su vía de acción, pues el organismo sufre una metamorfosis completa. El plaguicida está compuesto en un 75% por el compuesto organofosforado Acefato, el cual tiene un efecto sistémico, por ingestión y contacto, interrumpiendo la sinapsis.

Los resultados de la tabla 13 muestran una única respuesta positiva en el plaguicida y un comportamiento similar en el tratamiento de 1000 ppm en la muestra MMJB y en el de 5000 ppm de la muestra MPC. Este resultado indica que en las concentraciones estudiadas (5-5000 ppm), no hay efecto significativo de los extractos evaluados por aplicación tópica.

Debido a los resultados obtenidos, se propuso estudiar si los extractos podían influir sobre la alimentación del insecto.

5.7.2 Efecto sobre la alimentación y el desarrollo biológico de *T. solanivora* por aplicación tópica de los extractos de *Mentha* y *Minthostachys* por MAE (Ensayo 2)

La vía de acción de los plaguicidas es variada, por ello, se propuso estudiar si los extractos podían tener un efecto inhibitor de la alimentación en la *T. solanivora*, que limitaría de igual forma su desarrollo; los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Resultados del diseño experimental aplicado sobre *T. solanivora*, evaluando el efecto sobre la inhibición y desarrollo por aplicación tópica de extractos obtenidos por MAE; Control (A); Blanco (B); Positivo (C); 5 ppm (D); 50 ppm (E); 1000 ppm (G); 5000 ppm (H); signo negativo (-) indica individuo vivo y signo positivo (+) indica que el individuo muerto. El ensayo se realizó a 24 h.

MUESTRA	CONTROL (A)	BLANCO (B)	POSITIVO (C)	ppm				
				5 (D)	50 (E)	500 (F)	1000 (G)	5000 (H)
MMJB (1)	-	-	-	-	-	-	+	-
	-	+	-	-	+	+	+	-
	-	-	-	-	-	+	+	-
MMTJ (2)	+	+	-	-	+	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	+	-	-	-	-	-
MSE (3)	-	-	-	+	-	+	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	+	-
MSC (4)	+	+	+	-	-	-	-	-
	+	-	+	-	+	-	-	-
	+	-	-	-	+	-	-	-
MPC (5)	-	-	+	-	+	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	+	+	-	-	-	-	+
Mortalidad (%)	26,67	26,67	33,33	6,67	6,67	20	26,67	6,67

La mortalidad tanto en el blanco de solvente como en el control fue alta, de un 26,67%; por otra parte, la respuesta fue igual para ambos, indicando que no hay diferencia entre estos. En el plaguicida la mortalidad fue del 33.33%, lo cual muestra un posible efecto por parte de este tratamiento.

La mortalidad de las larvas tratadas con los extractos, fue incluso menor que la de los blancos, por lo tanto, se descarta un efecto inhibitorio en la alimentación, inducido por los extractos en las concentraciones utilizadas; debido a que no hay un comportamiento regular en los resultados obtenidos para los extractos, lo cual indica una falta de efecto sobre el desarrollo de estos insectos.

5.7.3 Evaluación del efecto por exposición en ambiente saturado sobre *T. solanivora* (Ensayo 3)

Se evaluó si había actividad plaguicida de los extractos por exposición de larvas de primer instar de *T. solanivora*, en un ambiente saturado durante 24 h. La tabla 15 muestra que en los resultados no hubo mortalidad significativa en los tratamientos aplicados, ni en el blanco, ni en los controles, por lo tanto se descarta un efecto de los extractos por vía respiratoria a esta concentración evaluada que fue de 5000 ppm.

Lo cual indica que los compuestos presentes en los extractos a las concentraciones evaluadas, no interactúan con el organismo de estos insectos inhibiendo funciones biológicas vitales.

Tabla 15. Resultados del diseño experimental aplicado sobre *T. solanivora*, evaluando el efecto por exposición en ambiente saturado de extractos obtenidos por MAE; signo negativo (-) indica individuo vivo y signo positivo (+) individuo muerto. El ensayo se realizó a 24 h.

MUESTRA	CONTROL	BLANCO	POSITIVO	EXTRACTO 5000 ppm
MMJB	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-
MMTJ	-	-	-	-
	-	+	-	-
	-	-	-	-
MSE	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-
MSC	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-
MPC	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-

5.7.4 Evaluación del efecto de la contracción por exposición en ambiente saturado de extractos de *Mentha* y *Minthostachys* por MAE contra *T. solanivora* (Ensayo 4)

En la literatura se reportan actividades importantes por parte de los aceites esenciales (AE) contra diferentes plagas. Teniendo en cuenta que la composición determinada tiene presentes los quimiotipos comunes reportados en los AE, se planteó evaluar si la falta de actividad era causada por la concentración de los compuestos terpénicos principales. Para ello, se comparó el extracto a 5000 ppm con un extracto saturado y un AE obtenido por hidrodestilación de MMJB (preparado exclusivamente para los ensayos 4 y 5) en el cual estos compuestos están más concentrados, tanto en adultos como en larvas de primer instar de *T. solanivora*, los resultados se muestran en tabla 16;

Tabla 16. Resultados del diseño experimental aplicado sobre *T. solanivora*, evaluando el efecto de la concentración por exposición en ambiente saturado de extractos obtenidos por MAE; signo negativo (-) indica individuo vivo y signo positivo (+) indica que el individuo muerto. El ensayo se realizó a 24 h.

MUESTRA	Larva			Adulto		
	1	2	3	1	2	3
CONTROL	-	-	-	-	-	-
Aceite Esencial	+	+	+	+	+	+
Extracto Saturado	-	-	-	-	-	-
Extracto a 5000 ppm	-	-	-	-	-	-

Se encontró que en los extractos no hay actividad, pero si se muestra actividad por parte del AE. Se observó una dependencia significativa de la concentración, sobre la muerte (efecto) en larvas y polillas (que se demuestra por los resultados de; Test G = 10,3742, p = 0,0156), siendo la concentración de terpenos del aceite esencial presuntamente la responsable del efecto sobre larvas y polillas. Por ello, se planteó evaluar el aceite esencial de MMTJ, contra los adultos de *T. solanivora*, por exposición en ambiente saturado con el fin de determinar la CL₅₀ de este.

5.7.5. Determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀) del aceite esencial de *Mintostachys mollis* contra *T. solanivora* (Ensayo 5)

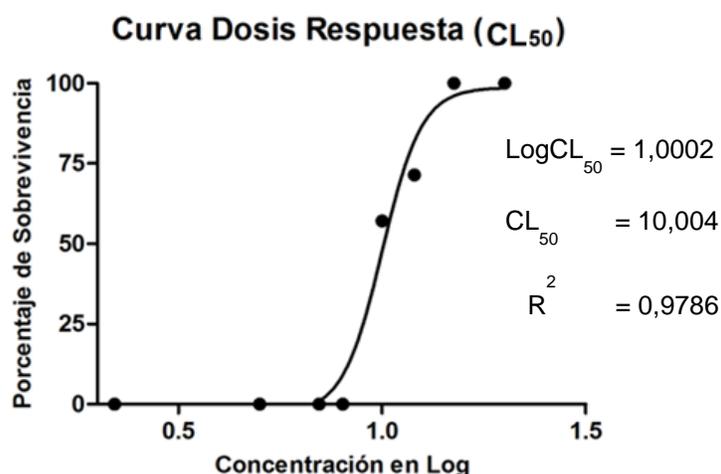


Figura 26. Gráfica de CL₅₀ para la determinación de la actividad bio-plaguicida de *M. mollis* contra adultos de *T. solanivora*.

Se determinó por primera vez la CL₅₀ del AE de MMJB disuelto en etanol, sobre adultos de *T. solanivora* por exposición en ambiente saturado (sección 4.8.5). Al realizar el ensayo, las polillas expuestas a las concentraciones más altas, mostraron molestias los primeros minutos, volando de un extremo a otro del recipiente; pasado una hora morían en las concentraciones más altas. Tanto en el blanco como el control no se registró mortalidad en 24 h. Con los resultados de mortalidad obtenidos se construyó la curva de dosis respuesta mostrada en la figura 26, a partir de esta se encontró la CL₅₀ la cual fue de 10,004% de aceite esencial en etanol en 500 cm³, equivalente a 4 µL/L_{aire}. de aceite esencial puro. Este resultado muestra que el AE es una alternativa eficaz para el control de esta importante plaga, ya que en contraste, el plaguicida utilizado como control no registró mortalidad a las 24 h. Cabe destacar que estos insectos se pueden reproducir recién emergen de las pupas, por ello es importante que los métodos de control sean eficaces y de rápida acción [54].

6. CONCLUSIONES

Por primera vez se reporta el estudio de extractos etanólicos de las especies *M. spicata*, *M. pulegium* y *M. mollis*, obtenidos por MAE, evaluando su composición química y sus bioactividades (antioxidantes, microbianas y bio-plaguicidas).

Se determinaron los compuestos principales presentes en extractos etanólicos obtenidos por MAE mediante CG-EM, encontrándose Carvona (47,68%) y Limoneno (6,24%) en MSE; *cis*-Hidratosabineno (7,14%) y Carvona (33,99%) en MSC; Pulegona (54,44%) y Piperitenona (30,75%) en MPE; *p*-Mentona (50,03%) y Pulegona (32,56%) en MPC; Isomentona (10,24%), Óxido de Piperitona (52,21%) en MMJB; Isomentona (25,30%) y Pulegona (36,94%) en MMTJ, todos ellos en base a los compuestos volátiles presentes en el extracto.

Se encontraron cuatro carbohidratos en los extractos analizados mediante CG-EM, previa derivatización por oximación-sililación, siendo MPC el que presentó mayor contenido en Fructosa, Glucosa y Sacarosa con una cantidad de 11856,80 , 4020,10 y 62665,67 mg/100g_{ES}; mientras que el extracto de MPE presentó el mayor contenido de Mio-inositol con 14489,66 mg/100_{ES}, que se considera como alto.

Los resultados obtenidos por los ensayos DPPH y CTP, sugieren una posible actividad antioxidante alta en los extractos etanólicos obtenidos por MAE, encontrándose que los de la especie *M. spicata* presentaron la mayor cantidad de polifenoles totales (714,67 mgEAG/100 g_{ms}) y de captación del radical DDPH (47,01 μ molTrolox/g). La actividad en las muestras de *Mentha* Colombianas fueron mayores que las Españolas. No se encontró interferencia por parte de carbohidratos en la determinación del CTP.

El análisis multivariante de clasificación relacionó las muestras MPE y MMTJ con MPC, mientras que las muestras de MSC y MSE fueron relacionadas con MMJB con base a sus componentes principales. Los resultados de actividad antioxidante muestran una relación similar, que sugiere que estas relaciones no solo son causadas por sus componentes volátiles, sino que presuntamente hay similitud en los compuestos con actividad antioxidante del tipo polifenol.

El alto contenido de carbohidratos, los bajos contenidos de DDPH y la ausencia de THF, sugieren que la metodología utilizada de Extracción Asistida por Microondas (MAE), es eficiente en el control de la temperatura, pues no se degradaron aparentemente los carbohidratos presentes en los extractos.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de *Mentha* contra las cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimorium* y *Candida albicans*, por el método de difusión en agar. Se encontró un efecto bacteriostático en los extractos de *M. spicata* concentrados 15 veces contra la *E. Coli*.

No se encontró actividad bio-plaguicida por parte de los extractos etanólicos, frente a *T. solanivora* en concentraciones de 5-5000 ppm en Etanol/Agua (1:10), por aplicación tópica ni por exposición en ambiente saturado durante 24 h.

Se encontró que la falta de bio-actividad de los extractos etanólicos, frente a *T. solanivora*, presuntamente es ocasionada por la una baja concentración de monoterpenos en los extractos.

Se encontró que el aceite esencial de MMJB causa mortalidad por exposición en ambiente saturado a larvas y adultos de *T. solanivora* (Test G=10,3742, $p=0,0156$), que se atribuye a la concentración de monoterpenos presentes en este aceite.

Se reporta por primera vez la actividad bio-plaguicida del AE de *Minthostachys mollis* obtenido por hidrodestilación, frente a adultos de *T. solanivora*, encontrándose una CL_{50} de 4 $\mu\text{L}/\text{L}_{\text{aire}}$ por exposición en ambiente saturado del AE de MMJB a 24 h, mientras que el plaguicida comercial Acefato no presentó actividad durante el ensayo. Estos resultados son un gran aporte para el desarrollo de métodos de control eficientes de plagas, lo que contribuye con la seguridad alimentaria.

Debido a la composición química determinada en los extractos y a los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antioxidante y biológica, se analizaron algunas posibles aplicaciones de estos extractos en alimentos, utilizándose como conservantes naturales y con propiedades funcionales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. Kumar, S. Mishra, A. Malik, and S. Satya, "Insecticidal properties of *Mentha* species: A review," *Ind. Crop. Prod.*, vol. 34, no. 1, pp. 802–817, 2011.
- [2] J. L. Fernández-Alonso, N. Vega, J. J. Filgueira, and G. Pérez, "Lectin prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 31, no. 31, pp. 617–633, 2003.
- [3] R. Morales, "*Mentha* L.," in *Flora Iberica 12*, S. Castroviejo, C. Aedo, M. Laínz, F. Muñoz Garmendia, G. Nieto Feliner, J. Paiva, and C. Benedí, Eds. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC, 1997, pp. 336–347.
- [4] J. Tardío, H. Pascual, and R. Morales, *Alimentos silvestres de Madrid Guía de plantas y setas de uso alimentario tradicional en la Comunidad de Madrid*. 2002.
- [5] R. Morales, "Flora iberica Vol. 12 - *Mentha spicata*," (Real Jardín Botánico) Castroviejo & al. (eds.), 2010. [Online]. Available: [http://www.floravascular.com/index.php?spp=Mentha spicata](http://www.floravascular.com/index.php?spp=Mentha%20spicata) - <http://www.anthos.es/>. [Accessed: 01-Jul-2016].
- [6] R. Pedraza and M. C. Henao, "Mineral composition of plant tissue in relation to growth variables and soil nutrients levels in commercial crops of mint (*Mentha spicata* L.)," *Agron. Colomb.*, vol. 26, no. 2, pp. 186–196, 2008.
- [7] U. N. de C. Fernández-Alonso, "Catálogo de plantas y líquenes de Colombia," *Instituto de Ciencias Naturales*, 2015. [Online]. Available: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/es/resultados/especie/Menthaspicata/>. [Accessed: 26-Oct-2016].
- [8] B. Valdes, S. Talavera, and E. Fernandez-Galiano, Eds., *Flora vascular de Andalucía occidental*, KETRES., vol. 2. Barcelona, 1987.
- [9] R. Morales, "Flora iberica Vol. 12 - *Mentha pulegium*," (Real Jardín Botánico) Castroviejo & al. (eds.), 2010. [Online]. Available: [http://www.floravascular.com/index.php?spp=Mentha pulegium](http://www.floravascular.com/index.php?spp=Mentha%20pulegium) - <http://www.anthos.es/>. [Accessed: 05-Jul-2016].
- [10] R. Bernal, S. Gradstein, and M. Celis, "Catálogo de plantas y líquenes de Colombia," *Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia*, 2015. [Online]. Available: [Catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co](http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/). [Accessed: 16-Jun-2016].
- [11] J. L. Fernández-Alonso, "Catálogo de plantas y líquenes de Colombia, Universidad Nacional de Colombia," *Instituto de Ciencias Naturales*, 2015. [Online]. Available: [http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/es/resultados/especie/Mentha pulegium /](http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/es/resultados/especie/Mentha%20pulegium/). [Accessed: 26-Oct-2016].
- [12] S. Kokkini, R. Karousou, and T. Lanaras, "Essential Oils of Spearmint (Carvone-rich) Plants from the Island of Crete (Greece)," *Biochem. Ecol.*, vol. 23, no. 4, pp. 425–430, 1995.
- [13] E. Sertkaya, K. Kaya, and S. Soyly, "Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd.) (Acarina: Tetranychidae)," *Ind. Crops Prod.*, vol. 31, pp. 107–112, 2010.
- [14] S. Kokkini and V. P. Papageorgiou, "Constituents of Essential Oils from *Mentha X rotundifolia* Growing Wild in Greece.," *Planta Med.*, vol. 54, no. 2, pp. 166–7, Apr. 1988.
- [15] A. Kedia, B. Prakash, P. K. Mishra, C. S. Chanotiya, and N. K. Dubey, "Antifungal, antiaflatoxicogenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 89, pp. 29–36, 2014.
- [16] K. Triantaphyllou, G. Blekas, and D. Boskou, "Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae.," *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 52, no. 4, pp. 313–7, Jul. 2001.
- [17] M. Shylaja and K. V. Peter, "The functional role of herbal spices," in *Handbook of herbs and spices*, K. V Peter, Ed. India : CRC Press, 2004, pp. 12–21.

- [18] C. M. Kaefer and J. A. Milner, "The role of herbs and spices in cancer prevention.," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 19, no. 6, pp. 347–61, Jun. 2008.
- [19] H. J. D. Dorman, M. Koşar, K. Kahlos, Y. Holm, and R. Hiltunen, "Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 16, pp. 4563–4569, Jul. 2003.
- [20] A. N. Schmidt-Lebuhn, "Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae)," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 118, no. 3, pp. 343–353, 2008.
- [21] A. N. Schmidt-Lebuhn, *A revision of the genus Minthostachys (Labiatae)*. Bronx, NY: New York Botanical Garden Press, 2008.
- [22] J. Calle, A. Espinosa, Claudia Nuñez, E. Bautista, and R. Pinzón, "Actividad insecticida del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (HBK) Griseb y sus componentes," *Rev. Colomb. Ciencias Quim.*, vol. 33, no. 2, pp. 137–144, 2004.
- [23] B. Bayramoglu, S. Sahin, and G. Sumnu, "Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano," *J. Food Eng.*, 2008.
- [24] N. Bousbia, M. A. Vian, M. A. Ferhat, E. Petitcolas, B. Y. Meklati, and F. Chemat, "Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity," *Food Chem.*, vol. 114, no. 1, pp. 355–362, 2009.
- [25] J. Dai, V. Orsat, G. S. Vijaya Raghavan, and V. Yaylayan, "Investigation of various factors for the extraction of peppermint (*Mentha piperita* L.) leaves," *J. Food Eng.*, vol. 96, no. 4, pp. 540–543, 2010.
- [26] M. E. Lucchesi, F. Chemat, and J. Smadja, "Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1043, no. 2, pp. 323–327, 2004.
- [27] C. Da Porto and D. Decorti, "Ultrasound-assisted extraction coupled with under vacuum distillation of flavour compounds from spearmint (carvone-rich) plants: Comparison with conventional hydrodistillation," *Ultrason. - Sonochemistry*, vol. 16, no. 6, pp. 795–799, 2009.
- [28] M. E. Torrenegra, C. Granados, M. R. Osorio, and G. León, "Comparación de la Hidrodestilación Asistida por Radiación de Microondas (MWHd) con Hidrodestilación Convencional (HD) en la Extracción de Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*," *Inf. tecnológica*, vol. 26, no. 1, pp. 117–122, 2015.
- [29] L. Luciana Garcia Brom Viviana Trebes Brom Viviana Trebes, "Determinación del extracto seco total densimétrico," *Ministerio de Agricultura, Ganadería y pesca Presidencia de la Nación*, 2012. [Online]. Available: http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/foro/2012/22-INV-SIF-DeterminacionDeExtractoSecoTotal06-09-12.pdf. [Accessed: 06-Oct-2016].
- [30] L. Gallo, M. V. Ramírez-Rigo, J. Piña, S. Palma, D. Allemandi, and V. Bucalá, "Valeriana officinalis Dry Plant Extract for Direct Compression: Preparation and Characterization," *Sci. Pharm.*, vol. 80, no. 4, pp. 1013–26, Dec. 2012.
- [31] A. Lagarto Parra, J. Tillán Capó, R. Vega Montalvo, and Y. Cabrera González, "Toxicidad aguda oral de extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales," *Rev. Cuba. Plantas Med.*, vol. 4, no. 1, pp. 26–28, 1999.
- [32] E. E. Stashenko and J. R. Martínez, "Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas," *Sci. Chromatogr.*, vol. 2, no. 1, pp. 29–47, 2010.
- [33] M. Pontin, R. Bottini, J. L. Burba, and P. Piccoli, "*Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*," *Phytochemistry*, vol. 115, no. 1, pp. 152–60, Jul. 2015.
- [34] C. Cardenas and S. Duarte, "Estudio del ciclo circadiano de la carvona en las hojas de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae)," Universidad Industrial de Santander, 2007.

- [35] M. Gavahian, R. Farhoosh, A. Farahnaky, Javidnia, and F. Shahidi, "Comparison of extraction parameters and extracted essential oils from *Mentha piperita* L., using hydrodistillation and steamdistillation," *Int. Food Res. J.*, vol. 22, no. 1, pp. 283–288, 2015.
- [36] M. A. Hossain, S. S. Al-Hdhami, A. M. Weli, Q. Al-Riyami, and J. N. Al-Sabahi, "Isolation, fractionation and identification of chemical constituents from the leaves crude extracts of *Mentha piperita* L., grown in Sultanate of Oman," *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 4, pp. S368–S372, 2014.
- [37] A. I. Ruiz-Matute, O. Hernández-Hernández, S. Rodríguez-Sánchez, M. L. Sanz, and I. Martínez-Castro, "Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses," *J. Chromatogr. B*, vol. 879, no. 17, pp. 1226–1240, 2011.
- [38] S. Rodriguez-Sanchez, O. Hernandez-Hernandez, A. I. Ruiz-Matute, and M. L. Sanz, "A derivatization procedure for the simultaneous analysis of iminosugars and other low molecular weight carbohydrates by GC-MS in mulberry (*Morus sp.*)," *Food Chem.*, vol. 126, no. 1, pp. 353–359, 2011.
- [39] M. Carhuapoma, S. López, M. Roque, B. Velapatiño, C. Bell, and D. Whu, "Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb ruyaq muña," *Cienc. e Investig. Fac. Farm. y Bioquímica UNMSM*, vol. 12, no. 2, pp. 83–89, 2009.
- [40] P. Kumar, S. Mishra, A. Malik, and S. Satya, "Insecticidal properties of *Mentha* species: A review," *Ind. Crops Prod.*, vol. 34, no. 1, pp. 802–817, 2011.
- [41] C. Tassou, K. Koutsoumanis, and G.-J. E. Nychas, "Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil," *Food Res. Int.*, vol. 33, no. 3–4, pp. 273–280, Apr. 2000.
- [42] C. García Féliz, "Salmelosis porcina en España: prevalencia, factores de riesgo y resistencia antimicrobiana," Universidad de León, 2011.
- [43] S. R. Kanatt, R. Chander, and A. Sharma, "Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products," *Food Chem.*, vol. 107, no. 2, pp. 845–852, 2008.
- [44] E. Abdollahzadeh, S. M. Ojagh, H. Hosseini, G. Irajian, and E. A. Ghaemi, "Prevalence and molecular characterization of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* isolated from fish, shrimp, and cooked ready-to-eat (RTE) aquatic products in Iran," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 73, pp. 205–211, 2016.
- [45] J. A. Vázquez-Boland, M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft, "Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 14, no. 3, pp. 584–640, Jul. 2001.
- [46] M.-H. Moosavy, S. Esmaili, and E. Mostafavi, "Antibacterial effect of *Mentha spicata* essential oil on *Listeria monocytogenes* in traditional lighvan cheese," *J. Food Saf.*, vol. 33, no. 4, pp. 509–514, 2013.
- [47] J. M. Miro, J. P. De La Bellacasa, F. C. Odds, B. K. Gill, J. Bisbe, J. M. Gatell, J. Gonzalez, X. Latorre, M. T. Jimenez De Anta, E. Soriano, and J. Garcia San Miguel, "Systemic Candidiasis in Spanish Heroin Addicts: A Possible Source of Infection," *J. Infect. Dis.*, vol. 156, no. 5, pp. 857–858, Nov. 1987.
- [48] S. Sasidharan, Z. Zuraini, L. Latha, and S. Suryani, "Fungicidal Effect and Oral Acute Toxicity of *Psophocarpus tetragonolobus*. Root Extract," *Pharm. Biol.*, vol. 46, no. 4, pp. 261–265, Jan. 2008.
- [49] M. . Motsei, K. . Lindsey, J. van Staden, and A. . Jäger, "Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 86, no. 2, pp. 235–241, 2003.
- [50] A. Aliero, B. L. Aliero, and U. Buhari, "Preliminary phytochemical and antibacterial screening of *Scadoxus multiflorus*," *Int J Pure Appl Sci*, vol. 2, no. 4, pp. 13–17, 2008.

- [51] Ö. Ertürk, "Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants," *Biologia (Bratisl.)*, vol. 61, no. 3, pp. 275–278, 2006.
- [52] G. Rodríguez, "Principales características de los grupos patógenos de *Escherichia coli*," *Salud Publica Mex.*, vol. 44, no. 5, pp. 464–475, 2002.
- [53] FAO, "*Escherichia coli*," in *Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales*, 2011, p. 39.
- [54] D. Villanueva and C. I. Saldamando, "Ingeniería y Ciencia *Tecia solanivora*, Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae): una revisión sobre su origen, dispersión y estrategias de control biológico," vol. 9, no. 18, pp. 197–214, 2013.
- [55] C. Espinel-Correal, X. Léry, L. Villamizar, J. Gómez, J. L. Zeddám, A. M. Cotes, and M. López-Ferber, "Genetic and biological analysis of Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae).," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 22, pp. 7617–25, Nov. 2010.
- [56] F. Herrera, "La polilla gualtemalteca de la papa, biología, comportamiento y practicas de manejo integrado," Boyacá, Colombia, 1998.
- [57] J. Monreal, S. Manzanera, and M. Tomé, "Optimización del método captación del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café Optimization of the DPPH method to evaluate antioxidant activity of coffee brew," vol. 28, pp. 67–78, 2012.
- [58] M. Abdelli, H. Moghrani, A. Aboun, and R. Maachi, "Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities," *Ind. Crops Prod.*, vol. 94, pp. 197–205, 2016.
- [59] D. Stagos, N. Portesis, C. Spanou, D. Mossialos, N. Aligiannis, E. Chaita, C. Panagoulis, E. Reri, L. Skaltsounis, A. M. Tsatsakis, and D. Kouretas, "Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species.," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 11, pp. 4115–24, Nov. 2012.
- [60] J. Tovar, "Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera," Universidad Tecnológica de Pereira, 2013.
- [61] G. Chaquilla, W. Estela, V. Torres, M. Ballinas, M. G. Gastélum, and V. Nevárez, "Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de muña *Minthostachys setosa* (Briq.) Epl., y anís *Pimpinella anísom L.*," *J. Agric. Food Chem.*, no. 53, pp. 1841–1856, 2005.
- [62] A. Benabdallah, C. Rahmoune, M. Boumendjel, O. Aissi, and C. Messaoud, "Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Argelia," *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 6, no. 9, pp. 760–766, 2016.
- [63] J. Palá-Paúl, J. Usano-Aleman, E. Granda, and A.-C. Soria, "Antifungal and antibacterial activity of the essential oil of *Chamaecyparis lawsoniana* from Spain.," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 7, no. 10, pp. 1383–6, Oct. 2012.
- [64] J. A. Lizcano Ramón and L. J. Vergara González, "Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilota*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Pastiflora maniaca*, frente a microorganismos patógenos y fitopatógeno," Pontificia Universidad Javeriana, 2008.
- [65] M. G. Maiocchi and J. R. -Avanza, "Degradación de clorofilas y feofitinas a diferentes temperaturas en *Ilex dumosa* e *Ilex paraguariensis*," 2004.
- [66] L. García Bacallao, L. Vicente García Gómez, D. M. Rojo Domínguez, and E. Sánchez García, "Plantas con propiedades antioxidantes," *Rev. Cuba. Investig. Biomédicas*, vol. 20, no. 3, pp. 231–235, 2001.
- [67] J. ichiro Hattai, K. Shindo, T. Ito, Y. Shibuya, A. Watanabe, C. Tagaki, F. Ohno, T. Sasaki, J. Ishii, A. Kondo, and N. Misawa, "Identification of a novel hedycaryol synthase

- gene isolated from *Camellia brevistyla* flowers and floral scent of *Camellia cultivars*,” *Planta*, vol. 243, no. 4, pp. 959–972, 2016.
- [68] M. Božovic, A. Pirolli, and R. Ragno, “*Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: Biological activities and chemistry,” *Molecules*, vol. 20, no. 5, pp. 8605–8633, 2015.
- [69] C. C. C. R. De Carvalho and M. M. R. Da Fonseca, “Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene,” *Food Chem.*, vol. 95, no. 3, pp. 413–422, 2006.
- [70] P. P. Almeida, N. Mezzomo, and S. R. S. Ferreira, “Extraction of *Mentha spicata* L., Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 5, no. 2, pp. 548–559, 2012.
- [71] B. Gastaldi, Y. Assef, C. Van Baren, P. Di Leo, D. Retta, A. Bandoni, and S. González, “Actividad antioxidante en infusiones, tinturas y aceites esenciales de especies nativas de la Patagonia Argentina,” *Rev. Cuba. Plantas Med.*, vol. 21, no. 1, pp. 51–62, 2016.
- [72] K. K. Aggarwal, S. P. S. Khanuja, A. Ahmad, T. R. Santha Kumar, V. K. Gupta, and S. Kumar, “Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*,” *J*, vol. 17, pp. 59–63, 2002.
- [73] P. A. Reddy, N. Reddy, M. D. Bhakshu, V. Ratnam, and V. Reddy, “Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Leaves and Fruits of *Commiphora caudata* Engl,” *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 38–44, 2015.
- [74] S. M. Moreno M., O. E. Crescente V., S. Ortiz M., and M. Quintero, “Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de *Simsia pubescens* Triana,” *Interciencia*, vol. 31, no. 10, pp. 745–747, 2006.
- [75] P. Quiroga, “Monoterpenos Como Agentes Químicas Y Sensoriales De Los Alimentos,” p. 157, 2013.
- [76] U. Ravid, E. Putievsky, and I. Katzir, “Enantiomeric Distribution of Piperitone in Essential Oils of Some *Mentha* spp., *Calamintha incana* (Sm.) Heldr. and *Artemisia judaica* L.,” *Flavor Fragr. J.*, vol. 9, pp. 85–87, 1994.
- [77] M. Lino, “Herbolaria: Piperitenona,” 2012. [Online]. Available: <http://prontuariodefarmacopea.blogspot.com.co/2012/07/piperitenona.html>. [Accessed: 28-Dec-2016].
- [78] E. Derwich, R. Chabir, R. Taouil, and O. Senhaji, “In-vitro Antioxidant Activity and GC/MS Studies on the Leaves of *Mentha piperita* (Lamiaceae) from Morocco,” *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.*, vol. 3, no. 2, pp. 130–136, 2011.
- [79] M. Arauco Livia, “Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico do óleo essencial de munha [*Minthostachys mollis* (Kunth)],” Universidade Federal de Santa Catarina Centro Tecnológico, 2010.
- [80] E. M. C. Reis-Vasco, J. A. P. Coelho, and A. M. F. Palavra, “Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation,” *Flavor Fragr. J.*, vol. 14, pp. 156–160, 1999.
- [81] C. A. Cano Perez, “Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis*, ‘muña,’” 2007.
- [82] A. T. Mata, C. Proença, A. R. Ferreira, M. L. M. Serralheiro, J. M. F. Nogueira, and M. E. M. Araújo, “Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices.”
- [83] M. I. E. Mohamed and S. A. M. Abdelgaleil, “Chemical composition and insecticidal potential of essential oils from Egyptian plants against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae),” *Appl. Entomol. Zool.*, vol. 43, no. 4, pp. 599–607, 2008.
- [84] H. Oumzil, S. Ghouli, M. Rhajaoui, A. Ilidrissi, S. Fkih-Tetouani, M. Faid, and A. Benjouad, “Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils of *Mentha suaveolens*,”

- Phyther. Res.*, vol. 16, pp. 727–731, 2002.
- [85] B. Zapata, C. Durán, E. Stashenko, L. B. Galvis, and A. C. M. Arango, “Actividad antimicótica, citotoxicidad y composición de aceites esenciales de plantas de la familia Labiatae,” *Rev. SALUD UIS*, vol. 41, no. 3, 2009.
- [86] H. E. Bachmann Lovece, “Estudios preliminares de caracterización de miel de abeja: determinación de carbohidratos por GC/MS y análisis enzimáticos,” Universidad Austral de Chile, 2007.
- [87] E. Uribe, D. Marín, A. Vega-Gálvez, I. Quispe-Fuentes, and A. Rodríguez, “Assessment of vacuum-dried peppermint (*Mentha piperita* L.) as a source of natural antioxidants,” *Food Chem.*, vol. 190, pp. 559–565, 2016.
- [88] L. Betancourt Latorre and J. E. Llano Moreno, “Extracción de pectinas a partir de los subproductos del beneficio del cacao,” Universidad EAFIT, 2009.
- [89] L. Ruiz Aceituno, “Nuevos métodos de extracción y fraccionamiento de carbohidratos bioactivos,” Universidad Autónoma de Madrid, 2015.
- [90] F. Song, H. Su, N. Yang, L. Zhu, J. Cheng, L. Wang, and X. Cheng, “Myo-Inositol content determined by myo-inositol biosynthesis and oxidation in blueberry fruit,” *Food Chem.*, vol. 210, pp. 381–387, 2016.
- [91] D. L. Ambuludi Farez and N. C. Cepeda Robles, “Estudio fitoquímico preliminar del follaje de *Minthostachys mollis* cultivada en Quito,” Universidad Técnica de Machala, 2015.
- [92] A. Belščak-Cvitanović, D. Komes, M. Dujmović, S. Karlović, M. Biškić, M. Brnčić, and D. Ježek, “Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolates formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives,” *Food Chem.*, vol. 167, pp. 61–70, 2015.
- [93] L. B. Chuquizuta y E. M. Gongora, “Influencia de la concentración de extracto de Betarraga (*Beta vulgaris*) y jarabe de Yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en la elaboración de una bebida nutracéutica aromatizada con menta (*Mentha piperita*)” Universidad Nacional “Toribio Rodrigues de Mendoza” de Amazonas, 2014.
- [94] I. G. Hwang, H. Y. Kim, K. S. Woo, S. H. Lee, J. Lee, and H. S. Jeong, “Isolation and Identification of the Antioxidant DDMP from Heated Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai).,” *Prev. Nutr. food Sci.*, vol. 18, no. 1, pp. 76–9, Mar. 2013.
- [95] K. Hiramoto, A. Nasuhara, K. Michikoshi, T. Kato, and K. Kikugawa, “DNA strand-breaking activity and mutagenicity of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP), a Maillard reaction product of glucose and glycine,” *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 395, no. 1, pp. 47–56, 1997.
- [96] I. R. Palić, J. D. Ickovski, A. S. Đorđević, V. D. Mitić, V. P. Stankov Jovanović, and G. S. Stojanović, “Antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and solvent extracts of *Mentha pulegium* L.,” *Physics, Chem. Technol.*, vol. 13, no. 2, pp. 109–119, 2015.
- [97] M. M. Dad, D. E. Fioravanti, G. R. Schinella, H. A. Tournier, L. Plata, I. Cient, and B. Aires, “Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina),” vol. 8, no. 6, pp. 529–539, 2009.
- [98] M. Elmastaş, İ. Telci, H. Akşit, and R. Erenler, “Comparison of total phenolic contents and antioxidant capacities in mint genotypes used as spices / Baharat olarak kullanılan nane genotiplerinin toplam fenolik içerikleri ve antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması,” *Turkish J. Biochem.*, vol. 40, no. 6, 2015.
- [99] F. Brahmi, D. Hauchard, N. Guendouze, K. Madani, M. Kiendrebeogo, L. Kamagaju, C. Stévigny, M. Chibane, and P. Duez, “Phenolic composition, in vitro antioxidant effects - Manuscript Brahmi F.”
- [100] R. Yapuchura Mamani, “Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de muña (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.) E., inca muña (*Clinopodium bolivianum* (benth.) Kuntze),” *Univ. Nac. Agrar. La Molina*, 2010.

- [101] S. Chordi Barrunte, "Contenido fenólico y capacidad antioxidante de fresa mínimamente procesada sometida a tratamientos de conservación por pulsos de luz de alta intensidad.," Universidad de Lleida, 2013.
- [102] R. Neelima, N. Nagaraju, Y. Bhavani, and V. Bandaru Rao, "Evaluation of in vitro antioxidant and antimicrobial activity of *Mentha spicata* L. leaves," *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.*, vol. 5, no. 4, pp. 102–106, 2014.
- [103] L. P. Roldán, G. J. Díaz, and J. Düringer, "Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria," *Rev. Colomb. Ciencias Pecu.*, vol. 23, no. 4, pp. 451–461, Aug. 2010.
- [104] O. A. Carter, R. J. Peters, and R. Croteau, "Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*," *Phytochemistry*, vol. 64, no. 2, pp. 425–433, 2003.

8. Anexos

Anexo 1. Calculo del Rendimiento (R):

$$\text{(Ecuación 1)} \quad R(\%) = \left(\frac{m_{\text{seco}}}{m_{\text{muestra}}} \right) \times 100$$

Dónde:

- m_{seco} : Es el peso del extracto seco en mg
- m_{muestra} : El peso del material de partida (hojas secas) en mg

Anexo 2. Cálculo de los Índices de Retención:

El IR se calculó con base al tiempo de retención (t_R) de cada compuesto separado de los extractos, los t_R y el número carbonos de los alcanos próximos al compuesto de interés. Debido a que se utilizó en todos los casos rampa de temperatura (temperatura programada) y mantenimiento de la temperatura máxima (condición isotérmica) en los análisis por CG-EM, se aplicó la fórmula de Índice de Retención Lineal (I^T) (Ecuación 2), en los t_R , que se encontraban dentro de la rampa de temperatura. Para los t_R en la condición isotérmica, se calculó con la ecuación 2*.

$$\text{(Ecuación 2)} \quad I^T = 100 \left[\frac{t_{Ri}^T - t_{Rz}^T}{t_{R(z+1)}^T - t_{Rz}^T} + z \right]$$

Dónde:

- I^T : es el índice de retención a temperatura programada en CG-EM, con velocidad de rampa constante 6 °C/min
- t_{Ri}^T : es el tiempo de retención ajustado del compuesto de interés
- t_{Rz}^T : es el tiempo de retención del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés
- $t_{R(z+1)}^T$: es el tiempo de retención del n-alcano que eluye inmediatamente después del compuesto de interés
- z : es el número de carbonos del n-alcano que eluye antes que el compuesto de interés

$$\text{(Ecuación 2 *)} \quad I^T = 100 \left[\frac{\text{LOG}(t_{Ri}^T) - \text{LOG}(t_{Rz}^T)}{\text{LOG}(t_{R(z+1)}^T) - \text{LOG}(t_{Rz}^T)} + z \right]$$

Dónde:

- I^T : es el índice de retención a temperatura programada en CG-EM, a temperatura constante 250 °C
- t_{Ri}^T : es el tiempo de retención ajustado del compuesto de interés
- t_{Rz}^T : es el tiempo de retención del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés
- $t_{R(z+1)}^T$: es el tiempo de retención del n-alcano que eluye inmediatamente después del compuesto de interés
- z : es el número de carbonos del n-alcano que eluye antes que el compuesto de interés

Anexo 3. Cuantificación de compuestos volátiles por CG-EM utilizando EI:

Para determinar la concentración de los compuestos volátiles, primero se determinó la cantidad en miligramos de cada analito (Ecuación 3):

(Ecuación 1)
$$mg_a = \frac{A_i}{A_{EI}} \times mg_{EI}$$

Dónde:

- A_i : es el área del pico de interés
- A_{EI} : es el área del estándar interno (EI) utilizado
- mg_{EI} : es la cantidad en miligramo de EI, agregados al extracto

Luego se determinó los miligramos de cada analito presentes en el extracto etanólico obtenido por MAE (Ecuación 4):

(Ecuación 2)
$$mg_{analito} = \frac{mg_a \times v}{v'}$$

Dónde:

- mg_a : son los miligramos del analito presentes en la solución de extracto con EI, obtenido de la Ecuación 3
- v : es el volumen en microlitros de extracto etanólico total obtenido de la extracción por MAE
- v' : es el volumen en microlitros de la solución de extracto con EI.

Posteriormente se calculó con la ecuación 5, los miligramos de analito por gramo de muestra seca:

(Ecuación 3)
$$mg_{analito} / g_{muestra} = \frac{mg_{analito}}{g_{muestra}}$$

Dónde:

- mg_{at} : son los miligramos de analito presentes en el extracto determinados en la Ecuación 4
- $g_{muestra}$: son los gramos de muestra seca utilizados para preparar el extracto etanólico por MAE

Finalmente se calculó la cantidad de analito presente en el extracto seco (ecuación 6)

(Ecuación 4)
$$mg_a / g_{ES} = \frac{(mg_a)(v_{ES})}{(v')(mg_{ES})}$$

Dónde:

- mg_a : son los miligramos de analito presentes en la solución de extracto con EI
- v_{ES} : es el volumen en microlitros utilizado para la determinación del extracto seco (ES)
- v' : es el volumen en microlitros de la solución de extracto con EI
- mg_{ES} : es el peso en miligramos del extracto seco

Anexo 4. Determinación de capacidad de captación del radical DPPH:

La concentración equivalente en Trolox de cada muestra medida se realizó mediante la ecuación 7:

$$\text{(Ecuación 7)} \quad \mu\text{mol Trolox/g} = a \times f \times \frac{1}{PM} \times p \times \frac{v}{m}$$

Donde:

- **a**: es la concentración de Trolox en $\mu\text{g/mL}$, calculada a por interpolación de la curva de calibración
- **f**: es el factor de dilución de los extractos analizados
- **PM**: es el peso molecular del Trolox en microgramos
- **p**: es la pureza del Trolox (97%)
- **v**: es el volumen en mililitros de extracto obtenido por MAE
- **m**: es el peso en gramos de extracto etanólico

Anexo 5. Determinación del contenido de polifenoles por CTP:

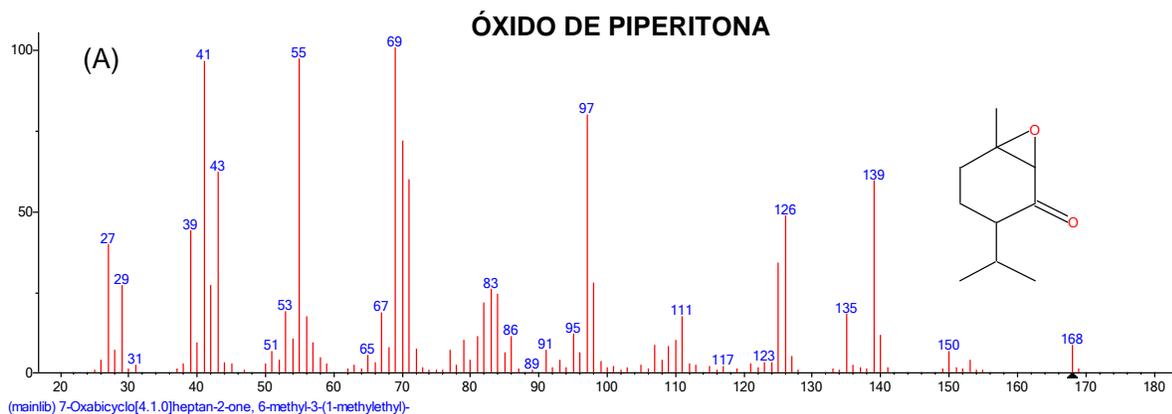
La concentración de ácido gálico equivalente se calculó mediante la ecuación 8:

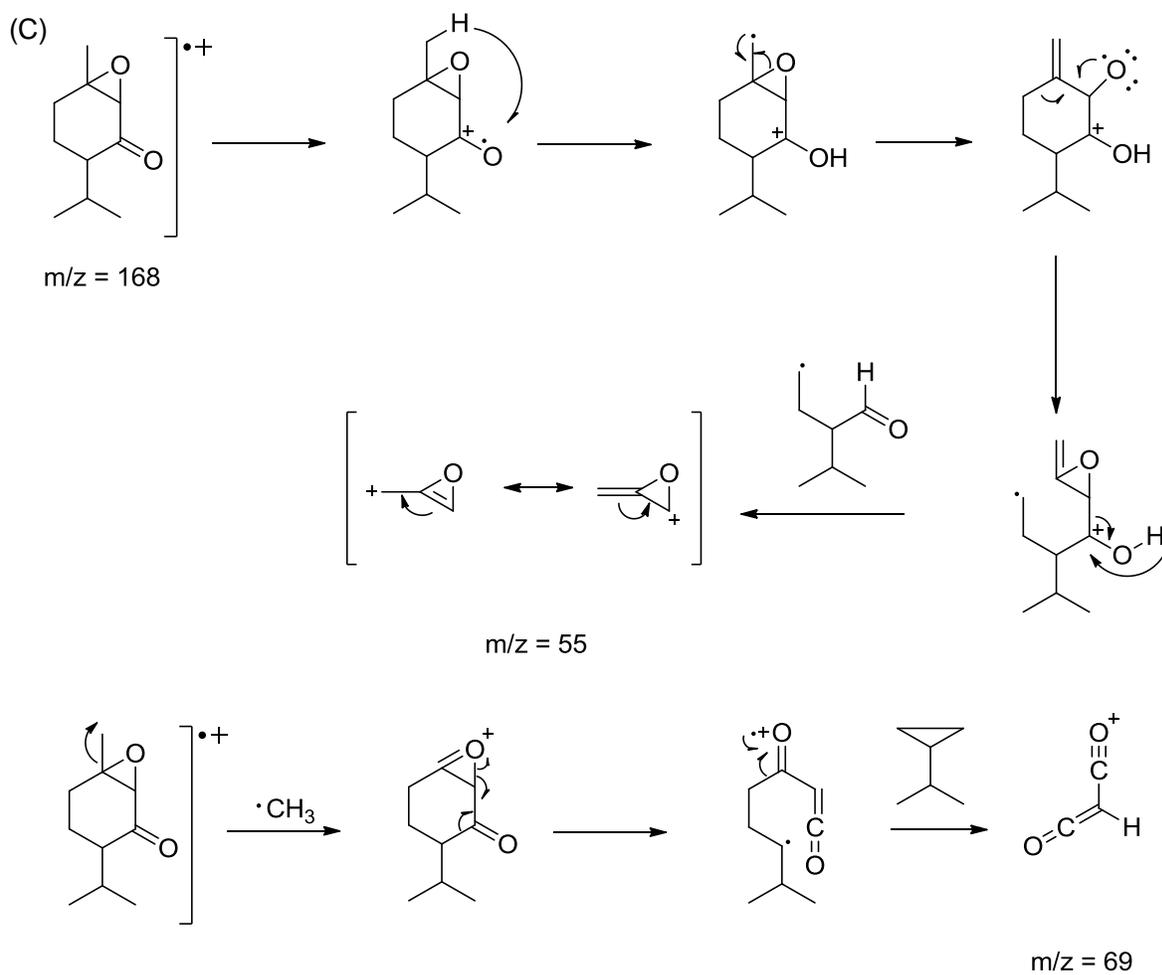
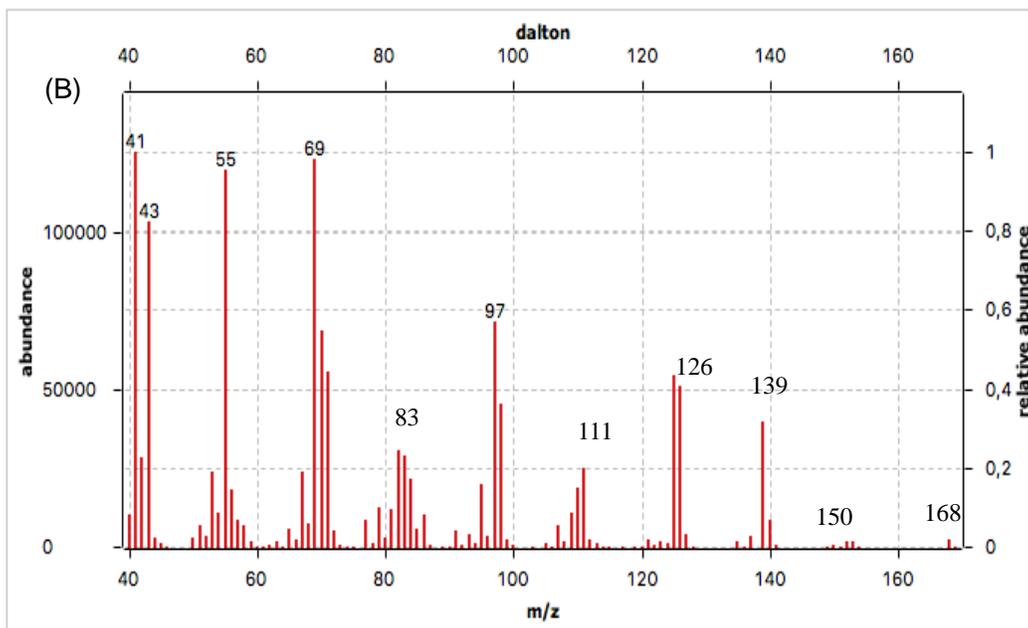
$$\text{(Ecuación 8)} \quad \text{mgEAG}/100\text{g} = a \times f \times p \times \frac{v}{m} \times 100$$

Dónde:

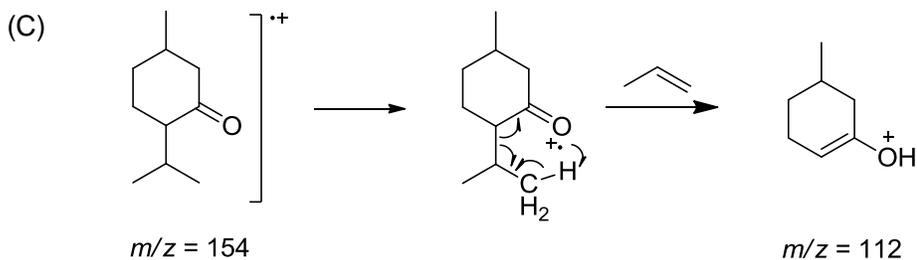
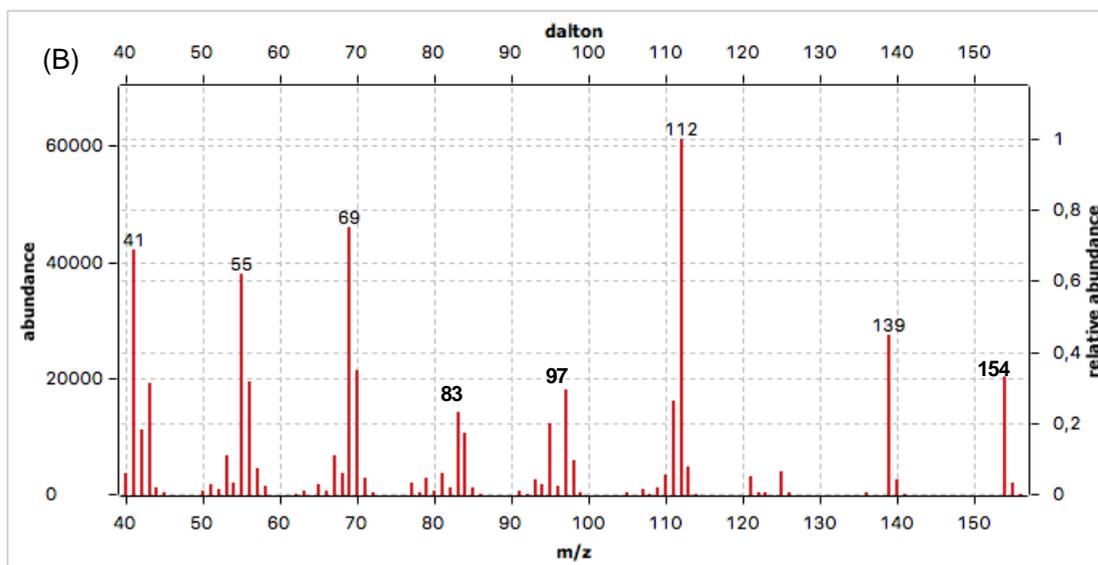
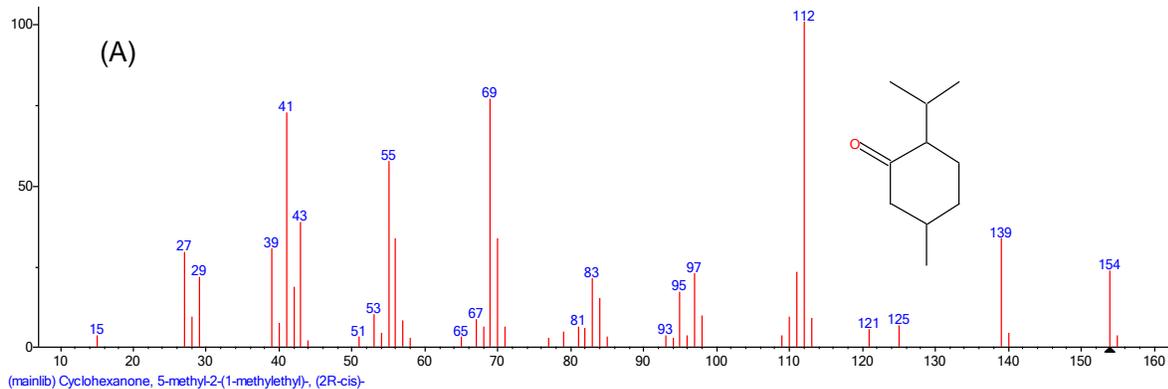
- **a**: es la concentración EAG en mg/mL , calculada por interpolación de la curva de calibración
- **f**: es el factor de dilución de los extractos analizados
- **p**: es la pureza del AG (98%)
- **v**: es el volumen en mililitros de extracto obtenido por MAE
- **m**: es el peso en gramos de muestra utilizada para preparar el extracto etanólico por MAE

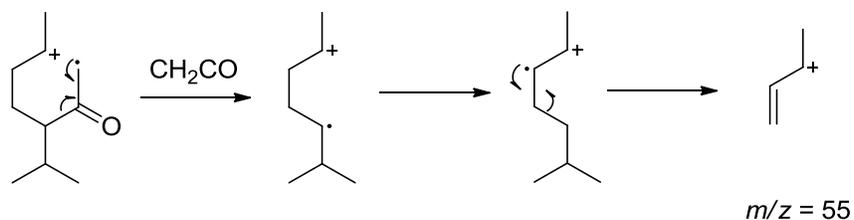
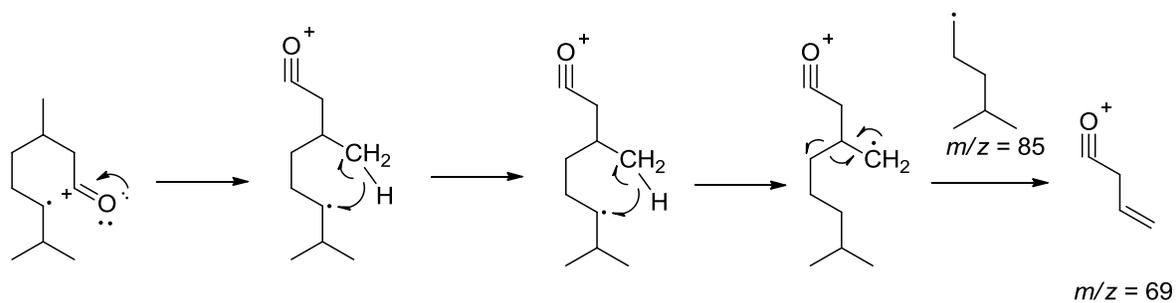
Anexo 6. Identificación del compuesto ÓXIDO DE PIPERITONA; (A) Corresponde al espectro reportado en la base de datos NITS (CAS: 5286-38-4); (B) Corresponde al espectro obtenido experimentalmente; (C) Se muestra la posible ruta de fragmentación con ion molecular ($m/z = 168$); pico base ($m/z = 69$); otro fragmento ($m/z = 55$),



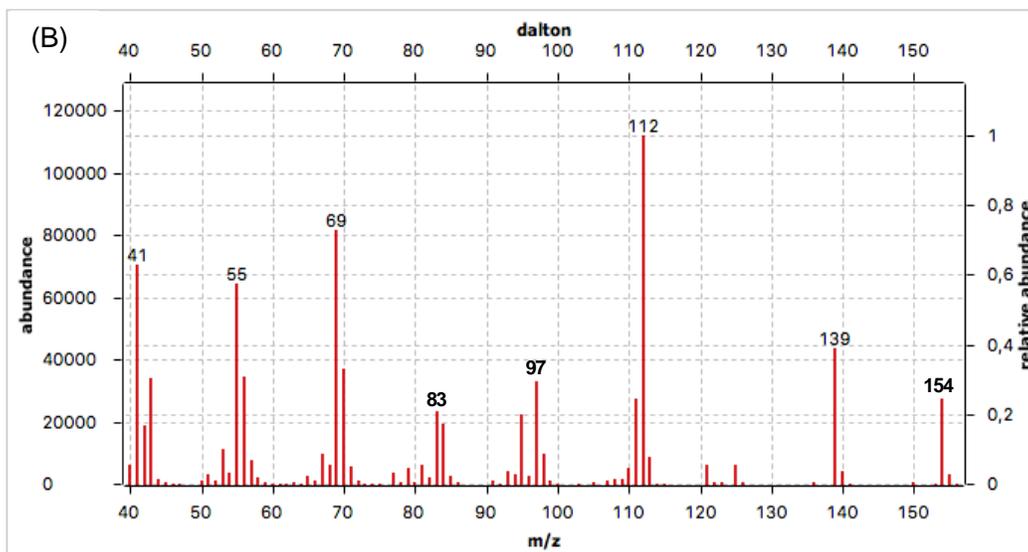
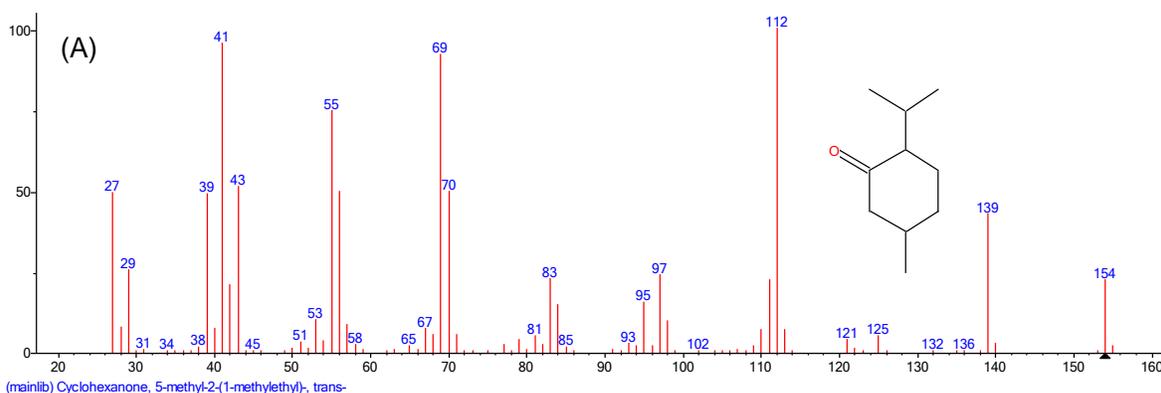


Anexo 7. Identificación del compuesto ISOMENTONA; (A) Corresponde al espectro reportado en la base de datos NITS (CAS: 491-07-6); (B) Corresponde al espectro obtenido experimentalmente; (C) Se muestra la posible ruta de fragmentación con ion molecular ($m/z = 154$); pico base ($m/z = 112$); otros fragmentos ($m/z = 69$ y 55),

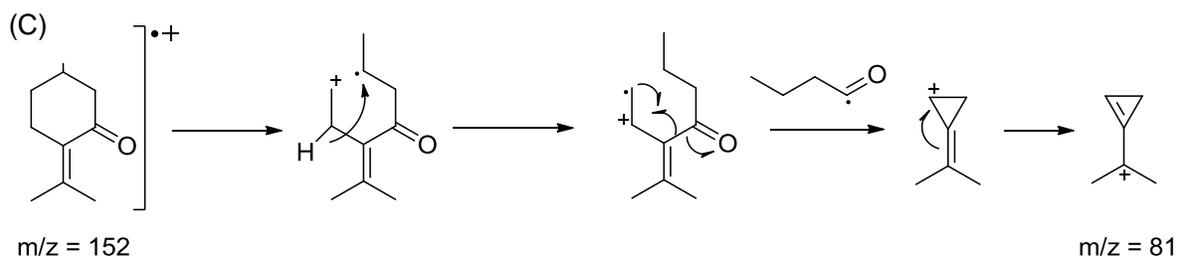
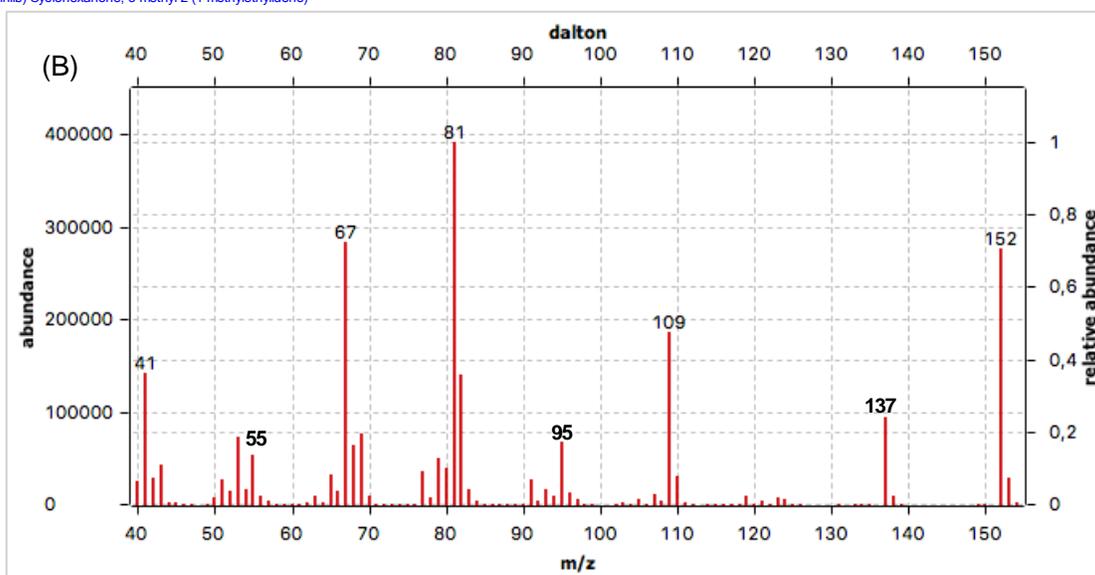
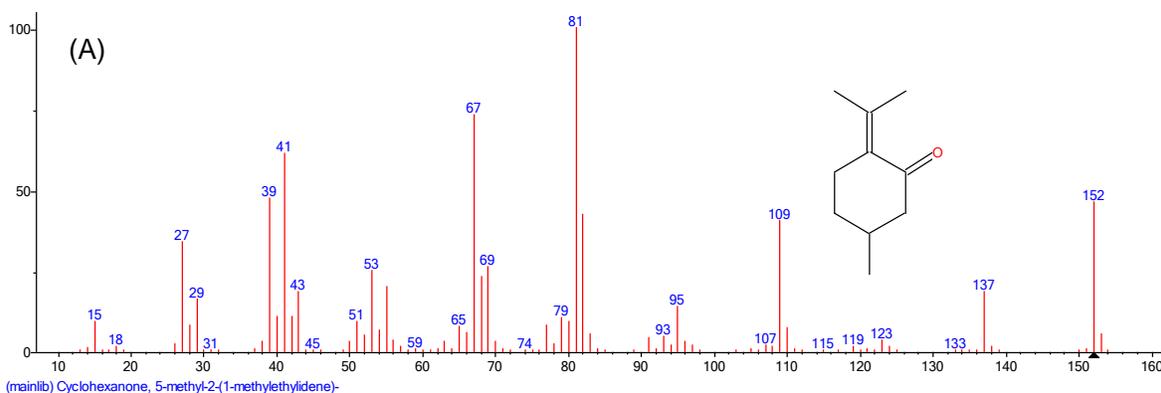




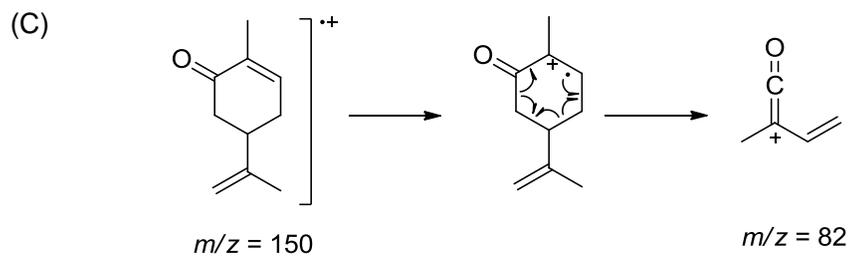
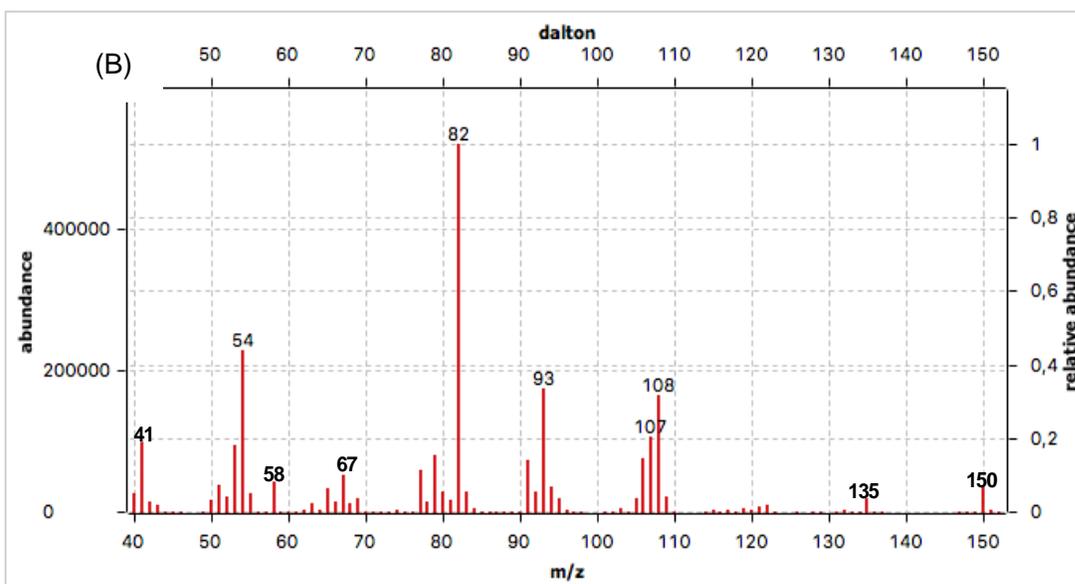
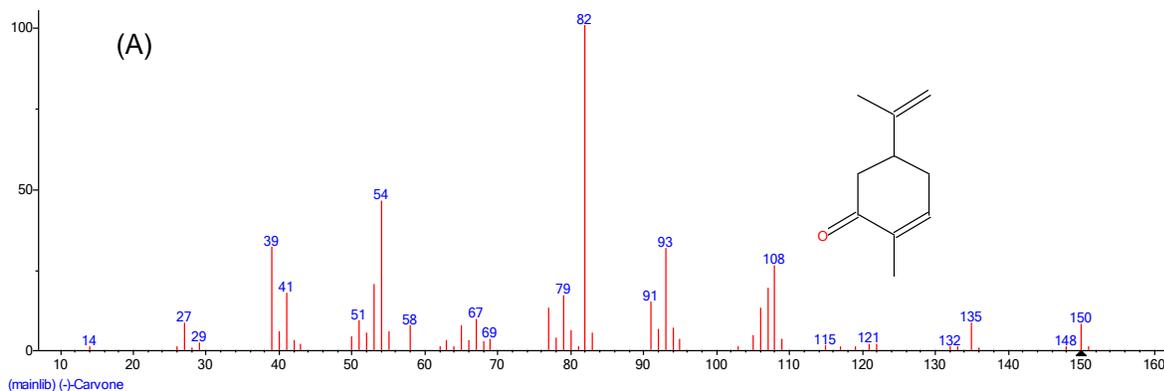
Anexo 8. Identificación del compuesto *p*-MENTONA; (A) Corresponde al espectro reportado en la base de datos NITS (CAS: 89-80-5); (B) Corresponde al espectro obtenido experimentalmente; La posible ruta de fragmentación se muestra en el anexo 7.



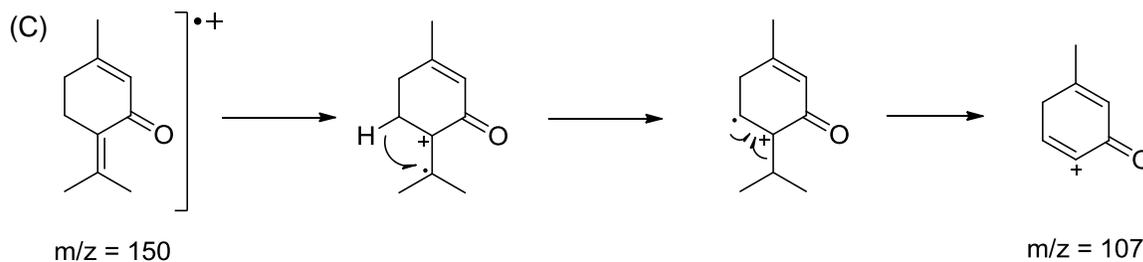
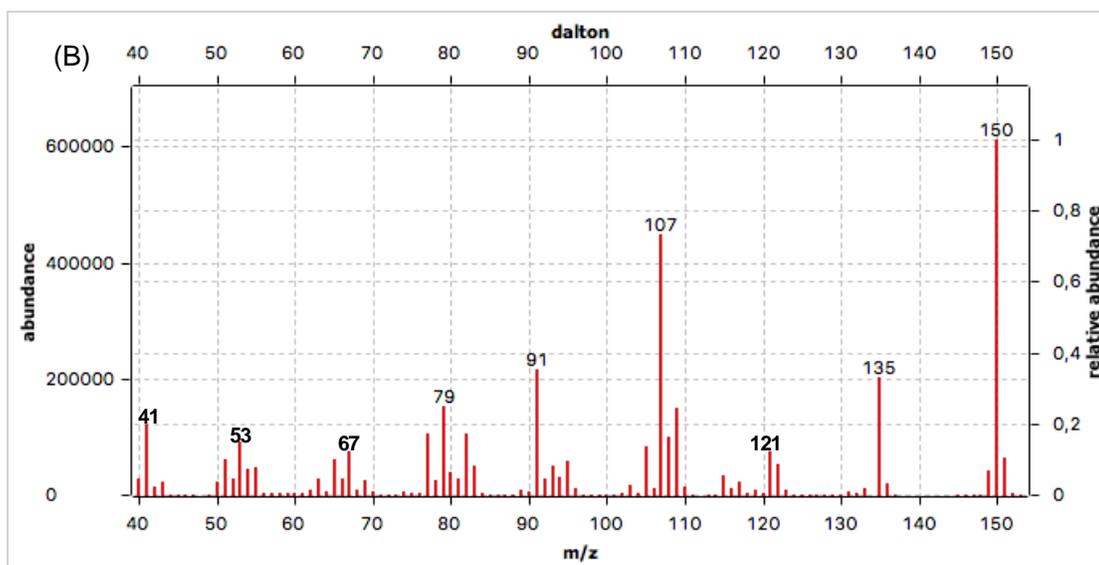
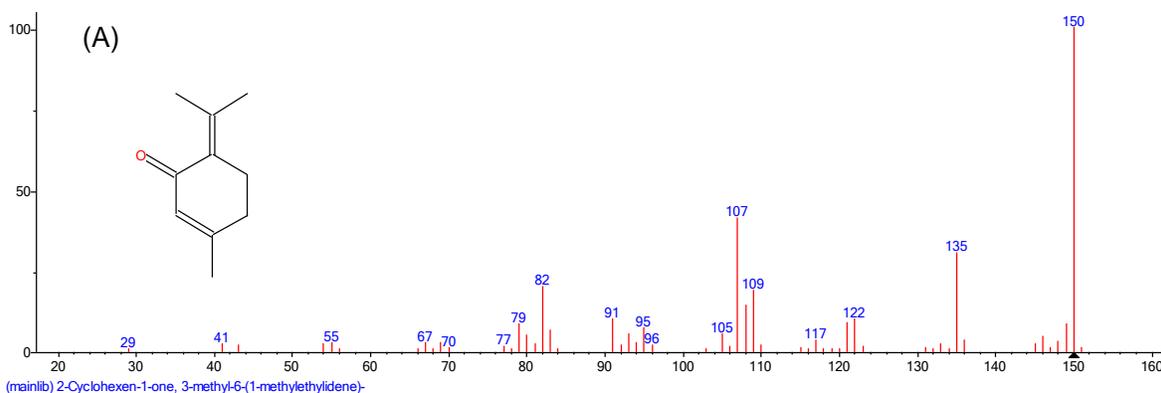
Anexo 9. Identificación del compuesto PULEGONA; (A) Corresponde al espectro reportado en la base de datos NITS (CAS: 89-82-7); (B) Corresponde al espectro obtenido experimentalmente; (C) Se muestra la posible ruta de fragmentación con ion molecular ($m/z = 152$); pico base ($m/z = 81$).



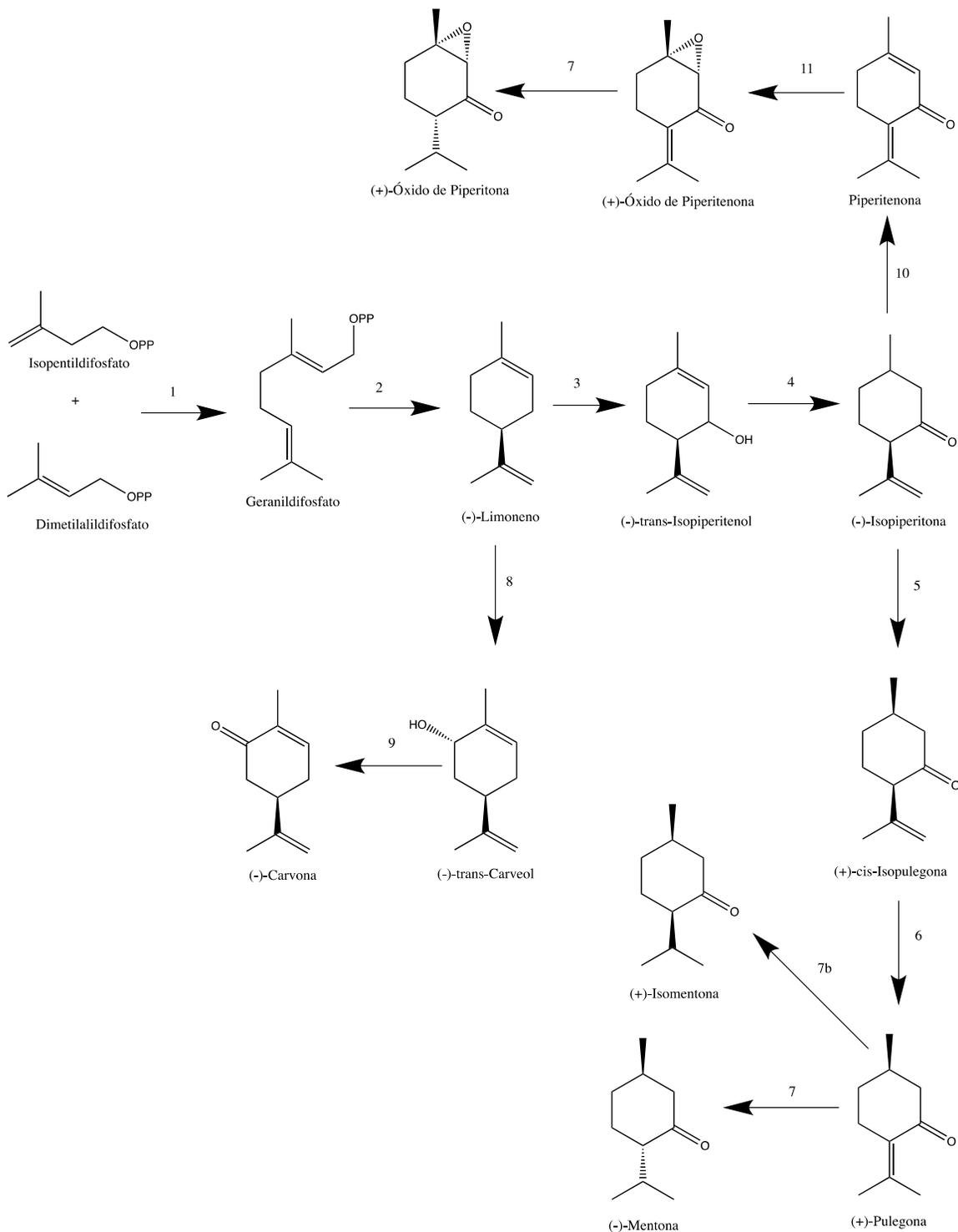
Anexo 10. Identificación del compuesto CARVONA; (A) Corresponde al espectro reportado en la base de datos NITS (CAS: 99-49-0); (B) Corresponde al espectro obtenido experimentalmente; (C) Se muestra la posible ruta de fragmentación con ion molecular ($m/z = 150$); pico base ($m/z = 82$).



Anexo 11. Identificación del compuesto PIPERITENONA; (A) Corresponde al espectro reportado en la base de datos NITS (CAS: 491-09-8); (B) Corresponde al espectro obtenido experimentalmente; (C) Se muestra la posible ruta de fragmentación con ion molecular ($m/z = 150$); pico base ($m/z = 107$).



Anexo 12. Rutas metabólicas para la biosíntesis monoterpénos, mediadas por; (1) geranil difosfata sintasa, (2) limoneno sintasa, (3) citocromo P450, (4) (-)-trans-isopiperitenol dehidrogenasa, (5) (-)-isopiperitenona reductasa, (6) (+)-cis-isoPULEGONA isomerasa, (7) (+)-PULEGONA reductasa, (7b) (+)-PULEGONA reductasa (8) citocromo P450 limoneno-6- hidroxilasa, (9) carveol dehidrogenasa, (10) (2)-cis-isopulegone isomerase, (11) terpenoide epoxidasa [68][104].



Anexo 13. Contenido de carbohidratos de los extractos etanólicos obtenidos por MAE; las cantidades se expresan en mg/100g de ES (\pm RSD).

Extracto	Fructosa	Glucosa	Mio-inositol	Sacarosa
MSC	1523,15 (\pm 17,35) ^a	304,65 (\pm 3,22) ^a	583,52 (\pm 14,79) ^a	2890,08 (\pm 3,92) ^a
MSE	10520,20 (\pm 5,53) ^c	1231,55 (\pm 8,84) ^{b,c}	2981,80 (\pm 12,77) ^d	17394,99 (\pm 3,99) ^b
MPC	11856,80 (\pm 1,73) ^c	4020,10 (\pm 2,42) ^e	2371,43 (\pm 3,30) ^c	62665,67 (\pm 7,61) ^c
MPE	4277,00 (\pm 16,66) ^{a,b}	938,85 (\pm 11,29) ^b	1489,5 (\pm 15,60) ^b	25320,00 (\pm 4,31) ^d
MMTJ	5640,00 (\pm 1,93) ^b	2507,25 (\pm 0,48) ^d	1021,4 (\pm 13,21) ^a	0
MMJB	10472,83 (\pm 34,27) ^c	1420,46 (\pm 31,76) ^c	865,57 (\pm 31,89) ^a	43635,55 (\pm 8,63) ^e

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), $n=3$.

El valor de (p) se reporta a continuación para cada Carbohidrato:

Fructosa	MSE	MSC	MPC	MPE	MMTJ	MMJB
MSE		,000	,881	,003	,019	1,000
MSC			,000	,296	,053	,000
MPC				,001	,003	,866
MPE					,872	,003
MMTJ						,020
MMJB						

Glucosa	MSE	MSC	MPC	MPE	MMTJ	MMJB
MSE		,001	,000	,497	,000	,844
MSC			,000	,020	,000	,000
MPC				,000	,000	,000
MPE					,000	,095
MMTJ						,000
MMJB						

Mio-inositol	MSE	MSC	MPC	MPE	MMTJ	MMJB
MSE		,000	,055	,000	,000	,000
MSC			,000	,004	,240	,655
MPC				,005	,000	,000
MPE					,188	,048
MMTJ						,953
MMJB						

Sacarosa	MSE	MSC	MPC	MPE	MMTJ	MMJB
MSE		,000	,000	,023	,000	,000
MSC			,000	,000	,729	,000
MPC				,000	,000	,000
MPE					,000	,000
MMTJ						,000
MMJB						

Anexo 14. Contenido de Mio-inositol en los extractos etanólicos; Las cantidades se expresan en mg/g de ms (\pm s).

COMPUESTO	Mio-inositol (mg/g _{ms})
MSC	0,35 (\pm 0,06) ^a
MSE	1,41 (\pm 0,08) ^d
MPC	1,07 (\pm 0,03) ^b
MPE	0,85 (\pm 0,13) ^b
MMTJ	0,37 (\pm 0,05) ^a
MMJB	0,45 (\pm 0,11) ^a

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), n=3.