

Extracción de compuestos fitoquímicos de *Tradescantia zebrina* y de *Juglans neotropica* mediante combinación de microextracción en fase sólida y un dispositivo de disco rotatorio

Edgar Allan Polo Osorio

Directora

Dra. Lizbeth Lorena López Parra

Director

Dr. John Jairo Ríos Acevedo

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Maestría en Química Industrial
Cali, Colombia
2023**

Extracción de compuestos fitoquímicos de *Tradescantia zebrina* y *Juglans neotropica* mediante combinación de microextracción en fase sólida y un dispositivo de disco rotatorio

Edgar Allan Polo Osorio

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Química Industrial.**

Directora

Dra. Lizbeth Lorena López Parra

Director

Dr. John Jairo Ríos Acevedo

Línea de Investigación:

Alimentos y fármacos

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en electroquímica y medio ambiente: GIEMA

Universidad Santiago de Cali

Facultad de Ciencias Básicas

Programa de Maestría en Química Industrial

Ciudad, Colombia

2023

IMPACTOS

Los siguientes son los impactos que presentó el Trabajo de Grado:

IMPACTO	PRODUCTOS	BENEFICIARIOS
Económico	Análisis fitoquímico de bajo costo.	Usuarios interesados en aplicar la técnica.
Científico	Información sobre aplicación de nueva metodología de micro extracción en fitoquímica.	Comunidad científica en general, local (regional y nacional).
Técnico	Lixiviados y extractos obtenidos mediante técnica novedosa de micro extracción en fase sólida y un dispositivo de disco rotatorio.	Comunidad científica en general, local (regional y nacional).
Ambiental	Técnica poco contaminante (en muy pocos mililitros de etanol, metanol y agua, de muy fácil disposición final), incluida en la química verde.	Comunidad científica y no científica en general, local (regional y nacional).
Social	Capacitación de talento humano.	Universidad Santiago de Cali.

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS DE *Tradescantia zebrina* Y *Juglans neotropica* MEDIANTE COMBINACIÓN DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y UN DISPOSITIVO DE DISCO ROTATORIO

Edgar Polo Osorio ¹, Milton Rosero-Moreano ², Lorena López Parra ³, John Jairo Ríos Acevedo ⁴.

¹Mg. Químico Industrial, Grupo de Investigación en Electroquímica y Medio Ambiente GIEMA. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia. edgar.polo01@usc.edu.co

² Grupo de Investigación en Cromatografía y Técnicas Afines GICTA, Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Caldas, Calle 65 # 26-10. Manizales, 170004, Colombia.

³Grupo de Investigación en Productos Naturales y Alimentos GIPNA. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad del Valle. Campus Meléndez Calle 13 # 100-00. Santiago de Cali. Colombia.

⁴Grupo de investigación en Electroquímica y Medio Ambiente GIEMA. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia.

RESUMEN

En esta investigación se aplicó una novedosa técnica para extraer metabolitos especializados basada en la combinación de la microextracción en fase sólida (Solid Phase MicroExtraction - SPME) y un dispositivo de disco rotatorio (Rotating Disk Sorptive Extraction - RDSE), sobre las plantas *Juglans neotropica* (nogal) y *Tradescantia zebrina* (panameña). Con el objeto de hallar los fitoquímicos de dichas plantas se empleó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Así, la metodología consistió en determinar primero el solvente adecuado, que fuese cercano a los principios de la química verde, es decir, ecológico, y segundo, determinar las condiciones óptimas de extracción, específicamente: temperatura, agitación y tiempo. Por consiguiente, los solventes ensayados fueron: etanol, metanol, agua y mezclas de etanol-agua y metanol-agua. Se obtuvieron los lixiviados de ambas plantas en metanol como solvente adecuado, en 60 minutos, 40°C y 600 rpm. En tales lixiviados los componentes principales, para *Juglans neotropica* fueron: juglona, neofitadieno y el farneseno; y los componentes principales, para *Tradescantia zebrina* fueron: neofitadieno y fitol. En cuanto a la extracción con SPME, fue mejor metanol-agua (70-30) como solvente adecuado, también en 60 minutos, 40°C y 600 rpm, con lo cual, para *Juglans neotropica*, se extrajeron: nerolidol, fitol, geranil acetona, cariofileno, escualeno, beta elemeno y ácido palmítico. Para *Tradescantia zebrina* se extrajeron: nerilacetona, neofitadieno, escualeno, linoleato de metilo, linolenato de metilo y ácido palmítico. Finalmente, *Juglans neotropica* y *Tradescantia zebrina* fueron usadas para un ensayo preliminar de actividad biológica sobre *Pseudomonas aeruginosa*, comprobando que no se produjo actividad antimicrobiana. El aporte fundamental del presente trabajo es la información obtenida de la aplicación de la combinación de RDSE-SPME-GC-MS sobre *Juglans neotropica* y *Tradescantia zebrina*.

Palabras clave: *Juglans neotropica*; *Tradescantia zebrina*; Fitoquímicos, SPME, RDSE, GC-MS.

EXTRACTION OF PHYTOCHEMICAL COMPOUNDS FROM *Tradescantia zebrina* AND *Juglans neotropica* THROUGH A COMBINATION OF SOLID PHASE MICROEXTRACTION AND A ROTATING DISK DEVICE

ABSTRACT

Abstract, In this research, a novel technique was applied to separate phytochemicals based on the combination of Solid Phase MicroExtraction (SPME) and a rotary disk device (Rotating Disk Sorptive Extraction - RDSE), on the *Juglans neotropica* (walnut) and *Tradescantia zebrina* (Panamanian) plants. In order to find the phytochemicals of these plants, the analysis method of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was used. Thus, the methodology used consisted of first finding out the suitable solvent, which

corresponding to the principles of green chemistry, that is, ecological, and second, probing the optimal extraction conditions, specifically: temperature, agitation and time. Therefore, the solvents tried out were: ethanol, methanol, water and mixtures of ethanol-water and methanol-water. The leachates of both plants were obtained in methanol as a suitable solvent, in 60 minutes, 40°C and 600 rpm. In such leachates the main components for *Juglans neotropica* were: juglone, neophytadiene and farnesene; and the main components, for *Tradescantia zebrina* were: neophytadiene and phytol. Regarding the extraction with SPME, methanol-water (70-30) was better as a suitable solvent, also in 60 minutes, 40°C and 600 rpm, with which, for *Juglans neotropica*, the following were extracted: nerolidol, phytol, geranyl acetone, caryophyllene, squalene, beta elemene and palmitic acid. For *Tradescantia zebrina*, the following were extracted: nerylacetone, neophytadiene, squalene, methyl linoleate, methyl linolenate and palmitic acid. Finally, *Juglans neotropica* and *Tradescantia zebrina* were used for a preliminary test of biological activity on *Pseudomonas aeruginosa*, verifying that no antimicrobial activity was produced. The fundamental contribution of this work is the information obtained from the application of the combination of RDSE-SPME-GC-MS on *Juglans neotropica* and *Tradescantia zebrina*.

Keywords: *Juglans neotropica*; *Tradescantia zebrina*; Phytochemicals, SPME, RDSE, GC-MS.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales ha sido una actividad humana histórica, mediante la cual se han desarrollado diversos métodos de extracción, desde básicos hasta súper avanzados. Entre los básicos o tradicionales están: la maceración^{1,2}, la infusión², la digestión², la decocción^{2,3}, la percolación, entre otros, donde la percolación requiere de gran cantidad de solvente^{1,3}. Entre los avanzados tenemos: microondas^{1,4}, la sonicación (ultrasonido)²⁻⁵ y demás. Finalmente, los métodos súper avanzados comprenden: Accelerated Solvent Extraction (ASE)^{2,6,7}, Supercritical Fluid Extraction (SFE)⁸, Solid Phase Micro-Extraction (SPME)^{3,9-11}, y algunos más. De estos últimos, la SPME involucra los procesos de adsorción y desorción de los compuestos de interés, en este caso fitoquímicos, sobre un material polimérico, el cual puede ser introducido en la muestra (adsorción líquido-sólido) o estar fuera de ella (adsorción gas-sólido)¹¹. El material adsorbente está dispuesto sobre un alambre muy fino, de metal, y a este conjunto se le llama fibra. La desorción de los analitos y su posterior análisis cualitativo se hace por cromatografía, ya sea líquida o gaseosa^{12,13}. De este método o técnica se deriva la extracción por adsorbente en disco rotatorio (Rotating Disk Sorbent Extraction – RDSE)¹⁴, en la cual se utiliza un disco hecho de politetrafluoroetileno (teflón), al cual se puede acoplar una lámina de polímero adsorbente en una de sus caras^{14,15} o bien, el disco puede tener una cavidad en uno de sus lados para albergar al polímero adsorbente, el cual se fija con una lámina tipo filtro (o papel filtro) y un anillo de teflón^{14,16,17}.

La técnica de RDSE se ha utilizado para determinar y cuantificar compuestos químicos orgánicos volátiles y no volátiles en muestras acuosas, como en la determinación de parabenos, usando cromatografía líquida HPLC¹⁸ y GC-MS¹⁹, o para determinar contaminantes orgánicos en aguas²⁰. También, para determinar estrógenos y sus metabolitos en orina mediante HPLC-MS²¹.

Se ha utilizado SPME y RDSE de forma simultánea al determinar bifenilos policlorados totales en sólidos, colocando la muestra sólida en polvo (matriz) en la cavidad del disco, para que los compuestos sean lixiviados en agua y a la vez, en ésta se sumerge la fibra de SPME, la cual extrae mediante adsorción a los analitos, que son luego desorbidos y analizados mediante GC-MS²². Con el mismo procedimiento se han determinado pesticidas en arroz²³. Si bien, la técnica de SPME se ha aplicado en las extracciones de: compuestos fitoquímicos para alimentos^{24,25}, metabolitos secundarios volátiles de aceites esenciales de verbenáceas²⁶, o en la identificación de compuestos orgánicos volátiles biogénicos de las hojas de tres especies de *Eucalyptus*²⁷, e incluso hay registro del uso de SPME-GC-MS para hallar la composición química de la nuez (*Juglans regia*) y su correlación con el perfil de sabor del aceite de nuez, mejorado con un pre tratamiento de tostado²⁸, entre muchas otras, realmente es muy poca la documentación sobre lixiviación o extracción de fitoquímicos mediante RDSE. Solo se conoce un caso de uso de RDSE para extraer e identificar los fitoquímicos: rutina y quercetina, a partir de las flores de *Bidens pilosa*, y esta técnica se comparó con la de Soxhlet²⁹. Tampoco hay evidencia de

aplicación simultánea de SPME y RDSE en el estudio de fitoquímicos, y mucho menos específicamente de hojas de *Tradescantia zebrina* y de *Juglans neotropica*. Por esto es natural que surja la cuestión de si es o no posible implementar una nueva metodología para la extracción de fitoquímicos, específicamente de *Tradescantia zebrina* y de *Juglans neotropica*, que genere un soporte científico a la medicina tradicional colombiana.

Así pues, en los compuestos fitoquímicos yace el origen de los muchos usos de las plantas, como por ejemplo en alimentos³⁰, en medicina³¹, entre otros. Luego, los fitoquímicos poseen más de una definición³². La más utilizada, y a la cual se ciñe la presente investigación, es que son compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas, por eso también se les llama metabolitos secundarios o metabolitos especializados³². Ejemplos de fitoquímicos son: los alcaloides, los flavonoides, compuestos fenólicos, terpenoides, esteroides, saponinas, y glicósidos^{31,33}.

La *Tradescantia zebrina* es una planta originaria del continente americano, de uso generalmente ornamental³⁴, pero con actividades antibacterial y antioxidante^{35,36}; y con aplicación etno-farmacológica en Venezuela y Guatemala, para controlar los niveles de glucemia en personas con diabetes mellitus^{37,38}, y con reportes de presencia, en sus hojas, de saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos³⁹, esteroides⁴⁰ y terpenoides^{41,42}. Aunque no hay reportes de compuestos identificados por GC-MS para *T. zebrina*, si los hay para las hojas de *Tradescantia pallida*, que es una especie bastante cercana. Por ejemplo, en la composición del aceite esencial de las hojas de *T. pallida*, se identificó, por GC-MS, el óxido de cariofileno, entre otros sesquiterpenos⁴³. También, en el extracto de hojas de *T. pallida*, se identificó, por GC-MS, la 2,5-di-ter-butil-1,4-benzoquinona, (un derivado de los compuestos fenólicos), entre otros distintos fitoquímicos⁴⁴.

Por otra parte, *Juglans neotropica* es también de origen americano, siendo un árbol comúnmente conocido como nogal, principalmente apreciado por su madera, aunque sus hojas son utilizadas en medicina tradicional colombiana para tratar diversas afecciones, entre ellas la diabetes^{38,45-47}. Se ha reportado la presencia de taninos y antraquinonas (derivados de los compuestos fenólicos) en sus hojas⁴⁸. Si bien no hay reportes de compuestos identificados por GC-MS para *J. neotropica*, si los hay para *J. regia*, y para *J. nigra*, especies que son bastante cercanas. Así, Por ejemplo, en los aceites esenciales de las hojas de *J. regia*, y de *J. nigra*, se identificó, por GC-MS, el fitol (en *J. regia*), y el farneseno (en *J. nigra*) entre muchos otros compuestos terpenoides en ambas especies⁴⁹.

La implementación de la combinación de las metodologías SPME y RDSE es un aporte a la extracción de fitoquímicos, ya que es un sistema analítico miniaturizado, que consume pocas cantidades de solventes, los cuales se restringen a metanol, etanol y agua, de bajo impacto medio ambiental, con un tiempo de análisis relativamente corto. Dado que la mayoría de compuestos que se reportan, hallados por GC-MS, en *J. neotropica* son apolares, y en *T. zebrina* resultan ser ligeramente polares, la fibra de SPME usada fue de polidimetilsiloxano (PDMS)⁵⁰, porque esta fibra es apolar. Adicionalmente, debido a la abundante información sobre las actividades biológicas de *J. neotropica*, y de *T. zebrina*^{44,51}, como parte de la investigación, se incluye un ensayo preliminar antibacterial, específicamente frente a *Pseudomonas aeruginosa*, con el propósito de confirmar esta propiedad biológica, pues esta bacteria es de especial interés en el manejo de infecciones hospitalarias⁵². Por todo lo anterior el presente artículo está encaminado a presentar los resultados de la implementación novedosa de la combinación de las técnicas SPME y RDSE para la extracción y análisis de fitoquímicos de *Tradescantia zebrina* y de *Juglans neotropica*, permitiendo caracterizarlos mediante GC-MS.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales y reactivos.

Se empleó agua tipo I para el procedimiento de lixiviación y optimización del método, con una resistividad de 18,2 MΩ cm, obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EE. UU.). Se utilizaron etanol y metanol grado HPLC obtenidos de Merck (Kenilworth, N. J., EE.UU) para la lixiviación de las muestras y la optimización del método. Con estos solventes se prepararon mezclas hidroalcohólicas (etanol-agua, 70:30 y metanol-agua, 70:30). Para la SPME se utilizó un soporte de fibra manual y una fibra de Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm, (Agilent), obtenida en Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.). Antes de su uso, la fibra PDMS se acondicionó en el puerto de inyector GC a 250 ° C durante 30 minutos, de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

2.2. Instrumentación.

Los lixiviados y los extractos obtenidos con el disco RDSE y con la fibra de SPME, respectivamente, fueron analizados en un equipo GC-MS (Shimadzu Nexis GC-2030, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Con detectores termoiónico de llama (FTD) y de ionización de descarga de barrera (BID); con inyector Split/splitless. Se utilizó helio (99,996% de pureza) como gas portador a un caudal de 1,46 mL min⁻¹. Para la separación de los fitoquímicos se usó una columna capilar SH – RXI - 5sil - MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), de baja polaridad, con fase de sílice fundida (crossbond silarylene phase 1,4-bis(dimethylsiloxy) phenylene dimethyl polysiloxane) proveniente de Shimadzu Corporation (Kyoto, Japón). La temperatura del puerto de inyección inicialmente a 200°C, luego la columna a 50°C durante 5 minutos, aumentó a una velocidad de 10°C/min durante 10 minutos hasta llegar a 250°C y se mantuvo durante 5 min. La ionización de masas se realizó con un voltaje de ionización electrónica (EI) de 70 eV, siendo la fuente de iones por impacto electrónico. La monitorización de exploración completa se llevó a cabo en el rango de masas de 45 a 500 uma, con temperaturas de fuente de iones de 290 °C, y analizador de masas de cuadrupolo. La identificación de compuestos se realizó por medio de la librería: instituto nacional de tecnologías y estándares (NIST), de espectros del equipo^{53,54}.

2.3. Material vegetal.

Las muestras de *Tradescantia zebrina* (Figura 1) y de *Juglans neotropica* (Figura 2) fueron adquiridas en la plaza de mercado de Alameda en Cali (3°26'4"N 76°32'8"W). Las hojas en mejor estado fueron seleccionadas, limpiadas y pesadas, para posterior secado, a 40°C durante 48 horas para *T. zebrina*, y a 40°C durante 24 horas, para *J. neotropica*, y enseguida triturado, con el fin de aumentar su área de superficie, con un tamaño de partícula de aproximadamente 2000 µm (10 mesh).

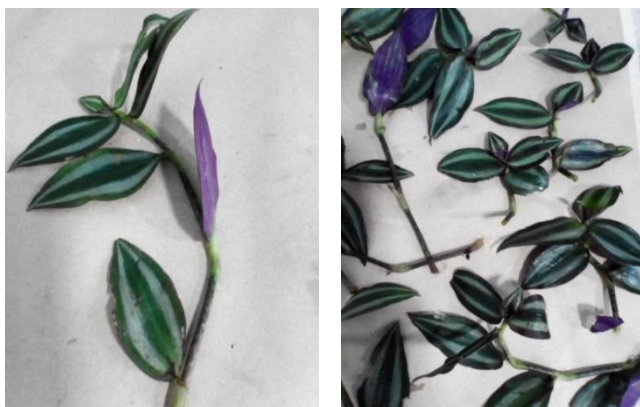


Figura 1. Muestras de *Tradescantia zebrina*.



Figura 2. Muestra de *Juglans neotropica*.

2.4. Obtención de lixiviados y extractos.

El proceso de lixiviación se realizó usando la metodología de RDSE, que involucra un disco de teflón de 1,5 cm de diámetro externo (que incluye en su interior una barra magnética de agitación). El disco posee una cavidad de 0,44 cm³, en su parte superior. En ésta cavidad se depositaron homogéneamente 90,0 mg de muestra seca y en polvo de *Juglans neotropica* (*J. neotropica*). Esta muestra se cubrió con papel filtro cuantitativo Whatman #1, de 1,5 cm de diámetro, 180 µm de grosor y 11 µm de tamaño promedio de poro, Whatman (Múnich, Alemania), y se selló el disco con un anillo de teflón (O-ring). (Figura 3)²².

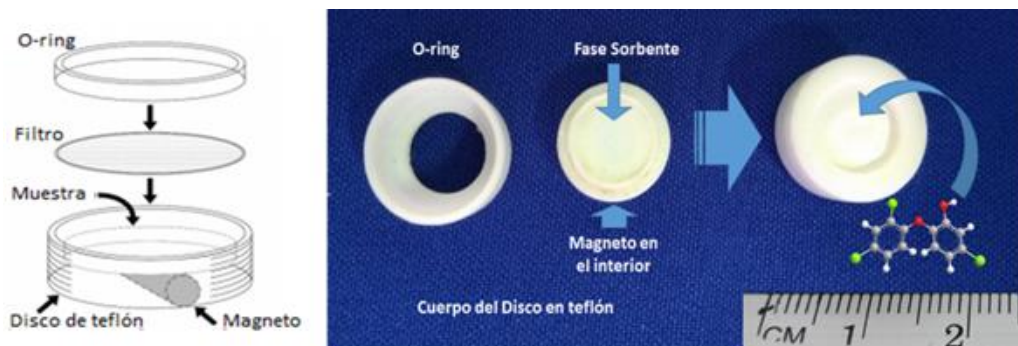


Figura 3. Disco usado para extraer (lixiviar) por disco rotatorio (RDSE)²²

Luego el disco fue insertado en un vial de vidrio de 40,0 mL de capacidad, (9,5 cm altura por 2,5 cm diámetro) y se añadió en éste 10,0 mL de solvente. La lixiviación de fitoquímicos desde el dispositivo RDSE, ocurrió sobre una plancha calentadora-agitadora a 600 rpm y 40°C durante un tiempo de pre-equilibrio/lixiviación de 60 minutos, valores obtenidos de acuerdo con la metodología (Tabla 1). De forma paralela, con un segundo disco y un segundo vial, se procedió exactamente igual con la muestra seca y en polvo de *Tradescantia zebrina* (*T. zebrina*).

2.5. Extracción en fase sólida (SPME)

Para conseguir la mejor extracción se utilizó el lixiviado optimizado, es decir, aquél que mostró el mayor número de picos cromatográficos y entre estos, mayor número de fitoquímicos. En este lixiviado se introdujo una fibra de PDMS (polidimetilsiloxano) de 100 µm, siendo este, el sistema para la extracción SPME por inmersión directa durante un tiempo de 60 min, a una temperatura de 40°C, con agitación continua de la muestra a 600 rpm, de acuerdo con la metodología (Tabla 1). La desorción de los fitoquímicos desde la fibra PDMS se realizó en el puerto de inyección de GC a 200 ° C durante 10 minutos. En la figura 4 se presenta el montaje utilizado en el proceso de lixiviación/extracción de los fitoquímicos.

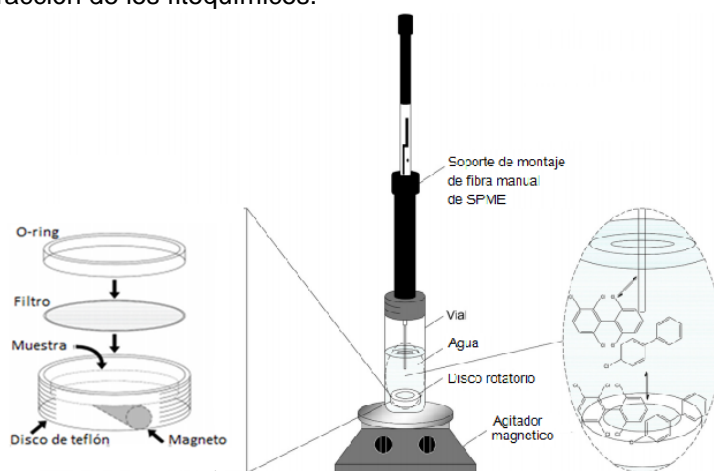


Figura 4. Montaje experimental para la lixiviación con RDSE y extracción con SPME²²

2.6. Diseño experimental para la optimización de la metodología.

Para conseguir la mejor técnica de lixiviación se hicieron ensayos con los solventes: etanol, metanol, agua, y con mezclas: metanol-agua (70:30) y etanol-agua (70:30). Luego de optimizado el solvente, se hicieron ensayos con tiempos de: 30, 60 y 120 minutos, con temperaturas de 20, 30 y 40°C, y con agitaciones: 300, 600 y 1200 revoluciones por minuto (rpm), en un diseño experimental tipo N + (N - 1), como se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Diseño experimental N + (N - 1).^{55,56}

Ensayo	1		2			3			4					
	Solvente					Tiempo (min)			Temperatura (°C)			Agitación (RPM)		
	Etanol	Metanol	Metanol 70:30	Etanol 70:30	Agua	30	60	120	20	30	40	300	600	1200
1	+						+				+			+
2		+					+				+			+
3			+				+				+			+
4				+			+				+			+
5					+		+				+			+
6			+			+					+			+
7			+					+			+			+

8	+	+	+		+
9	+	+		+	+
10	+	+		+	+
11	+	+		+	+

Como se puede apreciar en la Tabla 1, los ensayos 1 a 5 corresponden a la optimización del solvente; los ensayos 6 y 7 son la optimización del tiempo ya con un solvente definido; los ensayos 8 y 9 son la optimización de la temperatura ya con un solvente y un tiempo definidos, y los ensayos 10 y 11 son la optimización de la agitación ya con: un solvente, un tiempo y una temperatura definidos. Así, la extracción con la fibra PDMS fue el cromatograma con el solvente óptimo, junto con las demás variables. Como ya se mencionó, para determinar el mejor solvente se valoró aquel que mostró el mayor número de picos cromatográficos y entre estos, mayor número de fitoquímicos.

2.7. Maceración.

Se realizó un sencillo procedimiento de maceración para comparar con la técnica de disco, RDSE-GC-MS. Se tomaron 100,0 mg de *J. neotropica* y 100,0 mg de *T. zebrina*, secos y en polvo. Se adicionó a cada muestra 10,0 mL de metanol de grado HPLC, en sus respectivos morteros con sus mazos. Se hizo la mezcla durante 10,0 minutos y enseguida cada una fue transferida a su respectivo Erlenmeyer de 100,0 mL, dejándolas en reposo por 12 horas. Finalmente, se filtraron por gravedad los solventes, de cada una, y éstos se inyectaron en el GC-MS.

2.8. Ensayo preliminar de actividad biológica.

Se utilizaron las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* proporcionadas por el Departamento de Botánica de la Universidad del Valle. Tales cepas fueron aisladas de muestras de suelo, de acuerdo con los estándares del Departamento de Botánica. Los extractos metanólicos secos de *T. zebrina* y de *J. neotropica* fueron re-suspendidos en 2,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), teniendo así una concentración de 124,6 mg/mL de *T. zebrina* y de 302,8 mg/mL de *J. neotropica*. El tratamiento de las cepas se realizó mediante siembra masiva tomando con el asa una colonia representativa de cada una en una placa petri que contenía 5,0 mL de Agar Tripticasa de Soya (TSA). Luego de esto, se agregaron 8,0 µL de cada uno de los extractos de *T. zebrina* y de *J. neotropica* y de Ampicilina (AMP) a una concentración de 50,0 mg/mL, como control positivo. El control negativo fue metanol. Finalmente, se incubaron las placas a 37°C en una incubadora Kryoven durante 24-48 h. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para las hojas frescas y en buen estado de *T. zebrina* se encontró en promedio un 91,5 % de humedad (en peso húmedo), y para las respectivas hojas de *J. neotrópica* el porcentaje de humedad (en peso húmedo) fue de 47,2 %. Es claro, entonces, que las hojas de *T. zebrina* contienen más agua que las de *J. neotrópica*, lo cual es lógico, pues la primera es una planta herbácea, es decir, de muy poca altura, hasta 60,0 cm⁵⁷, mientras la segunda es un árbol, de hasta 30,0 m de altura⁵⁸, por lo cual administran el agua de forma diferente, ya que sus necesidades hídricas son diferentes. Aparte, como se mencionó en la metodología (sección 2.4), se depositaron 90,0 mg de hojas secas y en polvo de *J. neotropica* en el disco de RDSE, éste se introdujo al vial y se añadieron 10,0 mL de etanol como primer solvente para lixiviar los compuestos de la planta. Siguiendo entonces, el diseño experimental (Tabla 1), el mismo procedimiento se realizó para cada uno de los solventes, obteniendo así, cinco lixiviados, los cuales fueron analizados por GC-MS, bajo las condiciones descritas en la sección 2.2 de la metodología. Para determinar el mejor lixiviado, y por ende el mejor solvente, se valoró aquel que mostró el mayor número de picos cromatográficos y entre estos, el mayor número de fitoquímicos. De los cinco cromatogramas, el de metanol se mostró como el mejor solvente para la lixiviación, pues dio mayor número de picos. También en cada cromatograma se buscó entre los picos el mayor número de compuestos de tipo fitoquímico, siendo de nuevo el de metanol con el mayor número de fitoquímicos, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Optimización del solvente para *J. neotropica*.

Solvente	Picos totales	Picos de interés
Etanol	15	2
Metanol	35	3
Metanol-Agua	23	2
Etanol-Agua	9	0
Agua	4	1

El criterio usado para seleccionar los denominados picos de interés fue el índice de similitud (similarity index, S.I) reportado en cada uno de los espectros de masas, según la librería de espectros del equipo GC-MS, además de la coherencia de sus picos base. De esta manera, aquel pico que poseía un alto S.I (por encima de 60) y que correspondía a un núcleo de metabolito secundario, era seleccionado como pico de interés. Así, los picos de interés en el lixiviado con metanol corresponden a 3 compuestos: el farneseno, la juglona y el neofitadieno. Todos los compuestos que aparecieron con los otros solventes se relacionan en la Tabla 3, y los tres compuestos en mención se ilustran en la figura 5.

Tabla 3. Compuestos (picos de interés) de *Juglans neotropica* obtenidos con todos los solventes.

Etanol		Metanol		Metanol-agua		Etanol-agua		Agua	
SI	Compuesto	SI	Compuesto	SI	Compuesto	SI	Compuesto	SI	Compuesto
69	2,5-di-ter-amilhidroquinona	81	Juglona	83	Neofitadieno	32	Fern-9(11)-en-28-ol	63	2,5-di-ter-amilhidroquinona
68	L-ascorbato de octadecanoilo	77	Farneseno	62	Tetrahidro-lavandulol				
		68	Neofitadieno						

Es claro que los compuestos terpenoides son típicos de las hojas de plantas, y específicamente para el nogal, la juglona es característica, pues el nombre de este compuesto viene del nombre del género de la planta: "*Juglans*", y está comprobada la presencia de la juglona en la *Juglans regia*, (nogal inglés o nogal persa)^{59,60}, por lo cual, es natural hallarlo en la especie *Juglans neotrópica* (cedro negro, cedro nogal, nogal bogotano o *Juglans colombiensis*)⁶¹. Ahora, la presencia de los dos compuestos en etanol y de los otros dos en metanol-agua, es interesante, pues todos ellos son derivados de compuestos tipo quinonas, del ácido ascórbico, y de los terpenoides, es decir, característicos fitoconstituyentes de las hojas de *Juglans regia*⁶², y por extensión de *J. neotrópica*. Incluso el primero que aparece en etanol también lo hace en agua. Se nota pues, que aunque estos núcleos de metabolito secundario aparecen en etanol y metanol-agua (e incluso agua), se escoge el solvente que presenta el mayor número de estos núcleos.

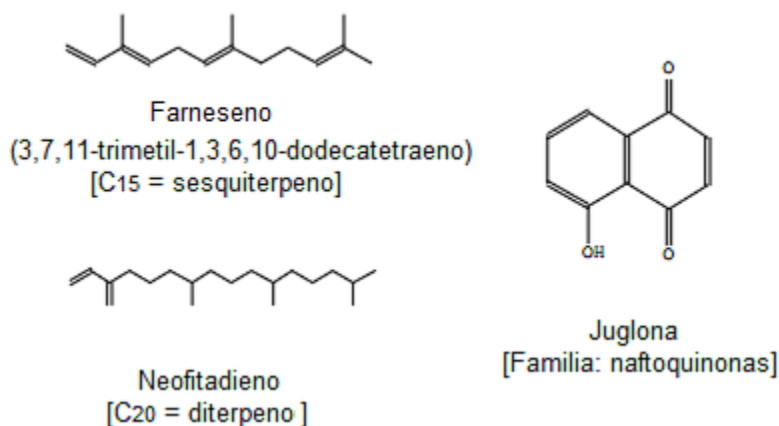


Figura 5. Estructuras de fitoquímicos de *J. neotrópica* lixiviados con metanol.

Es de notar que el tipo de solvente utilizado desempeña un papel fundamental en la lixiviación, pues entre los cinco solventes examinados, ha sido el metanol el que presentó la polaridad adecuada para estos fitoquímicos terpenoides, quinonas e incluso indicios de flavonoides, pues para la extracción de compuestos fenólicos el metanol es el solvente adecuado⁵⁹. Claramente el metanol es muy polar y se sabe que el agua es el solvente más polar en cromatografía, luego es interesante notar que con la mezcla metanol-agua aparecieron dos compuestos tipo terpeno, que no son tan polares.

Luego, se procedió a averiguar las condiciones óptimas de tiempo, temperatura y agitación, de acuerdo con la metodología planteada. Tales resultados aparecen en la tabla 4.

Tabla 4. Optimización de temperatura, tiempo y agitación.

Variable		<i>Juglans neotropica</i>		<i>Tradescantia zebrina</i>	
		Picos totales	Picos de interés	Picos totales	Picos de interés
T (°C) (En MeOH)	20	19	0	17	0
	30	41	0	7	0
	40	35	3	22	1
Tiempo (min) (MeOH y 40°C)	30	29	2	29	0
	60	35	3	22	1
	120	53	1	15	0
Agitación (rpm) (MeOH, 40°C y 60 min)	300	28	0	30	1
	600	35	3	22	1
	1200	26	0	10	0

Para *J. neotropica* se evidencia que el mejor tratamiento es a T = 40°C, tiempo = 60 min, y agitación = 600 rpm, pues la mayor cantidad de picos de interés aparece en estas condiciones.

De la Tabla 4 se observa que a T = 30°C aparecen 41 picos totales, o sea más picos que a 40°C (con 35); pero de esos 41 picos no hay ninguno que sea de interés, 0 (cero) picos de interés, por lo cual la condición de T = 30°C no se escoge. Igual sucede con tiempo = 120 min (53 picos totales), que solo muestra 1 (un) pico de interés, mientras que con tiempo = 60 min aparecen 3 (tres) picos de interés. Es de anotar, que se toma el valor de 60% como límite, ya que si se toman valores superiores a 70, 80 o 90%, la cantidad de compuestos de interés se reduce de 3 a 2, a 1 o incluso a 0 (cero). Dicho esto, si por ejemplo se tomara 80% de similitud como límite, la Tabla 3, quedaría reducida a 1 (un) compuesto en metanol, la juglona (S.I de 81) y 1 en metanol-agua, el neofitadieno (S.I de 83). Así, entre estos dos, lo más lógico sería elegir metanol-agua, pues el neofitadieno tiene mayor S.I. Entonces, la idea es poder incluir al menos dos compuestos más. Por eso el S.I de 60 que permite elegir al metanol.

En cuanto al análisis de los factores temperatura (T), tiempo (min) y agitación (rpm), como se ve en la Tabla 4, a 20°C y a 30°C no aparecen picos de interés, solo a 40°C hay 3 (tres) picos, que son las tres sustancias halladas (farneseno, neofitadieno, juglona). Para el factor tiempo (min), aparecen 2 (dos) picos de interés a 30 min, que corresponden a 2,5-di-t-amilo-p-benzoquinona (S.I = 90) y florobutirofenona (S.I = 69), que es un polifenol. Y a 120 min solo aparece 1 (un) pico de interés, que es el neofitadieno (S.I = 84). Finalmente, tanto para la agitación a 300 rpm como a 1200 rpm no aparecen picos de interés, solo a 600 rpm que muestra las tres sustancias ya mencionadas. Por eso, las condiciones óptimas son 40°C, 60 min y 600 rpm. Toda esta información se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Compuestos notables por cada variable (T, min, rpm) para *J. neotropica*.

20°C		30°C		30 min		120 min		300 rpm		1200 rpm	
SI	Com-puesto	SI	Com-puesto	SI	Compuesto	SI	Compuesto	SI	Com-puesto	SI	Com-puesto
-	-	-	-	90	2,5-di-t-amilo-p-benzoquinona	84	Neofitadieno	-	-	-	-
				69	Florobutilfenona						

Aparte, en cuanto a la optimización del solvente para lixiviar a *T. zebrina*, siguiendo el diseño experimental (Tabla 1), mediante análisis por GC-MS, buscando el cromatograma con la mayor cantidad de picos de interés, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Optimización del solvente para *T. zebrina*.

Solvente	Picos totales	Picos de interés
Etanol	20	1
Metanol	22	1
Metanol-Agua	10	2
Etanol-Agua	8	1
Agua	8	0

De acuerdo con la Tabla 6, aparece un mayor número de picos totales con el metanol; sin embargo, aparecen más picos de interés en metanol-agua (2 picos) que en metanol (1 pico), como se ve para cada solvente en la Tabla 7

Tabla 7. Compuestos (picos de interés) de *T. zebrina* obtenidos con todos los solventes.

Etanol		Metanol		Metanol-agua		Etanol-agua		Agua	
SI	Compuesto	SI	Compuesto	SI	Compuesto	SI	Compuesto	SI	Compuesto
69	Neofitadieno	91	Neofitadieno	80	Palmitato de Metilo	70	Fitol	41	Timol (TMS derivado)
		58	Fitol	69	Ácido n-hexadecanoico				
				59	Dihidrocarvona				
				58	Dihidrocarveol				

Son interesantes las dos primeras sustancias que aparecen con metanol-agua; donde la primera es un éster, y la segunda es un ácido carboxílico, los cuales pueden ser metabolitos de plantas, mas no necesariamente metabolitos secundarios, pues no presentan estructuras complejas como terpenos, quinonas, etc., que son de mayor interés, por cuanto estos últimos si son metabolitos especializados, de acuerdo con lo establecido en la presente investigación. También, de acuerdo con el criterio del S.I superior a 60%, la dihidrocarvona y el dihidrocarveol no se toman en cuenta, pero se mencionan por ser monoterpenos. Asimismo, el fitol que aparece con metanol, tampoco podría tomarse en cuenta. Es por esto que metanol-agua tiene 2 (dos) picos de interés y metanol solo 1 (uno), resultando entonces, que todos los solventes presentan al menos 1 (un) compuesto de interés, siendo el criterio del S.I superior a 60%, el que define al metanol como solvente optimo, ya que el neofitadieno obtenido con este, tiene el mayor valor de S.I (91), entre todos. El neofitadieno es un compuesto tipo terpenoide, que también apareció en las hojas de *J. neotropica*, por lo cual es de interés como fitoquímico. Finalmente, aunque el fitol no se pueda tomar en cuenta, es una sustancia notable, pues es una cadena de 16 carbonos, con metilos en los carbonos 3, 7, 11 y 15 y con un doble enlace en C-2; es la típica cadena lateral de la estructura de la clorofila⁶³, prácticamente es un terpenoide, probablemente resultado de la fragmentación de la clorofila. Las estructuras de todas estas sustancias se pueden ver la figura 6.

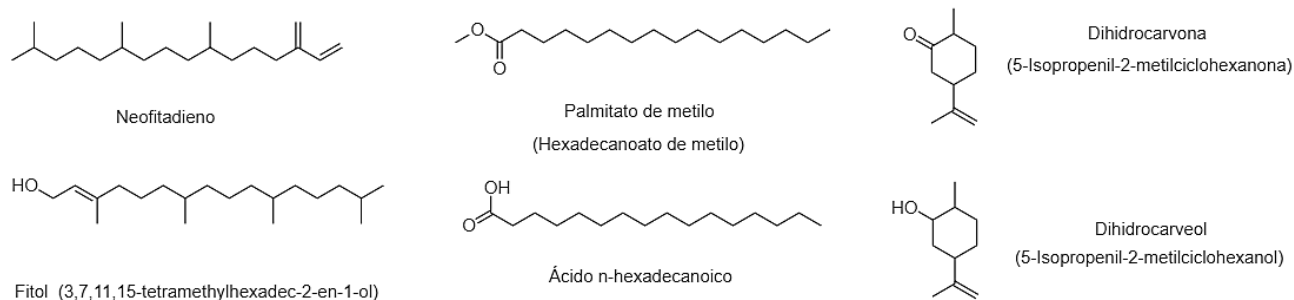


Figura 6. Estructuras de fitoquímicos de *T.zebrina* lixiviados con metanol y con metanol-agua.

Es importante anotar, que para ambas plantas, aunque el metanol termine siendo el solvente óptimo, la mezcla metanol-agua también lixivia compuestos de interés, siendo entonces una segunda opción como solvente para lixiviar. Luego, aplicando la metodología (Tabla 1), se optimizaron las condiciones de temperatura, tiempo y agitación para *T. zebrina*, notándose también que el mejor tratamiento es a $T = 40^{\circ}\text{C}$, tiempo = 60 min, y agitación = 600 rpm, como se ve en la Tabla 8.

Tabla 8. Optimización de temperatura, tiempo y agitación para *T. zebrina*.

<i>Tradescantia zebrina</i>			
Variable		Picos totales	Picos de interés
T ($^{\circ}\text{C}$) (En MeOH)	20	17	0
	30	7	0
	40	22	1
Tiempo (min) (MeOH y 40°C)	30	29	0
	60	22	1
	120	15	0
Agitación (rpm) (MeOH, 40°C y 60 min)	300	30	1
	600	22	1
	1200	10	0

Así, de acuerdo con la Tabla 8, en el caso de *T. zebrina*, se ve que en la variación de temperatura, a 20°C y a 30°C no aparecen picos de interés, es decir, 0 (cero). De igual forma, analizando el tiempo, tanto a 30 min como a 120 min tampoco aparecen picos de interés. Pero, en cuanto a agitación, a 300 rpm aparece 1 (un) pico de interés, que es el fitol (S.I = 65), un terpenoide que además ha sido reportado en hojas de *J. regia*⁴⁹, mientras que a 1200 rpm hay 0 (cero) picos de interés. Siendo entonces, que a 40° , 60 min y 600 rpm aparece el único pico de interés, que es el neofitadieno (S.I = 91), por lo cual esta es la razón de que éstas sean las condiciones óptimas de lixiviación. Toda esta información se presenta en la tabla 9.

Tabla 9. Compuestos notables por cada variable (T, min, rpm) para *T. zebrina*.

20$^{\circ}\text{C}$		30$^{\circ}\text{C}$		30 min		120 min		300 rpm		1200 rpm	
SI	Com-puesto	SI	Com-puesto	SI	Compuesto	SI	Compuesto	SI	Compuesto	SI	Com-puesto
-	-	-	-	-	-	-	-	65	Fitol	-	-

Luego, el proceso de lixiviación-extracción con la fibra se desarrolla bajo las condiciones de $T = 40^{\circ}\text{C}$, tiempo = 60 min, y agitación = 600 rpm, pues la mayor cantidad de picos de interés aparece con estas condiciones, para ambas plantas, con el montaje de fibra con disco y posterior desorción en la figura 7.

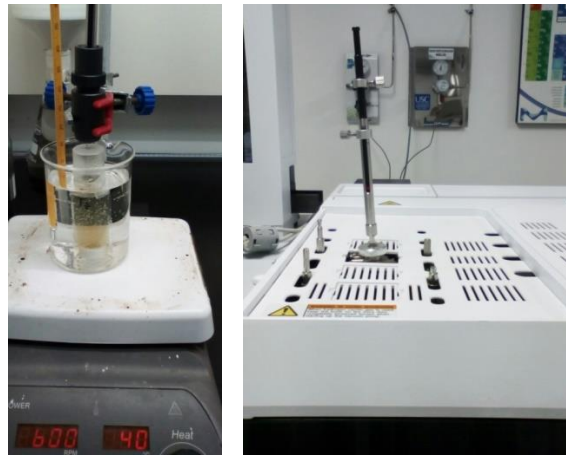


Figura 7. Montaje experimental de lixiviación-extracción, RDSE-SPME-GC-MS.

Como se aprecia en las imágenes de la Figura 7, una vez transcurridos los 60 min del proceso de extracción, la fibra se ubica en el puerto de inyección del GC-MS. Luego, bajo las condiciones de cromatografía ya indicadas, se obtiene el respectivo cromatograma, aclarando que se tuvo que usar metanol-agua, dado que la fibra PDMS, de 100 μm , es apolar, la cual, por indicación del fabricante no debe tener mucho contacto con solventes como metanol, y mucho menos etanol, pues estos solventes al comenzar a ser apolares como la fibra, comienzan a disolverla. Por lo tanto el agua (que es polar) no presenta inconveniente, siendo este el solvente recomendado por el fabricante. Así pues, los cromatogramas obtenidos para *J. neotropica* y para *T. zebrina*, provienen de usar como solvente metanol-agua, el cual, como ya se evidenció, es la segunda mejor opción para la lixiviación en ambas plantas.

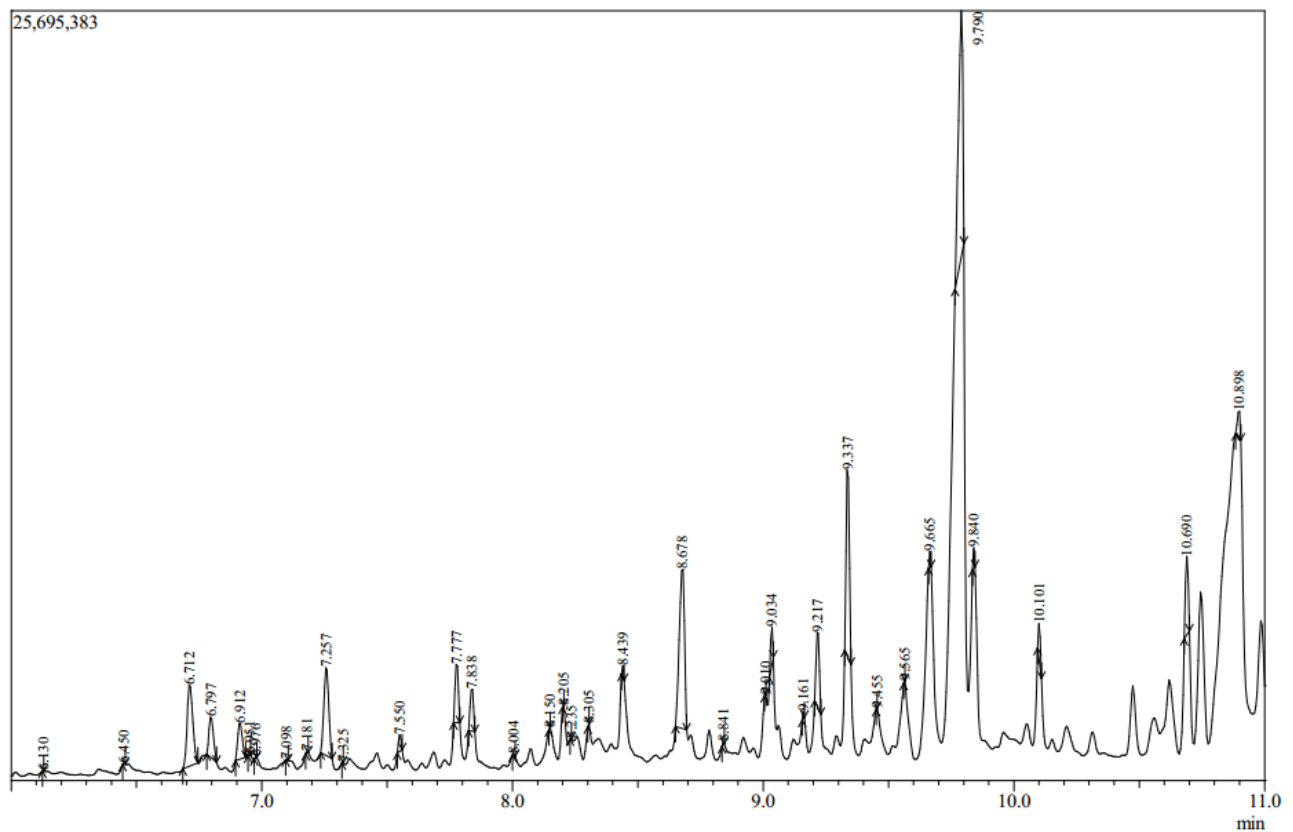


Figura 8. Cromatograma de extracción de compuestos de *J. neotropica* por RDSE con SPME, en metanol-agua.

De la Figura 8 se resaltan los compuestos tipo terpeno, como se relaciona en la Tabla 10, ordenados en valores de SI descendente.

Tabla 10. Picos (compuestos) de interés obtenidos mediante RDSE con SPME sobre *J. neotropica*.

Extracción RDSE con SPME					
SI (%)	Retención(min)	Compuesto	SI (%)	Retención(min)	Compuesto
97	7,550	Nerolidol	95	9,790	ácido palmítico
97	10,690	Fitol	95	17,728	Esqualeno
96	6,797	Geranil acetona	93	6,450	Beta Elemeno
95	6,712	Cariofileno			

Es muy importante notar la alta sensibilidad proveída por la fibra de PDMS por inmersión, pues se observan varias características en los resultados: una es el gran número de picos obtenidos; dos, que casi la totalidad de los picos tienen valores de SI altos, por encima de 80; y tres, que aparecen más terpenos que con la sola lixiviación con RDSE. Entonces, debido a esta alta precisión, de los terpenos obtenidos, que fueron doce, solo se tienen en cuenta los de SI por encima de 90, que son los seis mostrados en la Tabla 10. El ácido palmítico se muestra porque resultó ser el pico de mayor intensidad. Esto último resulta importante, pues de los más de cincuenta picos obtenidos, un número notable fueron siloxanos, probablemente provenientes de sangrado de la columna; otra gran cantidad de picos, fueron alcanos, quizá provenientes de la fibra; y finalmente, ácidos carboxílicos y ésteres (quizá provenientes de la planta) y algunos productos sintéticos, probablemente contaminantes ambientales. También cabe notar que compuestos como el fitol y la geranil acetona están muy relacionados con los obtenidos durante la optimización de temperatura y de agitación. Las estructuras de los compuestos de la Tabla 10 se ilustran en la Figura 9.

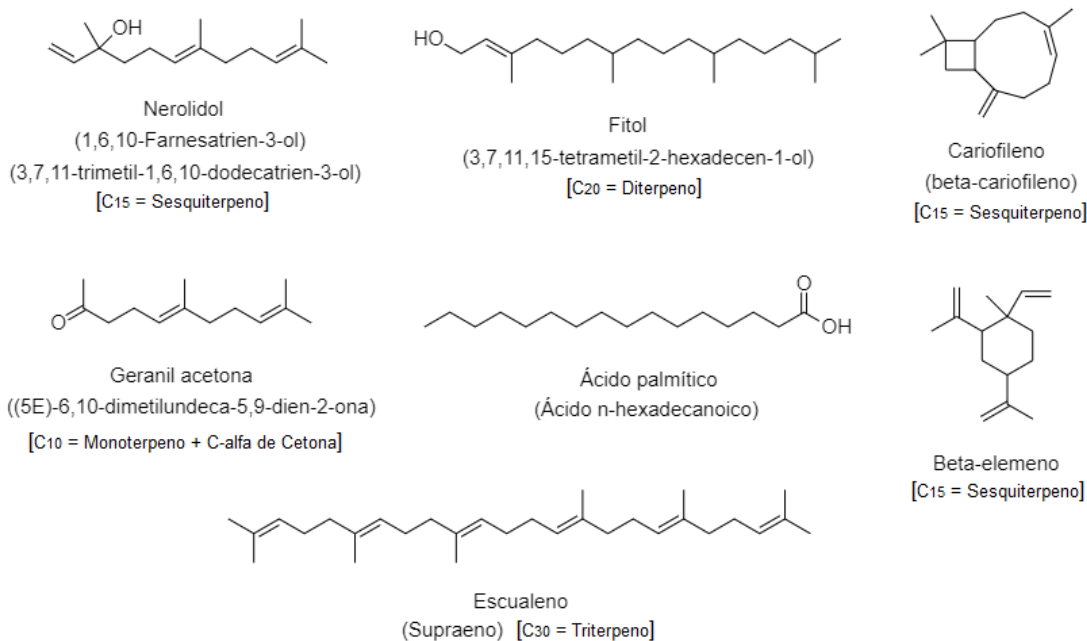


Figura 9. Estructuras de fitoquímicos de *J. neotropica* extraídos por RDSE con SPME en metanol-agua

De igual manera, la extracción compuestos de *T. zebrina*, con las condiciones óptimas, para el solvente que debía ser metanol, pero por las razones ya mencionadas, sobre el cuidado de la fibra, el solvente usado fue metanol-agua, que como también se mencionó, es la segunda mejor opción. El cromatograma obtenido se puede ver en la Figura 10.

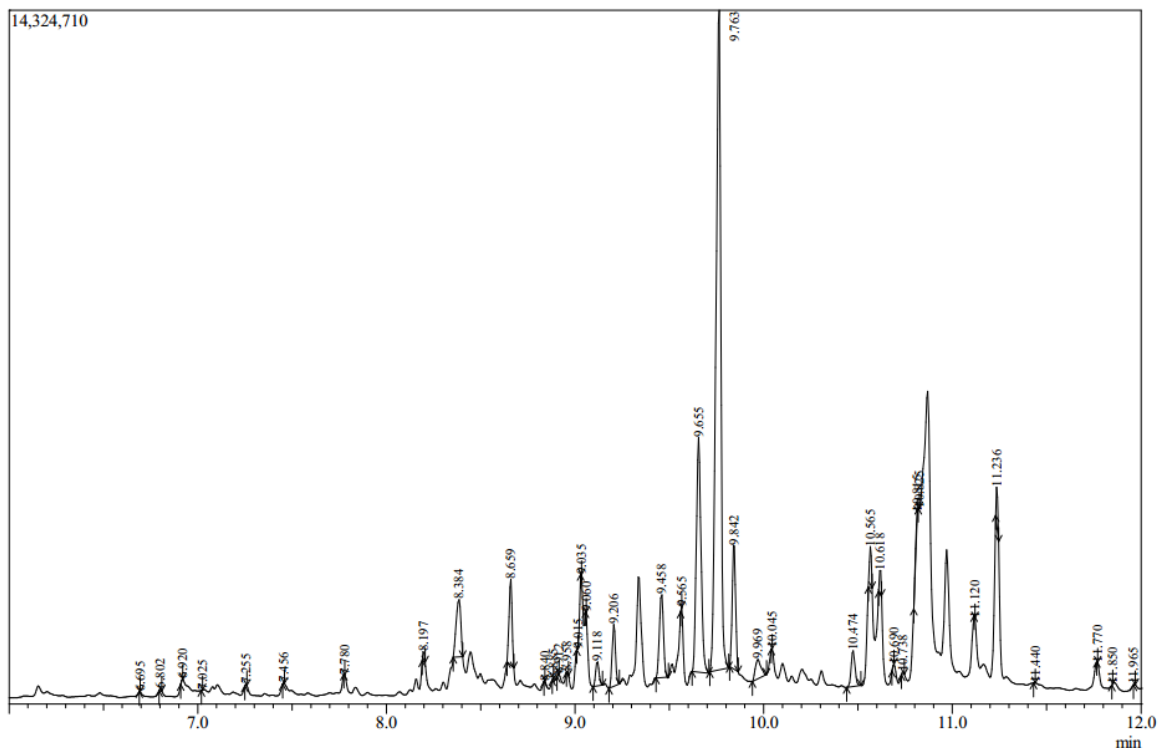


Figura 10. Cromatograma de extracción de compuestos de *T. zebrina* por RDSE con SPME, en metanol-agua.

Nuevamente, entre los compuestos notables aparecen terpenos, pero en menor cantidad para esta planta, y más bien, abundaron los ácidos grasos y sus ésteres, como se ve en la Tabla.11, con los valores de SI ordenados de forma descendente.

Tabla 11. Picos (compuestos) de interés obtenidos mediante RDSE con SPME sobre *T. zebrina*.

Extracción RDSE con SPME					
SI (%)	Retención(min)	Compuesto	SI (%)	Retención(min)	Compuesto
96	9,763	Ácido palmítico	93	6,802	Nerilacetona
96	10,565	Linoleato de metilo	92	9,118	Neofitadieno
95	10,618	Linolenato de metilo	82	17,721	Escualeno

Como en el caso anterior, es de notar la alta sensibilidad proveída por la fibra de PDMS por inmersión, para *T. zebrina*, pues aparecen muchos picos, relativamente bien definidos, con valores de SI por encima de 80, en su gran mayoría. Por ende, se toman en cuenta solo las señales con SI por encima de 90. Salvo el Escualeno (SI = 82), que puede provenir de la planta o ser un residuo de la medición de la anterior planta, y esto último explicaría su valor bajo de SI. Aparecen pues, dos terpenos, y dos ésteres de ácido graso, resultado muy similar al de la respectiva lixiviación con RDSE en metanol-agua; y nuevamente el ácido palmítico, como el pico sobresaliente, y es muy probable que si se encuentre en ambas plantas debido a su alto valor de SI. Las estructuras de los compuestos de la Tabla 11 se ilustran en la Figura 11.

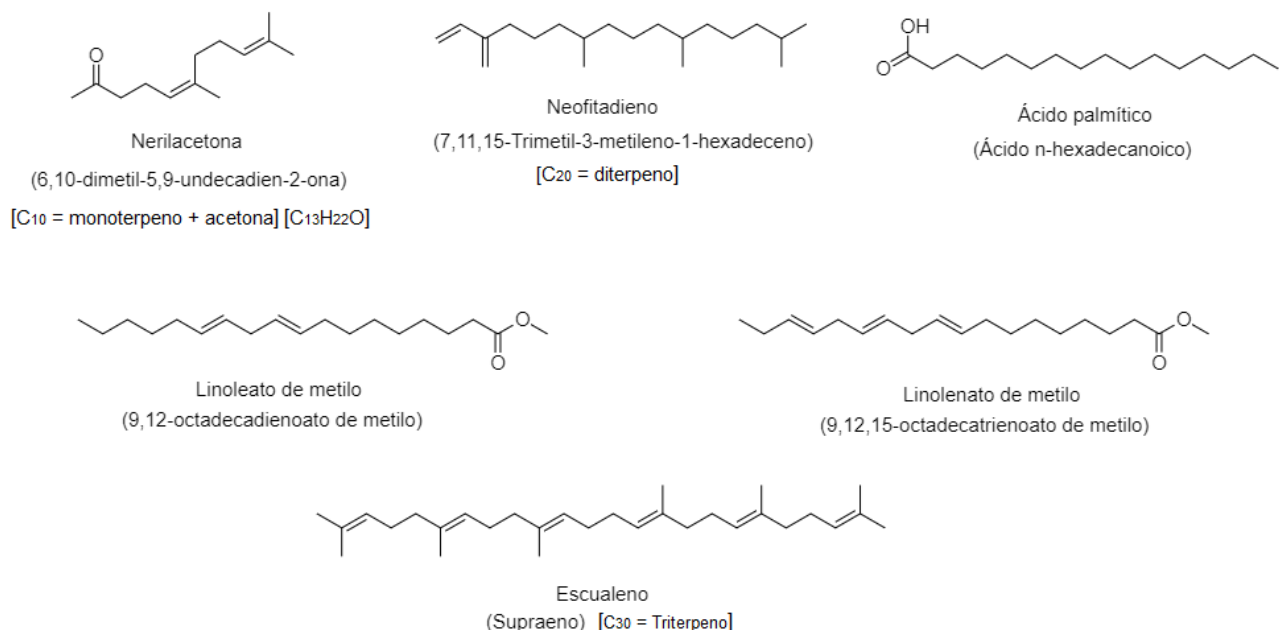


Figura 11. Estructuras de fitoquímicos de *T. zebrina* extraídos por RDSE con SPME en metanol-agua.

Así pues, es claro que la fibra apolar de PDMS extrae, muy bien compuestos tipo terpenoide que son fitoquímicos apolares y algunos esteres grasos y ácidos grasos debido a esta afinidad entre sustancias apolares.

Por otra parte, aprovechando que los lixiviados se inyectaron en el GC-MS, se pudo comparar la lixiviación con metanol contra la extracción vía maceración también con metanol, para ambas plantas, es decir, maceración vs RDSE, con el objeto de ver la eficacia de los dos procesos, de lo cual se presentan los resultados en las Tablas 12 y 13. Cabe anotar que se escogió la maceración por ser un proceso muy sencillo, el cual se halla a la mano cuando se requiere obtener un extracto de cualquier planta, es decir, está entre los métodos básicos o tradicionales de extracción ².

Tabla 12. Comparación maceración / lixiviación para *J. neotropica*.

Maceración con MeOH			Lixiviación con MeOH		
SI (%)	Retención(min)	Compuesto	SI (%)	Retención(min)	Compuesto
95	4,221	Oxalato de dimetilo	81	17,037	Juglona
93	16,571	Hexosa	77	16,924	Farneseno
85	12,680	1,4:3,6-dianhidro-alfa-d-glucopiranososa	68	20,653	Neofitadieno
84	22,665	Fitol			
81	11,515	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona			
63	8,221	2,4-dihidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furan-3-ona			

Se observa en la Tabla 12, que si bien se obtuvieron más compuestos con la maceración, éstos son de estructuras muy diversas, como carbohidratos, ésteres, un oxalato y un terpeno (el fitol), de los cuales, solo el terpeno es de interés como núcleo de metabolito secundario; mientras que con la lixiviación por medio del disco RDSE, los pocos compuestos obtenidos muestran núcleo de metabolito secundario, como terpenos y quinona.

Tabla 13. Comparación maceración / lixiviación para *T. zebrina*.

Maceración con MeOH			Lixiviación con MeOH		
SI (%)	Retención(min)	Compuesto	SI (%)	Retención(min)	Compuesto
95	22,570	Linolenato de metilo, (18:3)	91	20,651	Neofitadieno
94	20,909	Palmitato de metilo, (16:0)			
94	22,504	Linoleato de metilo, (18:2)			
92	12,691	1,4:3,6-dianhidro-alfa-d-glucopiranososa			
87	16,583	1,6-anhidro-beta-D-glucopiranososa			
73	22,776	Estearato de metilo, (18:0)			

De la Tabla 13 se nota fácilmente que con el proceso de extracción tradicional, maceración, se obtienen varios compuestos, principalmente ácidos grasos y ésteres de tales ácidos, y carbohidratos cíclicos (piranosidos); mientras que con la lixiviación mediante RDSE se obtuvo un compuesto, pero que si es de interés, ya que presenta núcleo de metabolito secundario, como en este caso: un terpeno. De esta forma, aplicando las mismas condiciones de cromatografía de gases y condiciones y criterios para la escogencia de los compuestos de interés, se revela que la lixiviación con disco, RDSE, permite obtener compuestos específicos, de tipo metabolitos secundarios, en comparación con la maceración, para ambas plantas. Específicamente, la RDSE con metanol para ambas plantas permite obtener terpenoides.

Finalmente, del ensayo preliminar de actividad biológica de los extractos en metanol de *J. neotropica*, y de *T. zebrina*, sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, se obtuvo un resultado negativo, pues no se produjo el halo de inhibición de crecimiento alrededor de los extractos, como se puede ver en la Figura 12, en la cual, la ampicilina (AMP), que fue el control positivo, si produjo halo de inhibición. En la misma, se aprecia la nomenclatura usada, es decir: el medio fue Trypticasa Soya Agar (TSA), el círculo amarillo pálido a la izquierda es *T. zebrina* (Tz), y el círculo marrón a la derecha es *J. neotropica*, (Jn). No se menciona el control negativo, que fue metanol, pues éste no manifestó ningún cambio observable.

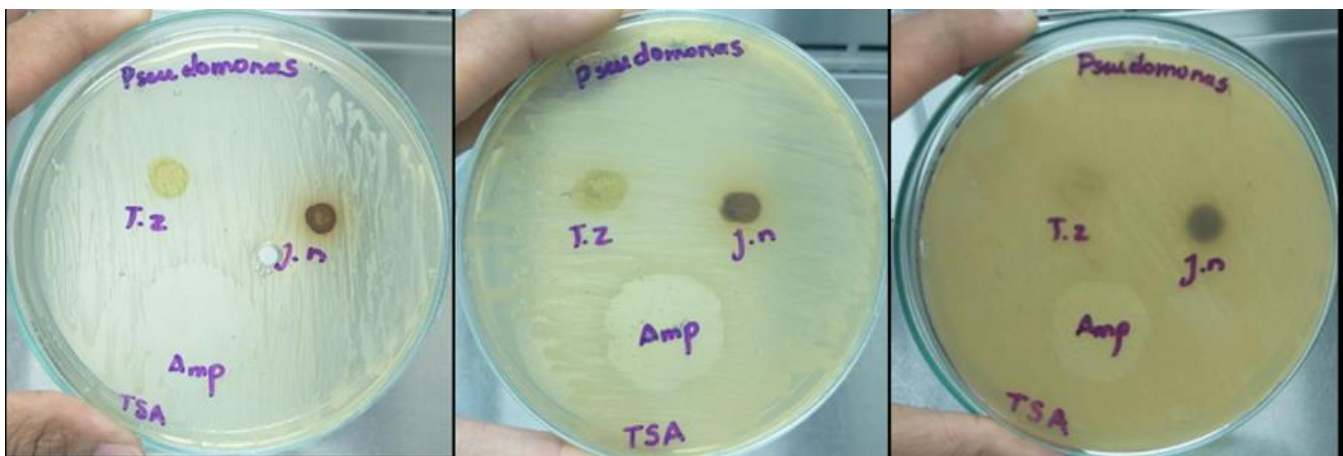


Figura 12. Resultados de actividad biológica de fitoquímicos de *T. zebrina* (Tz) y de *J. neotropica* (Jn), extraídos en metanol.

Es necesario indicar que para poder realizar este ensayo biológico preliminar, era estrictamente necesario contar con un mínimo de muestra seca de 100,0 mg, para lo cual, los residuos secos de los lixiviados no alcanzaban. Por esta razón se obtuvieron los extractos metanólicos secos mediante maceración. Luego, la ligera diferencia en las concentraciones, se debió a que *T. zebrina* no estaba completamente seca (ya que sus hojas poseen más humedad) y hubo que evaporar esa agua residual, dando una concentración menor a la de *J. neotropica*, pero a fin de cuentas mayor a los 100,0 mg requeridos. Por eso en la imagen de la figura 12, Tz es un círculo amarillo claro mientras que Jn es un círculo (oscuro) amarillo-ocre-marrón.

A pesar de este resultado para las hojas de *J. neotropica*, si se han reportado una diversidad de actividades biológicas y farmacológicas, para el extracto de hojas de *J. regia*; por ejemplo: si se hace la extracción acuosa de hojas en caliente y en frío, la solución resultante si posee actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, e incluso contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermis*, *Salmonella tiphymurium*, entre otras, según se evaluó mediante ensayos de difusión en disco y de rayado en agar⁵⁹. Aún más, los extractos de hojas con metanol-agua, mediante ensayo con DPPH, muestran actividad antioxidante; y asimismo, estudios *in vitro* e *in vivo*, de extractos con metanol de hojas de *J. regia* demostraron que estas poseen un potencial hipoglucemiante⁵⁹.

En cuanto a *T. zebrina*, existe el registro bibliográfico de actividad antimicrobiana muy baja, casi nula, frente a diversas bacterias, teniendo en cuenta la forma de extracción, es decir, específicamente, se extrajo en etanol, por tres métodos: Soxhlet, Estático y Ultrasonido, y tales extractos se usaron contra *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras, por el método de difusión en discos empapados con el extracto de la planta, en cultivo sembrado en medio Tripticasa Soya Agar (TSA), dando como resultado un halo de inhibición muy pequeño (0,3 mm) frente al control positivo: Tetraciclina (20,0mm), por lo que sería un resultado negativo (como el aquí obtenido); aunque el extracto de hojas de *T. zebrina*, con etanol, obtenido por ultrasonido, frente a *Staphylococcus aureus*, si mostró un halo de 14,2 mm contra 12,6 mm de Tetraciclina, por lo que si sería positivo, antibacterial, contra este último microorganismo⁶⁴. Finalmente, los extractos acuosos de *T. zebrina* también presentan actividades antioxidante e hipoglucemiante^{65,66}.

4. CONCLUSIONES

Se implementó el método de lixiviación-extracción por RSDE y SPME, respectivamente, el cual permitió reconocer más de dos compuestos fitoquímicos en los extractos de *J. neotropica* y más de dos compuestos fitoquímicos en los extractos de *T. zebrina*, mediante GC-MS, siendo este un procedimiento analítico miniaturizado, de muy bajo impacto medioambiental.

Mediante el método de SPME con RSDE se extrajeron los metabolitos especiales presentes en las hojas de *T. zebrina* y de *J. neotropica*.

La técnica de RDSE fue optimizada para la lixiviación de los metabolitos especiales de las hojas de *T. zebrina* y de *J. neotropica*., encontrándose que las mejores condiciones de equilibrio son a temperatura de 40°C, tiempo de 60 min, y agitación a 600 rpm, con metanol-agua, tanto para *J. neotropica* como para *T. zebrina*. Luego, mediante la técnica de GC-MS se caracterizó fitoquímicamente a los extractos obtenidos de las plantas de *J. neotropica* y de *T. zebrina*, ya que se pudieron detectar compuestos de tipo terpeno, quinona, ácidos grasos y algunos ésteres de tales ácidos y algunos pocos derivados de flavonoides y de alcaloides. Específicamente, para *J. neotropica* fueron predominantes los terpenoides (Neofitadieno, fitol y farneseno) y las quinonas (juglona y 2,5-di-t-amilhidroquinona), mientras que para *T. zebrina* lo fueron los terpenoides (Neofitadieno y fitol) y los ésteres grasos (palmitato de metilo y Linoleato de metilo).

De forma general, para los lixiviados mediante RDSE, tanto para *J. neotropica* como para *T. zebrina*, se puede decir que los compuestos tipo terpeno aparecen a tiempos de retención entre 16,0 y 22,0 minutos, mientras que los polifenoles y sus derivados tipo quinonas, se ven entre 16,5 y 17,5 minutos. Los ésteres grasos y ácidos carboxílicos lo hacen entre 20,0 y 21,0 minutos, y algunos pocos derivados de flavonoides y de alcaloides tienden a aparecer entre 9,0 y 15,0 minutos. También, al optimizar el solvente, la *J. neotrópica* presenta mayor cantidad de picos totales (86) en contraste con *T. zebrina* (68); y así mismo los picos de interés para *J. neotrópica* son 8 y para *T. zebrina* son 5. Y finalmente, aunque el metanol siempre fue el solvente óptimo (de acuerdo con los criterios fijados), la mezcla metanol – agua, siempre tuvo buena opción y fue también solvente óptimo para la extracción SPME, con la observación de que esta mezcla lixivia y extrae más compuestos de tipo terpeno en *J. neotropica*, y más bien ésteres grasos y terpenos en *T. zebrina*, que otros tipos de metabolitos especiales.

De todo lo anterior queda claro que si bien la lixiviación (RDSE) permite obtener metabolitos especiales, de ambas plantas, de manera más enfocada que la maceración, no favorece la cantidad, pues fueron pocos los compuestos obtenidos. Además, depende del tipo de planta, pues la *T. zebrina* siempre mostró más ésteres

grasos que terpenos en contraste con *J. neotropica*. Y esto es solo con la lixiviación, ya que al ensayar la fibra (SPME) se hace obvio el alto contenido de terpenos en *J. neotropica* y la combinación de esteres grasos y terpenos en *T. zebrina*. Luego, se concluye que la RDSE por sí sola no permitiría la detección de otros metabolitos secundarios que no fuesen terpenoides. También que con el acoplamiento RDSE-SPME si se pueden detectar metabolitos especiales de hojas de plantas, en este caso, de *J. neotropica* y de *T. zebrina*. Claramente, los terpenoides son compuestos poco polares los cuales fueron fáciles de detectar con la fibra ya que ésta era apolar. Si la fibra hubiese sido más polar, hubiese extraído metabolitos más polares (por ejemplo flavonoides y polifenoles), y desde luego, se usarían solventes más apolares como etanol.

Se evaluó la actividad biológica de los extractos de *J. neotropica* y de *T. zebrina*, sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, obteniéndose un resultado negativo. Sin embargo su actividad biológica bactericida no debe limitarse a un solo espécimen de bacteria, pues existen más bacterias que originan patologías en humanos, en animales y en plantas, sobre las cuales si puede haber efecto bactericida de los extractos de *J. neotropica* y de *T. zebrina*, según lo indica la literatura. Pues, hay bibliografía de ambas plantas que señala que, dependiendo del tipo de extracto, poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, hipoglucemiantes, entre otras, por lo cual se concluye que los extractos en etanol, en metanol y en mezclas: etanol-agua y metanol-agua, si tienen efectos biológicos, sólo que obtenidos mediante lixiviación RDSE parecen no proveer suficiente concentración de metabolitos especiales para demostrar tales actividades.

Como recomendación, al trabajar esta metodología con una planta determinada, aunque sea muy conocida, por abundante información en artículos, es importante primero someter su extracto crudo a una cromatografía de columna y enseguida analizar cada fracción por GC-MS, para tener mayor certeza de los compuestos que las técnicas de disco y de fibra puedan arrojar.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean reconocer el importante apoyo de los almacenistas de laboratorios, así como la valiosa atención y disposición de las personas del laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Santiago de Cali (USC), por el acceso al GC-MS.

Finalmente se declara que no existe conflicto de intereses entre los autores sobre la presente investigación.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oshadie De Silva, G., Abeyundara, A. T. & Weroshana Aponso, M. M. Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants. *Am. J. Essent. Oils Nat. Prod.* **5**, 29–32 (2017).
2. Bitwell, C., Indra, S. Sen, Luke, C. & Kakoma, M. K. A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Sci. African* **19**, (2023).
3. Patra, J. K., Das, G., Lee, S., Kang, S. S. & Shin, H. S. Selected commercial plants: A review of extraction and isolation of bioactive compounds and their pharmacological market value. *Trends Food Sci. Technol.* **82**, 89–109 (2018).
4. Ali Redha, A., Siddiqui, S. A. & Ibrahim, S. A. Advanced extraction techniques for Berberis species phytochemicals: A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **56**, 5485–5496 (2021).
5. Alberti, Á., Riethmüller, E. & Béni, S. Characterization of diarylheptanoids: An emerging class of bioactive natural products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **147**, 13–34 (2018).
6. Fojtová, J., Lojková, L. & Kubáň, V. GC/MS of terpenes in walnut-tree leaves after accelerated solvent extraction. *J. Sep. Sci.* **31**, 162–168 (2008).
7. Ahmad, R., Ahmad, N., Al-Anaki, W. S., Ismail, F. A. & Al-Jishi, F. Solvent and temperature effect of accelerated solvent extraction (ASE) coupled with ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC-PDA) for the determination of methyl xanthines in commercial tea and coffee. *Food Chem.* **311**, 126021 (2020).
8. Romano, R. *et al.* Recovery of bioactive compounds from walnut (*Juglans regia* L.) green husk by supercritical carbon dioxide extraction. *Int. J. Food Sci. Technol.* **56**, 4658–4668 (2021).
9. Gebara, S. S., De Oliveira Ferreira, W., Ré-Poppi, N., Simionatto, E. & Carasek, E. Volatile compounds of leaves and fruits of *Mangifera indica* var. coquinho (Anacardiaceae) obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. *Food Chem.* **127**, 689–693 (2011).

10. Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F. A. & de la Guardia, M. Green extraction techniques in green analytical chemistry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **116**, 248–253 (2019).
11. Zambonin, C. & Aresta, A. Recent applications of solid phase microextraction coupled to liquid chromatography. *Separations* **8**, (2021).
12. Lord, H. & Pawliszyn, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A* **885**, 153–193 (2000).
13. García, Y. M. *et al.* SPME fiber evaluation for volatile organic compounds extraction from acerola. *J. Braz. Chem. Soc.* **30**, 247–255 (2019).
14. Richter, P., Arismendi, D. & Becerra-Herrera, M. The fundamentals, chemistries and applications of rotating-disk sorptive extraction. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **137**, 116209 (2021).
15. Vieira, C. M. S. *et al.* A high throughput approach to rotating-disk sorptive extraction (RDSE) using laminar cork for the simultaneous determination of multiclass organic micro-pollutants in aqueous sample by GC-MS. *Talanta* **208**, 120459 (2019).
16. Cañas, A., Valdebenito, S. & Richter, P. A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma Microextraction Techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 2205–2210 (2014).
17. Manzo, V., Honda, L., Navarro, O., Ascar, L. & Richter, P. Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction. *Talanta* **128**, 486–492 (2014).
18. Vieira, C. M. S. *et al.* Exploiting green sorbents in rotating-disk sorptive extraction for the determination of parabens by high-performance liquid chromatography with tandem electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **41**, 4047–4054 (2018).
19. Becerra-Herrera, M., Miranda, V., Arismendi, D. & Richter, P. Chemometric optimization of the extraction and derivatization of parabens for their determination in water samples by rotating-disk sorptive extraction and gas chromatography mass spectrometry. *Talanta* **176**, 551–557 (2018).
20. Arismendi, D., Becerra-Herrera, M., Cerrato, I. & Richter, P. Simultaneous determination of multiresidue and multiclass emerging contaminants in waters by rotating-disk sorptive extraction–derivatization-gas chromatography/mass spectrometry. *Talanta* **201**, 480–489 (2019).
21. Honda, L., Arismendi, D. & Richter, P. Integration of rotating disk sorptive extraction and dispersive-solid phase extraction for the determination of estrogens and their metabolites in urine by liquid chromatography/mass spectrometry. *Microchem. J.* **185**, 23–24 (2023).
22. Mendes, L. D. *et al.* Development of an eco-friendly method for the determination of total polychlorinated biphenyls in solid waste by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Environ. Chem. Eng.* **6**, 5042–5048 (2018).
23. Omena, E. *et al.* A green and simple sample preparation method to determine pesticides in rice using a combination of SPME and rotating disk sorption devices. *Anal. Chim. Acta* **1069**, 57–65 (2019).
24. Kataoka, H., Lord, H. L. & Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A* **880**, 35–62 (2000).
25. Zhang, R., Li, S., Zhu, Z. & He, J. Recent advances in valorization of Chaenomeles fruit: A review of botanical profile, phytochemistry, advanced extraction technologies and bioactivities. *Trends Food Sci. Technol.* **91**, 467–482 (2019).
26. Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E. & Martínez, J. R. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* vol. 27 579–597 (2003).
27. Zini, C. A., Augusto, F., Christensen, E., Caramão, E. B. & Pawliszyn, J. SPME applied to the study of volatile organic compounds emitted by three species of Eucalyptus in situ. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7199–7205 (2002).
28. Bi, S. *et al.* Roasting pretreatment of walnut (*Juglansregia* L.) kernels: improvement of the oil flavor profile and correlation with the chemical composition. *Food Funct.* **13**, 11–12 (2022).
29. Pinilla, C. A. *et al.* Evaluation of antibacterial activity, chromatographic analysis for rutin and quercetin quantification using HPLC-UV-vis from the hydro-alcoholic extract obtained from *bidens pilosa* linné. *J. Braz. Chem. Soc.* **32**, 552–563 (2021).
30. Xiao, J. & Bai, W. Bioactive phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59**, 827–829 (2019).
31. Velu, G., Palanichamy, V. & Anand, R. Phytochemical and Pharmacological Importance of Plant Secondary Metabolites in Modern Medicine. en *Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview* (eds.

- Roopan, S. M. & Madhumitha, G.) 1–331 (Springer International Publishing AG., 2018). doi:10.1007/978-3-319-74210-6.
32. Wetzel, W. C. & Whitehead, S. R. The many dimensions of phytochemical diversity: linking theory to practice. *Ecol. Lett.* **23**, 16–32 (2020).
 33. Marcano, D. & Hasegawa, M. *Fitoquímica Organica*. vol. 3 (Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela., 2018).
 34. da Silva Machado, D. N., de Barros, A. A. M. & de Andrade Ribas, L. Exotic plants in a rocky outcrop area in the municipality of Niterói, Rio de Janeiro state, Brazil. *J. Coast. Conserv.* **24**, (2020).
 35. Pires Jr, E. *et al.* Tradescantia zebrina Bosse: study of the phenolic composition and bioactive properties of a potential natural coloring ingredient. en *Book of Abstracts - XXI EuroFoodChem Conference* 1–54 (2019). doi:10.23919/eumc.2019.8910961.
 36. da Silva, V. C. *et al.* Determination of phenolic bioactive compounds and evaluation of the antioxidant and hemolytic activities in the methanolic extracts of Tradescantia zebrina. *Rev. Colomb. Ciencias Quím.* **51**, 1341–1361 (2022).
 37. Ramirez C., A., Isaza, G. & Pérez, J. Especies Vegetales Investigadas Por Sus Propiedades Antimicrobianas, Inmunomoduladoras E Hipoglicemiantes En El Departamento De Caldas (Colombia, Sudamérica). *Biosalud* vol. 12 59–82 (2013).
 38. Ospina, L. F. & Pinzón, R. Plantas Usadas Como Antidiabéticas en la Medicina Popular Colombiana. *Rev. Colomb. Ciencias Químico Farm.* **23**, 81–94 (1995).
 39. Alaba, C. S. M. & Chichioco-Hernandez, C. L. 15-Lipoxygenase inhibition of Commelina benghalensis, Tradescantia fluminensis, Tradescantia zebrina. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **4**, 184–188 (2014).
 40. Dash, G. K., Swe, M. & Mathews, A. Tradescantia zebrina: A promising medicinal plant. *Indo Am. J. Pharm. Sci.* **4**, 3498–3502 (2017).
 41. Baghalpour, N. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory studies on Tradescantia zebrina. *Pakistan J. Bot.* **53**, 357–365 (2021).
 42. Grace, G., Aloys, O. & Chaka, B. Characterization of Bio-active Compounds Essential for Blood Coagulation in the Crude Extracts of Tradescantia zebrina, Tagetes minuta and Codiaeum variegatum Leaves. *Asian J. Appl. Chem. Res.* **6**, 41–52 (2020).
 43. Menegazzo, R. F. *et al.* Chemical composition of Tradescantia pallida (Rose) D.R. Hunt var. purpurea Boom (Commelinaceae) essential oil. *Nat. Prod. Res.* **36**, 396–400 (2021).
 44. Cabral, F. V. *et al.* Hexane Extract from Tradescantia pallida (Rose) D.R. Hunt (Commelinaceae): Its Volatile Constituents and in vitro Antifungal and Cytotoxic Activities. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **65**, 1–8 (2022).
 45. Angulo, A. F., Rosero, R. & Gonzalez, M. Estudio etnobotánico de las plantas medicinales utilizadas por los habitantes del corregimiento de Genoy, Municipio de Pasto, Colombia. *Revista Universidad y Salud* vol. 14 168–185 (2012).
 46. Toro Vanegas, E. & Roldán Rojas, I. C. State of the art, propagation and conservation of juglans neotropica diels., in andean zones. *Madera Bosques* vol. 24 1–15 (2018).
 47. Aranda-ventura, J. *et al.* Toxicidad , Actividad Antioxidante in Vitro E in Vivo Del Extracto Acuoso de Juglans neotropica Diels (nogal peruano). *Rev. Peru. Med. Integr.* **1**, 16–24 (2017).
 48. Hurtado Manrique, P., Jurado Teixeira, B., Ramos Llica, E. & Calixto Cotos, M. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO ESTANDARIZADO DE HOJAS DE Juglans neotropica Diels (NOGAL PERUANO). *Rev. Soc. Qu Perú* **81**, 283–291 (2015).
 49. Paudel, P., Satyal, P., Dosoky, N. S., Maharjan, S. & Setzer, W. N. Juglans regia and J. nigra, two trees important in traditional medicine: A comparison of leaf essential oil compositions and biological activities. *Nat. Prod. Commun.* **8**, 1481–1486 (2013).
 50. Agilent Technologies. Solid phase microextraction fundamentals. 1–9 (2023).
 51. Altemimi, A. B. *et al.* Exploring the phenolic profile, antibacterial, and antioxidant properties of walnut leaves (Juglans regia L.). *Food Sci. Nutr.* **11**, 6845–6853 (2023).
 52. Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E. & Guery, B. How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. *Drugs Context* **7**, 1–18 (2018).
 53. Shimadzu Corporation. *Gas Chromatograph Mass Spectrometer GCMS-QP2010 Series Operation Guide For GCMSsolution Ver. 2.6*. Shimadzu Corporation (Shimadzu Corporation, 2010).
 54. NIST. Búsqueda de Datos de una Especie por Peso Molecular. *NIST-National Institute of Standards and Technologies - U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America* 69

<https://webbook.nist.gov/chemistry/mw-ser/> (2023).

55. Melo Martínez, O. O., López Pérez, L. A. & Melo Martínez, S. E. *Diseño de experimentos: métodos y aplicaciones*. Universidad Nacional de Colombia (Universidad Nacional de Colombia, 2020). doi:10.36385/fcbog-4-0.
56. Gutierrez Pulido, H. & De la Vara Salazar, R. *Análisis y diseño de experimentos*. (McGraw-Hill/Interamericana de editores, 2008).
57. Butnariu, M. *et al.* A Review on Tradescantia: Phytochemical Constituents, Biological Activities and Health-Promoting Effects. *Front. Biosci. - Landmark* **27**, (2022).
58. Ramírez, F. & Kallarackal, J. The phenology of the endangered Nogal (*Juglans neotropica* Diels) in Bogota and its conservation implications in the urban forest. *Urban Ecosyst.* **24**, 1327–1342 (2021).
59. Shah, U. N. *et al.* Bio-techniques for improvement of qualitative and quantitative traits in walnut (*Juglans regia*). *Adv. Hortic. Sci.* **32**, 113–135 (2018).
60. Amaral, J. S. *et al.* Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Food Chem.* **88**, 373–379 (2004).
61. Nieto, V. & Rodríguez, J. JUGLANDACEAE (WALNUT FAMILY): *Juglans andina* Triana & Cortés, *Juglans colombiensis* Dode, *Juglans honorei* Dode Cedro negro, cedro nogal, nogal, nogal bogotano. en *Tropical Tree Seed Manual* 528–529 (Corporacion Nacional de investigacion of Forestal-Santa Fe de Bogotá, Colombia., 2010).
62. Gupta, A., Behl, T. & Panichayupakaranan, P. A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. *Obes. Med.* 100142 (2019) doi:10.1016/j.obmed.2019.100142.
63. Ávalos García, A. & Pérez-Urria Carril, E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. *Ser. Fisiol. Veg.* **2**, 119–145 (2009).
64. Da Rocha, B. S., Nobre, J. da C. N. & De Freitas, A. D. G. Avaliação Do Potencial Antimicrobiano Dos Extratos Da Tradescantia Zebrina Heynh. *Rev. Foco* **16**, e1140 (2023).
65. Tan, J. B. L. & Kwan, Y. M. The biological activities of the spiderworts (*Tradescantia*). *Food Chem.* **317**, 126411 (2020).
66. Tan, J. B. L., Yap, W. J., Tan, S. Y., Lim, Y. Y. & Lee, S. M. Antioxidant content, antioxidant activity, and antibacterial activity of five plants from the commelinaceae family. *Antioxidants* **3**, 758–769 (2014).