

**Diseño e implementación de un método cromatográfico para el  
fraccionamiento de extractos, obtenidos con disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico, de  
material vegetal después de su destilación, de plantas aromáticas de la biodiversidad  
colombiana**

**Félix Camilo MUÑOZ ÁLVAREZ**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Química**

**Maestría en Química**

**Bucaramanga**

**2023**

**FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES**

**Diseño e implementación de un método cromatográfico para el fraccionamiento de extractos, obtenidos con disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico, de material vegetal después de su destilación de plantas aromáticas, de la biodiversidad colombiana**

**Félix Camilo MUÑOZ ÁLVAREZ**

**Directores:**

**Elena E. STASHENKO, Química, Ph.D.**

**Jairo R. MÁRTINEZ, Químico, Ph.D.**

**Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Química**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Química**

**Maestría en Química**

**Bucaramanga**

**2023**

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### **Agradecimientos**

A los profesores Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez, por las enseñanzas y los conocimientos adquiridos durante el desarrollo del trabajo de investigación.

A los coordinadores Rogerio Saavedra y Lady Sierra, a los compañeros y amigos del laboratorio, por su amistad, ayuda y orientación durante el desarrollo del trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS), por brindarme el espacio de sus instalaciones y los equipos cromatográficos necesarios para el desarrollo del trabajo de investigación.

A la Universidad Industrial de Santander y a la Escuela de Química, por los apoyos económicos proporcionados para la participación de los congresos internacionales.

Ministerio de ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Ecuación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico-Colombia Científica, Fondo Francisco José de Caldas, contrato RC-FP44842-212-2018, programa Bio-Reto 15:50.

A mis familiares, amigos y compañeros del laboratorio por todo el apoyo brindado.

# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Tabla de contenido

Introducción .....	23
1. Estado del arte .....	26
1.1 Plantas bajo estudio.....	26
1.1.1 <i>Lippia origanoides</i> H.B.K., <i>quimiotipo felandreno</i> .....	26
1.1.2 <i>Turnera diffusa</i> Willd. <i>Ex Schult</i> .....	27
1.1.3 <i>Varronia curassavica</i> Jacq. Roem & Schult.....	29
1.2 Biomasa residual.....	30
1.3 Extractos vegetales.....	31
1.4 Metabolitos secundarios de interés .....	32
1.4.1 <i>Flavonoides</i> .....	32
1.4.2 <i>Ácidos hidroxicinámicos</i> .....	32
1.5 Aislamiento compuestos fenólicos .....	33
1.5.1 <i>Extracción con disolvente asistida con ultrasonido</i> .....	33
1.5.2 <i>Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico</i> .....	34
1.6 Técnicas analíticas instrumentales.....	35
1.6.1 <i>Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos</i> ..	35
1.6.2 <i>Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas Q-Exactive Orbitrap</i> .....	35
1.6.3 <i>Cromatografía líquida de alta eficiencia preparativa</i> .....	37
1.7 Panorama del uso de la cromatografía líquida preparativa para el aislamiento de compuestos naturales .....	39
2. Objetivos .....	42
2.1 Objetivo general.....	42

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

2.2 Objetivos específicos .....	42
3. Metodología .....	43
3.1 Diagrama metodológico .....	43
3.2 Reactivos.....	43
3.3 Recolección del material vegetal .....	44
3.4 Obtención de la biomasa residual .....	45
3.5 Extracción de compuestos fenólicos. ....	45
3.5.1 <i>Extracción con disolvente asistido por ultrasonido</i> .....	45
3.5.2 <i>Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico</i> .....	46
3.6 Preparación de las muestras, fracciones y las sustancias patrón para el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia y cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas Q- <i>Exactive Orbitrap</i> . ....	47
3.7. Análisis químico instrumental .....	48
3.7.1 <i>Caracterización química por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos, de los extractos bajo estudio y sus fracciones</i> .....	48
3.7.2 <i>Caracterización química por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas Q-Exactive Orbitrap, de los extractos bajo estudio y sus fracciones</i> .....	48
3.7.3 <i>Determinación de figuras de mérito para la cuantificación de extractos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas</i> .....	49
3.8 Diseño e implementación de un método cromatográfico, por cromatografía líquida preparativa, para el fraccionamiento de extractos de material vegetal después de su destilación .....	51
3.8.1 <i>Estudio del efecto del flujo de fase móvil y del gradiente de elución</i> .....	51
3.8.2 <i>Aislamiento de compuestos de interés, presentes en el extracto hidroalcohólico de L. origanoides quimiotipo felandreno, obtenido de material vegetal después de su destilación</i> .....	52

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

3.8.3 <i>Preparación de los extractos bajo estudio, obtenidos de material vegetal después de su destilación, para el fraccionamiento por cromatografía líquida preparativa</i> .....	53
3.8.4 <i>Fraccionamiento por cromatografía líquida preparativa de los extractos bajo estudio, obtenidos de material vegetal después de su destilación</i> .....	54
3.8.5 <i>Uso del sistema de reciclaje en cromatografía líquida preparativa, para la separación de compuestos presentes en la fracción II obtenida del extracto hidroalcohólico de L. origanoides, obtenido de material vegetal después de su destilación</i> .....	55
4. Resultados y discusión .....	56
4.1 Rendimientos de extracción .....	56
<sup>a</sup> Promedio .....	58
HA: Extracto hidroalcohólico .....	58
SFE-CO <sub>2</sub> : Extracto obtenido con fluido supercrítico .....	58
4.2 Análisis químico instrumental de los extractos vegetales bajo estudio, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación .....	58
4.2.1 <i>Caracterización química por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas</i> .....	58
4.2.2 <i>Patrones de fragmentación y iones-producto característicos de sustancias patrón de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, analizados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas</i> .....	76
4.2.3 <i>Repetibilidad de los tiempos de retención y áreas cromatográficas de sustancias patrón analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas</i> .....	86
4.2.4 <i>Cuantificación química por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, de los extractos bajo estudio</i> .....	87
4.2.5 <i>Caracterización química por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos, de los extractos vegetales bajo estudio</i> .....	95

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

4.3 Diseño e implementación de un método cromatográfico por cromatografía líquida preparativa, para el fraccionamiento de extractos, obtenidos de material vegetal después de su destilación .....	100
4.3.1 <i>Estudio del efecto del flujo de fase móvil y del gradiente de elución para el fraccionamiento de sustancias patrón</i> .....	100
4.3.2 <i>Fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de L. organoides quimiotipo felandreno, obtenido de material vegetal después de su destilación, para el aislamiento de compuestos de interés</i> .....	105
4.3.3 <i>Fraccionamiento de los extractos bajo estudio y caracterización química de las fracciones</i> .....	107
4.3.4 <i>Sistema de reciclaje de disolvente para la separación de compuestos presentes en la fracción II obtenida del extracto hidroalcohólico de L. organoides</i> .....	145
5. Conclusiones .....	150
6. Divulgación de resultados .....	152
Referencias bibliográficas.....	154
Apéndices.....	174

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Lista de figuras

Figura 1. <i>Lippia origanoides</i> H.B.K., quimiotipo felandreno. Imagen tomada por el químico Félix Camilo Muñoz. Lugar: parcelas experimentales del CENIVAM. Universidad Industrial de Santander (UIS), Bucaramanga, fecha: 1 de diciembre del 2022. ....	27
Figura 2. <i>Turnera diffusa</i> Willd. Ex Schult. Imagen tomada por el químico Félix Camilo Muñoz. Lugar: parcelas experimentales del CENIVAM. UIS, Bucaramanga, fecha: 1 de diciembre del 2022. ....	28
Figura 3. <i>Varronia curassavica</i> Jacq. Roem & Schult. Imagen tomada por el químico Félix Camilo Muñoz. Lugar: parcelas experimentales del CENIVAM. UIS, Bucaramanga, fecha: 1 de diciembre del 2022. ....	30
Figura 4. Estructura general de los flavonoides. Tomado de Atmani <i>et al</i> , 2009. ....	32
Figura 5. Estructura general de un ácido hidroxicinámico. Tomado de Gutiérrez-Grijalva <i>et al.</i> , 2017. ....	33
Figura 6. Esquema del analizador de masas <i>Q-Exactive Orbitrap</i> . Tomado de Zubarev & Makarov, 2013. ....	37
Figura 7. Publicaciones con Prep/HPLC, por año. Fuente: <i>Scopus (Elsevier)</i> . Periodo de observación 2004-2022. Fecha de consulta 20-12-22. Ecuación de búsqueda <i>TITLE-ABS-KEY</i> (“Prep/HPLC”) AND (“Extracts”). ....	40
Figura 8. Relación entre el porcentaje de publicaciones y el área de estudio con Prep/HPLC. Base de datos: <i>Scopus (Elsevier)</i> . Fecha de consulta 20-12-22. Periodo de observación 1981-2020. Ecuación de búsqueda <i>TITLE-ABS-KEY</i> (“Prep/HPLC”) AND (“Extracts”). ....	41
Figura 9. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de compuestos protonados [(M+H)] <sup>+</sup> y deprotonados [(M-H)] <sup>-</sup> , en los extractos bajo estudio de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno. A. Extracto HA de material vegetal, antes de su destilación; B. HA de material vegetal, después de su destilación; C. SFE-CO <sub>2</sub> de material vegetal, antes de su destilación; D. SFE-CO <sub>2</sub> de material vegetal, después de su destilación. UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS, columna <i>Zorbax Eclipse C<sub>18</sub></i> . Véase la identificación de los picos en la Tabla 2. ....	61
Figura 10. EIC de compuestos protonados [(M+H)] <sup>+</sup> detectados en los extractos bajo estudio de <i>T. diffusa</i> . A. HA de material vegetal, antes de su destilación; B. HA de material vegetal, después de su destilación; C. SFE-CO <sub>2</sub> de material vegetal antes de su destilación; D. SFE-CO <sub>2</sub> de material	

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

vegetal después de su destilación. UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, columna <i>Zorbax Eclipse C18</i> . Véase la identificación de los picos en la Tabla 3. ....	67
Figura 11. EIC de compuestos protonados [(M+H) <sup>+</sup> ] y deprotonados [(M-H) <sup>-</sup> ] detectados en los extractos bajo estudio de <i>V. curassavica</i> . A. Extracto HA de material vegetal antes de su destilación; B. HA de material vegetal después de su destilación; C. SFE-CO <sub>2</sub> de material vegetal antes de su destilación; D. SFE-CO <sub>2</sub> de material vegetal después de su destilación. UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, columna <i>Zorbax Eclipse C18</i> . Véase la identificación de los picos en la Tabla 4. ....	73
Figura 12. Escisiones de retrociclación del anillo C y sus fragmentos resultantes para flavonoides sustituidos. Tomado de Tsimogiannis <i>et al.</i> , 2007.....	77
Figura 13. Reacción retro Diels-Alder de una flavona con formación de los iones-producto A <sup>+</sup> y B <sup>+</sup> , a partir de la ruptura en el anillo C ( <sup>1,3</sup> A <sup>+</sup> y <sup>1,3</sup> B <sup>+</sup> ). Adaptado de Corradini <i>et al.</i> , 2011.....	78
Figura 14. Reacción de oxidación de la naringenina a eriodictiol, en medio acuoso y radiación. Adaptado de Nagy <i>et al.</i> , 2008.....	90
Figura 15. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno. A. Extracto HA de material vegetal, antes de su destilación; B. Extracto HA de material vegetal, después de su destilación; C. Extracto SFE-CO <sub>2</sub> de material vegetal, antes de su destilación; D. Extracto SFE-CO <sub>2</sub> de material vegetal, después de su destilación. Columna <i>GEMINI C18</i> . La identificación se muestra en el Apéndice 45. ....	97
Figura 16. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos de <i>T. diffusa</i> . A. Extracto HA de material vegetal, antes de su destilación; B. Extracto HA de material vegetal, después de su destilación; C. Extracto SFE-CO <sub>2</sub> de material vegetal, antes de su destilación; D. Extracto SFE-CO <sub>2</sub> de material vegetal, después de su destilación. Columna <i>GEMINI C18</i> . La identificación se muestra en el Apéndice 46.....	98
Figura 17. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos de <i>V. curassavica</i> . A. Extracto HA de material vegetal, antes de su destilación; B. Extracto HA de material vegetal, después de su destilación; C. Extracto SFE-CO <sub>2</sub> de material vegetal, antes de su destilación; D. Extracto SFE-CO <sub>2</sub> de material vegetal después, de su destilación. Columna <i>GEMINI C18</i> . La identificación se muestra en el Apéndice 47.....	99
Figura 18. Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC de la mezcla de sustancias patrón. A. Flujo de 4 mL/min, metanol 70% v/v; B. Flujo de 4 mL/min, metanol 50% v/v; C. Flujo de 10	

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

mL/min, metanol 50% v/v; D. Flujo de 12 mL/min, gradiente de elución programado. Columna <i>Shim-Pack GIST C<sub>18</sub></i> . .....	104
Figura 19. Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto HA de <i>L. origanoides</i> . Columna <i>Shim-Pack GIST C<sub>18</sub></i> . .....	106
Figura 20. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones recolectadas del extracto HA de <i>L. origanoides</i> . A. Fracción I; B. Fracción II. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> . ISTD: cafeína, 100 mg/L. ....	107
Figura 21. Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto HA de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno. Columna <i>Shim-Pack GIST C<sub>18</sub></i> . .....	111
Figura 22. Perfiles cromatográficos obtenido por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno. A. Fracción I; B. Fracción II; C. Fracción III; D. Fracción IV. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> . ....	113
Figura 23. Perfiles cromatográficos obtenido por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno. A. Fracción V; B. Fracción VI; C. Fracción VII; D. Fracción VIII. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> . .....	114
Figura 24. Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto SFE-CO <sub>2</sub> de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno. Columna <i>Shim-Pack GIST C<sub>18</sub></i> . .....	117
Figura 25. Perfiles cromatográficos obtenido por HPLC/DAD de las fracciones del extracto SFE-CO <sub>2</sub> de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno. A. Fracción I; B. Fracción II; C. Fracción III. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> . .....	119
Figura 26. Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto HA de <i>T. diffusa</i> . Columna <i>Shim-Pack GIST C<sub>18</sub></i> . .....	122
Figura 27. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de <i>T. diffusa</i> . A. Fracción I; B. Fracción II; C. Fracción III; D. Fracción IV. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> . .....	124
Figura 28. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de <i>T. diffusa</i> . A. Fracción V; B. Fracción VI; C. Fracción VII; D. Fracción VIII. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> . ....	125
Figura 29. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de <i>T. diffusa</i> . A. Fracción IX; B. Fracción X; C. Fracción XI. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> . .....	126

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

Figura 30. Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto SFE-CO <sub>2</sub> de <i>T. diffusa</i> . Columna <i>Shim-Pack GIST C<sub>18</sub></i> .....	128
Figura 31. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto SFE-CO <sub>2</sub> de <i>T. diffusa</i> . A. Fracción I; B. Fracción II; C. Fracción III; D. Fracción IV. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> . ....	130
Figura 32. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto SFE-CO <sub>2</sub> de <i>T. diffusa</i> . A. Fracción V; B. Fracción VI; C. Fracción VII. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> .....	130
Figura 33. Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto HA de <i>V. curassavica</i> . Columna <i>Shim-Pack GIST C<sub>18</sub></i> .....	135
Figura 34. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de <i>V. curassavica</i> . A. Fracción I; B. Fracción II; C. Fracción III. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> .....	137
Figura 35. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de <i>V. curassavica</i> . A. Fracción IV; B. Fracción V. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> . ....	138
Figura 36. Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto SFE-CO <sub>2</sub> de <i>V. curassavica</i> . Columna <i>Shim-Pack GIST C<sub>18</sub></i> .....	141
Figura 37. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto SFE-CO <sub>2</sub> de <i>V. curassavica</i> . A. Fracción I; B. Fracción II; C. Fracción III; D. Fracción IV. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> . ....	143
Figura 38. Perfiles cromatográficos obtenidos por Prep/HPLC con el sistema de reciclaje de disolvente, de las fracciones II del extracto HA de <i>L. origanoides</i> , obtenido de material vegetal después de su destilación. A. Sin ciclo de reciclaje de disolvente; B. Un ciclo de reciclaje de disolvente; C. Dos ciclos de reciclaje de disolvente. Columna <i>Shim-Pack GIST C<sub>18</sub></i> . ....	148
Figura 39. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de la fracción II y sus subfracciones, obtenidas del extracto HA de <i>L. origanoides</i> . A. Fracción II; B. fracción II-1; C. fracción II-2. Columna <i>GEMINI C<sub>18</sub></i> . maU). ....	149

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Lista de tablas

Tabla 1. Rendimientos los extractos vegetales bajo estudio, obtenidos con CO <sub>2</sub> supercrítico y disolvente, de material vegetal antes y después de su destilación por arrastre con vapor. ....	58
Tabla 2. Masas exactas de iones o moléculas protonadas [(M+H)] <sup>+</sup> y deprotonadas [(M-H)] <sup>-</sup> , identificadas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de compuestos presentes en los extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. ....	62
Tabla 3. Masas exactas de iones o moléculas protonadas [(M+H)] <sup>+</sup> , identificadas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de compuestos detectados en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. ....	68
Tabla 4. Masas exactas de iones o moléculas protonadas [(M+H)] <sup>+</sup> y deprotonadas [(M-H)] <sup>-</sup> , identificadas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de compuestos detectados en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. ....	74
Tabla 5. Iones-producto característicos y sus intensidades relativas (%) de las sustancias patrón usadas, pertenecientes a la familia de flavanonas. ....	82
Tabla 6. Iones-producto característicos y sus intensidades relativas (%) de las sustancias patrón usadas, pertenecientes a la familia de flavonoles. ....	83
Tabla 7. Iones-producto característicos y sus intensidades relativas (%) de las sustancias patrón usadas, pertenecientes a la familia de flavonas. ....	84
Tabla 8. Iones-producto característicos y sus intensidades relativas (%) de las sustancias patrón usadas, pertenecientes a la familia de ácidos hidroxicinámicos. ....	85
Tabla 9. Repetibilidad de t <sub>R</sub> y de áreas cromatográficas de las sustancias patrón analizados por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS. ....	86
Tabla 10. Cuantificación por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM, de los extractos vegetales de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación, mediante curvas de calibración externas con el uso de sustancias patrón. ....	92
Tabla 11. Cuantificación por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM, de los extractos vegetales de <i>T. diffusa</i> , obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación, a mediante curvas de calibración externas con el uso de sustancias patrón. ....	93

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

Tabla 12. Cuantificación por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM, de los extractos vegetales de <i>V. curassavica</i> , obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación, mediante curvas de calibración externas con el uso de sustancias patrón. ....	94
Tabla 13. Repetibilidad de los tiempos de retención y áreas cromatográficas de los compuestos presentes en la mezcla de sustancia patrón. Flujo de 12 mL/min, gradiente de elución programado. ....	103
Tabla 14. Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto hidroalcohólico de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno. Se inyectaron 200 mg de muestra. ....	112
Tabla 15. Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto obtenido con fluido supercrítico de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno. Se inyectaron 200 mg de muestra. ....	118
Tabla 16. Resumen de los compuestos detectados por HPLC/DAD en las fracciones obtenidas de los extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno. ....	120
Tabla 17. Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto hidroalcohólico de <i>T. diffusa</i> . Se inyectaron 200 mg de muestra. ....	123
Tabla 18. Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto obtenido con fluido supercrítico de <i>T. diffusa</i> , de material vegetal después de su destilación. Se inyectaron 200 mg de muestra. ....	129
Tabla 19. Resumen de los compuestos detectados por HPLC/DAD en las fracciones obtenidas de los extractos de <i>T. diffusa</i> . ....	132
Tabla 20. Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto hidroalcohólico de <i>V. curassavica</i> . Se inyectaron 200 mg de muestra. ....	136
Tabla 21. Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto obtenido con fluido supercrítico de <i>V. curassavica</i> . Se inyectaron 200 mg de muestra. ....	142
Tabla 22. Resumen de los compuestos detectados por HPLC/DAD en las fracciones obtenidas de los extractos de <i>V. curassavica</i> , de material vegetal después de su destilación. ....	144
Tabla 23. fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC de la fracción II del extracto hidroalcohólico de <i>L. origanoides</i> . Se inyectaron 23.3 mg de la fracción II. ....	147

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Lista de Apéndices

Apéndice 1. Espectro de masas de la taxifolina-glucósido ( $m/z$ 465.10397, 10 eV), presente en los extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2.....	174
Apéndice 2. Espectro de masas de la taxifolina ( $m/z$ 303.05115, 10 eV), presente en los extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2. ....	175
Apéndice 3. Espectro de masas del eriodictiol-7- <i>O</i> -glucósido ( $m/z$ 449.10904, 10 eV) presente en los extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2.....	176
Apéndice 4. Espectro de masas de la quercetina-3- <i>O</i> -glucósido ( $m/z$ 463.08850, 30 eV), presente en extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2.....	177
Apéndice 5. Espectro de masas de la luteolina-rutinósido ( $m/z$ 593.15179, 20 eV), presente en los extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2.....	178
Apéndice 6. Espectro de masas de la luteolina-7- <i>O</i> -glucósido ( $m/z$ 447.09344, 30 eV), presente en los extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2.....	179
Apéndice 7. Espectro de masas de la apigenina-7- <i>O</i> -glucorónido ( $m/z$ 447.09186, 20 eV), presente en los extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2.....	180
Apéndice 8. Espectro de masas de la apigenina-7- <i>O</i> -glucósido ( $m/z$ 433.11221, 10 eV), presente en extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2.....	181
Apéndice 9. Espectro de masas del eriodictiol ( $m/z$ 289.07016, 30 eV), presente en extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2. ....	182
Apéndice 10. Espectro de masas de la quercetina ( $m/z$ 301.03568, 20 eV), presente en extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2. ....	183

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

Apéndice 11. Espectro de masas de la naringenina ( $m/z$ 271.06137, 30 eV) presente en extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2. ....	184
Apéndice 12. Espectro de masas de la luteolina ( $m/z$ 287.05457, 40 eV) presente en extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2. ....	185
Apéndice 13. Espectro de masas de la cirsimaritina ( $m/z$ 315.08569, 40 eV) presente en extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2. ....	186
Apéndice 14. Espectro de masas de la pinocembrina ( $m/z$ 257.08060, 30 eV) presente en extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2. ....	187
Apéndice 15. Espectro de masas de la galangina ( $m/z$ 271.05984, 40 eV) presente en extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2. ....	188
Apéndice 16. Espectro de masas de la Galangina metilada ( $m/z$ 285.07541, 50 eV) presente en los extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 2.....	189
Apéndice 17. Espectro de masas de la luteolina-rutinósido ( $m/z$ 595.16510, 10 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	190
Apéndice 18. Espectro de masas de la vitexina ( $m/z$ 433.11255, 30 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	191
Apéndice 19. Espectro de masas de la luteolina-7- <i>O</i> -glucósido ( $m/z$ 449.10724, 10 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	191
Apéndice 20. Espectro de masas de la apigenina-7- <i>O</i> -glucorónido ( $m/z$ 447.09192, 20 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	193

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

Apéndice 21. Espectro de masas de la apigenina-7- <i>O</i> -glucósido ( <i>m/z</i> 433.11218, 10 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	194
Apéndice 22. Espectro de masas de la luteolina-8- <i>C</i> -β-[6-deoxy-2- <i>O</i> -(α-L-rhamnopiranosil)-xylohexopiranos-3-ulósido] ( <i>m/z</i> 577.15518, 20 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	195
Apéndice 23. Espectro de masas de la naringenina ( <i>m/z</i> 273.07550, 30 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	196
Apéndice 24. Espectro de masas de la luteolina ( <i>m/z</i> 287.05472, 50 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	197
Apéndice 25. Espectro de masas de la isrohamnetina ( <i>m/z</i> 317.06509, 40 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	198
Apéndice 26. Espectro de masas de la hechinacina ( <i>m/z</i> 579.14868, 10 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	199
Apéndice 27. Espectro de masas de la apigenina ( <i>m/z</i> 271.05981, 50 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	200
Apéndice 28. Espectro de masas del ácido de luteolina-8- <i>C</i> -propenóico ( <i>m/z</i> 357.06009, 20 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3. ....	201
Apéndice 29. Espectro de masas de la isosakuranetina ( <i>m/z</i> 289.09109, 40 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	202
Apéndice 30. Espectro de masas de la acacetina ( <i>m/z</i> 285.07541, 50 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	203

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

Apéndice 31. Espectro de masas del crisoeriol ( $m/z$ 301.07016, 50 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	204
Apéndice 32. Espectro de masas de la acacetina metilada ( $m/z$ 299.09100, 40 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	205
Apéndice 33. Espectro de masas de la velutina ( $m/z$ 315.08597, 50 eV) presente en los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 3.....	206
Apéndice 34. Espectro de masas del ácido cafeico ( $m/z$ 179.03404, 20 eV) presente en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 4.....	207
Apéndice 35. Espectro de masas del eriodictiol-7- <i>O</i> -glucósido ( $m/z$ 449.10818, 20 eV) presente en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 4.....	208
Apéndice 36. Espectro de masas de la rutina ( $m/z$ 609.14545, 20 eV) presente en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 4.....	209
Apéndice 37. Espectro de masas del ácido rosmarínico ( $m/z$ 359.07678, 10 eV) presente en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 4.....	210
Apéndice 38. Espectro de masas del kaempferol-3- <i>O</i> -galactósido ( $m/z$ 447.09265, 20 eV) presente en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 4. ....	211
Apéndice 39. Espectro de masas de la hidroxí-artemetina ( $m/z$ 405.11743, 40 eV) presente en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 4.....	212
Apéndice 40. Espectro de masas de la artemetina ( $m/z$ 359.12283, 30 eV) presente en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 4.....	213

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

Apéndice 41. Espectro de masas del pachipodol ( $m/z$ 345.09631, 30 eV) presente en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 4.....	214
Apéndice 42. Espectro de masas de la retusina ( $m/z$ 359.11209, 50 eV), presente en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 4.....	215
Apéndice 43. Espectro de masas del cordianal C ( $m/z$ 473.36194, 20 eV) presente en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 4.....	216
Apéndice 44. Espectro de masas del cordianal B ( $m/z$ 471.34616, 10 eV) presente en los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la Tabla 4.....	217
Apéndice 45. Espectro de masas de la sustancia patrón de sakuranetina ( $m/z$ 287.09113, 40 eV) obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. ....	218
Apéndice 46. Máximos de absorción y áreas relativas de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis por HPLC/DAD de los extractos de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. Columna <i>GEMINI C</i> <sub>18</sub> . ....	219
Apéndice 47. Máximos de absorción y áreas relativas de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis por HPLC/DAD de los extractos de <i>T. diffusa</i> , obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. Columna <i>GEMINI C</i> <sub>18</sub> . ....	220
Apéndice 48. Máximos de absorción y áreas relativas de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis por HPLC/DAD de los extractos de <i>V. curassavica</i> , obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. Columna <i>GEMINI C</i> <sub>18</sub> . ....	221

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Abreviaturas, siglas y acrónimos

AE	Aceite esencial.
AF	Ácido fórmico.
AT	<i>Agilent Technologies</i> .
AV	Arrastre con vapor.
BHA	<i>Butylated Hydroxyanisole</i> (Hidroxianisol butilado).
BHT	<i>Butylated Hydroxytoluene</i> (Hidroxitolueno butilado)
CA	California.
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas Tropicales.
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas.
DAD	<i>Diode-Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos).
$d_f$	Espesor de la fase estacionaria.
EE. UU.	Estados Unidos de América.
EI	<i>Electron Ionization</i> (Ionización por electrones).
EIC	<i>Extracted Ion Ccurrent</i> (Corriente iónica extraída).
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo).
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (y otros).
eV	Electrón-voltio
FA	Formiato de amonio.
FC	<i>Flash Chromatography</i> (Cromatografía rápida).
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización de llama).
HA	Extracto obtenido con solución hidroalcohólica.
HCD	<i>Higher-Energy Collision Dissociation Cell</i> (Celda de disociación de alta energía).
HCN	Herbario Nacional Colombiano.
HESI	<i>Heated Electrospray Ionization</i> (Ionización por electro-nebulización calentada).
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
MS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas de alta resolución).
HSCCC	<i>High speed counter ccurrent chromatography</i> (Cromatografía contra corriente de alta velocidad).
ISTD	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno).
D.I.	Diámetro interno
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida).
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección).
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Límite de cuantificación).
$m/z$	Relación masa/carga.
N.I.	No identificado.
Q-Orbitrap-MS	<i>Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas <i>Q-Exactive Orbitrap</i> ).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

PDA	<i>Photodiode-Array Detector</i> (Detector de fotoarreglo de diodos).
Prep/HPLC	<i>Preparative High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia preparativa).
RDA	Reacción de retro Diels-Alder
Ref.	Referencia.
rpm	Revoluciones por minuto.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico).
SFE-CO <sub>2</sub>	Extracto obtenido con CO <sub>2</sub> supercrítico.
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total).
t <sub>M</sub>	Tiempo muerto.
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención.
t <sub>RR</sub>	Tiempo de retención relativo
UHPLC	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia).
UV-Vis	Ultravioleta-visible.

## Resumen

**Título:** Diseño e implementación de un método cromatográfico para el fraccionamiento de extractos, obtenidos con disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico, de material vegetal después de su destilación de plantas aromáticas, de la biodiversidad colombiana.<sup>1</sup>

**Autor:** Félix Camilo Muñoz Álvarez<sup>2</sup>

**Palabras clave:** Cromatografía líquida preparativa, fraccionamiento de extractos, biomasa residual, extracto hidroalcohólico, extracto obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico.

### Descripción:

*Lippia origanoides* (Verbenaceae), quimiotipo felandreno, *Turnera diffusa* (Turneraceae) y *Varronia curassavica* (Boraginaceae), son plantas aromáticas presentes en la biodiversidad colombiana. Sus aceites esenciales (AE) y extractos poseen propiedades biológicas *e.g.*, antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antitumorales, entre otras, que se atribuyen principalmente a la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos. La destilación de estas plantas permite obtener los AE, y la biomasa residual es usada principalmente como compostaje o para la fabricación de combustibles. En la actualidad, se considera necesario, el estudio de nuevas formas de aprovechar este “desecho”.

En este trabajo de investigación, la biomasa residual de las plantas bajo estudio fue usada para obtener extractos mediante disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico. Los extractos obtenidos, se caracterizaron por técnicas de cromatografía líquida de alta resolución como HPLC/DAD y UHPLC/ESI-Orbitrap-HRMS. Fue posible determinar que, el proceso de destilación afecta la composición y cuantificación química del extracto, así como, su rendimiento de extracción.

Se desarrolló un método de cromatografía líquida preparativa para el fraccionamiento de extractos obtenidos, con disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico, de material vegetal después de su destilación. Se estudiaron parámetros operacionales como el flujo de fase móvil, el volumen de inyección de la muestra, las longitudes de onda de detección, el gradiente de elución, entre otros.

El método implementado, permitió aislar compuestos que presentan propiedades biológicas de interés y que tienen un valor comercial alto. En extractos de *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, fue posible aislar compuestos como el eriodictiol-7-*O*-glucósido, el eriodictiol, la pinocembrina y la galangina, en *T. diffusa*, la acetina metilada, y en *V. curassavica*, el ácido rosmarínico, la hidrox-artemetina, la artemetina y la retusina. Es posible utilizar y aprovechar la biomasa residual, producto de la destilación de las plantas aromáticas, como una fuente de compuestos naturales.

---

<sup>1</sup>Trabajo de investigación.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Maestría en Química. Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez.

### Abstract

**Title:** Design and implementation of a chromatographic method for the extracts fractionation, obtained with solvent and supercritical CO<sub>2</sub>, from vegetal material aromatic plants after its distillation, of colombian biodiversity.

**Author:** Félix Camilo Muñoz Álvarez.

**Key words:** Preparative liquid chromatography, extracts fractionation, residual biomass, hydroalcoholic extract, extract obtained with supercritical CO<sub>2</sub>.

### Description:

*Lippia origanoides* (Verbenaceae), phellandrene chemotype, *Turnera diffusa* (Turneraceae) and *Varronia curassavica* (Boraginaceae), are aromatic plants present in Colombian biodiversity. Its essential oils (EO) and extracts have biological properties, *e.g.*, antioxidant, antimicrobial, antiviral, antitumor, among others, which are mainly attributed to the presence of secondary metabolites such as phenolic compounds. The distillation of these plants makes it possible to obtain EOs, and the residual biomass is used mainly as composting or manufacture of fuels. At present, it is considered necessary to study new ways to take advantage of this "waste".

In this research work, the residual biomass of the plants under study was used to obtain extracts by solvent and supercritical CO<sub>2</sub>. The extracts obtained were characterized by high performance liquid chromatography techniques such as HPLC/DAD and UHPLC/ESI-Orbitrap-HRMS. It was possible to determine that the distillation process affects the composition and chemical quantification of the extract, and its extraction yield.

A preparative liquid chromatography method was developed for the extract's fractionation obtained, with solvent and supercritical CO<sub>2</sub>, from plant material after its distillation. Operational parameters such as mobile phase flow, sample injection volume, detection wavelengths, elution gradient, others, were studied.

The method implemented, allowed to isolate compounds that present biological properties of interest and that have a high commercial value. In extracts of *L. origanoides*, phellandrene chemotype, it was possible to isolate compounds such as eriodictyol-7-*O*-glucoside, eriodictyol, pinocembrin and galangin, in *T. diffusa*, methylated acacetin, and in *V. curassavica*, rosmarinic acid, hydroxy-artemetin, artemetin and retusin. It is possible to use and take advantage of the residual biomass, product of the distillation of aromatic plants, as a source of natural compounds.

## Introducción

Colombia es uno de los países más biodiverso del mundo, cualidad que no ha sido aprovechada, dado que diversas especies vegetales son poco conocidas o no han sido estudiadas, y que podrían ser de interés para las industrias farmacéutica, cosmética y agrícola (Bernal & Mesa, 2014; Instituto *von* Humboldt, Colombia, 2017). Especies aromáticas de la biodiversidad colombiana como *Lippia organoides* H.B.K, quimiotipo felandreno (Verbenaceae), *Turnera diffusa* Willd. Ex Schult (Turneraceae), y *Varronia curassavica* Jacq. Roem & Schult (Boraginaceae), se consideran promisorias, porque, sus metabolitos secundarios presentan bioactividad. Las plantas no han sido comercializadas a gran escala y pueden llegar a tener un grado de aprovechamiento agroindustrial alto.

Métodos de extracción no convencionales como la extracción con disolvente asistida con ultrasonido y con CO<sub>2</sub> supercrítico, se usan para aislar flavonoides y ácidos hidroxicinámicos (Pico *et al.*, 2020), que son metabolitos secundarios no volátiles con propiedades biológicas de interés (Lin *et al.*, 2016). Estudios previos han demostrado que extractos obtenidos con disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico, de las especies vegetales estudiadas, poseen bioactividades, *e.g.*, capacidad antioxidante, antimicrobiana, antiviral, citotoxicidad, entre otras (Michielin *et al.*, 2011; Álvarez, 2014; Li *et al.*, 2014; Stashenko *et al.*, 2016).

Las plantas aromáticas se destilan para obtener su aceite esencial (AE), sin embargo, cuyos rendimientos son inferiores al 1% en peso. La masa vegetal residual, se emplea como ingrediente para la fabricación de abonos orgánicos, compostaje y para la

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

elaboración de combustibles (Stashenko, 2009; Guarín & Barajas, 2016). En Colombia la biomasa residual de la producción de productos agrícolas es mayoritariamente desaprovechada por el desconocimiento de sus posibles usos, acceso a mercados y tecnologías, y por la ausencia de innovación en la generación de productos nuevos (Gobierno de la República de Colombia, 2019).

Existe un interés creciente en el aislamiento de compuestos bioactivos de material vegetal después del proceso de destilación de plantas aromáticas, que son de interés para las industrias farmacéutica y cosmética (Saha & Basak, 2020). En el Centro de Investigación CENIVAM, Arias *et al.*, 2020, obtuvieron extractos con CO<sub>2</sub> supercrítico de *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, de material vegetal después de su destilación, enriquecido en pinocembrina y galangina, sin embargo, aislar y purificar estos compuestos de forma eficiente, es posible solo mediante técnicas analíticas instrumentales de alta resolución.

La cromatografía líquida preparativa (Prep/HPLC) se presenta como una técnica importante para el fraccionamiento de muestras complejas, para recolectar sus constituyentes individuales de alta pureza, mediante flujos de fase móvil altos y columnas cromatográficas de dimensiones mayores, respecto a la cromatografía analítica, junto con el uso de un fraccionador (Wang *et al.*, 2011; Shimadzu, 2020). Sin embargo, esta técnica cromatográfica ha sido poco usada en Colombia para el aislamiento de compuestos naturales a partir de matrices vegetales.

Una de las dificultades al implementar una técnica cromatográfica nueva, es encontrar parámetros cromatográficos que permitan una selectividad específica hacia compuestos de interés (Cimpan & Gocan, 2002). Por tal motivo, se diseñó y se implementó

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

un método por Prep/HPLC, para fraccionar extractos, obtenidos con disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico, de las especies vegetales bajo estudio, de material vegetal después de su destilación por arrastre con vapor (AV). En el presente trabajo se desarrolló un método cromatográfico, teniendo en cuenta parámetros operativos como el flujo de fase móvil, el volumen de inyección, los disolventes de la fase móvil, el gradiente de elución, el tiempo de análisis, las longitudes de onda de detección, entre otros.

Este trabajo de investigación contribuye a construir bases científicas útiles para separar, purificar y recolectar compuestos fenólicos y otros compuestos de interés, presentes en la biodiversidad colombiana. Se espera beneficiar a largo plazo al sector de la agricultura promoviendo los cultivos de plantas aromáticas, a través de su aprovechamiento integral, como propuesta económica viable para generar ingresos alternativos a los cultivos tradicionales, con miras a dar alternativas al reemplazo de cultivos ilícitos en el marco del postconflicto armado colombiano.

## 1. Estado del arte

### 1.1 Plantas bajo estudio

#### 1.1.1 *Lippia organoides* H.B.K., quimiotipo *felandreno*

Es un arbusto aromático de hasta 3 m de altura, que pertenece a la familia Verbenaceae, nativo de América Central y el norte de Suramérica (Véase **Figura 1**). Comúnmente conocido como “orégano de monte”, sus hojas se utilizan como especia en la culinaria (Oliveira *et al.*, 2007). El componente mayoritario de sus aceites esenciales (AE) ha conducido a clasificar esta especie en quimiotipos, (Zapata *et al.*, 2009). Esta planta se considera promisoría por diversas razones, a saber, en la medicina tradicional se emplea para tratar enfermedades respiratorias, gastrointestinales, y los AE y extractos han demostrado propiedades biológicas, *e.g.*, actividad antimicrobiana, citotóxica, antioxidante, antígenotóxica, entre otros (Henao *et al.*, 2009; Zapata *et al.*, 2009; Arango Bedoya *et al.*, 2012; Rey, 2015).

En el Centro de Investigación CENIVAM, se caracterizó químicamente el extracto obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de la biomasa residual de *L. organoides*, quimiotipo *felandreno*, y se identificaron la pinocembrina y la galangina como compuestos mayoritarios (Arias *et al.*, 2020).

**Figura 1**

*Lippia origanoides* H.B.K., quimiotipo felandreno. Imagen tomada por el químico Félix Camilo Muñoz. Lugar: parcelas experimentales del CENIVAM. Universidad Industrial de Santander (UIS), Bucaramanga, fecha: 1 de diciembre del 2022.



**1.1.2 Turnera diffusa Willd. Ex Schult**

Es un pequeño arbusto de la familia Turneraceae, que crece en partes tropicales de América y, su nombre común es “damiana de flor amarilla” (Véase **Figura 2**). Los antiguos mayas y los indígenas mexicanos la usaban en tratamientos para el vértigo y como afrodisiaco (Zhao *et al.*, 2006). Usualmente, se consume en infusiones, bebidas alcohólicas o mezclada con otras plantas (Dorantes *et al.*, 2019). Esta especie aromática es de gran interés debido a que se han evaluado diferentes propiedades biológicas de los AEs y

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

extractos *e.g.*, actividad antioxidante, antibacterial, citotóxica, genotóxica y antigenotóxica (Stashenko *et al.*, 2011; Avelino *et al.*, 2014; Cely, 2014; Urbizu *et al.*, 2017).

En el Centro de Investigación CENIVAM, se estudió la composición química, la actividad antioxidante y fotoprotectora de extractos obtenidos con disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico. Los extractos hidroalcohólicos mostraron actividades antioxidante y fotoprotectora similares a las sustancias comerciales de referencia como el hidroxitolueno butilado (BHT) y el  $\alpha$ -tocoferol (Cordoba *et al.*, 2019).

### **Figura 2**

*Turnera diffusa Willd. Ex Schult. Imagen tomada por el químico Félix Camilo Muñoz.*

*Lugar: parcelas experimentales del CENIVAM. UIS, Bucaramanga, fecha: 1 de diciembre del 2022.*



### 1.1.3 *Varronia curassavica* Jacq. Roem & Schult

Esta especie vegetal de la familia Boraginaceae, crece en Norteamérica, Sudamérica y Malasia (Oza & Kulkarni, 2017). Es un subarbusto erecto de hasta 2.5 m de altura, ramificado, con hojas simples, coriáceas y aromáticas de 5 cm a 9 cm de largo (Véase **Figura 3**). Sus flores son pequeñas, blancas, dispuestas en racimos terminales de 10 cm a 15 cm y sus frutos son esféricos de coloración roja cuando están maduros (Schroeder & Burgos, 2017). En la medicina tradicional, se conoce como “mulato” y sus partes áreas se usan para el tratamiento de padecimientos respiratorios y del tracto gastrointestinal. Los AE y extractos tienen propiedades biológicas como antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria y analgésica (Hernández *et al.*, 2015; Bayeux *et al.*, 2002; Fagner *et al.*, 2015). En extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico, se han estudiado las composiciones químicas y su bioactividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Michielin *et al.*, 2009).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

En el Centro de Investigación CENIVAM, es la primera vez que se estudia la composición química de extractos de *V. curassavica*, obtenidos con disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico.

### Figura 3

*Varronia curassavica* Jacq. Roem & Schult. Imagen tomada por el químico Félix Camilo Muñoz. Lugar: parcelas experimentales del CENIVAM. UIS, Bucaramanga, fecha: 1 de diciembre del 2022.



### 1.2 Biomasa residual

La biomasa residual se define como la materia orgánica de “desecho”, generada por el ser humano, como subproducto de un proceso. Se distinguen cuatro tipos: residuos agrícolas, forestales, estiércol animal y desechos orgánicos, *e.g.*, desechos de madera (Pfau,

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

2015). La biomasa residual se destaca por su potencial de ser aprovechado como combustible, energía o producto químico (Ferreira-Leitao *et al.*, 2010).

En los procesos de destilación de plantas aromáticas para la obtención de los AEs a escala industrial, una gran cantidad de biomasa se genera como subproducto (Saha *et al.*, 2018). Se estima que se producen *ca.* 200.000 ton/año de residuos sólidos en todo el mundo (Rolz *et al.*, 1986; Sayed-Ahmad, *et al.*, 2017a; Sayed-Ahmad, *et al.*, 2017b). En la búsqueda de nuevos procesos que permitan el aprovechamiento de estos residuos, se ha demostrado que la biomasa residual de especies vegetales es una fuente de compuestos bioactivos, por ejemplo, Vega y Dávila, 2021, aislaron flavonoides con alta capacidad antioxidante, a partir de la biomasa residual no-psicoactiva de *Cannabis sativa* L.

### 1.3 Extractos vegetales

Los extractos son mezclas multicomponentes de composición desconocida y compleja, que contienen metabolitos secundarios de la planta, que incluyen sustancias de volatilidad baja y de peso molecular alto (>400 Da). En ellos, prevalecen compuestos fenólicos, ácidos grasos, hidrocarburos parafínicos de cadena larga, sus alcoholes o aldehídos (Stashenko & Martínez, 2011; Stashenko & Martínez, 2013). Son interés debido a sus actividades farmacológicas, cuyos efectos se atribuyen a determinados compuestos fitoquímicos, denominados compuestos bioactivos, que incluyen flavonoides, ácidos hidroxicinámicos, entre otros. Los extractos se obtienen con diferentes disolventes polares, apolares o con fluido supercrítico, según la naturaleza química de los metabolitos secundarios que se quieran obtener (Vázquez, 2015; Rodríguez *et al.*, 2012; Oliveros, 2015). En este trabajo de investigación, se empleó la extracción hidroalcohólica asistida por ultrasonido y la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico.

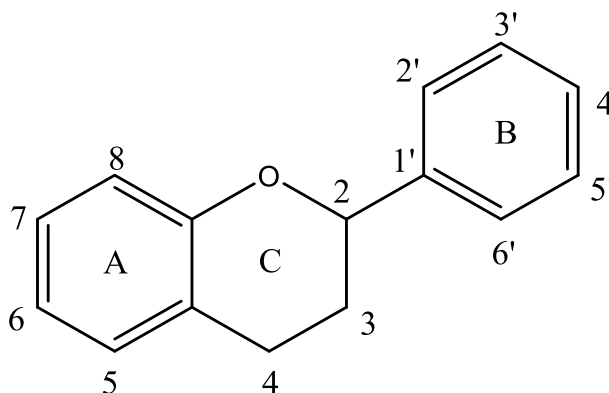
## 1.4 Metabolitos secundarios de interés

### 1.4.1 Flavonoides

Son derivados de benzopirano con un grupo fenilo en la segunda posición. Estas sustancias se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes especies de plantas. La estructura básica de los flavonoides tiene en tres anillos fusionados (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), etiquetados como A, C y B (Véase **Figura 4**) (Atmani *et al.*, 2009). Los diferentes sustituyentes en los anillos A, C y B, dan lugar a diferentes clases de flavonoides que incluyen chalconas, flavonas, isoflavonoides, flavanonas, flavonoles y antocianinas (Tiwari & Rana, 2015). En la naturaleza se encuentran más de 8.000 compuestos fenólicos reportados, que se clasifican, según su número y posición de átomos de carbono (Cheynier, 2012). Actualmente, los flavonoides son objeto de mucho interés por sus propiedades biológicas que se les atribuyen, principalmente, por su capacidad antioxidante (Lin *et al.*, 2016).

#### Figura 4

*Estructura general de los flavonoides. Tomado de Atmani et al, 2009.*



### 1.4.2 Ácidos hidroxicinámicos

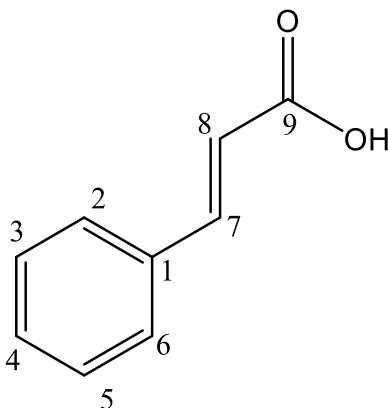
Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran en frutas, verduras y matrices vegetales. Son moléculas con un anillo fenólico unido a uno o más grupos hidroxilo, (Rocha *et al.*,

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

2012). La clase más estudiada comprende una estructura de un anillo aromático unido a una cadena lateral de tres carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), donde se encuentran principalmente ácidos como el cafeico, el rosmarínico, el ferúlico, los dicafeoilquínicos, entre otros (Pereira *et al.*, 2009). Las propiedades bioactivas reportadas incluyen efectos antitumorales, antimicrobianos, antioxidantes y neuroprotectores (Razzaghi-Asl *et al.*, 2013). La **Figura 5** muestra la estructura general de un ácido hidroxicinámico.

### Figura 5

*Estructura general de un ácido hidroxicinámico. Tomado de Gutiérrez-Grijalva et al., 2017.*



## 1.5 Aislamiento compuestos fenólicos

### 1.5.1 Extracción con disolvente asistida con ultrasonido

Esta extracción consiste en separar uno o más componentes de una fase sólida, mediante el uso de una fase líquida o disolvente (Mejia, 2014). La elección del disolvente adecuado para la extracción, es función de las afinidades de los grupos funcionales presentes en el soluto, con los del disolvente. Para el disolvente, se deben tener en cuenta otras propiedades como viscosidad, toxicidad, polaridad, entre otras (Todd, 2014). Los

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

medios de extracción más usados son soluciones acuosas de acetona, etanol y metanol (Kähkönen *et al*, 2001). El proceso puede facilitarse por ultrasonido para romper las paredes celulares de la planta (Rojas, 2015). Entre las ventajas de este método se encuentran la fácil recuperación de los disolventes empleados que pueden ser removidos del extracto por rotoevaporación y el agua remanente por liofilización (Aybastier *et al*, 2013).

### **1.5.2 Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico**

Un fluido supercrítico (SF), es una sustancia cuyas condiciones de presión y temperatura se encuentran por encima de su punto crítico, por lo cual, exhibe propiedades tanto de un gas como de un líquido (Gómez, 2012). La densidad de un SF se encuentra más cercana a la de un líquido, mientras que, la viscosidad y difusividad a la de un gas, lo que facilita la penetración del material vegetal para extraer los compuestos activos (Wrona, 2017). El CO<sub>2</sub> es el disolvente más utilizado para obtener extractos vegetales, alcanza su punto crítico a 73.8 bares de presión y 31.1 °C de temperatura, condiciones que impiden la degradación térmica de los metabolitos secundarios, además, después del proceso de extracción, se prescinde de la etapa de separación del solvente, ya que, en condiciones ambientales el CO<sub>2</sub> (solvente lipofílico) se encuentra en estado gaseoso (Stashenko *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2012). En ocasiones, se emplea un cosolvente polar para aumentar la solubilidad de los compuestos fenólicos durante la extracción (Scopel *et al.*, 2013). A través del cosolvente se busca incrementar las fuerzas intermoleculares como puentes de hidrógeno, la polarizabilidad de la mezcla, la selectividad, y, por ende, el rendimiento de extracción (Del Valle *et al.*, 2017).

### 1.6 Técnicas analíticas instrumentales

#### 1.6.1 *Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos*

Esta técnica (HPLC/DAD) es útil para el análisis de moléculas polares, termolábiles y de alto peso molecular (Carrillo, 2017). Se basa en la separación de analitos de una mezcla compleja a través de la transferencia de masa entre dos fases. Una móvil, que es líquida y una estacionaria que puede ser líquida o sólida. Las columnas cromatográficas poseen longitudes entre 30 mm y 250 mm, con tamaños de partículas de 2  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$ , lo que permite que la muestra pueda separarse por diferencia de afinidades entre ambas fases (Mejia, 2014; Thammana, 2016). Para la separación y caracterización de compuestos fenólicos y sus derivados, se emplea esta técnica cromatográfica en fase reversa, con columnas apolares de sílice modificada de octilsilano ( $\text{C}_8$ ) y octadecilsilano ( $\text{C}_{18}$ ). Los compuestos fenólicos absorben luz en rangos de longitudes de onda  $\lambda=240\text{-}560$  nm, por lo que es común que su caracterización se realice con sistemas de detección de arreglo de diodos (DAD) y UV-Vis, y en otros casos, cuando se requiere un análisis químico de alta resolución, se combina HPLC/DAD con detectores de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) (Merken & Beecher, 2000; Tsimogiannis *et al.*, 2007). Actualmente, HPLC es la técnica cromatográfica más empleada en diferentes campos de investigación como química, ciencias ambientales, farmacia, ciencias forenses, entre otros (Thammana, 2016), para la separación de mezclas de sustancias polares y poco volátiles.

#### 1.6.2 *Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas Q-Exactive Orbitrap*

UHPLC se basa en el mismo fundamento que HPLC, se diferencia en el uso de columnas con tamaño de partículas inferiores a 2  $\mu\text{m}$  y la operación del equipo se lleva a

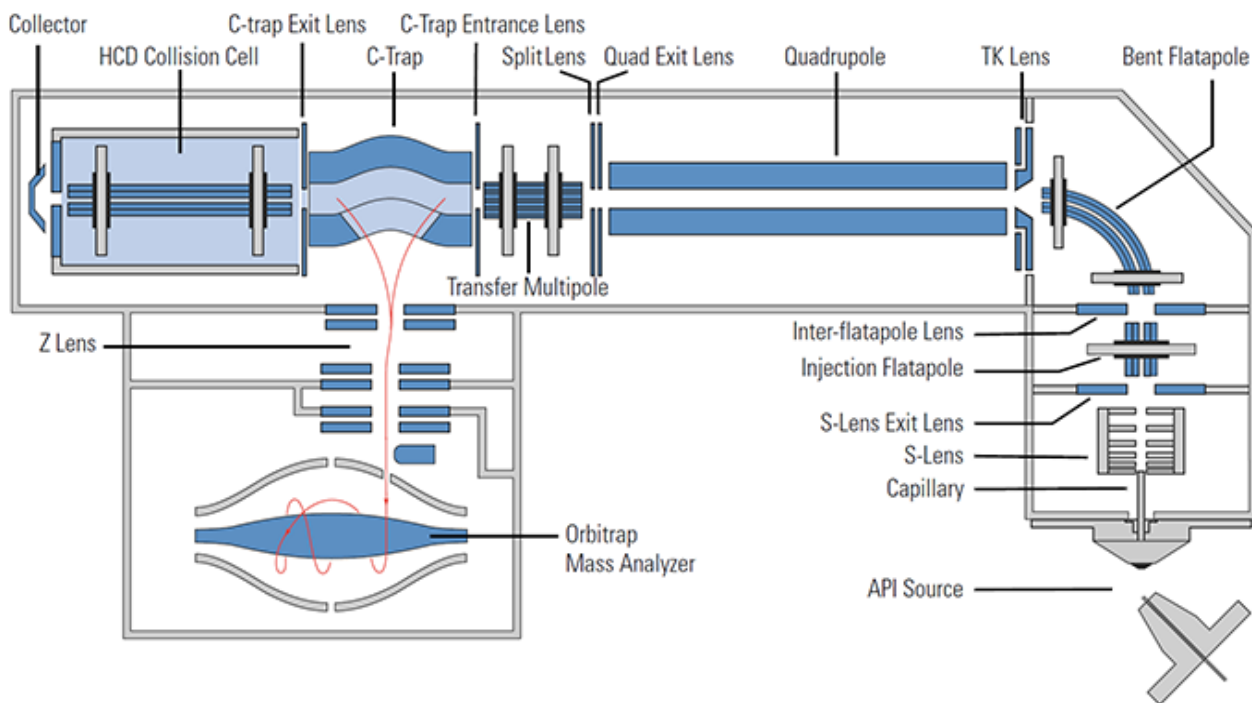
## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

cabo con presiones altas (41-103 MPa) (Walter & Andrews, 2014). Es ideal para análisis rápidos que requieren menor consumo de solvente y, para el desarrollo de métodos cromatográficos de muestras muy complejas (Rathod *et al.*, 2019).

La **Figura 6** muestra el esquema del analizador de masas *Q-Exactive Orbitrap*. Los analitos separados en la columna cromatográfica se ionizan, y los iones formados en la interfaz del *electrospray*, entran tangencialmente a una trampa en forma de barril con un electrodo coaxial que posee un campo electrostático, que obliga a los iones a permanecer en una frecuencia de oscilación en espiral casi circular dentro de la trampa (como un planeta en el sistema solar) (Zubarev & Makarov, 2013). A medida que los iones oscilan armónicamente a lo largo del eje, las diferencias de las corrientes de imagen entre electrodos se detectan por un amplificador diferencial. Las corrientes iónicas de espejo se amplifican y se digitalizan, luego, se someten a una transformada de Fourier, que convierte la señal del tiempo registrada en un espectro de relación  $m/z$  (Hecht *et al.*, 2019; Marshall & Verdun, 1990). El uso del cuadrupolo (Q) permite el monitoreo del ion seleccionado (SIM), donde el Q analiza los rangos de tiempo y masas seleccionados. La combinación *Q-Orbitrap* posibilita el monitoreo de masas de iones seleccionados y sus precursores, seguida de un análisis conjunto de los iones-producto obtenidos en la celda de disociación de alta energía (HCD) (Michalski *et al.*, 2011).

**Figura 6**

*Esquema del analizador de masas Q-Exactive Orbitrap. Tomado de Zubarev & Makarov, 2013.*



La UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS posee diferentes ventajas analíticas, entre ellas, una elevada sensibilidad, alta especificidad, medición de iones con masa exacta, información sobre la composición elemental, rutas de fragmentación de moléculas y posibilita el análisis de muestras complejas en alta resolución (Dong & Zhang, 2014; Brea, 2009). Actualmente, es usada en varios campos de la ciencia como química, farmacia, química ambiental, ciencias forenses, toxicología, entre otras aplicaciones (Hussain & Shaikh, 2016).

### 1.6.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia preparativa

Esta técnica (Prep/HPLC), se fundamenta en HPLC, la diferencia consiste en el aislamiento y purificación de un compuesto deseado presente en una muestra (Syukri *et al*,

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

2013). Prep/HPLC se caracteriza por el uso de flujos de fase móvil altos (5-50 mL/min) y el uso de columnas cromatográficas largas (250-500 mm), con diámetros internos grandes (10-50 mm), respecto a la cromatografía analítica (Shimadzu, 2020). La muestra atraviesa la columna arrastrada por la acción de la fase móvil, en consecuencia, este proceso separa la mezcla en compuestos que pueden ser recolectados con un fraccionador (Schulenberg-Schell & Tei, 2015). La columna preparativa, según su diámetro, permite una capacidad de carga de hasta 2 g de muestra (Font, 2012). Esta técnica cromatográfica se usa ampliamente en la industria farmacéutica para la purificación de fármacos quirales y, es una herramienta útil para obtener compuestos de alta pureza, requeridos para su estudio biológico posterior (Fornstedt *et al.*, 2017).

El desarrollo de un método por Prep/HPLC se encuentra condicionado por las características fisicoquímicas de la muestra. Para este trabajo de investigación, la composición química de un extracto vegetal condiciona los materiales y métodos utilizados. Un extracto obtenido con etanol acuoso diferirá en su composición, respecto a si la planta se somete a un proceso extractivo con un disolvente como *n*-hexano, por lo tanto, conocer la polaridad de los compuestos que conforman el extracto es uno de los principales factores determinantes en cuanto a qué método se va a aplicar en Prep/HPLC (Latif & Sarker, 2012).

En fitoquímica ha sido posible el fraccionamiento, purificación y caracterización de compuestos bioactivos presentes en extractos vegetales. Se han reportado estudios con el uso de fases móviles binarias o ternarias de agua, metanol y acetonitrilo, en presencia o ausencia de modificadores ácidos, con flujos que van desde los 5 mL/min hasta los 20 mL/min. Los sistemas cromatográficos más usados poseen columnas con dimensiones de

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

250 mm de longitud, 10-20 mm de diámetro interno y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, con fase estacionaria en fase reversa; módulo de recirculación de solvente (sistema de reciclaje), detector DAD, fraccionador automático o manual (Merken & Beecher, 2000). La caracterización química de los compuestos aislados se puede realizar por técnicas como HPLC/DAD, LC/MS, FTIR y RMN; (Puri *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2019).

### 1.7 Panorama del uso de la cromatografía líquida preparativa para el aislamiento de compuestos naturales

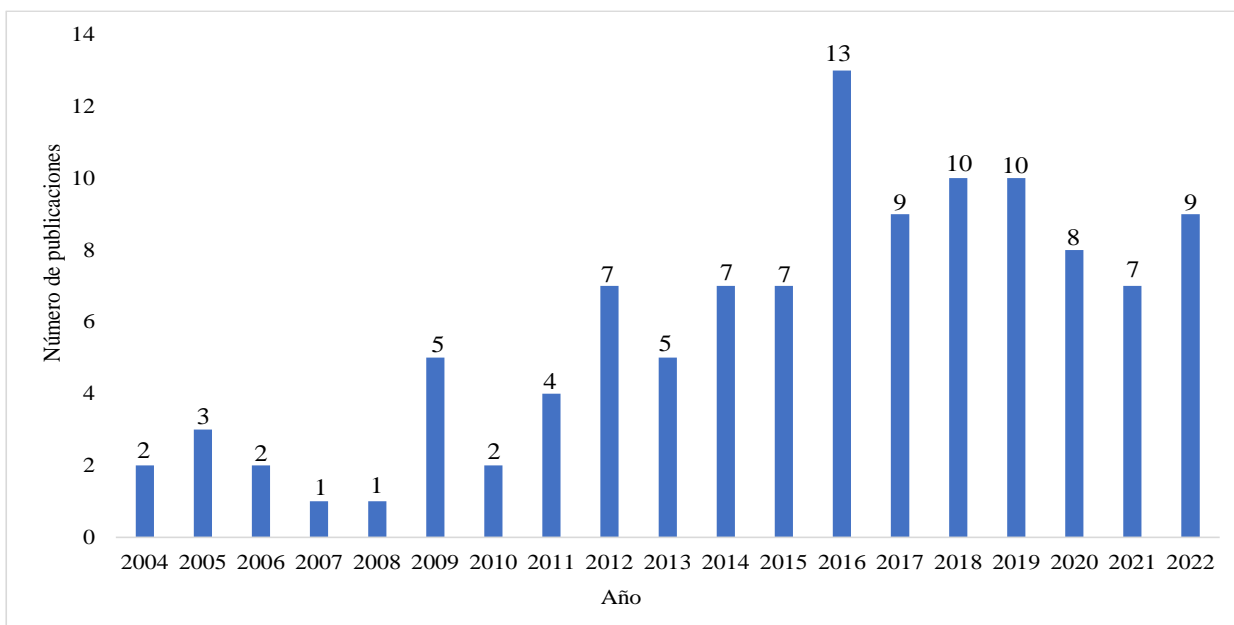
Para este análisis bibliométrico, se empleó la base de datos *Scopus* (*Elsevier*) y la siguiente ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY* (“Prep/HPLC”) *AND* (“*Extracts*”). Se obtuvieron 117 resultados, se descartaron artículos científicos relacionados con cromatografía contra-corriente de alta velocidad (HSCCC), *flash chromatography* (FC) o cromatografía en columna, así como, purificación de compuestos orgánicos sintetizados o fármacos. No se encontraron publicaciones sobre las especies bajo estudio de material vegetal, después de su destilación, tampoco artículos científicos relacionados con el fraccionamiento y purificación de extractos obtenidos mediante  $\text{CO}_2$  supercrítico.

En la **Figura 7** se observan las publicaciones realizadas durante el periodo de 2004-2022. En el año 2016, se publicó la mayor cantidad de artículos científicos (13).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 7**

*Publicaciones con Prep/HPLC, por año. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de observación 2004-2022. Fecha de consulta 20-12-22. Ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY (“Prep/HPLC”) AND (“Extracts”).*



Los estudios realizados involucraban el fraccionamiento de extractos vegetales para la obtención, purificación y caracterización de compuestos nuevos individuales (Liang *et al.*, 2014), bioactivos (Sasidharan *et al.*, 2011), antocianinas (Syukri *et al.*, 2013), compuestos fenólicos (Peng *et al.*, 2017), entre otros.

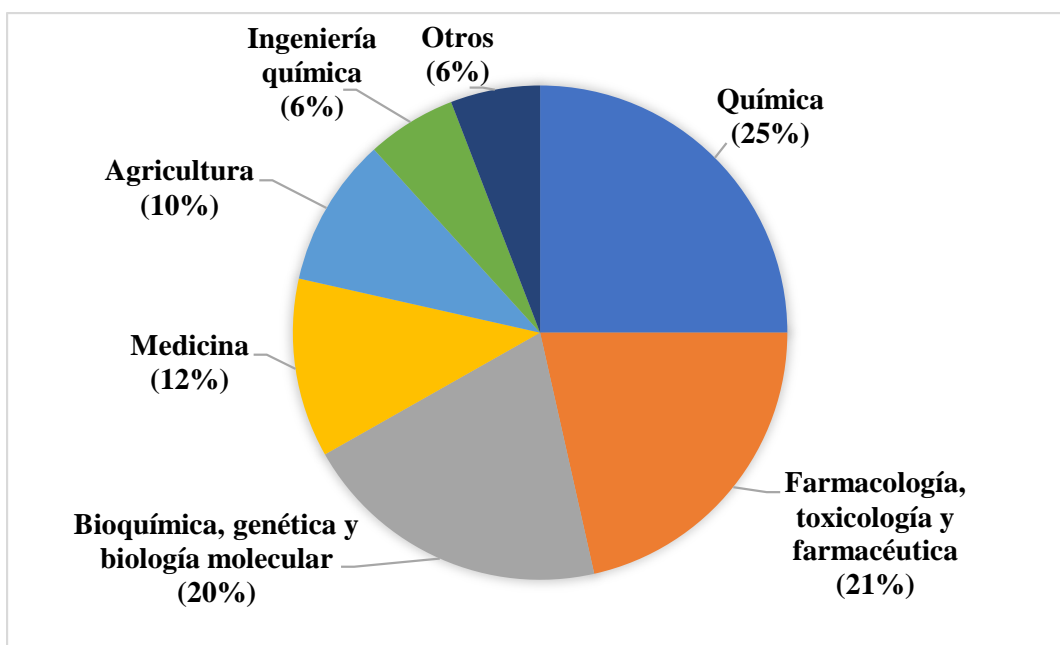
La **Figura 8** muestra que el área de estudio con más publicaciones para Prep/HPLC corresponde a “química” (25%). Por otra parte, le siguen las áreas de “farmacología, toxicología y farmacéutica” (21%) y “bioquímica, genética y biología molecular” (20%). Los autores que más han reportado el uso de esta técnica son Li, P., y Wei, Y., con cuatro artículos cada uno. El país donde más publicaciones se realizaron es China, con 70 artículos

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

científicos, le siguen Corea del Sur (16), Estados Unidos e India (10), Holanda, Alemania, Malasia, Suiza y Reino Unido, con tres cada uno.

### Figura 8

*Relación entre el porcentaje de publicaciones y el área de estudio con Prep/HPLC. Base de datos: Scopus (Elsevier). Fecha de consulta 20-12-22. Periodo de observación 1981-2020. Ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY (“Prep/HPLC”) AND (“Extracts”).*



## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Encontrar parámetros cromatográficos de la Prep/HPLC que permitan eficientemente el fraccionamiento de extractos vegetales, obtenidos con disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico, para diseñar e implementar un método que posibilite aislar compuestos fenólicos de interés, presentes en el material vegetal, después de su destilación por arrastre con vapor (AV), de tres plantas aromáticas promisorias de la biodiversidad colombiana.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Comparar la composición química de los extractos obtenidos con disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico, de material vegetal antes y después de su destilación por arrastre con vapor, para determinar el efecto del proceso destilativo, en el rendimiento de extracción y la composición química del extracto.

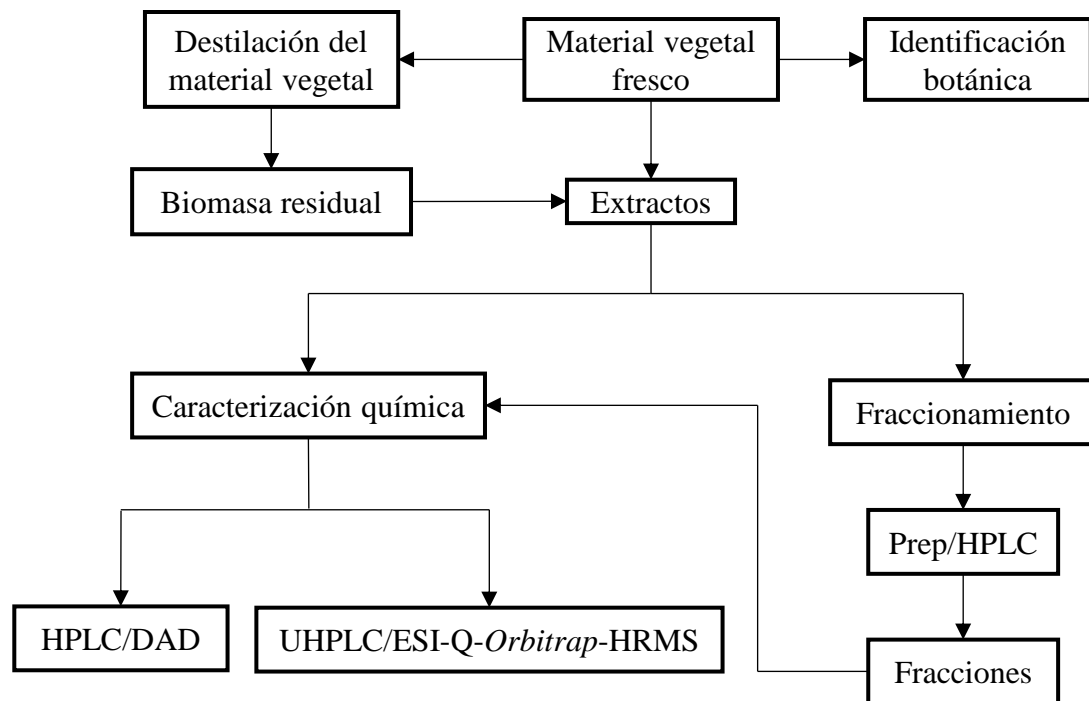
2. Estudiar parámetros cromatográficos de la técnica Prep/HPLC para determinar sus efectos, sobre la separación, aislamiento y purificación de los compuestos fenólicos de interés, presentes en los extractos vegetales bajo estudio, obtenidos de material vegetal después de su destilación por arrastre con vapor.

3. Diseñar e implementar un método de Prep/HPLC que permita la separación, aislamiento y purificación de la mayor cantidad de compuestos fenólicos de interés, presentes en los extractos bajo estudio, obtenidos de material vegetal después de su destilación por arrastre con vapor.

### 3. Metodología

#### 3.1 Diagrama metodológico

El trabajo experimental se realizó siguiendo el esquema que aparece a continuación:



#### 3.2 Reactivos

Apigenina ( $\geq 95\%$ ), ácido cafeico ( $\geq 98\%$ ), ácido rosmarínico ( $\geq 97\%$ ), eriodictiol ( $\geq 90\%$ ), quercetina-3-*O*-glucósido ( $\geq 90\%$ ), quercetina ( $\geq 98\%$ ), naringenina ( $\geq 95\%$ ), isorhamnetina ( $\geq 95\%$ ), pinocembrina ( $\geq 95\%$ ), taxifolina ( $\geq 85\%$ ), cafeína ( $\geq 99\%$ ) y teobromina ( $\geq 99\%$ ), fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich* (SA, St. Louis, MO, EE. UU.). Eriodictiol-7-*O*-glucósido ( $\geq 98\%$ ), kaempferol-3-*O*-galactósido ( $\geq 98\%$ ), pachipodol ( $\geq 98\%$ ), luteolina-7-*O*-glucósido ( $\geq 98\%$ ), apigenina-7-*O*-glucorónido ( $\geq 98\%$ ), luteolina ( $\geq 98\%$ ), cirsimaritina ( $\geq 98\%$ ), acetina ( $\geq 98\%$ ), salvigenina ( $\geq 98\%$ ), se obtuvieron

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

de *Chemfaces* (Wuhan, Ubei, China). La apigenina-7-*O*-glucósido ( $\geq 90\%$ ), galangina ( $\geq 95\%$ ), vitexina ( $\geq 95\%$ ), artemetina ( $\geq 98\%$ ), sakuranetina ( $\geq 98\%$ ) se compraron al proveedor *Phytolab GmbH* (Vestenbergsgreuth, Baviera, Alemania). Acetonitrilo grado HPLC, ácido fórmico grado HPLC, metanol grado HPLC, metanol grado LC/MS, formiato de amonio ( $\geq 99\%$ ), agua Tipo I (sistema de purificación *Millipore Direct-Q<sup>TM</sup>*) fueron obtenidos de *Merck* (*Merck KGaA*, Darmstadt, Alemania). El nitrógeno y el dióxido de carbono (99.995%) se compraron de *Messer* (Bucaramanga, Colombia).

### 3.3 Recolección del material vegetal

Las plantas bajo estudio se cultivaron y recolectaron en las parcelas experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM, en el campus principal de la UIS, Bucaramanga, Santander, Colombia. La identificación taxonómica fue realizada por el doctor Andrés Felipe Castaño Moreno, director del Herbario UIS. Para el desarrollo de esta investigación, se emplearon las partes aéreas (tallo, hojas y flores) de las especies *L. origanoides* H.B.K., quimiotipo felandreno (N° voucher UIS22186), *T. diffusa* Willd. Ex Schult (N° voucher UIS22032) y *V. curassavica* Jacq. Roem & Schult (N° voucher UIS20892), cuyas *exsiccatum* se encuentran depositadas en el herbario UIS. Los criterios de selección del material vegetal fueron los siguientes: plantas adultas en estado de floración y población local abundante.

Los experimentos que involucraron la manipulación de material vegetal fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación Científica de la UIS, de acuerdo con la Ley N° 6, del 13 de abril de 2018. Además, se tuvo en cuenta el Permiso de Recursos Genéticos N° 270 (contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados para

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

investigación científica con fines de prospección biológica) celebrado entre el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la UIS.

### 3.4 Obtención de la biomasa residual

El AE del material vegetal picado (partes aéreas) se obtuvo por destilación por AV, según lo descrito por Stashenko *et al.*, 1996, con algunas modificaciones. Se usó un equipo conformado por un alambique de acero inoxidable de 0.5 m<sup>3</sup>, un intercambiador de calor y un vaso florentino. El vapor se generó en una caldera de 6 BHP (Tecnik Ltda., Bogotá, Colombia), operada a una presión de 500 MPa. El vapor inyectó a la biomasa con un flujo de condensado de 500 mL/min. La destilación duró 2 h.

El material vegetal, después de su destilación, se secó durante 15 a 20 días a temperatura ambiente, luego se picó con una picadora de cuchillas *Retsch SM100 (Retsch GmbH, Haan, Alemania)* y se almacenó en frascos de vidrio hasta su extracción.

### 3.5 Extracción de compuestos fenólicos.

#### 3.5.1 Extracción con disolvente asistido por ultrasonido

Se usó el material vegetal de las plantas bajo estudio, antes y después de su destilación. La extracción se realizó según las recomendaciones realizadas por Pico *et al.*, 2020 y Cuevas *et al.*, 2016, con algunas modificaciones. Se empleó una solución de etanol:agua (70%, v/v), con relación material vegetal-solvente 1:20. La mezcla se sonicó durante 1 h con frecuencia de 35 kHz a 50 °C en un equipo de ultrasonido *Elmasonic S300H (Elma Schmidbquer GmbH, Gießen, Alemania)*. La solución se filtró, y el exceso de disolvente se removió a presión reducida a 50 °C en un rotoevaporador *Heidolph (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania)*. El extracto se liofilizó durante 48 h, en un equipo *Virtis Advance Plus (SP Scientific, NY, EE. UU.)*, se pesó y se almacenó a 4 °C.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

Las extracciones se realizaron por triplicado. Los resultados del rendimiento de extracción se expresaron como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar (Véanse **Ecuación 1** y **2**).

$$\text{Rendimiento, \%} = 100 * \frac{\text{Extracto obtenido, g}}{\text{Material vegetal, g}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\text{valor experimental} - \text{valor calculado})^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde, S es la desviación estándar.

### 3.5.2 Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico

Se usó el material vegetal de las plantas bajo estudio, antes y después de su destilación. La extracción se realizó con un equipo THAR-SFE-2000-2-FMC-50 modificado (*Thar Instruments inc*, Pittsburg, PA, EE. UU.). Los parámetros operativos del equipo se ajustaron según la experiencia del grupo de investigación y estudios realizados por Arias *et al.*, 2020. Del Valle *et al.*, 2016 y Durling *et al.*, 2007, con algunas modificaciones. Se cargó el material vegetal al contenedor de 2 L (60% de su volumen), luego se le adicionó una solución hidroetanólica al 50% v/v, teniendo en cuenta la relación de 1.35 mL de solución por 1 g de material cargado. El control de la presión, temperatura y flujo se efectuó desde un computador, mediante el *Software Process Suite Thar* (*Thar Instruments inc*, Pittsburg, PA, EE. UU.). Se usó una presión de 30 MPa y una temperatura de 50 °C. El flujo de CO<sub>2</sub> se ajustó a 40 g/min. El modificador fue una solución hidroetanólica al 89% v/v, con flujo de 2.6 g/min. El tiempo estático fue de 1 h. La extracción se realizó durante 2 h. El extracto se recolectó, se trasvasó a cajas de Petri y se secó con un flujo de aire a 60 °C. Las extracciones se realizaron por triplicado. Los resultados del rendimiento de extracción se expresaron según la **Ecuación 1** y **2**.

### **3.6 Preparación de las muestras, fracciones y las sustancias patrón para el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia y cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas *Q-Exactive Orbitrap*.**

Para el análisis por HPLC/DAD, se pesaron 10 mg de extracto en una balanza *Mettler-Toledo AL2014* (Nanicon, Suiza). El extracto se disolvió con 1 mL de una solución metanol-agua (50% v/v) con ácido fórmico (AF) al 0.5% v/v. La mezcla se agitó en un *MS2 Minishaker IKA* (Wilmington, NC, EE.UU). Se sonicó en un equipo *Elmasonic S300H* (*Elma Schmidbauer GmbH*, Gießen, Alemania) a una frecuencia de 35 kHz durante 30 min, luego, se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 min en una centrifuga *Mikro 220* (*Hettich Technology, Andreas Hettich GmbH*, Alemania). La muestra se filtró con un filtro de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ . Para UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS, se pesó 1 mg del extracto y se disolvió en una solución metanol-agua (50% v/v) con AF 0.1% v/v y 5 mM de formiato de amonio (FA). Se repitió el procedimiento de preparación de la muestra y se filtró con un filtro de PVDF de 0.22  $\mu\text{m}$ . Los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico se desengrasaron con *n*-hexano, previo a la filtración.

1 mg de sustancia patrón se disolvió en 1 mL de metanol. Se tomó una alícuota de 2  $\mu\text{L}$  (UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS) y otra ,de 20  $\mu\text{L}$  (HPLC/DAD), que se trasvasaron a un frasco de 2 mL, respectivamente; se secaron con corriente de nitrógeno y se reconstituyeron en la fase móvil respectiva. Las fracciones se prepararon en concentraciones de 0.02 g/L y 1 g/L para su caracterización química por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS y HPLC/DAD, respectivamente.

### 3.7. Análisis químico instrumental

#### 3.7.1 *Caracterización química por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos, de los extractos bajo estudio y sus fracciones*

Se usó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC 1260 *Infinity* (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.) con columna cromatográfica *GEMINI C<sub>18</sub>* (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) de 250 mm L x 4.6 mm D.I. x 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, con detector de arreglo de diodos AT G1315D, bomba cuaternaria AT G1311C e inyector automático AT G1329B. Se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra. Se empleó un flujo de fase móvil de 1 mL/min con gradiente de elución binario: **A**. Ácido fórmico (0.5% v/v); **B**. Acetonitrilo grado HPLC, programado de esta manera: 2% **B** (0 min), 2-12% **B** (15 min), 12% **B** (15-23 min), 12-40% **B** (23-46 min), 40-90% **B** (46-71 min), 90% **B** (71-75 min), 90-2% **B** (75-80 min), 2% **B** (80-85 min). La detección de los compuestos se realizó a  $\lambda=245$  nm, 270 nm, 290 nm y 515 nm. El procesamiento de los datos se realizó empleando el *software* AT *ChemStation for LC & LC/MS Systems*, versión B.04.02-SP1. Se usó un estándar interno (ISTD) de cafeína en una concentración de 0.1 g/L.

#### 3.7.2 *Caracterización química por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas Q-Exactive Orbitrap, de los extractos bajo estudio y sus fracciones*

Los compuestos fenólicos se analizaron mediante un sistema de cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia *Vanquish<sup>TM</sup>* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA), equipado con un compartimento de columna controlada termostáticamente (40 °C). La separación se realizó en una columna cromatográfica *Zorbax Eclipse XDB C<sub>18</sub>* (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.) de 50 mm L x 2.1 mm D.I. x 1,8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Se usó un flujo de fase móvil de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  con gradiente de elución binario:

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**A.** Agua (0.1 % FA + 5 mM AF); **B.** Metanol LC/MS (0.1% FA + 5 mM AF), programado así: 0% **B** (0 min), 0-100% **B** (0-8 min), 100% **B** (8-12 min), 100-0% **B** (12-13 min) y 0% **B** (13-16 min). El volumen de inyección fue de 2  $\mu$ L. El cromatógrafo líquido se conectó a un espectrómetro de masas *Q-Exactive Plus Orbitrap* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania), con una fuente de ionización por electronebulización celentada (HESI-II). Los iones inyectados a la celda HCD, a través del *C-trap*, se fragmentaron con energías de colisión normalizadas por pasos de 10 eV a 70 eV. Los datos se obtuvieron y analizaron con el *software Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ Chromatography Data System* (CDS), versión 7.2, y el *software Thermo Xcalibur 3.1* (*Thermo Scientific*, San José, CA, USA), respectivamente. La identificación confirmatoria de los compuestos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención ( $t_R$ ) y espectros de masas con sustancias patrón. La identificación tentativa se realizó teniendo en cuenta la masa exacta, el ión molecular, el patrón isotópico del carbono ( $C^{13}$ ) y el patrón de fragmentación comparado con bases de datos. Se usó un ISTD de salvigenina en una concentración de 2 mg/L.

### **3.7.3 Determinación de figuras de mérito para la cuantificación de extractos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas**

**3.7.3.1 Determinación de la repetibilidad del método.** Para determinar la repetibilidad de áreas cromatográficas y de tiempos de retención, se calcularon los promedios (**Ecuación 3**), las desviaciones estándar (**Ecuación 4**) y los coeficientes de variación (**Ecuación 5**), así:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

**Ecuación 3**

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} * 100\% \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:  $\bar{x}$ : promedio de datos.  $x_i$ : datos;  $N$ : número de datos;  $S$ : desviación estándar;  $CV$ : coeficiente de variación.

**3.7.3.2 Determinación de la linealidad, la sensibilidad y los niveles mínimos de detección y cuantificación del método usado para la caracterización y cuantificación química por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.** La linealidad, sensibilidad, el nivel mínimo de detección (LOD) y el nivel mínimo de cuantificación (LOQ), se determinaron a partir de las curvas de calibración de sustancias patrón mencionadas en el apartado **4.2** (reactivos). Las curvas de calibración se prepararon a partir de una solución *stock* de 1 g/L de cada compuesto y se realizaron diluciones (0.1-10 mg/L) para soluciones de trabajo. El coeficiente de determinación ( $R^2 > 0.986$ ) se empleó como criterio de la linealidad. Los errores en los valores de las pendientes y los cortes del eje Y (**Ecuación 6**) se expresaron como las desviaciones estándar de la pendiente y del intercepto (**Ecuaciones 7 y 8**).

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:  $S_{y/x}$ : desviación estándar de la recta;  $Y_i$ : datos experimentales del componente  $i$ ;  $\hat{Y}_i$ : puntos sobre la recta de la regresión calculada.

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 7}$$

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

Donde:  $S_m$  = Desviación estándar de la pendiente (m).

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i X_i^2}{n \sum_i (X_i - \bar{X})^2}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:  $S_b$ : desviación estándar de la ordenada (b).

Para determinar el LOD se usó la **Ecuación 9**, y el LOQ se calculó con la **Ecuación**

**10.**

$$LOD = \frac{KS_b}{m} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:  $K=3$ ;  $S_b$ : desviación estándar del blanco;  $m$ : pendiente de la curva de calibración.

$$LOQ = \frac{KS_b}{m} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde:  $K$ : 10.

### **3.8 Diseño e implementación de un método cromatográfico, por cromatografía líquida preparativa, para el fraccionamiento de extractos de material vegetal después de su destilación**

#### **3.8.1 Estudio del efecto del flujo de fase móvil y del gradiente de elución**

Se usó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Prominence* (*Shimadzu Corporation*, Kyoto, Japón) con detector de arreglo de fotodiodos SPD-M20A, bomba cuaternaria LC-20AP, inyector automático SIL-10AP, válvula de reciclaje FCV-12AH y fraccionador FRC-10A, con columna cromatográfica *Shim-Pack GIST C<sub>18</sub>* (*Shimadzu Corporation*, Kyoto, Japón) de 250 mm L x 20 mm D.I. x 5 µm de tamaño de partícula. Se usaron sustancias patrón de teobromina, cafeína y quercetina, en una concentración de 1 g/L. Las sustancias patrón se disolvieron en una solución agua-metanol (50% v/v). Se

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

inyectó 1 mL de muestra para cada análisis cromatográfico. Se emplearon los siguientes solventes para la fase móvil: **A.** Agua tipo I; **B.** Metanol HPLC. Para evaluar el efecto del flujo y los gradientes de fase móvil, se realizaron análisis cromatográficos con caudales de 4, 10 y 12 mL/min bajo un régimen isocrático de 50% v/v y 70% v/v y. Para evaluar el efecto del gradiente, el flujo de fase móvil fue de 12 mL/min con gradiente de elución binario; **A.** Agua Tipo I; **B.** Metanol grado HPLC, programado así: 2% **B** (0 min), 50% **B** (1-5 min), 90% **B** (7-15 min), 2% **B** (15-17 min), 2% **B** (19 min). La detección de los compuestos fue a  $\lambda=240$  nm, 270 nm, 290 nm, 310 nm, 330 nm y 350 nm. El procesamiento de los datos se llevó a cabo en el *software LabSolutions<sup>TM</sup>*.

### **3.8.2 Aislamiento de compuestos de interés, presentes en el extracto hidroalcohólico de *L. origanoides* quimiotipo *felandreno*, obtenido de material vegetal después de su destilación**

El análisis cromatográfico se llevó a cabo, según metodologías y recomendaciones propuestas por Penduff, 2013, con algunas modificaciones. El extracto hidroalcohólico de *L. origanoides*, se preparó en una concentración de 20 g/L. Se disolvieron 200 mg en 10 mL de una solución agua-metanol (50% v/v). La mezcla se agitó en un *MS2 Minishaker IKA* (Wilmington, NC, EE. UU), y se sonicó en un equipo *Elmasonic S300H* (*Elma Schmidbauer GmbH*, Gießen, Alemania) a una frecuencia de 35 kHz durante 30 min, luego, se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 min, en una centrifuga *Rotofix 32A* (*Hettich Technology, Andreas Hettich GmbH*, Alemania). Se inyectaron 0.5 mL de muestra al cromatógrafo para su análisis inicial y su fraccionamiento. El flujo de fase móvil fue de 15 mL/min con gradiente de elución binario; **A.** Agua Tipo I; **B.** Metanol grado HPLC, programado así: 30% **B** (0 min), 30%-60% **B** (0-5 min), 60% **B** (5-10 min), 60%-70% **B**

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

(10-15 min), 70%-90% **B** (15-20 min), 90% **B** (20-30 min). La detección de los compuestos fue a  $\lambda=240$  nm, 270 nm, 290 nm, 310 nm, 330 nm y 350 nm. El procesamiento de los datos se llevó a cabo en el *software LabSolutions<sup>TM</sup>* versión 5.97. **Fraccionador:** se ajustaron parámetros de pico como: ancho de 3 s, pendiente de 100  $\mu\text{V/s}$ , nivel de 1.000.000  $\mu\text{V}$ . Con un volumen de frasco de 3 mL, respuesta de 1 s y volumen de retardo del fraccionador de 703  $\mu\text{L}$ . Se habilitó la opción válvula abierta y válvula cerrada en intervalos de tiempo específicos. **Tratamiento de las fracciones recolectadas:** Las fracciones se combinaron y se rotoevaporaron hasta eliminar el exceso de fase móvil, luego se reconstituyeron y trasvasaron a frascos de 4 mL. Se llevaron hasta sequedad con corriente de nitrógeno. Las fracciones obtenidas se caracterizaron por HPLC/DAD.

### ***3.8.3 Preparación de los extractos bajo estudio, obtenidos de material vegetal después de su destilación, para el fraccionamiento por cromatografía líquida preparativa***

Se pesaron 400 mg de extracto en una balanza *Mettler-Toledo AL2014* (Nanicon, Suiza). El extracto se disolvió en 10 mL de una solución agua-metanol (50% v/v). La mezcla se agitó en un *MS2 Minishaker IKA* (Wilmington, NC, EE. UU), y se sonicó en un equipo *Elmasonic S300H* (*Elma Schmidbauer GmbH*, Gießen, Alemania) a una frecuencia de 35 kHz durante 30 min, luego, se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 min, en una centrifuga *Rotofix 32A* (*Hettich Technology, Andreas Hettich GmbH*, Alemania). La muestra se filtró con un filtro de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ . Por otra parte, los extractos obtenidos con  $\text{CO}_2$  supercrítico (400 mg) se disolvieron en 10 mL de metanol, y se llevo a cabo el mismo proceso de agitación, sonicación y centrifugación, luego se desengrasaron con 40 mL de *n*-hexano previo a la filtración.

### **3.8.4 Fraccionamiento por cromatografía líquida preparativa de los extractos bajo estudio, obtenidos de material vegetal después de su destilación**

El análisis cromatográfico se realizó según metodologías y recomendaciones propuestas por Kumar *et al.*, 2016, y Abu-Lafi *et al.*, 2018, con algunas modificaciones. Se inyectaron 2.5 mL de muestra al cromatógrafo para evaluar la separación cromatográfica y 5 mL para llevar a cabo el fraccionamiento. El flujo de fase móvil fue de 15 mL/min con gradiente de elución binario: **A.** Agua Tipo I; **B.** Metanol HPLC, programado así: 30% **B** (0 min), 30%-100% **B** (0-30 min), 100% **B** (30-38 min). La detección de los compuestos fue a  $\lambda=240$  nm, 270 nm, 290 nm, 310 nm, 330 nm y 350 nm. El procesamiento de los datos se llevó a cabo con el *software LabSolutions<sup>TM</sup>*.

**Fraccionador:** se ajustaron parámetros de pico como: ancho de 7 s, pendiente de 400  $\mu$ V/s, nivel de 1.000.000  $\mu$ V. Con un volumen de frasco de 25 mL, respuesta de 1 s y volumen de retardo del fraccionador de 703  $\mu$ L. Se habilitó la opción de válvula abierta y de válvula cerrada en intervalos de tiempo específicos. **Tratamiento de las fracciones recolectadas:** Las fracciones se combinaron y se rotoevaporaron con un rotoevaporador *Heidolph* (*Heidolph Instruments*, Schwabach, Alemania) hasta eliminar el exceso de fase móvil. Las fracciones se trasvasaron a frascos de 4 mL y se llevaron hasta sequedad con corriente de nitrógeno y luego se liofilizaron en un liofilizador *Virtis Advance Plus* (*SP Scientific*, New, York, EE.UU). Las fracciones obtenidas se caracterizaron por HPLC/DAD y UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### **3.8.5** *Uso del sistema de reciclaje en cromatografía líquida preparativa, para la separación de compuestos presentes en la fracción II obtenida del extracto hidroalcohólico de L. origanoides, obtenido de material vegetal después de su destilación*

Se realizó dos veces el fraccionamiento por Prep/HPLC del extracto hidroalcohólico de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido de material vegetal después de su destilación. La fracción II (46.7 mg) se disolvió en 4 mL de fase móvil. Se inyectaron 0.5 mL de muestra para realizar el análisis cromatográfico inicial, y 2 mL para el fraccionamiento. Se usaron solventes de fase móvil: **A.** Agua tipo I; **B.** Metanol HPLC, con régimen isocrático 50% v/v. La detección de los compuestos fue a  $\lambda=240$  nm, 270 nm, 290 nm, 310 nm, 330 nm y 350 nm. El procesamiento de los datos se llevó a cabo con el software *LabSolutions*<sup>TM</sup>. **Fraccionador:** se ajustaron parámetros de pico como: ancho de 7 s, pendiente de 400  $\mu$ V/s, nivel de 1.000.000  $\mu$ V, con un volumen de frasco de 25 mL, respuesta de 1 s y volumen de retardo del fraccionador de 703  $\mu$ L. Se habilitó la opción de válvula abierta y de válvula cerrada en intervalos de tiempo específicos. **Tratamiento de las fracciones recolectadas:** Las fracciones se combinaron y se rotoevaporaron con un rotoevaporador *Heidolph* (*Heidolph Instruments*, Schwabach, Alemania) hasta eliminar el exceso de fase móvil. Las fracciones se trasvasaron a frascos de 4 mL y se llevaron hasta sequedad con corriente de nitrógeno y luego se liofilizaron con un liofilizador *Virtis Advance Plus* (*SP Scientific*, New, York, EE.UU). Las fracciones obtenidas se caracterizaron por HPLC/DAD y UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Rendimientos de extracción

Los rendimientos de los extractos bajo estudio, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación, se muestran en la **Tabla 1**. Los extractos obtenidos con solución hidroalcohólica (HA) de *L. origanoides*, de material vegetal antes y después de su destilación, tuvieron los rendimientos más altos ( $13 \pm 1\%$  p/p y  $8 \pm 1\%$  p/p, respectivamente), en comparación, con los extractos HA de *T. diffusa* ( $11 \pm 1\%$  p/p y  $2.8 \pm 0.1\%$  p/p, respectivamente) y *V. curassavica* ( $8 \pm 1\%$  p/p y  $5 \pm 1\%$  p/p, respectivamente).

En el Centro de Investigación CENIVAM, Cordoba *et al.*, 2019, obtuvieron un rendimiento de extracción para los extractos HA de *L. origanoides* y *T. diffusa* de material vegetal antes de su destilación de  $18\%$  p/p y  $6\%$  p/p, respectivamente. En el extracto HA de *V. curassavica*, Michielin *et al.* 2011, obtuvieron un rendimiento del  $8.13\%$  p/p, valor cercano al obtenido en este estudio. En la literatura no se encontraron estudios enfocados en la obtención de extractos HA y con CO<sub>2</sub> supercrítico (SFE-CO<sub>2</sub>), de material vegetal después de su destilación (biomasa residual) para las especies *T. diffusa* y *V. curassavica*.

Para extractos SFE-CO<sub>2</sub> de *L. origanoides* y *T. diffusa*, obtenidos de material vegetal antes de su destilación, Cordoba *et al.* 2019, obtuvieron rendimientos del  $3.3\%$  p/p y  $1.2\%$  p/p, respectivamente, en ausencia de cosolvente, valores que también son menores a los obtenidos en este estudio. En *L. origanoides*, Arias *et al.* 2020, aislaron extractos SFE-CO<sub>2</sub> a partir de material vegetal después de su destilación, en condiciones operativas

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

similares del equipo y en ausencia de cosolvente, y obtuvieron un rendimiento del 1.35% p/p, siendo menor que el de este estudio.

Los rendimientos de los extractos SFE-CO<sub>2</sub> de *L. origanoides* y *T. diffusa*, de material vegetal antes y después de su destilación, aumentaron debido al uso del cosolvente etanol-agua, ya que fue posible incrementar las fuerzas intermoleculares como puentes de hidrógeno, la polarizabilidad de la mezcla, la selectividad, la solubilidad de los compuestos fenólicos durante la extracción, y por ende, el rendimiento de extracción (Scopel *et al.*, 2013; Del Valle *et al.*, 2017).

Es la primera vez que se estudia el efecto del proceso de destilación de plantas aromáticas, sobre el rendimiento de extracción y composición química de los extractos vegetales. Se observó que los extractos bajo estudio obtenidos de material vegetal antes de su destilación tenían rendimientos más altos, en comparación con los extractos aislados de material vegetal después de su destilación. La destilación del material vegetal disminuyó los rendimientos. Posiblemente, durante la destilación, compuestos fenólicos presentes en el material vegetal se degraden por la temperatura alta (Ioannou *et al.*, 2019), o muchos otros compuestos presentes en el material vegetal se solubilicen debido a la condensación del vapor de agua dentro del alambique (O. Ferreira & Simao, 2012).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 1**

*Rendimientos los extractos vegetales bajo estudio, obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico y disolvente, de material vegetal antes y después de su destilación por arrastre con vapor.*

Especie	Material vegetal	Extracto	Rendimiento, % p/p ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) <sup>a</sup>	Literatura, % p/p	Referencia
<i>L. origanoides</i>	Antes de su destilación	HA	13 ± 1	18	Córdoba <i>et al.</i> , 2019
		SFE-CO <sub>2</sub>	6.6 ± 0.1	3.3	Córdoba <i>et al.</i> , 2019
	Después de su destilación	HA	8 ± 1	No reportado	-
		SFE-CO <sub>2</sub>	1.8 ± 0.1	1.35	Arias <i>et al.</i> , 2020
<i>T. diffusa</i>	Antes de su destilación	HA	11 ± 1	6	Córdoba <i>et al.</i> , 2019
		SFE-CO <sub>2</sub>	3.2 ± 0.1	1.2	Córdoba <i>et al.</i> , 2019
	Después de su destilación	HA	2.8 ± 0.1	No reportado	-
		SFE-CO <sub>2</sub>	1.20 ± 0.04	No reportado	-
<i>V. curassavica</i>	Antes de su destilación	HA	8 ± 1	8.13	Michielin <i>et al.</i> , 2011
		SFE-CO <sub>2</sub>	3.7 ± 0.2	3-5	Quispe <i>et al.</i> , 2008
	Después de su destilación	HA	5 ± 1	No reportado	-
		SFE-CO <sub>2</sub>	1.9 ± 0.2	No reportado	-

<sup>a</sup> Promedio ± desviación estándar (n=3)

HA: Extracto hidroalcohólico.

SFE-CO<sub>2</sub>: Extracto obtenido con fluido supercrítico.

### 4.2 Análisis químico instrumental de los extractos vegetales bajo estudio, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación

#### 4.2.1 Caracterización química por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La **Figura 9** muestra la corriente iónica extraída (EIC) en modo SIM, obtenida por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de compuestos protonados [(M+H)]<sup>+</sup> y deprotonados [(M-H)]<sup>-</sup>, detectados en los extractos bajo estudio de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. En todos los extractos se detectaron la pinocembrina y la galangina como los compuestos mayoritarios. En los extractos HA, se observó que algunos compuestos como la naringenina, la luteolina, la

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

pinocembrina y la galangina, disminuyeron su cantidad, después del proceso de destilación, por el contrario, compuestos como la taxifolina, el eriodictiol-7-*O*-glucósido, la quercetina-3-*O*-glucósido, la galangina metilada, aumentaron su cantidad en el extracto. Flavonoides como la luteolina-7-*O*-glucósido, la apigenina-7-*O*-glucorónido, la apigenina-7-*O*-glucósido y el eriodictiol, no variaron su abundancia relativa. En los extractos SFE-CO<sub>2</sub> bajo estudio, se observó que la pinocembrina, la galangina y la galangina metilada, disminuyeron su cantidad, después de la destilación del material vegetal por AV.

La **Tabla 2** muestra la caracterización química por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS de los compuestos detectados en los extractos de *L. origanoides*. Mediante el uso de sustancias patrón se identificaron confirmatoriamente 13 flavonoides, que incluyen tres flavonoles, un flavonol glicosilado, tres flavanonas, una flavanona *O*-glicosilada, dos flavonas y tres flavonas *O*-glicosiladas. Se identificaron tres compuestos de forma tentativa, usando, sus masas exactas, ion molecular, relación isotópica y los patrones de fragmentación comparado, con bases de datos.

En extractos HA de *L. origanoides*, Leitão *et al.* 2017, identificaron compuestos como la taxifolina, luteolina-7-*O*-glucósido, el eriodictiol, la naringenina y la pinocembrina. En extractos de *L. graveolens*, Lin *et al.* 2007, identificaron la apigenina-7-*O*-glucósido, la luteolina y la galangina. En especies del género *Lippia*, Bautista-Hernández *et al.* 2022, determinaron la presencia de quercetina-3-*O*-glucósido. En extractos de *L. alba*, Hennebelle *et al.*, identificaron la apigenina-7-*O*-glucorónido. En *L. sidoides*, Cicera *et al.*, 2022 encontraron el eriodictiol-7-*O*-glucósido y luteolina-7-*O*-rutinósido. En extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico, Arias *et al.* 2020, determinaron la

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

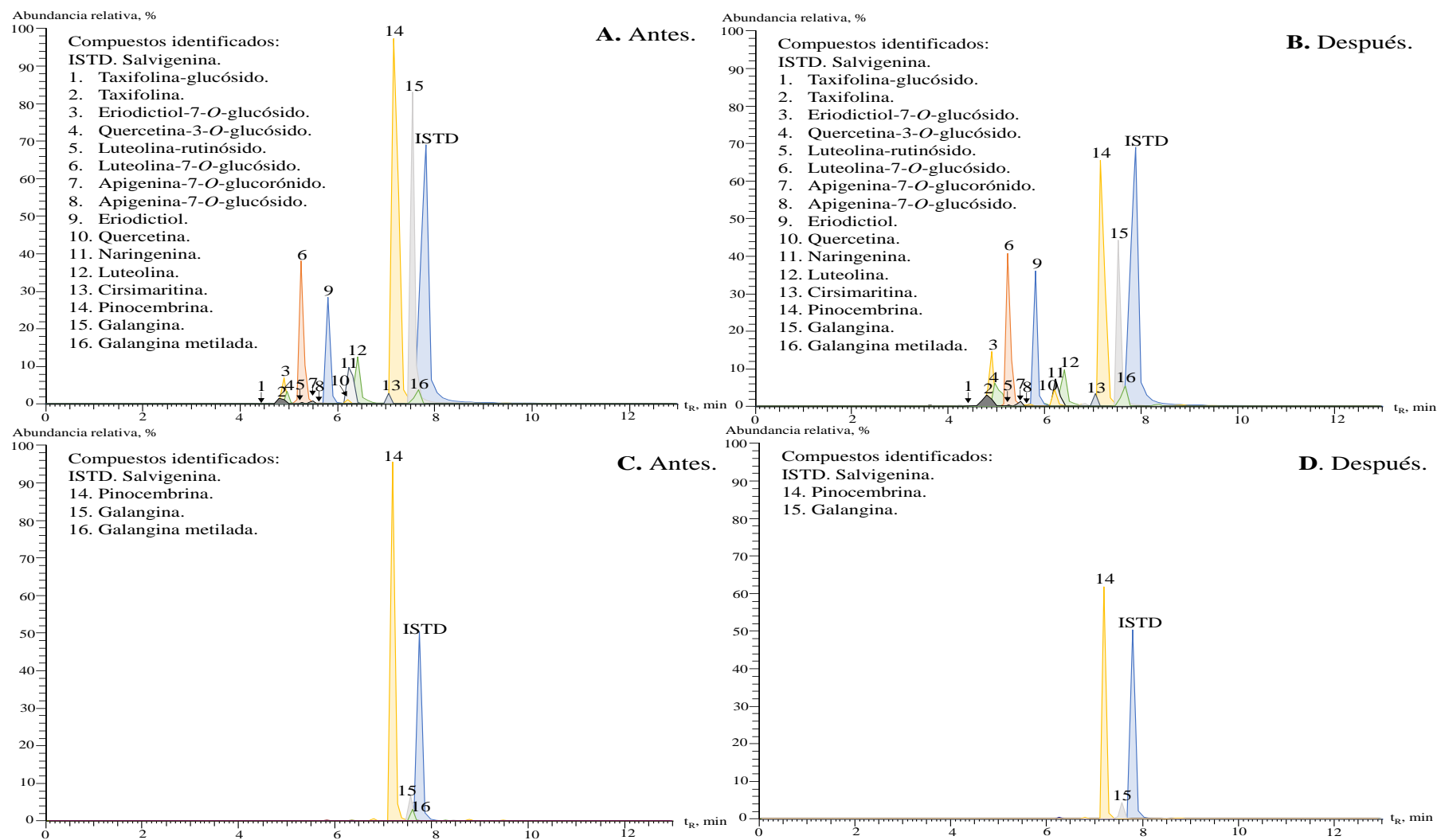
pinocembrina y la galangina como los compuestos de mayor abundancia, así mismo, identificaron tentativamente la galangina metilada.

En este estudio se observaron los iones-producto de la sustancia patrón de galangina para determinar las rupturas características similares en la galangina metilada, teniendo en cuenta los criterios de identificación (Véase **Tabla 2**). Los **Apéndices 1 a 16** muestran los espectros de masas de los compuestos identificados presentes en los extractos bajo estudio de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 9

Corrientes iónicas extraídas (EIC) de compuestos protonados  $[(M+H)]^+$  y deprotonados  $[(M-H)]^-$ , en los extractos bajo estudio de *L. organoides* quimiotipo felandreno. **A.** Extracto HA de material vegetal, antes de su destilación; **B.** HA de material vegetal, después de su destilación; **C.** SFE- $CO_2$  de material vegetal, antes de su destilación; **D.** SFE- $CO_2$  de material vegetal, después de su destilación. UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, columna Zorbax Eclipse  $C_{18}$ . Véase la identificación de los picos en la **Tabla 2**.



FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 2**

Masas exactas de iones o moléculas protonadas [(M+H)<sup>+</sup>] y deprotonadas [(M-H)<sup>-</sup>], identificadas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de compuestos presentes en los extractos de *L. origanoides*, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación.

N° pico Fig. 9	Compuesto	Formula	t <sub>R</sub> , min	Masa experimental		Δ ppm	HCD, eV	Iones-producto			Refs.
				[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>			Iones-producto	Fórmula	m/z, I (%)	
1	Taxifolina-glucósido <sup>a,b</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	4.43	-	465.10397	0.26	10	[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	303.05124 (100)	Demarque <i>et al.</i> , 2016
2	Taxifolina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	4.85	-	303.05115	0.40	10	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	285.04059 (100)	Leitão <i>et al.</i> , 2017; Arias <i>et al.</i> , 2020
								[(M-H)-CO] <sup>-</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	275.05643 (9)	
								[(M-H)-H <sub>2</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	177.01868 (18)	
								[(M-H)-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	151.00275 (1)	
3	Eriodictiol-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a,b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	4.89	-	449.10904	0.23	10	[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.05615 (100)	Cicera J <i>et al.</i> , 2022
								[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	151.00273 (10)	
4	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido <sup>a,b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	4.97	-	463.08850	0.65	30	[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	301.03546 (100)	Bautista-Hernández <i>et al.</i> , 2022
								[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	151.00276 (1)	
5	Luteolina-rutinósido <sup>a,b</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	5.23	-	593.15179	1.01	20	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	447.09509 (2)	Cicera J <i>et al.</i> , 2022
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	285.04074 (25)	
6	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a,b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	5.27	-	447.09344	0.35	30	[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	285.04053 (100)	Leitão <i>et al.</i> , 2017;
								[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	151.00293 (1)	
7	Apigenina-7- <i>O</i> -glucorónido <sup>a,b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	5.46	447.09186	-	0.73	20	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	271.05981 (100)	Hennebelle <i>et al.</i> , 2006
8	Apigenina-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a,b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	5.60	433.11221	-	1.63	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	271.05957 (100)	Lin <i>et al.</i> , 2007
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	271.05963 (5)	
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	243.06505 (1)	
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179.03365 (10)	
9	Eriodictiol <sup>a,b,c</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5.80	289.07016	-	1.74	30	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	163.03877 (90)	Leitão <i>et al.</i> , 2017; Arias <i>et al.</i> , 2020
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01807 (70)	
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179.03365 (10)	

FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 2**  
*Continuación.*

10	Quercetina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	6.18	-	301.03568	0.99	20	[(M+H)-CO] <sup>-</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	273.04053 (2)	Arias <i>et al.</i> , 2020
								[(M+H)-C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	178.99800 (16)	
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	151.00288 (28)	
11	Naringenina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	6.28	-	271.06137	0.64	30	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	253.05074 (2)	Leitão <i>et al.</i> , 2017
								[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	177.01866 (14)	
								[(M-H)-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O] <sup>-</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	151.00284 (100)	
								[(M-H)-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O	119.04929 (48)	
12	Luteolina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	6.36	287.05457	-	1.56	40	[(M-H)-C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O	93.03358 (14)	Lin <i>et al.</i> , 2007
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	269.04398 (1)	
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	241.04945 (1)	
13	Cirsimaritina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	7.03	315.08569	-	1.97	40	[(M+H)-C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01808 (5)	Arias <i>et al.</i> , 2020
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	300.06232 (37)	
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	282.05719 (100)	
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	254.05695 (42)	
14	Pinocembrina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	7.19	257.08060	-	0.92	30	[(M+H)-C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	197.04399 (1)	Leitão <i>et al.</i> , 2017; Arias <i>et al.</i> , 2020
								[(M+H)-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O	119.04924 (1)	
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	239.06990 (1)	
								[(M+H)-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	215.07018 (2)	
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179.03386 (2)	
								[(M+H)-C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01819 (100)	
[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O	131.04919 (60)									
[(M+H)-C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub>	103.05449 (8)									

FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 2**  
Continuación.

15	Galangina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	7.53	271.05984	-	0.94	40	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	253.04941 (1)	Arias <i>et al.</i> , 2020; Lin <i>et al.</i> , 2007
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	225.05447 (1)	
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01823 (2)	
16	Galangina metilada <sup>a,b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	7.60	285.07541	-	1.19	50	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+*</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.05191 (100)	Arias <i>et al.</i> , 2020; Lin <i>et al.</i> , 2007
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+*</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	242.05708 (15)	
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+*</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	224.04657 (1)	
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01819 (1)	

<sup>a</sup> Identificación tentativa basada en masas exactas de moléculas protonadas [(M+H)]<sup>+</sup> o deprotonadas [(M-H)]<sup>-</sup>, reportadas en la literatura científica para especies del género *Lippia*.

<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en el estudio del patrón de fragmentación del compuesto, relación isotópica de iones y por comparación con las bases de datos FooDB (2022) y NIST (2017).

<sup>c</sup> Identificación confirmatoria basada por comparación de los t<sub>R</sub> y espectros de masas con sustancias patrón, *i.e.*, taxifolina (≥ 85%), eriodictiol-7-*O*-glucósido (≥ 98%), quercetina-3-*O*-glucósido (≥ 98%), luteolina-7-*O*-glucósido (≥ 98%), apigenina-7-*O*-glucorónido (≥ 98%), apigenina-7-*O*-glucósido (≥ 90%), eriodictiol (≥ 90%), quercetina (≥ 98%), naringenina (≥ 95%), luteolina (≥ 98%), cirsimarina (≥ 98%), pinocembrina (≥ 95%) y galangina (≥ 95%).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

La **Figura 10** muestra los EIC de iones protonados  $[(M+H)]^+$  presentes en los extractos de *T. diffusa*, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. El compuesto de mayor abundancia relativa fue la acetina metilada. En extractos HA se observó que después del proceso de destilación, compuestos como la luteolina-rutinósido, la luteolina-8-C- $\beta$ -[6-deoxy-2-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosil)-xylo-hexopyranos-3-ulósido], la apigenina, el crisoeiril, la acetina metilada y la velutina disminuyeron su abundancia relativa, por el contrario, flavonoides como la luteolina, el ácido de luteolina-8-C-propenóico y la acetina, aumentaron su abundancia relativa. En extractos SFE-CO<sub>2</sub>, se observó que después del proceso de destilación, la acetina aumento su abundancia relativa, por el contrario, los demás compuestos disminuyeron. La caracterización química por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, permitió identificar nueve compuestos confirmatoriamente que incluyeron, un flavonol, una flavanona, dos flavonas, una flavona metilada, tres flavonas O-glicosiladas y una flavona C-glicosilada. Se identificaron tentativamente ocho compuestos, en su mayoría, derivados de apigenina y luteolina O-glicosilados y, una flavona metilada (Véase **Tabla 3**).

Los compuestos identificados tentativamente en este trabajo han sido reportados en extractos de *T. diffusa*. Compuestos como la luteolina 8-C- $\beta$ -[6-deoxi-2-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosil)-xylo-hexopyranos-3-ulósido], el ácido de luteolina-8-*trans*-propenóico, luteolina-7-O-rutinósido y la hechinacina fueron identificados por Zhao *et al.*, 2007. La naringenina, acetina metilada y la velutina fueron identificados estructuralmente por Willer *et al.*, 2019. Así mismo, la acetina, la apigenina-7-O-glucósido y el crisoeiril se han encontrado en esta especie en otro estudio realizado por Zhao *et al.*, en 2008. da Luz *et al.*, 2022, encontraron la vitexina-rahmnósido y sus derivados glicosilados. En este trabajo,

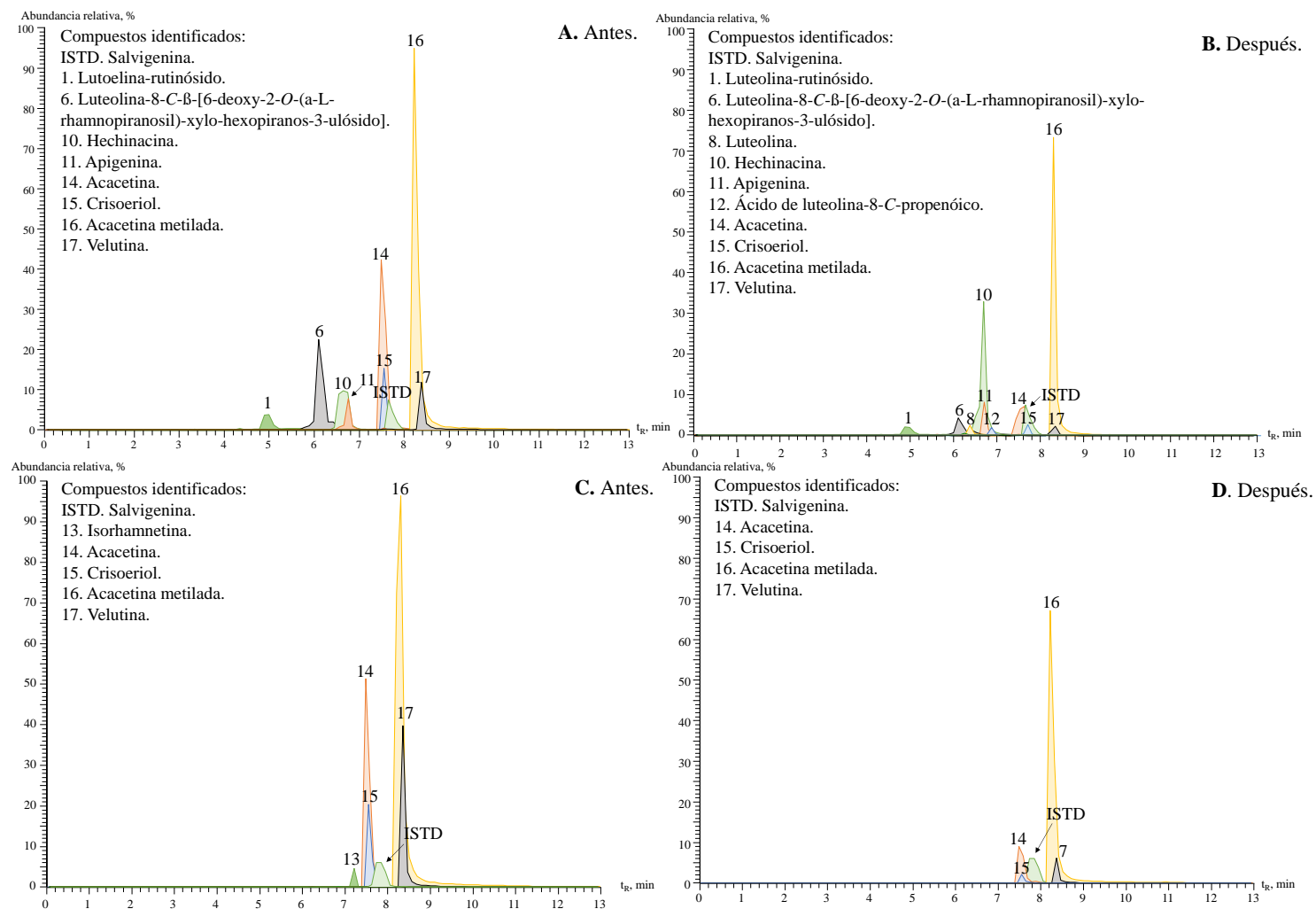
## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

se identificaron por primera vez la isorhamnetina, la vitexina y la isosakuranetina. La isorhamnetina y la vitexina se identificaron usando sustancia patrón. La isosakuranetina se identificó, según el patrón de fragmentación de una sustancia homóloga como la sakuranetina. Hasta el momento no se han publicado estudios donde reporten estos compuestos en especies del género *Turnera*. La apigenina fue identificada mediante sustancia patrón, este compuesto ha sido catalogado como característico en especies del género *Turnera* (Kumar *et al.*, 2008). Los **Apéndices 17 a 33** muestran los espectros de masas de los compuestos identificados en los extractos de *T. diffusa*, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 10

*EIC de compuestos protonados [(M+H)]<sup>+</sup> detectados en los extractos bajo estudio de T. diffusa. A. HA de material vegetal, antes de su destilación; B. HA de material vegetal, después de su destilación; C. SFE-CO<sub>2</sub> de material vegetal antes de su destilación; D. SFE-CO<sub>2</sub> de material vegetal después de su destilación. UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, columna Zorbax Eclipse C<sub>18</sub>. Véase la identificación de los picos en la **Tabla 3**.*



FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 3**

Masas exactas de iones o moléculas protonadas [(M+H)<sup>+</sup>], identificadas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de compuestos detectados en los extractos de *T. diffusa*, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación.

N° pico Fig. 10	Compuesto	Fórmula	t <sub>R</sub> , min	Masa Exp. [M+H] <sup>+</sup>	Δ ppm	HCD, eV	Iones-producto			Ref,
							Pérdida	Fórmula	m/z, I (%)	
1	Luteolina-rutinósido <sup>a,b</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	4.91	595.16510	1.08	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.10687 (100)	Zhao <i>et al.</i> , 2007
							[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.05444 (2)	
2	Vitexina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	5.07	433.11255	0.86	30	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	415.10168 (44)	da Luz <i>et al.</i> , 2022
							[(M+H)-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	397.09122 (68)	
							[(M+H)-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub>	379.08072 (23)	
							[(M+H)-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub>	367.08066 (29)	
							[(M+H)-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub>	343.08066 (15)	
							[(M+H)-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	313.07016 (100)	
3	Luteolina-7-O-glucósido <sup>a,b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	5.23	449.10724	1.33	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.05466 (92)	Zhao <i>et al.</i> , 2008
							[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	271.05966 (8)	-
4	Apigenina-7-O-glucorónido <sup>a,b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	5.61	447.09192	0.60	20	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	271.05966 (8)	-
5	Apigenina-7-O-glucósido <sup>a,b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	5.57	433.11218	1.70	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	271.05991 (1)	Zhao <i>et al.</i> , 2007
6	Luteolina-8-C-β-[6-deoxy-2-O-(α-L-rhamnopyranosil)-xylo-hexopiranos-3-ulósido] <sup>a,b,c</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	6.14	577.15518	1.53	20	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	431.09650 (100)	Zhao <i>et al.</i> , 2007
							[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.05450 (1.77)	
7	Naringenina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	6.23	273.07550	0.91	30	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	255.06488 (3)	Willer <i>et al.</i> , 2019
							[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01817 (64)	
							[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	147.04399 (43)	
							[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	123.04410 (2)	

FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 3**  
*Continuación.*

8	Luteolina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	6.36	287.05472	1.03	50	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	269.04425 (2)	Zhao <i>et al.</i> , 2007
							[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	241.04941 (2)	
							[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01811 (11)	
9	Isorhamnetina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	6.42	317.06509	1.53	40	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> *	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302.04163 (73)	Chen <i>et al.</i> , 2015
							[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup> *	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	274.04657 (9)	
							[(M+H)-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01802 (1)	
10	Hechinacina <sup>a,b</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	6.69	579.14868	1.76	10	[(M+H)-C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	433.11407 (1)	Zhao <i>et al.</i> , 2007
							[(M+H)-C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	309.09637 (3)	
							[(M+H)-C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	271.05954 (45)	
							[(M+H)-C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	147.04390 (11)	
11	Apigenina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	6.70	271.05981	1.05	50	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	253.04935 (1)	Kumar <i>et al.</i> , 2008
							[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	225.05446 (1)	
							[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01819 (12)	
							[(M+H)-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O	119.04930 (5)	
12	Ácido de luteolina-8-C-propenoico <sup>a,b</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	6.85	357.06009	1.13	20	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	339.04947 (53)	Zhao <i>et al.</i> , 2007
							[(M+H)-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	313.07022 (100)	
13	Isosakuranetina <sup>a,b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	7.18	287.09109	1.06	40	[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	167.03384 (27)	FoodB, 2020a
							[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	161.05965 (59)	
							[(M+H)-C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01819 (100)	
14	Acacetina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	7.49	285.07541	1.19	50	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> *	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.05197 (51)	Zhao <i>et al.</i> , 2008
							[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup> *	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	242.05711 (50)	
							[(M+H)-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01814 (5)	

FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 3**  
Continuación.

15	Crisoeriol <sup>a,b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	7.56	301.07016	1.67	50	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> *	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.04666 (28)	Zhao <i>et al.</i> , 2008
							[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup> *	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	258.05191 (30)	
							[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CO-CO] <sup>+</sup> *	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	230.05708 (12)	
							[(M+H)-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01808 (11)	
16	Acacetin metilada <sup>a,b</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	8.24	299.09100	1.32	40	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> *	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284.06757 (66)	Willer <i>et al.</i> , 2019
							[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup> *	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	256.07269 (71)	
							[(M+H)-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	167.03378 (5)	
							[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O	133.06477 (3)	
17	Velutina <sup>a,b</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	8.33	315.08597	1.10	50	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> *	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	300.06253 (52)	Willer <i>et al.</i> , 2019
							[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup> *	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	272.06763 (51)	
							[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CO-CO] <sup>+</sup> *	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	244.07291 (20)	
							[(M+H)-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	167.03387 (16)	

<sup>a</sup> Identificación tentativa basada en masas exactas de moléculas protonadas [(M+H)]<sup>+</sup>, reportadas en la literatura científica para especies del género *Turnera*.

<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en el estudio del patrón de fragmentación del compuesto, relación isotópica de iones y por comparación con las bases de datos FooDB (2022) y NIST (2017).

<sup>c</sup> Identificación confirmatoria basada por comparación de los t<sub>R</sub> y espectros de masas con sustancias patrón, *i.e.*, vitexina (≥ 98%), luteolina-7-*O*-glucósido (≥ 98%), apigenina-7-*O*-glucorónido (≥ 98%), apigenina-7-*O*-glucósido (≥ 98%), naringenina (≥ 95%), luteolina (≥ 98%), isorhamnetina (≥ 95%), apigenina (≥ 95%), sakuranetina (≥ 98%) y acacetina (≥ 98%).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

La **Figura 11** muestra los EIC de los extractos de *V. curassavica*, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. La hidroxi-artemetina y la artemetina fueron los compuestos mayoritarios. En extractos HA se observó que el ácido rosmarínico, la hidroxi-artemetina, artemetina y el cordianal C aumentaron su cantidad relativa después del proceso de destilación del material vegetal, por el contrario, compuestos como el pachipodol, la retusina y el cordianal B, disminuyeron. En extractos SFE-CO<sub>2</sub> la cantidad relativa de la retusina aumentó después del proceso de destilación, por el contrario, la abundancia relativa de la artemetina, el pachipodol y el cordianal B disminuyeron. La hidroxi-artemetina no vario considerablemente su abundancia.

La caracterización química de los extractos bajo estudio permitió identificar 11 compuestos polifenólicos, entre ellos derivados de ácidos hidroxicinámicos, flavonoides *O*-glucosilados, triterpenos y derivados de flavonoles *O*-metilados (Véase **Tabla 4**). Se identificaron confirmatoriamente los ácidos cafeico y rosmarínico, que también fueron encontrados en extractos de *V. curassavica*, analizados por El-Sayed *et al.* 1998, y Ticli *et al.* 2005, respectivamente. También se identificó la rutina, compuesto que había sido reportado por Matias *et al.*, 2013. La artemetina y la hidroxi-artemetina, compuestos característicos en especies del género *Varronia*, fueron reportados previamente por Velde *et al.* 1982. También se identificaron el pachipodol, la retusina y dos derivados de ácidos triterpénicos como cordianal C y cordianal B, estos fueron descritos anteriormente por Kuroyanagi *et al.*, 2001.

En este trabajo se identificaron confirmatoriamente, usando sustancia patrón los compuestos glicosilados, como el eriodictiol-7-*O*-glucósido y el kaempferol-3-*O*-galactósido. Estos compuestos no habían sido reportados previamente en la literatura en

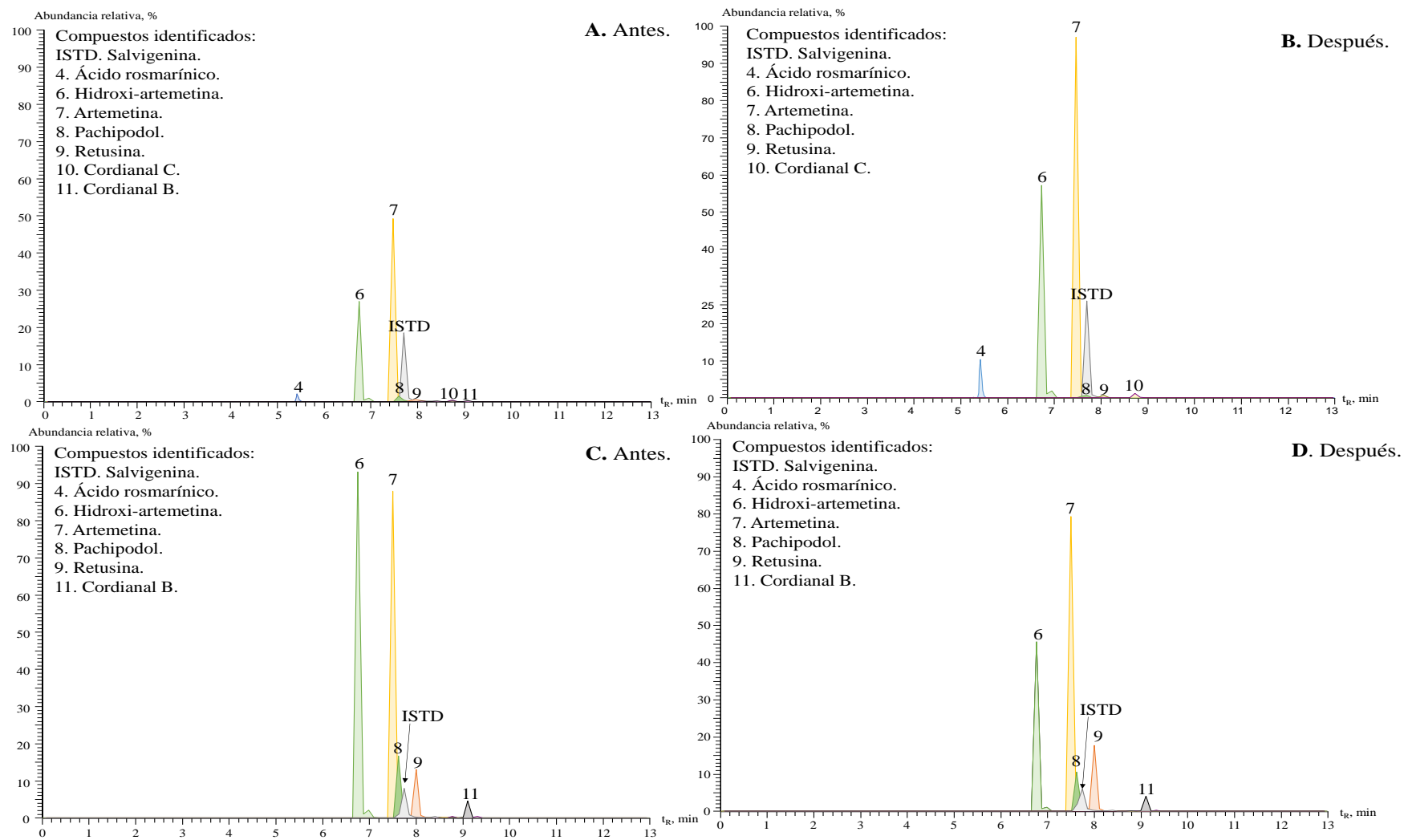
## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

extractos de especies del género *Varronia*. Por primera vez se reportan los espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la artemetina, la hidroxi-artemetina, el cordianal C y el cordianal B. Los **Apéndices 34 a 44** muestran los espectros de masas de los compuestos identificados en extractos de *V. curassavica*, de material vegetal antes y después de su destilación.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 11**

*EIC de compuestos protonados  $[(M+H)]^+$  y deprotonados  $[(M-H)]^-$  detectados en los extractos bajo estudio de *V. curassavica*. **A.** Extracto HA de material vegetal antes de su destilación; **B.** HA de material vegetal después de su destilación; **C.** SFE- $CO_2$  de material vegetal antes de su destilación; **D.** SFE- $CO_2$  de material vegetal después de su destilación. UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, columna Zorbax Eclipse  $C_{18}$ . Véase la identificación de los picos en la **Tabla 4**.*



FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 4**

Masas exactas de iones o moléculas protonadas [(M+H)]<sup>+</sup> y deprotonadas [(M-H)]<sup>-</sup>, identificadas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de compuestos detectados en los extractos de *V. curassavica*, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación.

N° pico Fig. 10	Compuesto	Fórmula	t <sub>R</sub> , min	Masa experimental		Δ ppm	HCD, eV	Iones-producto			Ref.
				[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>			Pérdida	Fórmula	m/z, I (%)	
1	Ácido caféico <sup>a,b,c</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	4.12	-	179.03404	5.42	20	[(M-H)-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	135.04402 (100)	El-Sayed <i>et al.</i> , 1998
2	Eriodictiol-7- <i>O</i> - glucósido <sup>a,b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	4.88	-	449.10818	1.66	20	[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> [(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	287.05576 (100) 151.00259 (16)	FoodB, 2020
3	Rutina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	5.38	-	609.14545	1.08	20	[(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> [(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> [(M-H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	463.08554 (1) 301.03500 (12) 151.00261 (1)	Matias <i>et al.</i> , 2013
4	Ácido rosmarínico <sup>a,b,c</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	5.42	-	359.07678	1.27	10	[(M-H)-C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> [(M-H)-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> [(M-H)-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> [(M-H)-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	197.04469 (35) 179.03397 (6) 161.02335 (100) 135.04398 (2)	Ticli <i>et al.</i> , 2005
5	Kaempferol-3- <i>O</i> - galactósido <sup>a,b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	5.62	-	447.09265	1.41	20	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> [(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	284.03223 (21) 151.00255 (1)	FoodB, 2019
6	Hidroxi- artemetina <sup>a,b</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	6.74	405.11743	-	1.42	40	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+•</sup> [(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> [(M+H)-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+•</sup> [(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+•</sup> [(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+•</sup> [(M+H)-C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>9</sub> C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub> C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	390.09384 (14) 375.07050 (100) 372.08316 (4) 357.05994 (21) 329.06491 (1) 197.04430 (30)	Velde <i>et al.</i> , 1982
7	Artemetina <sup>a,b,c</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	7.46	389.12283	-	0.67	30	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+•</sup> [(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> [(M+H)-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+•</sup> [(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> [(M+H)-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+•</sup> [(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup> [(M+H)-C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	374.09940 (14) 359.07590 (12) 356.08887 (21) 341.06540 (2) 328.09399 (2) 313.07053 (2) 197.04430 (1)	Velde <i>et al.</i> , 1982

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 4**  
 Continuación.

8	Pachipodol <sup>a,b,c</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	7.63	345.0931	-	1.63	30	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> *	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330.07285 (100)	Kuroyanagi <i>et al.</i> , 2001
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	315.04944 (42)	
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.05453 (6)	
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -CO-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	259.05969 (3)	
								[(M+H)-C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	151.03883 (1)	
9	Retusina <sup>a,b</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	8.01	359.11209	-	1.22	50	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> *	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	344.08862 (63)	Kuroyanagi <i>et al.</i> , 2001
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	329.06516 (71)	
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	301.07028 (100)	
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	283.05975 (13)	
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -CO-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	255.06494 (4)	
10	Cordianal C <sup>a,b</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	8.70	473.36194	-	1.26	20	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub>	455.35159 (79)	Kuroyanagi <i>et al.</i> , 2001
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>2</sub>	437.34100 (100)	
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> O <sub>2</sub>	427.35675 (5)	
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>43</sub> O	419.33054 (29)	
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>45</sub> O	409.34622 (15)	
11	Cordianal B <sup>a,b</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	9.09	471.34616	-	1.53	10	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>3</sub>	453.33591 (50)	Kuroyanagi <i>et al.</i> , 2001
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>43</sub> O <sub>2</sub>	435.32541 (17)	
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>43</sub> O <sub>2</sub>	423.32535 (100)	
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>41</sub> O	405.31476 (16)	

<sup>a</sup> Identificación tentativa basada en masas exactas de moléculas protonadas [(M+H)]<sup>+</sup> o deprotonadas [(M-H)]<sup>-</sup>, reportadas en la literatura científica para especies del género *Varronia*.

<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en el estudio del patrón de fragmentación del compuesto, relación isotópica de iones y por comparación con las bases de datos FooDB (2022) y NIST (2017).

<sup>c</sup> Identificación confirmatoria basada por comparación de los t<sub>R</sub> y espectros de masas con sustancias patrón, *i.e.*, ácido cafeico (≥ 98%), eriodictiol-7-*O*-glucósido (≥ 98%), rutina (≥ 94%), ácido rosmarínico (≥ 97%), kaempferol-3-*O*-galactósido (≥ 98%), artemetina (≥ 98%) y pachipodol (≥ 98%).

### ***4.2.2 Patrones de fragmentación y iones-producto característicos de sustancias patrón de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, analizados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas***

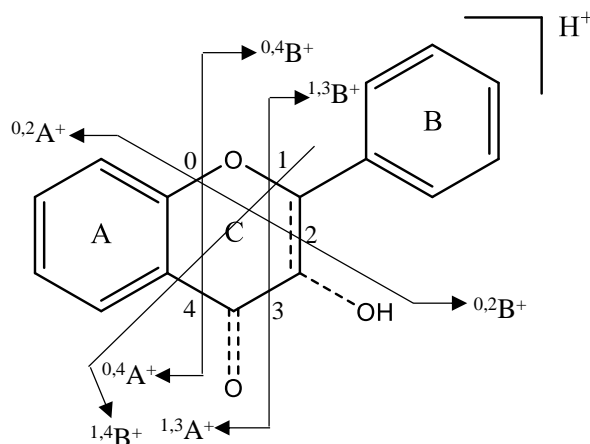
La caracterización química permitió identificar los iones-producto característicos de los compuestos fenólicos detectados con sustancias patrón en los extractos bajo estudio. Los espectros de masas se analizaron a diferentes energías de HCD (10-70 eV). El HESI se operó en modo de adquisición de iones positivos y negativos. La identificación se realizó midiendo la masa exacta con exactitud  $\Delta$  ppm < 2. El patrón isotópico para los iones o moléculas protonados  $[(M+H)]^+$  y deprotonados  $[(M-H)]^-$  fue similar al calculado por el *software Thermo Xcalibur 3.1*.

Los flavonoides glicosilados pueden tener sustituyentes de azúcares en las posiciones 3 y 7 (*O*-glicósidos) o 6 y 8 (*C*-glicósidos), que experimentan rupturas consecutivas según la cantidad de hexosas presentes en la estructura. Es común encontrar en sus espectros de masas las pérdidas de  $m/z$  132 (arabinósido,  $C_6H_8O_4$ ),  $m/z$  146 (rahmnósido,  $C_6H_{10}O_4$ ),  $m/z$  162 (glucósido o galactósido,  $C_6H_{10}O_5$ ),  $m/z$  176 (glucorónido,  $C_6H_8O_6$ ), entre otros (Kachlicki *et al.*, 2008). Se observó la formación de iones-producto debido a las pérdidas de otras moléculas neutras como  $H_2O$  ( $m/z$  18),  $CO$  ( $m/z$  28),  $CH_2=C=O$  ( $m/z$  42),  $CO_2$  ( $m/z$  44) y el radical  $CH_3^\bullet$  ( $m/z$  15). Los fragmentos resultantes de la ruptura del anillo C son específicos para cada subgrupo de flavonoide (flavona, flavanona, flavonol, entre otros), y puede revelar el patrón de sustitución de los anillos A y B (Véase **Figura 12**) (Tsimogiannis *et al.*, 2007).

**Figura 12**

*Escisiones de retrociclación del anillo C y sus fragmentos resultantes para flavonoides sustituidos.*

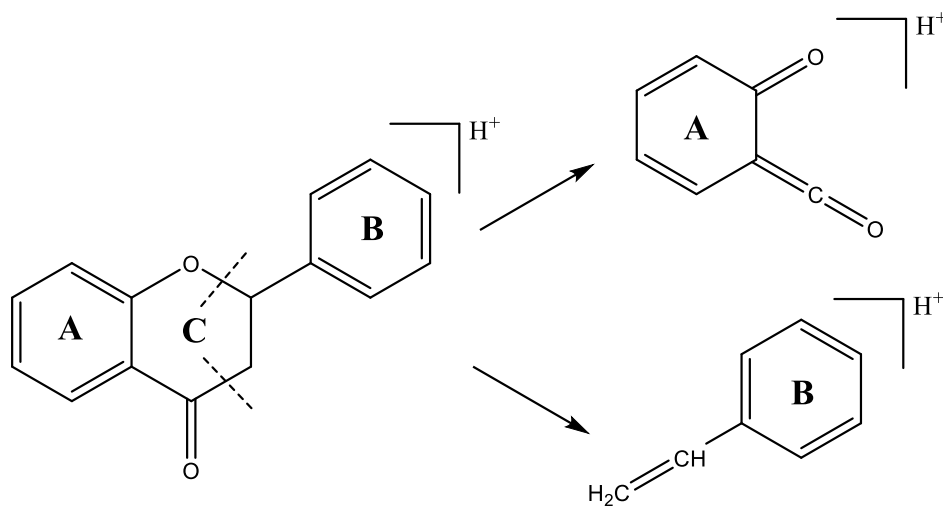
*Tomado de Tsimogiannis et al., 2007.*



Existe una reacción de fragmentación típica de los flavonoides conocida como retro Diels- Alder (RDA), que puede ocurrir en las estructuras cíclicas del anillo C de seis miembros que contienen un doble enlace. El resultado neto de estos reordenamientos es la escisión de dos enlaces y la formación de dos enlaces alílicos, por ejemplo, el ciclohexeno generará el butadieno y el etileno (Véase **Figura 13**) (Corradini *et al.*, 2011).

**Figura 13**

Reacción retro Diels-Alder de una flavona con formación de los iones-producto  $A^+$  y  $B^+$ , a partir de la ruptura en el anillo C ( $^{1,3}A^+$  y  $^{1,3}B^+$ ). Adaptado de Corradini et al., 2011.



Mediante el estudio de los espectros de masas de las sustancias patrón disponibles, fue posible identificar de forma tentativa compuestos, presentes en los extractos bajo estudio. Tal es el caso para la galangina metilada, la acetina metilada y la hidroxiartemetina, se disponían de sustancias patrón homólogas como la galangina, la acetina y la artemetina, respectivamente.

El **Apéndice 15** muestra el espectro de masas de la galangina, flavonol que se ha reportado en *L. origanoides* (Arias et al., 2020). Se observó la molécula protonada  $[(M+H)]^+$   $m/z$  271.05984, que pierde  $-H_2O$  ( $m/z$  253.04941), y  $-CO$  ( $m/z$  225.05447), con la pérdida de  $-C_8H_6O$  con la ruptura del anillo C entre los carbonos  $C_2-C_3$  ( $^{1,3}A^+$ ), para formar el ion-producto  $[(M+H)-C_8H_6O]^+$  de  $m/z$  153.01823. El espectro de masas de la galangina metilada tiene una molécula protonada  $[(M+H)]^+$   $m/z$  285.07541, con la pérdida inicial de

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

un radical  $-\text{CH}_3^\bullet$  ( $m/z$  270.05191), seguido de la pérdida del  $-\text{CO}$  y  $-\text{H}_2\text{O}$  (Véase **Apéndice 16**). Se observó también, la pérdida  $[(\text{M}+\text{H})]^+-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}$  producto de la ruptura del anillo C, lo que indicó que el *O*-metil se encontraba en la posición 3 del anillo C.

El **Apéndice 30** muestra el espectro de masas de la acacetina, flavona identificada en extractos de *T. diffusa* (Zhao *et al.*, 2008). Se observó el ion molecular  $[(\text{M}+\text{H})]^+$   $m/z$  285.07541, seguido de las pérdidas consecutivas de  $-\text{CH}_3^\bullet$  ( $m/z$  270.05197),  $-\text{CO}$  ( $m/z$  242.05711) y la pérdida de  $-\text{C}_9\text{H}_8\text{O}$  que corresponde a la ruptura del anillo C ( $^{1,3}\text{A}^+$ ), para formar el ion-producto  $[(\text{M}+\text{H})-\text{C}_9\text{H}_8\text{O}]^+$  de  $m/z$  153.01814. En el espectro de masas de la acacetina metilada se encontró el ión molecular  $[(\text{M}+\text{H})]^+$   $m/z$  299.09100, con las rupturas consecutivas  $-\text{CH}_3^\bullet$  y  $-\text{CO}$  (Véase **Apéndice 32**). La ruptura del anillo C ( $^{1,3}\text{A}^+$ ) formó los iones-producto  $[(\text{M}+\text{H})-\text{C}_9\text{H}_8\text{O}]^+$  de  $m/z$  167.03378 y  $[(\text{M}+\text{H})-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}]^+$  de  $m/z$  133.06477, esto indicó que el otro *O*-metil se encontraba en el anillo A.

En *T. diffusa*, se identificó la isosakuranetina tentativamente, compuesto que no ha sido reportado en especies del género *Turnera*, mediante el uso de la sustancia patrón de sakuranetina. El espectro de masas de la sakuranetina mostró el ion molecular  $[(\text{M}+\text{H})]^+$   $m/z$  287.09113 con rupturas del anillo C para formar los iones-producto de  $m/z$  147.04399 ( $^{1,4}\text{B}^+$ ) y, por ( $^{1,3}\text{A}^+$ , RDA) para formar el ion  $m/z$  167.03380 (Véase **Apéndice 45**). El **Apéndice 29** muestra el espectro de masas de la isosakuranetina con ion molecular  $[(\text{M}+\text{H})]^+$   $m/z$  287.09109, con rupturas del anillo C para formar los iones-producto de  $m/z$  161.05965 ( $^{1,4}\text{B}^+$ ) y  $m/z$  153.01819 ( $^{1,3}\text{A}^+$ , RDA) para. por lo que se concluyó que el *O*-metil se encuentra en el anillo B. Cabe resaltar, que en los espectros de masas de flavonoides *O*-metilados, es común encontrar iones-producto que corresponden a las pérdidas de  $-\text{CH}_3^\bullet$  ( $m/z$  15), sin embargo, tanto en la isosakuranetina como la sakuranetina, este ión no se

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

formó durante la fragmentación, por lo que ambos compuestos poseen un patrón de fragmentación similar.

El **Apéndice 40** muestra el espectro de masas de la artemetina, flavonol *O*-metilado, que se ha identificado principalmente en especies de los géneros *Artemisia* (J. Ferreira *et al.*, 2010) y *Varronia* (Velde *et al.*, 1982). El espectro de masas muestra el ion molecular  $[(M+H)]^+$   $m/z$  389.12283, se observaron pérdidas consecutivas de  $-CH_3^{\bullet}$  ( $m/z$  374.09940 y 359.07590),  $-H_2O$  ( $m/z$  356.08887 y 341.06540) y  $-CO$  ( $m/z$  328.09399 y 313.07053), características de esta familia de compuestos (Tsimogiannis *et al.*, 2007). Además, mostró una ruptura en el anillo C ( $^{1,3}A^+$ ) que generó el ion-producto  $[(M+H)-C_{11}H_{12}O_3]^+$  de  $m/z$  197.04430, con una abundancia menor que el 1 %. El espectro de masas de la hidroxiartemetina, presentó iones-producto y rupturas similares que la artemetina, y la formación del ion-producto  $[(M+H)-C_{11}H_{12}O_4]^+$  de  $m/z$  197.04430 con abundancia del 30 %, lo que permitió concluir que el  $-OH$  se encontraba en el anillo B (Véase **Apéndice 39**). Es la primera vez que se muestran los espectros de masas de la hidroxiartemetina y la artemetina obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS en modo SIM.

Por otra parte, fue posible identificar la presencia de los cordianales C y B, pertenecen a la familia de los triterpenos. Sus espectros se caracterizan por mostrar rupturas típicas que corresponden a pérdidas de  $-H_2O$  y  $-CO$  (Véanse **Apéndices 43** y **44**) (Nieto & Chegwin, 2008). El cordianal C con ion-molecular  $[(M+H)]^+$   $m/z$  473.36194 muestra cuatro pérdidas consecutivas de  $-H_2O$  ( $m/z$  455.35159, 437.34100, 419.33054 y 409.34622), y una pérdida de  $-CO$  ( $m/z$  427.35675). El cordianal B con ion-molecular  $[(M+H)]^+$   $m/z$  471.34616 muestra dos pérdidas consecutivas de  $-H_2O$  ( $m/z$  453.33591 y 435.32541), seguido de una pérdida del aldehído  $-CH_2O$  ( $m/z$  423.32535) y una pérdida de  $-H_2O$  ( $m/z$

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

405.31476). Es la primera vez que se muestran los espectros de masas del cordianal C y cordianal B obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS en modo SIM.

En extractos de *V. curassavica* se identificaron los ácidos cafeico (Véase **Apéndice 34**) y rosmarínico (Véase **Apéndice 35**), en ambos espectros de masas se observó la formación del ion-producto de  $m/z$  44 que corresponde a la pérdida de CO<sub>2</sub>, ruptura típica en ácidos hidroxicinámicos (Masike *et al.*, 2017).

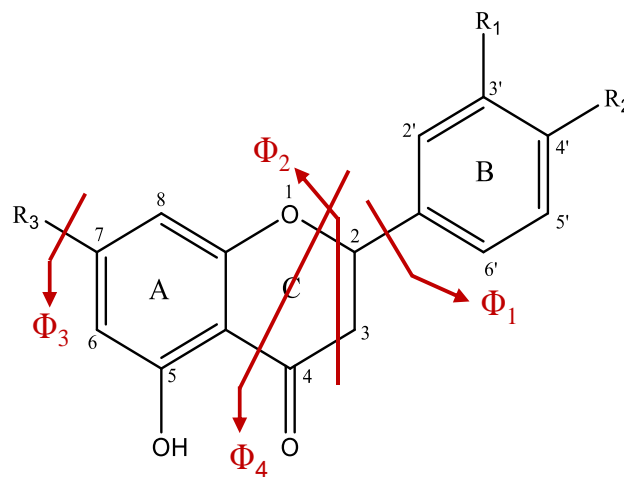
Las **Tablas 5 a 8** muestran las rupturas típicas, iones-producto característicos y sus intensidades relativas (%) de las sustancias patrón analizadas. Los compuestos se clasificaron en: flavanonas, flavonoles, flavonas y ácidos hidroxicinámicos.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 5**

*Iones-producto característicos y sus intensidades relativas (%) de las sustancias patrón usadas, pertenecientes a la familia de flavanonas.*

### Flavanonas



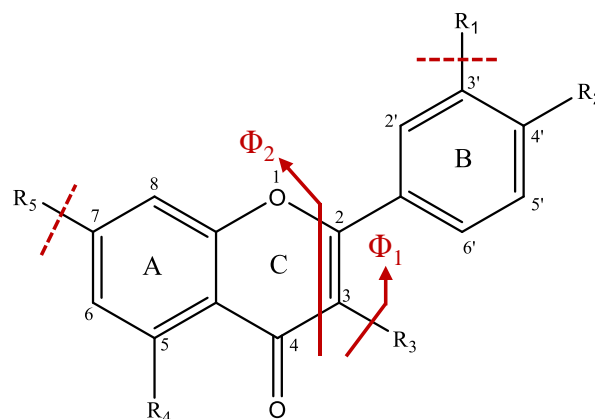
Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	HCD, eV	Iones-producto, m/z (I. %)					
					[(M+H)] <sup>+</sup>	[(M-H)] <sup>-</sup>	Φ <sub>1</sub>	Φ <sub>2</sub>	Φ <sub>3</sub>	Φ <sub>4</sub>
Pinocembrina	H	H	OH	30	257.08060	-	179.03386 (2)	153.01819 (100)	-	131.04919 (62)
Naringenina	H	OH	OH	30	-	271.06137	177.01866 (14)	151.00284 (100)	-	-
Sakuranetina	H	OCH <sub>3</sub>	OH	40	287.09113	-	-	167.03380 (100)	-	147.04399 (65)
Eriodictiol	OH	OH	OH	30	289.07020	-	179.03365 (10)	153.01807 (70)	-	-
Taxifolina	OH	OH	OH	10	-	303.05115	-	151.00275	-	-
Eriodictiol-7-O-glucósido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	20	-	449.10904	-	151.00273 (10)	287.05615 (100)	-

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 6**

*Iones-producto característicos y sus intensidades relativas (%) de las sustancias patrón usadas, pertenecientes a la familia de flavonoles.*

### Flavonoles



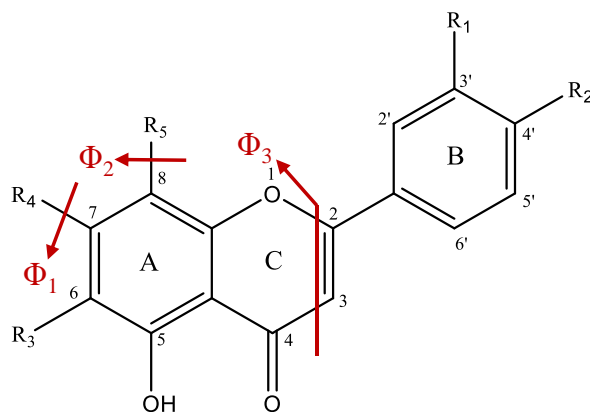
Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	HCD, eV	iones-producto, m/z (I. %)					
							[(M+H)] <sup>+</sup>	[(M-H)] <sup>-</sup>	$\Phi_1$	[(M)-R <sub>1</sub> -R <sub>5</sub> ]	[(M)-R <sub>3</sub> -R <sub>5</sub> ]	$\Phi_2$
Galangina	H	H	OH	OH	OH	40	271.05984	-	-	-	-	153.01804 (2)
Quercetina	OH	OH	OH	OH	OH	20	-	301.03568	-	-	-	151.00288 (28)
Isorhamnetina	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	OH	40	317.06509	-	-	302.04163 (73)	-	153.01802 (1)
Pachipodol	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	30	345.09631	-	330.07285 (100)	315.04944 (42)	-	151.03883 (1)
Artemetina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	30	389.12283	-	-	359.07590 (12)	374.09940 (14)	197.04430 (1)
Kaempferol-3-O-galactósido	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	OH	10	-	447.09265	284.03223 (21)	-	-	151.00255 (1)
Quercetina-3-O-glucósido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	OH	30	-	463.08850	301.03546 (100)	-	-	151.00276 (1)
Rutina	OH	OH	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	OH	OH	20	-	609.14545	301.03500 (12)	-	-	151.00261 (16)

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 7**

*Iones-producto característicos y sus intensidades relativas (%) de las sustancias patrón usadas, pertenecientes a la familia de flavonas.*

### Flavonas

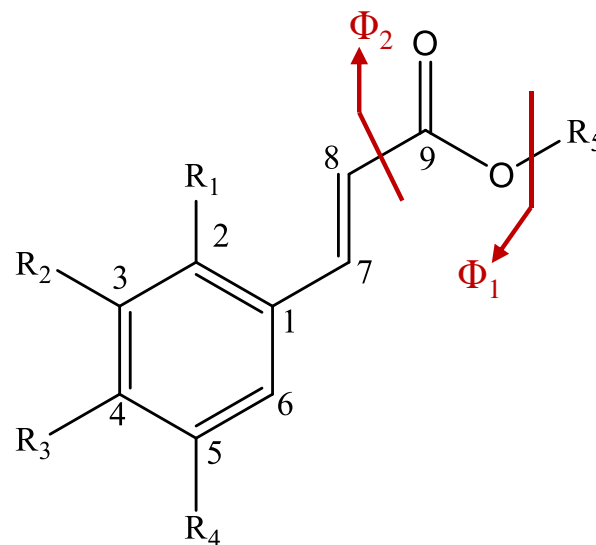


Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	HCD, eV	iones-producto, m/z (I. %)			
							[(M+H) <sup>+</sup> ]	$\Phi_1$	$\Phi_2$	$\Phi_3$
Apigenina	H	OH	H	OH	OH	50	271.05981	-	-	153.01819 (12)
Acacetina	H	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OH	50	285.07541	-	-	153.01814 (5)
Luteolina	OH	OH	H	OH	OH	40	287.05472	-	-	153.01811 (11)
Cirsimaritina	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	40	315.08569	300.06232 (37)	-	197.04399 (1)
Apigenina 7-O-glucosido	H	OH	H	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	H	10	433.11221	271.05957 (100)	-	-
Vitexina	H	OH	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	30	433.11255	-	271.05948 (1)	-
Apigenina-7-O-glucurónido	H	OH	H	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	H	20	447.09192	271.05966 (100)	-	-
Luteolina-7-O-glucosido	OH	OH	H	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	H	10	449.10724	285.05466 (100)	-	-

**Tabla 8**

*Iones-producto característicos y sus intensidades relativas (%) de las sustancias patrón usadas, pertenecientes a la familia de ácidos hidroxicinámicos.*

## Ácidos hidroxicinámicos



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	HCD, eV	iones-producto, m/z (I. %)		
							[(M-H)] <sup>-</sup>	Φ <sub>1</sub>	Φ <sub>2</sub>
Ácido cafeico	H	OH	OH	H	H	20	179.03404	-	135.04402 (100)
Ácido rosmarínico	H	H	OH	OH	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	10	359.07678	135.04398 (2)	179.03397 (6)

**4.2.3 Repetibilidad de los tiempos de retención y áreas cromatográficas de sustancias patrón analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas**

En la **Tabla 9** se reportan las repetibilidades de los  $t_R$ , y las áreas cromatográficas obtenidas para las sustancias patrón analizadas por UHPLC/ESI-Orbitrap-MS. Las inyecciones de las soluciones se realizaron por triplicado.

**Tabla 9**

*Repetibilidad de  $t_R$  y de áreas cromatográficas de las sustancias patrón analizados por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS.*

N°	Compuesto	Formula	$t_R$ , min ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) <sup>a</sup>	CV, % <sup>b</sup>	Área, cuentas $\times 10^6$ ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) <sup>a</sup>	CV, % <sup>b</sup>
1	Ácido cafeico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	4.16 ± 0.01	0.30	25 ± 0.30	1.2
2	Taxifolina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	4.89 ± 0.00	0.00	30 ± 1.00	4.0
3	Eriodictiol-7-O-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	4.91 ± 0.01	0.20	10 ± 0.30	3.1
4	Vitexina	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	5.09 ± 0.01	0.20	62 ± 0.30	1.0
5	Luteolina-7-O-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	5.29 ± 0.01	0.20	54 ± 0.70	1.3
6	Rutina	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	5.36 ± 0.01	0.10	20 ± 0.50	2.5
7	Quercetina-3-O-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	5.42 ± 0.01	0.20	24 ± 1.30	5.4
8	Ácido rosmarínico	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	5.46 ± 0.02	0.40	34 ± 0.30	1.0
9	Apigenina-7-O-glucurónido	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	5.48 ± 0.01	0.10	48 ± 0.70	1.5
10	Apigenina 7-O-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	5.56 ± 0.02	0.30	48 ± 2.00	4.2
11	Kaempferol-3-O-galactósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	5.67 ± 0.01	0.20	34 ± 2.00	4.8
12	Eriodictiol	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5.84 ± 0.01	0.20	62 ± 1.20	2.0
13	Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	6.23 ± 0.01	0.20	46 ± 3.00	6.5
14	Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	6.28 ± 0.01	0.20	100 ± 1.20	1.2
15	Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	6.40 ± 0.01	0.10	160 ± 0.60	0.4
16	Apigenina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	6.75 ± 0.02	0.20	190 ± 4.20	2.2
17	Isorhamnetina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	6.77 ± 0.01	0.10	32 ± 1.40	4.4
18	Cirsimaritina	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	7.05 ± 0.01	0.10	91 ± 2.70	3.0
19	Pinocembrina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	7.14 ± 0.00	0.00	119 ± 2.30	1.9
20	Sakuranetina	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	7.19 ± 0.01	0.20	330 ± 9.30	2.8
21	Artemetina	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	7.47 ± 0.01	0.10	640 ± 2.20	3.5
22	Acacetina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	7.53 ± 0.01	0.10	280 ± 7.00	2.4
23	Galangina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	7.58 ± 0.01	0.10	130 ± 0.50	3.8

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

24	Pachipodol	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	7.69 ± 0.01	0.10	490 ± 1.40	2.8
25	Salvigenina	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	7.72 ± 0.02	0.20	1100 ± 110	10

<sup>a</sup> Promedio ± desviación estándar ( $n = 3$ ).

<sup>b</sup> CV: coeficiente de variación.

### **4.2.4 Cuantificación química por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, de los extractos bajo estudio**

Las **Tablas 10** a **12** muestran los resultados obtenidos para la linealidad, sensibilidad, el LOD y el LOQ del método usado para cuantificar flavonoides y ácidos hidroxicinámicos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, presentes en los extractos vegetales bajo estudio, de material vegetal antes y después de su destilación. Se usaron curvas de calibración externas con uso de sustancia patrón en concentraciones de 0.1-10 mg/L. El coeficiente de correlación para todas las sustancias patrón fue de  $R^2 > 0.986$ .

La cuantificación de los extractos bajo estudio de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, de material vegetal antes y después de su destilación, mostró que los compuestos mayoritarios fueron el eriodictiol-7-*O*-glucósido, eriodictiol, la pinocembrina, la galangina y la galangina metilada (Véase **Tabla 10**). En extractos HA de *L. origanoides* se observó, que después del proceso de destilación algunos compuestos aumentaron su concentración, tal es el caso para flavonoides como la taxifolina-glucósido, la taxifolina, el eriodictiol-7-*O*-glucósido, la quercetina-3-*O*-glucósido y la quercetina. Compuestos como la pinocembrina y la galangina disminuyeron su concentración en los extractos HA y SFE-CO<sub>2</sub> de *L. origanoides*, después del proceso de destilación (Véase **Tabla 10**). Cabe resaltar que en los extractos SFE-CO<sub>2</sub> los compuestos más polares como flavonoides *O*-glicosilados, se encontraron < LOD, compuestos apolares como la pinocembrina, galangina tuvieron grandes concentraciones después del proceso de destilación, con valores de 63 ± 1.3 mg/extracto y 15 ± 0.4 mg/extracto, respectivamente.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

La **Tabla 11** muestra la cuantificación de los extractos bajo estudio de *T. diffusa*, antes y después de su destilación. Se determinó que la acetina metilada fue el compuesto más abundante. En extractos HA, se observó que después de su destilación algunos compuestos disminuyeron su concentración, tales como la luteolina-rutinósido, la apigenina-7-*O*-glucósido, la apigenina, la acetina, el crisoiol y la velutina. En el extracto SFE-CO<sub>2</sub>, de material vegetal después de su destilación, se cuantificó solamente la acetina metilada. Compuestos como la luteolina-8-*C*-propenoico, la hechinacina y la luteolina-8-*C*-β-[6-deoxy-2-*O*-(α-L-rhamnopiranosil)-xylo-hexopiranos-3-ulósido no se cuantificaron ya que no se contaba con una sustancia patrón de estructura homóloga.

La **Tabla 12** muestra la cuantificación de los extractos bajo estudio de *V. curassavica*, de materiales antes y después de su destilación. El ácido rosmarínico, la hidroxi-artemetina y artemetina fueron los compuestos que se encontraron en mayor concentración. El extracto SFE-CO<sub>2</sub>, obtenido de material vegetal antes de su destilación, presentó el mayor contenido de artemetina ( $24 \pm 2.4$  mg/g extracto), sin embargo, después de la destilación la concentración disminuyó a  $9.0 \pm 1.0$  mg/g extracto, por el contrario, la concentración de la hidroxi-artemetina aumentó. En extractos HA se observó que la concentración del ácido rosmarínico, la hidroxi-artemetina y la artemetina aumentaron después de la destilación (Véase **Tabla 12**). Se observó que en el extracto HA de *V. curassavica*, después de su destilación, compuestos glicosilados como el eriodictiol-7-*O*-glucósido y el kameferol-3-*O*-galactósido, se encontraron en menor concentración. La hidroxi-artemetina y la retusina, compuestos identificados tentativamente, se cuantificaron con las curvas de calibración de la artemetina y el pachipodol, respectivamente, por sus

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

estructuras químicas similares. Los cordianales B y C no se cuantificaron. No se disponía de una sustancia patrón análoga.

Es la primera vez que se observa el efecto que tiene el proceso de destilación en la composición química de las plantas aromáticas. De manera general, el proceso de destilación afectó el contenido de compuestos fenólicos presentes en los materiales vegetales de las especies bajo estudio. Es posible que algunos compuestos fenólicos presentes en el material vegetal se degraden en respuesta a las altas temperaturas y presiones, además, es posible que las especies vegetales presenten efectos diferentes ante el proceso de destilación, debido a factores morfológicos y fisiológicos de las mismas, como por ejemplo, el grosor de los tallos, la forma y la estructura de la hojas, la estructura celular, entre otros (Ioannou *et al.*, 2019; Sajid *et al.*, 2021).

En los extractos de *T. diffusa* y *V. curassavica* los compuestos *O*-glicosilados disminuyeron su concentración después del proceso destilativo, por el contrario, compuestos más apolares se encontraron en mayor abundancia. Debido a que el proceso de destilación se realizó con vapor agua, la solubilización de algunos compuestos de mayor polaridad, pudo ocurrir por la condensación del vapor dentro del alambique (Ferreira & Simao, 2012). Chebil *et al.* 2006, demostraron que las solubilidades de compuestos glicosilados como la rutina (quercetina-3-*O*-rutinósido) e isoquercetina (quercetina-3-*O*-glucósido) son menores, en comparación, con la quercetina (aglicona) en acetona y acetonitrilo, dado que son solventes menos polares, por lo que la presencia de azúcares mejora la hidrofiliidad de la aglicona.

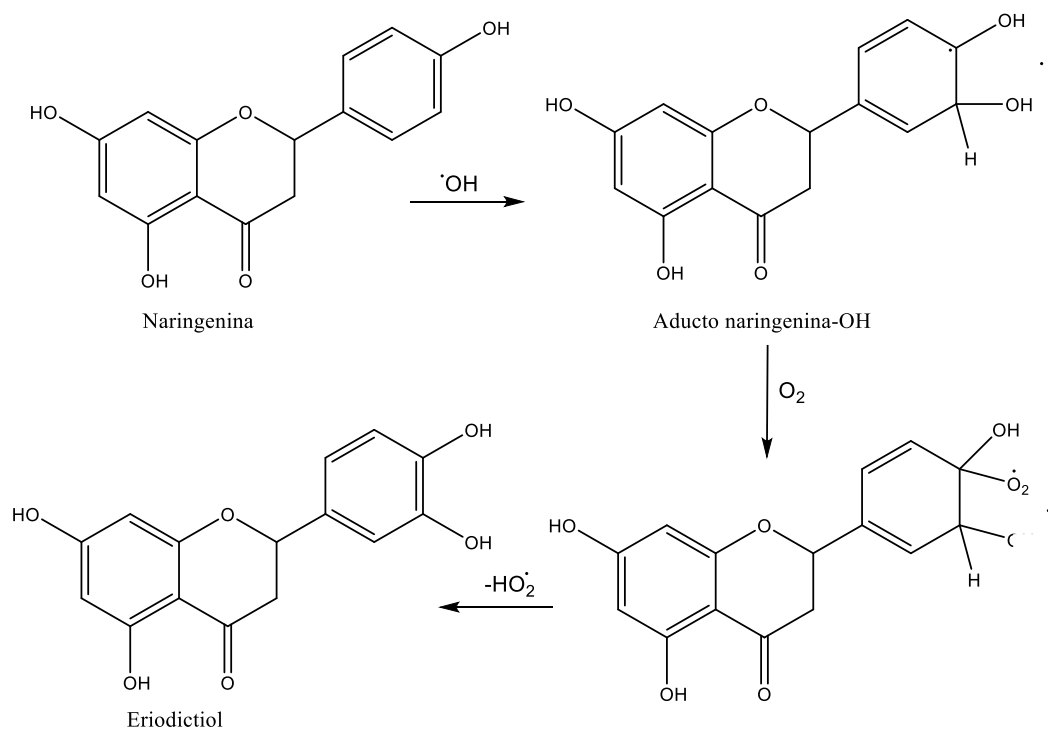
El incremento en la concentración de algunos compuestos fenólicos se puede deber a los factores previamente mencionados como temperatura, presión y agua, que pueden

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

favorecer o no, la ruptura y transformación de compuestos. En los extractos HA de *L. origanoides*, se observó que después del proceso de destilación, la naringenina disminuyó a la mitad de su concentración, por el contrario, el eriodictiol, compuesto de mayor abundancia, no disminuyó la concentración, cabe resaltar que este último es producto de la oxidación de la naringenina (Véase **Tabla 10**). Nagy *et al.* 2008, estudiaron la oxidación de la naringenina en eriodictiol en medio acuoso, cuando en presencia de agua y radiación se forma un aducto con un radical  $\bullet\text{OH}$  (Véase **Figura 14**).

### Figura 14

Reacción de oxidación de la naringenina a eriodictiol, en medio acuoso y radiación. Adaptado de Nagy et al., 2008.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

Probablemente el incremento en la concentración de algunos compuestos se encuentre relacionado con este proceso de oxidación, debido a la presencia de temperatura, agua y la formación de un aducto con el radical  $\bullet\text{OH}$ , durante el proceso de destilación.

En extractos HA y SFE- $\text{CO}_2$  de las especies vegetales bajo estudio, se cuantificaron en mayor abundancia flavonoides como la pinocembrina, la galangina, la acacetina, la acacetina metilada, la artemetina e hidrox-artemetina, compuestos apolares más afines con el carácter lipofílico del  $\text{CO}_2$  en estado supercrítico (Scopel *et al.*, 2013). La acacetina metilada, la acacetina, la galangina metilada, la artemetina y la hidrox-artemetina son flavonoides *O*-metilados, lo que incrementa el carácter apolar de la molécula, esto se observa en las corrientes iónicas obtenidas por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS, ya que, eluyen cuando la fase orgánica se encuentra en mayor concentración. Para el caso de la pinocembrina y galangina, estos no contienen grupo catecol en su estructura (el anillo B no posee hidroxilos), lo que disminuye su polaridad y permite que ocurran interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo B y el  $\text{CO}_2$  supercrítico. Cuando el anillo B del flavonoide contiene más grupos hidroxilos, el efecto de la interacción  $\pi$ - $\pi$  del  $\text{CO}_2$  con el anillo aromático es apantallado por los enlaces de hidrógeno del agua o el etanol, disolventes usados durante la extracción (Chen *et al.*, 2013).

FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 10**

Cuantificación por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM, de los extractos vegetales de *L. origanoides*, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación, mediante curvas de calibración externas con el uso de sustancias patrón.

N°	Compuesto	Rango, mg/L	Ecuación lineal	R <sup>2</sup>	[mg/L]		Cantidad de sustancia mg/g extracto $\bar{x} \pm s$ (n=3)			
					LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>b</sup>	Antes de su destilación		Después de su destilación	
							HA	SFE-CO <sub>2</sub>	HA	SFE-CO <sub>2</sub>
1	Taxifolina-glucósido <sup>c</sup>	0.01-0.80	$y = 6.3 \times 10^6 x - 1740$	0.997	0.04	0.15	< LOQ	< LOD	0.30 ± 0.01	< LOD
2	Taxifolina	0.01-0.80	$y = 1.7 \times 10^7 x + 2.3 \times 10^5$	0.991	0.08	0.27	1.70 ± 0.10	< LOD	3.00 ± 0.20	< LOD
3	Eriodictiol-7-O-glucósido	0.01-5.00	$y = 5.7 \times 10^6 x + 2.4 \times 10^5$	0.997	0.28	0.92	<b>16.0 ± 1.20</b>	< LOD	<b>28.0 ± 1.20</b>	< LOD
4	Quercetina-3-O-glucósido	0.40-2.00	$y = 1.3 \times 10^7 x - 6.1 \times 10^5$	0.996	0.10	0.32	4.40 ± 0.20	< LOD	12.0 ± 0.10	< LOD
5	Luteolina-rutinósido	0.08-2.00	$y = 2.5 \times 10^7 x + 3.0 \times 10^6$	0.989	0.20	0.68	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD
6	Luteolina-7-O-glucósido	1.00-10.0	$y = 2.2 \times 10^5 x + 1.0 \times 10^7$	0.991	0.97	3.23	17.0 ± 1.00	< LOD	15.0 ± 0.30	< LOD
7	Apigenina-7-O-glucorónido	0.01-0.80	$y = 2.8 \times 10^7 x - 2.3 \times 10^5$	0.996	0.05	0.15	0.90 ± 0.10	< LOD	1.12 ± 0.06	< LOD
8	Apigenina-7-O-glucósido	0.01-0.80	$y = 6.2 \times 10^7 x + 1.6 \times 10^6$	0.990	0.08	0.26	0.90 ± 0.01	< LOD	1.10 ± 0.04	< LOD
9	Eriodictiol	1.00-10.0	$y = 1.2 \times 10^7 x - 5.6 \times 10^6$	0.990	0.92	3.07	<b>24.0 ± 1.00</b>	< LOQ	<b>22.0 ± 1.00</b>	< LOQ
10	Quercetina	0.01-0.80	$y = 1.8 \times 10^7 x + 1.8 \times 10^5$	0.997	0.05	0.16	0.90 ± 0.10	< LOD	2.44 ± 0.01	< LOD
11	Naringenina	0.01-2.00	$y = 5.7 \times 10^7 x + 4.1 \times 10^6$	0.986	0.22	0.66	2.90 ± 0.10	2.00 ± 0.10	1.20 ± 0.10	< LOQ
12	Luteolina	0.40-6.00	$y = 4.2 \times 10^7 x + 1.6 \times 10^7$	0.990	0.63	2.11	7.00 ± 0.40	< LOD	< LOQ	< LOD
13	Cirsimaritina	0.01-0.80	$y = 4.2 \times 10^8 x + 9.7 \times 10^6$	0.991	0.08	0.27	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
14	Pinocembrina	1.00-10.0	$y = 7.1 \times 10^7 x - 2.0 \times 10^7$	0.987	1.08	3.58	<b>32.0 ± 2.00</b>	<b>94.0 ± 0.40</b>	<b>13.0 ± 0.20</b>	<b>63.0 ± 1.30</b>
15	Galangina	4.00-10.0	$y = 7.8 \times 10^7 x - 1.6 \times 10^8$	0.988	0.73	2.44	<b>18.0 ± 0.01</b>	<b>21.0 ± 0.20</b>	<b>10.2 ± 0.20</b>	<b>15.0 ± 0.40</b>
16	Galangina metilada <sup>d</sup>	4.00-10.0	$y = 7.8 \times 10^7 x - 1.6 \times 10^8$	0.988	0.73	2.44	< LOD	<b>7.10 ± 0.04</b>	< LOQ	<b>7.40 ± 0.20</b>

<sup>a</sup> LOD: límite de detección.

<sup>b</sup> LOQ: límite de cuantificación.

<sup>c</sup> Cuantificación mediante curva de calibración externa con uso de sustancia patrón de eriodictiol-7-O-glucósido.

<sup>d</sup> Cuantificación mediante curva de calibración externa con uso de sustancia patrón de galangina.

Los extractos de *L. origanoides* fueron analizados en una concentración de 400 mg/L.

HA: extracto hidroalcohólico.

SFE-CO<sub>2</sub>: extracto obtenido con fluido supercrítico.

FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 11**

Cuantificación por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM, de los extractos vegetales de *T. diffusa*, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación, a mediante curvas de calibración externas con el uso de sustancias patrón.

N°	Compuesto	Rango, mg/L	Ecuación lineal	R <sup>2</sup>	[mg/L]		Cantidad de sustancia, mg/g extracto $\bar{x} \pm s$ (n=3)			
					LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>b</sup>	Antes de su destilación		Después de su destilación	
							HA	SFE-CO <sub>2</sub>	HA	SFE-CO <sub>2</sub>
1	Luteolina-rutinósido <sup>c</sup>	1.00-10.0	$y = 2.2 \times 10^7 x + 1.0 \times 10^7$	0.991	0.97	3.23	$3.80 \pm 0.10$	< LOD	< LOQ	< LOD
2	Vixetina	0.06-4.00	$y = 2.8 \times 10^7 + 1.3 \times 10^7$	0.994	0.28	0.94	$1.23 \pm 0.02$	< LOD	$2.04 \pm 0.003$	< LOD
3	Luteolina-7-O-glucósido	0.01-0.80	$y = 3.1 \times 10^7 x + 5.8 \times 10^5$	0.994	0.06	0.20	< LOQ	< LOQ	< LOD	< LOD
4	Apigenina-7-O-glucorónido	0.01-0.80	$y = 2.8 \times 10^7 x - 2.3 \times 10^5$	0.996	0.05	0.15	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
5	Apigenina-7-O-glucósido	0.01-4.00	$y = 4.8 \times 10^7 x + 5.2 \times 10^6$	0.994	0.27	0.9	$1.20 \pm 0.02$	< LOD	< LOD	< LOD
7	Naringenina	0.01-0.80	$y = 6.9 \times 10^7 x + 1.5 \times 10^6$	0.996	0.05	0.17	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOD
8	Luteolina	0.01-0.80	$y = 6.2 \times 10^7 x + 1.5 \times 10^6$	0.994	0.06	0.21	< LOQ	< LOD	$0.40 \pm 0.01$	< LOD
9	Isorhamnetina	0.01-0.80	$y = 3.4 \times 10^7 x + 1.7 \times 10^5$	0.997	0.05	0.18	< LOQ	< LOD	$0.26 \pm 0.01$	< LOD
11	Apigenina	1.00-10.0	$y = 2.1 \times 10^7 x + 5.0 \times 10^7$	0.985	1.06	3.55	$3.80 \pm 0.40$	< LOD	< LOQ	< LOD
13	Isosakuranetina <sup>d</sup>	0.01-0.80	$y = 1.6 \times 10^8 x + 5.4 \times 10^6$	0.992	0.08	0.26	< LOQ	$0.50 \pm 0.05$	< LOD	< LOD
14	Acetina	1.00-10.0	$y = 2.2 \times 10^8 - 2.6 \times 10^7$	0.993	0.75	2.48	<b><math>3.23 \pm 0.14</math></b>	<b><math>3.80 \pm 0.14</math></b>	< LOD	< LOD
15	Crisoeriol <sup>e</sup>	0.01-2.00	$y = 2.0 \times 10^8 + 7.1 \times 10^6$	0.992	0.17	0.58	$0.83 \pm 0.03$	$1.1 \pm 0.01$	< LOD	< LOD
16	Acetina metilada <sup>e</sup>	1.00-10.0	$y = 2.2 \times 10^8 - 2.6 \times 10^7$	0.993	0.75	2.48	<b><math>4.80 \pm 0.20</math></b>	<b><math>9.00 \pm 1.00</math></b>	<b><math>5.00 \pm 1.00</math></b>	<b><math>5.70 \pm 0.30</math></b>
17	Velutina <sup>e</sup>	0.01-2.00	$y = 2.0 \times 10^8 + 7.1 \times 10^6$	0.992	0.17	0.58	$0.80 \pm 0.10$	$3.00 \pm 0.10$	< LOQ	< LOQ

<sup>a</sup> LOD: límite de detección.

<sup>b</sup> LOQ: límite de cuantificación.

<sup>c</sup> Cuantificación mediante curva de calibración externa con uso de sustancia patrón de luteolina-7-O-glucósido.

<sup>d</sup> Cuantificación mediante curva de calibración externa con uso de sustancia patrón de sakuranetina.

<sup>e</sup> Cuantificación mediante curva de calibración externa con uso de sustancia patrón de acetina.

Los extractos de *T. diffusa* fueron analizados en una concentración de 1000 mg/L.

HA: extracto hidroalcohólico.

SFE-CO<sub>2</sub>: extracto obtenido con fluido supercrítico.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 12**

Cuantificación por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM, de los extractos vegetales de *V. curassavica*, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación, mediante curvas de calibración externas con el uso de sustancias patrón.

N°	Compuesto	Rango, mg/L	Ecuación lineal	R <sup>2</sup>	[mg/L]		Cantidad de compuesto, mg/g extracto ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )			
					LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>b</sup>	Antes de su destilación		Después de su destilación	
							HA	SFE-CO <sub>2</sub>	HA	SFE-CO <sub>2</sub>
1	Ácido cafeico	0.01-0.80	$y = 3.7 \times 10^7 x + 7.1 \times 10^5$	0.994	0.07	0.23	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD
2	Eriodictiol-7-O-glucósido	0.02-0.80	$y = 6.3 \times 10^6 x - 1740$	0.990	0.04	0.15	$0.40 \pm 0.01$	< LOD	$0.50 \pm 0.02$	< LOD
3	Rutina	0.01-0.80	$y = 8.0 \times 10^6 x + 1.0 \times 10^5$	0.996	0.09	0.30	< LOQ	< LOD	< LOQ	< LOD
4	Ácido rosmarínico	0.06-10.0	$y = 4.2 \times 10^7 x - 7.2 \times 10^6$	0.995	0.55	1.84	<b><math>4.40 \pm 0.10</math></b>	<b><math>1.90 \pm 0.01</math></b>	<b><math>14.3 \pm 0.01</math></b>	<b><math>1.70 \pm 0.01</math></b>
5	Kaempferol-3-O-galactósido	0.08-0.80	$y = 4.1 \times 10^6 x + 1.0 \times 10^5$	0.994	0.06	0.20	$1.00 \pm 0.10$	< LOD	$0.30 \pm 0.03$	< LOD
6	Hidroxi-artemetina <sup>c</sup>	1.00-10.0	$y = 5.8 \times 10^8 x + 2.7 \times 10^7$	0.990	0.97	3.22	<b><math>5.00 \pm 0.40</math></b>	<b><math>13.0 \pm 1.20</math></b>	<b><math>8.60 \pm 0.03</math></b>	<b><math>6.90 \pm 0.40</math></b>
7	Artemetina						<b><math>8.00 \pm 1.00</math></b>	<b><math>11.0 \pm 2.00</math></b>	<b><math>15.00 \pm 1.00</math></b>	<b><math>13.0 \pm 1.00</math></b>
8	Pachipodol	0.06-0.80	$y = 1.6 \times 10^8 x + 2.0 \times 10^7$	0.993	0.06	0.20	< LOD	$8.30 \pm 0.10$	< LOQ	$4.80 \pm 0.10$
9	Retusina <sup>d</sup>						< LOQ	$6.40 \pm 0.10$	< LOQ	$8.80 \pm 0.20$

<sup>a</sup> LOD: límite de detección.

<sup>b</sup> LOQ: límite de cuantificación.

<sup>c</sup> Cuantificación mediante curva de calibración externa con uso de sustancia patrón de artemetina.

<sup>d</sup> Cuantificación mediante curva de calibración externa con uso de sustancia patrón de pachipodol.

Los extractos de *V. curassavica* fueron analizados en una concentración de 100 mg/L.

HA: extracto hidroalcohólico.

SFE-CO<sub>2</sub>: extracto obtenido con fluido supercrítico.

### **4.2.5 Caracterización química por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos, de los extractos vegetales bajo estudio**

La **Figura 15** muestra los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos bajo estudio de *L. origanoides*, de material vegetal antes y después de su destilación. Por comparación de  $t_R$  y espectros UV-Vis de los compuestos observados en los picos cromatográficos con sustancia patrón, se identificaron 13 compuestos confirmatoriamente. Mediante el estudio de los espectros UV-Vis de los picos cromatográficos y, por comparación con bases de datos, se identificaron tentativamente, tres derivados de flavonas, dos derivados de flavanonas y un derivado de flavonol. En los extractos HA de material vegetal antes y después de su destilación, se detectaron compuestos de mayor abundancia como el eriodictiol-7-*O*-glucósido, el eriodictiol, la pinocembrina y la galangina, siendo estos dos últimos los únicos flavonoides presentes en los extractos SFE-CO<sub>2</sub> (Véase **Figura 15 C y D**). La identificación de los picos cromatográficos se muestra en el **Apéndice 46**.

La **Figura 16** muestra los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos bajo estudio de *T. diffusa*. En los extractos HA de material vegetal antes y después de su destilación, se identificaron mediante sustancia patrón la apigenina-7-*O*-glucósido, la apigenina y la acacetina. Antes del proceso de destilación se observaron dos compuestos mayoritarios que corresponden a un derivado de flavona (pico 10) y un compuesto no identificado (pico 30). Sin embargo, después del proceso de destilación un derivado de flavona se encontró en mayor abundancia (pico 17) (Véase **Figura 16 A y B**). En extractos SFE-CO<sub>2</sub> de material vegetal antes y después de su destilación, se identificó

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

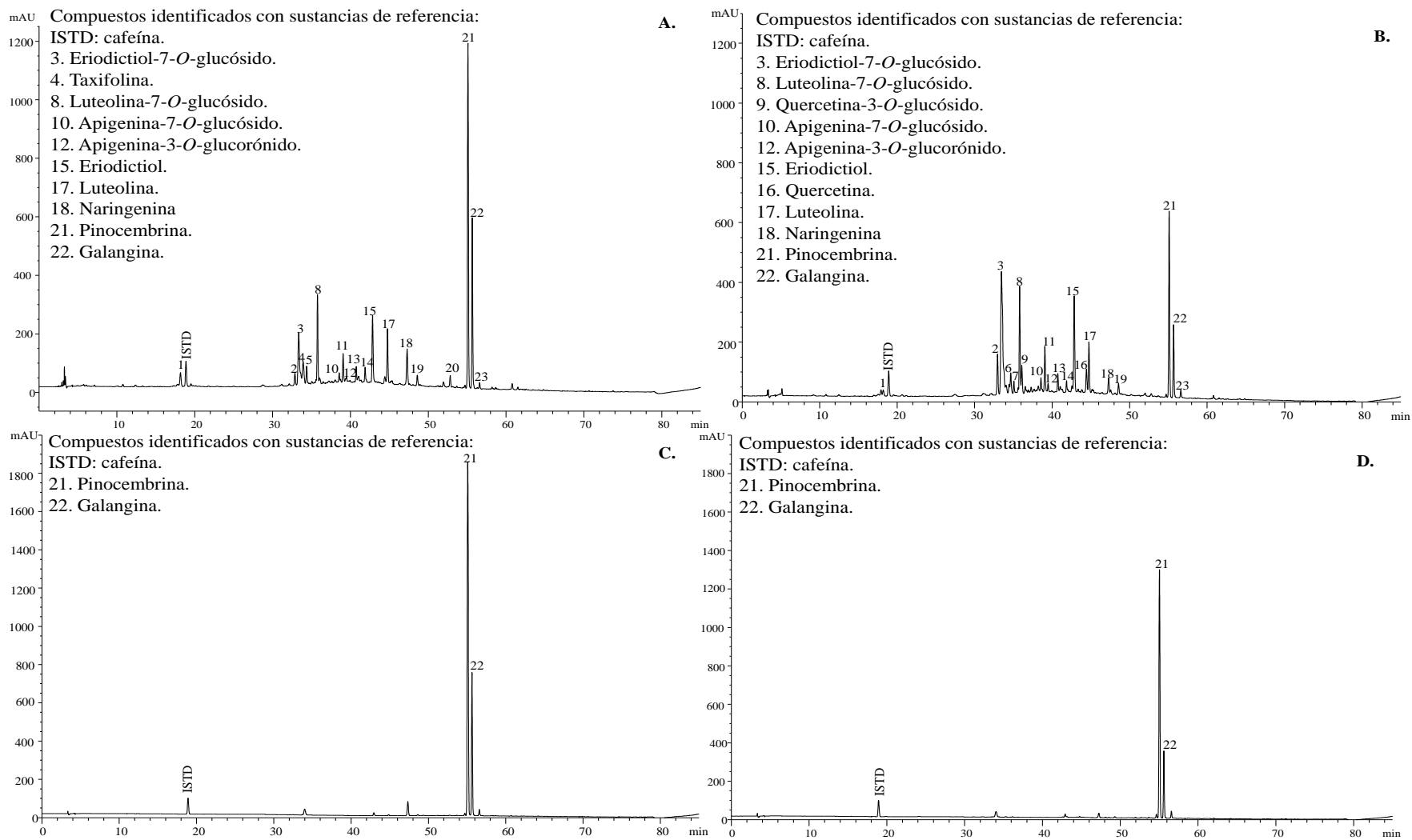
la acacetina en baja abundancia relativa. La identificación de los picos cromatográficos se muestra en el **Apéndice 47**.

La **Figura 17** muestra los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos bajo estudio de *V. curassavica*, de material vegetal antes y después de su destilación. En extractos HA antes y después de su destilación, se identificaron confirmatoriamente cinco compuestos como la rutina, el kamepferol-3-*O*-galactósido, el pachipodol el ácido rosmarínico, y la artemetina, este último se encontró en mayor abundancia (Véase **Figura 17 A y B**). En extractos SFE-CO<sub>2</sub> de material vegetal antes y después de su destilación, se identificaron como compuestos mayoritarios un derivado de flavonol (pico 15) y la artemetina (Véase **Figura 17 C y D**). La identificación de los picos cromatográficos se muestra en el **Apéndice 48**.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 15

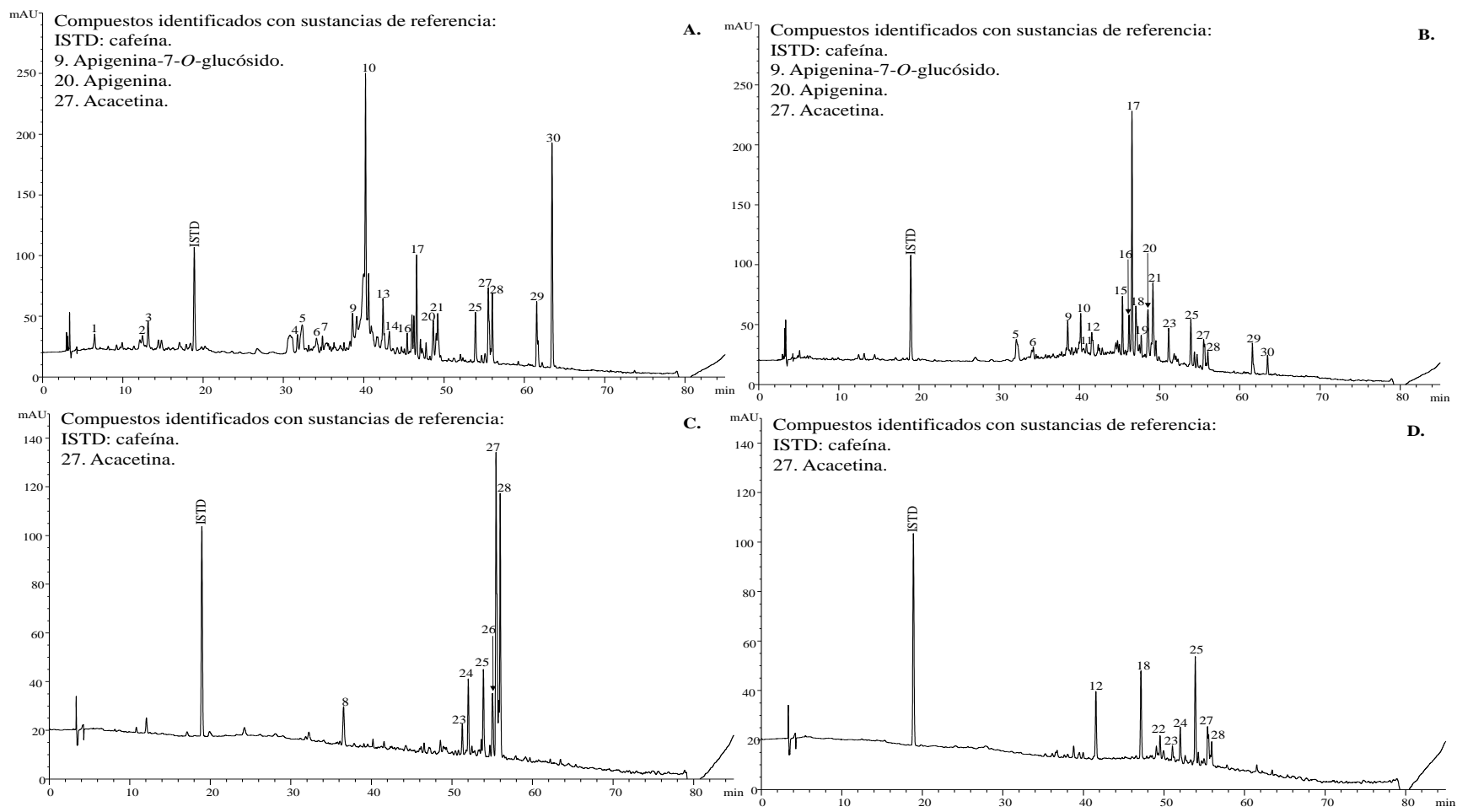
Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos de *L. origanoides* quimiotipo *felandreno*. **A.** Extracto HA de material vegetal, antes de su destilación; **B.** Extracto HA de material vegetal, después de su destilación; **C.** Extracto SFE-CO<sub>2</sub> de material vegetal, antes de su destilación; **D.** Extracto SFE-CO<sub>2</sub> de material vegetal, después de su destilación. Columna GEMINI C<sub>18</sub>. La identificación se muestra en el Apéndice 45.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 16

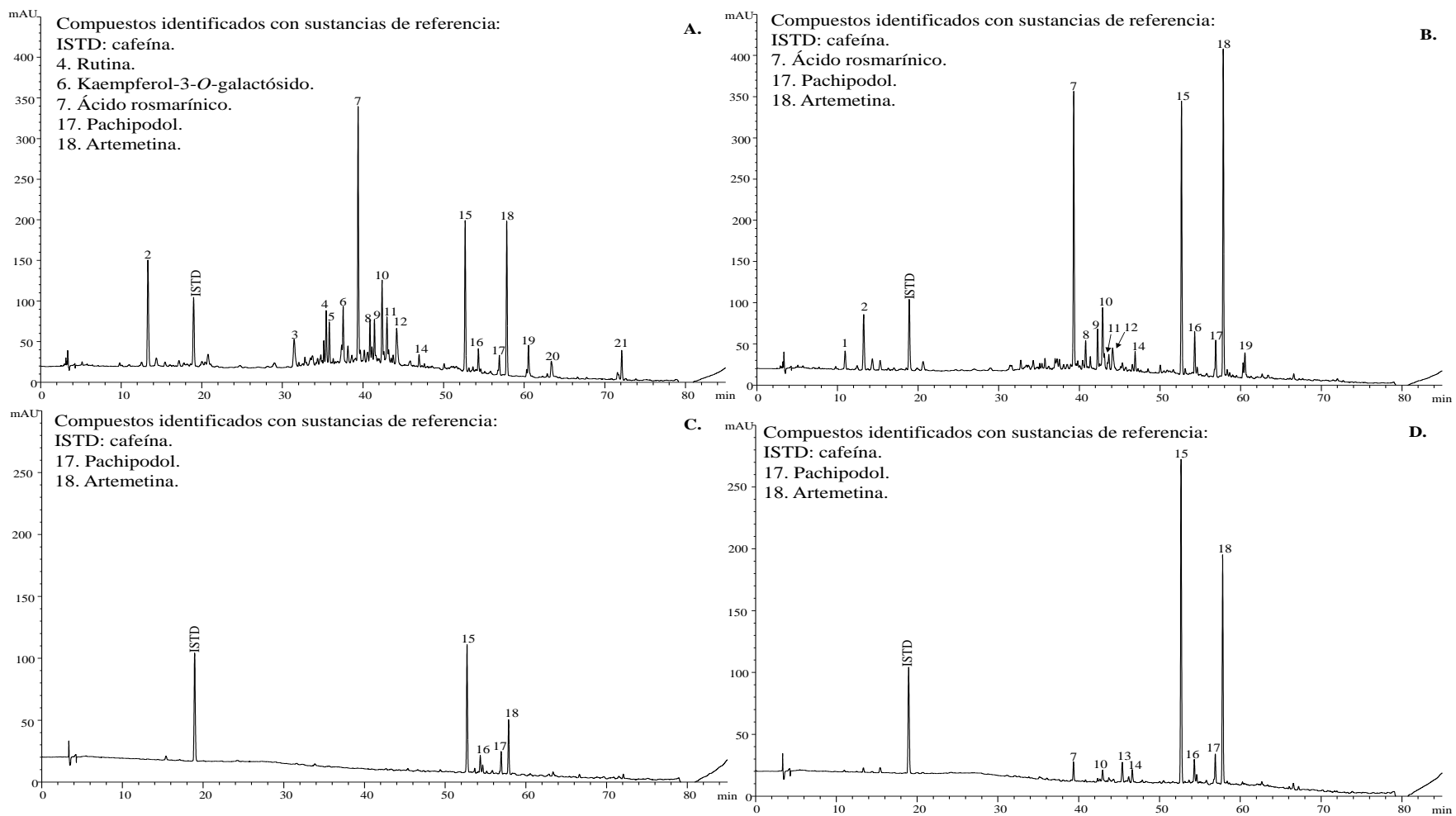
Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos de *T. diffusa*. **A.** Extracto HA de material vegetal, antes de su destilación; **B.** Extracto HA de material vegetal, después de su destilación; **C.** Extracto SFE-CO<sub>2</sub> de material vegetal, antes de su destilación; **D.** Extracto SFE-CO<sub>2</sub> de material vegetal, después de su destilación. Columna GEMINI C<sub>18</sub>. La identificación se muestra en el Apéndice 46.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 17**

Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos de *V. curassavica*. **A.** Extracto HA de material vegetal, antes de su destilación; **B.** Extracto HA de material vegetal, después de su destilación; **C.** Extracto SFE-CO<sub>2</sub> de material vegetal, antes de su destilación; **D.** Extracto SFE-CO<sub>2</sub> de material vegetal después, de su destilación. Columna GEMINI C<sub>18</sub>. La identificación se muestra en el Apéndice 47.



### 4.3 Diseño e implementación de un método cromatográfico por cromatografía líquida preparativa, para el fraccionamiento de extractos, obtenidos de material vegetal después de su destilación

#### 4.3.1 Estudio del efecto del flujo de fase móvil y del gradiente de elución para el fraccionamiento de sustancias patrón

El desarrollo de un método cromatográfico debe tener en cuenta algunos aspectos, *e.g.*, el tipo de columna (fase normal o reversa), fase móvil, flujo de fase móvil, volumen de inyección, sistema de detección, el tipo de compuesto que se va a analizar, entre otros (Lakka & Kuppan, 2020). Se propuso el escalamiento del método analítico (HPLC/DAD) al sistema preparativo (Prep/HPLC) considerando aspectos de las columnas cromatográficas empleadas en ambos equipos, como las longitudes, diámetros internos y tamaños de partícula. La **Ecuación 11** permite determinar el flujo de fase móvil necesario para obtener un perfil cromatográfico de un método analítico, escalado en un sistema preparativo. La fórmula relaciona las dimensiones de ambas columnas (Long & Majors, 2004). Las columnas empleadas en este estudio poseen iguales longitudes (250 mm) y tamaños de partícula (5  $\mu\text{m}$ ), por tanto, el escalamiento estuvo condicionado por el cociente de los diámetros internos de la columna analítica (4.6 mm) y preparativa (20 mm). El flujo de fase móvil usado en HPLC/DAD fue de 1 mL/min durante 85 min.

$$F_{\text{Prep}} = F_{\text{Analítico}} * \frac{(D_{\text{Prep}}^2)}{(D_{\text{Analítico}}^2)} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$F_{\text{Prep}} = 1 \text{ mL/min} * \frac{(20 \text{ mm})^2}{(4.6 \text{ mm})^2} = 18.9 \text{ mL/min}$$

Donde:

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

$F_{\text{Prep}}$ : flujo de fase móvil del método preparativo.

$F_{\text{Análítico}}$ : flujo de fase móvil del método analítico.

$D^2_{\text{Prep}}$ : diámetro interno de la columna preparativa.

$D^2_{\text{Análítico}}$ : diámetro interno de la columna analítica.

Según el resultado, el método preparativo tendría un flujo de 18.9 mL/min durante 85 min, lo que consumiría un volumen de fase móvil de 1.6 L por cada análisis cromatográfico, por tanto, un escalamiento directo no fue posible. Para solucionar esto, se propuso el desarrollo de un método por cromatografía líquida preparativa, con menor gasto de disolvente de fase móvil.

Para determinar el flujo de la fase móvil se realizó la revisión bibliográfica de estudios previos por Prep/HPLC para el fraccionamiento de extractos vegetales. Arzanlou *et al.*, emplearon un régimen isocrático de metanol-agua (50% v/v) con un flujo de 2 mL/min para la purificación de un extracto de ajo (Arzanlou *et al.*, 2015). Wang *et al.*, emplearon fase móvil con gradiente de elución programado de metanol-agua-ácido acético y flujo de 5 mL/min durante 60 min (Wang *et al.*, 2011). Por otra parte, Kumar *et al.*, purificaron compuestos presentes en extractos de *Picrorhiza kurroa*. Los autores usaron una fase móvil de: A. Ácido fórmico (2% v/v); B. Acetonitrilo, sin embargo, la fase móvil modificada causó la inestabilidad y descomposición de las fracciones recolectadas en Prep/HPLC, por lo cual, los autores eliminaron el modificador ácido (Kumar *et al.*, 2016).

Los solventes de fase móvil más usados son el acetonitrilo y metanol. El metanol es un disolvente prótico que puede crear puentes de hidrógeno con el agua y la muestra de estudio, esto causa una disminución en la separación de los compuestos dentro de la

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

columna cromatográfica. El acetonitrilo no crea puentes de hidrógeno y su fuerza de elución es mayor que la del metanol (Bocian *et al.*, 2008). Además, posee una polaridad cercana al metanol, es transparente ante el detector UV-Vis y se pueden obtener picos cromatográficos de mejor resolución. Sin embargo, se seleccionó el metanol debido a su baja toxicidad y bajo precio en el mercado (Rudakov *et al.*, 2018).

Para determinar el flujo del método cromatográfico por Prep/HPLC, se usaron tres sustancias patrón con respuesta al sistema de detección (DAD), con una cantidad suficiente para preparar una mezcla y realizar los análisis cromatográficos, estas fueron: la teobromina, la cafeína y la quercetina. Con base en los estudios encontrados en la literatura, se ajustaron métodos con un régimen isocrático metanol-agua de 70% v/v y 50% v/v con un flujo de fase móvil de 4 mL/min. Las **Figuras 18 A y B** muestran los cromatogramas obtenidos por Prep/HPLC. Con un régimen isocrático de metanol-agua 70% v/v los compuestos tuvieron menor resolución, en comparación, con el método isocrático metanol-agua 50% v/v, sin embargo, este último método tenía una duración de 30 min. Se aumentó el flujo de fase móvil a 10 mL/min con un régimen isocrático metanol-agua 50% v/v. La **Figura 18 C** muestra una mejor resolución de los compuestos, así mismo, el tiempo de elución fue inferior a los 10 min.

Wang *et al.*, fraccionaron extractos de *Scutellaria barbata*. La caracterización química por HPLC/DAD se realizó con un método cromatográfico de 60 min, el método por Prep/HPLC, lo realizaron empleando la mitad del tiempo (30 min) con un flujo de 12 mL/min. Siguiendo esta metodología, se empleó un flujo de fase móvil de 12 mL/min con gradiente de elución binario; A. Agua Tipo I; B. Metanol grado HPLC, programado así: 2% B (0 min), 50% B (1-5 min), 90% B (7-15 min), 2% B (15-17 min), 2% B (19 min). La

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 18 D** muestra el cromatograma obtenido, donde se observó una mejor resolución de los picos cromatográficos, sin embargo, se observó *tailing* en estos, posiblemente atribuido a la ausencia de un modificador como un ácido orgánico que garantiza la presencia de una misma especie de moléculas cargadas (Angulo *et al.*, 2019). En Prep/HPLC se debe tener en cuenta la reproducibilidad del método, esto con el fin de obtener las mismas fracciones en cada fraccionamiento del extracto bajo estudio, por lo que el fraccionador se configura de acuerdo con la altura (*level*), pendiente (*slope*), ancho (*width*) y tiempos de retención de los picos cromatográficos de interés (Shimadzu, 2019). La **Tabla 13** muestra la repetibilidad de los  $t_R$  y las áreas cromatográficas para los compuestos presentes en la mezcla de sustancias patrón, con coeficientes de variación inferiores al 2.4%. Según los resultados obtenidos, se observó que un flujo de fase móvil de 12 mL/min y gradiente binario metanol-agua, favoreció la respuesta del detector en la construcción del perfil cromatográfico.

**Tabla 13**

*Repetibilidad de los tiempos de retención y áreas cromatográficas de los compuestos presentes en la mezcla de sustancia patrón. Flujo de 12 mL/min, gradiente de elución programado.*

Pico N° Fig. 18 D	Compuesto	$t_R$ , min ( $\bar{x} \pm s$ , $n = 3$ ) <sup>a</sup>	CV, % <sup>b</sup>	área, cuentas $\times 10^4$ ( $\bar{x} \pm s$ , $n = 3$ ) <sup>a</sup>	CV, % <sup>b</sup>
I	Teobromina	7.30 $\pm$ 0.04	0.5	300 $\pm$ 3.8	1.3
II	Cafeína	9.10 $\pm$ 0.10	1.1	316 $\pm$ 0.2	0.1
III	Quercetina	12.6 $\pm$ 0.30	2.4	317 $\pm$ 3.3	1.1

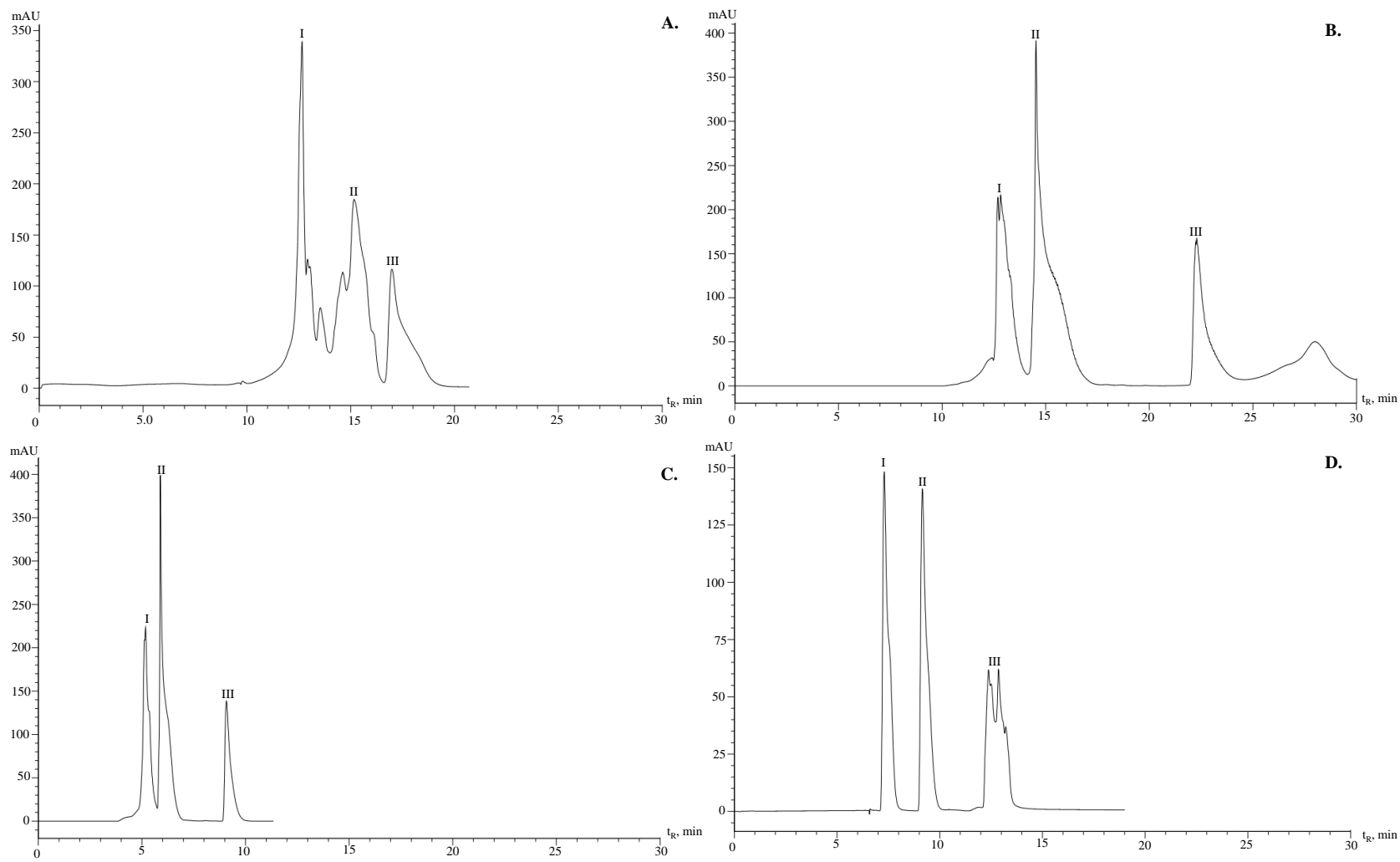
<sup>a</sup> Promedio  $\pm$  desviación estándar.

<sup>b</sup> CV: coeficiente de variación.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 18

Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC de la mezcla de sustancias patrón. **A.** Flujo de 4 mL/min, metanol 70% v/v; **B.** Flujo de 4 mL/min, metanol 50% v/v; **C.** Flujo de 10 mL/min, metanol 50% v/v; **D.** Flujo de 12 mL/min, gradiente de elución programado. Columna Shim-Pack GIST C<sub>18</sub>.



### **4.3.2 Fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido de material vegetal después de su destilación, para el aislamiento de compuestos de interés**

Cuando se encuentran compuestos de interés, es posible disminuir el tiempo de elución de los analitos, para ello, se determina el punto de elución virtual, que se define como el porcentaje de disolvente orgánico necesario para producir la elución de dicho compuesto (Penduff, 2013). El perfil cromatográfico del extracto HA de *L. origanoides*, obtenido de material vegetal después de su destilación, mostró que la pinocembrina y galangina eluyeron con una concentración de acetonitrilo cercano al 40% v/v, es decir, un método con régimen isocrático o con gradiente binario que sobrepase el 40% v/v de fase orgánica, permitirá la elución de ambos analitos de interés (Véase **Figura 15 B**). La pinocembrina y galangina se consideraron compuestos objetivos, puesto que, ambos son los compuestos mayoritarios presentes en el extracto, y eluyeron en  $t_R$  mayores a los 55 min, muy separados de los otros picos cromatográficos. Estudios previos han mostrado que la pinocembrina y la galangina poseen altas actividades antioxidantes, comparables a antioxidantes comerciales de referencia, por lo que, son compuestos de interés para su fraccionamiento y purificación (Halagarda *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2018).

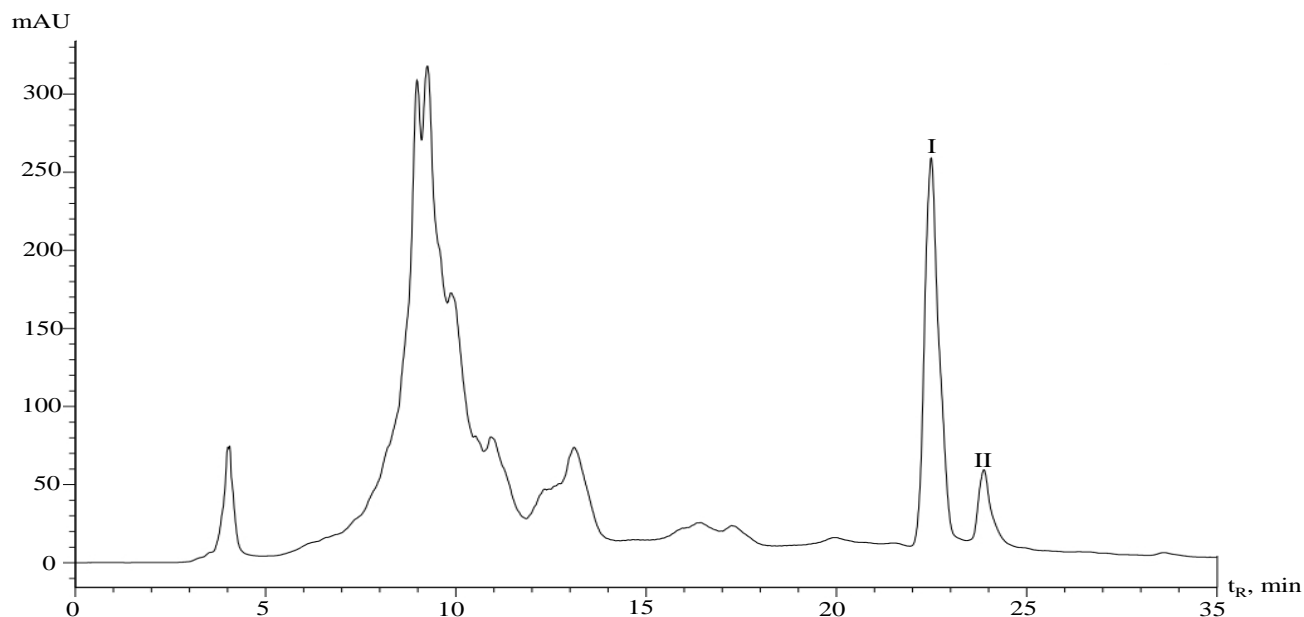
Se preparó una muestra a una concentración de 20 g/L. Se empleó un flujo de fase móvil de 15 mL/min, con gradiente de elución binario; **A.** Agua Tipo I; **B.** Metanol grado HPLC, programado así: 30% **B** (0 min), 30%-60% **B** (0-5 min), 60% **B** (5-10 min), 60%-70% **B** (10-15 min), 70%-90% **B** (15-20 min), 90% **B** (20-30 min). La mayor parte del tiempo, la fase orgánica se mantuvo sobre el 60% v/v, con el fin de obtener una mejor resolución de los compuestos objetivo (pinocembrina y galangina).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

En la **Figura 19** se muestra el perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto HA de *L. origanoides*, de material vegetal después de su destilación. Debido al gradiente empleado y, a la complejidad del extracto, no se resolvieron los picos cromatográficos obtenidos en  $t_R$  de de 2.5 min a 18 min. Sin embargo, fue posible separar dos picos que se encontraron en  $t_R$  de 22 min a 25 min, los cuales fueron fraccionados. La caracterización química por HPLC/DAD de las fracciones I y II mostraron que fue posible aislar la pinocembrina y la galangina, respectivamente (Véase **Figura 20**).

### Figura 19

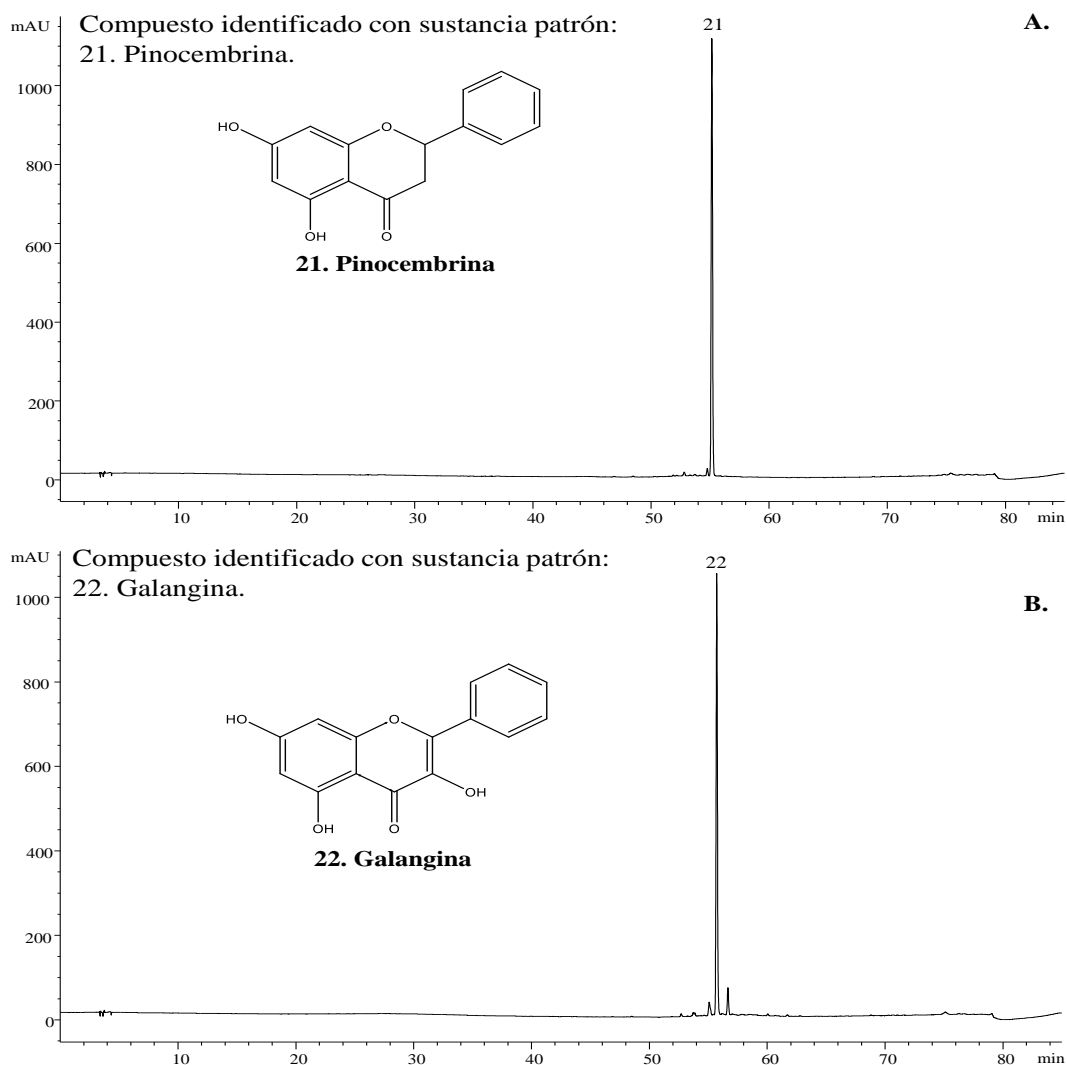
*Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto HA de L. origanoides. Columna Shim-Pack GIST C<sub>18</sub>.*



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 20**

*Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones recolectadas del extracto HA de L. origanoides. A. Fracción I; B. Fracción II. Columna GEMINI C<sub>18</sub>. ISTD: cafeína, 100 mg/L.*



### 4.3.3 Fraccionamiento de los extractos bajo estudio y caracterización química de las fracciones

Prep/HPLC posee tres objetivos principales: productividad, rendimiento y pureza de los compuestos aislados. Inyecciones de muestras poco concentradas conducirán a la obtención de perfiles cromatográficos con picos resueltos. Sin embargo, el rendimiento y la productividad de la técnica conducen a tener en cuenta la capacidad de carga máxima de

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

la columna preparativa y, el volumen máximo de inyección del inyector automático (Phenomenex, 2020). Para purificar muestras muy concentradas (superiores a 30 g/L), existen dos métodos posibles, la ampliación del sistema analítico o la sobrecarga de la columna. La ampliación del sistema analítico requiere columnas con diámetros superiores a 10 mm de diámetro interno y flujos de fase móvil superiores a los 15 mL/min. Por otra parte, la sobrecarga de la columna, es decir, el aumento de la cantidad de muestra aplicada en las mismas condiciones analíticas, suele ser el método de elección. La capacidad de carga de una columna se encuentra condicionada por sus dimensiones (longitud y diámetro interno). Para este método es necesario el uso de columnas cromatografías con longitudes superiores a 150 mm y diámetros internos superiores a 10 mm (Huber & Major, 2012). Sin embargo, la inyección de muestras muy concentradas conduce a picos cromatográficos poco resueltos con *tailing* o *fronting*. A mayor complejidad química de la muestra, mayor será la dificultad en la optimización de los tres parámetros de interés. Por tanto, se debe priorizar la optimización de al menos uno de estos objetivos (productividad, rendimiento y pureza).

Para realizar el diseño e implementación del método cromatográfico por Prep/HPLC, para el fraccionamiento de los extractos bajo estudio, de material vegetal después de su destilación, se tuvieron en cuenta los resultados preliminares, y se realizó la revisión bibliográfica de estudios previos. Abu-Lafi *et al.*, fraccionaron un extracto vegetal de la especie *Inula viscosa*. El perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD mostró 11 compuestos. Los autores usaron un cromatógrafo líquido preparativo con columna en fase reversa de C<sub>18</sub> con dimensiones de 250 mm de longitud x 22.2 mm D. I. x 10 µm de tamaño de partícula, inyección de 1 mL de muestra en una concentración de 46 g/mL, gradiente

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

binario: **A.** Agua; **B.** Acetonitrilo, programado de la siguiente forma: 5-100% **B** en (0-17 min) y 100% **B** (7-30 min). El aumento constante del acetonitrilo permitió la elución sucesiva de los compuestos, además, aumentar la fase orgánica hasta el 100% permitió la limpieza de la columna cromatográfica (Abu-Lafi *et al.*, 2018). De Igual forma, Kumar *et al.*, recomiendan prescindir del uso de modificadores ácidos como ácido fórmico, acético o trifluoroacético, debido a la inestabilidad de algunos analitos en condiciones ácidas (Kumar *et al.*, 2016).

También, se determinaron el volumen y el tiempo muerto de la columna cromatográfica. El volumen muerto se conoce como el volumen total de la fase móvil en la columna, por su parte, el tiempo muerto, es el tiempo que se necesita para completar dicho volumen. En cromatografía líquida en fase reversa, el uracilo y la acetona son las moléculas orgánicas más usadas, ya que absorben en el rango UV-Vis y no son retenidas por la columna (Tsopelas *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2014). Se realizó la inyección de acetona a un flujo de 15 mL/min. Se establecieron el volumen y el tiempo muerto en 60 mL y 4 min, respectivamente.

Según las recomendaciones de Abu-lafi *et al.*, y Kumar *et al.*, y algunas modificaciones, se definieron los siguientes parámetros cromatográficos como un flujo de fase móvil de 15 mL/min con gradiente de elución binario: **A.** Agua Tipo I; **B.** Metanol HPLC, programado: 30% **B** (0 min), 30%-100% **B** (0-30 min), 100% **B** (30-38 min). Se recolectó la línea base durante el análisis cromatográfico con el fin se observar la pérdida de masa durante el fraccionamiento de los extractos bajo estudio.

La columna preparativa usada en este estudio posee una longitud de 250 mm y diámetro interno de 20 mm. Esta columna soporta cargas máximas de 300 mg de muestra

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

(Shimadzu, 2022). Para realizar el fraccionamiento de los extractos, se hicieron dos análisis cromatográficos, el primero para observar la resolución de los picos y determinar los compuestos de interés (100 mg de muestra), el segundo para realizar el fraccionamiento del extracto mediante el uso de fraccionador automático (200 mg de muestra).

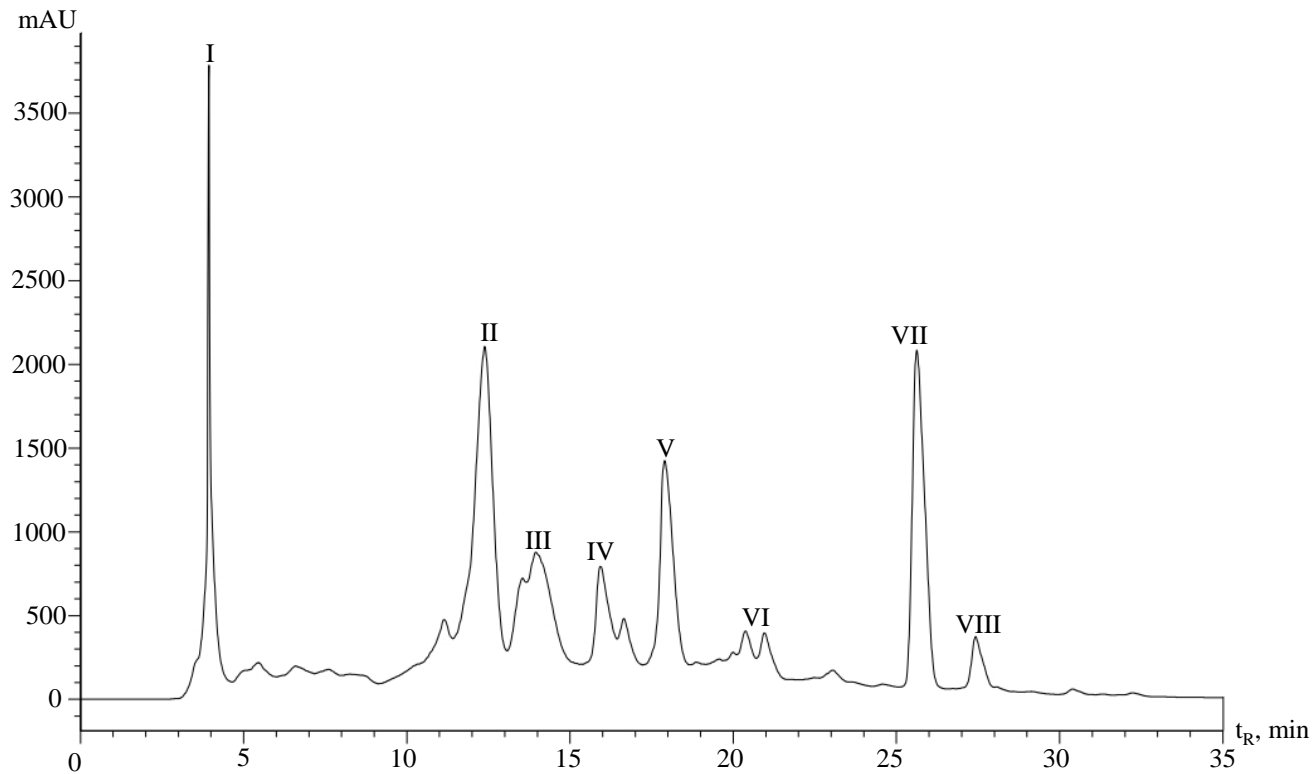
La **Figura 21** muestra el perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto HA de *L. origanoides*, obtenido de material vegetal después de su destilación. El gradiente usado permitió resolver los picos no resueltos mostrados en la **Figura 19**. Se distinguieron ocho fracciones (Véase **Figura 21**). La **Tabla 14** muestra el peso las fracciones de recolectadas. La fracción I tuvo un peso de 59.7 mg, es decir, el 30% p/p, sin embargo, correspondió a los compuestos no retenidos por la columna. Se obtuvieron 149.7 mg de las fracciones colectadas en una inyección de 200 mg de muestra.

Las **Figuras 22** y **23** muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones obtenidas. Mediante la caracterización química por HPLC/DAD no se detectó ningún compuesto de interés en la fracción I (Véase **Figura 21 A**). Fue posible aislar los compuestos de mayor abundancia del extracto, *e.g.*, el eriodictiol (fracción V), la pinocembrina (fracción VII) y la galangina (fracción VIII) con pesos de 7.0 mg, 6.8 mg y 1.1 mg, respectivamente. Mediante UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS fue posible identificar el pico cromatográfico 23 como la galangina metilada (Véase **Figura 23 D**).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 21**

*Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto HA de L. origanoides quimiotipo felandreno. Columna Shim-Pack GIST C<sub>18</sub>.*



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 14**

*Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto hidroalcohólico de L. origanoides quimiotipo felandreno. Se inyectaron 200 mg de muestra.*

N°	Intervalo de tiempo, min	Fracciones, mg
I	2.5-4.5	59.7
II	11.0-13.4	23.8
III	13.5-15.65	13.1
IV	15.7-17.7	10.0
V	17.7-19.6	7.0
VI	19.7-22.2	7.4
VII	24.9-26.5	6.8
VIII	26.7-28.8	1.1
-	Pérdidas*	20.8
<b>Total</b>		<b>149.7</b>
-	Residuos**	44.7

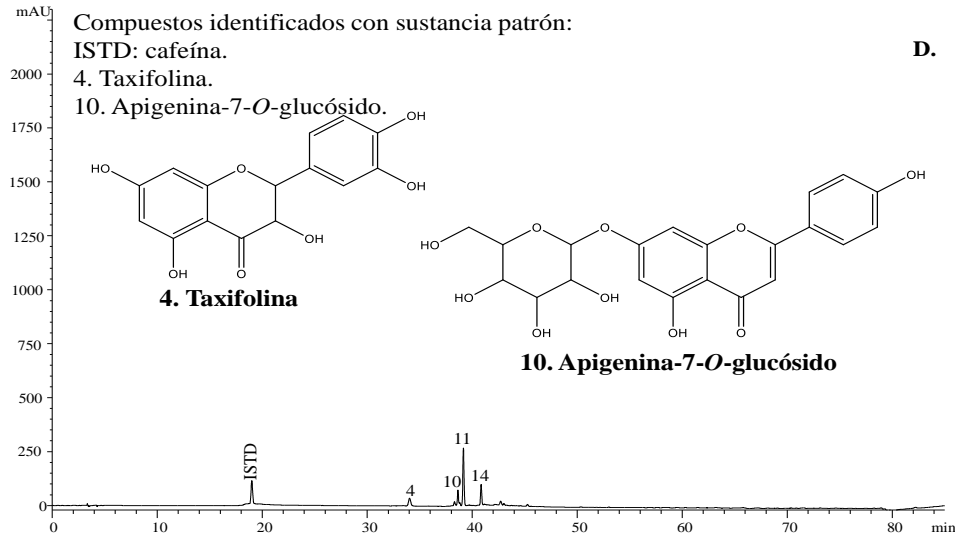
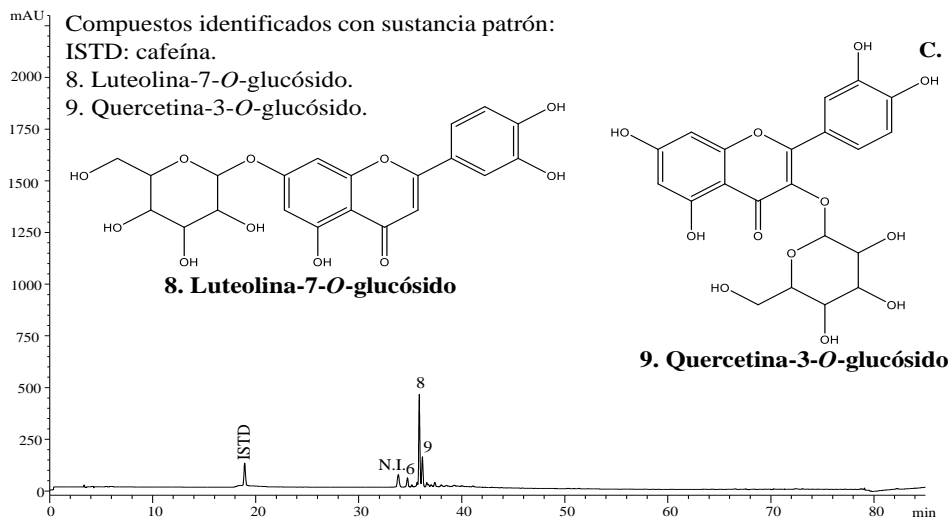
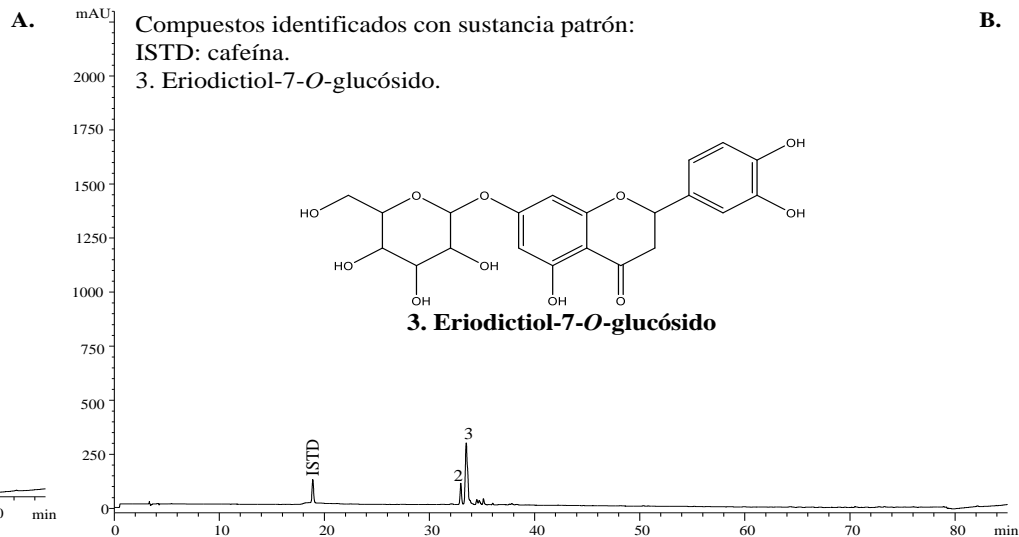
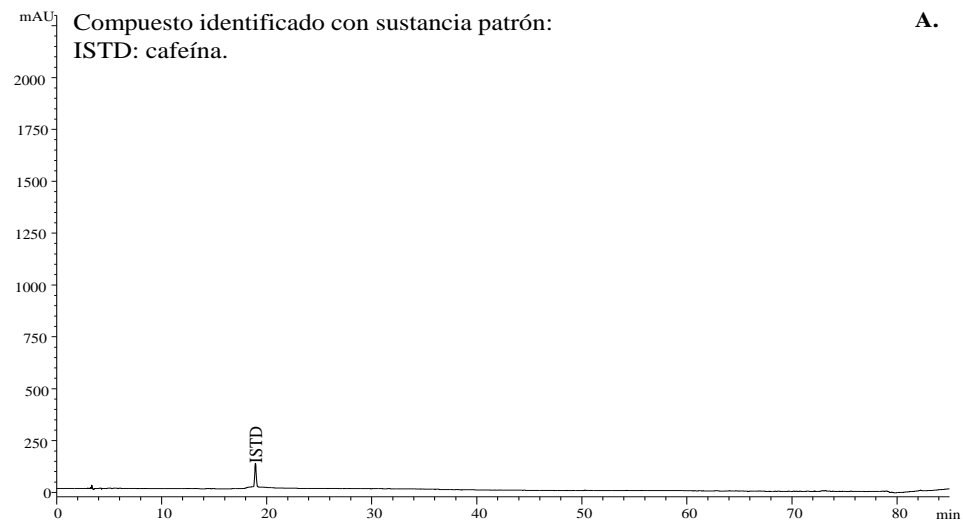
\*Recolección de la línea base durante el fraccionamiento.

\*\*Residuo del extracto obtenido por centrifugación durante la preparación de la muestra (400 mg).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 22**

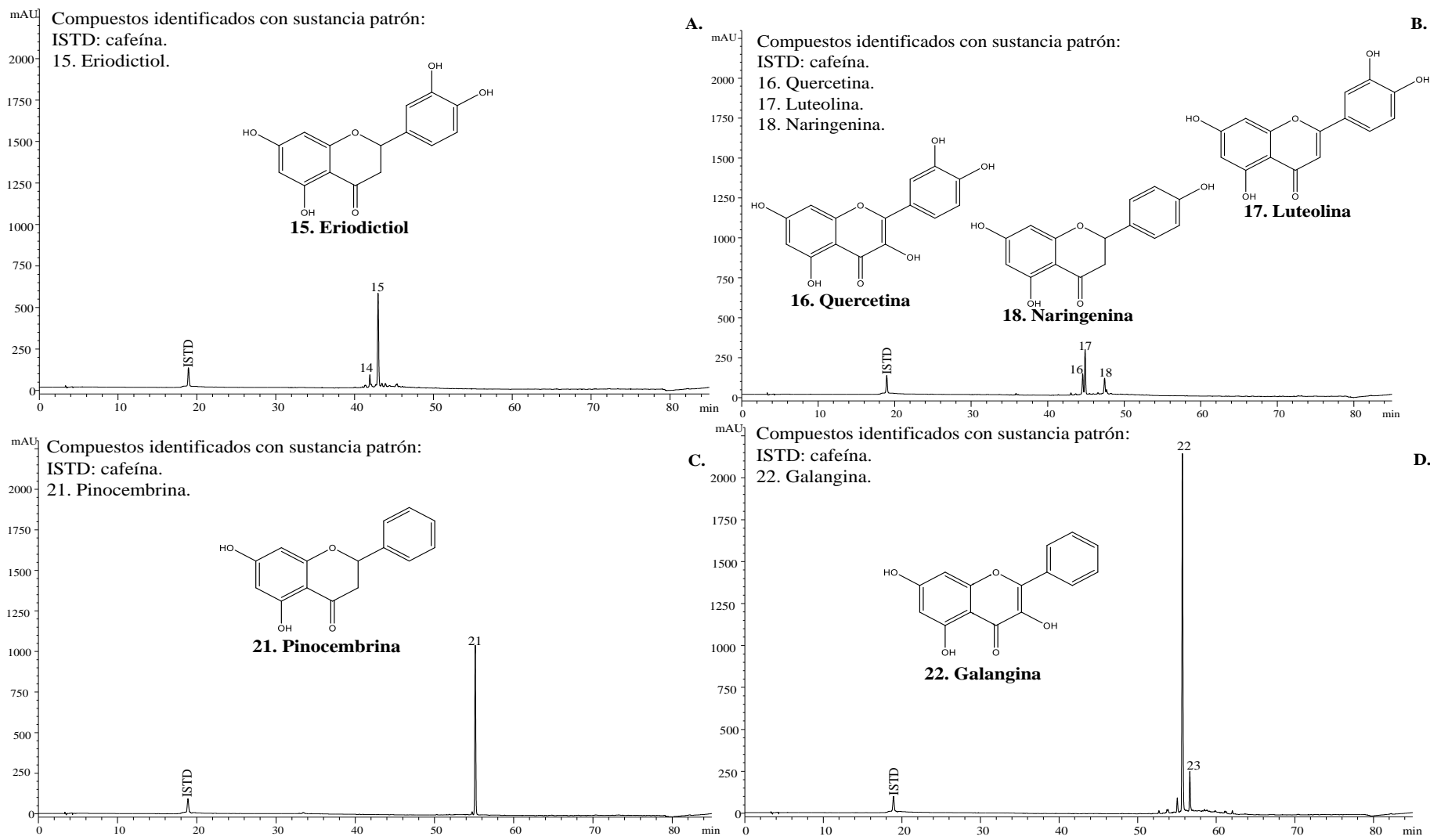
Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de *L. organoides* quimiotipo *felandreno*. **A.** Fracción I; **B.** Fracción II; **C.** Fracción III; **D.** Fracción IV. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 23**

Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de *L. organoides* quimiotipo *felandreno*. **A.** Fracción V; **B.** Fracción VI; **C.** Fracción VII; **D.** Fracción VIII. Columna GEMINI C18.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

La **Figura 24** muestra el perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de *L. origanoides*, de material vegetal después de su destilación. Se recolectaron tres fracciones. El pico I mostró la mayor la mayor abundancia. La **Tabla 15** muestra los pesos de las fracciones recolectadas. Las fracciones I, II y III tuvieron pesos de 14.0 mg, 3.9 mg y 24.3, respectivamente. La caracterización química por HPLC/DAD de las fracciones mostró que fue posible aislar la pinocembrina (fracción I) y la galangina (fracción II), respectivamente. No se detectó ningún compuesto en la fracción III. Se obtuvieron 47.7 mg de las fracciones colectadas en una inyección de 200 mg de muestra (Véase **Tabla 15**).

El proceso de extracción con fluido supercrítico fue altamente selectivo hacia pinocembrina y galangina, y actuó como un pre-fraccionamiento del extracto, esto facilitó la purificación por Prep/HPLC. La pinocembrina aislada del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de *L. origanoides*, formó un residuo sólido de color blanco después de remover el exceso de disolvente. El color de la pinocembrina obtenida del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de *L. origanoides* (blanco), difirió del color de la pinocembrina obtenida del extracto HA de *L. origanoides* (amarillo pálido). Es importante analizar la pureza química, después de la liofilización de las muestras. El proceso de secado puede eliminar los solventes, sin embargo, las impurezas no volátiles podrían permanecer en las fracciones (Urwin *et al.*, 2020). Existen métodos de análisis instrumental para determinar la pureza de un compuesto. Zamani *et al.*, usaron sustancias patrón para determinar la pureza de flavonoides como el xantomicrool, la calicopterina y la cirsimaritina, compuestos aislados en extractos de *Dracocephalum kotschy* Bioss (Zamani *et al.*, 2016). Aunque es un método usado para determinar la pureza,

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

es recomendable el uso de técnicas de análisis químico complementarias como RMN, FT-IR, o el uso de un detector universal como dispersión de la luz.

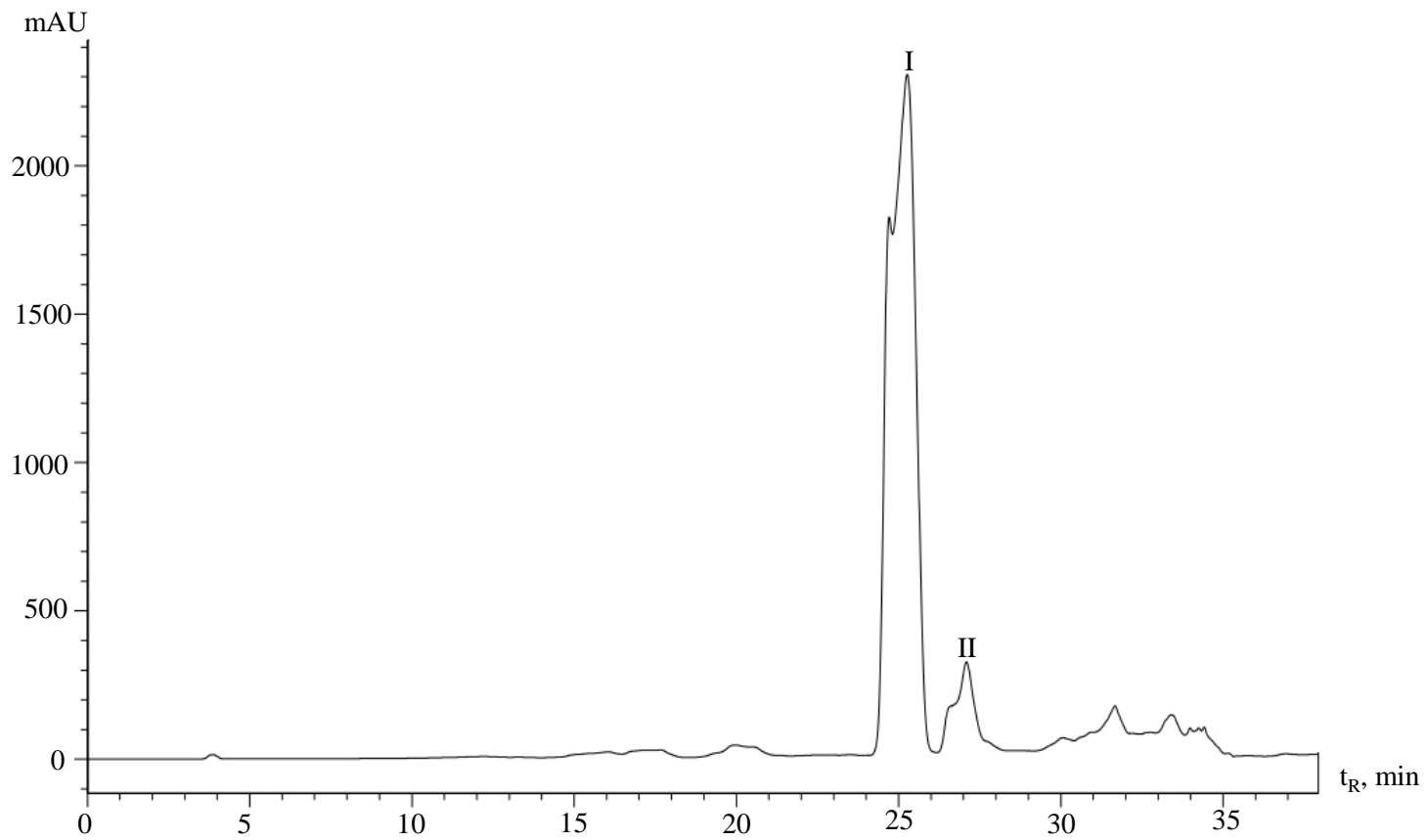
Al año 2023, en la distribuidora comercial *Merck* (*Merck* KGaA, Darmstadt, Alemania), el precio de 50 mg de pinocembrina (estándar de referencia, > 95%) es de 274.2 USD. Según la cantidad aislada de pinocembrina del extracto SFE-CO<sub>2</sub>, se pueden obtener 70 mg de pinocembrina/g extracto, valor similar al obtenido mediante la cuantificación química por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS (63 mg pinocembrina/g extracto, Véase **Tabla 10**).

Teniendo en cuenta que este extracto posee mayoritariamente dos compuestos, es posible emplear un método isocrático con una concentración de metanol cercana al punto de elución virtual de la pinocembrina, con el fin de reducir el consumo de solvente y el tiempo del análisis cromatográfico. Es posible aprovechar el material de *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, después de su destilación, tanto en el extracto HA como SFE-CO<sub>2</sub>, ya que existen compuestos de interés que pueden ser aislados. Es la primera vez que se reporta el aislamiento de la pinocembrina y la galangina por Prep/HPLC en fase reversa. La **Tabla 16** resume los compuestos obtenidos en las fracciones recolectadas por Prep/HPLC.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 24**

*Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de L. organoides quimiotipo felandreno. Columna Shim-Pack GIST C<sub>18</sub>.*



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 15**

*Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto obtenido con fluido supercrítico de L. origanoides quimiotipo felandreno. Se inyectaron 200 mg de muestra.*

N°	Intervalo de tiempo, min	Fracciones, mg
I	24.1-26.4	14.0
II	26.6-28.7	3.9
III	29.0-37.9	24.3
-	Pérdidas*	5.5
<b>Total</b>		<b>47.7</b>
-	Residuos**	32.6
-	Lavado***	248.3

\*Recolección de la línea base durante el fraccionamiento.

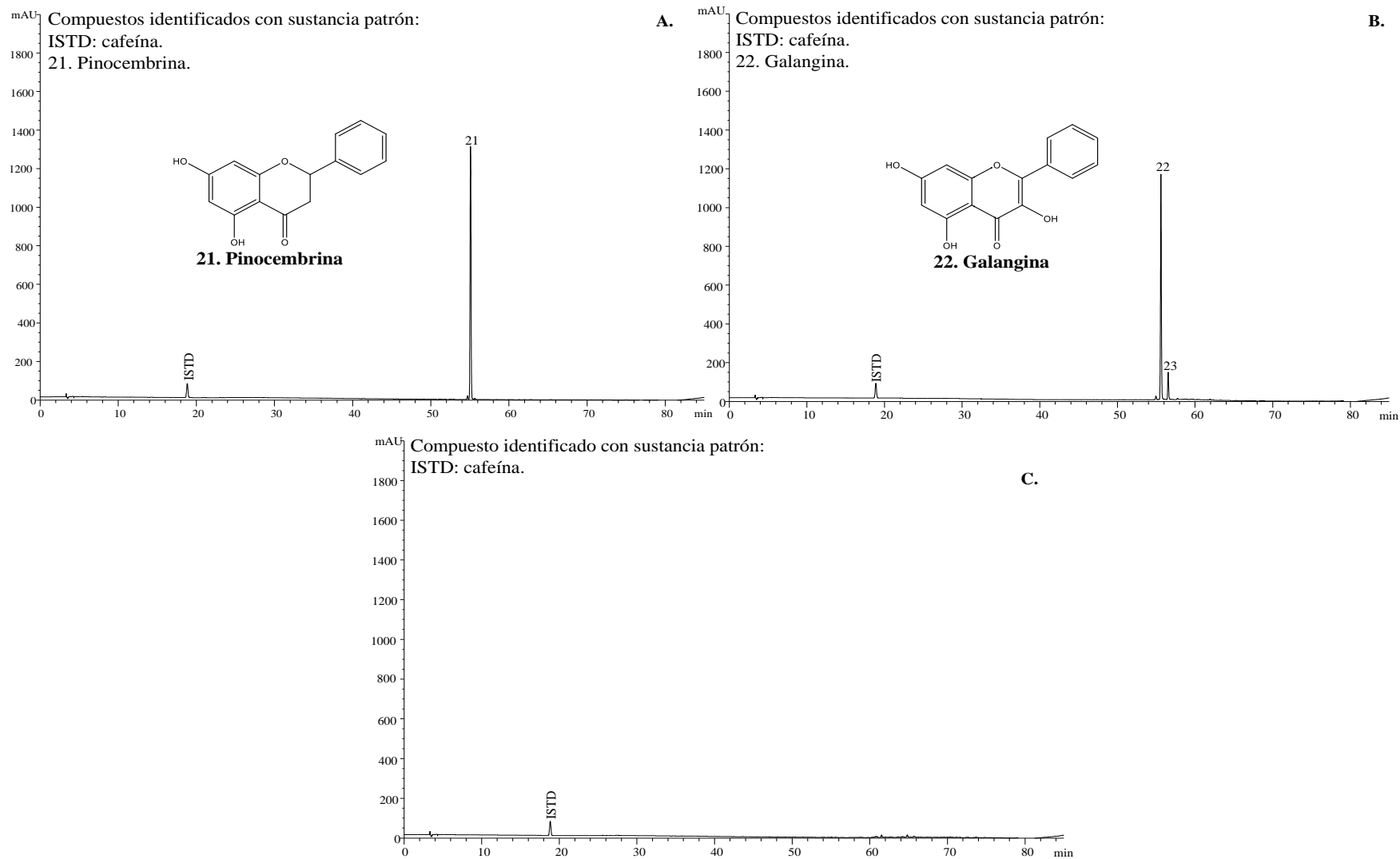
\*\* Residuo del extracto obtenido por centrifugación durante la preparación de la muestra (400 mg).

\*\*\*Residuo obtenido del extracto después de desengrasar con *n*-hexano.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 25**

Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de *L. origanoides* quimiotipo *felandreno*. **A.** Fracción I; **B.** Fracción II; **C.** Fracción III. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.



FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 16**

Resumen de los compuestos detectados por HPLC/DAD en las fracciones obtenidas de los extractos de *L. origanoides* quimiotipo *felandreno*.

N°	Compuesto	t <sub>R</sub> , min	Fracciones															
			A <sub>i</sub> /A <sub>ISTD</sub>															
			1		2		3		4		5		6		7		8	
HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE			
1	Derivado de flavona <sup>b</sup>	18.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2	Derivado de flavona <sup>b</sup>	32.9	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
3	Eriodictiol-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>	33.4	-	-	3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
4	Taxifolina <sup>a</sup>	34.0	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-		
5	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	34.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	34.7	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7	Der. Ácido hidroxincinámico <sup>b</sup>	35.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
8	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>	35.8	-	-	-	-	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>	36.1	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
10	Apigenina-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>	38.6	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-		
11	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	39.1	-	-	-	-	-	-	1.6	-	-	-	-	-	-	-		
12	Apigenina-3- <i>O</i> -glucorónido <sup>a</sup>	39.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
13	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	40.8	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-		
14	Derivado de flavona <sup>b</sup>	41.9	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-		
15	Eriodictiol <sup>a</sup>	42.9	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-	-		
16	Quercetina <sup>a</sup>	44.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-		
17	Luteolina <sup>a</sup>	44.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	-	-	-		
18	Naringenina <sup>a</sup>	47.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-		
19	Derivado de flavona <sup>b</sup>	48.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
20	Derivado de flavona <sup>b</sup>	52.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
21	Pinocembrina <sup>a</sup>	55.1	-	13.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.1	-		
22	Galangina <sup>a</sup>	55.6	-	-	-	10.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.1		
23	Derivado de flavona <sup>b</sup>	56.6	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.6		

<sup>a</sup> Identificación confirmatoria basada en el espectro UV-Vis y por comparación con el espectro UV-Vis y t<sub>R</sub> (min) de sustancias patrón.

<sup>b</sup> Compuestos identificados tentativamente por comparación de los espectros UV-Vis reportados en la librería espectral.

A<sub>i</sub>/A<sub>ISTD</sub>: área del compuesto/área del estándar interno (cafeína, 100 mg/L). HA: extracto hidroalcohólico. SFE: extracto obtenido con fluido supercrítico.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

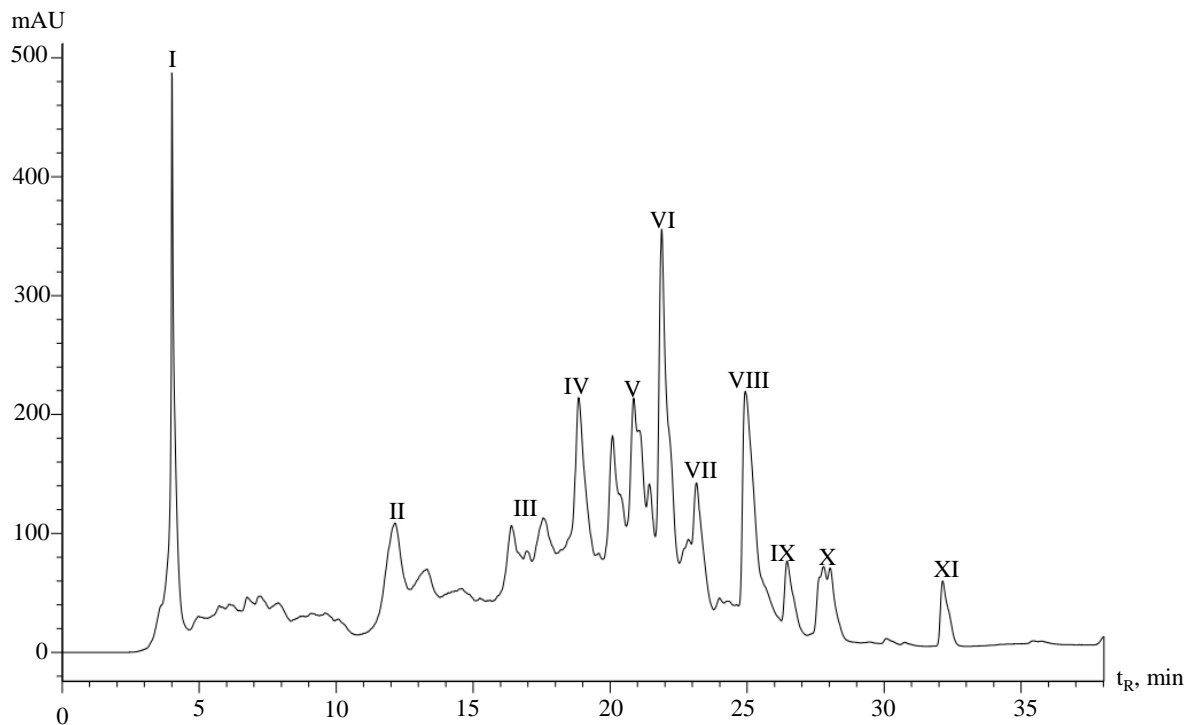
El perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD del extracto HA de *T. diffusa*, de material vegetal después de su destilación se mostró en la **Figura 16 B**. Este extracto posee una composición química compleja, la mayoría de los compuestos eluyeron entre el intervalo de  $t_R$  de 38 min a 56 min. El perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC en la **Figura 26**, mostró que el gradiente de elución programado no resolvió la mayoría de los compuestos, por lo que se observaron picos coeluidos. La **Tabla 17** muestra los intervalos de tiempo de retención usados y las fracciones recolectadas. Se obtuvieron 11 fracciones. De la fracción I se recolectaron 43.0 mg que corresponde al 22% p/p de la muestra. Esta fracción corresponde a los compuestos no retenidos por la columna. Se obtuvieron 94.6 mg de las fracciones colectadas en una inyección de 200 mg de muestra.

La caracterización química de las fracciones por HPLC/DAD corrobora la coelución de los compuestos. La apigenina se detectó en las fracciones VI, VII y VIII. Las **Figuras 29 B y C** muestran que fue posible aislar la acetina y un derivado de flavona, respectivamente. Mediante UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS fue posible identificar los picos 17 (fracción VI) y 29 (fracción XI) que corresponden a la hechinacina y la acetina metilada, respectivamente.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 26**

*Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto HA de T. diffusa. Columna Shim-Pack GIST C<sub>18</sub>.*



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 17**

*Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto hidroalcohólico de T. diffusa. Se inyectaron 200 mg de muestra.*

N°	Intervalo de tiempo, min	Fracciones, mg
I	2.50-4.6	43.0
II	11.0-14.0	6.3
III	16.0-18.4	5.4
IV	18.5-19.7	2.8
V	19.8-21.6	5.2
VI	21.8-22.8	2.5
VII	22.9-24.3	2.1
VIII	24.5-25.9	2.0
IX	26.0-27.2	1.3
X	27.3-31.6	3.3
XI	31.7-37.9	2.8
-	Pérdidas*	19.7
<b>Total</b>		<b>96.4</b>
-	Residuo**	161.2

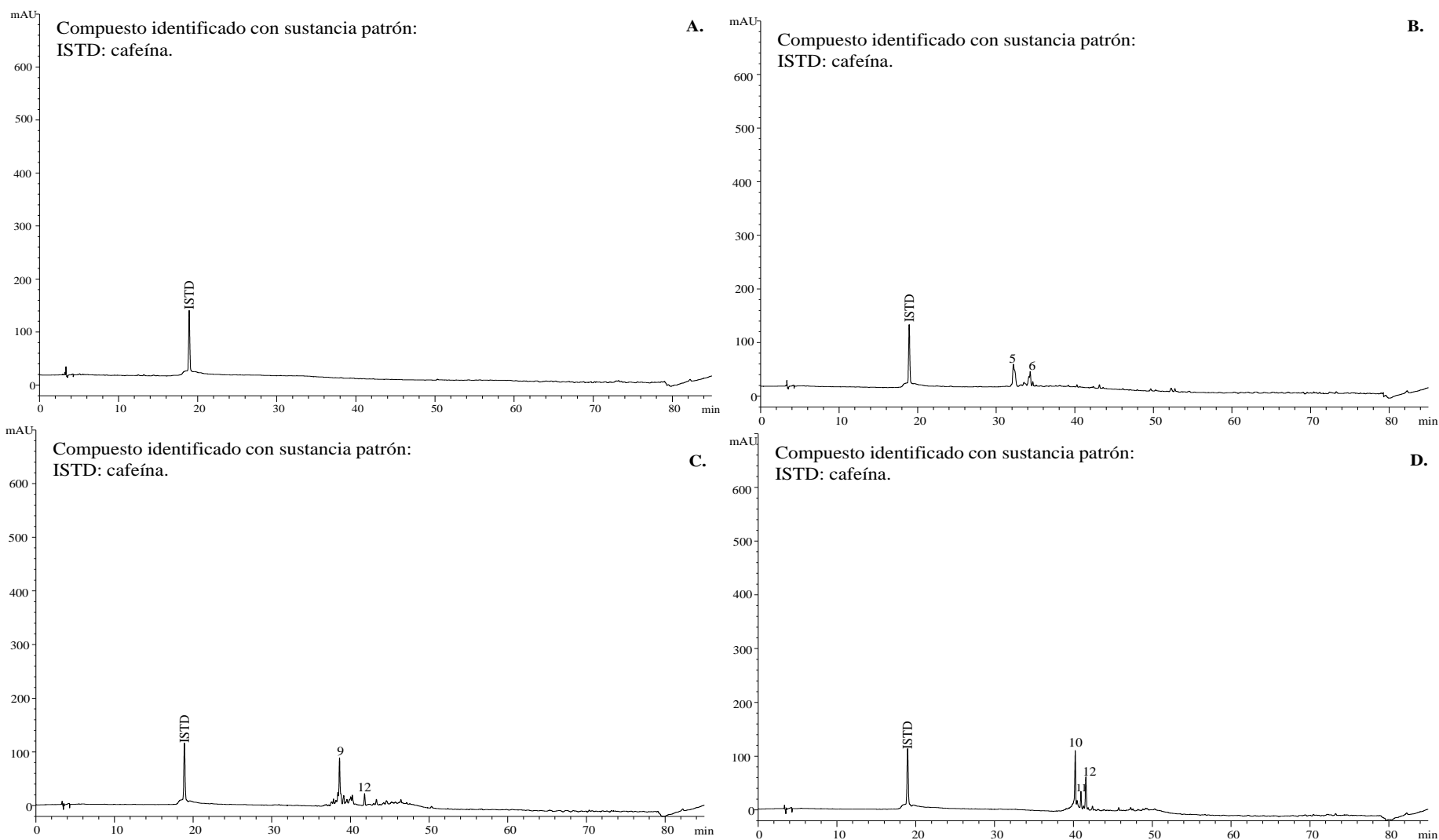
\*Recolección de la línea base durante el fraccionamiento del extracto.

\*\* Residuo del extracto obtenido por centrifugación durante la preparación de la muestra (400 mg).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 27

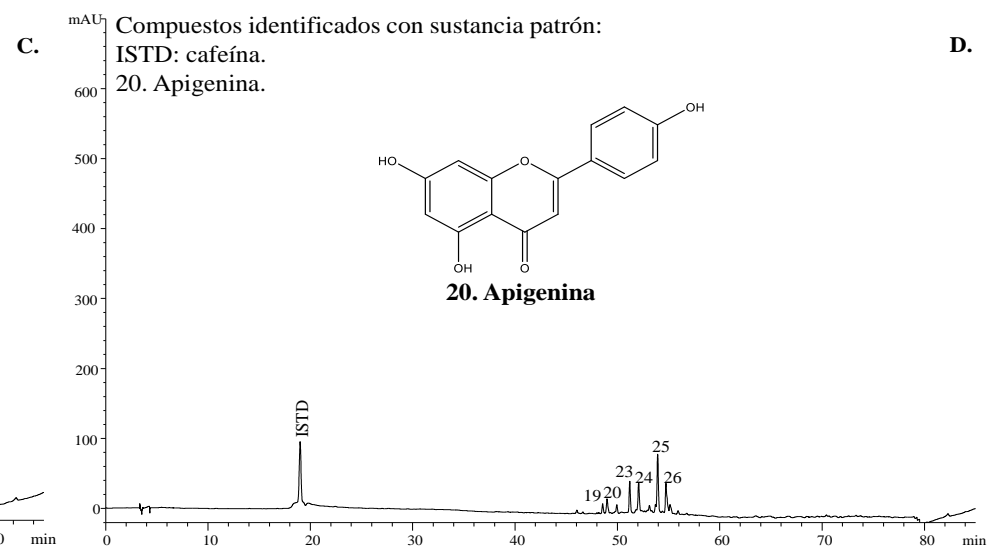
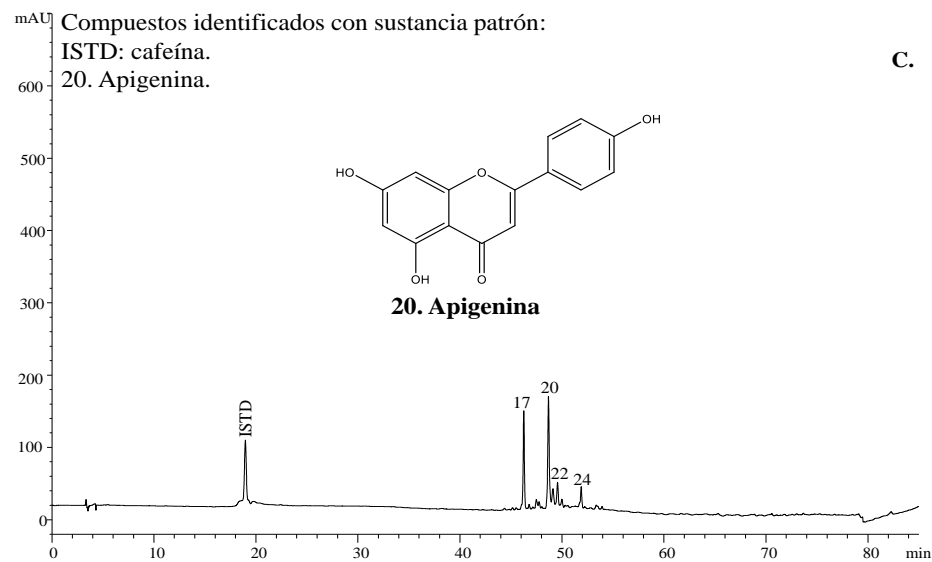
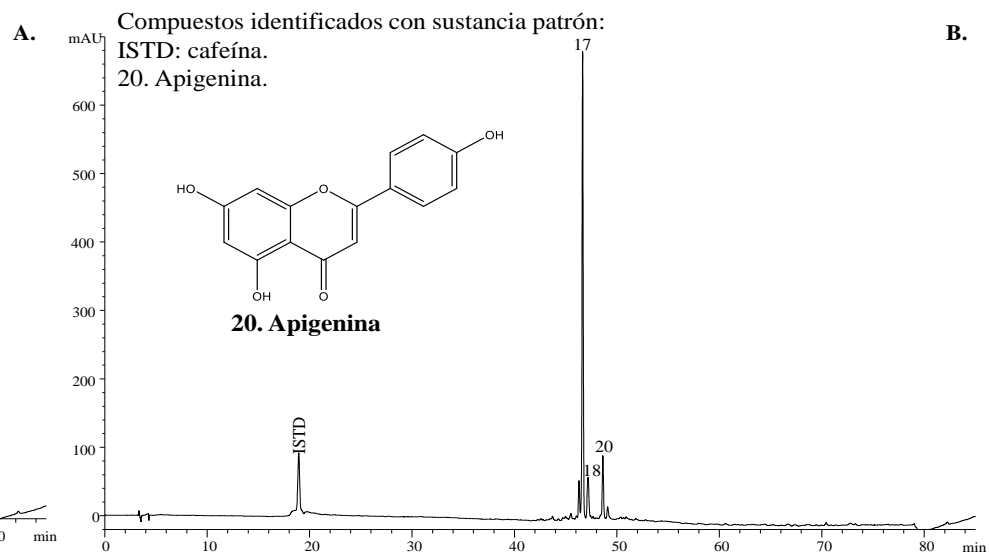
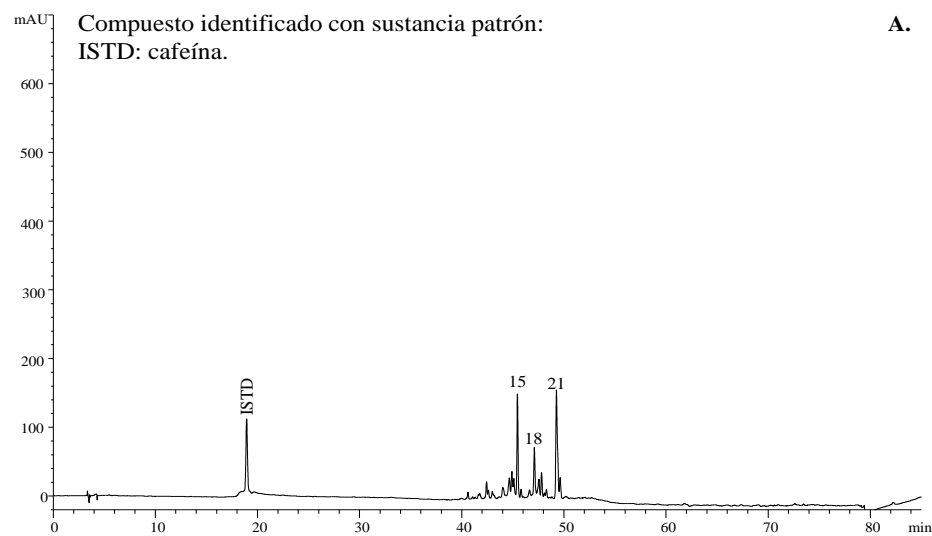
Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de *T. diffusa*. **A.** Fracción I; **B.** Fracción II; **C.** Fracción III; **D.** Fracción IV. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 28

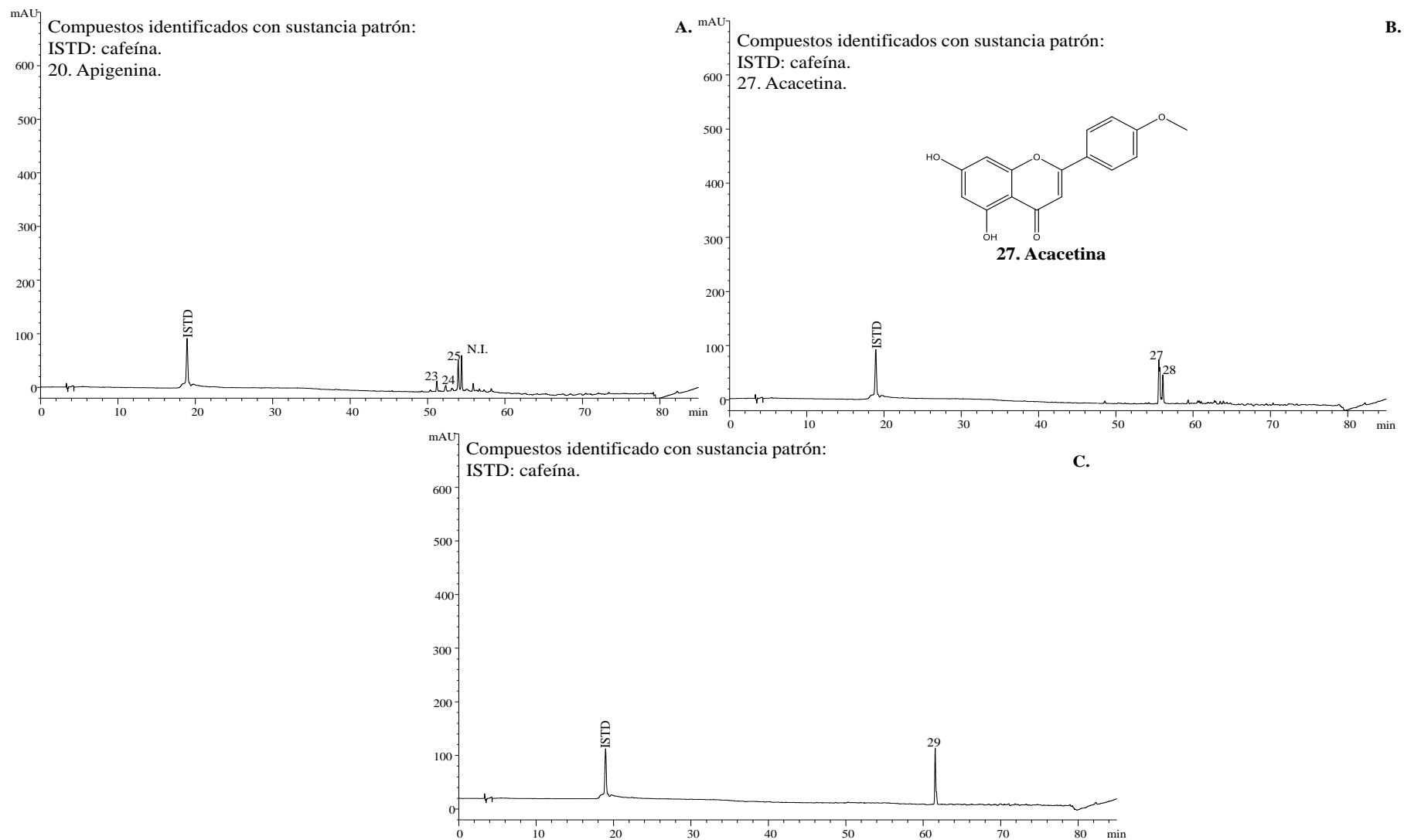
Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de *T. diffusa*. **A.** Fracción V; **B.** Fracción VI; **C.** Fracción VII; **D.** Fracción VIII. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 29

Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de *T. diffusa*. **A.** Fracción IX; **B.** Fracción X; **C.** Fracción XI. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

La **Figura 30** muestra el perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de *T. diffusa*, de material vegetal después de su destilación. Se observaron seis picos cromatográficos, siendo el pico V el de mayor abundancia. La **Tabla 18** muestra el peso de las fracciones obtenidas. Se obtuvieron 22.8 mg de las fracciones colectadas en una inyección de 200 mg de muestra. La fracción VII tuvo la mayor masa, en comparación, con las demás fracciones.

Las **Figuras 29 y 30** muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones recolectadas. La caracterización química por HPLC/DAD no detectó ningún compuesto en la fracción VII (Véase **Figura 32 C**). En las fracciones I y II se aislaron un compuesto no identificado y un derivado de flavonol, respectivamente. Mediante UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS fue posible identificar la presencia de la acacetina metilada en la fracción VI (pico 29). Es la primera vez que se reporta el aislamiento de la acacetina metilada por Prep/HPLC en fase reversa, en especies del género *Turnera*. La acacetina metilada, aún no se comercializa como sustancia de referencia, por lo que es posible a futuro, obtener un beneficio económico a partir del aislamiento de este compuesto.

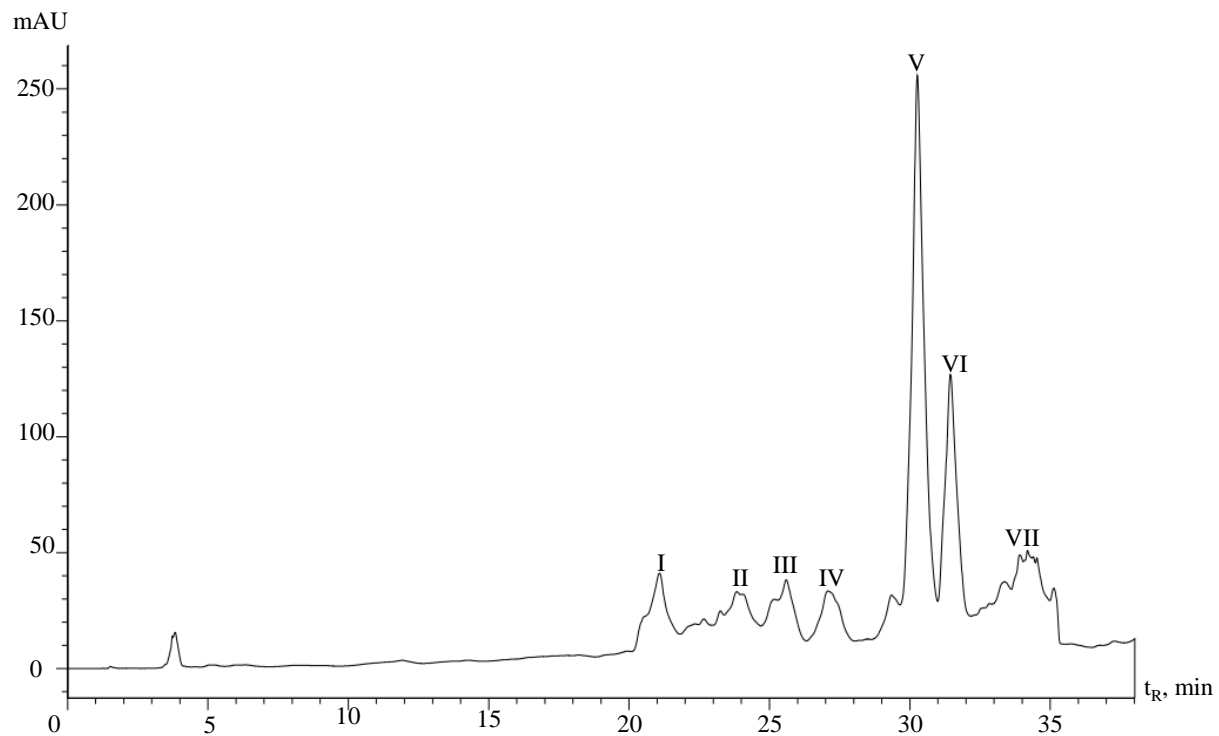
La **Tabla 19** resume los compuestos obtenidos en las fracciones recolectadas por Prep/HPLC, de los extractos bajo estudio de *T. diffusa*.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 30**

*Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de T. diffusa. Columna*

*Shim-Pack GIST C<sub>18</sub>.*



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 18**

*Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto obtenido con fluido supercrítico de T. diffusa, de material vegetal después de su destilación. Se inyectaron 200 mg de muestra.*

N°	Intervalo de tiempo, min	Fracciones, mg
I	17.5-20.3	1.3
II	20.4-23.1	1.7
III	23.25-24.9	0.8
IV	25.2-27.5	2.2
V	28.5-30.8	2.8
VI	31.0-32.4	1.3
VII	33.0-37.9	5.2
-	Pérdidas*	7.5
<b>Total</b>		<b>22.8</b>
-	Residuos**	32.3
-	Lavado***	293.5

\*Recolección de la línea base durante el fraccionamiento del extracto.

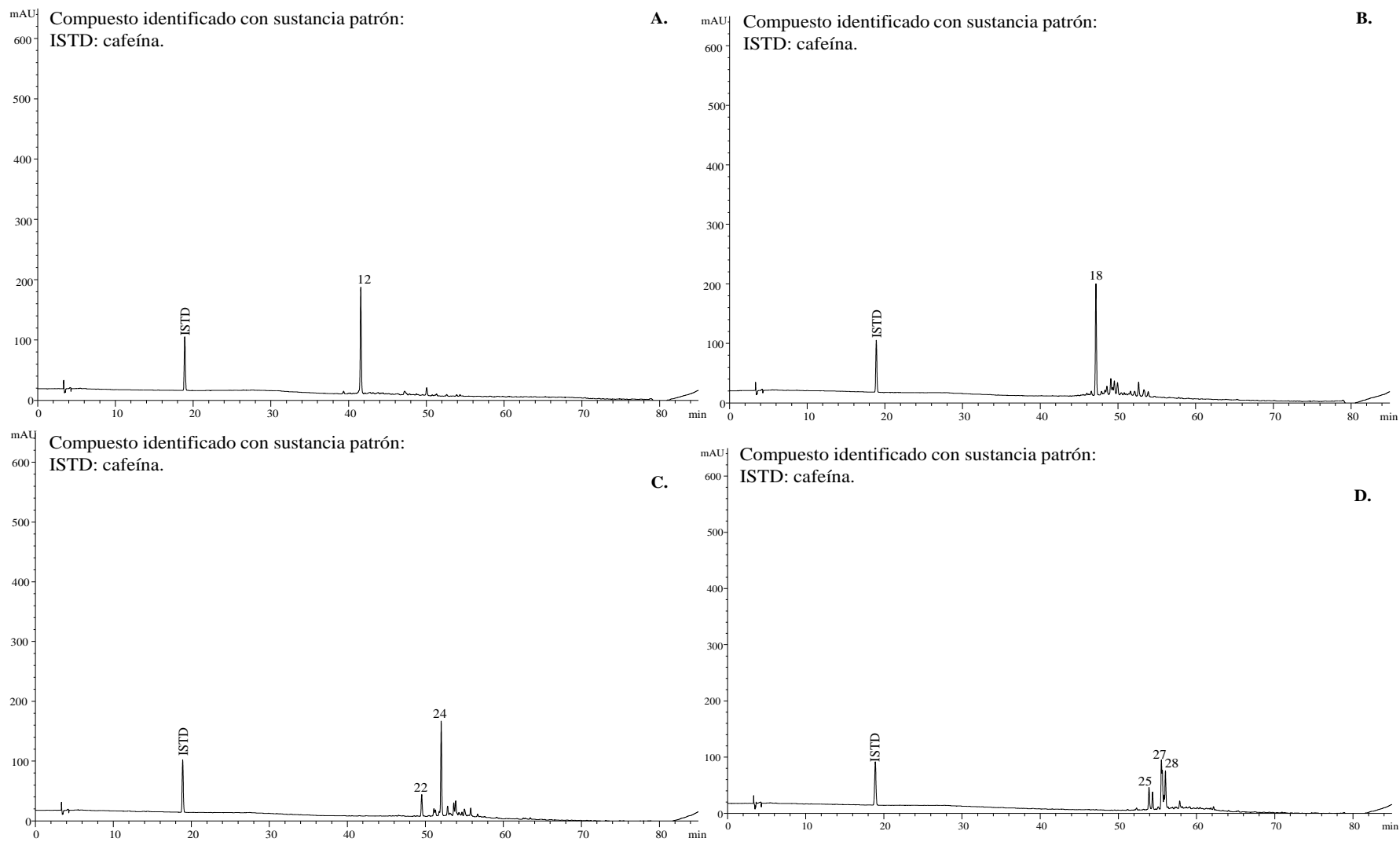
\*\* Residuo del extracto obtenido por centrifugación durante la preparación de la muestra (400 mg).

\*\*\*Residuo obtenido del extracto después de desengrasar con *n*-hexano.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 31

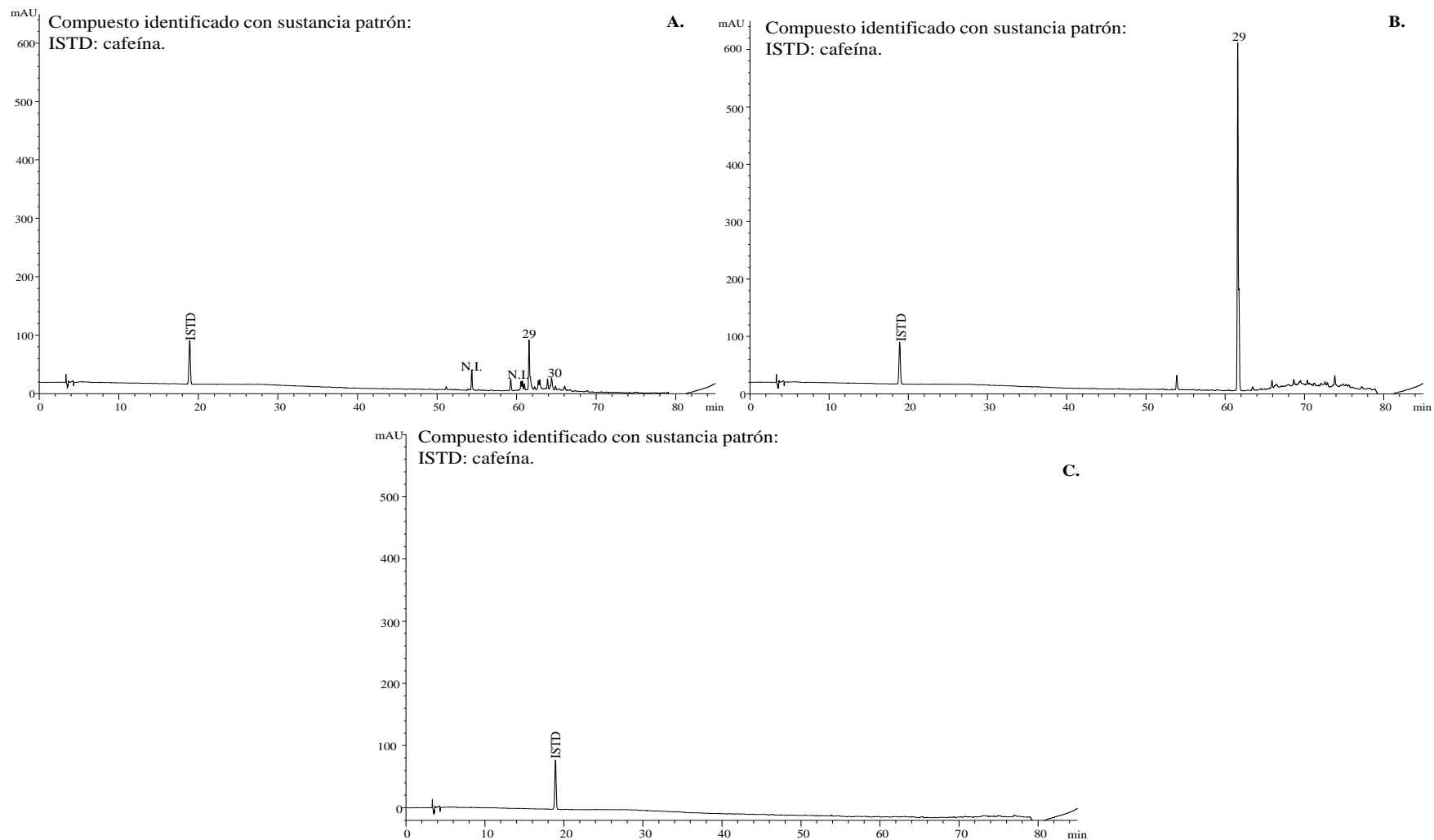
Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de *T. diffusa*. **A.** Fracción I; **B.** Fracción II; **C.** Fracción III; **D.** Fracción IV. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 32

Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de *T. diffusa*. **A.** Fracción V; **B.** Fracción VI; **C.** Fracción VII. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.



FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 19**

*Resumen de los compuestos detectados por HPLC/DAD en las fracciones obtenidas de los extractos de T. diffusa.*

N° pico Fig.	Compuesto	t <sub>R</sub> , min	Fracciones																					
			A <sub>I</sub> /A <sub>ISTD</sub>																					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	
1	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	12.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	No identificado	13.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	31.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Derivado de flavona <sup>b</sup>	32.3	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Derivado de flavona <sup>b</sup>	34.1	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	34.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	No identificado	36.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Apigenina-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>	38.6	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Derivado de flavona <sup>b</sup>	40.2	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	40.9	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	No identificado	41.6	-	2.0	-	-	0.2	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Derivado de flavona <sup>b</sup>	42.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Derivado de flavona <sup>b</sup>	43.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Derivado de flavona <sup>b</sup>	45.3	-	-	-	-	-	-	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	46.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Derivado de flavona <sup>b</sup>	46.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.7	-	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	47.0	-	-	-	2.1	-	-	-	0.5	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 18**

*Continuación.*

19	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	47,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Apigenina <sup>a</sup>	48.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	1.2	-	0.1	-	-	-	-	-	-
21	Derivado de flavona <sup>b</sup>	49.1	-	-	-	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-
22	Der. Ácido hidroxicinámico <sup>b</sup>	49.6	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-
23	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	51.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	0.1	-	-	-	-
24	Der. Ácido hidroxicinámico <sup>b</sup>	52.0	-	-	-	-	1.7	-	-	-	-	-	-	0.3	-	0.3	-	0.1	-	-	-
25	No identificado	53.9	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	0.6	-	0.4	-	-	-	-
26	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	55.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-
27	Acacetina <sup>a</sup>	55.4	-	-	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-
28	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	56.0	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-
29	Derivado de flavona <sup>b</sup>	61.5	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-	7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7
30	No identificado	63.5	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Identificación confirmatoria basada en el espectro UV-Vis y por comparación con el espectro UV-Vis y t<sub>R</sub> (min) de sustancias patrón.

<sup>b</sup> Compuestos identificados tentativamente por comparación de los espectros UV-Vis reportados en la librería espectral.

A<sub>I</sub>/A<sub>ISTD</sub>: área del compuesto/área del estándar interno (ISTD: cafeína, 100 mg/L). HA: extracto hidroalcohólico. SFE: extracto obtenido con fluido supercrítico.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

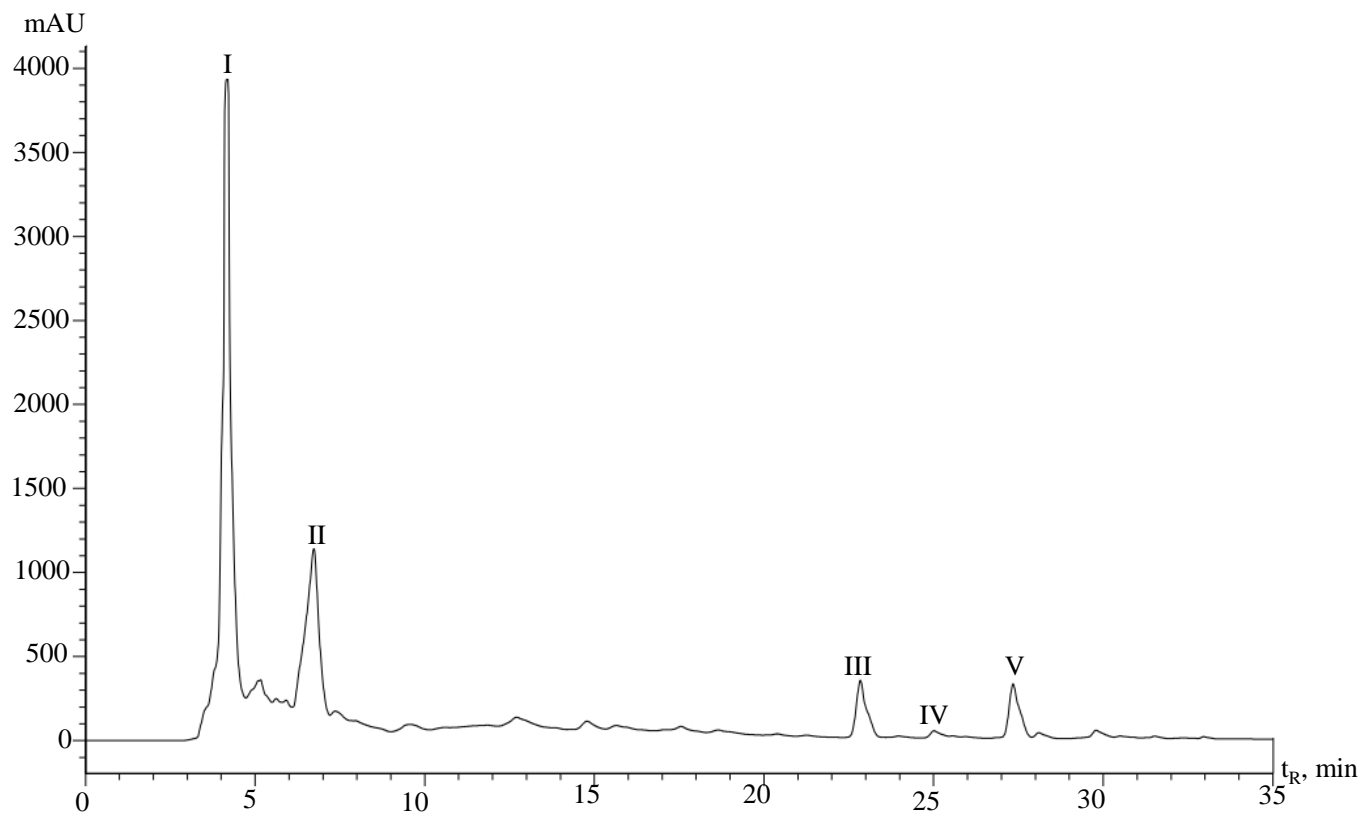
La **Figura 33** muestra el perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto HA de *V. curassavica*, de material vegetal después de su destilación. Se observó que es un extracto de baja complejidad en su composición química. Se distinguen cinco picos cromatográficos La **Tabla 20** muestra el peso y los intervalos de tiempo de recolección de las fracciones de interés. La fracción I tuvo un peso 90.1 mg, es decir, el 45% p/p de la muestra, que corresponde a los compuestos no retenidos por la columna. Se recolectaron 139.6 mg de una inyección de 200 mg de muestra.

La caracterización química por HPLC/DAD de la fracción I no detectó ningún compuesto de interés. Se observó que fue posible aislar compuestos como el ácido rosmarínico (fracción II), un derivado de flavonol (fracción III), un derivado de flavona (fracción IV) y la artemetina (fracción V) (Véanse **Figuras 34** y **35**). Mediante UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS, se identificó el pico 15 (fracción III) como la hidrox-artemetina (Véase **Figura 34 C**).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 33**

*Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto HA de V. curassavica. Columna Shim-Pack GIST C<sub>18</sub>.*



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 20**

*Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto hidroalcohólico de V. curassavica. Se inyectaron 200 mg de muestra.*

N°	Intervalo de tiempo, min	Fracciones, mg
I	3.0-5.9	90.1
II	6.0-7.6	8.8
III	22.5-24.7	3.3
IV	24.8-26.9	2.0
V	27.0-28.1	3.5
-	Pérdidas*	31.9
<b>Total</b>		<b>139.6</b>
-	Residuos**	97.4

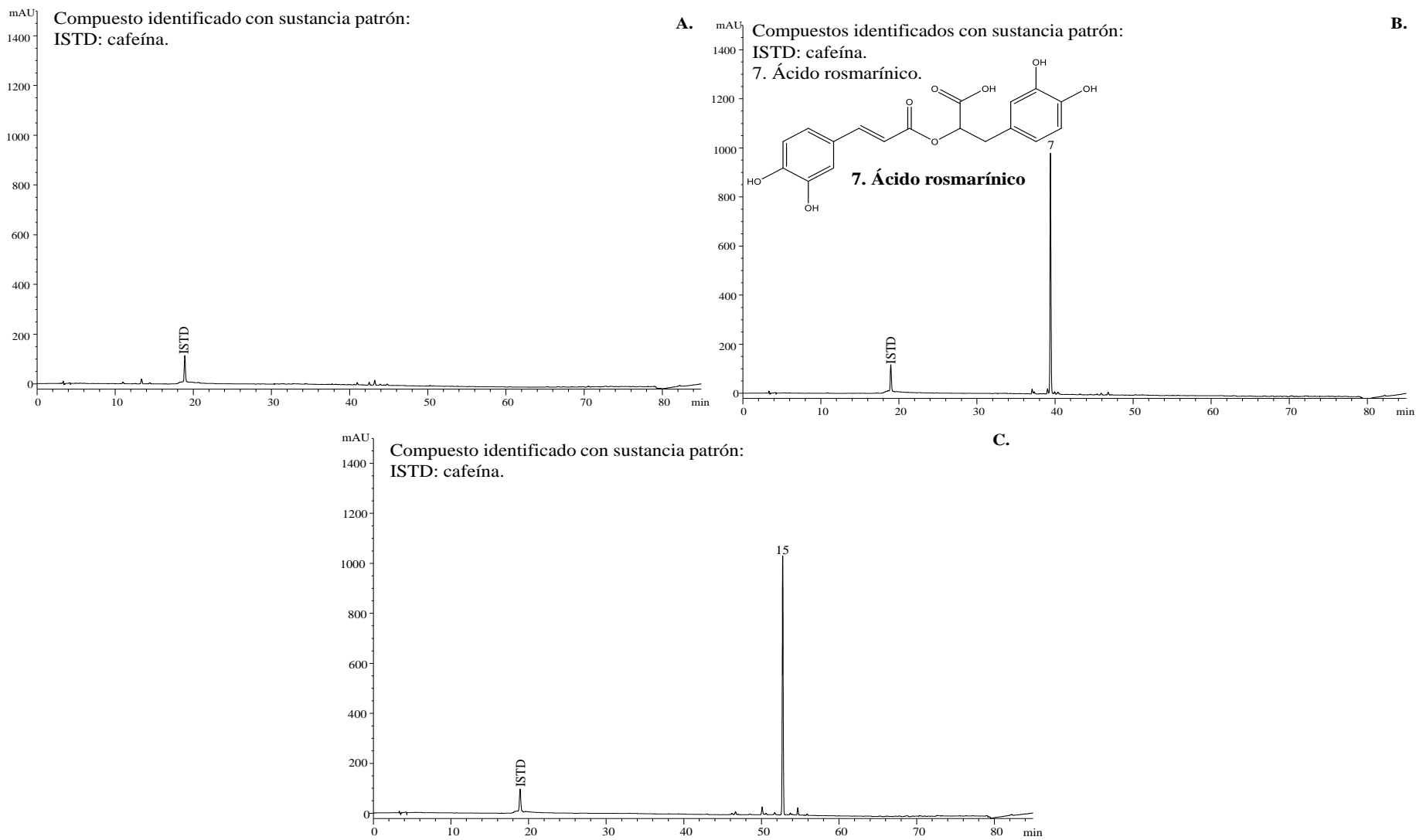
\*Recolección de la línea base durante el fraccionamiento del extracto.

\*\* Residuo del extracto obtenido por centrifugación durante la preparación de la muestra (400 mg).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 34

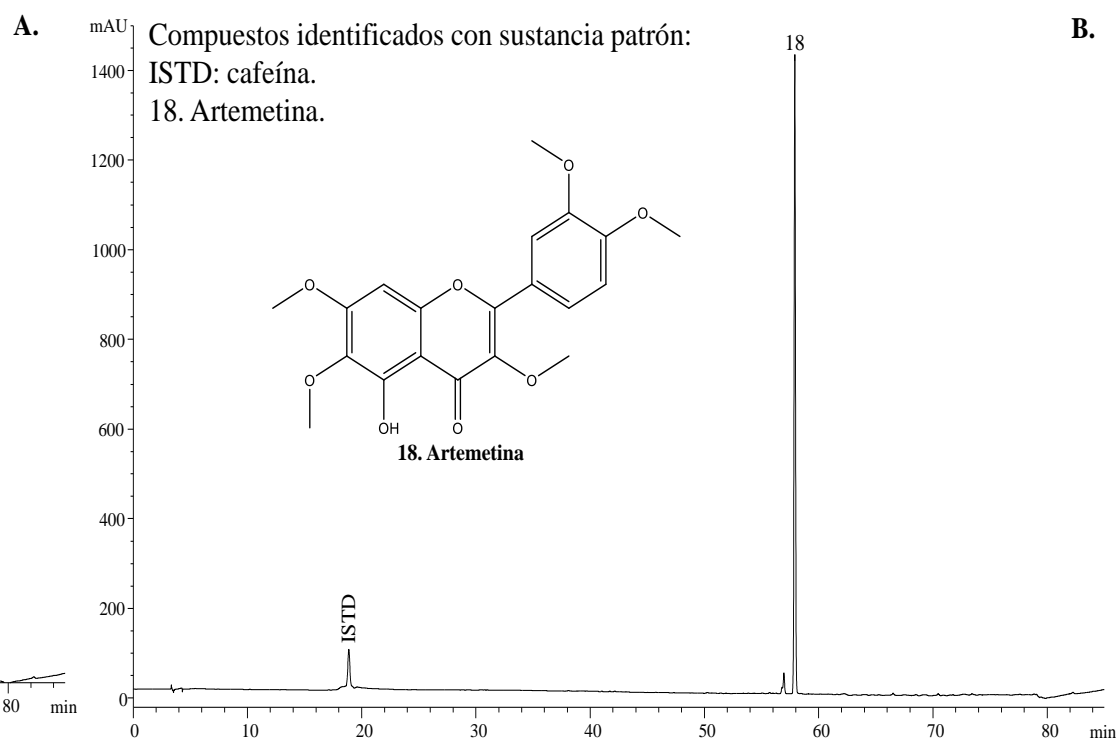
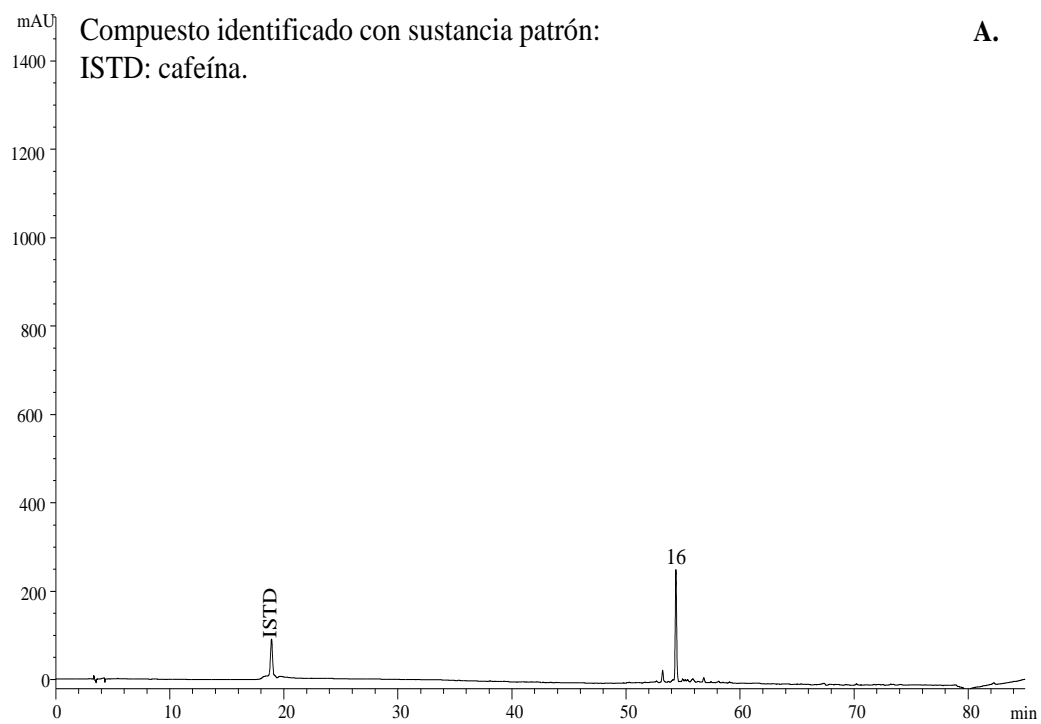
Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de *V. curassavica*. **A.** Fracción I; **B.** Fracción II; **C.** Fracción III. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 35**

Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto HA de *V. curassavica*. **A.** Fracción IV; **B.** Fracción V. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

La **Figura 36** muestra el perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de *V. curassavica*, de material vegetal después de su destilación. Se detectaron cuatro picos cromatográficos. La **Tabla 21** muestra los pesos de las fracciones recolectadas. Se obtuvieron pesos de 6.5 mg y 4.7 mg de las fracciones I y III, respectivamente. Estos valores fueron mayores, en comparación, con las fracciones II y IV. Se obtuvieron 36.5 mg de las fracciones colectadas en una inyección de 200 mg de muestra.

La caracterización química por HPLC/DAD de la fracción I mostró que el pico 7 corresponde al ácido rosmarínico, sin embargo, posee baja absorbancia en comparación con los cromatogramas obtenidos para las fracciones II y III (Véase **Figura 37 A, B y C**). La fracción IV corresponde al aislamiento de la artemetina, de la cual se aislaron 2.2 mg de compuesto, es decir, que se pueden aislar 10.5 mg de compuesto, valor cercano al cuantificado por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS (Véase **Tabla 12**). Mediante UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS se determinó que las fracciones II y IV correspondieron a la hidroxiartemetina (pico 15) y la retusina (pico 19), respectivamente (Véase **Figura 34 B y D**).

Existen diversos estudios sobre los beneficios farmacológicos de la artemetina, donde se destacan sus efectos citotóxicos en células cancerosas (Rosa *et al.*, 2022), antiedematogénicos (Bayeux *et al.*, 2002), anti-inflamatorios (Sertié *et al.*, 1990), vasoconstrictores y vasodilatadores (de Souza *et al.*, 2011), propiedades que convierten a esta molécula de interés para su aislamiento. En extractos HA y SFE-CO<sub>2</sub> de *V. curassavica*, de material vegetal después de su destilación, se aislaron 3.5 mg y 4.7 mg de artemetina, es decir, es posible obtener 17.5 de artemetina/g extracto y 23.5 de artemetina/g extracto, respectivamente. Al 2023, en la distribuidora comercial Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), 10 mg de artemetina (pureza > 98%), posee un valor de 525.7 USD.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

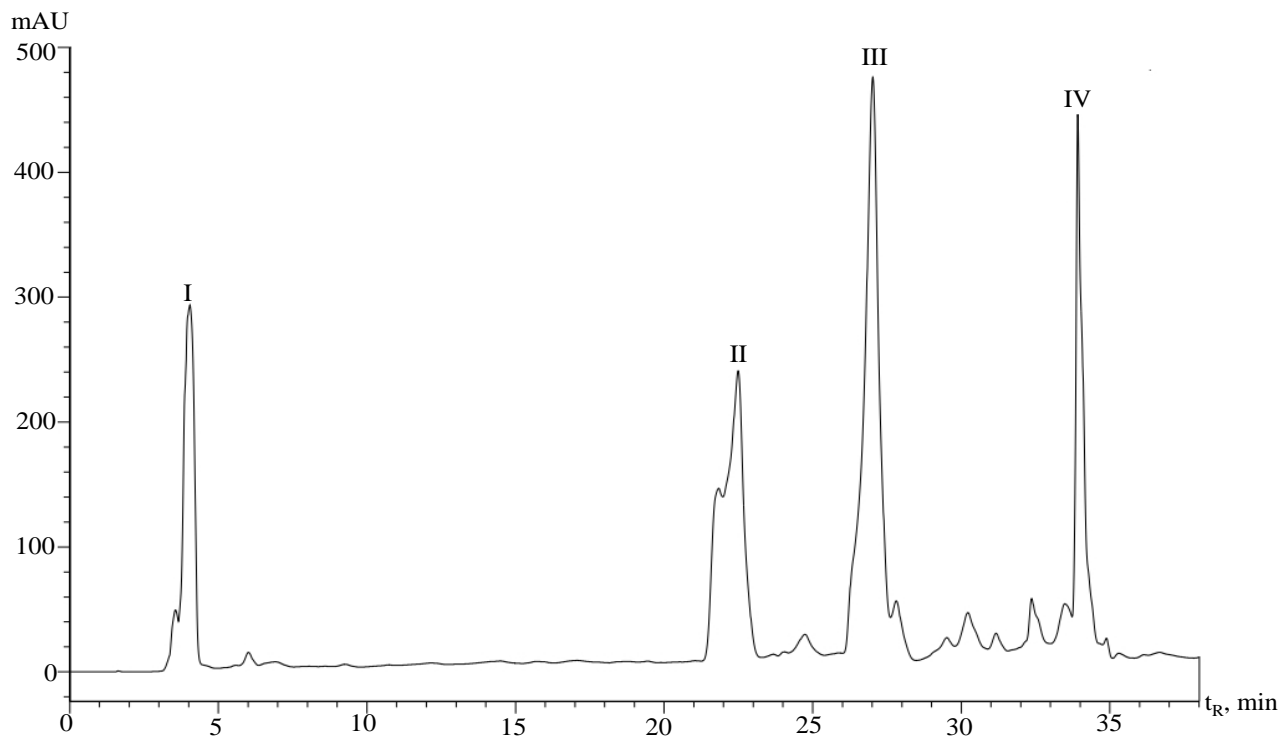
En *Phytolab GmbH* (Vestenbergsgreuth, Baviera, Alemania), 10 mg de artemetina (pureza > 98%) posee un valor de 232.5 USD. Es posible obtener un beneficio económico, a partir del material vegetal después de su destilación. La hidroxi-artemetina aún no se comercializa como sustancia patrón.

Es posible aprovechar el material de *V. curassavica*, después de su destilación, ya que en el extracto HA como en el extracto SFE-CO<sub>2</sub>, existen compuestos de interés que pueden ser aislados. Es la primera vez que se reporta el aislamiento de la hidroxi-artemetina y artemetina por Prep/HPLC en fase reversa. La **Tabla 22** resume los compuestos obtenidos en las fracciones recolectadas por Prep/HPLC, de los extractos bajo estudio de *V. curassavica*.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 36**

*Perfil cromatográfico obtenido por Prep/HPLC del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de V. curassavica. Columna Shim-Pack GIST C<sub>18</sub>.*



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 21**

*Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC del extracto obtenido con fluido supercrítico de V. curassavica. Se inyectaron 200 mg de muestra.*

N°	Intervalo de tiempo, min	Fracciones, mg
I	3.0-5.0	6.5
II	31.3-24.0	4.1
III	26.0-27.9	4.7
IV	33.0-36.0	2.2
-	Pérdidas*	19.0
<b>Total</b>		<b>36.5</b>
-	Residuos**	76.6
-	Lavado***	235.7

\*Recolección de la línea base durante el fraccionamiento del extracto.

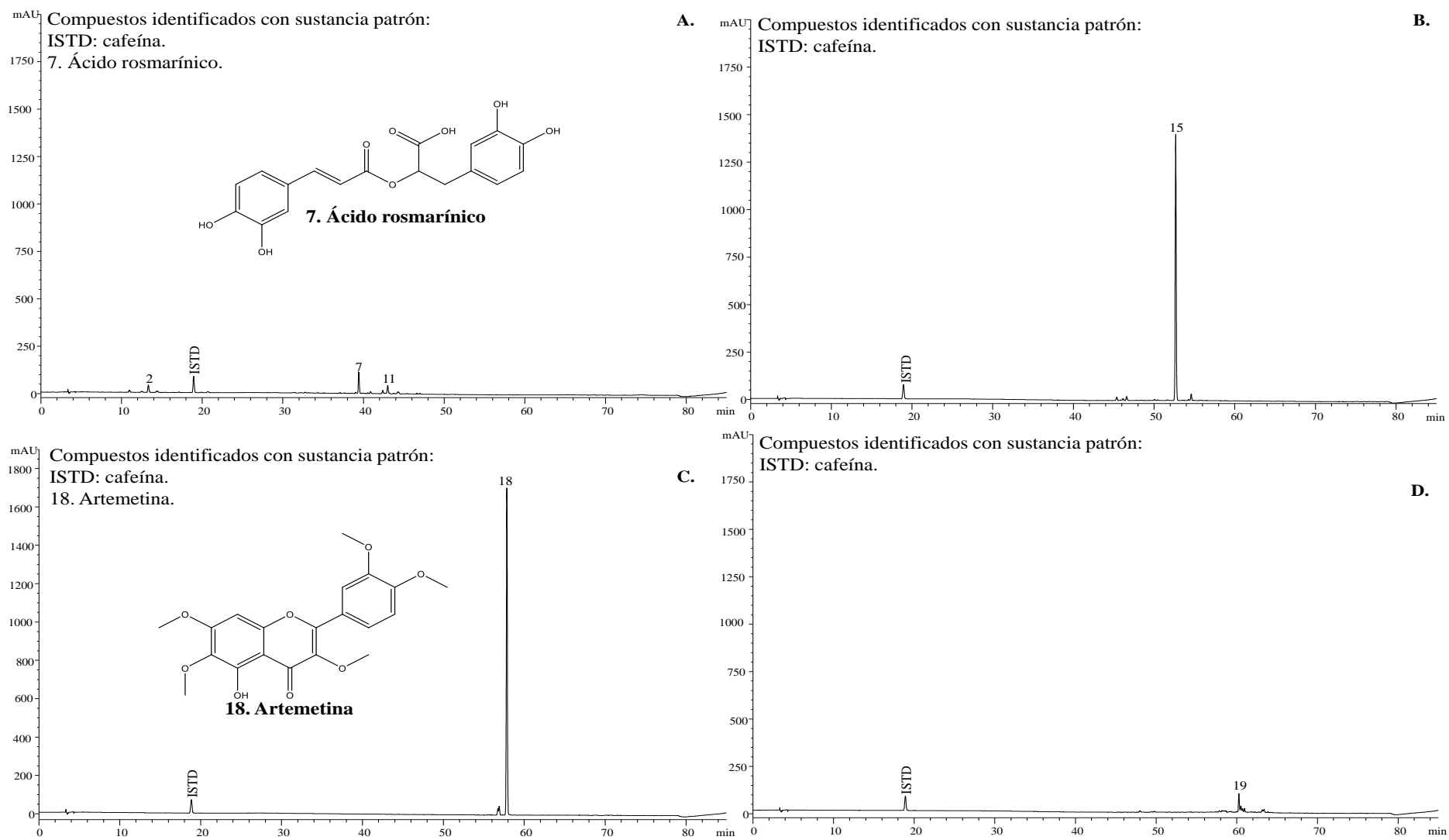
\*\* Residuo del extracto obtenido por centrifugación durante la preparación de la muestra (400 mg).

\*\*\*Residuo obtenido del extracto después de desengrasar con *n*-hexano.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Figura 37**

Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones del extracto SFE-CO<sub>2</sub> de *V. curassavica*. **A.** Fracción I; **B.** Fracción II; **C.** Fracción III; **D.** Fracción IV. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.



FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Tabla 22**

*Resumen de los compuestos detectados por HPLC/DAD en las fracciones obtenidas de los extractos de V. curassavica, de material vegetal después de su destilación.*

N° pico Fig.	Compuesto	t <sub>R</sub> , min	Fracciones										
			A <sub>I</sub> /A <sub>ISTD</sub>										
			1		2		3		4		5		
			HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	HA	SFE	
1	Derivado de flavanono <sup>b</sup>	10.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Der. Ácido hidroxicinámico <sup>b</sup>	13.3	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Derivado de flavona <sup>b</sup>	31.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Rutina <sup>a</sup>	35.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Derivado de flavono <sup>b</sup>	35.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Kaempferol-3- <i>O</i> -galactósido <sup>a</sup>	37.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Ácido rosmarínico <sup>a</sup>	39.3	-	1.1	6.8	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Der. Ácido hidroxicinámico <sup>b</sup>	40.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Derivado de flavona <sup>b</sup>	41.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Derivado de flavona <sup>b</sup>	42.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	43.1	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	44.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	No identificado	45.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	No identificado	46.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Derivado de flavono <sup>b</sup>	52.6	-	-	-	13.6	6.0	-	-	-	-	-	-
16	Derivado de flavona <sup>b</sup>	54.2	-	-	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-
17	Pachipodol <sup>a</sup>	56.8	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-
18	Artemetina <sup>a</sup>	57.8	-	-	-	-	16.9	-	-	8.1	-	-	-
19	No identificado	60.5	-	-	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-
20	No identificado	63.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	No identificado	72.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Identificación confirmatoria basada en el espectro UV-Vis y por comparación con el espectro UV-Vis y t<sub>R</sub> (min) de sustancias patrón.

<sup>b</sup> Compuestos identificados tentativamente por comparación de los espectros UV-Vis reportados en la librería espectral.

A<sub>I</sub>/A<sub>ISTD</sub>: área del compuesto/área del estándar interno (cafeína, 100 mg/L). HA: extracto hidroalcohólico. SFE: extracto obtenido con fluido supercrítico.

### **4.3.4 Sistema de reciclaje de disolvente para la separación de compuestos presentes en la fracción II obtenida del extracto hidroalcohólico de *L. origanoides***

Debido a la complejidad en la composición química de los extractos vegetales, normalmente se recomienda realizar un pre-fraccionamiento por cromatografía en columna en fase normal, y posteriormente, purificar por Prep/HPLC con una columna en fase reversa. La separación "ortogonal" en las columnas permite separar componentes de una muestra muy compleja, en fracciones más fáciles de purificar (Pellett *et al.*, 2006), sin embargo, el cromatógrafo líquido preparativo puede separar sustancias que se encuentran en una fracción mediante ciclo cerrado de reciclaje de disolvente. Bajo esta metodología el Prep/HPLC funciona en un circuito cerrado que permite el paso de la muestra por la columna  $n$  veces, lo que es equivalente a  $n$  columnas en serie, incrementando los platos teóricos y, por ende, la resolución de los picos (Zhu *et al.*, 2020).

Huang *et al.*, 2019, fraccionaron y purificaron extractos de *Polycarpa maxim* por HSCCC combinada con Prep/HPLC. Los autores afirman que la purificación de isómeros es a menudo difícil debido a que poseen pesos molares, estructuras y polaridades similares, entre otras características químicas y físicas estrechamente relacionadas. Los autores emplearon un régimen isocrático de metanol-agua al 45% v/v y 50% v/v para separar la fracción I y la fracción II, respectivamente.

Para este caso de estudio, el extracto HA de *L. origanoides*, se fraccionó dos veces y se usó el sistema de reciclaje para purificar la fracción II. La fracción II (46.7 mg) se disolvió en 4 mL de fase móvil. Se realizaron diferentes análisis cromatográficos por Prep/HPLC para observar la separación en la columna preparativa durante cada ciclo de reciclaje. El fraccionamiento se realizó con una inyección de 2 mL de muestra con dos

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

ciclos de reciclaje. Se empleó un régimen isocrático metanol-gua 50% v/v, teniendo en cuenta el punto de elución virtual de la fracción II, durante el método cromatográfico usado para el fraccionamiento de los extractos bajo estudio.

La **Figura 38** muestra los perfiles cromatográficos obtenidos por Prep/HPLC de la fracción II del extracto HA de *L. origanoides*, cuando el equipo se encuentra operado en sistema de reciclaje de disolvente. Se realizaron dos ciclos de reciclaje y se detectaron tres picos cromatográficos. En cada ciclo de reciclaje se observa la separación entre los picos detectados. Cabe resaltar, que después del segundo ciclo de reciclaje, el pico III se separa de los picos de menor abundancia, sin embargo, se observó el ensanchamiento de estos, debido al efecto de la difusión longitudinal en el proceso de recirculación, que aumenta la dispersión del soluto a medida que atraviesa la columna cromatográfica (Kostanyan, 2015).

La **Figura 39** muestra el perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD de la fracción II y sus fracciones. Mediante el uso de sustancia patrón, se identificó el eriodictiol-7-*O*-glucósido en la fracción II-2 (Véase **Figura 39 C**). Por otra parte, mediante el estudio del espectro UV-Vis, se identificó un derivado de flavona (pico 2) en la fracción II-1 (Véase **Figura 39 B**). La caracterización química por HPLC/DAD permitió observar que el eriodictiol-7-*O*-glucósido y otros compuestos minoritarios se enriquecieron, ya que sus abundancias relativas aumentaron después del proceso de purificación. Mediante UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS no se identificó el pico 2 de la fracción II-1. La **Tabla 23** muestra los pesos obtenidos. A partir de 23.3 mg de la fracción II, se recolectaron 3.9 (17% p/p) mg de la fracción II-1 y 9.3 (40% p/p) mg de la fracción II-2.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

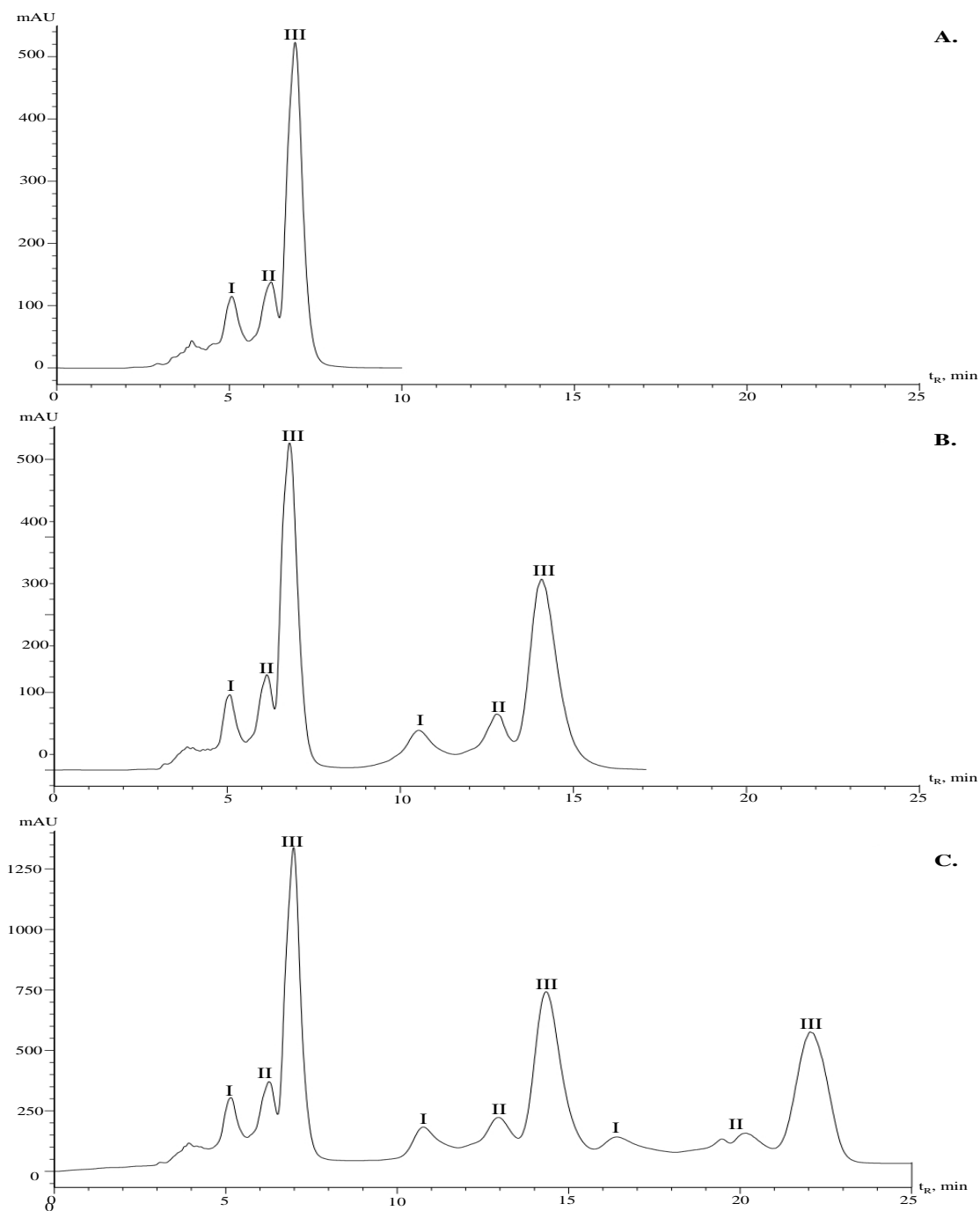
**Tabla 23**

*Fracciones recolectadas mediante Prep/HPLC de la fracción II del extracto hidroalcohólico de L. origanoides. Se inyectaron 23.3 mg de la fracción II.*

<b>N°</b>	<b>Fracción, mg</b>
II-1	3.9
II-2	9.3
<b>Total</b>	<b>13.2</b>

**Figura 38**

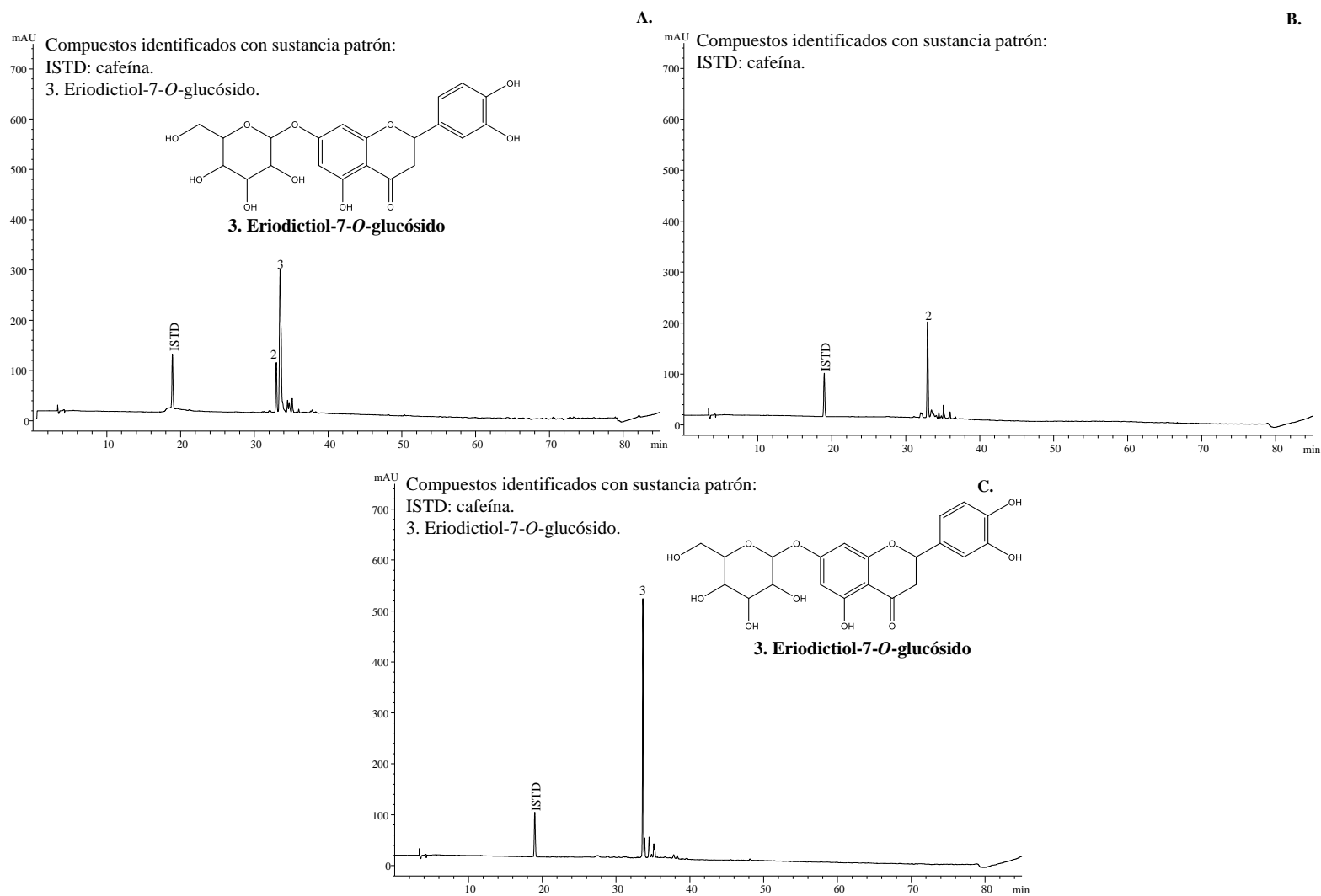
Perfiles cromatográficos obtenidos por Prep/HPLC con el sistema de reciclaje de disolvente, de las fracciones II del extracto HA de *L. origanoides*, obtenido de material vegetal después de su destilación. **A.** Sin ciclo de reciclaje de disolvente; **B.** Un ciclo de reciclaje de disolvente; **C.** Dos ciclos de reciclaje de disolvente. Columna Shim-Pack GIST  $C_{18}$ .



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Figura 39

Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de la fracción II y sus sub-fracciones, obtenidas del extracto HA de *L. origanoides*.  
A. Fracción II; B. fracción II-1; C. fracción II-2. Columna GEMINI C<sub>18</sub>. mAU)



### 5. Conclusiones

Se observó que los extractos bajo estudio obtenidos con disolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico de material vegetal después de su destilación, tuvieron menores rendimientos de extracción, en comparación con los extractos obtenidos de material vegetal antes de su destilación. El proceso de destilación afecta el rendimiento de extracción de compuestos presentes en la matriz vegetal.

Mediante UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS fue posible identificar compuestos presentes en el material vegetal después de su destilación de las plantas bajo estudio. En extractos de *T. diffusa* se identificaron por primera vez la vitexina, la isorhamentina y la isosakuranetina. En extractos de *V. curassavica* se identificaron por primera vez el eriodictiol-7-*O*-glucósido y el kaempferol-3-*O*-galactósido. Es la primera vez que se reporta los espectros de masas de la hidroxí-artemetina, la artemetina, el cordianal C y el cordianal B.

Se determinó que el proceso de destilación afectó la composición química de los extractos bajo estudio. En los extractos HA y SFE-CO<sub>2</sub> de *L. origanoides*, después de la destilación, los compuestos mayoritarios como la pinocembrina y la galangina, disminuyeron su concentración. Por el contrario, en el extracto HA de *V. curassavica*, el ácido rosmarínico, la hidroxí-artemetina y la artemetina, aumentaron su concentración.

Los compuestos cuantificados con la mayor concentración tuvieron como factor común su baja polaridad, por ejemplo, la pinocembrina, la galangina, la artemetina, la

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

hidroxi-artemetina, la acetina metilada, la acetina. Esto se relaciona con la pérdida de compuestos más polares durante la destilación, posiblemente atribuido a la condensación de vapor de agua.

Mediante Prep/HPLC se aislaron compuestos de interés presentes en el extracto HA de *L. origanoides*, de material vegetal después de su destilación. Fue posible aislar la pinocembrina y la galangina, debido a que eluyeron con una concentración de metanol (60% v/v) superior al punto de elución virtual determinado en el método analítico (HPLC/DAD).

Se establecieron parámetros cromatográficos como el flujo de fase móvil, los solventes de fase móvil, el volumen de inyección de la muestra, la concentración de la muestra, entre otros, para el desarrollo del método por Prep/HPLC, con el que se logró el fraccionamiento de los extractos bajo estudio, de material vegetal después de su destilación y, el aislamiento de compuestos como la pinocembrina, la galangina, la artemetina, la hidroxi-artemetina, el ácido rosmarínico y la acetina metilada.

La caracterización química por HPLC/DAD permitió determinar la complejidad en la composición química de los extractos bajo estudio. La mayoría de los compuestos se encontraron en rangos de  $t_R$  de 30 min a 50 min. Mediante esta técnica, fue posible detectar los compuestos presentes en las fracciones obtenidas por Prep/HPLC, de los extractos bajo estudio de *L. origanoides*, *T. diffusa* y *V. curassavica*, de material vegetal antes y después de su destilación.

Se observó que los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico, de material vegetal después de su destilación, poseían principalmente compuestos apolares solubles en *n*-

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

hexano, como ceras y ácidos grasos. Los extractos HA de *T. diffusa* tienen menor solubilidad, en comparación con los extractos HA de *L. origanoides* y *V. curassavica*, de material vegetal después de su destilación.

Mediante el uso del sistema de reciclaje de solvente en Prep/HPLC, fue posible obtener dos sub-fracciones de la fracción II del extracto HA de *L. origanoides*, de material vegetal después de su destilación. En la sub-fracción II-1 y II-2 se identificaron un derivado de flavona y el eriodictiol-7-*O*-glucósido, respectivamente.

Bajo el método cromatográfico implementado por Prep/HPLC, fue posible aprovechar el material vegetal después de su destilación en especies como *L. origanoides* y *V. curassavica*, ya que, se aislaron compuestos de valor comercial. Por su parte, la complejidad en la composición química de los extractos de *T. diffusa*, de material vegetal después de su destilación, dificultó el aislamiento de compuestos. La eficiencia en la separación de compuestos y su fraccionamiento por Prep/HPLC estuvo condicionado a la complejidad en la composición química del extracto vegetal.

### 6. Divulgación de resultados

Participé en el XXIII simposio internacional sobre avances en tecnologías de extracción (ExTech 2021), bajo la modalidad póster, titulado: *Chemical characterization of plant extracts obtained by SFE from residual biomass of promising aromatic and medicinal species*. Universidad de Alicante, Alicante, España. 30 de junio al 2 de julio del 2021.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

Participé en 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, el XVIII COLACRO, el X COCOCRO, el II SPAE y el IV C2B2, bajo la modalidad póster, titulado: Caracterización química del aceite esencial de *Ambrosia cumanensis* Kunth, recolectada en Santander, Colombia. Cartagena de indias. Colombia. 11 al 15 de octubre del 2021.

Participé en 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, el XVIII COLACRO, el X COCOCRO, el II SPAE y el IV C2B2, bajo la modalidad ponencia oral, titulada: Caracterización química de aceites esenciales y extractos hidroetanólicos obtenidos a partir de biomasa residual post-distilación de *Turnera diffusa*, colectada en Santander, Colombia. Cartagena de indias. Colombia. 11 al 15 de octubre del 2021.

Participo en 3<sup>rd</sup> *Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry*, bajo la modalidad póster, titulado: *LC/MS study of Hypericum carinosum (Hyperaceae) hydroethanolic extract, obtained from post-distilled plant material*. Rio de Janeiro. Brasil. 10 al 15 de diciembre del 2022.

Participé como coautor en 3<sup>rd</sup> *Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry*, bajo la modalidad póster, titulado: “*LC/MS study of Lippia origanoides (Verbenaceae) supercritical CO<sub>2</sub> extract and its fractions, obtained from post-distilled plant material*”, presentado por Silvia Juliana Muñoz. Rio de Janeiro. Brasil. 10 al 15 de diciembre del 2022.

Participé como coautor en 3<sup>rd</sup> *Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry*, bajo la modalidad póster, titulado: *Chromatographic and mass spectrometric characterization of Lippia origanoides (Verbenaceae) extract obtained with supercritical CO<sub>2</sub>*, presentado por María Fernanda Estupiñán. Rio de Janeiro. Brasil. 10 al 15 de diciembre del 2022.

**Referencias Bibliográficas**

- Abu-Lafi, S., Akkawi, M., Abu-Remeleh, Q., Jaber, S., Qutob, M., & Lutgen, P. (2018). Pure isolates and preparative HPLC fractions or crude extract of *Inula viscosa*: effect on  $\beta$ -hematin inhibition in vitro. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 6 (1), 4–9.  
<https://doi.org/10.15406/ppij.2018.06.00145>
- Álvarez, D. (2014). Las especies vegetales promisorias: caso del departamento de antioquia. Trabajo de grado. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).
- Angulo, S., Jaimes, L., & Cuervo, S. (2019). Desarrollo de un método de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD) para la caracterización de especies de la familia Asteracea. Universidad de Ciencias Ambientales y Aplicadas.
- Arango Bedoya, O., Pantoja, D., & Santacruz, L. (2012). Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del alto Patia. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10 (2), 79–86.
- Arias, J., Mejía, J., Córdoba, Y., Martínez, J. R., Stashenko, E., & del Valle, J. M. (2020). Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO<sub>2</sub> after steam distillation. *Industrial Crops and Products*, 146 (12), 112170. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112170>
- Arzanlou, M., Bohlooli, S., & Ranjbar, M. (2015). Purification of allicin from garlic extract using semi-preparative high performance liquid chromatography. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 10 (2). <https://doi.org/10.17795/jjnpp-17424>
- Avelino, M., Cruz, M., Jiménez, F., & Reyes, J. (2014). Cytotoxic activity of the methanolic extract of

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- Turnera diffusa* Willd on breast cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, 18 (3), 299-305.  
<https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0055>
- Aybastier, Ö., Is, E., & Saliha, S. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. *Industrial Crops & Products*, 44, 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.022>
- Bautista-Hernández, I., Aguilar, C., Martínez-Ávila, G., Ilina, A., Torres-León, C., Verma, D., & Chávez-González, M. (2022). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Lippia graveolens* Kunth residual leaves fermented by two filamentous fungal strains in solid-state process. *Food and Bioproducts Processing*, 136, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.09.001>
- Bayeux, M., Fernandes, A., Foglio, M., & Carvalho, J. (2002). Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 1229–1232. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002001000017>
- Bernal, H. Y., & Mesa, C. (2014). Plantas medicinales endémicas de Colombia, 476 registros. En Linea. [http://ipt.sibcolombia.net/sib/resource.do?r=puj\\_002](http://ipt.sibcolombia.net/sib/resource.do?r=puj_002)
- Bocian, S., Felinger, A., & Buszewski, B. (2008). Comparison of solvent adsorption on chemically bonded stationary phases in RP-LC. *Chromatographia*, 68 (1), 19–26.  
<https://doi.org/10.1365/s10337-008-0519-4>
- Brea, S. G. (2009). Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal. Trabajo de grado. Universidad Jaume.
- Bueno, J., Escobar, P., Martínez, R., Leal, S., & Stashenko, E. (2011). Composition of three essential oils, and their mammalian cell toxicity and antimycobacterial activity against drug resistant-

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- tuberculosis and nontuberculous *Mycobacteria Satrains*. *Natural Product Communications*, *6*, 1743–1748. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100601143>
- Carrillo, K. (2017). Estudio de la composición química y evaluación de la capacidad antioxdante de los extractos de la flor de *Brownea macrophylla* obtenidos por diferentes técnicas de aislamiento. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander.
- Cely, J. (2014). Estudio del efecto genotoxico y potencial antigenotoxico de extractos supercríticos de especie vegetales de las familias Malvaceae, Myrtaceae, Passifloraceae y Lamiaceae frente a radiacion ultravioleta tipo C. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander
- Chebil, L., Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J. M., & Ghoul, M. (2006). Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*, *41* (11), 2237–2251. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.027>
- Chen, L., Cao, F., & Sun, H. (2013). Ab initio study of the  $\pi$ - $\pi$  Interactions between CO<sub>2</sub> and benzene, pyridine, and pyrrole. *International Journal of Quantum Chemistry*, *113* (20), 2261–2266. <https://doi.org/10.1002/qua.24444>
- Chen, Y., Yu, H., Wu, H., Pan, Y., Wang, K., Jin, Y., & Zhang, C. (2015). Characterization and quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in pollen typhae for transformation rule exploration. *Molecules*, *20* (10), 18352–18366. <https://doi.org/10.3390/molecules201018352>
- Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, *11* (2), 153–177. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>
- Cicera, C., Leite, D., da S. Mendes, J., Dantas, A., de Carvalho, N., Castro, J., Salazar, G., Ferreira, M., de Meneses, J., da Silva, A., dos Santos, H., Tavares, J., Silva, J., Rodrigues, F., Cheon, C.,

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- Kim, B., & da Costa, J. (2022). Analysis toxicity by different methods and anxiolytic effect of the aqueous extract *Lippia sidoides* Cham. *Scientific Reports*, *12* (1), 20626.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-23999-9>
- Cimpan, G., & Gocan, S. (2002). Analysis of medicinal plants by HPLC: recent approaches. *Journal of Liquid Chromatography & Amp: Related Technologies*, *25* (13–15), 2225–2292.  
<https://doi.org/10.1081/JLC-120014003>
- Cordoba, Y., Stashenko, E., & Martínez, J. R. (2019). Estudio de la composición química y las actividades antioxidante y fotoprotectora de los extractos de damiana y orégano de monte, cultivadas en Santander. Tesis doctoral. Universidad Industrial de Santander.
- Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2011). Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*, *25* (5), 469–495.  
<https://doi.org/10.1080/14786419.2010.482054>
- Cuevas, J., Vergara, J., & Perez, J. (2016). Solid-liquid extraction of polyphenols at low pressure. J. Cuevas, J. Vergara, & J. Perez (Eds.), *Advances in technologies for producing food-relevant polyphenols* (1st ed., pp. 63–76). Taylor & Francis Group.
- da Luz, J., Barbosa, E., Do Nascimento, T., de Rezende, A., Ururahy, M., Brito, A. da S., Araujo-Silva, G., López, J., & Almeida, M. (2022). Chemical characterization of flowers and leaf extracts obtained from *Turnera subulata* and their immunomodulatory effect on LPS-Activated RAW 264.7 macrophages. *Molecules*, *27* (3), 1084. <https://doi.org/10.3390/molecules27031084>
- de Souza, P., Gasparotto, A., Crestani, S., Stefanello, M., Marques, M., Silva-Santos, J. & Kassuya, C. (2011). Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. *Phytomedicine*, *18* (10), 819–825.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.02.005>

Del Valle, J. M., Uquiche, E., & Valenzuela, L. (2016). Supercritical fluid Extraction of Polyphenols.

In J. Valenzuela, J. Vergara, & J. Perez (Eds.), *Advances in technologies for producing food - Relevant polyphenols* (1st ed., pp. 125–177). Taylor & Francis Group, LLC.

Demarque, D., Crotti, A., Vessecchi, R., Lopes, J., & Lopes, N. (2016). Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Product Reports*, 33 (3), 432–455. <https://doi.org/10.1039/c5np00073d>

Dong, M., & Zhang, K. (2014). Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. *Trends in Analytical Chemistry*, 63, 21–30.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.019>

Dorantes, M., Viguera, R., Mayagoitia, L., Martínez, L., Gutiérrez, O., & Estrada, R. (2019).

Neurobehavioral and toxicological effects of an aqueous extract of *Turnera diffusa* Willd (Turneraceae) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 236 (5), 50–62.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.036>

Durling, N. E., Catchpole, O. J., Tallon, S. J., & Grey, J. B. (2007). Measurement and modelling of the ternary phase equilibria for high pressure carbon dioxide–ethanol–water mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, 252, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2006.12.014>

El-Sayed, N., Aboutabl, S., Moharram, F., Allim, M., & Mabry, T. (1998). Phenolics and flavonoids of *Cordia macleodii*. *Revista Latinoamericana de Química*, 26, 30–35.

Elena E. Stashenko. (2009). Generalidades. *Aceites esenciales* (Primera ed, pp. 11–36). Universidad Industrial de Santander.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- Ferreira-Leitao, V., Gottschalk, L., Ferrara, M., Nepomuceno, A., Molinari, H., & Bon, E. (2010). Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. *Waste and Biomass Valorization*, 1 (1), 65–76. <https://doi.org/10.1007/s12649-010-9008-8>
- Ferreira, J., Luthria, D., Sasaki, T., & Heyerick, A. (2010). Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules*, 15 (5), 3135–3170. <https://doi.org/10.3390/molecules15053135>
- Ferreira, O., & Simao, P. (2012). Solubility of flavonoids in pure solvents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51 (18), 6586–6590. <https://doi.org/10.1021/ie300211e>
- Font, L. (2012). Optimización del proceso de purificación de nuevos compuestos orgánicos mediante cromatografía de líquidos preparativa acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). Tesis doctoral. Universidad Autonoma de Madrid.
- FoodB. (2019). *Food constituents, chemistry and biology database*. Compound Kaempferol 3-Galactoside (FDB002824). [www.foodb.ca](http://www.foodb.ca)
- FoodB. (2020a). *Compound isosakuranetin (FDB000610)*. [www.foodb.ca](http://www.foodb.ca)
- FoodB. (2020b). *Food constituents, chemistry and biology database*. Compound Eriodictyol 7-Glucoside (FDB000689). [www.foodb.ca](http://www.foodb.ca)
- Fornstedt, T., Forssén, P., & Samuelsson, J. (2017). Modeling of preparative liquid chromatography. In *Liquid Chromatography* (Second Edi, pp. 573–592). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00024-5>
- Gobierno de la Republica de Colombia. (2019). Estrategia Nacional de Economía Circular. Cierre de ciclos de materiales, innovación tecnológica, colaboración y nuevos modelos de negocios. Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible, Ministerio de Comercio, Industria y Turismo.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- Gómez, F. (2012). Aislamiento, identificación y cuantificación de hernandulcina en el extracto de *Lippia dulcis* trevir, obtenido por extracción con fluido supercrítico. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander.
- Guarin, O., & Barajas, A. (2016). Hidrodestilación asistida con microondas (MWHD) para la extracción de hidrolatos de plantas aromáticas. *Revista Politécnica*, 11 (21), 51–55.
- Gutiérrez-Grijalva, E., Picos-Salas, M., Leyva-López, N., Criollo-Mendoza, M., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. (2017). Flavonoids and phenolic acids from oregano: occurrence, biological activity and health benefits. *Plants*, 7 (1), 2. <https://doi.org/10.3390/plants7010002>
- Halagarda, M., Groth, S., Poppek, S., Rohn, S., & Pedan, V. (2020). Antioxidant activity and phenolic profile of selected organic and conventional honeys from Poland. *Antioxidants*, 9 (1), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antiox9010044>
- Hecht, E., Eliuk, S., Scigelova, M., & Makarov, A. (2019). Fundamentals and advances of Orbitrap Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–40. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9309.pub2>
- Henaó, J., Muñoz, L., Ríos, E., Padilla, L., & Giraldo, G. (2009). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides* H.B.K. Cultivada en el departamento del Quindío. *Revista De Investigaciones Universidad Del Quindio*, 1 (19), 159–164.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., & Bailleul, F. (2006). Phenolics and iridoids of *Lippia Alba*. *Natural Product Communications*, 1 (9), 727-730. <https://doi.org/10.1177/1934578X0600100906>
- Hernández, T., García, A., Serrano, R., Ávila, G., Dávila, P., Cervantes, H., Peñalosa, I., Flores, C., &

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

Lira, R. (2015). fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Tip*, 18 (2), 116–121.

<https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.003>

Huang, L., Peng, T., Li, Y., Zhang, S., Xiao, S., Lu, Q., Chen, F., & Tang, L. (2019). Isolation and purification of four phenolic glycoside isomers from the leaves of *Idesia polycarpa* Maxim. by high-speed counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 57 (10), 901-909.

<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz063>

Huber, U., & Major, R. (2012). Principles in preparative HPLC. *Agilent Technologies*, 30 (10), 1–85.

Humboldt Colombia. (2017). Biodiversidad colombiana: números para tener en cuenta.

<http://www.humboldt.org.co/es/boletines-y-comunicados/item/1087-biodiversidad-colombiana-numero-tener-en-cuenta>

Hussain, S., & Shaikh, T. (2016). Ultra High Performance Liquid Chromatography (UPLC): A new trend in analysis. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (3), 387–394.

Ioannou, I., Kriznik, A., Chekir, L., & Ghoul, M. (2019). Effect of the processing temperature on the degradation of food flavonoids : Kinetic and calorimetric studies on model solutions. *Journal of Food Engineering and Technology*, 8 (2), 91–102.

Jiang, P., Wu, D., & Lucy, C. (2014). Determination of void volume in normal phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1324, 63–70.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.019>

Kachlicki, P., Einhorn, J., Muth, D., Kerhoas, L., & Stobiecki, M. (2008). Evaluation of glycosylation

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC/MS/MS metabolite profiling. *Journal of Mass Spectrometry*, 43 (5), 572–586. <https://doi.org/10.1002/jms.1344>
- Kähkönen, M., Hopia, A., & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (8), 4076–4082. <https://doi.org/10.1021/jf010152t>
- Kostanyan, A. (2015). Modeling of closed-loop recycling liquid-liquid chromatography: analytical solutions and model analysis. *Journal of Chromatography A*, 1406, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.010>
- Kumar, S., Madaan, R., & Sharma, A. (2008). Estimation of apigenin, an anxiolytic constituent, in *Turnera aphrodisiaca*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70 (6), 847. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.49143>
- Kumar, V., Sood, H., & Chauhan, R. S. (2016). Optimization of a preparative RP-HPLC method for isolation and purification of picosides in *Picrorhiza kurroa*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 25 (2), 208–214. <https://doi.org/10.1007/s13562-015-0327-5>
- Kuroyanagi, M., Seki, T., Hayashi, T., Nagashima, Y., Kawahara, N., Sekita, S., & Satake, M. (2001). Anti-androgenic triterpenoids from the Brazilian medicinal plant, *Cordia multispicata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49 (8), 954–957. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.954>
- Lakka, N., & Kuppan, C. (2020). Principles of chromatography method development. In *Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89501>
- Latif, Z., & Sarker, S. (2012). Isolation of natural products by preparative high performance liquid chromatography (Prep-HPLC). *Methods in Molecular Biology*, 864, 255–274.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_10)

Leitão, S., Leitão, G., Vicco, D., Pereira, J., de Moraes Simão, G., Oliveira, D., Celano, R., Campone, L., Piccinelli, A., & Rastrelli, L. (2017). Counter-current chromatography with off-line detection by ultra high performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry in the study of the phenolic profile of *Lippia origanoides*. *Journal of Chromatography A*, 1520, 83–90.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.004>

Li, A., Li, S., Zhang, Y., Xu, X., Chen, Y., & Li, H. (2014). Resources and biological activities of natural Polyphenols. *Nutrients*, 6, 6020–6047. <https://doi.org/10.3390/nu6126020>

Liang, Z., Li, B., Liang, Y., Su, Y., & Ito, Y. (2015). Separation and purification of two minor compounds from *Radix Isatidis* by Integrative MPLC and HSCCC with PReparative HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38 (5), 1–26.

<https://doi.org/10.1080/10826076.2014.936606>

Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., & Xing, B. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21 (10), 1374. <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>

Lin, L., Mukhopadhyay, S., Robbins, R., & Harnly, J. M. (2007). Identification and quantification of flavonoids of mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (5), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.09.005>

Long, W., & Majors, R. E. (2004). Preparative HPLC scale-up of antibiotics. *Agilent Technologies*, 1–4.

Marshall, A., & Verdun, F. (1990). Fourier Transform Spectrometry: Common Features. In *Fourier Transforms in NMR, Optical and Mass Spectrometry* (pp. 95–140).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-87360-6.50009-1>

Masike, K., Mhlongo, M. I., Mudau, S. P., Nobela, O., Ncube, E. N., Tugizimana, F., George, M. J., & Madala, N. E. (2017). Highlighting mass spectrometric fragmentation differences and similarities between hydroxycinnamoyl-quinic acids and hydroxycinnamoyl-isocitric acids. *Chemistry Central Journal*, *11* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0262-8>

Matias, E., Alves, M. do Nascimento, M., de Alencar, V., Couthino, H., & de Costa, J. (2015). The genus *Cordia*: botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *25* (5), 542-552. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.012>

Matias, E., Alves, E., Santos, B., Sobral de Souza, C., Alencar, J., Santos, A., Figueredo, F., Ferreira, L., Vieira, F., Neves, F., Viana, A., Augusti, A., Saraiva, R., Athayde, M., da Rocha, J., & da Costa, J. (2013). Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbenacea* DC. as tool to validate the ethnobiological usage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/164215>

Mejia, J. (2014). Caracterización química y evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) obtenidos por diferentes técnicas de aislamiento. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander.

Merken, H., & Beecher, G. (2000). Measurement of food flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48* (3), 577-599. <https://doi.org/10.1021/jf990872o>

Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., & Horning, S. (2011). Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics*, *10* (9), 1-12. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011015>

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- Michielin, E., De Lemos, L., Ferreira, E., Pedrosa, R., & Ferreira, S. (2011). Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. *Journal of Supercritical Fluids*, 56 (1), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.11.006>
- Michielin, E., Salvador, A., Riehl, C., Smânia, A., Smânia, E., & Ferreira, S. (2009). Composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. *Bioresource Technology*, 100 (24), 6615–6623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.061>
- Nagy, T., Ledolter, K., & Solar, S. (2008). Oxidation of naringenin by gamma-radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 77 (6), 728–733. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2007.10.007>
- Nieto, I., & Chegwin, C. (2008). Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajor-cajú*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 53 (2), 1515–1517. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072008000200015>
- Oliveira, D., Leitão, G., Bizzo, H., Lopes, D., Alviano, D., Alviano, C., & Leitão, S. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chemistry*, 101 (1), 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.022>
- Oliveros, C. (2015). Estudio por técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas de los alcaloides harmala en extractos de *Banisteriopsis caapi* y en muestras de orina. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander.
- Oza, M., & Kulkarni, Y. (2017). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Cordia* (Boraginaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69 (7), 755–789. <https://doi.org/10.1111/jphp.12715>
- Pellett, J., Lukulay, P., Mao, Y., Bowen, W., Reed, R., Ma, M., Munger, R., Dolan, J., Wrisley, L., Medwid, K., Toltl, N., Chan, C., Skibic, M., Biswas, K., Wells, K., & Snyder, L. (2006).

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- “Orthogonal” separations for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1101 (1–2), 122–135. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.080>
- Penduff, P. (2013). Analytical to preparative HPLC method transfer an easy way to scale up from UHPLC to preparative. *Agilent Technologies*.
- Peng, J., Li, K., Zhu, W., Deng, X., & Li, C. (2018). Separation and purification of four phenolic compounds from persimmon by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1072, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.010>
- Pereira, D., Valentão, P., Pereira, J., & Andrade, P. (2009). Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules*, 14 (6), 2202–2211. <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>
- Pfau, S. (2015). Residual biomass: A silver bullet to ensure a sustainable bioeconomy? *The European Conference on Sustainability, Energy & the Environment 2015*, 6, 295–312.  
[http://papers.iafor.org/wp-content/uploads/conference-proceedings/ECSEE/ECSEE2015\\_proceedings.pdf](http://papers.iafor.org/wp-content/uploads/conference-proceedings/ECSEE/ECSEE2015_proceedings.pdf)
- Phenomenex. (2020). *How much can i load?*
- Pico, S., Murillo, C., & López, L. (2020). Extraction, separation, and evaluation of antioxidant effect of the different fractions of polyphenols from cocoa beans. *Revista Colombiana de Química*, 49 (3), 19–27. <https://doi.org/10.15446/rcq.v49n3.84082>
- Puri, S., Handa, G., Kalsotra, A., Gupta, V., Shawl, A., Suri, O., & Qazi, G. (2006). Preparative high-performance liquid chromatographic separation of naphthodianthrones from St. John’s Wort. *Journal of Chromatographic Science*, 44 (4), 177–180.  
<https://doi.org/10.1093/chromsci/44.4.177>
- Rathod, R., Chaudhari, S., Patil, A., & Shirkhedkar, A. (2019). Ultra-high performance liquid

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *Future Journal of Pharmaceutical Sciencies*, 8, 1–26.

<https://doi.org/10.1186/s43094-019-0007-8>

Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F., & Firuzi, O. (2013). Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: A review of structure- activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, 20 (36), 4436–4450. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990141>

Rey, N. (2015). Estudio del potencial antigenotóxico de extractos de fluidos supercríticos obtenidos de especies vegetales de la diversidad colombiana (asteraceae, burseraceae, ericaceae, lauraceae, solanaceae y verbenaceae) frente al daño genético producido por radiación. Trabajo de gradado. Universidad Industrial de Santander.

Rocha, L., Monteiro, M., & Teodoro, A. (2012). Anticancer properties of hydroxycinnamic acids - a review. *Cancer and Clinical Oncology*, 1 (2), 109–121. <https://doi.org/10.5539/cco.v1n2p109>

Rodríguez, E., Árias, A., Vásquez, E., Martínez, J., & Stashenko, E. (2012). Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium Gguajava* obtenidos con CO<sub>2</sub> Supercrítico. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 36 (140), 305–316.

Rojas, J. (2015). Estudio de extractos de mora de castilla y de cáscara de platano harton para su uso como antioxidantes naturales en emulsiones de aceite en agua. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander.

Rolz, C., De Leon, R., De Arriola, M., & De Cabrera, S. (1986). Biodelignification of lemon grass and citronella bagasse by white-rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 52 (4), 607–611. <https://doi.org/10.1128/aem.52.4.607-611.1986>

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- Rosa, A., Isola, R., Pollastro, F., & Nieddu, M. (2022). Effect of the natural polymethoxylated flavone artemetin on lipid oxidation and its impact on cancer cell viability and lipids. *Fitoterapia*, *156* (11), 105102. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.105102>
- Rudakov, O. B., Rudakova, L. V., & Selemenev, V. F. (2018). Acetonitrile as tops solvent for liquid chromatography and extraction. *Journal of Analytical Chromatography and Spectroscopy*, *1* (2), 1-19. <https://doi.org/10.24294/jacs.v1i2.883>
- Saha, A., & Basak, B. (2020). Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, *145* (6), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111979>
- Saha, A., Tripathy, V., Basak, B., & Kumar, J. (2018). Entrapment of distilled palmarosa (*Cymbopogon martinii*) wastes in alginate beads for adsorptive removal of methylene blue from aqueous solution. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, *37* (6), 1942–1953. <https://doi.org/10.1002/ep.12872>
- Sajid, M., Kifayat, M., Salman, M., Usman, M., Rahman, S., & Saddique, M. (2021). Effects of high temperature on morphological and physiological stages of different cultivated crops. *Mediterranean Journal of Basic and Applied Sciences*, *05* (04), 44–50. <https://doi.org/10.46382/mjbas.2021.5405>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *Institute for Research in Molecular Medicine*, *8* (1), 1–10.
- Sayed-Ahmad, B., Straumīte, E., Šabovics, M., Krūma, Z., Merah, O., Saad, Z., Hijazi, A., & Talou, T. (2017). Effect of addition of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) on the quality of protein bread. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, *71* (6), 509–514.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

<https://doi.org/10.1515/prolas-2017-0088>

- Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., & Merah, O. (2017). The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial Crops and Products*, 109 (8), 661–671. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.027>
- Schroeder, M., & Burgos, Á. (2017). Dinámica de la composición de los nutrientes de las hojas de *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. y Schult (María negra). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8 (9), 5.
- Schulenberg-Schell, H., & Tei, A. (2015). Principles and practical aspects of preparative liquid chromatography. In *Agilent Technologies*.
- Scopel, R., Neto, R., Alves, M., Cassel, E., & Figueiró, M. (2013). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Schinus molle* L with co-Solvents : mathematical modeling and antimicrobial applications. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56 (6), 513–519.
- Sertié, J., Basile, A., Panizza, S., Matida, A., & Zelnik, R. (1990). Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. *Planta Medica*, 56 (01), 36–40. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960879>
- Shimadzu. (2019). *Fraction collector for Shimadzu high performance liquid chromatograph FRC10-A*.
- Shimadzu. (2020). *Preparative Chromatography Systems*.  
<https://www.shimadzu.com/an/hplc/aplsys/prep.html>
- Shimadzu. (2022). *Introduction of preparative systems according to purpose*. Shimadzu Corporation.  
<https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/hplc/prep4.html#1>

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- Stashenko, E., & Martínez, J. (2011). Algunos consejos útiles para el análisis cromatográfico de compuestos orgánicos volátiles. *Scientia Chromatographica*, 3 (3), 199–221.  
<https://doi.org/10.4322/sc.2011.012>
- Stashenko, E., Prada, N., & Martínez, J. (1996). HRGC/FID/NPD and HRGGC/MSD study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques. *Journal of High Resolution Chromatography*, 19 (6), 353–358.  
<https://doi.org/10.1002/jhrc.1240190609>
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2013). Análisis de fragancias florales por GC-MS. *Scientia Chromatographica*, 5 (1), 7–25. <https://doi.org/10.4322/sc.2013.004>
- Stashenko, E., Martínez, J., Patiño, J., & Reyes, J. (2007). Caracterización de los metabolitos secundarios de dos especies de *ocimum* (fam. labiatae), en función del método de extracción. *Scientia et Technica*, 1 (33), 121–123. <https://doi.org/10.22517/23447214.6139>
- Stashenko, E., Velandia, S., Flechas, M., & Ocazonez, R. (2016). Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de colombia para investigación con base en su citotoxicidad. *Vistae Revista de La Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentaria*, 23 (1), 18–29.  
<https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v23n1a02>
- Syukri, D., Darwis, D., & Santoni, A. (2013). Preparative HPLC for the Purification of major Anthocyanins from *Ficus padana burm. L.* *Research Journal of Chemical Sciences*, 3 (12), 60–64.
- Thammana, M. (2016). A Review on High Performance Liquid Chromatography ( HPLC ). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5 (2), 22–28.
- Ticli, F., Hage, L., Cambraia, R., Pereira, P., Magro, Â., Fontes, M., Stábeli, R., Giglio, J., França, S.,

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- Soares, A., & Sampaio, S. (2005). Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon*, 46 (3), 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.023>
- Tiwari, R., & Rana, C. (2015). Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3 (5), 661–670.
- Todd, D. (2014). Solvent Extraction. In *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook* (Third Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2553-3.00012-X>
- Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., & Oreopoulou, V. (2007a). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 12 (3), 593–606. <https://doi.org/10.3390/12030593>
- Tsopelas, F., Ochsenkühn, M., & Tsantili, A. (2010). Void volume markers in reversed-phase and biomimetic liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217 (17), 2847–2854. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.062>
- Urbizu, A., Castillo, O., Martínez, G., & Torres, J. (2017). Natural variability of essential oil and antioxidants in the medicinal plant *Turnera diffusa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 10 (2), 121-125. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.01.013>
- Urwin, S., Levilain, G., Marziano, I., Merritt, J., Houson, I., & Ter Horst, J. (2020). A structured approach to cope with impurities during industrial crystallization development. *Organic Process Research and Development*, 24 (8), 1443–1456. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00166>
- Vázquez, E. (2015). *Actividades biológicas de extractos de plantas y de sus combinaciones*. Trabajo de grado. Universidad Autónoma de Madrid.
- Vega, G., & Dávila, J. (2021). Use of non-psychoactive residual biomass from *Cannabis sativa* L. for

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

- obtaining phenolic rich-extracts with antioxidant capacity. *Natural Product Research*, 36 (16), 4193–4199. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1969562>
- Velde, V., Lavie, D., Zelnik, R., Matida, A., & Panizza, S. (1982). Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1, 2697–2700. <https://doi.org/10.1039/p19820002697>
- Walter, T., & Andrews, R. (2014). Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *Trends in Analytical Chemistry*, 63, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.016>
- Wang, X., Liang, Y., Peng, C., Xie, H., Pan, M., Zhang, T., & Ito, Y. (2011). Preparative isolation and purification of chemical constituents of *Belamcanda* by MPLC, HSCCC, and PREP-HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 34 (4), 241–257. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.547058>
- Wang, Y., Xue, X., Xiao, Y., Zhang, F., Xu, Q., & Liang, X. (2008). Purification and preparation of compounds from an extract of *Scutellaria barbata* D. Don using preparative parallel high performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 31 (10), 1669–1676. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700609>
- Willer, J., Çiçek, S., Johrer, K., Greil, R., & Zidorn, C. (2019). Cytotoxic properties of damiana (*Turnera diffusa*) extracts and constituents and a validated quantitative UHPLC-DAD assay. *Molecules*, 24 (5), 855-869. <https://doi.org/10.3390/molecules24050855>
- Wrona, O. (2017). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plant materials. *Journal of AOAC International*, 100 (6), 1624–1635. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0232>
- Yang, X., Wang, X., Chen, X., Ji, H., Zhang, Y., & Liu, A. (2018). Pinocembrin–lecithin complex: characterization, solubilization, and antioxidant activities. *Biomolecules*, 8 (2), 41.

## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

<https://doi.org/10.3390/biom8020041>

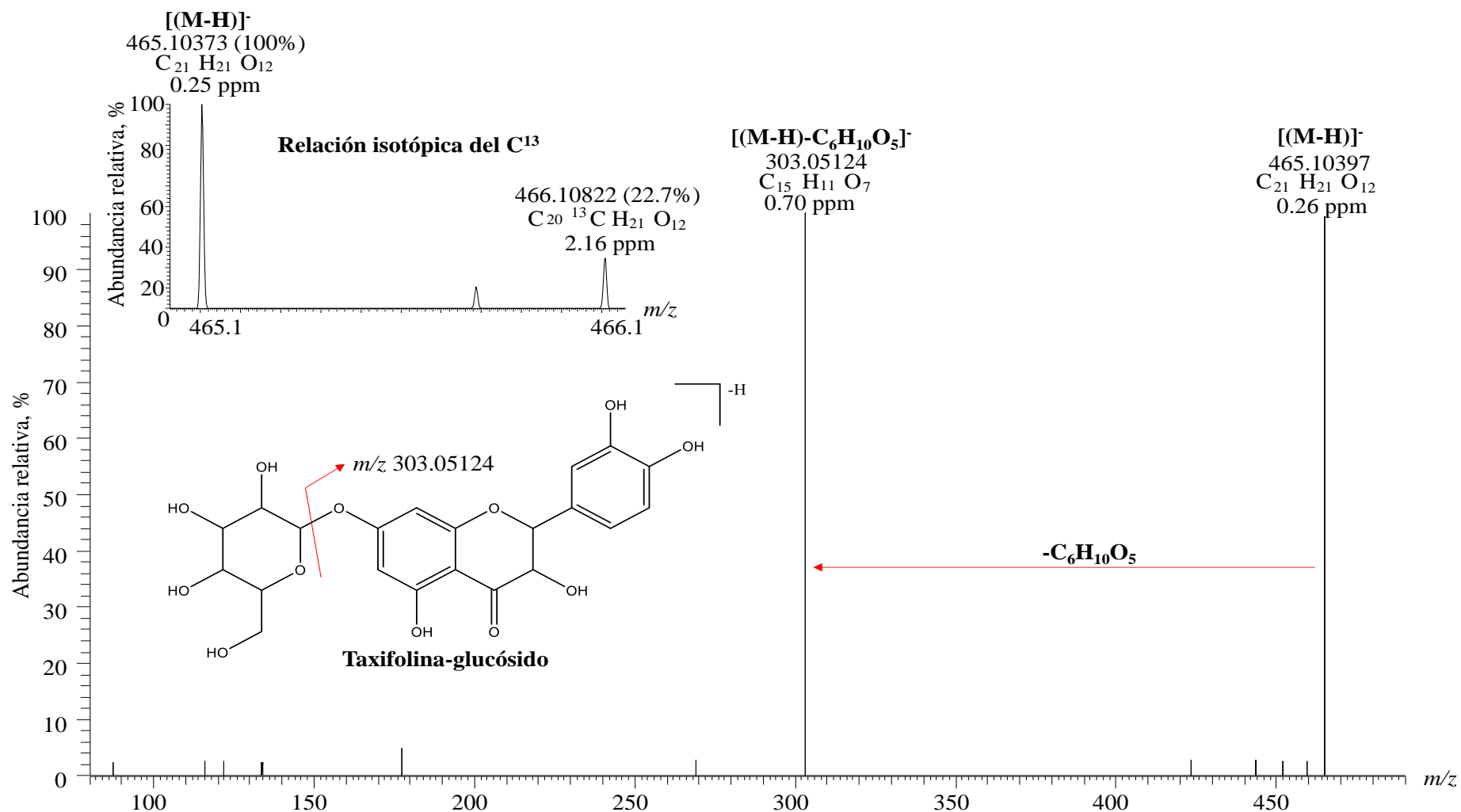
- Zamani, S., Hossieni, M., Etebari, M., Salehian, P., & Ebrahimi, S. (2016). Pharmacokinetics of calycopterin and xanthmicrol, two polymethoxylated hydroxyflavones with anti-angiogenic activities from *Dracocephalum kotschyi* Bioss. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40199-016-0161-x>
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Correa, J., & Liliana, B. (2009). Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. y componentes mayoritarios. *Salud UIS*, 41, 215–222.
- Zhang, Y., Jiao, J., Liu, C., Wu, X., & Zhang, Y. (2008). Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 107 (3), 1326–1336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.037>
- Zhao, J., Dasmahapatra, A., Khan, S., & Khan, I. (2008). Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). *Journal of Ethnopharmacology*, 120 (3), 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.016>
- Zhao, J., Pawar, R., Ali, Z., & Khan, I. A. (2007). Phytochemical investigation of *Turnera diffusa*. *Journal of Natural Products*, 70 (2), 289–292. <https://doi.org/10.1021/np060253r>
- Zhu, Y., Bowen, T., & Song, X. (2020). Preparative scale purification of natural glycans by closed-loop recycle HPLC. *Analytical Biochemistry*, 599 (3), 113702. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113702>
- Zubarev, R., & Makarov, A. (2013). Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85 (11), 5288–5296. <https://doi.org/10.1021/ac4001223>

# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndices

### Apéndice 1

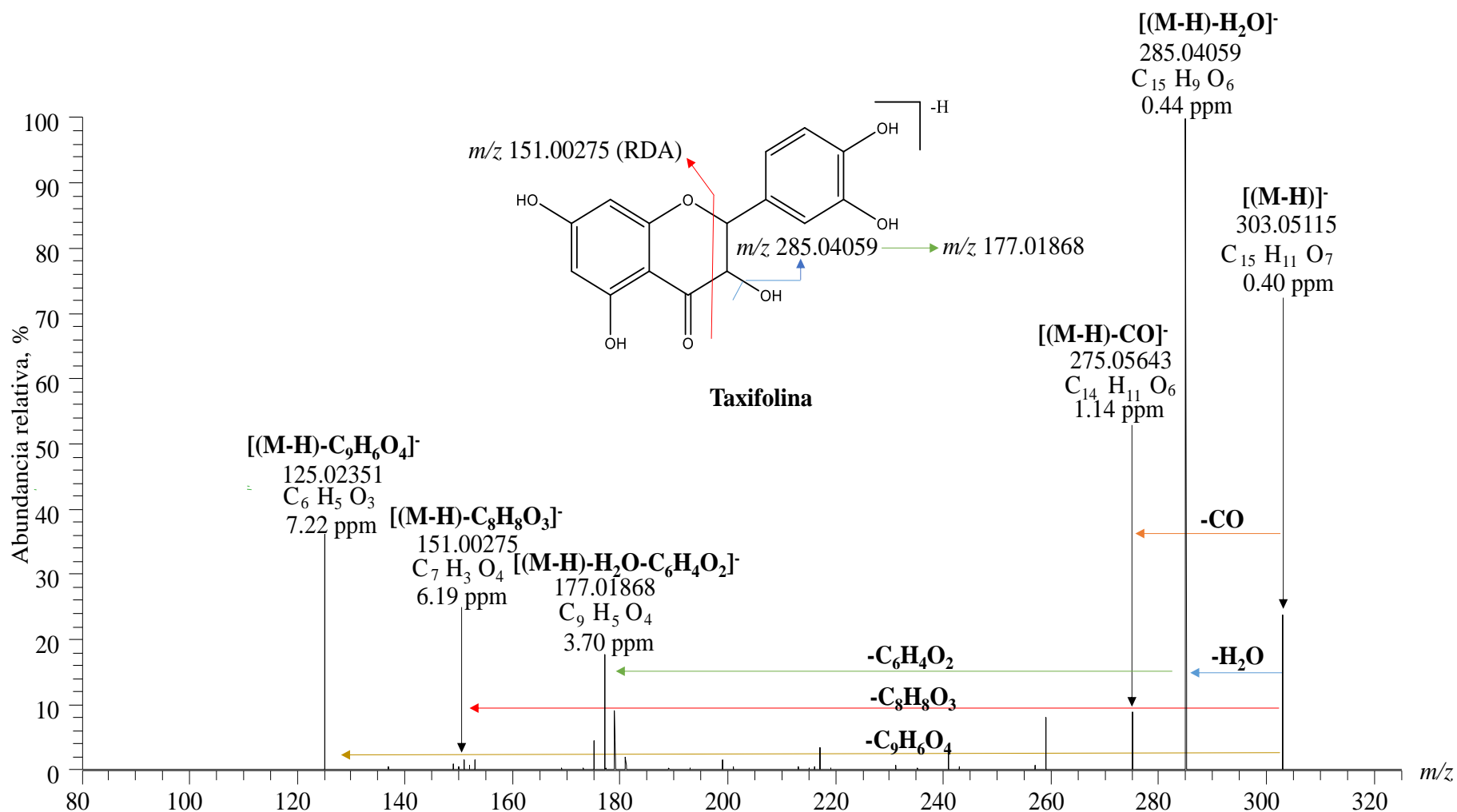
Espectro de masas de la taxifolina-glucósido ( $m/z$  465.10397, 10 eV), presente en los extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 2

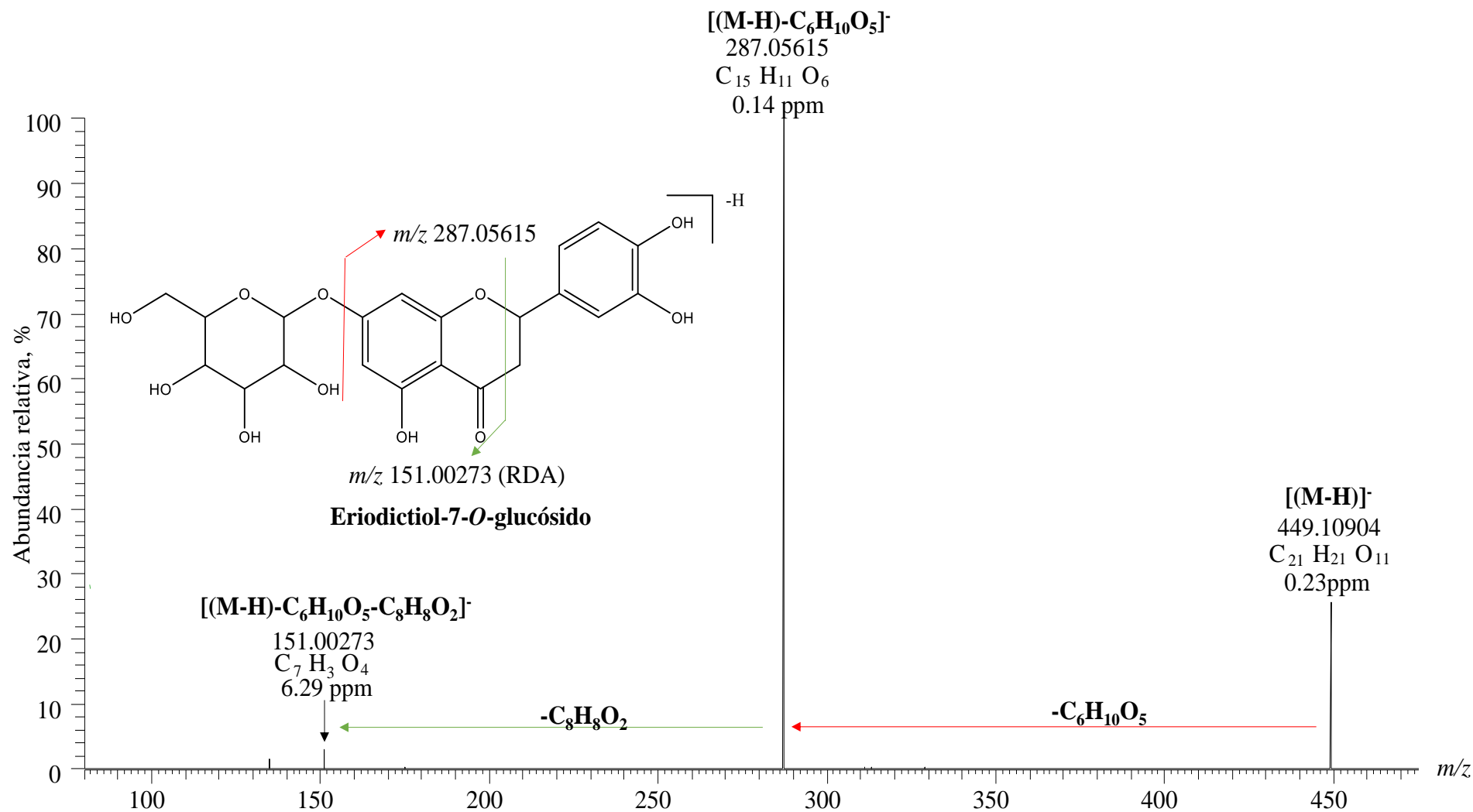
Espectro de masas de la taxifolina ( $m/z$  303.05115, 10 eV), presente en los extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 3

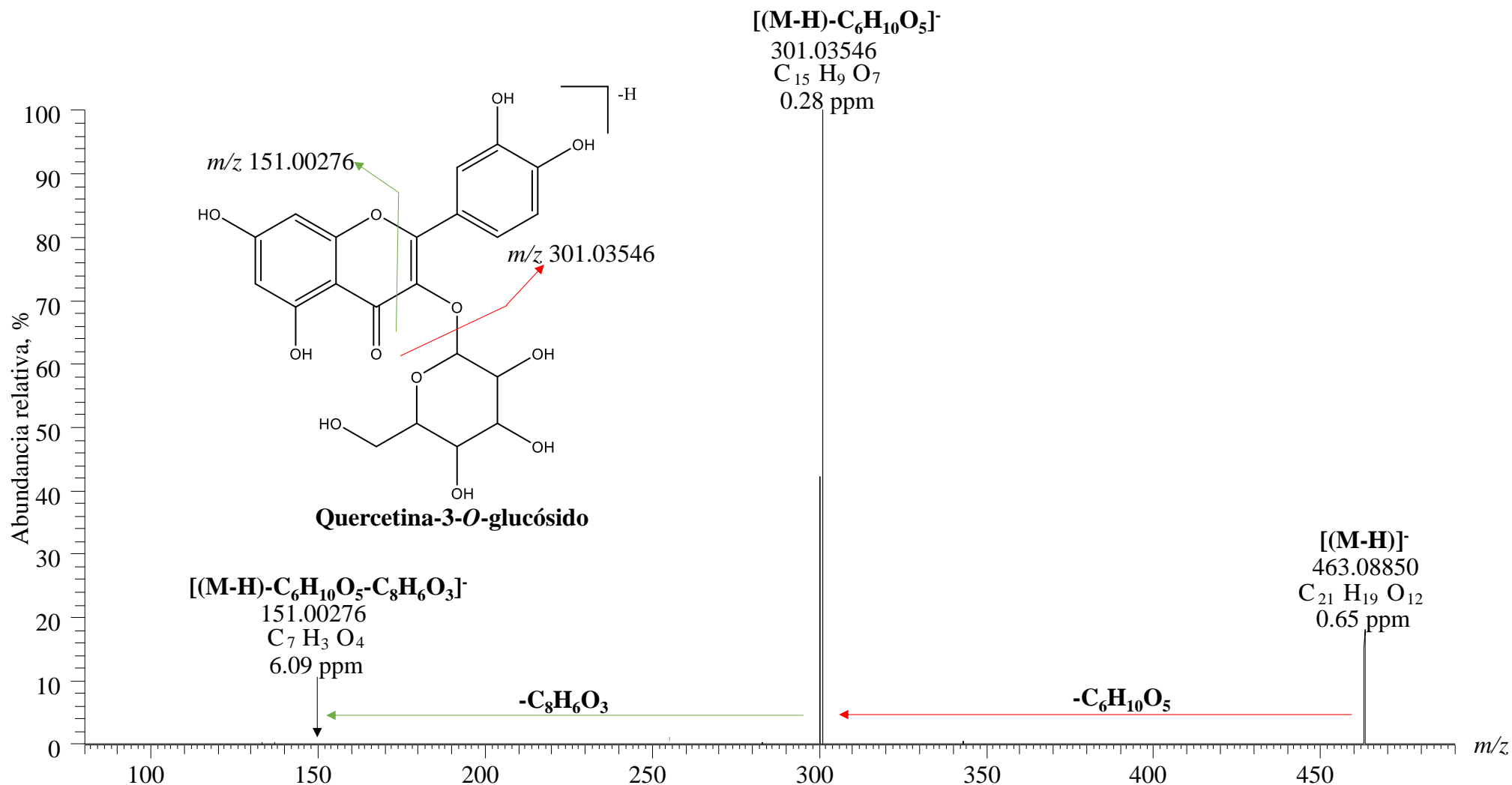
Espectro de masas del eriodictiol-7-O-glucósido ( $m/z$  449.10904, 10 eV) presente en los extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 4

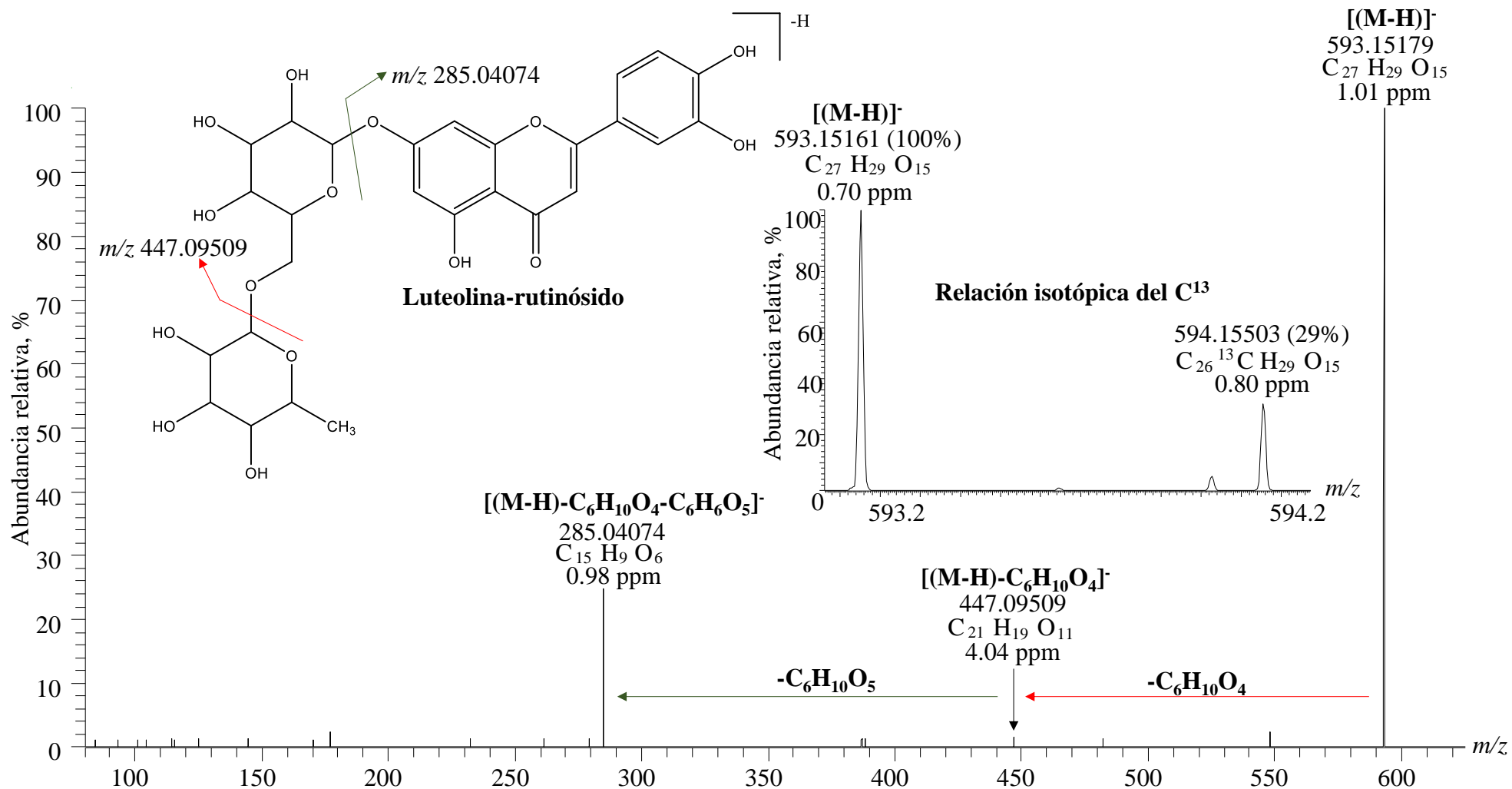
Espectro de masas de la quercetina-3-O-glucósido ( $m/z$  463.08850, 30 eV), presente en extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndice 5

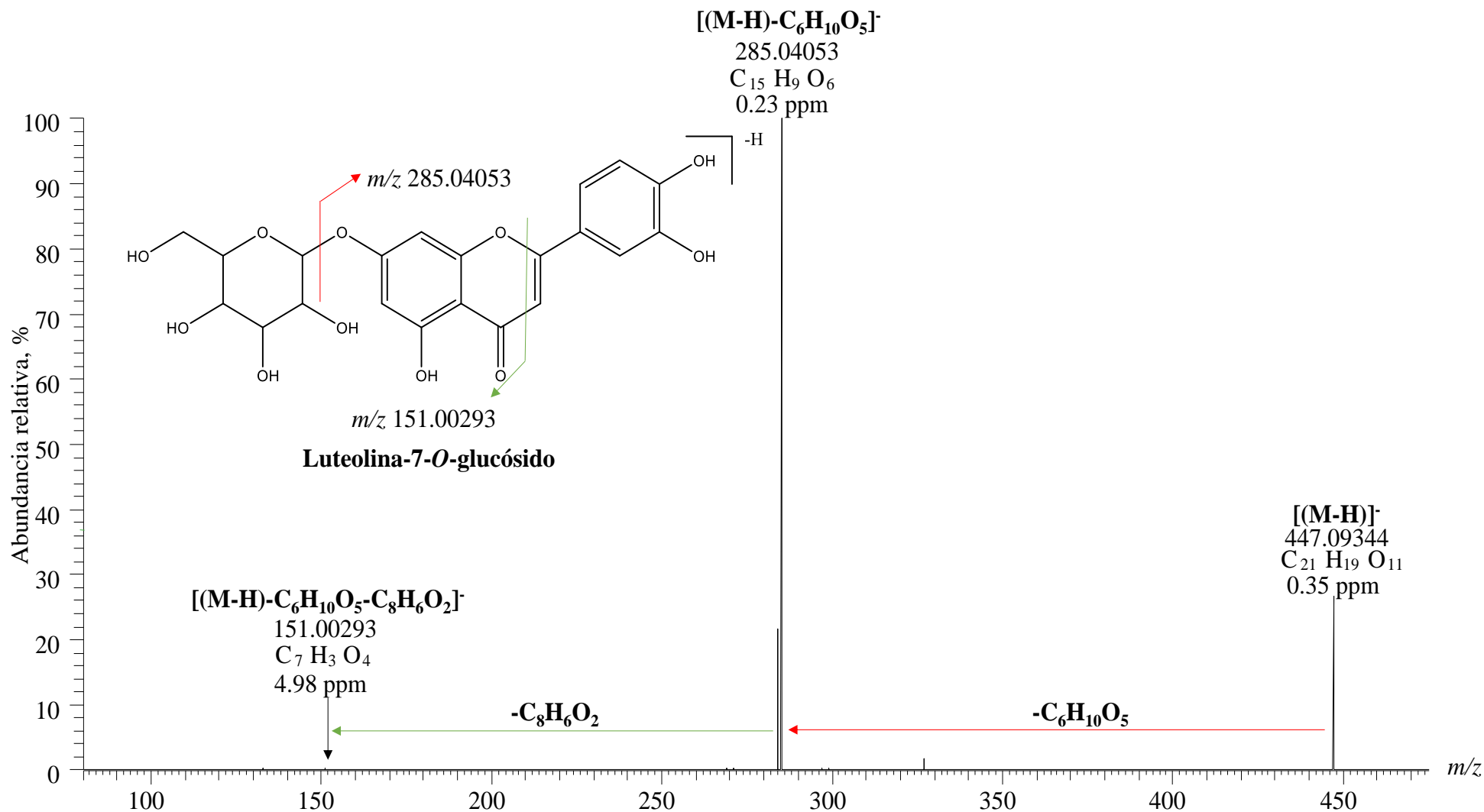
Espectro de masas de la luteolina-rutinósido ( $m/z$  593.15179, 20 eV), presente en los extractos de *L. origanoides* quimiotipo *felandreno*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 6

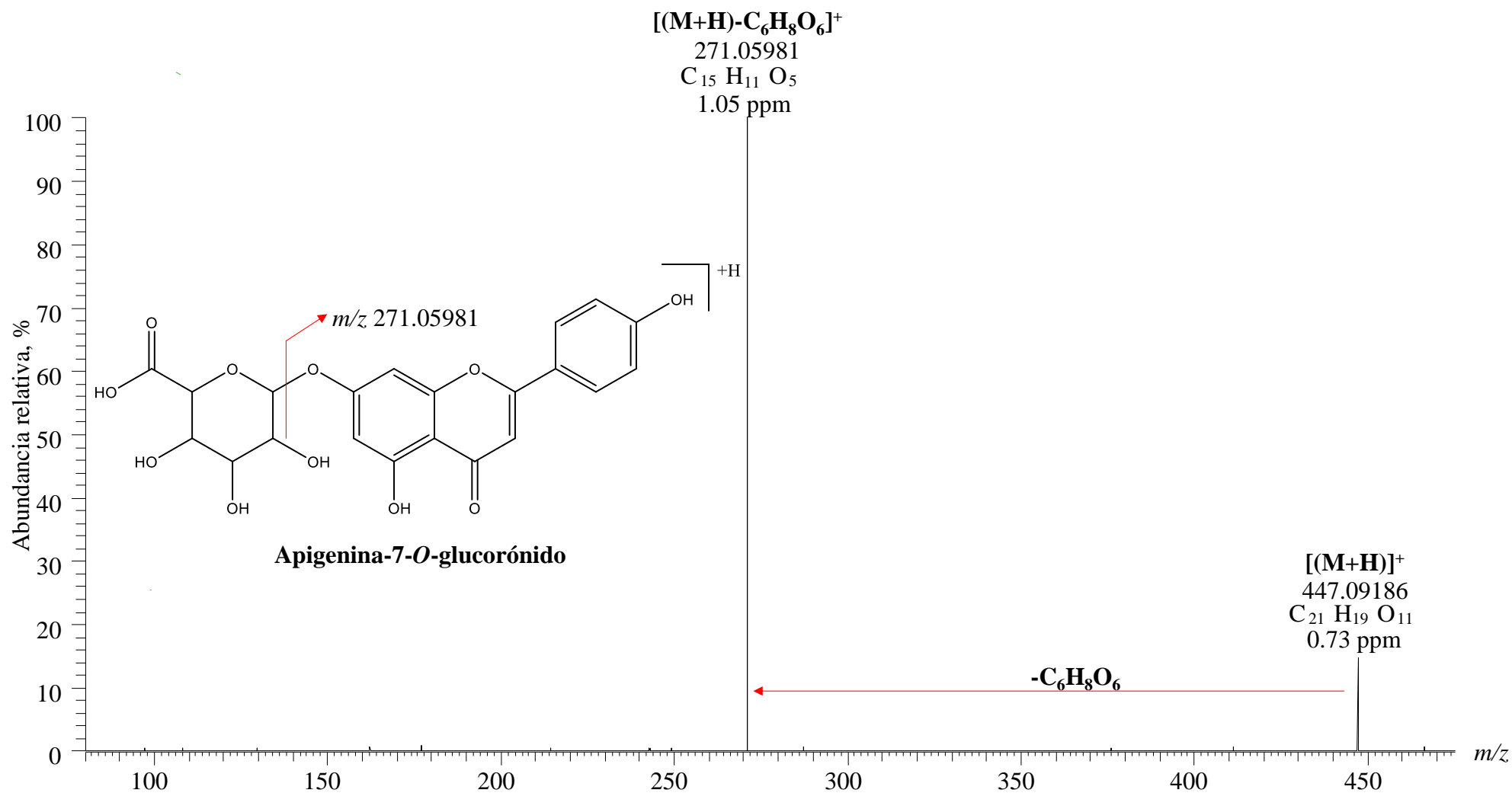
Espectro de masas de la luteolina-7-*O*-glucósido ( $m/z$  447.09344, 30 eV), presente en los extractos de *L. origanoides* quimiotipo *felandreno*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 7

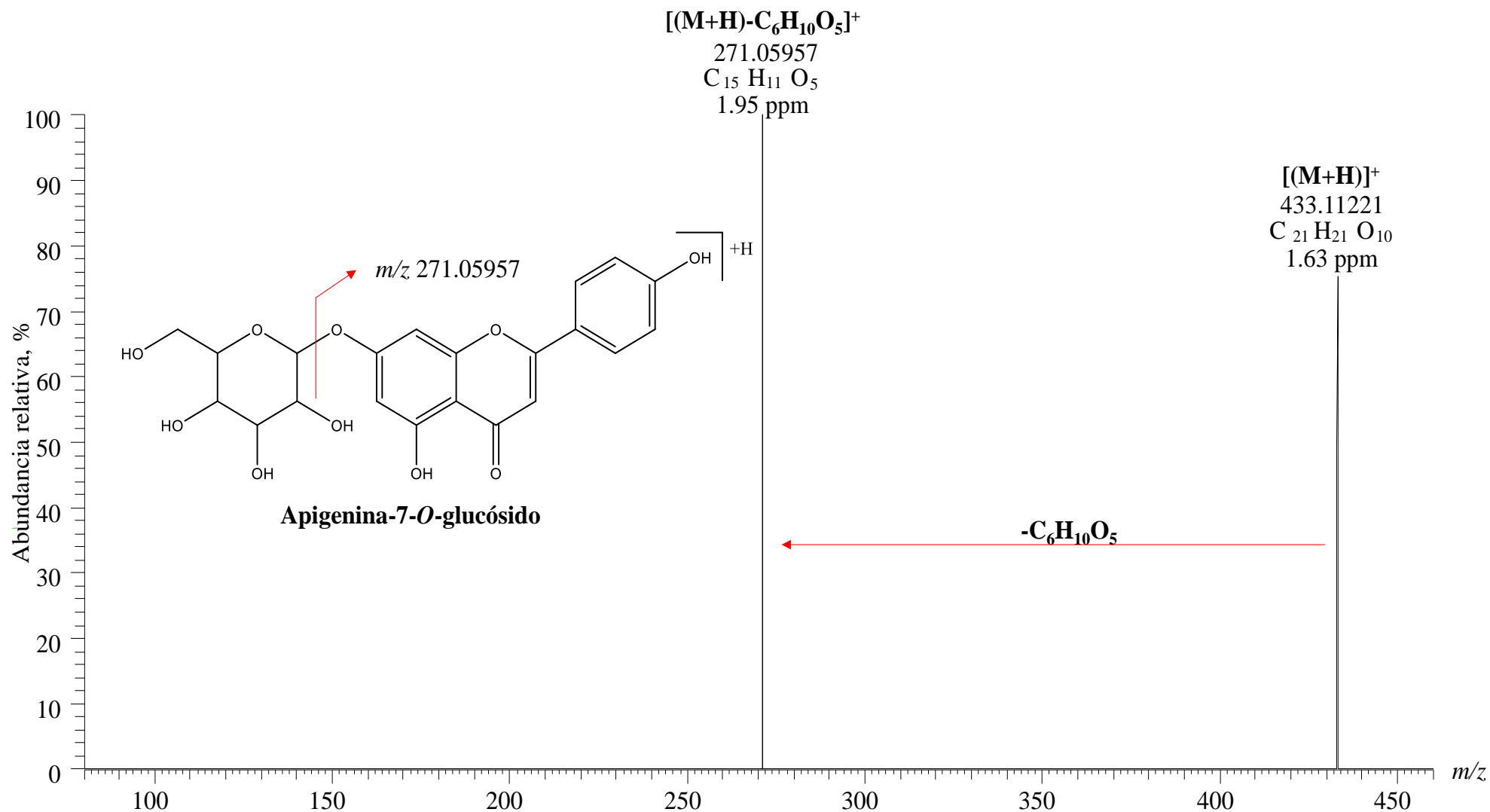
Espectro de masas de la apigenina-7-O-glucorónido ( $m/z$  447.09186, 20 eV), presente en los extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 8

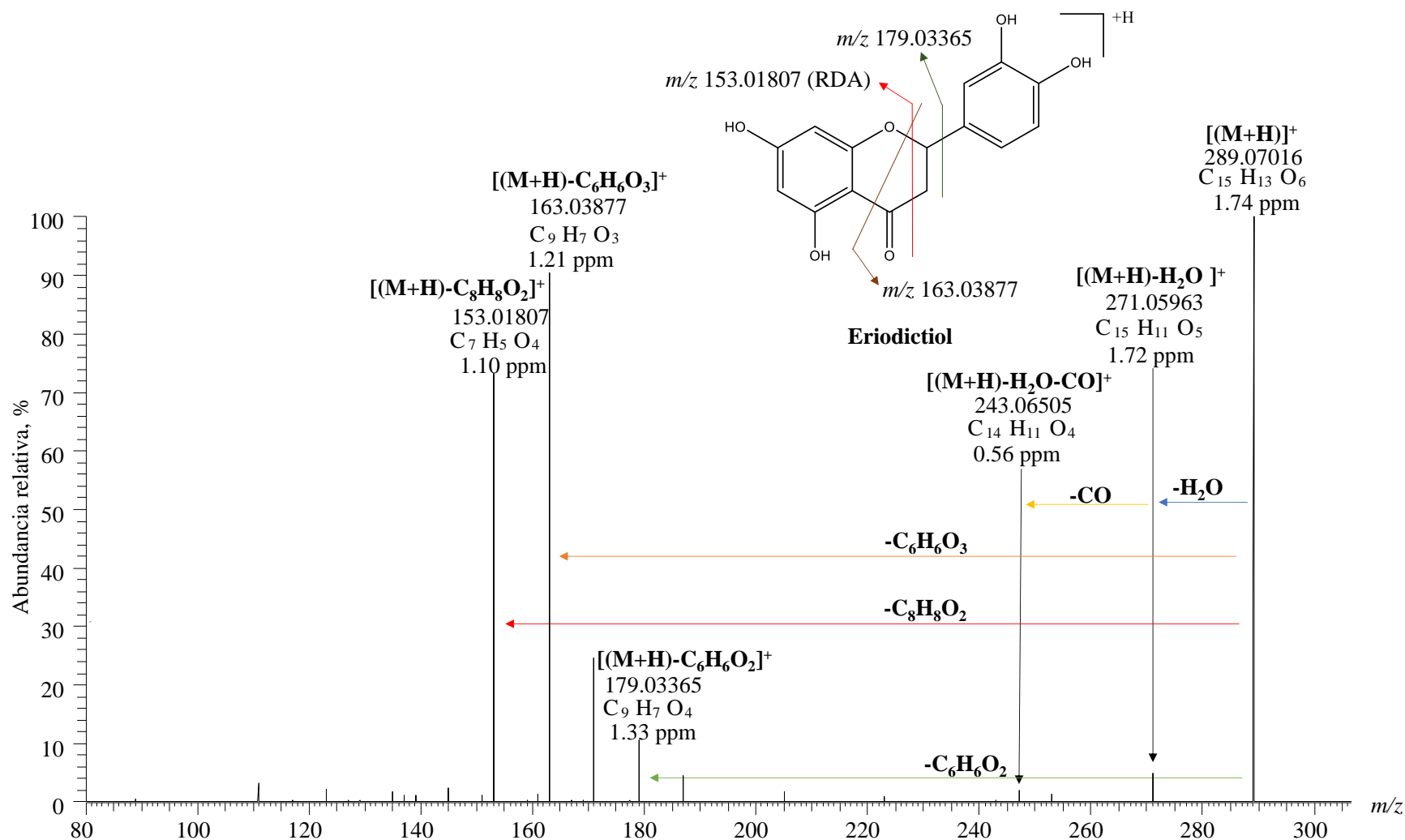
Espectro de masas de la apigenina-7-O-glucósido ( $m/z$  433.11221, 10 eV), presente en extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 9

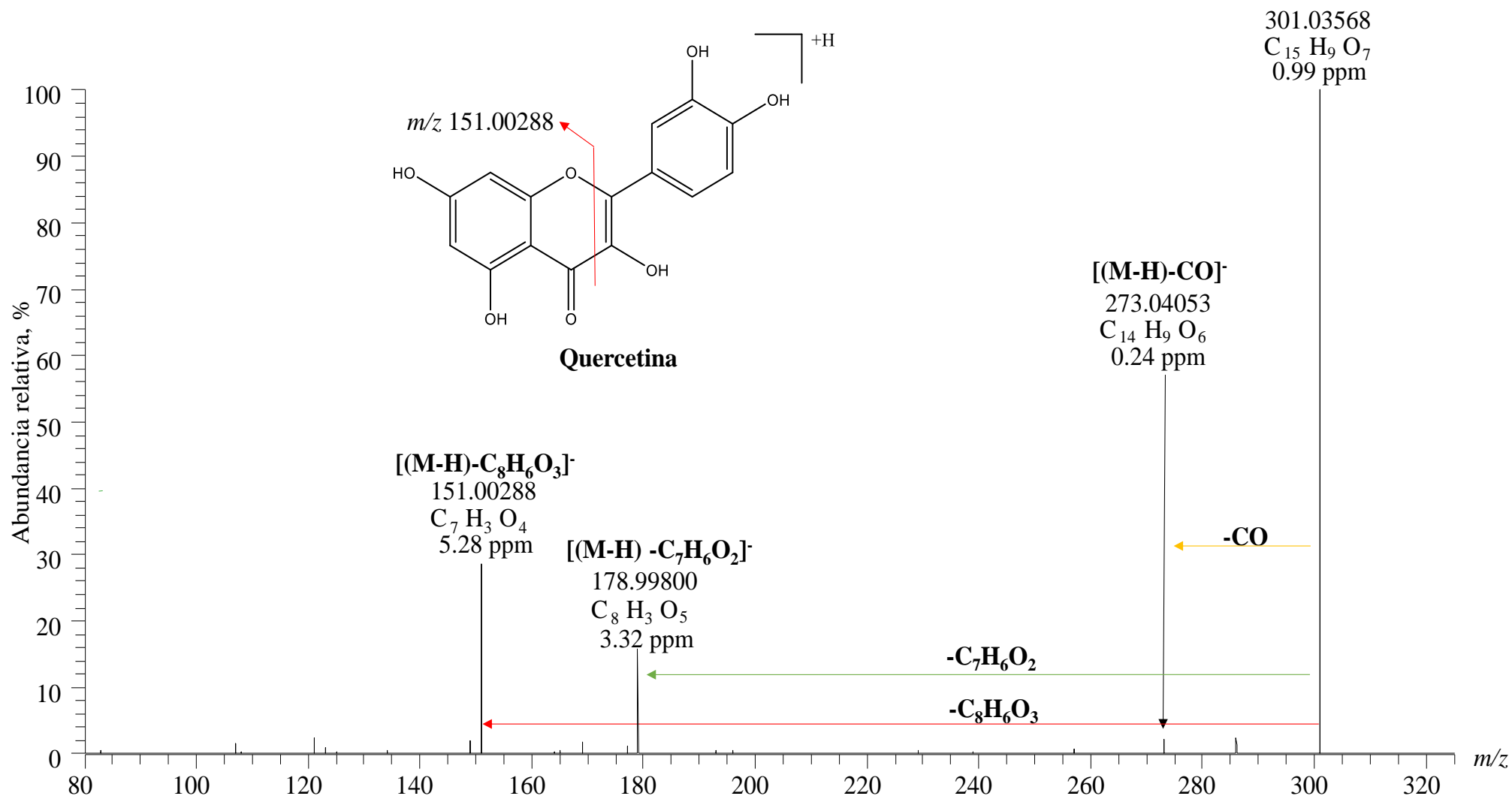
Espectro de masas del eriodictiol ( $m/z$  289.07016, 30 eV), presente en extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndice 10

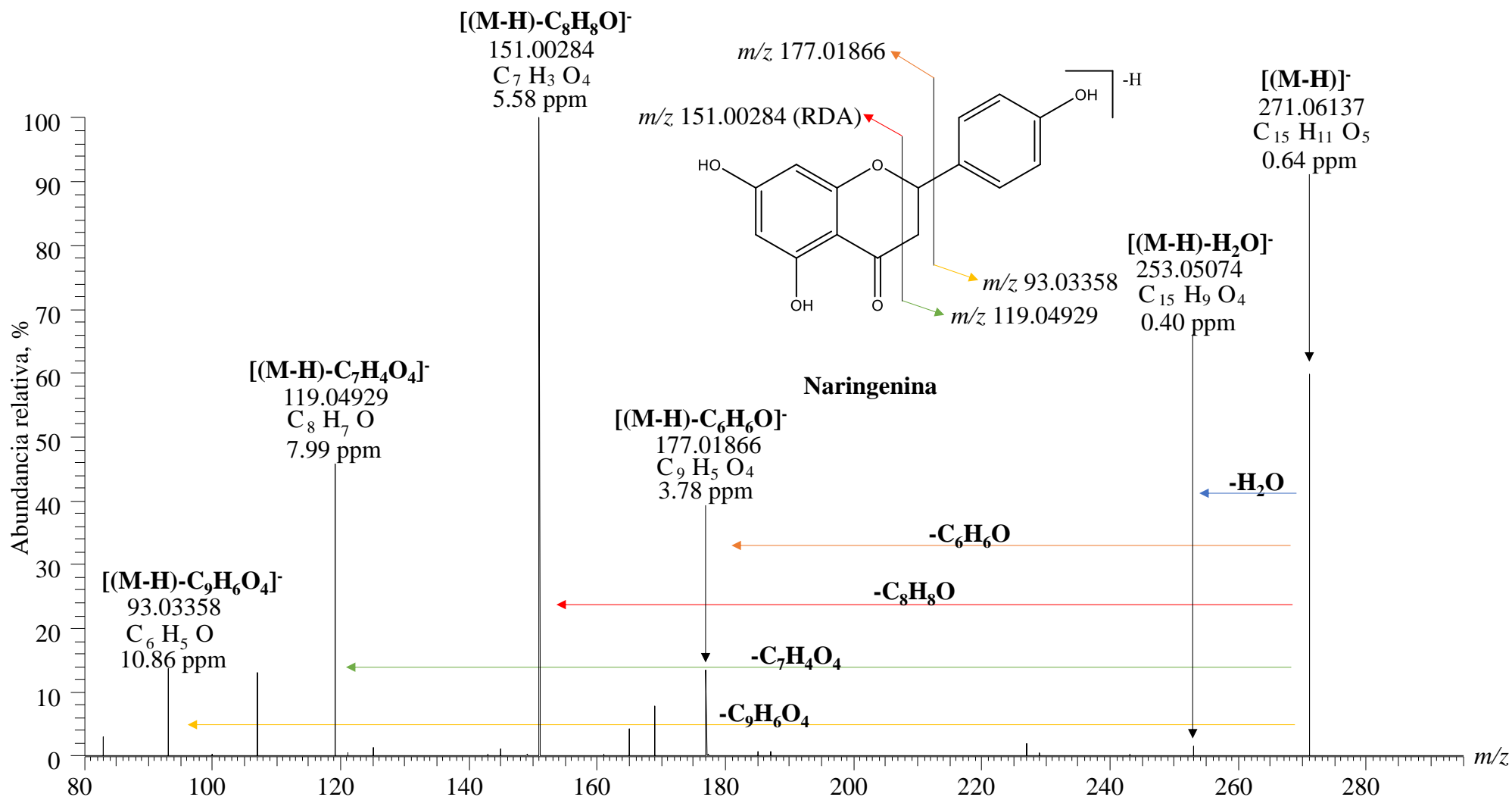
Espectro de masas de la quercetina ( $m/z$  301.03568, 20 eV), presente en extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndice 11

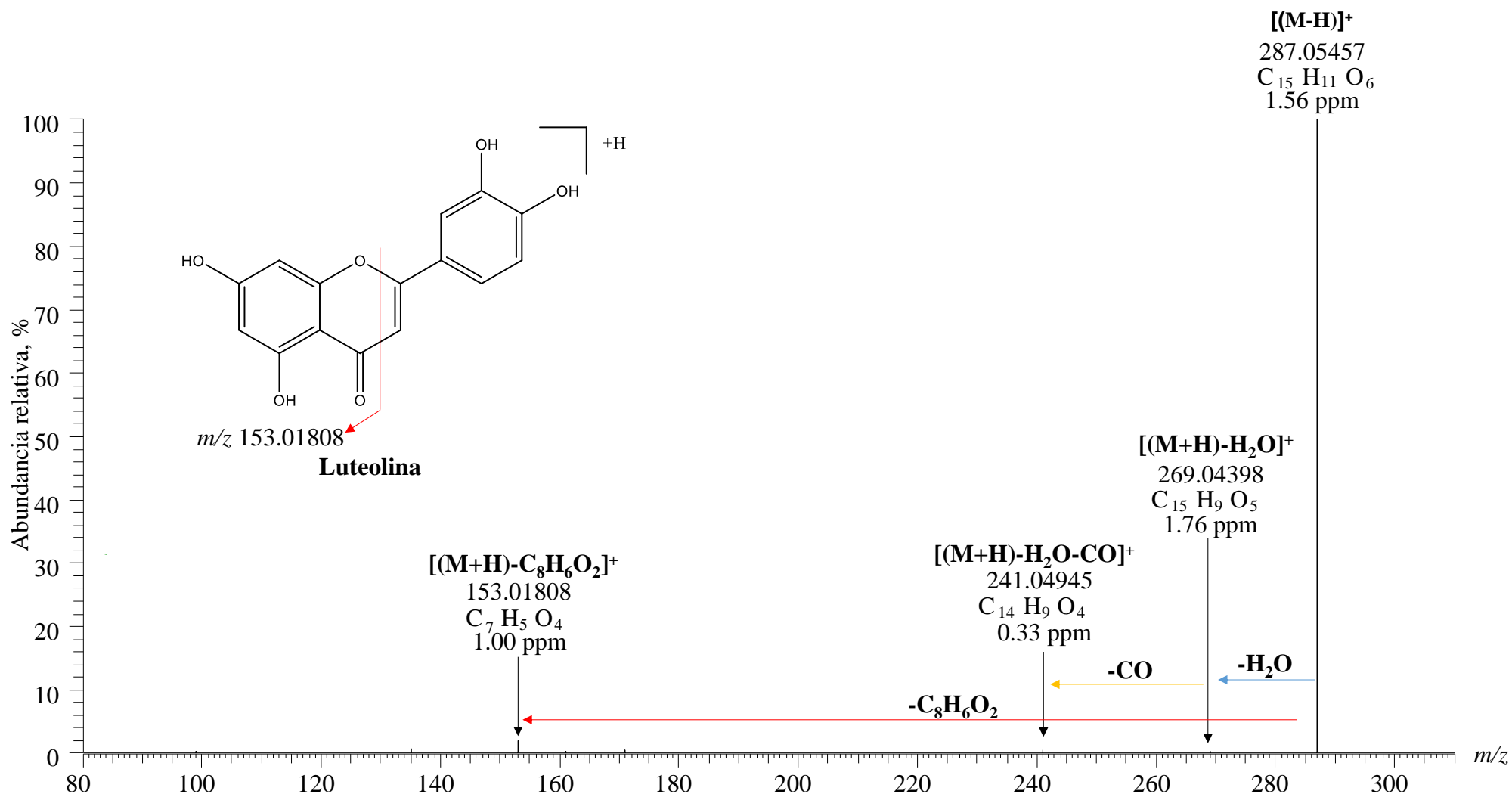
Espectro de masas de la naringenina ( $m/z$  271.06137, 30 eV) presente en extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 12

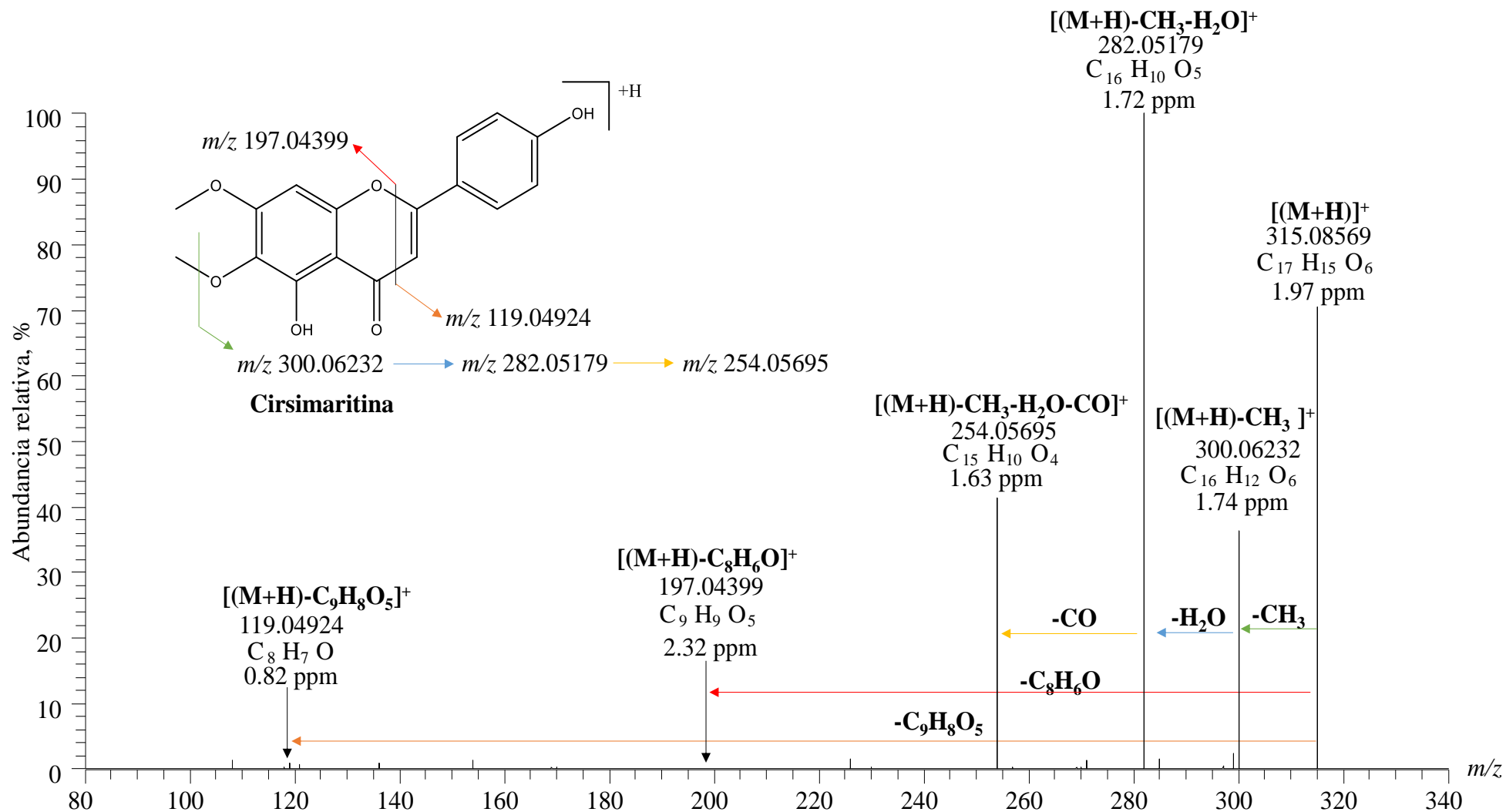
Espectro de masas de la luteolina ( $m/z$  287.05457, 40 eV) presente en extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 13

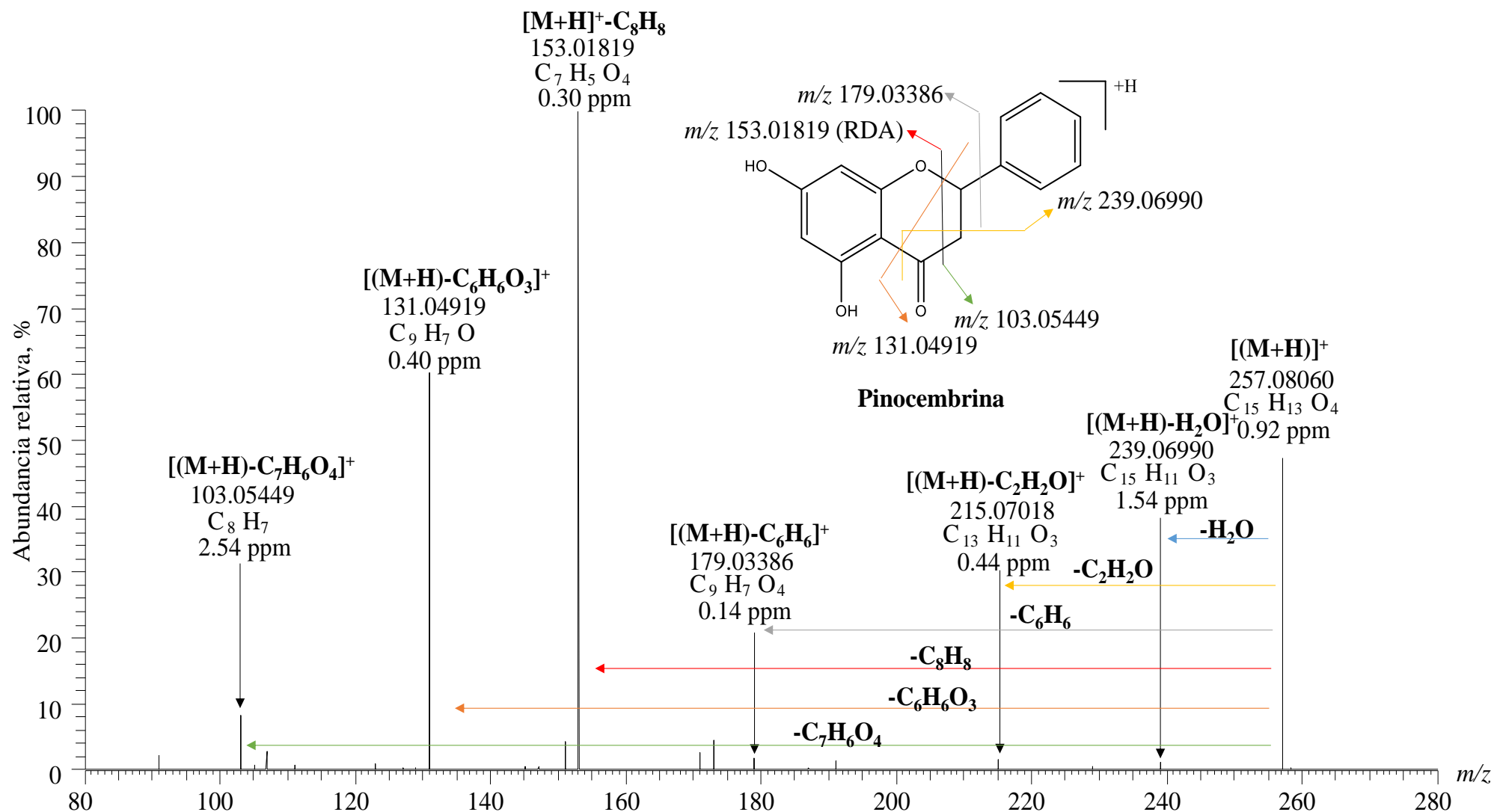
Espectro de masas de la cirsimaritina ( $m/z$  315.08569, 40 eV) presente en extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 14

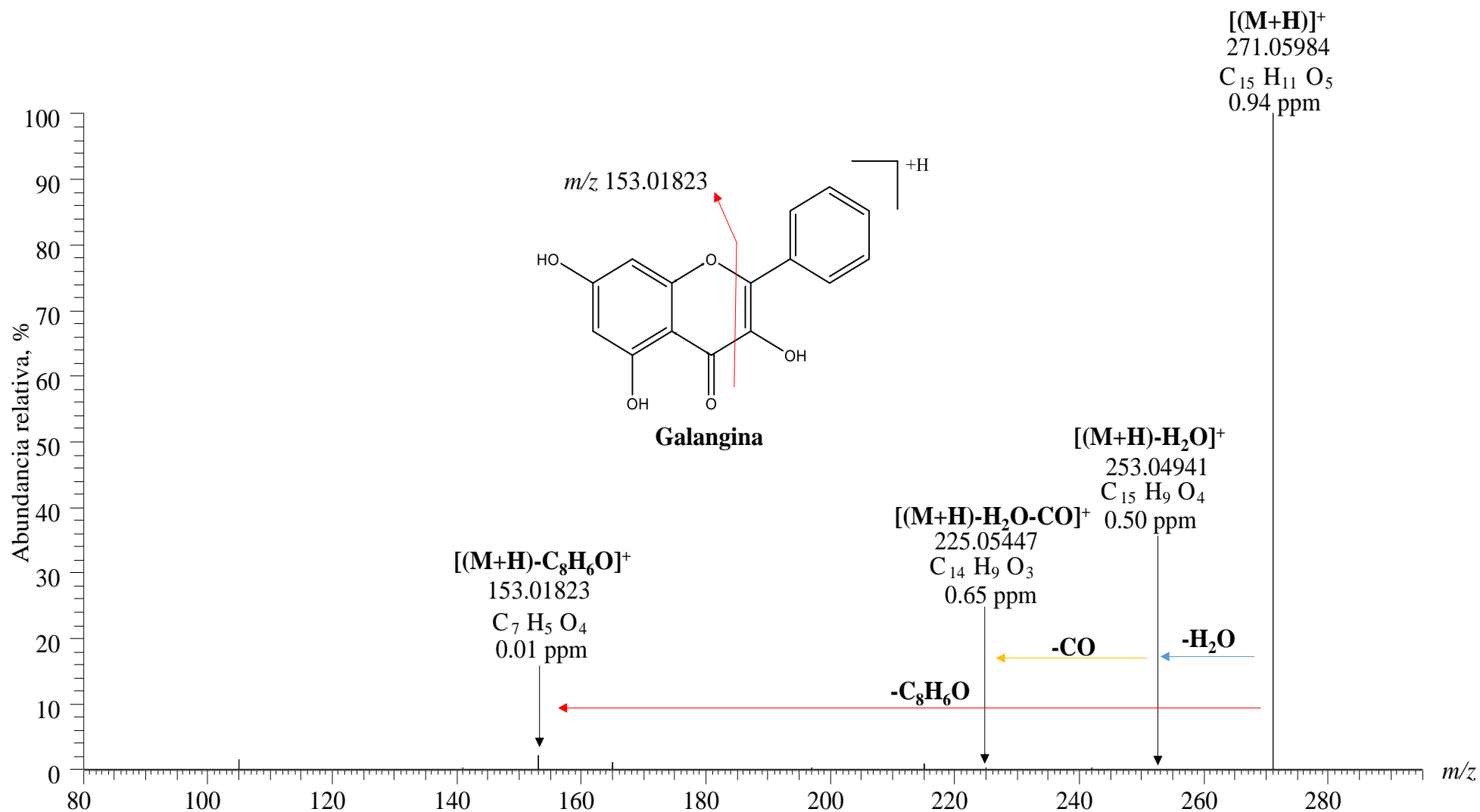
Espectro de masas de la pinocembrina ( $m/z$  257.08060, 30 eV) presente en extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

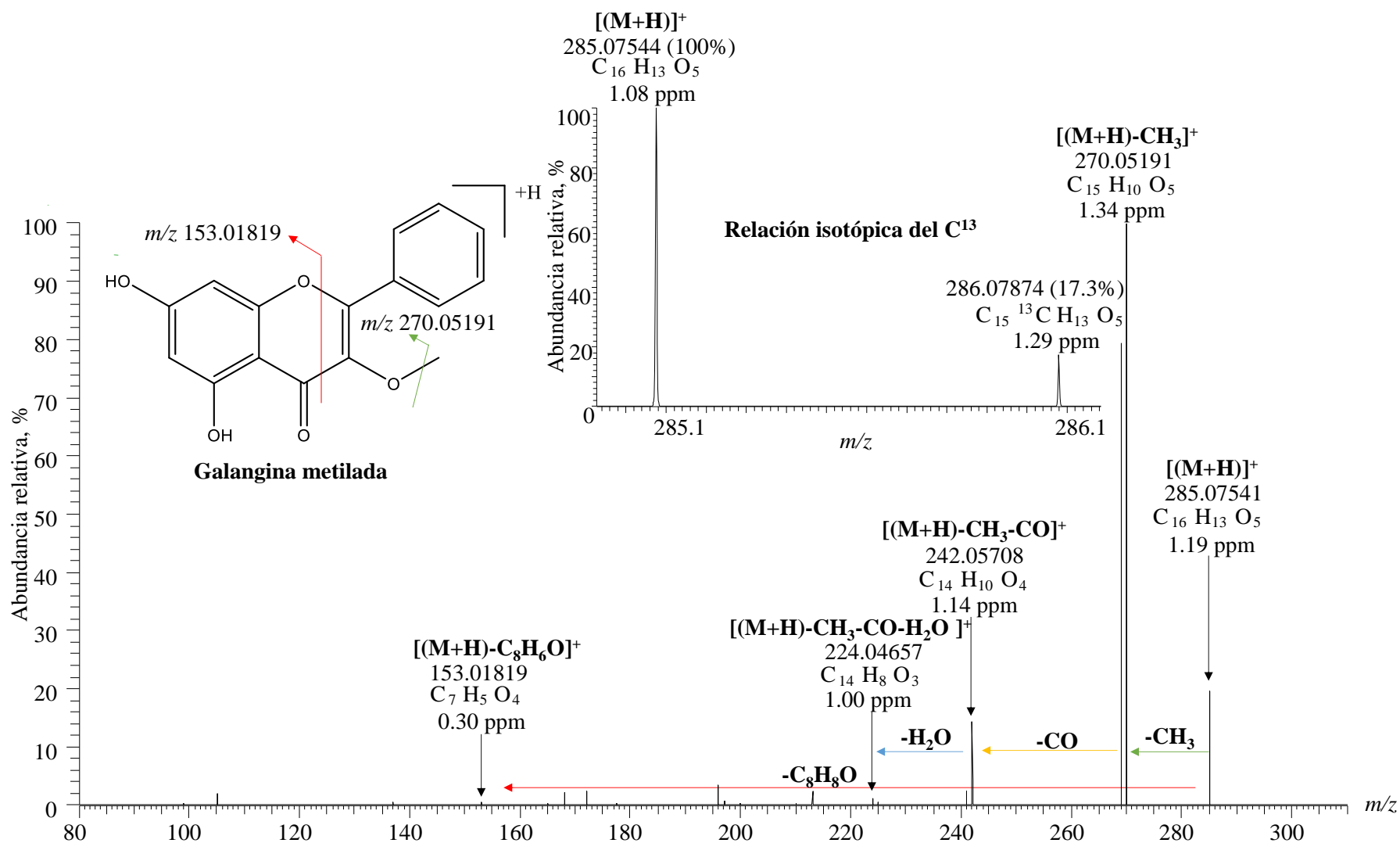
### Apéndice 15

Espectro de masas de la galangina ( $m/z$  271.05984, 40 eV) presente en extractos de *L. organoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



## Apéndice 16

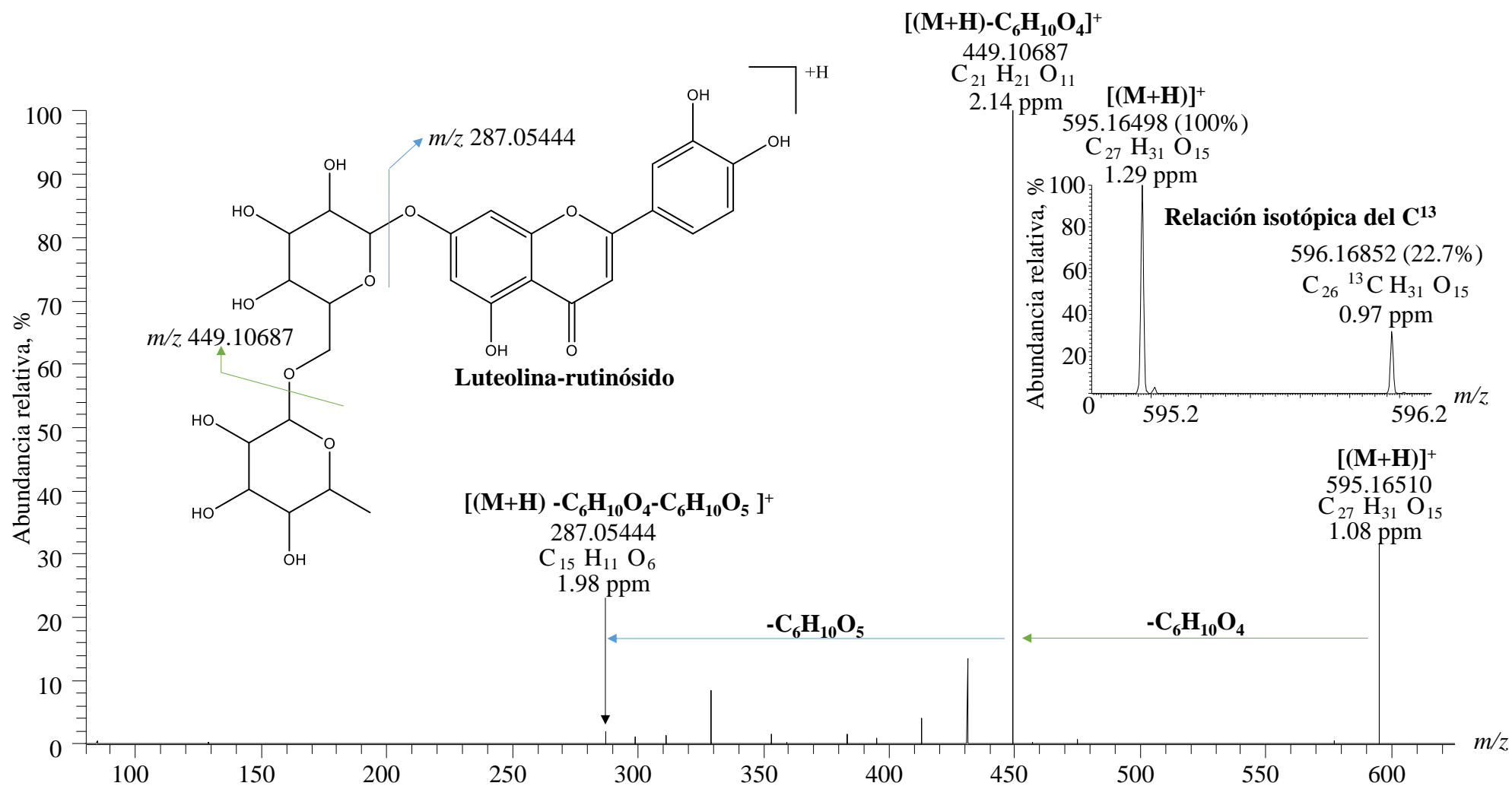
Espectro de masas de la galangina metilada ( $m/z$  285.07541, 50 eV) presente en los extractos de *L. origanoides* quimiotipo felandreno, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 2**.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndice 17

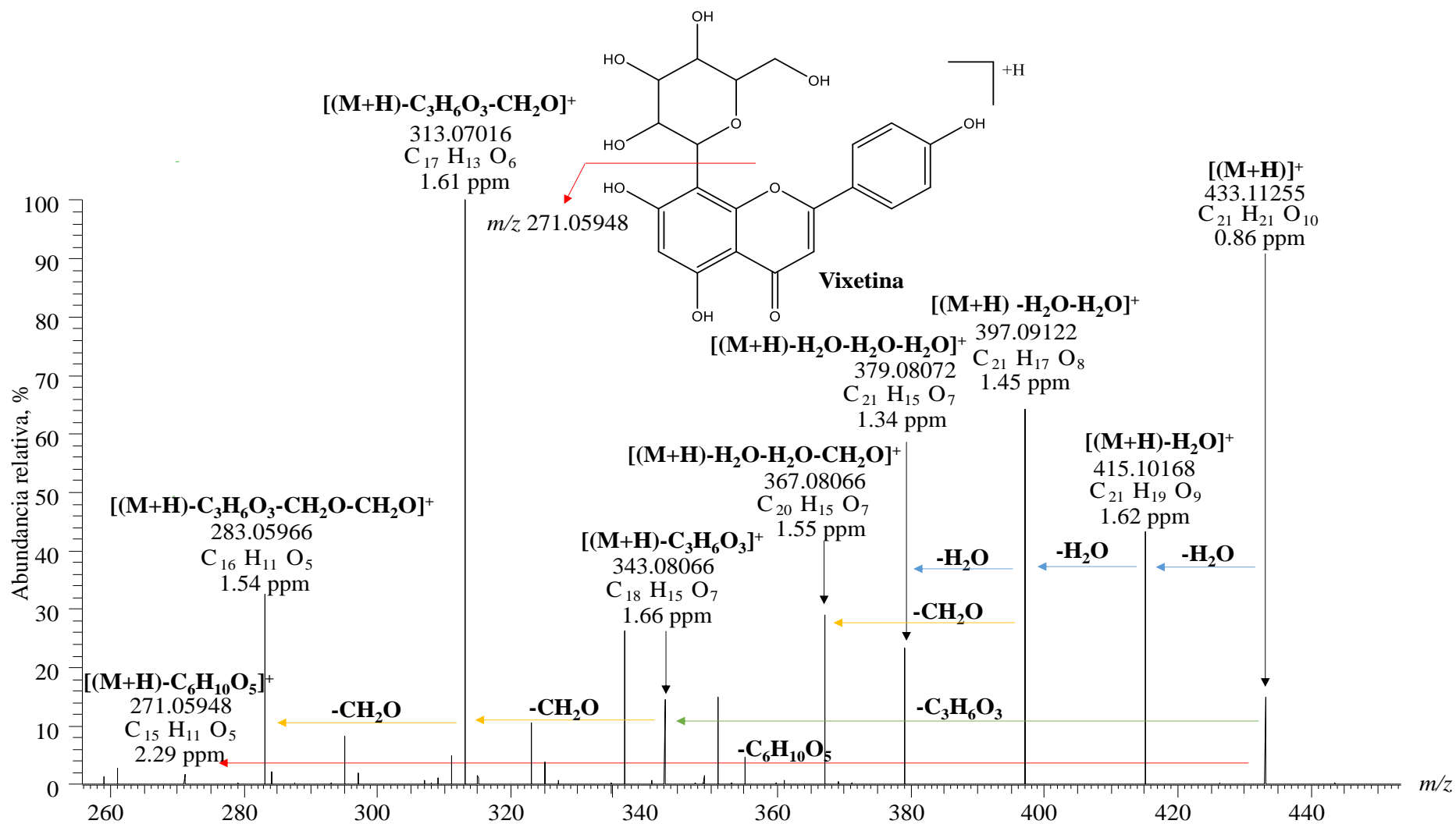
Espectro de masas de la luteolina-rutinósido ( $m/z$  595.16510, 10 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndice 18

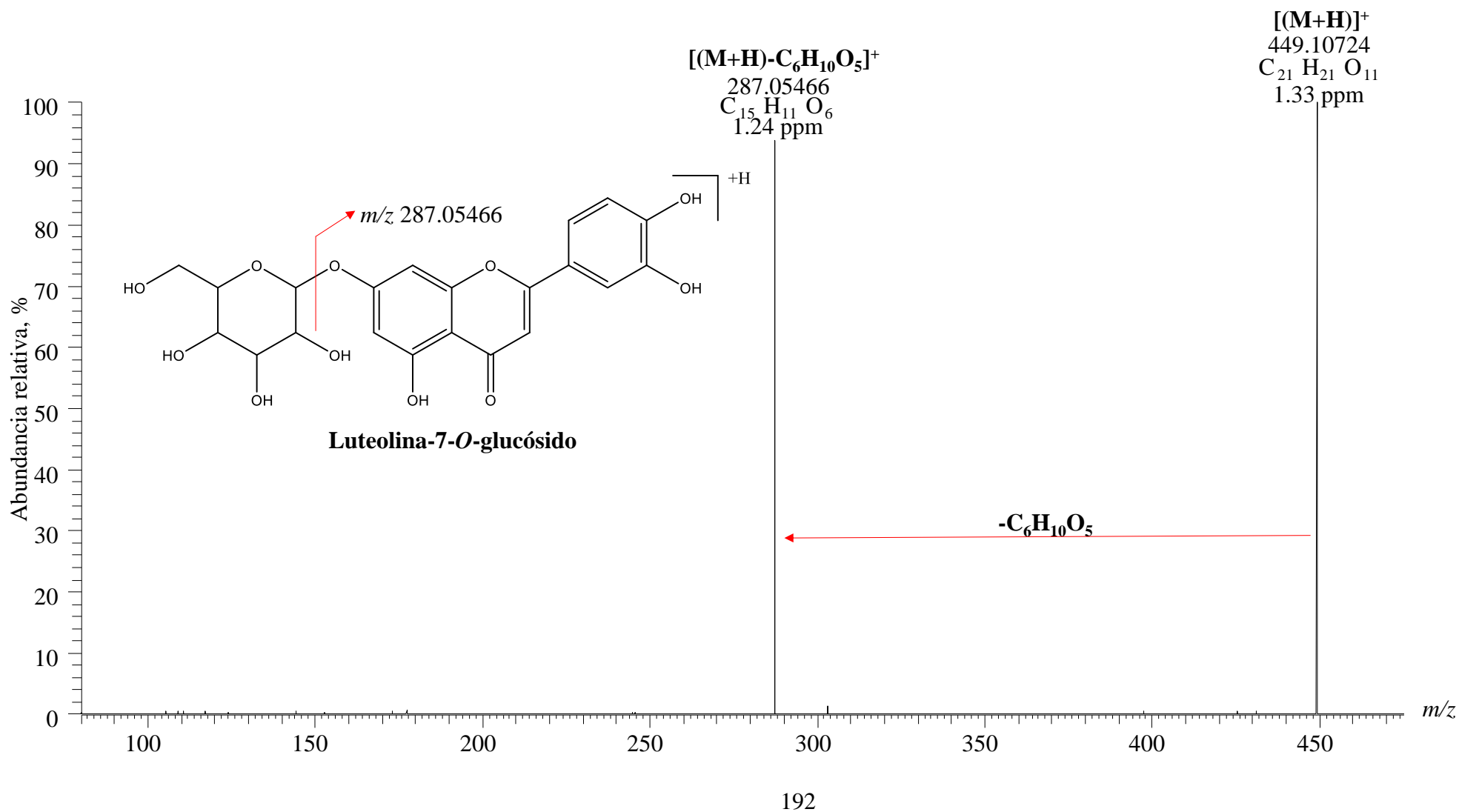
Espectro de masas de la vitexina ( $m/z$  433.11255, 30 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 19

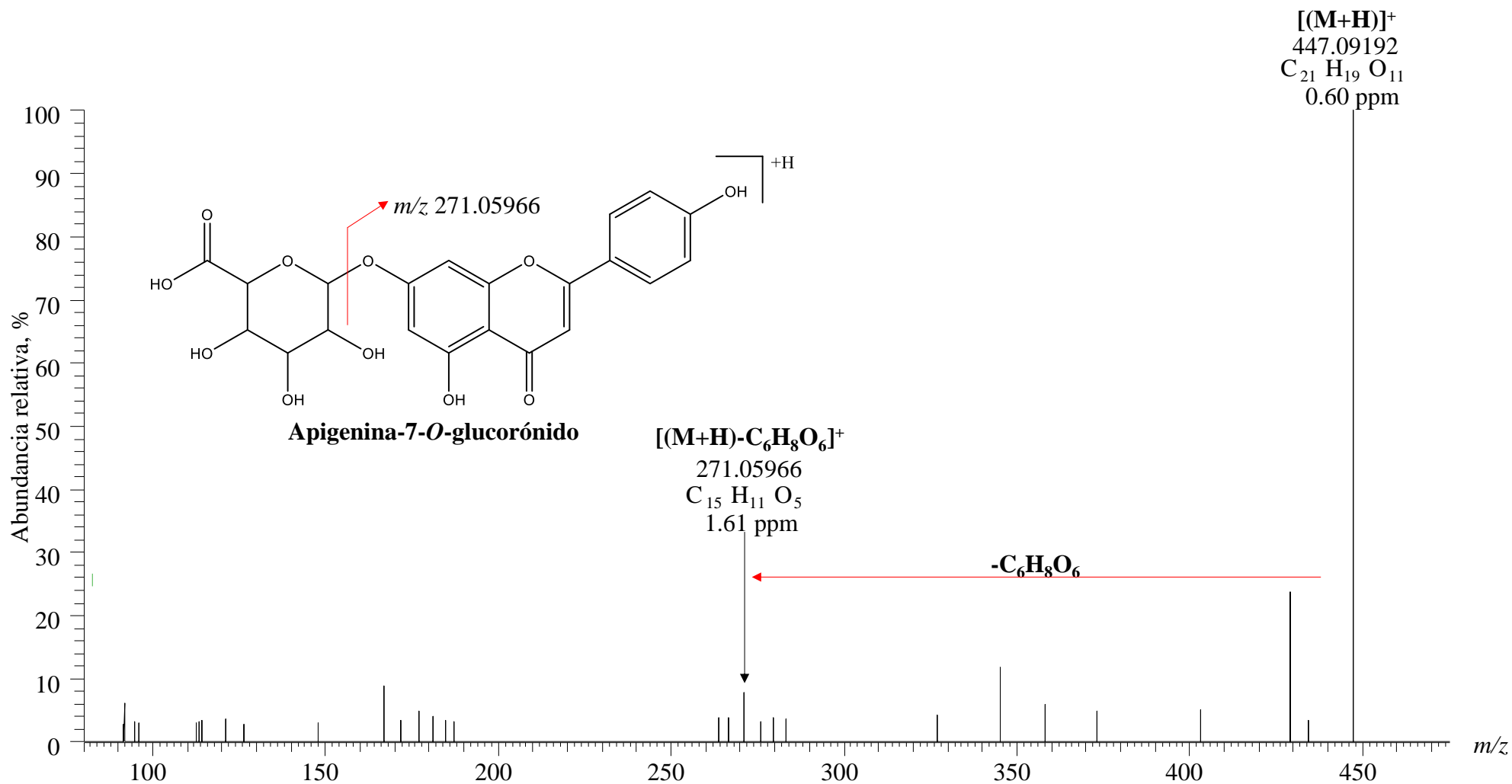
Espectro de masas de la luteolina-7-O-glucósido ( $m/z$  449.10724, 10 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 20

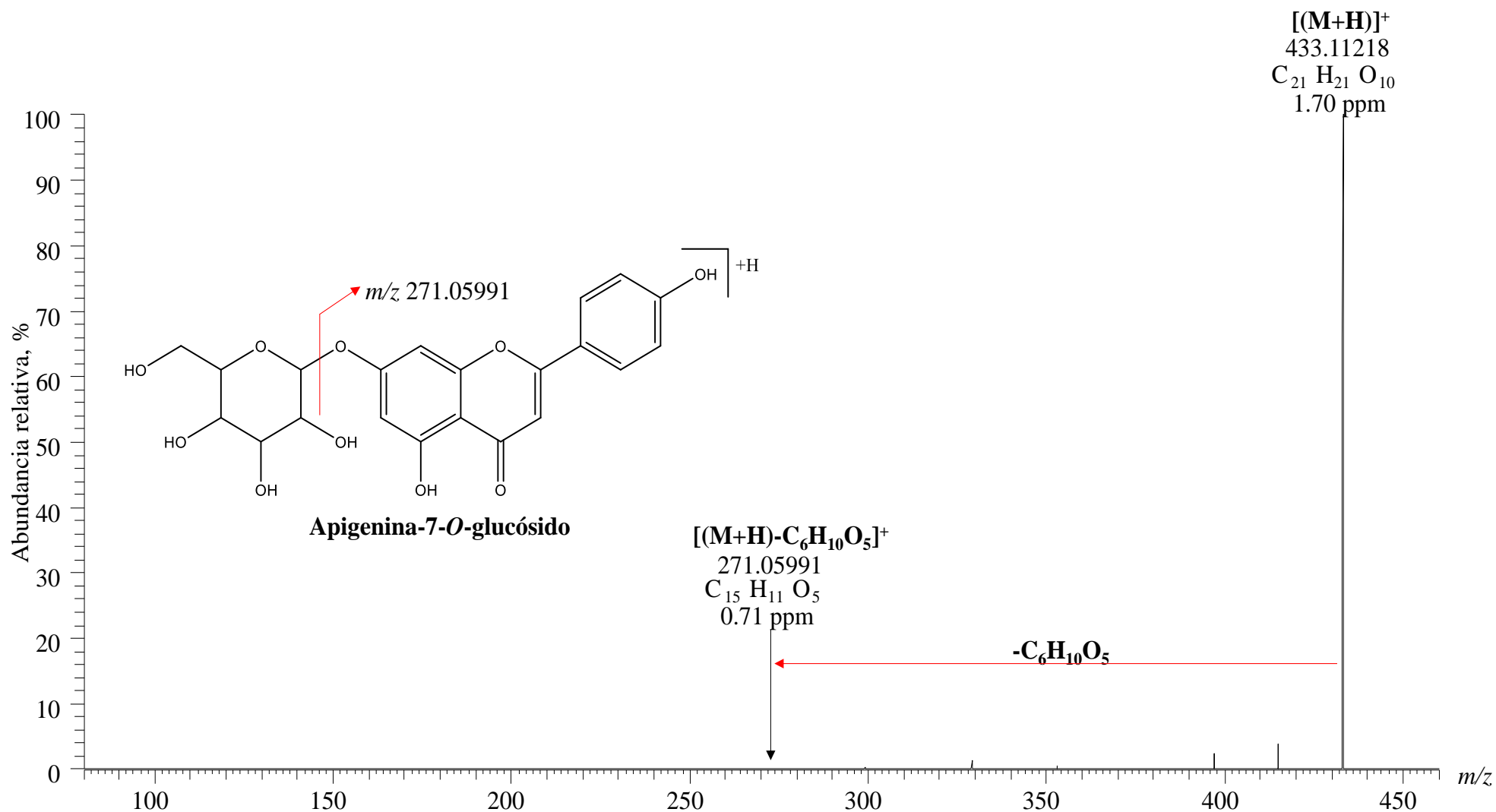
Espectro de masas de la apigenina-7-*O*-glucorónido ( $m/z$  447.09192, 20 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 21

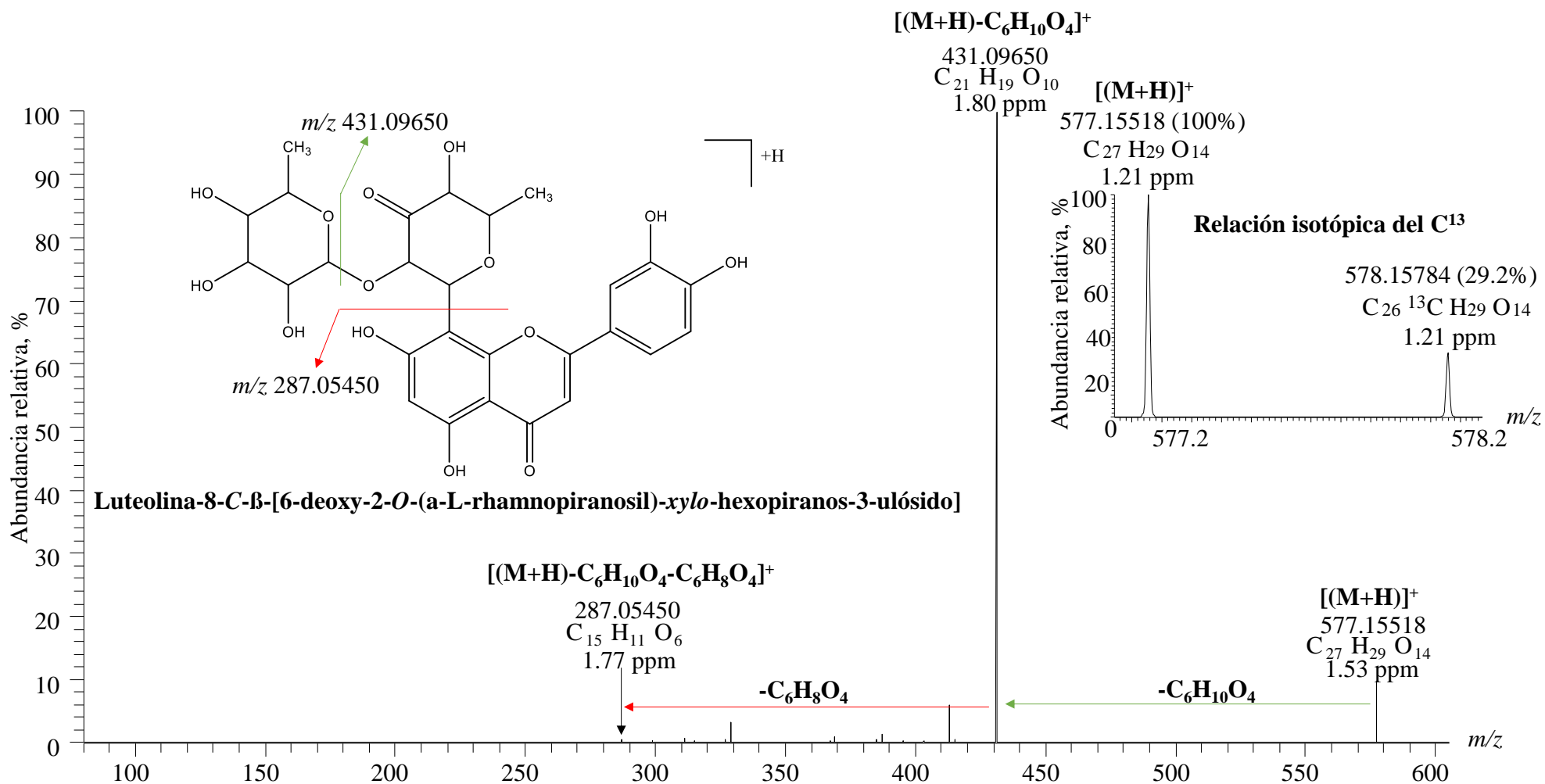
Espectro de masas de la apigenina-7-O-glucósido ( $m/z$  433.11218, 10 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 22

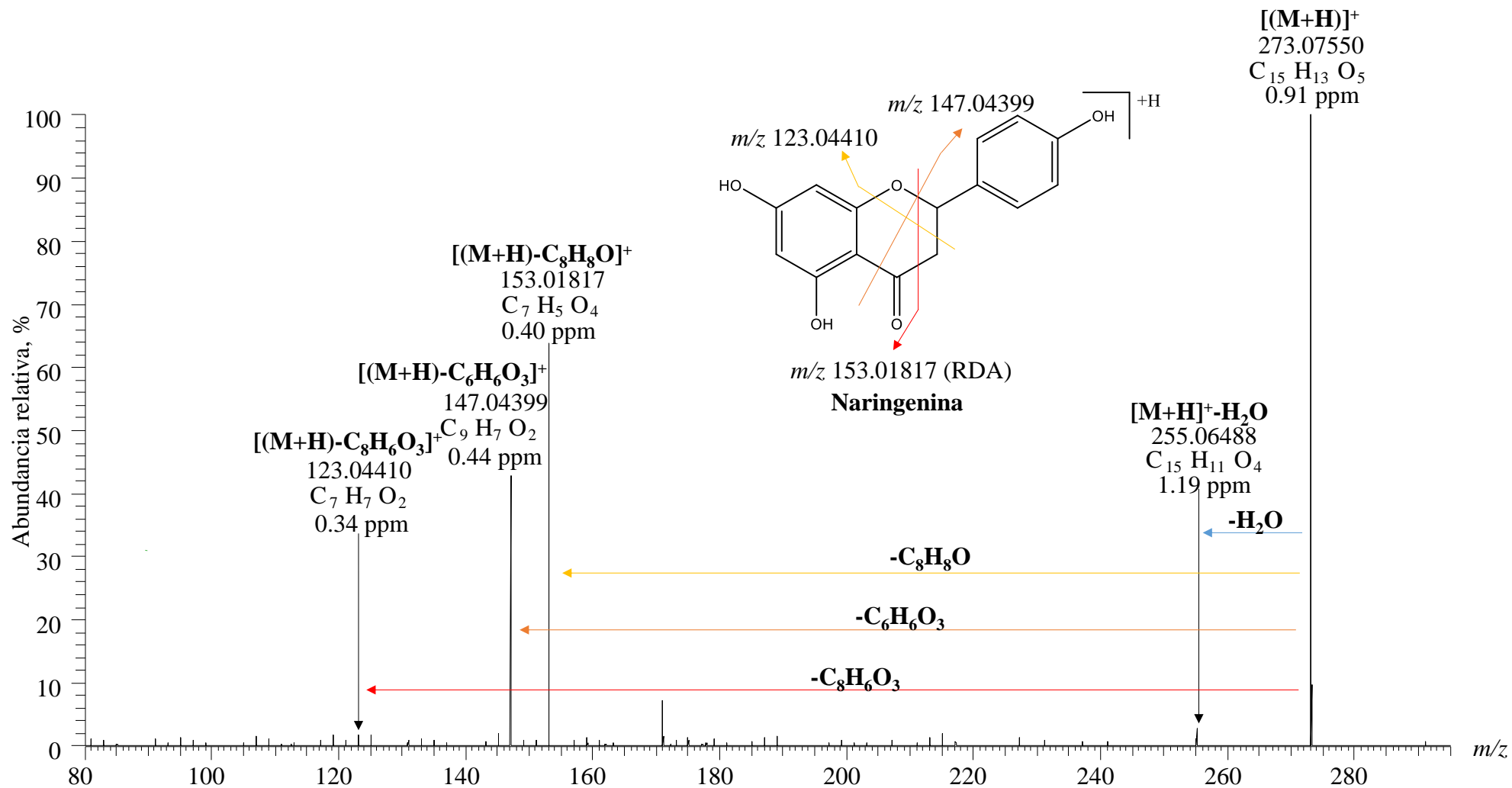
Espectro de masas de la luteolina-8-C-β-[6-deoxy-2-O-(α-L-rhamnopiranosil)-xylo-hexopiranos-3-ulósido] (*m/z* 577.15518, 20 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Apéndice 23**

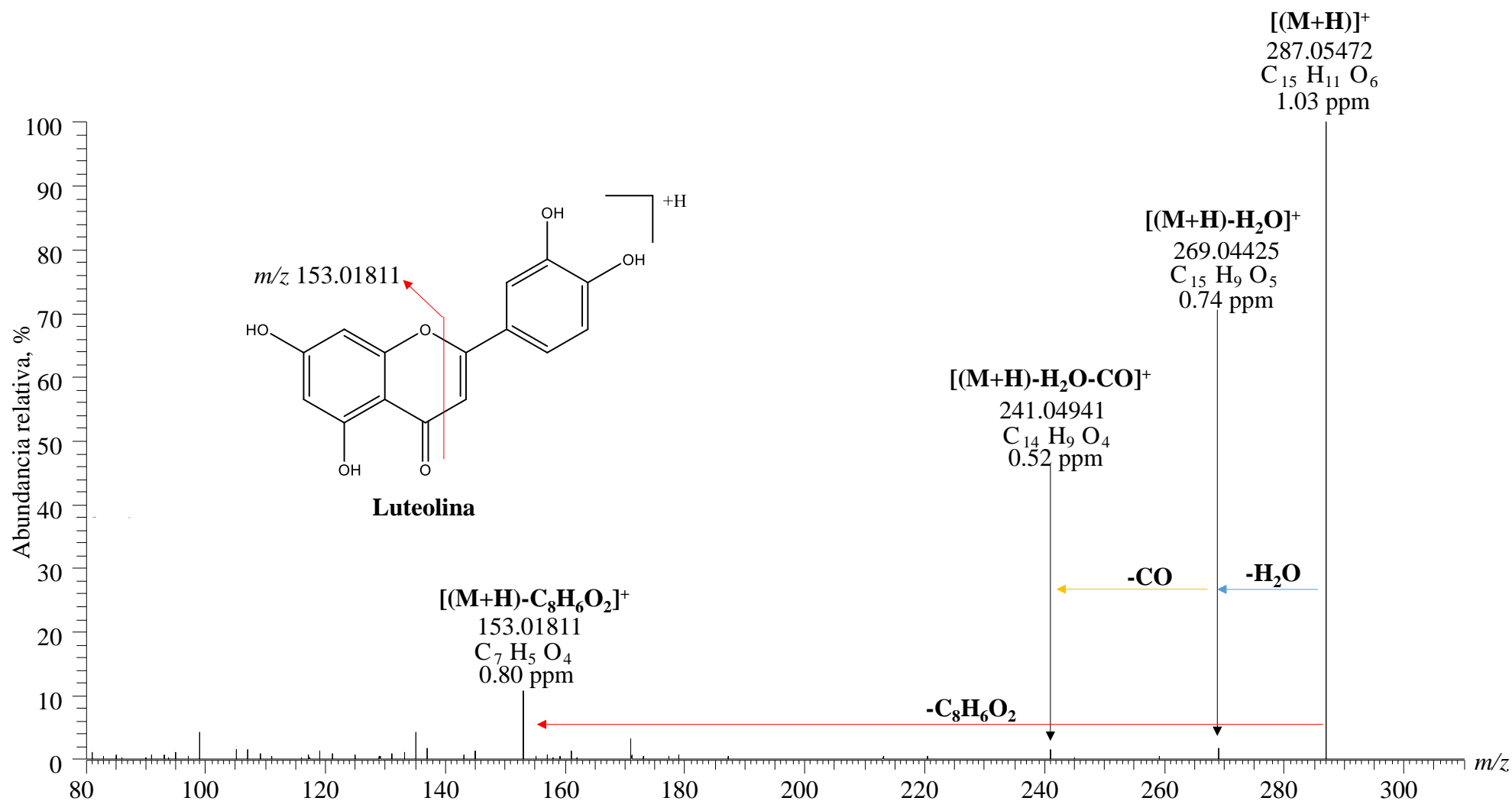
Espectro de masas de la naringenina ( $m/z$  273.07550, 30 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 24

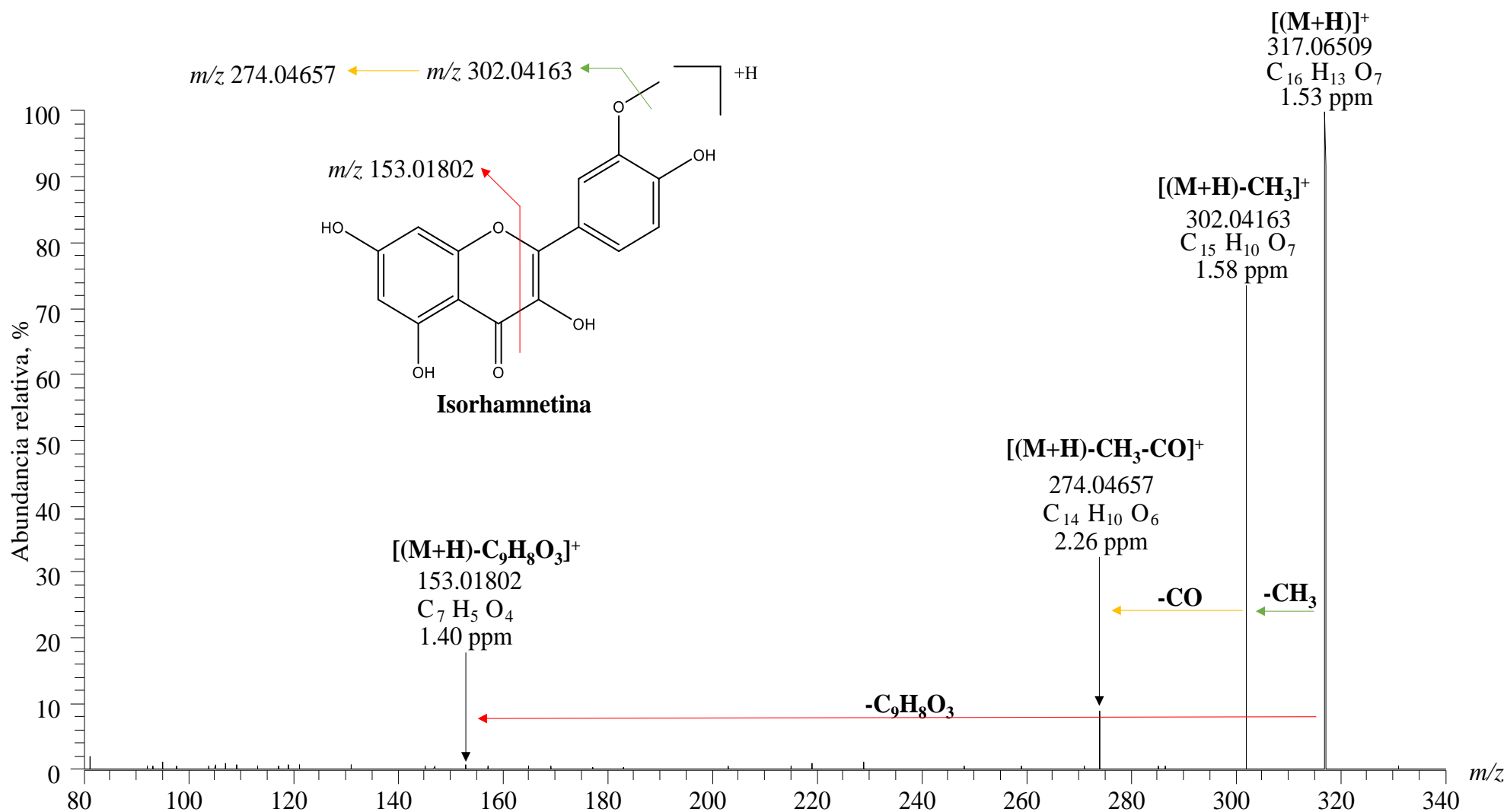
Espectro de masas de la luteolina ( $m/z$  287.05472, 50 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 25

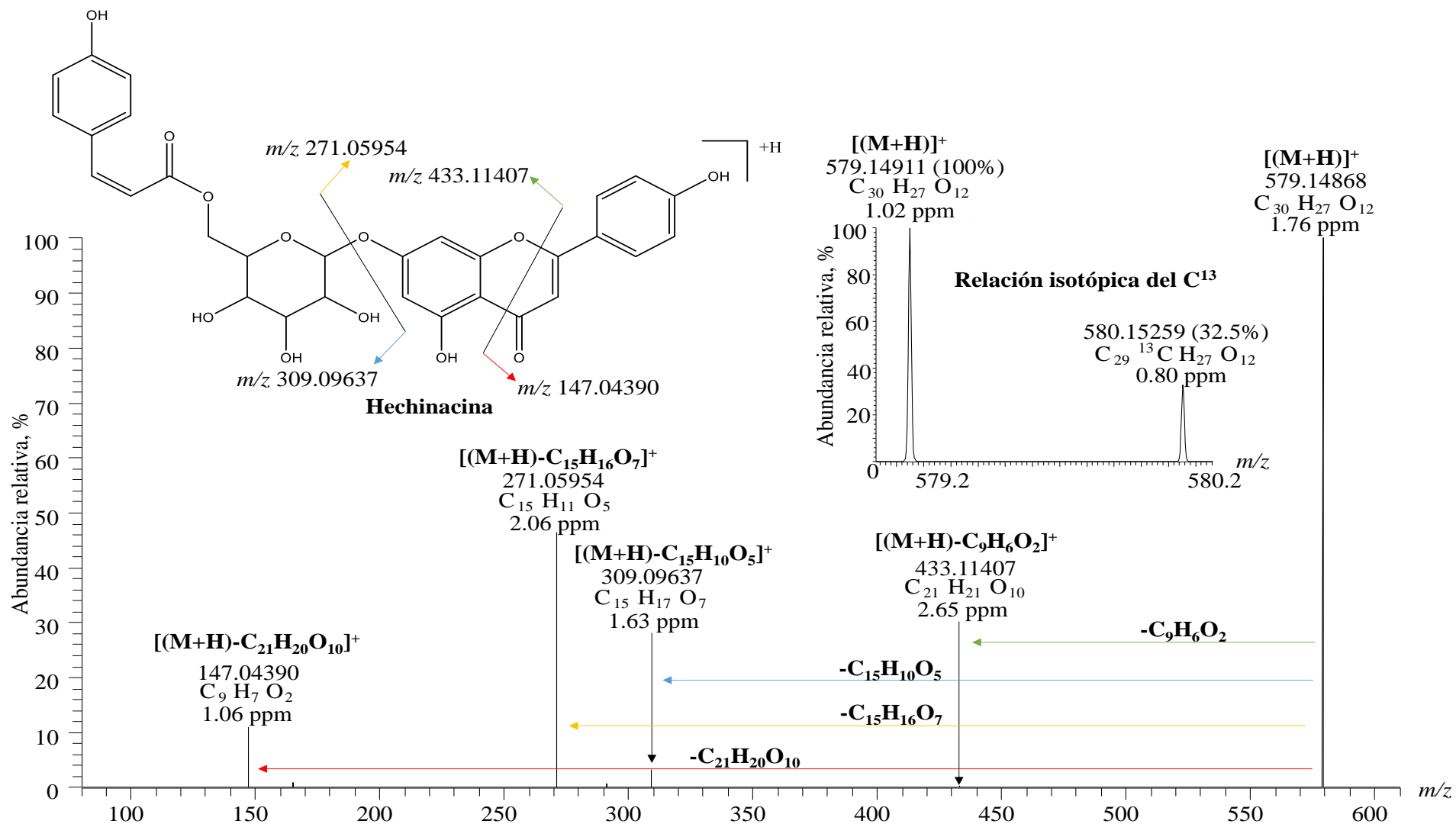
Espectro de masas de la isorhamnetina ( $m/z$  317.06509, 40 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 26

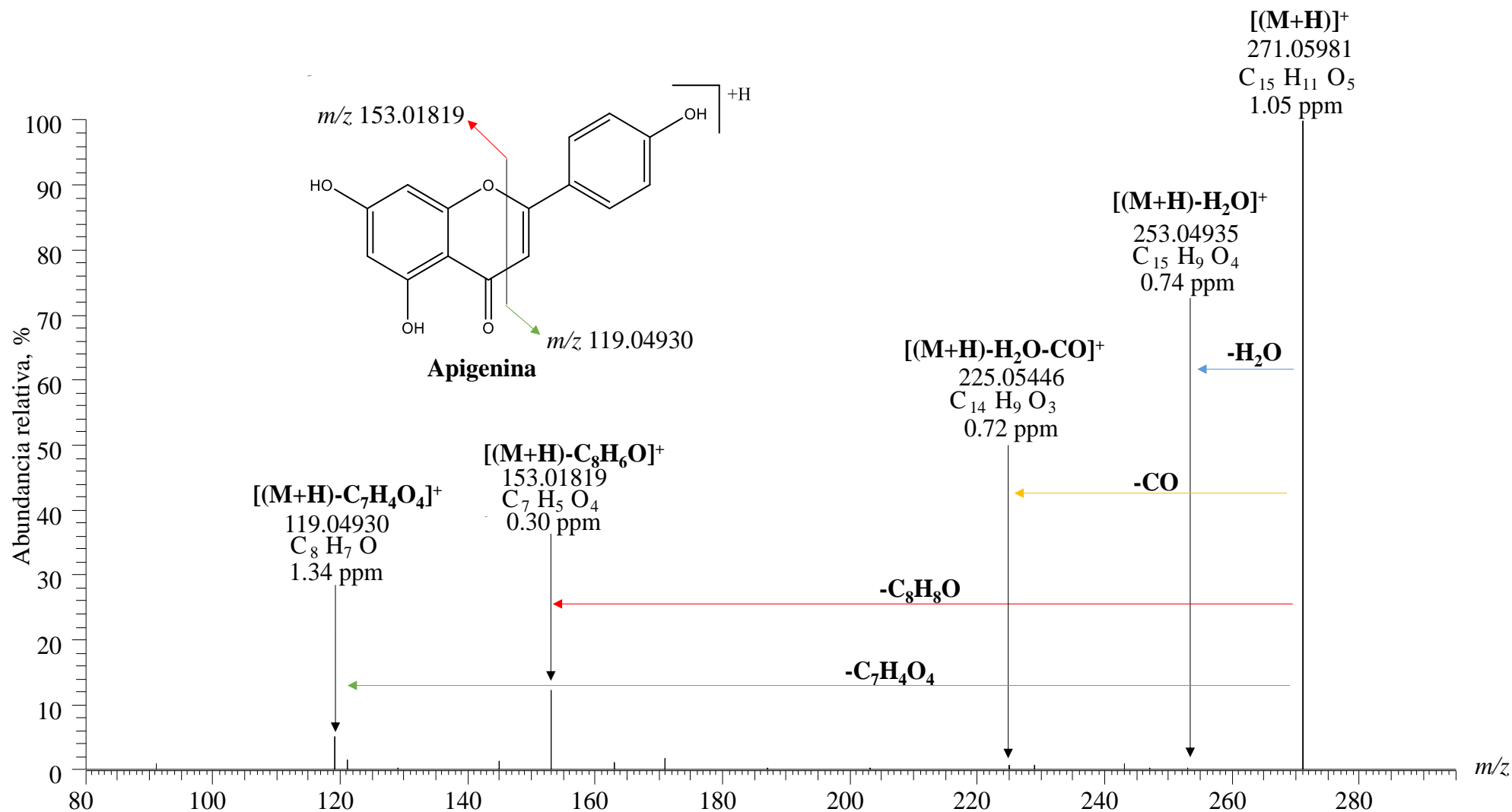
Espectro de masas de la hechinacina ( $m/z$  579.14868, 10 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 27

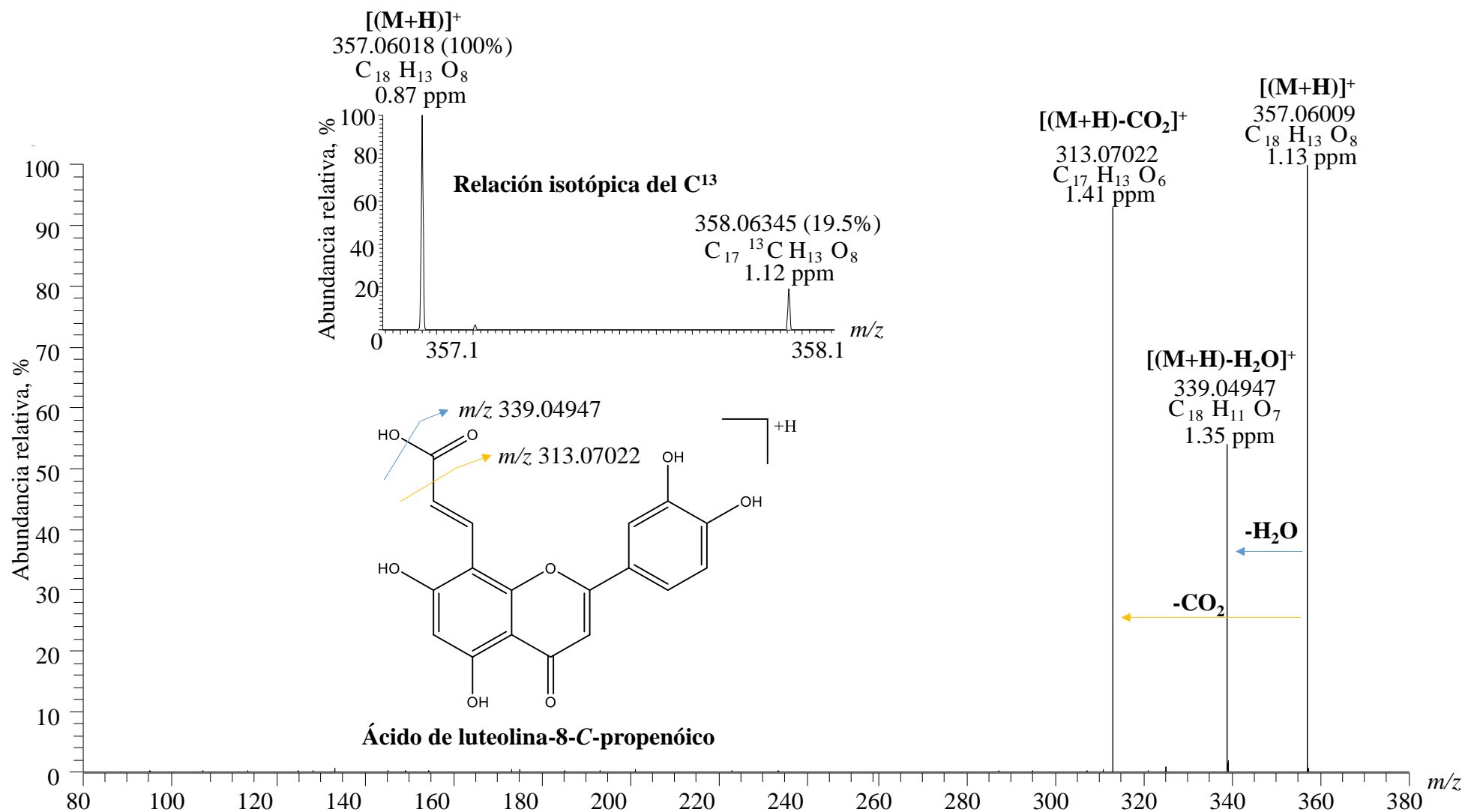
Espectro de masas de la apigenina ( $m/z$  271.05981, 50 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 28

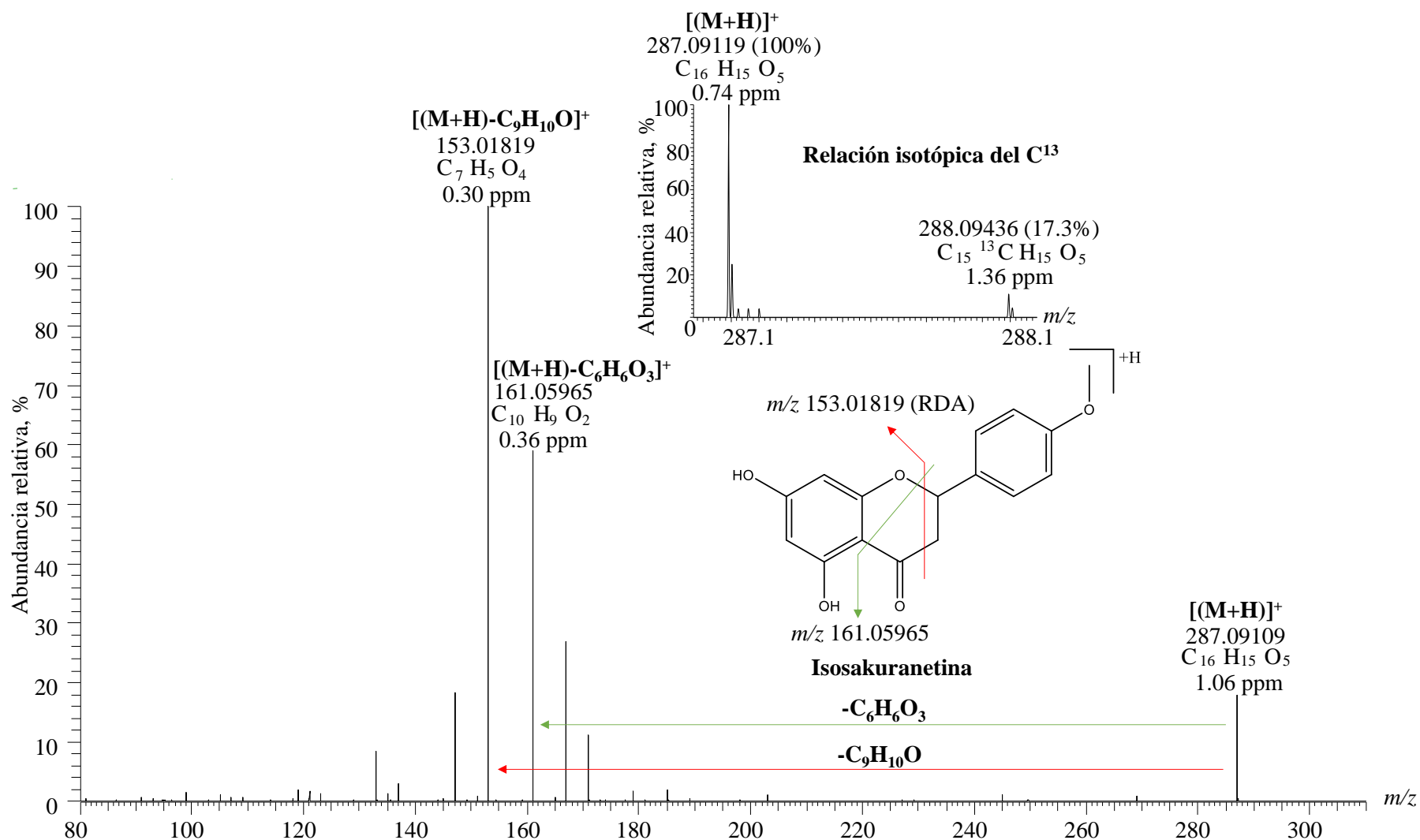
Espectro de masas del ácido de luteolina-8-C-propenónico ( $m/z$  357.06009, 20 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndice 29

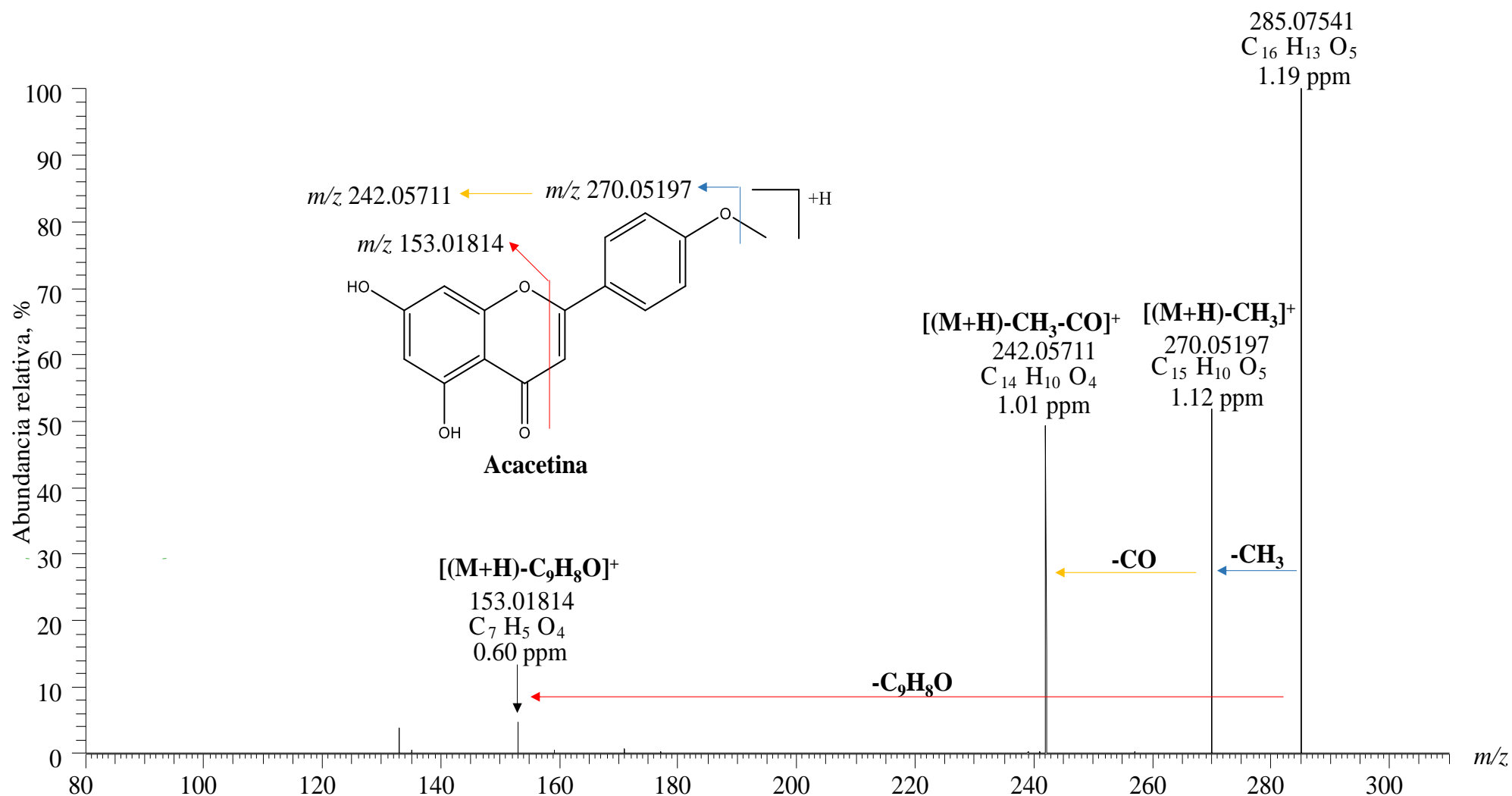
Espectro de masas de la isosakuranetina ( $m/z$  289.09109, 40 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 30

Espectro de masas de la acetina ( $m/z$  285.07541, 50 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.

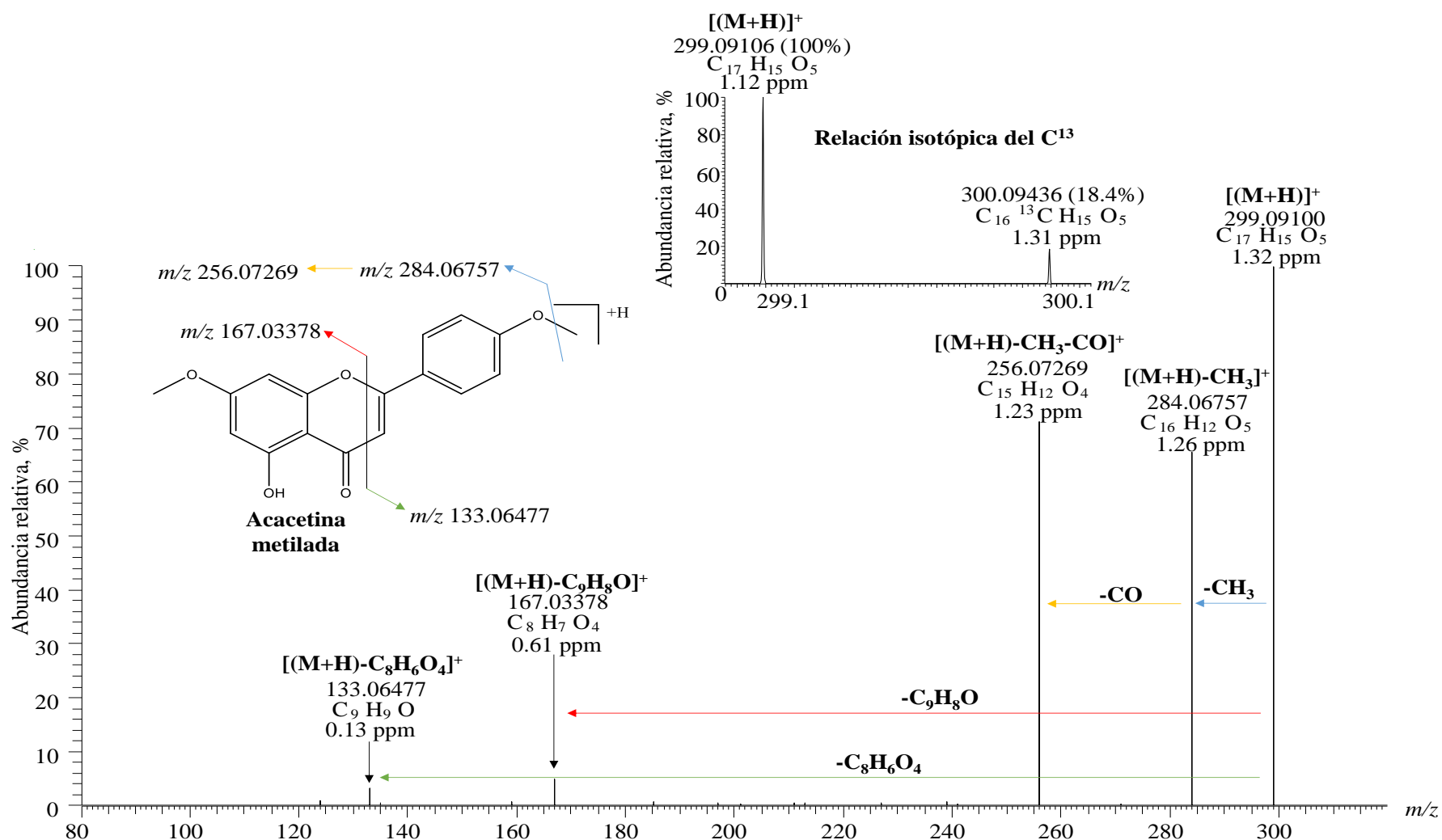




## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 32

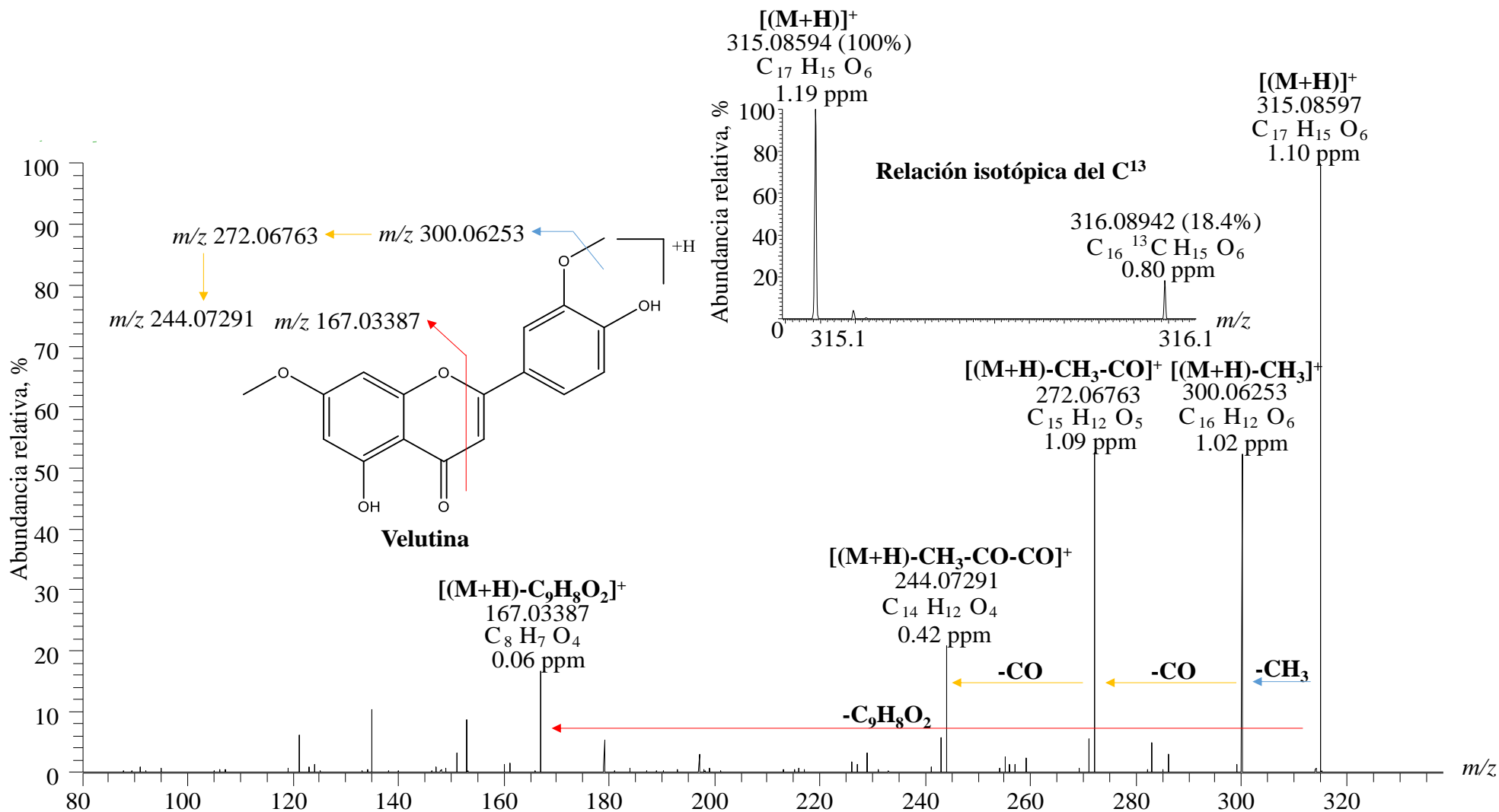
Espectro de masas de la acetina metilada ( $m/z$  299.09100, 40 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndice 33

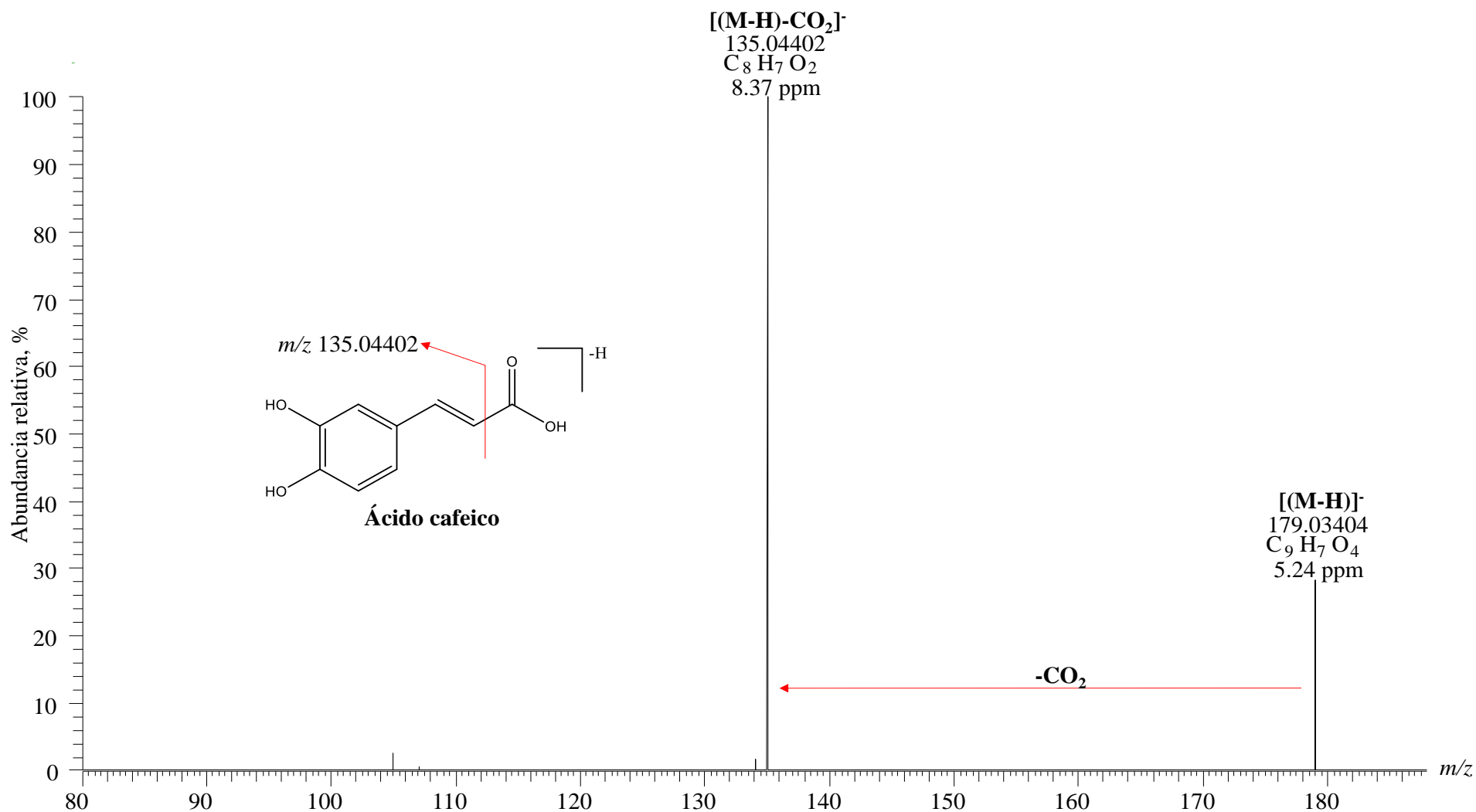
Espectro de masas de la velutina ( $m/z$  315.08597, 50 eV) presente en los extractos de *T. diffusa*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 3**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 34

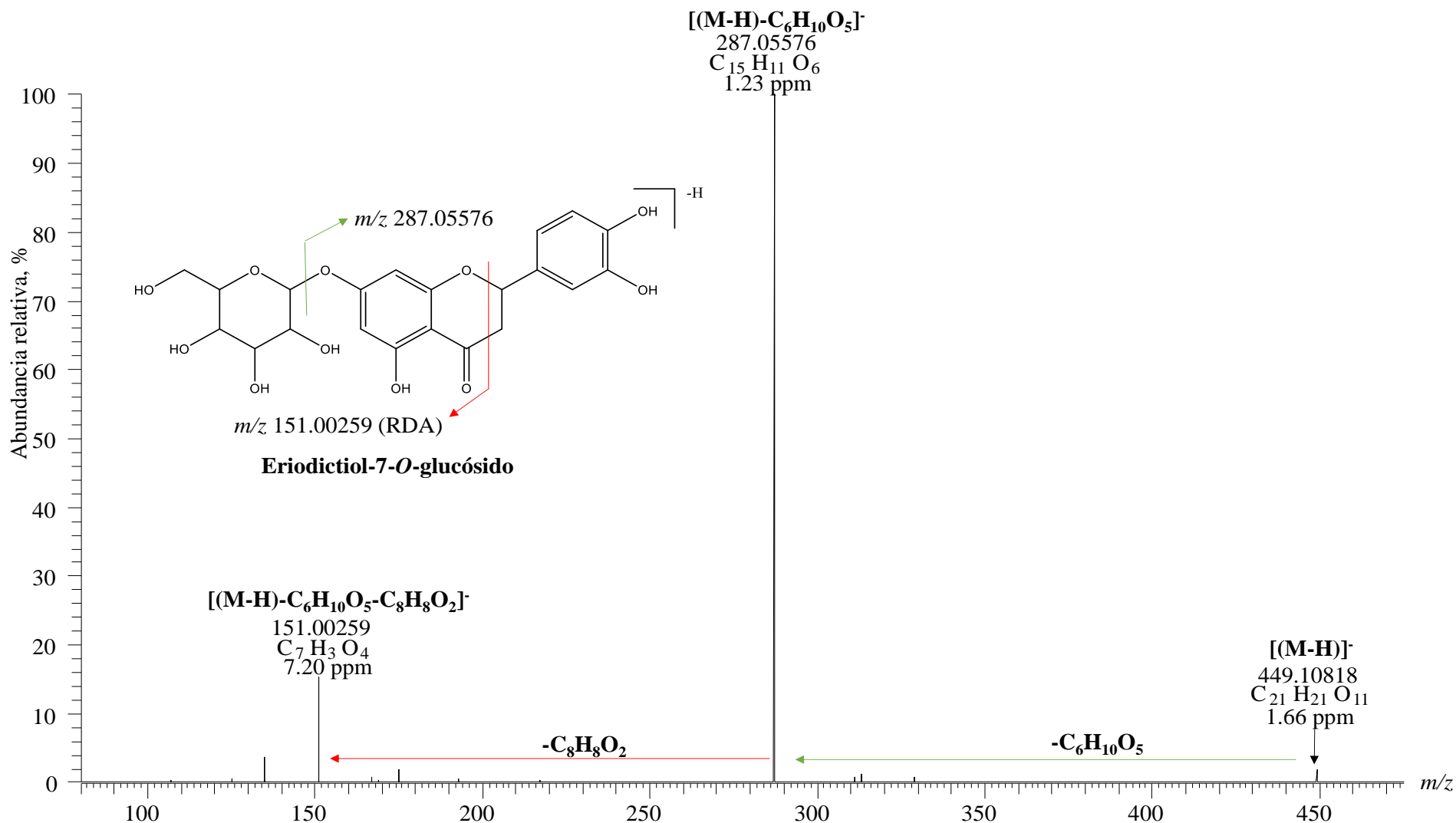
Espectro de masas del ácido cafeico ( $m/z$  179.03404, 20 eV) presente en los extractos de *V. curassavica*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 4**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 35

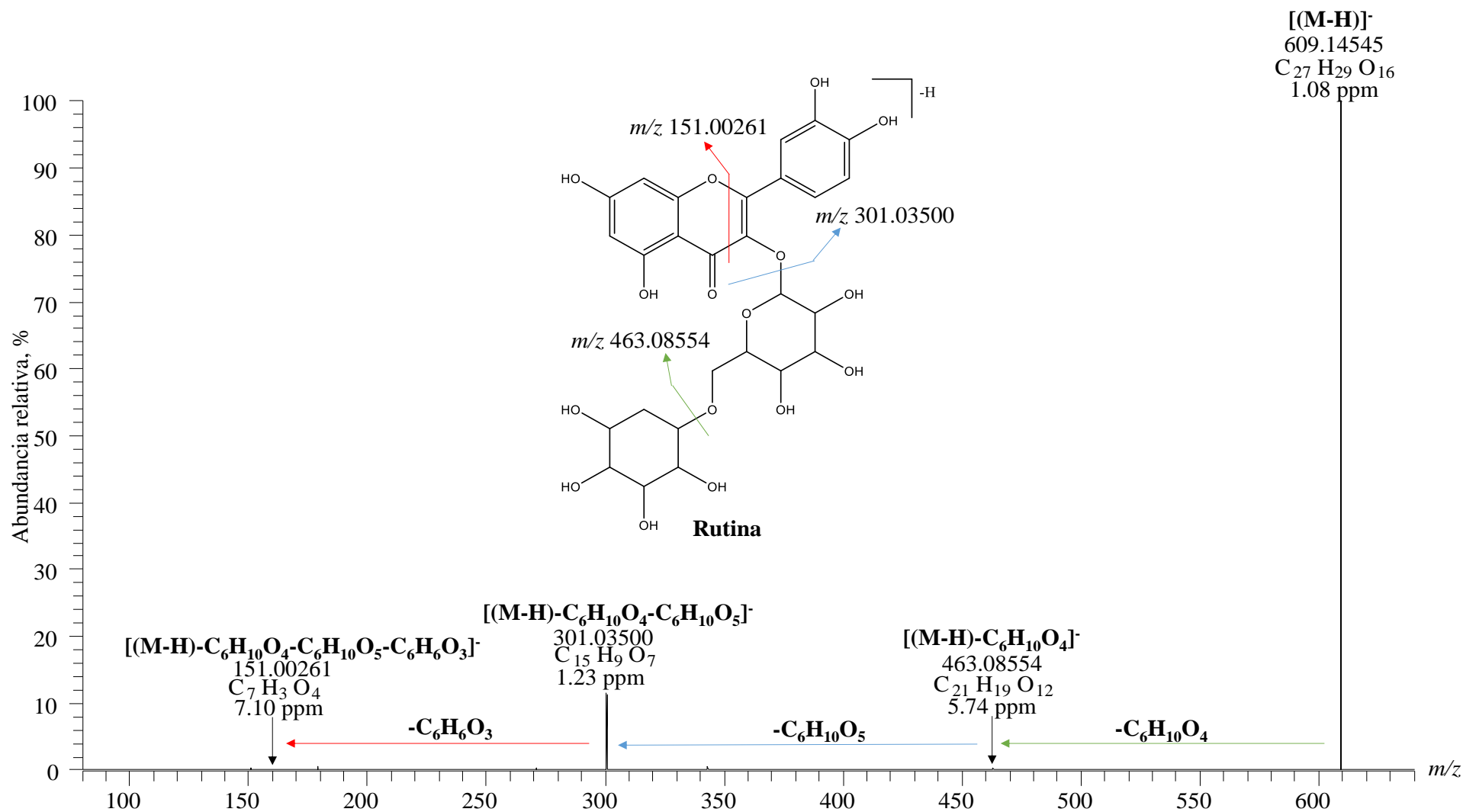
Espectro de masas del eriodictiol-7-*O*-glucósido ( $m/z$  449.10818, 20 eV) presente en los extractos de *V. curassavica*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 4**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 36

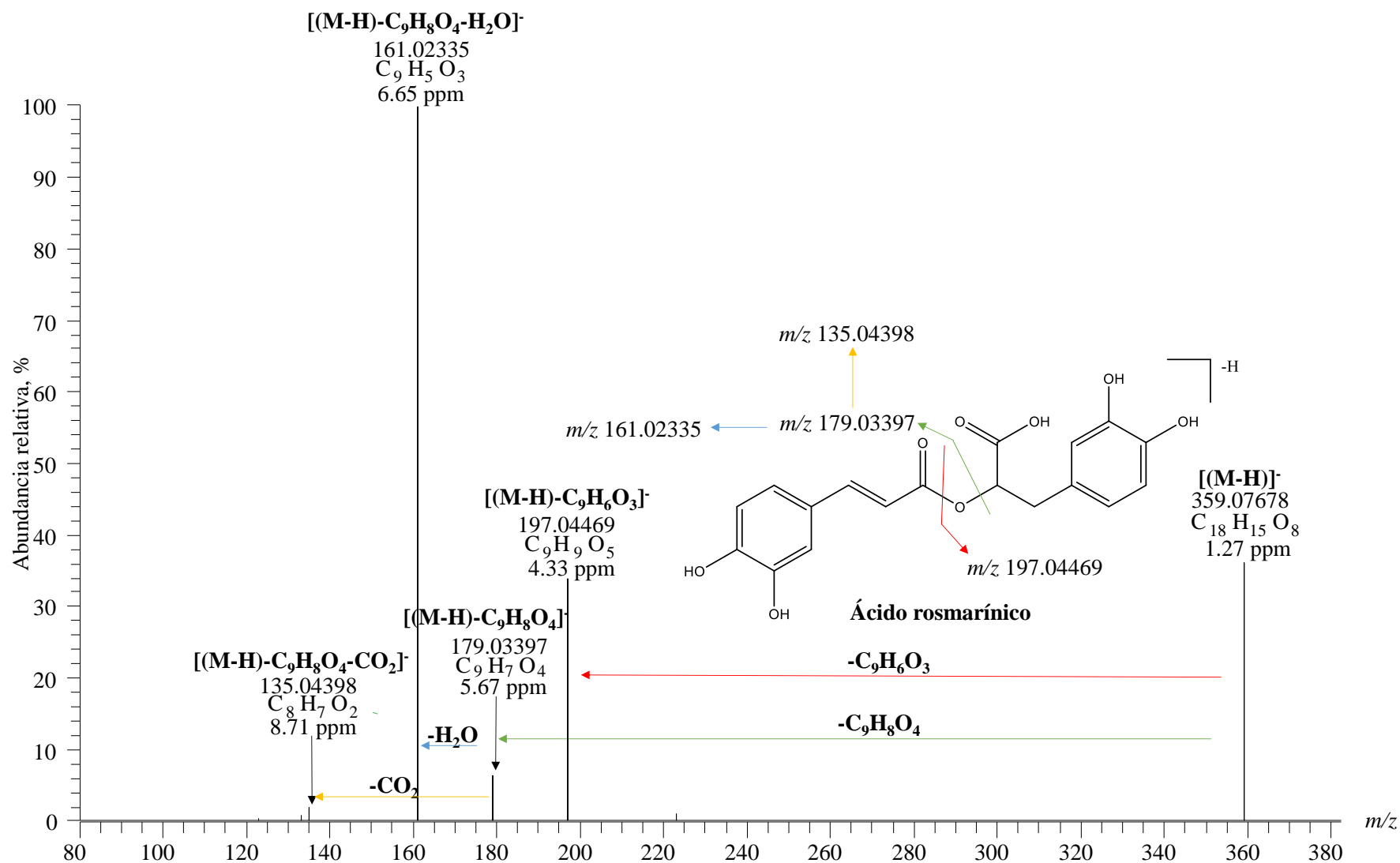
Espectro de masas de la rutina ( $m/z$  609.14545, 20 eV) presente en los extractos de *V. curassavica*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 4**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 37

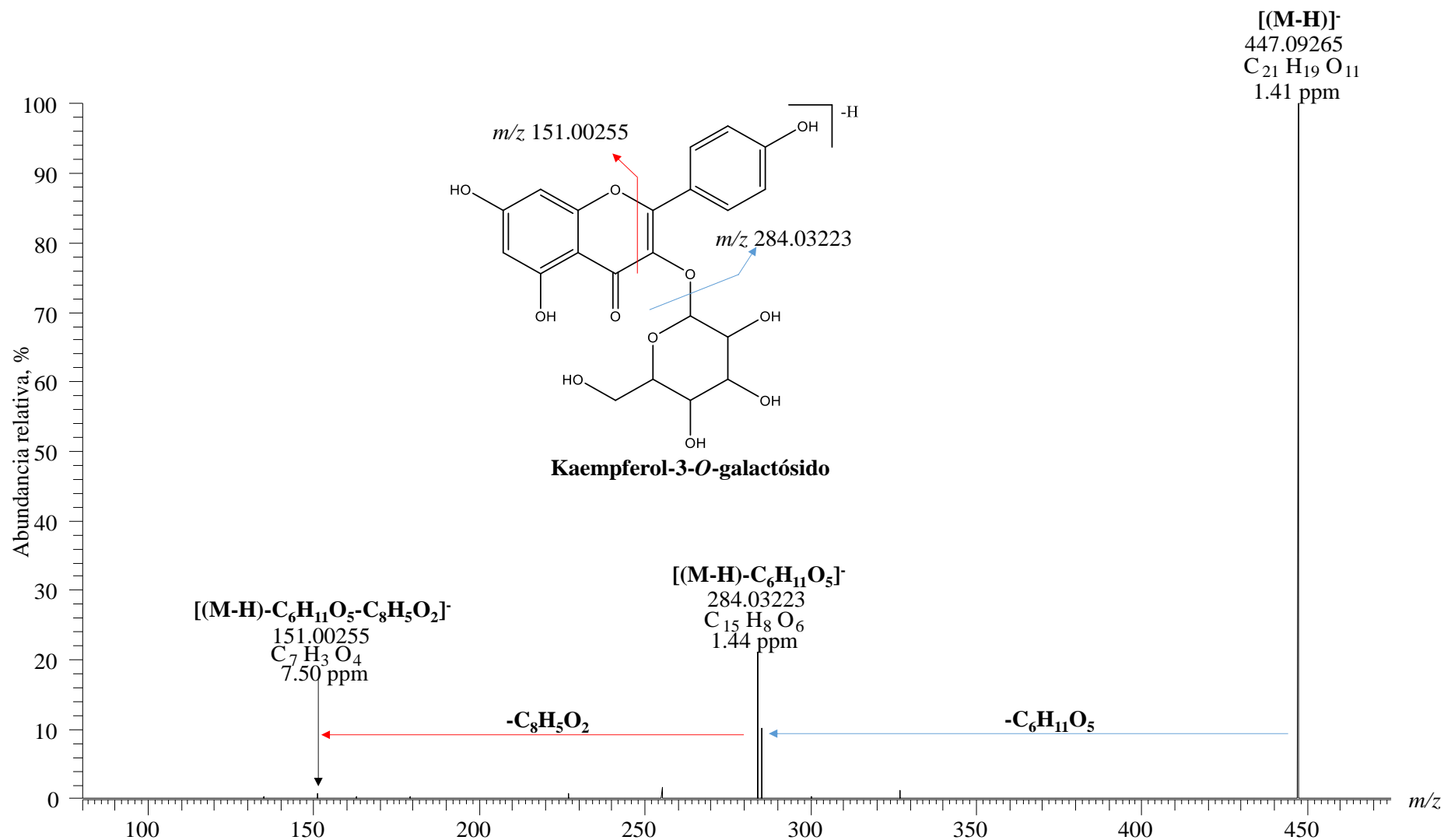
Espectro de masas del ácido rosmarínico ( $m/z$  359.07678, 10 eV) presente en los extractos de *V. curassavica*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 4**.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndice 38

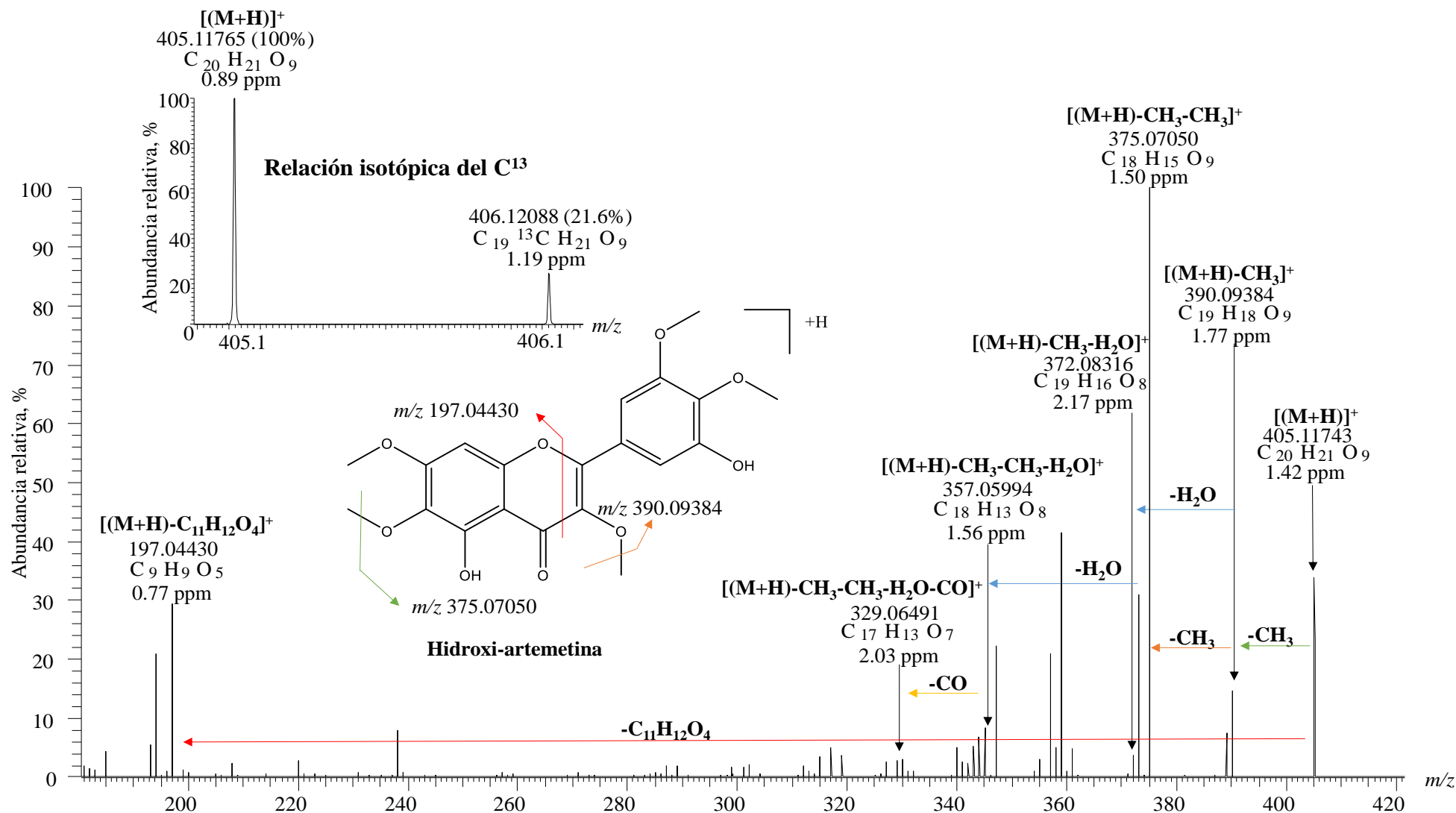
Espectro de masas del kaempferol-3-O-galactósido ( $m/z$  447.09265, 20 eV) presente en los extractos de *V. curassavica*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 4**.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndice 39

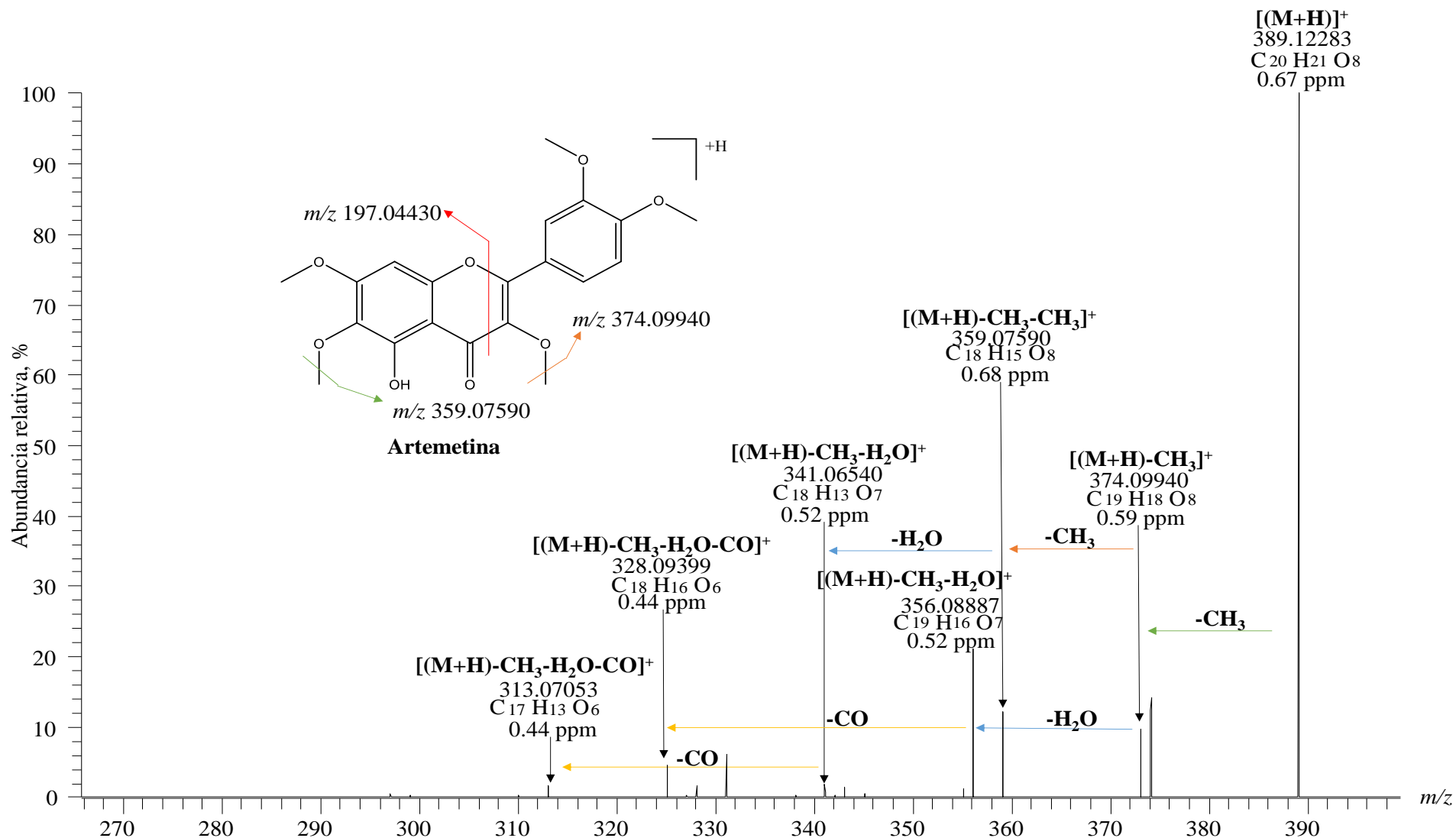
Espectro de masas de la hidroxi-artemetina ( $m/z$  405.11743, 40 eV) presente en los extractos de *V. curassavica*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 4**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 40

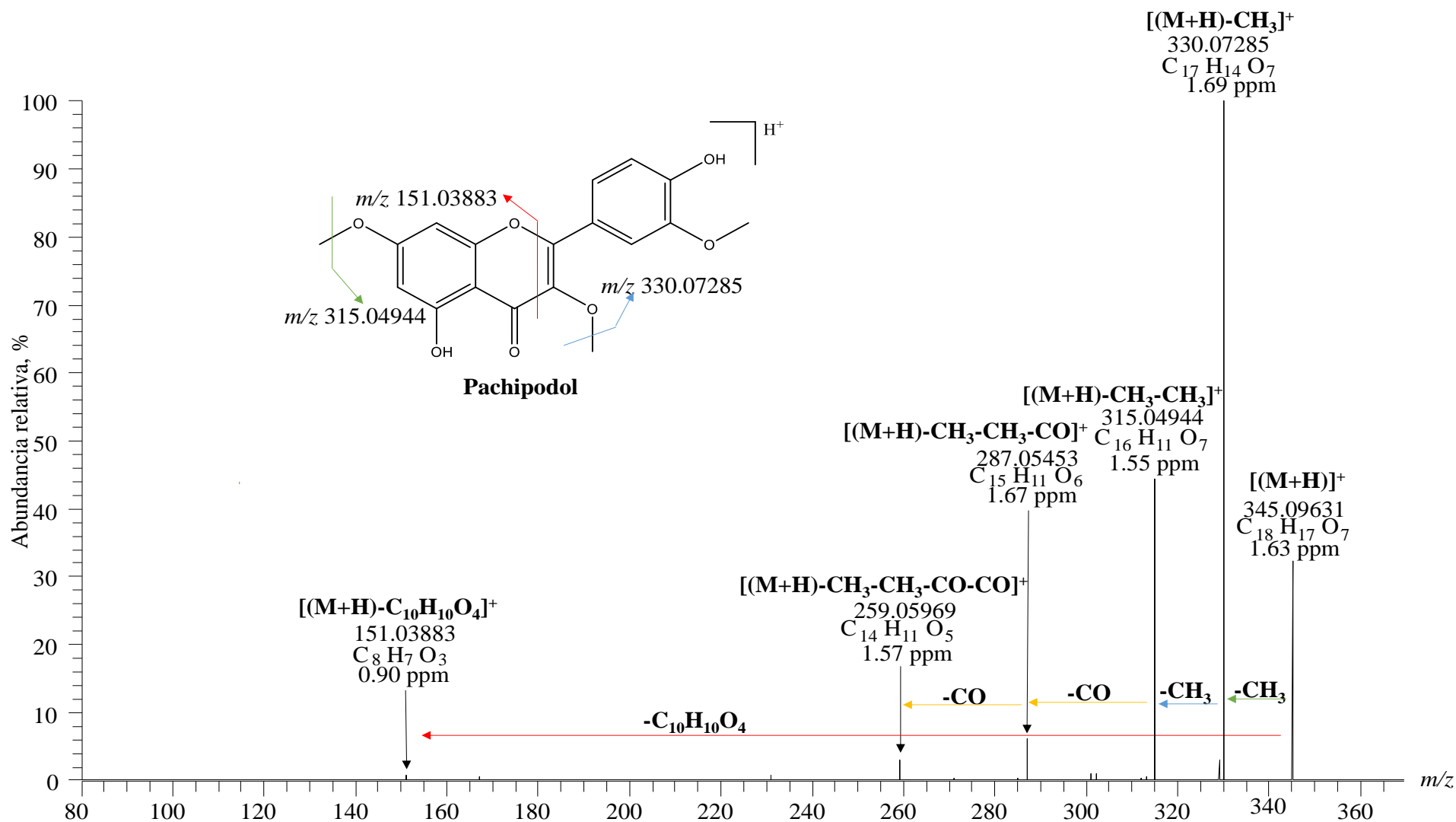
Espectro de masas de la artemetina ( $m/z$  359.12283, 30 eV) presente en los extractos de *V. curassavica*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 4**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

### Apéndice 41

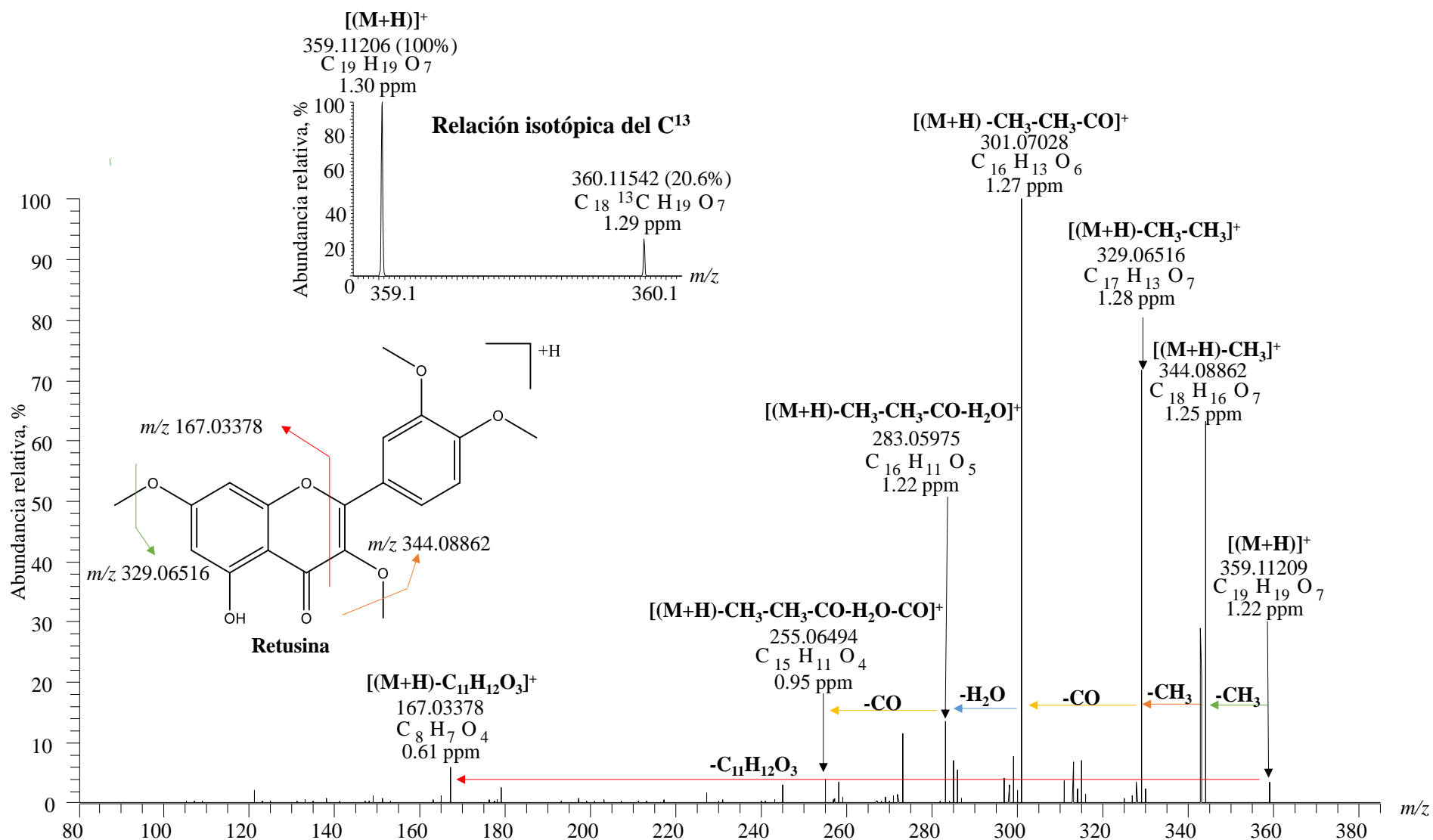
Espectro de masas del pachipodol ( $m/z$  345.09631, 30 eV) presente en los extractos de *V. curassavica*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 4**.



## FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

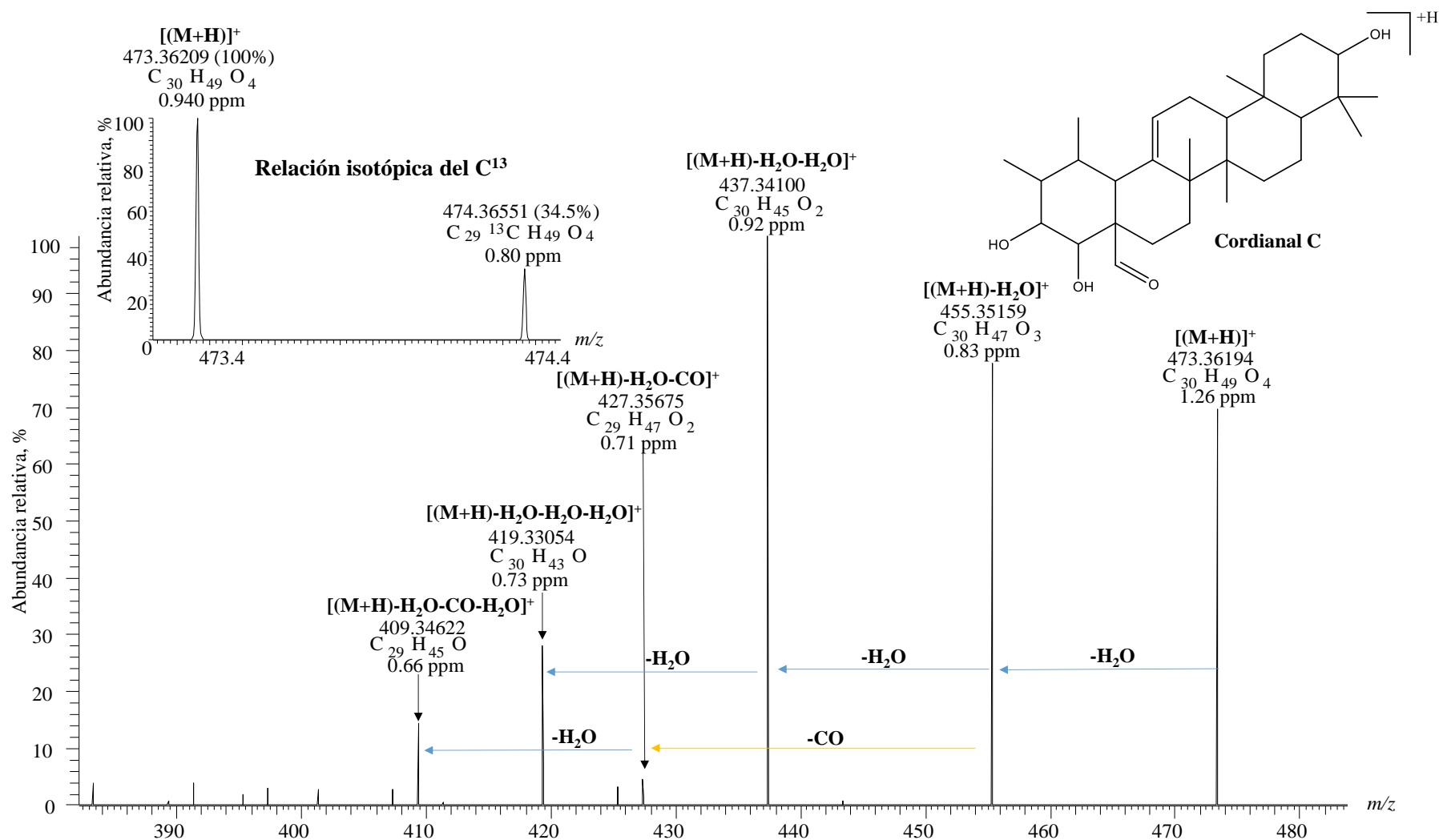
### Apéndice 42

Espectro de masas de la retusina ( $m/z$  359.11209, 50 eV), presente en los extractos de *V. curassavica*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 4**.



## Apéndice 43

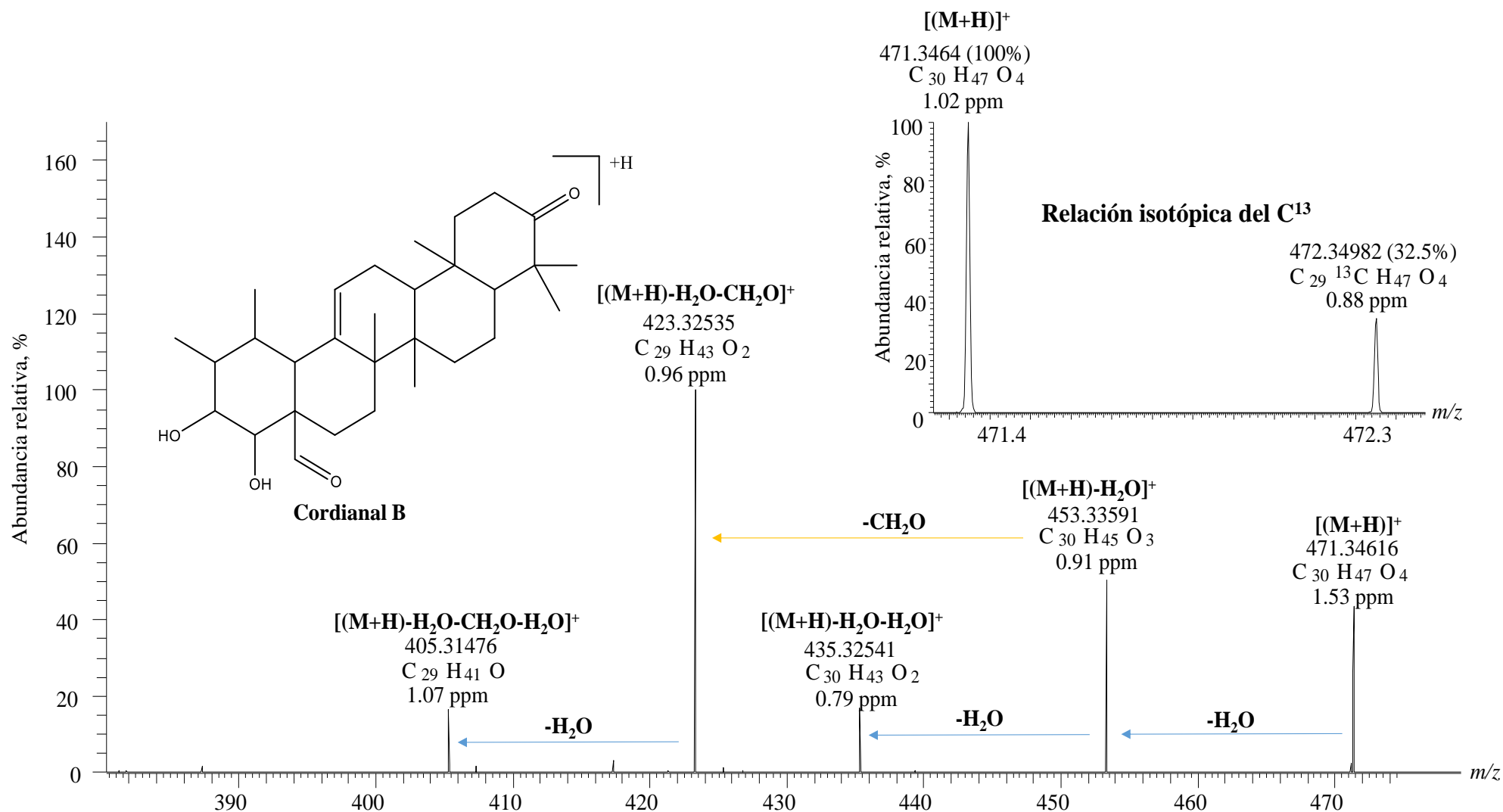
Espectro de masas del cordianal C ( $m/z$  473.36194, 20 eV) presente en los extractos de *V. curassavica*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 4**.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndice 44

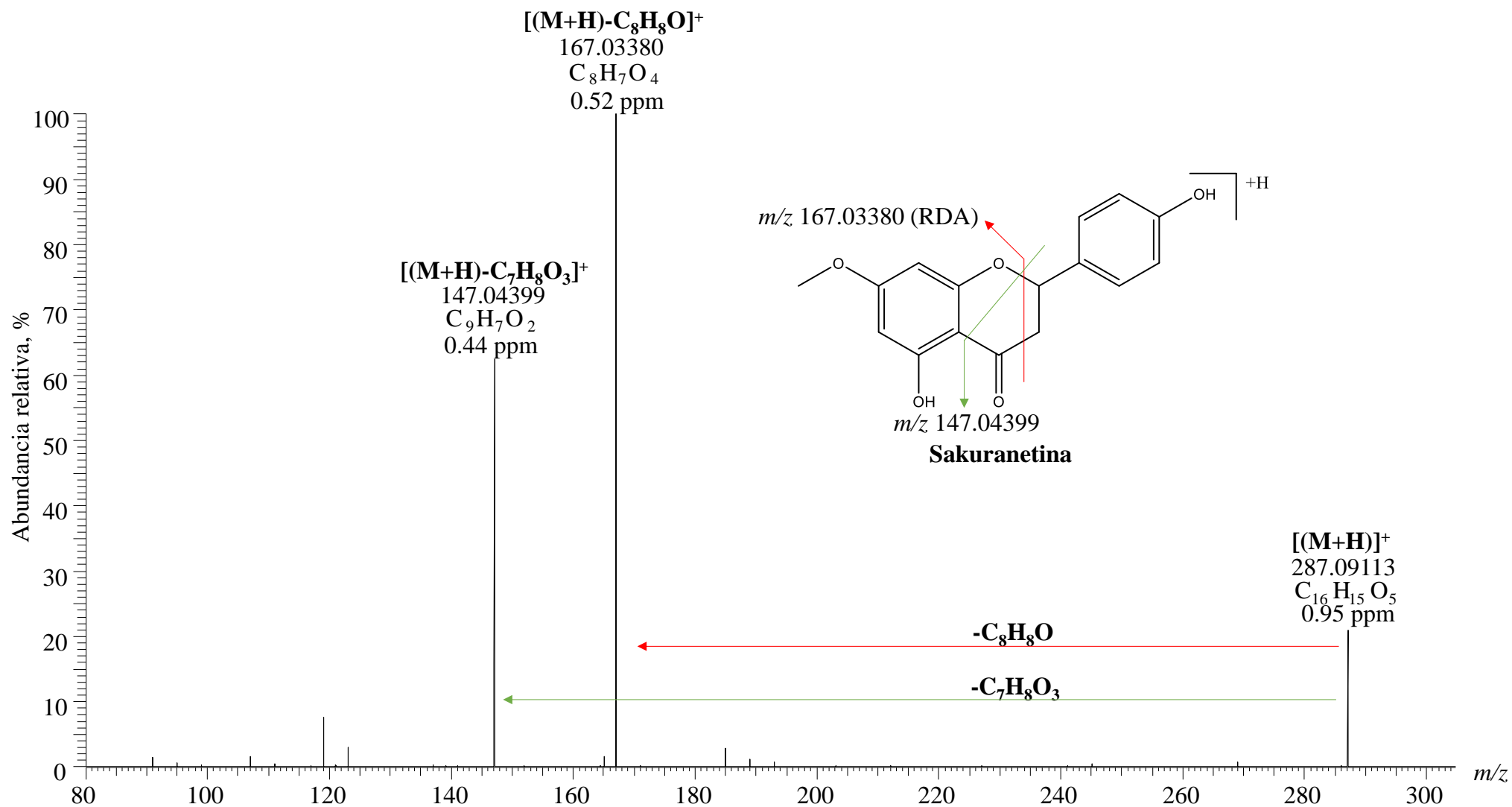
Espectro de masas del cordianal B ( $m/z$  471.34616, 10 eV) presente en los extractos de *V. curassavica*, obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM. La identificación se muestra en la **Tabla 4**.



# FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

## Apéndice 45

Espectro de masas de la sustancia patrón de sakuranetina ( $m/z$  287.09113, 40 eV) obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS operado en modo SIM.



FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Apéndice 46**

*Máximos de absorción y áreas relativas de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis por HPLC/DAD de los extractos de L. origanoides quimiotipo felandreno, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.*

N° pico Fig. 14	Compuesto	t <sub>R</sub> , min	A <sub>i</sub> /A <sub>ISTD</sub>				λ, nm
			HA	HA-PD	SFE	SFE-PD	
1	Derivado de flavona <sup>b</sup>	18.2	0.6	0.3	-	-	254 <sup>max</sup> , 228 <sup>h</sup> , 288
2	Derivado de flavona <sup>b</sup>	32.9	0.7	1.6	-	-	283 <sup>max</sup> , 228, 342
3	Eriodictiol-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>	33.4	3.3	8.5	-	-	284 <sup>max</sup> , 229
4	Taxifolina <sup>a</sup>	34.0	1.5	-	-	-	254 <sup>max</sup> , 227 <sup>h</sup> , 294
5	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	34.4	0.9	-	-	-	312 <sup>max</sup> , 231, 400
6	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	34.7	-	1.1	-	-	256 <sup>max</sup> , 230 <sup>h</sup> , 370
7	Der. Ácido hidroxincínámico <sup>b</sup>	35.1	-	0.6	-	-	332 <sup>max</sup> , 229
8	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>	35.8	3.1	3.4	-	-	347 <sup>max</sup> , 228 <sup>h</sup> , 254
9	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>	36.1	-	1.2	-	-	286 <sup>max</sup> , 229
10	Apigenina-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>	38.6	0.7	1.2	-	-	335 <sup>max</sup> , 228 <sup>h</sup> , 268
11	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	39.1	1.3	1.0	-	-	284 <sup>max</sup> , 228
12	Apigenina-3- <i>O</i> -glucorónido <sup>a</sup>	39.5	0.9	2.0	-	-	336 <sup>max</sup> , 228 <sup>h</sup> , 268
13	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	40.8	0.8	0.7	-	-	228 <sup>max</sup> , 283
14	Derivado de flavona <sup>b</sup>	41.9	1.2	1.0	-	-	348 <sup>max</sup> , 226 <sup>h</sup> , 255
15	Eriodictiol <sup>a</sup>	42.9	3.0	0.8	-	-	288 <sup>max</sup> , 230
16	Quercetina <sup>a</sup>	44.4	-	1.5	-	-	348 <sup>max</sup> , 226 <sup>h</sup> , 254
17	Luteolina <sup>a</sup>	44.8	2.2	2.0	-	-	348 <sup>max</sup> , 226 <sup>h</sup> , 254
18	Naringenina <sup>a</sup>	47.3	1.7	1.3	-	-	228 <sup>max</sup> , 290
19	Derivado de flavona <sup>b</sup>	48.6	0.4	0.8	-	-	220 <sup>max</sup> , 267, 338
20	Derivado de flavona <sup>b</sup>	52.8	0.4	-	-	-	224 <sup>max</sup> , 257, 298
21	Pinocembrina <sup>a</sup>	55.1	11.5	5.7	22.5	13.6	285 <sup>max</sup> , 236
22	Galangina <sup>a</sup>	55.6	5.1	2.3	6.9	3.2	266 <sup>max</sup> , 360 <sup>h</sup>
23	Derivado de flavona <sup>b</sup>	56.6	0.2	0.5	0.3	0.3	265 <sup>max</sup> , 350 <sup>h</sup>

<sup>a</sup> Identificación confirmatoria basada en el espectro UV-Vis y por comparación con el espectro UV-Vis y t<sub>R</sub> (min) de sustancias patrón.

<sup>b</sup> Compuestos identificados tentativamente por comparación de los espectros UV-Vis reportados en la librería espectral.

<sup>max</sup>: Máximo. <sup>h</sup>: Hombro.

A<sub>i</sub>/A<sub>ISTD</sub>: área del compuesto/área del estándar interno (cafeína, 100 mg/L). HA: extracto hidroalcohólico. HA-PD: extracto hidroalcohólico de material vegetal después de su destilación. SFE: extracto obtenido con fluido supercrítico. SFE-PD: extracto obtenido con fluido supercrítico de material vegetal después de su destilación.

FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Apéndice 47**

Máximos de absorción y áreas relativas de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis por HPLC/DAD de los extractos de *T. diffusa*, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.

N° pico Fig. 15	Compuesto	t <sub>R</sub> , min	A <sub>i</sub> /A <sub>ISTD</sub>				λ, nm
			HA	HA-PD	SFE	SFE-PD	
1	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	6.5	0.2	-	-	-	228 <sup>max</sup> , 282
2	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	12.3	0.2	-	-	-	226 <sup>max</sup> , 280
3	No identificado	13.2	0.3	-	-	-	279 <sup>max</sup>
4	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	31.9	0.2	-	-	-	352 <sup>max</sup> , 268 <sup>h</sup> , 246
5	Derivado de flavona <sup>b</sup>	32.3	0.7	0.5	-	-	348 <sup>max</sup> , 255 <sup>h</sup>
6	Derivado de flavona <sup>b</sup>	34.1	0.4	0.2	-	-	340 <sup>max</sup> , 245 <sup>h</sup> , 270
7	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	34.8	0.2	-	-	-	351 <sup>max</sup> , 247 <sup>h</sup>
8	No identificado	36.5	-	-	0.2	-	256 <sup>max</sup>
9	Apigenina-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>	38.6	0.7	0.4	-	-	340 <sup>max</sup> , 228 <sup>h</sup> , 266
10	Derivado de flavona <sup>b</sup>	40.2	2.3	0.5	-	-	350 <sup>max</sup> , 270 <sup>h</sup>
11	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	40.9	-	0.3	-	-	226 <sup>max</sup> , 350
12	No identificado	41.6	-	0.7	-	0.3	250 <sup>max</sup>
13	Derivado de flavona <sup>b</sup>	42.4	0.4	-	-	-	342 <sup>max</sup> , 240 <sup>h</sup> , 270
14	Derivado de flavona <sup>b</sup>	43.1	0.4	-	-	-	342 <sup>max</sup> , 242 <sup>h</sup> , 270
15	Derivado de flavona <sup>b</sup>	45.3	-	0.6	-	-	332 <sup>max</sup> , 226, 270
16	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	46.0	0.4	0.5	-	-	350 <sup>max</sup> , 244 <sup>h</sup>
17	Derivado de flavona <sup>b</sup>	46.5	7.7	2.1	-	-	320 <sup>max</sup> , 230 <sup>h</sup> , 270
18	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	47.0	-	0.9	-	0.4	226 <sup>max</sup> , 270 <sup>h</sup> , 284
19	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	47.7	-	0.3	-	-	226 <sup>max</sup> , 314 <sup>h</sup> , 320
20	Apigenina <sup>a</sup>	48.5	0.4	0.8	-	-	335 <sup>max</sup> , 225 <sup>h</sup> , 268
21	Derivado de flavona <sup>b</sup>	49.1	0.6	1.0	-	-	318 <sup>max</sup> , 226 <sup>h</sup> , 269
22	Der. Ácido hidroxicinámico <sup>b</sup>	49.6	-	-	-	0.1	252 <sup>max</sup> , 226
23	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	51.1	-	0.5	0.1	0.1	254 <sup>max</sup> , 340
24	Der. Ácido hidroxicinámico <sup>b</sup>	52.0	-	-	0.3	0.2	252 <sup>max</sup> , 223
25	No identificado	53.9	0.5	0.5	0.4	0.5	335 <sup>max</sup> , 225 <sup>h</sup> , 268
26	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	55.0	-	-	0.3	-	227 <sup>max</sup> , 289
27	Acacetina <sup>a</sup>	55.4	0.8	0.3	1.7	0.2	332 <sup>max</sup> , 224 <sup>h</sup> , 268
28	Derivado de flavonol <sup>b</sup>	56.0	0.6	0.2	-	0.1	366 <sup>max</sup> , 224 <sup>h</sup> , 266
29	Derivado de flavona <sup>b</sup>	61.5	0.7	0.3	1.0	-	330 <sup>max</sup> , 212 <sup>h</sup> , 269
30	No identificado	63.5	1.9	0.2	-	-	252 <sup>max</sup>

<sup>a</sup> Identificación confirmatoria basada en el espectro UV-Vis y por comparación con el espectro UV-Vis y t<sub>R</sub> (min) de sustancias patrón.

<sup>b</sup> Compuestos identificados tentativamente por comparación de los espectros UV-Vis reportados en la librería espectral.

<sup>max</sup>: Máximo. <sup>h</sup>: Hombro.

A<sub>i</sub>/A<sub>ISTD</sub>: área del compuesto/área del estándar interno (cafeína, 100 mg/L). HA: extracto hidroalcohólico. HA-PD: extracto hidroalcohólico de material vegetal después de su destilación. SFE: extracto obtenido con fluido supercrítico. SFE-PD: extracto obtenido con fluido supercrítico de material vegetal después de su destilación.

FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES

**Apéndice 48**

*Máximos de absorción y áreas relativas de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis por HPLC/DAD de los extractos de V. curassavica, obtenidos de material vegetal antes y después de su destilación. Columna GEMINI C<sub>18</sub>.*

N° pico Fig. 16	Compuesto	t <sub>R</sub> , min	A <sub>I</sub> /A <sub>ISTD</sub>				λ, nm
			HA	HA-PD	SFE	SFE-PD	
1	Derivado de flavanono <sup>b</sup>	10.9	-	0.3	-	-	230 <sup>max</sup> , 280
2	Der. Ácido hidroxicinámico <sup>b</sup>	13.3	1.5	0.8	-	-	299 <sup>max</sup> , 230
3	Derivado de flavona <sup>b</sup>	31.3	0.7	-	-	-	303 <sup>max</sup> , 230 <sup>h</sup> , 252
4	Rutina <sup>a</sup>	35.3	0.8	-	-	-	355 <sup>max</sup> , 226 <sup>h</sup> , 256
5	Derivado de flavono <sup>b</sup>	35.7	0.6	-	-	-	355 <sup>max</sup> , 226 <sup>h</sup> , 258
6	Kaempferol-3-O-galactósido <sup>a</sup>	37.5	1.0	-	-	-	355 <sup>max</sup> , 228 <sup>h</sup> , 256
7	Ácido rosmarínico <sup>a</sup>	39.3	3.1	3.3	-	0.2	330 <sup>max</sup> , 230 <sup>h</sup>
8	Der. Ácido hidroxicinámico <sup>b</sup>	40.9	0.7	0.4	-	-	277 <sup>max</sup> , 228 <sup>h</sup>
9	Derivado de flavona <sup>b</sup>	41.4	0.9	0.3	-	-	228 <sup>max</sup> , 265, 315
10	Derivado de flavona <sup>b</sup>	42.2	0.1	0.6	-	-	228 <sup>max</sup> , 286, 310
11	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	43.1	0.1	1.0	-	-	226 <sup>max</sup> , 290
12	Derivado de flavanona <sup>b</sup>	44.4	0.1	0.7	-	0.1	224 <sup>max</sup> , 303
13	No identificado	45.4	-	-	-	0.2	244 <sup>max</sup>
14	No identificado	46.9	0.1	0.2	-	0.1	274 <sup>max</sup> , 244 <sup>h</sup> , 387
15	Derivado de flavono <sup>b</sup>	52.6	1.9	3.2	1.0	2.6	350 <sup>max</sup> , 225 <sup>h</sup> , 260
16	Derivado de flavona <sup>b</sup>	54.2	0.3	0.6	0.1	0.2	223 <sup>max</sup> , 258, 348
17	Pachipodol <sup>a</sup>	56.8	0.3	0.5	0.2	0.3	255 <sup>max</sup> , 355
18	Artemetina <sup>a</sup>	57.8	1.7	3.6	0.4	1.8	347 <sup>max</sup> , 224 <sup>h</sup> , 256
19	No identificado	60.5	0.4	0.4	-	-	243 <sup>max</sup>
20	No identificado	63.4	0.4	-	-	-	242 <sup>max</sup>
21	No identificado	72.2	0.4	-	-	-	280 <sup>max</sup>

<sup>a</sup> Identificación confirmatoria basada en el espectro UV-Vis y por comparación con el espectro UV-Vis y t<sub>R</sub> (min) de sustancias patrón.

<sup>b</sup> Compuestos identificados tentativamente por comparación de los espectros UV-Vis reportados en la librería espectral.

<sup>max</sup>: Máximo. <sup>h</sup>: Hombro.

A<sub>I</sub>/A<sub>ISTD</sub>: área del compuesto/área del estándar interno (caféina, 100 mg/L). HA: extracto hidroalcohólico. HA-PD: extracto hidroalcohólico de material vegetal después de su destilación. SFE: extracto obtenido con fluido supercrítico. SFE-PD: extracto obtenido con fluido supercrítico de material vegetal después de su destilación.