

**Estudio de la composición química y evaluación del potencial antioxidante, citotóxico y sensibilizante de extractos de *Hibiscus rosa-sinensis* (Malváceas) y de la biomasa residual de *Lippia organoides* (Verbenáceas) como posibles ingredientes en productos cosméticos**

**Jesica Julieth MEJIA MEDINA**

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Química  
Doctorado en Química  
Bucaramanga  
2022**

**Estudio de la composición química y evaluación del potencial antioxidante, citotóxico y sensibilizante de extractos de *Hibiscus rosa-sinensis* (Malváceas) y de la biomasa residual de *Lippia origanoides* (Verbenáceas), como posibles ingredientes en productos cosméticos**

**Jesica Julieth MEJIA MEDINA**  
**Química**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al título  
de Doctora en Química**

**Directores:**

**Elena STASHENKO, Química, *Ph.D.***  
**Jairo René MARTÍNEZ, Químico, *Ph.D.***

**Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL**  
**Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS**  
**Centro de Excelencia CENIVAM**

**Universidad Industrial de Santander**  
**Facultad de Ciencias**  
**Escuela de Química**  
**Doctorado en Química**  
**Bucaramanga**  
**2022**

### **Agradecimientos**

A Dios por darme la fortaleza, sensatez, sabiduría y perseverancia para alcanzar esta meta.

A la Universidad Industrial de Santander, mi alma mater, en la cual me he formado profesionalmente.

A mis maestros la doctora Elena Stashenko y el doctor Jairo René Martínez, por ser mis guías y mentores durante este proceso académico.

A mi familia, mi compañero de vida y mi hija, quienes son el motor de mi vida, siempre me han brindado su apoyo emocional y físico.

A todos mis amigos y compañeros quienes siempre me apoyaron, me motivaron y estuvieron conmigo hasta el último momento, de forma presencial o virtual, pero siempre manifestando su cariño.

A Minciencias, Convocatoria 647 del año 2014, Doctorados Nacionales. Manducación, Mincomercio e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>22</b>
<b>1 ESTADO DEL ARTE</b> .....	<b>28</b>
<b>1.1 Plantas bajo estudio</b> .....	<b>28</b>
1.1.1 <i>Lippia origanoides</i> .....	28
1.1.2 <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> .....	32
<b>1.2 Metabolismo secundario</b> .....	<b>35</b>
<b>1.3 Polifenoles</b> .....	<b>35</b>
1.3.1 Biosíntesis de polifenoles .....	38
1.3.2 Polifenoles: su relación con el color y la fotoprotección. ....	38
1.3.3 Extracción de polifenoles .....	41
1.3.4 Identificación y cuantificación de polifenoles.....	42
<b>1.4 Antioxidantes naturales y sintéticos</b> .....	<b>43</b>
<b>1.5 Determinación de capacidad antioxidante, fotoprotectora, citotóxica y sensibilizante de extractos naturales</b> .....	<b>48</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>53</b>
<b>2.1 Objetivo general</b> .....	<b>53</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>53</b>
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
<b>3.1 Reactivos</b> .....	<b>55</b>
<b>3.2 Material vegetal</b> .....	<b>56</b>
3.2.1 Recolección e identificación botánica .....	56
<b>3.3 Obtención de extractos</b> .....	<b>58</b>
3.3.1 Extracción con solventes .....	58
3.3.2 Extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico .....	60

<b>3.4</b>	<b>Análisis instrumental.....</b>	<b>61</b>
3.4.1	Análisis por UHPLC-ESI(+)- <i>Orbitrap</i> -MS.....	61
3.4.2	Determinación de figuras analíticas de mérito para el método LC/MS .....	63
3.4.3	Determinación de la relación entre la composición química, el color y la capacidad antioxidante de cultivares de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> .....	65
<b>3.5</b>	<b>Actividad biológica .....</b>	<b>68</b>
3.5.1	Determinación de la capacidad antioxidante .....	68
3.5.2	Determinación de la actividad fotoprotectora de extractos .....	75
3.5.3	Actividad citotóxica y sensibilizante.....	77
3.5.3.2	Determinación de la actividad sensibilizante .....	78
3.5.4	Determinación de la actividad biológica total .....	79
<b>3.6</b>	<b>Desarrollo de una formulación fitocosmética con propiedades fotoprotectoras y antioxidantes</b>	<b>80</b>
3.6.1	Evaluación de la estabilidad acelerada .....	81
3.6.2	Evaluación de fotoestabilidad.....	83
3.6.3	Determinación del factor de oclusión.....	85
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>86</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterización por UHPLC-ESI<sup>+</sup>-<i>Orbitrap</i>-MS de extractos hidro-alcohólicos y obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico.....</b>	<b>100</b>
4.1.1	Condiciones de análisis por UHPLC-ESI <sup>+</sup> - <i>Orbitrap</i> -MS .....	100
4.1.2	Identificación por UHPLC-ESI <sup>+</sup> - <i>Orbitrap</i> -MS de flavonoides presentes en los extractos de cultivares de <i>H. rosa-sinensis</i> , y quimiotipos de <i>L. origanoides</i> . .....	102
4.1.3	Patrones de fragmentación de flavonoides en los espectros de masas, obtenidos por ESI <sup>+</sup> - <i>Orbitrap</i> 116	
4.1.4	Relación entre la composición química, el color y la capacidad antioxidante en los cultivares de <i>H. rosa-sinensis</i> bajo estudio. ....	140
<b>4.2</b>	<b>Actividad biológica de extractos hidro-alcohólicos y obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico. ....</b>	<b>159</b>
4.2.1	Capacidad antioxidante .....	159
4.2.2	Actividad fotoprotectora.....	178
4.2.3	Actividad citotóxica.....	179
4.2.4	Actividad sensibilizante.....	183
<b>4.3</b>	<b>Desarrollo de un prototipo cosmético fotoprotector .....</b>	<b>187</b>
4.3.1	Evaluación de la estabilidad acelerada .....	187

4.3.2	Evaluación de la fotoestabilidad.....	192
4.3.3	Determinación del factor de oclusión.....	193
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>195</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERACIONES ÉTICAS.....</b>	<b>199</b>
<b>7</b>	<b>INFORMACION DE FINANCIAMIENTO.....</b>	<b>199</b>
<b>8</b>	<b>DIVULGACIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>199</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>203</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>230</b>

**ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

AAPH	<i>2,2'-Azobisisobutyramidinium chloride</i> [Cloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)].
ABC	Área bajo la curva.
AO	Antioxidantes.
ABTS	<i>2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i> [Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)].
ABTS <sup>+</sup>	Catión-radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).
ADI	<i>Acceptable Daily Intake</i> (Ingesta diaria aceptable)
AF	Ácido fórmico
AIF	<i>All-Ion-Fragmentation</i> (Fragmentación de todos los iones)
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de la varianza)
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> (Ionización química a presión atmosférica)
AT	<i>Agilent Technologies</i>
BHT	<i>Butylated Hydroxytoluene</i> (Hidroxitolueno butilado).
BHA	<i>Butylated hydroxyanisole</i> (Hidroxianisol butilado).
CA	California
CAN	Comunidad Andina de Naciones
CENIVAM	Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas.
CINTROP	Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales.
DAD	<i>Diode-Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos).
DAC	Dermatitis alérgica de contacto.
d <sub>f</sub>	Espesor de la fase estacionaria.

DFT	<i>Density-Functional Theory</i> (Teoría del funcional de densidad)
D.I.	Diámetro interno.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DPPH	Difenil-1-picrilhidracilo.
EE. UU.	Estados Unidos de América
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización).
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i> (Detector evaporativo de dispersión de luz).
EI	<i>Electron Ionization</i> (Ionización electrónica)
ET	<i>Electron Transfer</i> (Transferencia de un electrón).
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo).
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (y otros)
eV	Electrón-Voltio.
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Drogas y Alimentos)
FL	<i>Fluorescein</i> (Fluorescina).
FPS	Factor de protección solar
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (Capacidad para reducir el hierro férrico).
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases).
GST	Glutación-S-transferasa
GSp <sub>x</sub>	Glutación peroxidasa
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i> (Transferencia de un átomo de hidrógeno).
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (Orbital molecular ocupado más alto).
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
IAS	Índice de actividad sensibilizante

ICA	Índice de capacidad antioxidante
ICONTEC	Instituto Colombiano de Normas Técnicas
IOU	<i>Inhibited Oxygen Uptake</i> (Inhibición de la absorción de oxígeno).
IP	<i>Ionization potential</i> (Potencial de ionización)
IPS	Índice de protección solar
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida).
LPS	Lipopolisacáridos
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (Orbital molecular no ocupado más bajo)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas).
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas).
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-iol)-2,5-difeniltetrazol]
MWD	<i>Multi-Wavelength Detector</i> (Detector de longitud de onda múltiple)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
NMD	Nivel mínimo de detección
NMC	Nivel mínimo de cuantificación
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno).
PA	Pensilvania
PG	Galato de propilo
RL	Radicales libres
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (Especies reactivas de nitrógeno).
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies reactivas de oxígeno).
SE	<i>Solvent Extraction</i> (Extracción con solvente).

SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico).
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida).
SOD	Superóxido dismutasa
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (Capacidad antioxidante equivalente a la del Trolox).
TBHQ	<i>tert</i> -Butilhidroquinona
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total).
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (Tiempo de vuelo).
$t_R$	Tiempo de retención (min).
TRAP	<i>Total Radical-Trapping Antioxidant Potential</i> (Parámetro antioxidante total de la captura de radicales).
Trolox <sup>®</sup>	<i>6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid</i> (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia).
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta –Visible.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentaje del número de publicaciones sobre *L. origanoides*, según el área de estudio. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 2004-2022. Fecha de consulta: 23 de enero de 2022. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: ("*Lippia origanoides*")......30
- Figura 2.** Número de publicaciones sobre *H. rosa-sinensis*, según área de estudio. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 2004-2022. Fecha de consulta: 23 de enero de 2022. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: ("*Hibiscus rosa-sinensis*"). .....33
- Figura 3.** Algunas familias de compuestos fenólicos encontrados en plantas. Tomado con modificaciones de Hooper y Cassidy (2006).....37
- Figura 4.** Número de publicaciones sobre antioxidantes naturales y sintéticos. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de búsqueda: 1990-2022. Fecha de consulta: 24 de enero de 2022. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("*Synthetic antioxidants*") y ("*Natural antioxidants*"). .....44
- Figura 5.** Adecuación y siembra de los tres quimiotipos de *Lippia origanoides*. Imágenes tomadas por Jesica MEJÍA y Julián ARIAS, en las parcelas experimental del CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, fecha: 29 de noviembre de 2016.....56
- Figura 6.** Propagación y siembra de cultivares de flores de *H. rosa-sinensis*. Imágenes tomadas por Jesica MEJÍA, en el jardín experimental del CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, fecha: 16 de agosto de 2016. ....57
- Figura 7.** Flores de 16 cultivares de *H. rosa-sinensis* recolectados de población natural. **A-D.** Rojo, **E-G.** Rosado, **H-J.** Naranja, **K-N.** Amarillo, **K.** Lila, **P.** Blanco. Imágenes tomadas por Jesica MEJÍA. En el jardín experimental del CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, fecha: 28 de abril de 2019.....65
- Figura 8.** Medición de los parámetros colorímetros de una muestra de *Hibiscus rosa-sinensis* cultivar rojo. Imagen tomada por Jesica MEJÍA. En el laboratorio Marie CURIE ubicado en CENIVAM, Bucaramanga, fecha: 28 de abril de 2019.....66

**Figura 9.** Analizador de transmitancia UV-2000S (*Labsphere*, North Sutton, NH, EE. UU.). Fotografía tomada por Jesica MEJÍA, en el laboratorio de Desenvolvimento Galênico (LADEG), Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil, fecha: 10 de junio 2018. ...82

**Figura 10.** Simulador solar (*Oriel Model 91192-1000*, Newport Corp., EE. UU.) Fotografía tomada por Jesica MEJÍA, en el Laboratorio de Microbiologia e Avaliação Genotóxica (LAMIAG), Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil, fecha: 10 de junio 2018. por la autora. Junio 2018, Rio de Janeiro-Brasil.....84

**Figura 11.** Gráfico de Pareto para los efectos estandarizados en el diseño experimental planteado para extractos, con alta capacidad antioxidante, obtenidos a partir de biomasa residual de *L. origanoides*. **A:** Relación material-solvente; **B:** Relación etanol: agua; **C:** Temperatura y **D:** Tiempo de extracción. ....91

**Figura 12.** Gráfico de Pareto para los efectos estandarizados en el diseño experimental planteado para extractos, con alta capacidad antioxidante, obtenidos a partir de flores de *H. rosa-sinensis*. **A:** Relación etanol:agua; **B:** Concentración de ácido HCl; **C:** Temperatura; **D:** Relación material-solvente y **E:** Tiempo de extracción.....91

**Figura 13.** Influencia de la concentración de ácido fórmico en las fases móviles (acetonitrilo o metanol) y el voltaje de electronebulización (*V<sub>spray</sub>*) sobre la corriente iónica de los iones  $[M]^+$  de cianidina-3-glucósido (0,5 mg/L). Promedio  $\pm$  error estándar,  $n=3$ . ANOVA, las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95% de confianza.....100

**Figura 14.** Perfiles cromatográficos obtenidos por LC/MS (*Orbitrap*), de los extractos hidro-alcohólicos de cuatro cultivares de *H. rosa-sinensis*. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 18**. ....103

**Figura 15.** Corrientes iónicas extraídas (EIC), obtenidas por UHPLC-ESI<sup>+</sup>-*Orbitrap*-MS, de moléculas protonadas  $[M+H]^+$  presentes en los extractos hidro-alcohólicos de la biomasa residual de *L. origanoides*. **A.** Quimiotipo Timol; **B.** Quimiotipo Carvacrol; **C.** Quimiotipo Felandreno. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 19**. ....108

**Figura 16.** Espectros de masas, obtenidos por ESI<sup>+</sup>-Orbitrap. **A.** Relación isotópica del ion [M+H]<sup>+</sup> en *m/z* 451.12327 de eriodictiol-hexósido, adquirido en modo *full scan*. **B.** Fragmentos típicos en el espectro de masas del eriodictiol-hexósido. ....116

**Figura 17.** Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por UHPLC-ESI<sup>+</sup>-Orbitrap-MS, de iones [M]<sup>+</sup> o moléculas protonadas [M+H]<sup>+</sup> de las sustancias de referencia de flavonoides. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 24**. ....127

**Figura 18.** Reacción de oxidación de la naringenia a eriodictiol. Adaptado de Nagy *et al.* (2008). ....133

**Figura 19.** Distribución de flavonoides en los extractos hidro-etanólicos obtenidos de diferentes cultivares de *H. rosa-sinensis*. ....138

**Figura 20.** Gráfico de dispersión de burbujas 3D representado con escala de colores que corresponden a los diferentes cultivares de flores de *H. rosa-sinensis* estudiados, según: **A.** Los parámetros colorimétricos CIELAB (*L\**, *a\**, *b*); **B.** Los parámetros colorimétricos CIELAB (*L\**, *C<sub>ab</sub>*, *h<sub>ab</sub>*). Los tamaños de las burbujas son proporcionales a la actividad antioxidante que varió de 1580 a 3840 μmol Trolox<sup>®</sup>/g de extracto. ....141

**Figura 21.** Mapa de calor de la matriz de correlación de los parámetros de color, la capacidad antioxidante (ORAC) y los 20 compuestos presentes en los pétalos de los 16 cultivares de *H. rosa-sinensis*. Cada cuadrado indica el coeficiente de correlación de *Pearson* para un par de datos, y la intensidad de los colores rojo y *beige* en el mapa de calor indica el nivel de correlación positiva y negativa, respectivamente. ....144

**Figura 22.** Esquema general de la biosíntesis de flavonoides en flores de *Hibiscus rosa-sinensis*. **PAL** (Fenilalanina-amonio liasa), **CH4** (Cinamato-4-hidroxilasa), **4CL** (4-Cumarato CoA ligasa), **CHI** (Flavanona chalcona isomerasa), **FNS** (Flavanona sintasa), **UGT** (Glucuroniltransferasa), **F3H** (Flavanona-3-hidroxilasa), **FLS** (Flavonol sintasa), **F3'H** (Flavonoide-3`hidroxilasa), **DFR** (Dihidroflavonol-4-reductasa), **LAR** (Leucoantocianidina reductasa), **ANS** (Antocianina sintasa), **ANR** (Antocianidina reductasa), **3GT** (Antocianidina-3-glucosiltransferasa). Adaptado de: Hammerbacher *et al.* (2019), Gerats, T. y Strommer, (2008) y Hong *et al.* (2014). ....147

**Figura 23.** Representación gráfica de la relación entre el color, la actividad antioxidante y la composición química para diferentes cultivares de flores de *H. rosa-sinensis*. .....149

**Figura 24.** Orbitales de frontera HOMO, LUMO y *band gap* para: **A.** Epicatequina, **B.** Catequina, **C.** Quercetina-hexósido, **D.** Quercetina-dihexósido, **E.** Cianidina-hexósido, **F.** Cianidina-dihexósido.....152

**Figura 25.** Orbitales moleculares que participan en la transición de  $\lambda=256$  nm para los derivados glicosilados de quercetina.....155

**Figura 26.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de sustancias de referencia de compuestos fenólicos, antes **A.**  $\lambda=270$  nm y después **B.**  $\lambda=734$  nm de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup>. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 35**.170

**Figura 27.** Variación de la viscosidad para el prototipo fotoprotector con la velocidad de rotación. ....189

**Figura 28.** Resultados de la estabilidad del color y de la emulsión para el prototipo fotoprotector a diferentes temperaturas. Imágenes tomadas por Jessica MEJÍA, en el laboratorio de Desenvolvimento Galênico (LADEG), Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil, fecha: marzo a mayo de 2018.....190

**Figura 29.** Factor de protección solar obtenido frente a diferentes dosis de radiación UVB para la formulación fotoprotectora que incorporan extracto hidro-alcohólico obtenido de la biomasa residual de *L. origanoides*, quimiotipo timol. ....191

**Figura 30.** Factor de oclusión para la crema base y el prototipo fotoprotector en un sistema de estrato corneo de *Crotalus durissus*.....192

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Número de publicaciones científicas sobre *Lippia origanoides*. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación 2004-2022. Fecha de consulta: 23 de enero de 2022. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: ("*Lippia origanoides*")......29
- Tabla 2.** Número de publicaciones sobre *H. rosa-sinensis*, según año. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Fecha de consulta: 23 de enero de 2022. Periodo de observación 2004-2022. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: ("*Hibiscus rosa-sinensis*")......33
- Tabla 3.** Propiedades, aplicaciones y regulaciones de los aditivos antioxidantes sintéticos.47
- Tabla 4.** Métodos más utilizados actualmente para medir capacidad antioxidante (Sánchez, 2002; Prior *et al.*, 2005). .....49
- Tabla 5.** Factores y sus valores para la extracción de flavonoides en flores de *H. rosa-sinensis*, cultivar rojo. ....58
- Tabla 6.** Factores y sus valores para la extracción de flavonoides de biomasa residual de *L. origanoides*, quimiotipo timol. ....59
- Tabla 7.** Constante determinada por Sayre *et al.* (1980). .....76
- Tabla 8.** Porcentaje en peso de los ingredientes utilizados en la formulación fotoprotectora.80
- Tabla 9.** Correspondencia entre las dosis de UVA y UVB y el tiempo de irradiación en el simulador solar. ....84
- Tabla 10.** Identificación taxonómica de las especies estudiadas. ....87
- Tabla 11.** Resultados del análisis de la varianza aplicado al diseño factorial 2<sup>4</sup>, para la extracción de flavonoides a partir de la biomasa residual de *L. origanoides* con efectos individuales y binarios. **A:** Relación material-solvente; **B:** Relación etanol: agua; **C:** Temperatura y **D:** Tiempo de extracción. ....88

- Tabla 12.** Resultados del análisis de la varianza aplicado al diseño factorial fraccionado  $2^{5-1}$ , para la extracción de flavonoides a partir de flores de *H. rosa-sinensis* con efectos individuales y binarios. **A:** Relación etanol: agua; **B:** Concentración de HCl; **C:** Temperatura; **D:** Relación material-solvente y **E:** Tiempo de extracción.....88
- Tabla 13.** Modelos matemáticos que predijeron las mejores condiciones para la extracción de flavonoides a partir de la biomasa residual de *L. origanoides* y de flores *Hibiscus rosa-sinensis*.....92
- Tabla 14.** Condiciones óptimas para la extracción de flavonoides a partir de la biomasa residual de *L. origanoides*. .....93
- Tabla 15.** Condiciones óptimas para la extracción de flavonoides a partir de flores de *H. rosa-sinensis*.....94
- Tabla 16.** Valores de capacidad antioxidante predichos y experimentales para extractos de *H. rosa-sinensis* y de la biomasa residual (después de la destilación) de *L. origanoides*. .....94
- Tabla 17.** Rendimiento (%) de los extractos vegetales de *H. rosa-sinensis* y de la biomasa residual de *L. origanoides*. .....98
- Tabla 18.** Masas exactas obtenidas por UHPLC-ESI+ -*Orbitrap*-MS, de iones  $[M]^+$  o moléculas protonadas  $[M+H]^+$ , de flavonoides presentes en extractos hidro-alcohólicos de flores de *H. rosa-sinensis*. .....105
- Tabla 19.** Masas exactas obtenidas por UHPLC-ESI+ -*Orbitrap*-MS, de iones de moléculas protonadas  $[M+H]^+$ , presentes en los extractos hidro-alcohólicos y obtenidos con  $CO_2$  supercrítico de *Lippia origanoides*. .....110
- Tabla 20.** Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) en los espectros de masas de las antocianinas, encontradas en los extractos hidro-alcohólicos de algunos cultivares de *H. rosa-sinensis*. .....118

- Tabla 21.** Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) de los iones característicos en los espectros de masas para las flavanonas encontradas en los extractos obtenidos de la biomasa residual de *L. origanoides* o de flores de *H. rosa-sinensis*. .....120
- Tabla 22.** Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) de los iones característicos en los espectros de masas de los flavonoles encontrados en los extractos obtenidos de la biomasa residual de *L. origanoides* o de flores de *H. rosa-sinensis*. .....122
- Tabla 23.** Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) de los iones característicos en los espectros de masas de las flavonas encontradas en los extractos obtenidos de la biomasa residual de *L. origanoides* o de flores de *H. rosa-sinensis*. .....124
- Tabla 24.** Repetibilidad de tiempos de retención ( $t_R$ ) y de áreas cromatográficas de sustancias de referencia de flavonoides, analizados por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS. ....125
- Tabla 25.** Linealidad y sensibilidad determinadas para sustancias de referencia de flavonoides, analizados por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS. ....127
- Tabla 26.** Contenido de compuestos fenólicos (mg/g) en los extractos hidro-alcohólicos y en los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico del material vegetal de *L. origanoides* antes y después de la destilación. ....131
- Tabla 27.** Contenido de compuestos fenólicos (mg/g) presentes en extractos hidro-alcohólicos de flores de *H. rosa-sinensis* de diferentes cultivares. ....136
- Tabla 28.** Flavonoides totales, organizados por subfamilias, encontrados en las flores de *H. rosa-sinensis* de diferentes cultivares. ....137
- Tabla 29.** Parámetros colorimétricos CIELAB medidos para diferentes cultivares de flores de *H. rosa-sinensis*. ....141
- Tabla 30.** Descriptores moleculares, transiciones (nm) y orbitales moleculares (MO) calculados para algunos flavonoides presentes en los cultivares de *H. rosa-sinensis*, usando el método B3LYP / 6-311 + G (d, p). ....152

- Tabla 31.** Repetibilidad del valor del porcentaje de inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno en presencia de Trolox<sup>®</sup> (15  $\mu$ M) analizadas por espectrofotometría UV-Vis.....160
- Tabla 32.** Reproducibilidad del porcentaje de inhibición (%) obtenido por el método de decoloración del  $\beta$ -caroteno para el  $\alpha$ -tocoferol (100 mg/L).....161
- Tabla 33.** Robustez del método de decoloración del  $\beta$ -caroteno en presencia de Trolox<sup>®</sup> (15  $\mu$ M).  
.....162
- Tabla 34.** Valores de la capacidad antioxidante medidos por los ensayos de ORAC, ABTS<sup>+</sup>,  $\beta$ -caroteno, y por el método de **HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup>** de extractos hidro-alcohólicos y obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de las plantas bajo estudio.....163
- Tabla 35.** Capacidad antioxidante, medida por HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup>, de sustancias de referencia de compuestos fenólicos, utilizados en este estudio.....170
- Tabla 36.** Valores del ICA calculados para extractos de *H. rosa-sinensis* y de *L. origanoides*.  
.....177
- Tabla 37.** Valores de factor de protección solar obtenidos para los extractos de flores de *H. rosa-sinensis* y de biomasa residual de *L. origanoides*.....178
- Tabla 38.** Perfiles de citotoxicidad de extractos de cuatro cultivares de flores de *H. rosa sinensis*, y de tres quimiotipos de biomasa residual de *L. origanoides*.....180
- Tabla 39.** Evaluación de la actividad sensibilizante en células THP-1 de los extractos de flores de *H. rosa-sinensis* y de extractos, obtenidos de biomasa residual de *L. origanoides*.....184
- Tabla 40.** Actividad biológica total calculada para los extractos de flores de *H. rosa-sinensis* y para los extractos, obtenidos de la biomasa residual de *L. origanoides*.....187
- Tabla 41.** Valores de pH y FPS obtenidos durante la evaluación de la estabilidad acelerada para el prototipo fotoprotector.....188

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo A.** Capacidad antioxidante de compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos de cuatro cultivares de *H. rosa-sinensis*. .....230
- Anexo B.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de los extractos hidroalcohólicos obtenidos de diferentes cultivares de *H. rosa sinensis*, antes **A.**  $\lambda=270$  nm y después **B.**  $\lambda=734$  nm de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup> .....231
- Anexo C.** Capacidad antioxidante de compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos de biomasa residual de *L. origanoides*. .....234
- Anexo D.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC con derivatizador, para extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de biomasa residual de *L. origanoides* de diferentes quimiotipos, antes (DAD, **A.**  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup>. .....235
- Anexo E.** Capacidad antioxidante de compuestos presentes en los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de la biomasa residual de *L. origanoides*. .....238
- Anexo F.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de los extractos aislados con CO<sub>2</sub> supercrítico de *L. origanoides*, de diferentes quimiotipos, antes (DAD, **A.**  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup>. .....239

## Resumen

**Título:** Estudio de la composición química y evaluación del potencial antioxidante, citotóxico y sensibilizante de extractos de *Hibiscus rosa-sinensis* (Malváceas) y de la biomasa residual de *Lippia origanoides* (Verbenáceas) como posibles ingredientes en productos cosméticos\*

**Autor:** Jesica Julieth MEJIA MEDINA\*\*

**Palabras clave:** Antioxidantes, flavonoides, composición química, color, biomasa residual

### Descripción

Encontrar nuevas fuentes de compuestos biológicamente activos, que puedan ser empleados en las diferentes industrias, ha sido el foco principal de las investigaciones que se realizan en las áreas de ciencias exactas y farmacéuticas. El objetivo de este trabajo doctoral fue aportar información sobre la composición química y determinar el potencial biológico de dos fuentes alternativas de material vegetal no exploradas en Colombia hasta ahora, como lo son la biomasa residual de *L. origanoides* (orégano de monte) y las flores de diferentes cultivares de *H. rosa-sinensis*, a través de ensayos que evaluaron la capacidad antioxidante, fotoprotectora, además, sus propiedades citotóxicas y sensibilizantes. Con los resultados obtenidos en este trabajo, se aportó información específica sobre la composición de flavonoides presentes en los extractos de las matrices vegetales bajo estudio, además, se identificaron los compuestos responsables que aportan a la capacidad antioxidante en los extractos, y se estudió, por primera vez, la relación entre el color, la composición química y la capacidad antioxidante para cultivares de *H. rosa-sinensis*, así como también por primera vez que se evaluó el residuo sólido obtenido después de la destilación de *L. origanoides*. El trabajo además concluyó con la formulación de un prototipo cosmético que incorporó uno de los extractos obtenidos como principio activo, lo que, de forma práctica, ejemplificó la aplicación de la idea de aprovechamiento integral del recurso vegetal que resulta promisorio.

---

\*Tesis Doctoral

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Elena Stashenko y Jairo René Martínez

### Abstract

**Title:** Study of the chemical composition and evaluation of the antioxidant, cytotoxic and sensitizing potential of extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae) and of the residual biomass of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) as possible ingredients in cosmetic products\*

**Author:** Jesica Julieth MEJIA MEDINA\*\*

**Keywords:** Antioxidants, flavonoids, chemical composition, color, residual biomass.

### Description

Finding new sources of biologically active compounds that can be used in different industries has been the main focus of research carried out in the areas of exact sciences and pharmaceuticals. The objective of this doctoral work was to provide information on the chemical composition and determine the biological potential of two alternative sources of plant material not explored in Colombia until now, such as the residual biomass of *L. origanoides* (mountain oregano) and the flowers of different cultivars of *H. rosa-sinensis*, through tests that evaluated the antioxidant and photoprotective capacity, as well as its cytotoxic and sensitizing properties. With the results obtained in this work, specific information was provided on the composition of flavonoids present in the extracts of the plant matrices under study, in addition, the responsible compounds that contribute to the antioxidant capacity in the extracts were identified, and it was studied, by For the first time, the relationship between color, chemical composition and antioxidant capacity for *H. rosa-sinensis* cultivars, as well as for the first time that the solid residue obtained after distillation of *L. origanoides* was evaluated. The work also concluded with the formulation of a cosmetic prototype that incorporated one of the extracts obtained as an active ingredient, which, in a practical way, exemplified the application of the idea of comprehensive use of plant resources, which is promising.

---

\*Doctoral Thesis

\*\*Science Faculty. School of Chemistry. Directors: Elena Stashenko and Jairo René Martínez

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se observa un creciente interés por la adquisición y consumo de suplementos nutricionales, cosméticos o de higiene personal que contengan ingredientes o principios activos de origen natural con propiedades antioxidantes y fotoprotectoras, entre otras. La evidencia científica respalda que ciertos compuestos de origen natural son eficaces en el tratamiento de patologías crónico-degenerativas, como la diabetes y el cáncer, entre otras (Giampieri *et al.*, 2012 y Pillai, 2016). Conforme se reportan más resultados beneficiosos de los productos naturales, la demanda de estos insumos por parte de las industrias cosmética, farmacéutica y de productos de aseo aumenta; porque también es prioridad para ellos reducir el uso de conservantes de origen sintético, debido a su seria implicación con posibles efectos negativos como alergias en la piel, problemas gastrointestinales y cancerígenos (Botterweck *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2005; Randhawa y Bahna, 2009 y Engin *et al.*, 2011).

En la pesquisa por fuentes de ingredientes naturales aprovechables, los desechos agroindustriales derivados de la producción de aceites esenciales han capturado la atención de los investigadores, debido a que aun cuando han sido despojados del aceite esencial, todavía retienen compuestos fitoquímicos de utilidad. El uso de este subproducto en el pasado ha sido limitado a ser transformado como fertilizante de suelos o biocombustible, sin embargo, ahora son considerados materia prima con potencial para las industrias farmacéutica, cosmética y perfumista (Saha y Basak, 2020). Agregar valor a los residuos impacta positivamente, no solo en ganancias económicas para los cultivadores, sino también, contribuye al problema de eliminación de residuos de material vegetal (ca. 6 millones de toneladas al año) y permite acercarse más a los procesos sostenibles de generación de valor.

A partir de la biomasa residual obtenida, después de la destilación de plantas aromáticas y medicinales como *Salvia rosmarinus*, *Ocimum basilicum* y *Salvia lavandulifolia*, se han logrado extraer ácidos fenólicos y flavonoides, con propiedades antioxidantes (Santana *et al.*, 2014; Pagano *et al.*, 2018; Sánchez *et al.*, 2018). La *Lippia origanoides* (Verbenáceas), es otra de las plantas perennes de la cual se producen grandes cantidades de residuo agroindustrial que se pueden aprovechar. Esta planta ha sido catalogada como una de las especies aromáticas promisorias que crecen en Santander (Stashenko y Martínez, 2018), debido a las propiedades biológicas reportadas para su aceite esencial, a saber: capacidad antioxidante (Stashenko *et al.*, 2008; Teles *et al.*, 2014), actividad antibacteriana (Ramírez *et al.*, 2009; Sarrazin *et al.*, 2015), actividad antimicrobiana (Perera *et al.*, 2017; Majolo *et al.*, 2016), actividad fungicida (Medeiros *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2015) y como conservante en alimentos, productos cosméticos y farmacéuticos (Hernandes *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta su potencial actividad biológica y la relación de estas con moléculas que no precisamente constituyen su aceite esencial, resulta necesario estudiar si es posible que, a pesar del proceso destilativo al que se sometió el material vegetal, el sustrato aún retiene compuestos activos viables para ser aprovechados como insumo de formulaciones biológicamente activas.

Continuando en esa búsqueda de nuevas fuentes de ingredientes naturales con interés biológico que puedan ser aprovechables, las flores comestibles han llamado la atención de los investigadores, ya que el su uso en la dieta humana y en las preparaciones culinarias ha mostrado efectos positivos en la salud humana (Demasi *et al.*, 2021). En Colombia, las flores de *H. rosa-sinensis* se emplean solamente con fines ornamentales, debido a que son flores grandes, vistosas y de colores llamativos, sin embargo, en Sri Lanka, las flores de *Hibiscus* se consumen como parte

de las tradiciones culturales (Janarny *et al.*, 2021), y se ha reportado que los extractos obtenidos de diferentes partes (flores, tallos, hojas y raíz) presentan actividad antiinflamatoria (Neeru y Sharma, 2008), antibacteriana (Ruban y Gajalakshmi, 2012), anti-convulsionante (Kasture *et al.*, 2000) y antioxidante, evaluada principalmente por el método DPPH<sup>\*</sup> (radical difenil-1-picrilhidracilo). A pesar de que estas flores han sido empleadas para el consumo humano, resulta necesario realizar estudios de caracterización química detallada sobre los cultivares que crecen en Colombia, que pueden contener metabolitos secundarios de gran interés biológico como los polifenoles, pero también algunos compuestos tóxicos como los alcaloides tropánicos presentes en las flores de *Atropa belladonna*, *Datura stramonium* y *Hyoscyamus niger* (Mircea y Draghia, 2014).

Encontrar nuevas fuentes de compuestos biológicamente activos, que puedan ser empleados en las diferentes industrias, ha sido el foco principal de las investigaciones que se realizan en las áreas de ciencias exactas y farmacéuticas. El objetivo de este trabajo doctoral fue aportar información sobre la composición química y determinar el potencial biológico de dos fuentes alternativas de material vegetal no exploradas en Colombia hasta ahora, como lo son la biomasa residual de *L. origanoides* (orégano de monte) y las flores de diferentes cultivares de *H. rosa-sinensis*, a través de ensayos que evaluaron la capacidad antioxidante, fotoprotectora, además, sus propiedades citotóxicas y sensibilizantes. Con los resultados obtenidos en este trabajo, se aportó información específica sobre la composición de flavonoides presentes en los extractos de las matrices vegetales bajo estudio, además, se identificaron los compuestos responsables que aportan a la capacidad antioxidante en los extractos, y se estudió, por primera vez, la relación entre el color, la composición química y la capacidad antioxidante para cultivares de *H. rosa-sinensis*, así como también por primera vez que se evaluó el residuo sólido obtenido después de la

destilación de *L. origanoides*. El trabajo además concluyó con la formulación de un prototipo cosmético que incorporó uno de los extractos obtenidos como principio activo, lo que, de forma práctica, ejemplificó la aplicación de la idea de aprovechamiento integral del recurso vegetal que resulta promisorio.

El trabajo se dividió en cuatro capítulos que se presentan a continuación. En el **capítulo I**, se describen el proceso de extracción de flavonoides, a través de diseños experimentales y la propuesta de dos modelos matemáticos que mostraron un buen ajuste entre las variables extractivas y la capacidad antioxidante ( $R^2 = 0.98$  y  $0.95$ ). Con los experimentos y su análisis se logró relacionar el potencial antioxidante del extracto con las variables experimentales de su obtención.

En el **capítulo II**, se estudió la composición química de los extractos hidro-alcohólicos y obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de la biomasa residual de *L. origanoides* y de flores de *H. rosasinensis*, por medio de cromatografía líquida acopladas a espectrometría de masas de alta resolución. En total, se identificaron 47 compuestos entre antocianinas, flavonoles, flavanonas, entre otros, que se asocian con actividad biológica. Se estudió la relación entre el color, la capacidad antioxidante y la composición de flavonoides en los 16 cultivares de flores de *H. rosasinensis*. El estudio se complementó con cálculos mecano-cuánticos de los principales compuestos detectados en las flores. Se mostró, que la capacidad antioxidante de los extractos florales estaba directamente relacionada con el contenido de antocianinas, flavan-3-oles y flavanonoles totales e inversamente proporcional al contenido de flavonoles.

En el **capítulo III**, se evaluó la actividad biológica de extractos aislados, a partir de flores de *Hibiscus* y de biomasa residual de orégano de monte, usando diferentes ensayos que miden la capacidad antioxidante, a saber: la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), la decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup> y la decoloración del  $\beta$ -caroteno; con estos métodos se determinó la capacidad antioxidante total de los extractos crudos, mientras que por HPLC-ABTS<sup>+</sup> se pudo establecer que la cianidina-sofórosido y derivados glicosilados de quercetina, fueron los responsables principalmente de la capacidad antioxidante en los cultivares de *Hibiscus* estudiados. En los extractos hidro-alcohólicos de *L. origanoides*, el eriodictiol y sus derivados glicosilados fueron los compuestos que aportaron principalmente a la actividad antioxidante, mientras que, en los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico, la galangina, pinocembrina, sakuranetina, timol y carvacrol contribuyeron a la capacidad antioxidante en diferentes grados, según el quimiotipo estudiado. Adicionalmente, a los extractos se les evaluó la actividad fotoprotectora, citotóxica y sensibilizante.

En el **capítulo IV**, se describe la formulación de un prototipo cosmético con propiedades fotoprotectoras, al cual se le incorporó, como principio activo, el extracto hidroalcohólico de *L. origanoides* (quimiotipo timol), ya que fue seleccionado por presentar las mejores propiedades biológicas entre las muestras vegetales estudiadas. El factor de protección solar (FPS), el pH, la viscosidad y el color del producto fueron estables durante su almacenamiento por 90 días bajo diferentes condiciones de temperatura, además, el prototipo formulado fue fotoestable y presentó propiedades oclusivas.

Parte de este trabajo doctoral se publicó en el año 2020 ([doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112170](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112170)), fue incluido en los datos de una patente, y en memorias de eventos nacionales e internacionales. La autora fue codirectora de varios proyectos de pregrado; actualmente, hay una solicitud de patente pendiente y dos manuscritos en preparación. Los resultados de esta tesis doctoral pueden ser de interés para las áreas de investigación en productos naturales, química analítica y fitocosmética. El proyecto doctoral fue financiado por COLCIENCIAS, Contrato RC-0572-2012, y por Minciencias, Mineducación, Mincomercio e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50. Se contó con el permiso de bioprospección N 270, suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Industrial de Santander.

## 1 ESTADO DEL ARTE

### 1.1 Plantas bajo estudio

#### 1.1.1 *Lippia origanoides*

*Lippia origanoides* Kunth (Familia Verbenácea), es un arbusto muy aromático que se distribuye desde Centro América hasta Sur América; la planta crece en México, Brasil, las Guayanas, Venezuela y Colombia (Pascual *et al.*, 2001). Es una planta que se emplea para el tratamiento de enfermedades respiratorias, en trastornos gastrointestinales y como antiséptico para la boca. Se han reportado usos en la culinaria como condimento (Morton, 1981; Stashenko *et al.*, 2010). En Colombia, se conoce con diferentes nombres comunes como orégano de monte, orégano cimarrón y orégano silvestre; crece hasta 1,8 m o más, sus hojas son esparcidas y ovaladas y su tallo es de color café. Las flores son pequeñas con pétalos de color blanco y se conocen diferentes quimiotipos de *L. origanoides* (Stashenko *et al.*, 2010).

Con el objetivo de analizar las investigaciones que se han realizado sobre la biomasa residual de *L. origanoides*, se hizo una exploración de la producción científica existente, utilizando la base de datos *Scopus* (*Elsevier*). Usando la ecuación de búsqueda “*Lippia origanoides* “and “*biomass waste*” o “*after steam distillation*”, se encontraron cuatro artículos, publicados por nuestro grupo de investigación, en uno de éstos, se ha divulgado parte de los resultados obtenidos en este trabajo. Usando la ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY: ("Lippia origanoides")* se han encontrado 150 artículos, en el periodo de 2004-2022, que involucran, en su mayoría, el estudio del aceite esencial y, también, se reportan algunas investigaciones sobre extractos. En la **Tabla 1**, se presentan los registros de artículos reportados y se evidencia, durante los últimos siete años, la

producción científica sobre *L. organoides* sea ha triplicado, lo que revela el interés científico creciente sobre esta planta y sus aplicaciones.

**Tabla 1.**

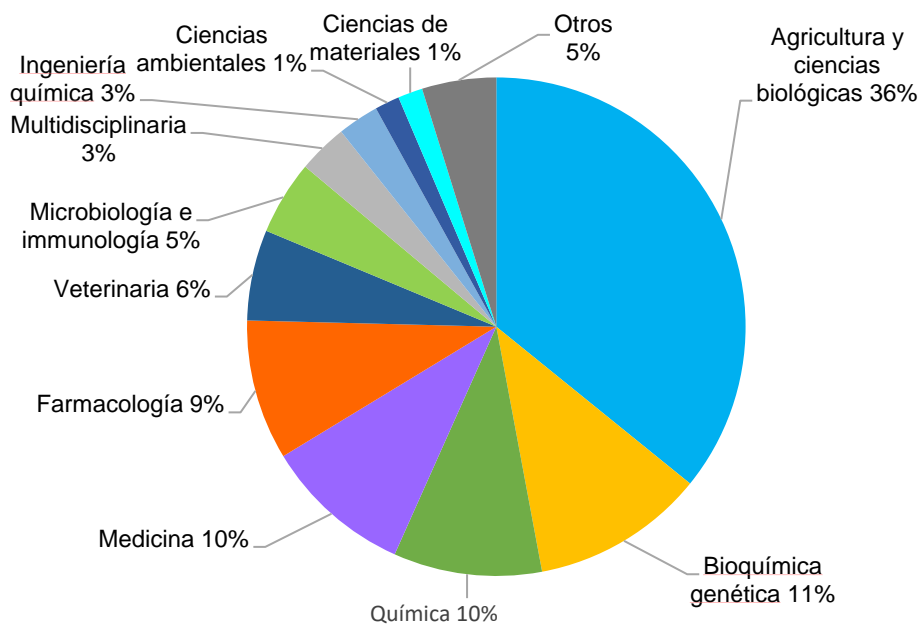
*Número de publicaciones científicas sobre Lippia organoides. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de observación 2004-2022. Fecha de consulta: 23 de enero de 2022. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: ("Lippia organoides")*

<b>Años de publicación</b>	<b>Número de registros</b>
2004-2009	15
2010-2014	34
2015-2022	101

En la **Figura 1**, se presenta la relación entre el porcentaje del número de publicaciones sobre *L. organoides* y el área de estudio. La agricultura y ciencias biológicas son las áreas con más reportes, con un 36% sobre el total de las publicaciones. La mayoría de los artículos hacen referencia al estudio de la actividad biológica del aceite esencial. Sin embargo, sobre la obtención de extractos hidro-alcohólicos de orégano de monte y su caracterización química, se encuentran pocos artículos; igualmente, sobre el uso de biomasa residual de *L. organoides* hay solo los artículos publicados por nuestro Centro de Investigación.

**Figura 1.**

Porcentaje del número de publicaciones sobre *L. origanoides*, según el área de estudio. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 2004-2022. Fecha de consulta: 23 de enero de 2022. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: ("*Lippia origanoides*").



La planta de *L. origanoides* y sus metabolitos secundarios presentan un especial interés debido a las diferentes propiedades que poseen. Las actividades antibacteriana y fungicida del aceite esencial de *L. origanoides* cultivada en Colombia y en Brasil han sido atribuidas principalmente al timol (Ramírez *et al.*, 2009; Medeiros *et al.*, 2016), mientras que la actividad antimicrobiana al metil cinnamato (Perera *et al.*, 2017) y al carvacrol (Majolo *et al.*, 2016). Los aceites esenciales de esta planta se han caracterizado y se clasificaron a través del análisis de componentes principales en tres quimiotipos, según sus componentes mayoritarios, *i.e.*, timol, carvacrol,  $\alpha$ -y  $\beta$ -felandrenos, *p*-cimeno y limoneno (Stashenko *et al.*, 2010). Se reportó, que el

aceite esencial y los extractos de *L. origanoides* poseen capacidad antioxidante cercana o superior a la de los antioxidantes sintéticos butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) (Celis C. 2007; Stashenko *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2009; Córdoba Y. 2013; Souza *et al.*, 2018; Cortés *et al.*, 2021).

En cuanto a los extractos, obtenidos de *L. origanoides*, se ha reportado la optimización del método de extracción, en el cual la relación etanol-agua (1:1, v/v), fue la variable que tuvo mayor influencia sobre el rendimiento de extracción (Coelho *et al.*, 2015). Aparte de la actividad antioxidante, también se han descrito las actividades acaricida contra *T. cinnabarinus* (Sivira *et al.*, 2011) y antifúngica de amplio espectro (de Barros *et al.*, 2019). Dentro la composición química de los extractos, se han encontrado varios flavonoides como apigenina, quercetina, luteolina, naringenina, taxifolina, orientina, vitexina, robinetin-7-*O*-hexosa, ramnocitrina, catequina, eriodictiol, pinocembrina, sakuranetina y galangina (Stashenko *et al.*, 2013; Leitão *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2019; Arias *et al.*, 2020 y Cortés *et al.*, 2021).

Del análisis de la revisión bibliográfica, se evidenció que los componentes mayoritarios presentes tanto en los aceites esencial como en los extractos de *L. origanoides* pueden variar, según las condiciones de crecimiento de las plantas, el suelo, época de cultivo, de cosecha y todo lo referente a la parte agrotecnológica (Acosta, L., 2010). En los trabajos de Leitão *et al.* (2017) y Cortés *et al.* (2021) se reporta la composición química estudiada por LC/MS de los extractos hidroalcohólicos, parte de los resultados de esta investigación fueron divulgados por Arias *et al.* (2020), quienes reportaron, por primera vez, 15 compuestos fenólicos en extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de biomasa residual, con lo que se puede demostrar, que los residuos, después de la destilación de la planta, pueden ser valorizados, al ser fuentes para la obtención de compuestos bioactivos. Hasta la fecha, sin embargo, no se encontraron reportes que indiquen,

cuáles son los metabolitos secundarios que aportan a la capacidad antioxidante en los extractos de esta planta.

### 1.1.2 *Hibiscus rosa-sinensis*

*Hibiscus* es un género conformado por más de 200 plantas, que pertenecen a la familia Malvaceae, entre éstas, figuran plantas herbáceas, anuales o perennes. Las plantas del género *Hibiscus* son originarias del Asia Sudoriental, crecen en ambientes cálidos, regiones tropicales y subtropicales, producen flores grandes y vistosas de colores variados, desde blanco, rosado, rojo, morado, amarillo, anaranjado y sus combinaciones, algunas, se usan en diferentes culturas con fines ornamentales (Dwivedi *et al.*, 1977). La flor de *Hibiscus rosa-sinensis* es la flor nacional de Malasia (Watson R, 2014). En Colombia, las plantas de *H. rosa-sinensis* se conocen como cayenos, según su nombre vernáculo, y se cultivan con propósitos ornamentales, por sus flores, vistosas y coloridas. En Asia del Sur, los cayenos se utilizan en la medicina tradicional para aliviar el catarro bronquial y la diarrea (Gilani *et al.*, 2005).

La búsqueda sistemática sobre las publicaciones científicas sobre los extractos de *H. rosa-sinensis* se realizó en la base de datos *Scopus (Elsevier)*; se utilizó como ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY: ("Hibiscus rosa-sinensis")*, durante un periodo de observación de 2004-2022. En total, se encontraron 641 publicaciones científicas relacionadas con el tema (**Tabla 2**), cuyo interés está enfocado en las aplicaciones de *H. rosa-sinensis* en los sectores cosmético y farmacéutico.

**Tabla 2.**

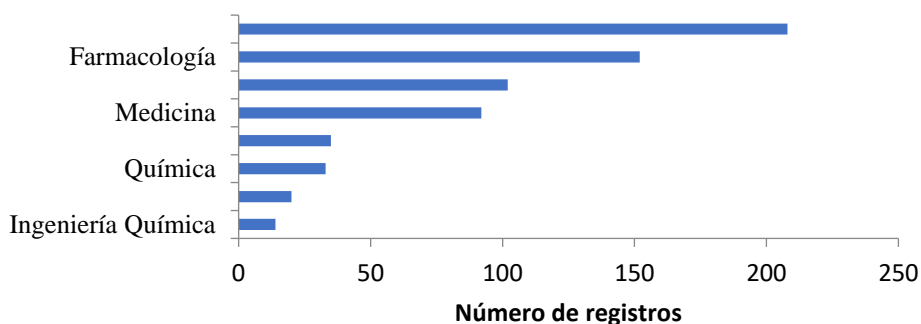
Número de publicaciones sobre *H. rosa-sinensis*, según año. Fuente: Scopus (Elsevier). Fecha de consulta: 23 de enero de 2022. Periodo de observación 2004-2022. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: ("*Hibiscus rosa-sinensis*").

Años de publicación	Número de registros
2004-2010	111
2011-2015	252
2016-2022	278

En la **Figura 2** se observa la relación entre el número de publicaciones y el área de estudio. Se evidencia que las áreas de mayor estudio son la agricultura y ciencias biológicas. En algunos artículos que se encuentran en estas áreas, se estudian los efectos anticancerígenos, antioxidantes, estimulantes del crecimiento capilar de los extractos de la flor *H. rosa-sinensis*.

**Figura 2.**

Número de publicaciones sobre *H. rosa-sinensis*, según área de estudio. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 2004-2022. Fecha de consulta: 23 de enero de 2022. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: ("*Hibiscus rosa-sinensis*").



Entre los estudios más relevantes sobre *H. rosa-sinensis* se destacan varios estudios sobre la capacidad antioxidante de flores, hojas y tallos, medida por los métodos DPPH\*, peroxidación

lipídica y FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (Vankar y Srivastava, 2008; Sheth and De 2012; Patel *et al.*, 2012; Mak *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014 y Afify y Hassan, 2016), de los métodos reportados, el de DPPH• tiene menor relevancia biológica, y resulta ser muy deficiente en simular *in vitro* su acción en sistemas reales (Prior *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha reconocido la especie *Hibiscus* como promisorio para su uso en tratamientos médicos de diabetes (Sachdewa *et al.*, 2001; Sachdewa y Khemani, 2003; Moqbel *et al.*, 2011; Zaki *et al.*, 2017 y Pillai, 2016).

Entre otras de las actividades biológicas reportadas para los extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de hojas y flores de *H. rosa-sinensis* se destacan la actividad antimicrobiana (Seyyednejad *et al.*, 2010; Ruban y Gajalakshmi 2012 y Mak *et al.*, 2013) y su potencial como estimulante para el crecimiento del cabello (Adhirajan *et al.*, 2003 y Upadhyay *et al.*, 2013).

Sobre la composición química se encontraron artículos generales sobre estudios fitoquímicos cualitativos, en ellos, se reportó la presencia de taninos, flavonoides, saponinas y alcaloides (Patel *et al.*, 2012 y Rao *et al.*, 2014). Yasuyuki *et al.* (1990) aislaron cianidina-3-soforósido y Shen *et al.* (2021), aislaron quercetina-soforósido, y caracterizaron estos compuestos por resonancia magnética nuclear (RMN). En otras investigaciones (Sachdewa y Khemani, 2003; Gauthaman *et al.*, 2006; Rengarajan *et al.*, 2020) los autores encontraron ácidos orgánicos, hibiscetina, antocianinas, antocianidinas, acetato de taraxerilo,  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol, ergosterol, usando la técnica instrumental HPLC-DAD.

## 1.2 Metabolismo secundario

El metabolismo primario es un conjunto de reacciones químicas, que da lugar a la biosíntesis de aminoácidos, lípidos, proteínas, azúcares, entre otros, que desempeñan un papel importante en la existencia y en el desarrollo fisiológico de la planta (Hanson, 2013). Existe también una gran cantidad de compuestos orgánicos, que no están involucrados directamente en el crecimiento y desarrollo de la planta; a ellos, se les conoce como “metabolitos secundarios”. Estos compuestos están relacionados con el sistema de defensa y de adaptación de las plantas a su habitat, así como para comunicarse con otras especies; son responsables de las características odoríferas de las plantas y de su actividad biológica. Los metabolitos secundarios de las plantas pueden dividirse en tres grandes grupos: **1.** Terpenoides; **2.** Compuestos fenólicos y **3.** Compuestos nitrogenados (Taiz y Zeiger, 2002).

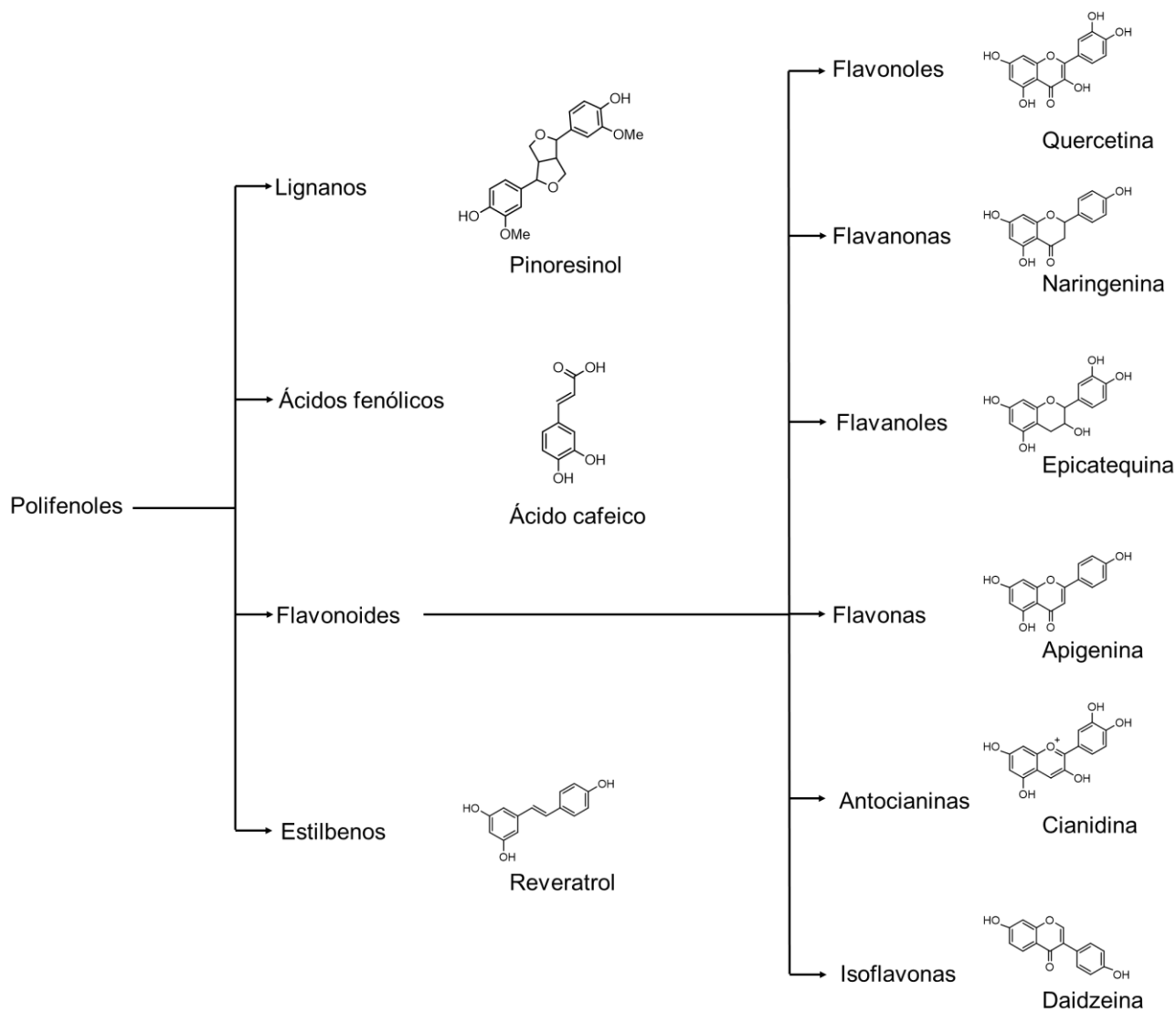
## 1.3 Polifenoles

Los compuestos fenólicos, producidos a partir del metabolismo secundario de las plantas, constituyen un grupo numeroso representado por diferentes sustancias (*ca.* 8000 sustancias reportadas) (Gómez *et al.*, 2006). Se destacan químicamente por la presencia de al menos un anillo aromático que lleva uno o más sustituyentes (grupos hidroxilo, ésteres y glucósidos). En las plantas, se encuentran como una mezcla, y se pueden clasificar, según sus estructuras químicas (Manach *et al.*, 2004). La clasificación más utilizada, los divide en ácidos fenólicos, flavonoides y, los menos abundantes, estilbencenos y lignanos, aunque existen también otras estructuras (Bhat *et al.*, 2005). Los polifenoles son solubles en agua, debido a que se encuentran con frecuencia como glucósidos situados en la vacuola celular de las plantas (Proestos *et al.*, 2006). En la **Figura 3**, se muestran algunos de los principales compuestos fenólicos presentes en plantas.

Los flavonoides constituyen el grupo más grande y diverso de los polifenoles, se clasifican en flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas y flavonoles (catequinas y proantocianidinas). Estos compuestos poseen una estructura de benzopirona  $C_6-C_3-C_6$  y presentan, en diferentes posiciones, diversos grupos funcionales, *e.g.*, hidroxilo, metoxilo u *O*-glucósido; esto explica la existencia de más de 8000 estructuras conocidas hasta la fecha (Havsteen, B., 2002).

**Figura 3.**

*Algunas familias de compuestos fenólicos encontrados en plantas. Tomado con modificaciones de Hooper y Cassidy (2006).*



Las antocianinas se encuentran en la cáscara de la uva, mora, manzana, ciruela, pera, rosas, col morada y, también, en flores de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), entre otras; son responsables de su coloración característica que depende del tipo y la concentración de

antocianinas. La coloración de las antocianinas depende del pH, de la presencia de otros flavonoides (efecto de copigmentación), de la temperatura y la luz, entre otros (Gross J., 1987). Las antocianinas, en plantas se encuentran como glicósidos, *i.e.*, una antocianidina se une a un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glicosídico (Cavalcanti *et al.*, 2011).

En las plantas, que crecen a una gran altitud, los azúcares juegan un papel crítico en su metabolismo celular. Se ha demostrado (Gross J. 1987), que estas plantas tienen niveles de azúcares altos, ello, para aumentar su tolerancia a tensiones abióticas tales como la sequía y la temperatura de congelación. Los azúcares comúnmente encontrados son la D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-arabinosa y D-xilosa, la presencia de estas unidades otorga una mayor estabilidad y solubilidad a los polifenoles (Gross J., 1987).

### **1.3.1 Biosíntesis de polifenoles**

En las plantas superiores, la ruta biosintética de polifenoles inicia con el ácido shiquímico; a través de esta ruta, se sintetizan la mayoría de los fenoles y flavonoides. La ruta inicia con la síntesis de fenilalanina, a partir del ácido shiquímico, acompañada de la posterior desaminación de la fenilalanina, para producir el ácido *trans*-cinámico. A partir de este ácido se sintetiza el *p*-cumaroil-CoA, que se condensa con el malonil-CoA, dando lugar a la formación de chalconas, precursoras de todos los compuestos fenólicos conocidos como flavonoides (Ávalos *et al.*, 2009).

### **1.3.2 Polifenoles: su relación con el color y la fotoprotección.**

Los polifenoles juegan un rol en la fisiología de plantas importante, las defienden de patógenos, atraen polinizadores debido a la variabilidad de colores que otorgan a diferentes

partes de las plantas; además, las protegen de la radiación UV y de las especies reactivas de oxígeno (Treutter. D., 2006).

En los frutos, las concentraciones altas de flavonoides se relacionan con la baja incidencia de patógenos; por lo tanto, los frutos verdes son generalmente más resistentes a la descomposición inducida por hongos (Treutter, 2006). Los flavonoides también juegan un papel importante en la conservación de las frutas y verduras poscosecha, debido a que los diferentes tratamientos inducen un aumento en la biosíntesis de compuestos fenólicos, que aumenta la resistencia del huésped a los patógenos durante la poscosecha (Lattanzio *et al.*, 1994; Lattanzio, 2003). La producción de antocianinas epidérmicas en las hojas de algodón es un indicio de resistencia a la plaga bacteriana *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum*, según Kangatharalingam *et al.* (2002).

Los flavonoides como pigmentos se encuentran relacionados con los colores de las flores, especialmente, las antocianinas, moléculas responsables por las señales visuales, útiles para atraer polinizadores. Estas señales se perciben de forma específica por cada polinizador, ya que lo que pueden ver los polinizadores depende de sus órganos visuales, la agudeza y la sensibilidad a los colores; de esta manera, la misma flor puede ser observada distintamente por cada polinizador (Miller *et al.*, 2011).

Manlan *et al.* (2012) estudiaron los pigmentos de las flores de lirio de agua (familia Nymphaeaceae), con el fin de correlacionar la composición química de los pigmentos con el color de la flor; a su vez, los autores clasificaron los cultivares estudiados y no encontraron antocianinas en las variedades blancas y amarillas. Wan *et al.* (2019) determinaron

flavonoides y carotenoides en diferentes cultivares de rosas y estudiaron la contribución a sus colores, concluyendo que el color en las rosas amarillas está influenciado por carotenoides, mientras en las flores naranjas por antocianinas, otros flavonoides y sus relaciones cuantitativas.

Los polifenoles, metabolitos secundarios de las plantas, se consideran filtros solares naturales, ya que tienen la capacidad de absorber la radiación ultravioleta (Saewan y Jimtaisong, 2013). De hecho, los flavonoides muestran dos picos de absorción máximos en la región ultravioleta visible, uno a  $\lambda = 240$  y  $280$  nm, y otro, entre  $\lambda = 330$  y  $550$  nm, lo que permite emplearlos como filtros solares en formulaciones fotoprotectoras (Kale *et al.*, 2010).

Estudios experimentales en ratones han demostrado que los polifenoles protegen la piel de los efectos adversos de la radiación ultravioleta (UV) a través de múltiples vías (Afaq y Katiyar, 2011). Por ejemplo, Giampieri *et al.* (2012) encontraron que la cianidina-3-glucósido extraída de la fresa, aumentó la viabilidad celular y disminuyó el daño del ADN de fibroblastos humanos, después de someterlos a radiación UVA. Además de los estudios realizados en células y en ratones, Elmets *et al.* (2001) hallaron que el uso tópico de una solución de té verde al 2,5% en voluntarios humanos, logró inhibir el eritema inducido por la radiación UV.

Se ha demostrado el efecto sinérgico de la combinación de filtros solares físicos o químicos con polifenoles, como es el caso de la quercetina-rutinósido (0,1%) que, al mezclar con la benzofenona (6%), generó un aumento del factor de protección solar (FPS) de 24,3 a 33,3 (Velasco *et al.*, 2012). En el estudio realizado por Chiari *et al.* (2014) se reportó también

un efecto sinérgico del 20% en el FPS, al mezclar el extracto de café verde y el filtro solar sintético de etilhexilmetoxicinamato. Con estos resultados, se evidencia que, al combinar los polifenoles con filtros solares sintéticos, se potencializa el FPS, se mejora la fotoestabilidad y, además, se incorporan antioxidantes naturales a las formulaciones cosmética, con lo que se mejoran las características beneficiosas que estos productos le pueden otorgar a la piel (Nunes *et al.*, 2018).

### **1.3.3 Extracción de polifenoles**

Existen muchos estudios sobre polifenoles en diferentes matrices vegetales; la extracción de antocianinas y flavonoides con solventes ha sido el método más utilizado para su aislamiento. Se han empleado diferentes solventes orgánicos, entre ellos, figuran etanol, metanol o isopropanol, así como el agua y la acetona o sus combinaciones (Kähkönen *et al.*, 2001). Estos solventes se emplean ampliamente, ya que pueden ser removidos fácilmente del extracto aislado, sin afectar su composición (Aybastier *et al.*, 2013).

Para aislar flavonoides, se usa la extracción convencional con solvente que involucra calentamiento, ebullición o reflujo, sin embargo, la desventaja de este método es la posible pérdida o la transformación de estos compuestos, debido a tiempos de extracción largos, la hidrólisis y oxidación que pueden sufrir (Hui *et al.*, 2005). En los últimos años, varias técnicas de la extracción de sustancias bioactivas se han desarrollado, entre ellas, la extracción asistida por ultrasonido, por la radiación de microondas, con fluido supercrítico y extracción acelerada con solventes (Wang y Weller, 2006). La extracción asistida por ultrasonido se destaca como una alternativa económica, sencilla y eficiente a otras técnicas convencionales de extracción (Jing *et al.*, 2008).

Otra de las técnicas que se emplean actualmente para la extracción de flavonoides, es la extracción con fluidos supercríticos, que se destaca frente a otras técnicas extractivas, por presentar algunas ventajas como: no utilizar disolventes orgánicos nocivos o emplear menor cantidad de disolvente; la despresurización del solvente usada en el proceso de extracción, permite separar el solvente del soluto en un solo paso, dejando libre de solvente el extracto, además, el uso de algunos gases como el dióxido de carbono, que tiene punto crítico bajo, es abundante en forma pura, disponible, de bajo costo, no es tóxico ni inflamable, y después del proceso de extracción, el CO<sub>2</sub> puede reciclarse y reutilizarse para otras extracciones. Todas estas ventajas hacen de la extracción con fluido supercrítico un método interesante para la extracción de compuestos bioactivo (Sathasivam *et al.*, 2022).

#### **1.3.4 Identificación y cuantificación de polifenoles**

La cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), acoplada a diferentes sistemas de detección, es la técnica más usada para la separación y análisis de sustancias de naturaleza fenólica (Sun *et al.*, 2006). Se emplean columnas de sílice modificada con octilsilano (C<sub>8</sub>) u octadecilsilano (C<sub>18</sub>); columnas de 1 a 3 cm, con diámetro interno usualmente de 4,6 mm (Merken y Beecher, 2000). Las fases móviles empleadas son soluciones acuosas acidificadas con ácido acético, trifluoroacético, perclórico, *o*-fosfórico y fórmico, o con *buffers* de acetato o formiato en agua (solvente A), y metanol o acetonitrilo como modificadores orgánicos (solvente B) (Merken y Beecher, 2000; Molnár y Füzfal, 2005).

Los sistemas de detección más empleados son conjuntos de fotodiodos, otros, incluyen detectores electroquímicos y fluorimétricos, cuando se necesita aumentar la

especificidad. Sin embargo, la espectrometría de masas (MS) acoplada a cromatografía líquida LC (LC/MS) con interfaces de ionización química a presión atmosférica (APCI) o ionización por *electrospray* (ESI), operadas tanto en modo de iones positivos como de iones negativos, permiten el análisis de mezclas complejas, combinando la capacidad de separación eficiente y alta sensibilidad con la caracterización estructural (Merken y Beecher, 2000; Molnár y Füzfai, 2005; Rijke *et al.*, 2006).

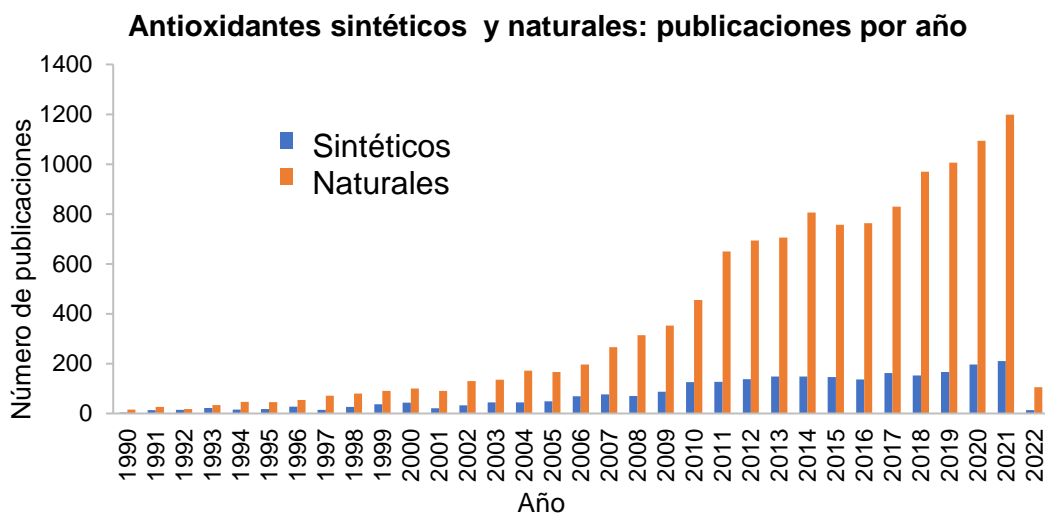
#### 1.4 Antioxidantes naturales y sintéticos

Los antioxidantes (AO) se clasifican, según su origen, como naturales o sintéticos (Halliwell, 1990). Krinsky (1992) define un antioxidante natural como un “compuesto que protege sistemas biológicos en contra de los efectos dañinos potenciales de los procesos o reacciones que causen oxidación extensiva”. Los consumidores y organizaciones de control están preocupados por la seguridad de los alimentos y, sobre todo, por los posibles efectos nocivos de los aditivos sintéticos en la salud humana. A pesar de su bajo costo y la alta estabilidad de los antioxidantes sintéticos, estudios realizados han detectado un posible efecto carcinogénico, lo que ha contribuido a la disminución de su uso o consumo (Botterweck *et al.*, 2000).

En el presente trabajo, se realizó una búsqueda cuantitativa en la base de datos *Elsevier (Scopus)* de antioxidantes naturales y sintéticos. Como ecuación de búsqueda se empleó la siguiente: *TITLE-ABS-KEY (“Synthetic antioxidants”)* y (*“Natural antioxidants”*). Los resultados se presentan en la **Figura 4**. Se compara el número de publicaciones sobre antioxidante naturales y sintéticos, a través del tiempo, y se observa una tendencia creciente del número de publicaciones sobre el uso de antioxidantes de origen natural.

**Figura 4.**

Número de publicaciones sobre antioxidantes naturales y sintéticos. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de búsqueda: 1990-2022. Fecha de consulta: 24 de enero de 2022. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“Synthetic antioxidants”) y (“Natural antioxidants”).



Los antioxidantes sintéticos, sin embargo, se han empleado más que los de origen natural, debido a que presentan una estabilidad más alta, disponibilidad y, además, son de bajo costo en comparación con los antioxidantes naturales (Xiu *et al.*, 2009). Los antioxidantes sintéticos más empleados en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica han sido el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT), el galato de propilo (PG) y la *terc*-butilhidroquinona (TBHQ) (IPCS<sub>a y b</sub>, 1999 y Xiu *et al.*, 2009). Sin embargo, el uso prolongado de antioxidantes sintéticos se ha asociado con problemas de salud, como alergias en la piel, problemas gastrointestinales y, en casos más delicados, estos compuestos se han

relacionado con un mayor riesgo de cáncer (Botterweck *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2005; Randhawa y Bahna, 2009 y Engin *et al.*, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), y el Programa Internacional de la Seguridad Química (INCHEM) (IPCS<sub>a</sub> y b, 1999), establecen los límites máximos de antioxidantes sintéticos permitidos para una amplia gama de alimentos sólidos y bebidas. Los antioxidantes, BHT y BHA, tienen valores ADI (*Acceptable Daily Intake*) entre 0-0.3 y 0-0.5 mg/kg de peso corporal, respectivamente.

Estudios *in vivo* realizados por Iverson (1999) sobre el BHA en ratones, demostraron una inflamación en la mucosa de los estómagos de los roedores. Estos cambios se observaron, cuando el BHA se administró tanto por sonda en aceite como en la dieta. El TBHQ tuvo el mismo efecto, pero menos pronunciado que el BHA; igualmente, el BHT produjo un incremento en la proliferación celular, pero el efecto fue menor que el producido por el BHA.

Según Botterweck *et al.* (2000), en un estudio realizado en hombres y mujeres de 55 a 69 años, que tuvieron una dieta rica de alimentos que contenían BHA y BHT, no se encontraron evidencias claras de la asociación de estos compuestos con el cáncer de estómago. Empero, “*The International Agency for Research on Cancer*” concluyen que sí hay suficiente evidencia para sospechar que el BHA y BHT son responsables de la carcinogénesis y del daño hepático cuando se usan en grandes cantidades en animales de experimentación (IARC, 1986).

Dolatabadi y Kashanian, (2010), reportaron que los aditivos empleados en alimentos como TBHQ, BHA, TBMP y PG pueden formar complejos moleculares con estructura de

ácido nucleico y causar daño a la estructura helicoidal doble del ADN. El resumen sobre las regulaciones, aplicaciones y propiedades del BHA, BHT y TBHQ se muestran en la **Tabla 3** (Sahidi y Zhong, 2005).

**Tabla 3.**

*Propiedades, aplicaciones y regulaciones de los aditivos antioxidantes sintéticos.*

<b>Propiedad</b>	<b>BHA</b>	<b>BHT</b>	<b>TBHQ</b>
Utilización en comidas	Grasas animales, margarinas, quesos, alimentos procesados, carnes, cereales, papas, bebidas, vitaminas.	Alimentos cocinados al horno, papas fritas, margarinas, bocadillos y mariscos.	Grasas, margarinas, embutidos de carne, aceites vegetales, cereales secos, carne de ave.
Función en las comidas	Antioxidante conservante, atrapador de radicales libres durante los procesos de oxidación.	Antioxidante conservante, atrapador de radicales libres durante los procesos de oxidación.	Antioxidante conservante, atrapador de radicales libres durante los procesos de oxidación.
Efecto sinérgico	BHT, galato de propilo, ácido cítrico y fosfórico	BHA	BHA y ácido cítrico
Seguridad alimentaria	Ha demostrado la formación de tumores en el estómago de animales de experimentación	Este antioxidante no ha sido sujeto a una gran crítica.	Ha mostrado mutagenicidad <i>in vivo</i> .
Legislación	EE. UU.: nivel máximo aprobado para uso general; FDA: 0,02% y USDA: 0,01% del peso de la grasa. Reino Unido, Europa, Canadá y Australia: aprobado	EE. UU.: nivel máximo aprobado para uso general; FDA: 0,02% y USDA: 0,01% del peso de la grasa. Reino Unido, Europa, Australia, Japón y Canadá: aprobado	EE. UU.: no se permite usar en combinación con el galato de propilo, FDA: 0.02% y USDA: 0.01% del peso de la grasa. Reino Unido, Noruega, Dinamarca, Suecia, Suiza, Canadá, Japón: no se permite su uso en comida. Australia, Nueva Zelanda: permitido su uso en comida.

FDA: *Food and Drug Administration* (Sahidi y Zhong, 200

### 1.5 Determinación de capacidad antioxidante, fotoprotectora, citotóxica y sensibilizante de extractos naturales

Los antioxidantes pueden ser extraídos de plantas, tejidos animales, o ser productos del procesamiento de los alimentos; comúnmente, muchos de los AO son compuestos fenólicos, tales como tocoferoles, flavonoides o ácidos fenólicos. Los compuestos sintéticos son igualmente compuestos fenólicos, con grupos alquílicos introducidos, para aumentar su solubilidad en grasas (Krinsky, 1992; Exarchou *et al.*, 2006).

Debido a la complejidad de los extractos de las plantas y alimentos, se han desarrollado varios métodos para evaluar la capacidad del antioxidante. Sin embargo, no existe un método estándar y único para esta determinación (Niki *et al.*, 2000). Entre algunos ensayos, para medir la capacidad antioxidante, se destacan aquellos cuyo mecanismo incluye la transferencia de átomos de hidrógeno o de un electrón, o el mecanismo mixto. En la **Tabla 4**, se resumen las características de los métodos más utilizados actualmente para medir capacidad antioxidante (Prior *et al.*, 2005).

Los ensayos de transferencia de electrón tienen en cuenta una reacción redox, sin embargo, Prior *et al.* (2005), reportaron la importancia del mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés) sobre mecanismo de transferencia de electron (ET, por sus siglas en inglés), debido a su mecanismo de acción; porque en el mecanismo HAT, los radicales utilizados son peroxilo, que predominan en las comidas y en sistemas biológicos, razón por la cual el método de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC) es uno de los ensayos *in vitro* que más simulan su acción en sistemas reales.

**Tabla 4.**

*Métodos más utilizados actualmente para medir capacidad antioxidante (Sánchez, 2002; Prior et al., 2005).*

<b>Método</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Ejemplos de matrices</b>	<b>Referencias</b>
ORAC <sup>a</sup>	Transferencia de átomo de hidrógeno	Bebidas comerciales de <i>Ilex paraguariensis</i> ; sorgo y productos derivados; avellanas, frutos de <i>Passiflora mollissima</i> ; flores de <i>Cananga odorata</i> , <i>Actinidia chinensis</i> , <i>Jasminum grandiflorum</i> , <i>Lavandula augustifolia</i> y <i>Rosa damascena</i> .	Awika et al. (2003). Dudonné et al. (2009). García et al. (2017). Pelvan et al. (2018). Mateos et al. (2018).
FRAP <sup>b</sup>	Transferencia de electrón	Diferentes semillas de legumbres, garbanzo, quinoa, maní y guayaba; bebidas herbales.	Benzie y Szeto, (1999). Thaipong et al. (2006). Xu et al. (2007). Segev et al. (2010). Brand et al. (2012). Shem et al. (2012).
CUPRAC <sup>c</sup>	Transferencia de electrón	Bebidas herbales de <i>Anagallis arvensis</i> , <i>Helichrysum italicum</i> , <i>Camellia sinensis</i> , <i>Fumaria officinalis</i> , <i>Melissa officinalis</i> ; colorantes empleados en alimentos.	Apak et al. (2006). Ozdemir et al. (2016).
ABTS <sup>+•d</sup>	Transferencia de electrón	Semillas de <i>Abelmoschus moschatus</i> , <i>Coffea arabica</i> , <i>Daucus carota</i> ; sorgo; diferentes frutas: fresa, kiwi, ciruelas, papaya, mango, piña, melón, manzanas, aguacate, mora, pera y en aceites esenciales de <i>L. origanoides</i>	Leong y Shui et al. (2002). Awika et al. (2003). García et al. (2004). Stashenko et al. (2008). Dudonné et al. (2009).
DPPH <sup>•e</sup>	Transferencia de electrón	Nueces, aceites de semillas, leche y derivados; guayaba, flores de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> .	Thaipong et al. (2006). Sreeramulu y Raghunath, (2011). Sheth and De, (2012).

<sup>a</sup>ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno); <sup>b</sup>FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*); <sup>c</sup>CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*); <sup>d</sup>ABTS<sup>+•</sup> (Capacidad de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+•</sup>); <sup>e</sup>DPPH<sup>•</sup> Ensayo de radical difenil-1-picrilhidracilo.

Como parte de la defensa antioxidante, el organismo humano sintetiza ciertas enzimas cuya función es remover las especies reactivas de oxígeno (ROS), su acción antioxidante se traduce en una disminución del estado redox de la célula. Entre estas enzimas se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), que reduce radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, la catalasa (CAT) que convierte peróxido de hidrógeno a agua, la glutatión peroxidasa (GSpx) que reduce lipo-hidroperóxidos a sus alcoholes correspondientes, glutatión-S-transferasa (GST), que actúa reduciendo peróxidos orgánicos, la glutatión reductasa que convierte glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) (Hamid *et al.*, 2010).

Por otro lado, dentro de los métodos *in vitro* que se emplean para determinar el factor de protección solar (FPS) tanto de extractos naturales como de productos cosméticos que incorporan filtros solares, se emplea un espectrofotómetro para medir la absorbancia de soluciones diluidas de extractos en cubetas de cuarzo (Mansur *et al.*, 1986) o la transmitancia para formulaciones cosméticas en placas de cuarzo o biomembranas, en las longitudes de onda  $\lambda=290$  a 320 nm, con saltos de 5 nm (Nunes *et al.*, 2018). En la actualidad, se cuenta con cuatro métodos para determinar del FPS, principalmente, con materiales opacos, como productos cosméticos, a saber: FDA (estadounidense), DIN (alemán) donde los valores resultantes son la mitad de los del FDA, SAA (australiano) en el que los valores resultantes son intermedios entre los dos anteriores y el COLIPA (europeo) (Batlle, 2005).

Colombia es uno de países que perteneces a La Comunidad Andina de Naciones (CAN), la cual no cuenta con una normativa específica sobre protectores solares. Sin embargo, en Colombia existe la Resolución 3132 de agosto de 1998 del Ministerio de Salud Pública, que reglamenta las normas sobre protectores solares y que aplica en las partes que

no contravienen la Decisión 516 de 2002 de la Comisión de la Comunidad ANDINA, que tiene carácter supranacional (MinSalud, 1998). Adicionalmente, el Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC) cuenta con una Guía sobre protectores solares, que puede ser usada. En Colombia se acepta usar los métodos propuestos por la FDA, o por COLIPA, en este último la determinación del FPS *in vitro*, se realiza empleando un analizador de transmitancia UV-2000S.

A parte de estudiar la capacidad antioxidante o fotoprotectora de los extractos vegetales, es necesario determinar su posible potencial tóxico. La evaluación del potencial tóxico de extractos naturales al inicio del estudio, es indispensable para seleccionar muestras líderes para la fase de diseño de un producto para uso humano (Velandia *et al.*, 2016). Actualmente, los experimentos en animales no se recomiendan, además, tienen limitaciones como costo de infraestructura alto, número de muestras que es limitado, y su análisis, está restringido solo a aquellas pruebas que no causen sufrimiento al animal, según normas éticas (Chhabra *et al.*, 2003). Debido a estas dificultades, el uso de ensayos basados en célula (citotoxicidad *in vitro*) ha aumentado (Velandia *et al.*, 2016).

La actividad sensibilizante es otro ensayo que brinda información sobre la seguridad y la viabilidad del uso de los extractos vegetales (Nukada *et al.*, 2012). Uno de los parámetros para evaluar efectos adversos que pueden causar diferentes sustancias o preparados herbales (Edris, 2007) es la tendencia de causar dermatitis alérgica de contacto (DAC). Los compuestos sensibilizantes incrementan la secreción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de marcadores de activación inmune en células que contienen el antígeno (Parise *et al.*, 2015). El incremento de IL-8, como indicador temprano de respuesta inmune innata,

se reconoce como indicador de sensibilización a DAC (Kaplan *et al.*, 2012; Nukada *et al.*, 2012; Miyazawa *et al.*, 2007). Los monocitos de origen humano, estimulados *in vitro* con LPS (lipopolisacáridos) producen IL-8 en concentración fácilmente detectable y, por esta propiedad, se usan en ensayos que evalúan el efecto sensibilizante de compuestos de interés (Nukada *et al.*, 2008; Parise *et al.*, 2015).

Del marco de antecedentes, se evidenció el interés científico sobre las dos matrices vegetales bajo estudio, que se reflejó en el aumento de las publicaciones a través del tiempo. Sobre la planta *H. rosa sinensis* y sus aplicaciones se encontró mucha más información que sobre *L. origanoides*, sin embargo, en la mayoría de las publicaciones se realizó un análisis fitoquímico muy general y se evaluaron diferentes actividades biológicas. De estos estudios se puede concluir que ambas plantas son promisorias y sus metabolitos secundarios pueden ser usados para el tratamiento de diversas enfermedades. En este trabajo doctoral, se aprovechó todo el conocimiento ya existente sobre estas plantas para profundizar, a través de la química analítica, en el estudio de la extracción y caracterización de la composición química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de diferentes quimiotipos de biomasa residual de *L. origanoides* y de cultivares de *Hibiscus rosa-sinensis*, su relación con la capacidad antioxidante evaluada a través de diversos métodos, su actividad fotoprotectora, citotóxica y sensibilizante, incluso su relación con el color en el caso de las flores. Además, se diseñó un prototipo cosmético que incorporó el extracto biológicamente más activo encontrado entre las plantas estudiadas. A continuación, se presentan los objetivos planteados en esta tesis doctoral y la metodología usada en el estudio para alcanzarlos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Determinar el potencial biológico de los extractos obtenidos a partir de la biomasa residual de *Lippia origanoides* y de flores de *Hibiscus rosa-sinensis*, usando diferentes ensayos que evalúen la capacidad antioxidante, fotoprotectora, propiedades citotóxicas y sensibilizantes.

### 2.2 Objetivos específicos

Encontrar las mejores condiciones (temperatura, tiempo de extracción, relación material/solvente, relación de solventes) para la extracción hidro-alcohólica de flavonoides de *H. rosa-sinensis* y de la biomasa residual de *L. origanoides* para obtener extractos con alta capacidad antioxidante medida por el ensayo ORAC.

Determinar las condiciones operacionales que permitan detectar, cuantificar e identificar de una manera sensible y reproducible flavonoides en extractos vegetales, mediante el estudio de parámetros de adquisición (voltajes de capilar, fase móvil, pH) de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, usando la interfaz de electro-nebulización.

Identificar por LC-ESI(+)-MS los metabolitos secundarios de flores de *H. rosa-sinensis* y de la biomasa residual de *L. origanoides*, aislados por extracción con solventes y CO<sub>2</sub> supercrítico.

Establecer la relación entre la capacidad antioxidante, el color y la composición química de extractos de diferentes cultivares de flores de *H. rosa-sinensis*.

Medir las propiedades biológicas (antioxidante, fotoprotectora, citotóxico y sensibilizante) de extractos de flores de *H. rosa-sinensis* y de la biomasa residual de *L. origanoides*, e implementar el método antioxidante de decoloración del  $\beta$ -caroteno en complemento al ensayo por el método ORAC.

Diseñar y estudiar un prototipo de producto cosmético con propiedades antioxidantes y fotoprotectoras, que incorpore el extracto que demuestre tener la capacidad antioxidante más alta, junto con la fotoprotectora, y que tenga actividades citotóxica y sensibilizante bajas.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Reactivos

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se utilizaron los siguientes reactivos y sustancias-patron: cloruro de pelargonidina (95%), cloruro de cianidina (95%), naringenina (95%), kaempferol (90%), kaempferol-3-glucósido (95%), eriodictiol (95%), pinocembrina (95%), apigenina (95%), rutina (95%), quercetina (95%), quercetina-3-glucósido (98%), ácido gálico (99%), catequina (98%), ácido-*p*-hidroxibenzoico (97%), ácido carnósico (91%), ácido clorogénico (95%), epicatequina (97%), ácido elágico (95%), ABTS (sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (98%), AAPH [2,2'-azinobis-(2-amidino-propano) diclorhidrato] (98%),  $\alpha$ -tocoferol (97%), Trolox<sup>®</sup> (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico) (97%), BHT (98,8%), fluoresceína [benzoato disódico de 2-(3-oxo-6-óxido-3H-xanten-9-il)],  $\beta$ -caroteno (97%), ácido linoleico (93%), Tween 40, MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio], DMSO (99.5 %), LPS (lipopolisacáridos de *Escherichia coli*), polisorbato 80 y aminometilpropanol (95%) adquiridos de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EE. UU.). La cianidina-3-glucósido (95%), cianindina-3,5-glucósido (95%), cianidina-3-rutinósido (99%), delfinidina-3-glucósido (90%) y pelargonidina-3-glucósido (95%) se adquirieron de *PhytoLab GmbH & Co. KG* (Vestenbergsgreuth, Alemania). El metanol y etanol absoluto (99,9%), ácido fórmico Suprapur (98-100%), bifosfato de potasio (99%), acetato de sodio (99%), sulfato de sodio anhidro (99%), ácido clorhídrico (37%), persulfato de potasio (PDS, 97%), cloruro de potasio (99,5%), cloroformo y metanol, grado HPLC (99,8%) fueron adquiridos de *Merck* (Darmstadt, Alemania). Acetonitrilo o metanol grado LC-MS ( $\geq 99.9\%$ ), se comparon a

*Honeywell Burdick & Jackson* (Morristown, NJ, EE. UU.). *Kit de Elisa* Invitrogen KHC0081 fue adquirido de *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, EE. UU.). Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato de BASF (Sao Paulo, Brasil), octilmetoxicinamato de Fragon Iberica (Barcelona, España), solución acuosa de metilisotiazolinona y etanol. Produtos Especiais LTDA (São Paulo, Brasil), carboxipolimetileno de Pharma Nostra (Rio de Janeiro, Brasil). El etanol industrial (95%) fue adquirido a Suquin (Bucaramanga, Colombia); CO<sub>2</sub> (99.8%) fue comprado a Praxair (Bucaramanga, Colombia). El agua Tipo I fue producida en un equipo purificador *Synergy UV* de Merck Millipore (Molsheim, Francia), disponible en el laboratorio CROM-MASS, UIS (campo principal, Bucaramanga, Colombia).

## 3.2 Material vegetal

### 3.2.1 *Recolección e identificación botánica*

Para la siembra del material vegetal, se usaron esquejes de tres quimiotipos de *L. origanoides* (quimiotipos timol, carvacrol y felandreno, Véase **Figura 5**). Los esquejes se sembraron en el vivero N° 2 del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, durante dos meses, posteriormente, fueron trasplantados a la zona de cultivos experimentales, hasta su cosecha. Las flores de diferentes cultivares de *Hibiscus rosa-sinensis* también se recolectaron en el Centro de Investigación CENIVAM, en el jardín experimental (**Figura 6**). Para la identificación botánica de las especies bajo estudio, se enviaron *exsiccatae* de plantas al Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales, de la Universidad Nacional de Colombia. Para la recolección del material vegetal se contó con el permiso de colecta, otorgado a través del contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados

con fines de bioprospección N° 270, suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Industrial de Santander.

El material vegetal de *L. organoides* fue destilado para obtener el aceite esencial y, posteriormente, la biomasa residual fue secada al sol y almacenada hasta su posterior extracción. Las flores de los diferentes cultivares de *H. rosa-sinensis* se secaron en un liofilizador de bandejas *VirTis Advantage Plus* (New York, EE. UU.) y se almacenaron a temperatura ambiente (26 °C), en ausencia de luz.

### Figura 5.

*Adecuación y siembra de los tres quimiotipos de Lippia organoides. Imágenes tomadas por Jessica MEJÍA y Julián ARIAS, en las parcelas experimental del CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, fecha: 29 de noviembre de 2016.*



**Figura 6.**

*Propagación y siembra de cultivares de flores de *H. rosa-sinensis*. Imágenes tomadas por Jesica MEJÍA, en el jardín experimental del CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, fecha: 16 de agosto de 2016.*

**3.3 Obtención de extractos****3.3.1 Extracción con solventes**

Para encontrar las mejores condiciones de extracción con solventes (SE) y obtener extractos con capacidad antioxidante alta, medida por el ensayo ORAC, se realizó un diseño experimental para cada material vegetal bajo estudio. Para la extracción de flavonoides de flores de *H. rosa-sinensis* se usó un diseño experimental fraccionado  $2^{5-1}$ , los factores y los niveles se relacionan en la **Tabla 5**. Para la extracción de flavonoides a partir de la biomasa residual de *L. origanoides*, se empleó un diseño experimental  $2^4$ , los factores y los niveles se relacionan en la

**Tabla 6.****Tabla 5.**

*Factores y sus valores para la extracción de flavonoides en flores de H. rosa-sinensis, cultivar rojo.*

Símbolo	Factores	Unidades	Niveles		
			-1	0	1
<b>A</b>	Etanol en agua, %	v/v	95:5	70:30	45:55
<b>B</b>	Concentración de HCl, %	v/v	0	0.5	1
<b>C</b>	Temperatura	°C	30	40	50
<b>D</b>	Relación material/solvente	g/mL	1/20	1/30	1/40
<b>E</b>	Tiempo de extracción	min	5	10	15

**Tabla 6.**

*Factores y sus valores para la extracción de flavonoides de biomasa residual de L. origanoides, quimiotipo timol.*

Símbolo	Variables independientes	Unidades	Niveles		
			-1	0	1
<b>A</b>	Relación material/solvente	g/mL	1/40	1/30	1/20
<b>B</b>	Etanol en agua, %	v/v	95:5	70:30	45:55
<b>C</b>	Temperatura	°C	30	40	50
<b>D</b>	Tiempo de extracción	min	10	20	30

En cada uno de los tratamientos de los diseños experimentales se mezcló el material vegetal deshidratado (1 g) con la solución hidro-alcohólica correspondiente, la mezcla se introdujo en un baño de ultrasonido (*Elmasonic S15H*, Singen, Alemania) de 37 kHz de frecuencia y 35 W de potencia, durante los tiempos de extracción definidos. El residuo se separó por filtración (papel filtro *Whatman* N° 1) y se le realizó una nueva extracción renovando el solvente. Todos los extractos fueron almacenados a 7 °C, en ausencia de luz. Se realizaron cuatro réplicas en el punto central. Los resultados se expresaron como el valor medido  $\pm$  la desviación estándar.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA, *Analysis of Variance*, por sus siglas en inglés), a través del *software* estadístico *Statgraphics Centurion XVI.I* (versión de prueba). A partir de los resultados obtenidos se plantearon modelos matemáticos cuyo observable fue la capacidad antioxidante (CA) medida por el ensayo ORAC. Posteriormente, se realizó, por triplicado, el experimento bajo las mejores condiciones encontradas para la extracción de flavonoides en cada matriz, se compararon los resultados predichos por el modelo matemático con los obtenidos experimentalmente por medio de la **Ecuación 1**. Los resultados para la capacidad antioxidante y el rendimiento de extracción se expresaron como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar.

$$\% \text{ Error relativo} = 100 * \frac{RMSE}{\text{Valor experimental promedio}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde: RMSE es la raíz del error cuadrático medio.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\text{Valor Experimental} - \text{Valor calculado})^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

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

La extracción con fluido supercrítico (SFE) de la biomasa residual de las plantas de los tres quimiotipos (Timol, Carvacrol y Felandreno) de *L. origanoides* se llevó a cabo en un equipo *Thar SFE-2000-2-FMC50* (*Thar Instruments*, Inc, Pittsburg, PA, EE. UU.). Las extracciones del material vegetal (500 g, <1 mm de tamaño de partícula) se realizaron a una presión de 30 MPa y una temperatura de 40 °C, con una mezcla (90:10, v/v) de CO<sub>2</sub> puro al 99.8% de Praxair (Bucaramanga, Colombia) y etanol de calidad industrial (95%). Un período estático inicial (20 min) fue seguido de un flujo continuo de CO<sub>2</sub> modificado con etanol (40

g/min, 120 min), que se condujo a un separador de recolección de vórtice a 0,5 MPa. El etanol se eliminó del extracto en un evaporador rotativo *Heidolph® Basis Hel-Vap HL* (Schwabach, Alemania). El extracto se llevó a sequedad con flujo de nitrógeno y, posteriormente, se almacenó a 7 °C, en ausencia de luz.

### 3.4 Análisis instrumental

#### 3.4.1 Análisis por UHPLC-ESI(+)-Orbitrap-MS

El análisis de flavonoides se realizó en un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas, con una interfaz de ionización por electro nebulización (ESI), operada en modo positivo, equipado con un detector de masas *Orbitrap (Exactive Plus, Thermo-Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.)*, una bomba binaria (HPG-3400RS), un inyector automático (WPS-300TRS) y una unidad termostataada para la columna (TCC-3000). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna *Hypersil GOLD aQ (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.)* de 100 mm, L, x 2.1 mm, d.i., x 1.9 µm de tamaño de partícula.

Se evaluó la incidencia que tenía la concentración del ácido fórmico en la fase móvil y el voltaje del electrospray ( $V_{spray}$ ) sobre la respuesta del analizador *Orbitrap-MS* para la cianidina-3-glucósido. Se usaron soluciones estándar de este compuesto a 500 µg/L. La fase móvil (A): FA/agua y (B): FA/acetonitrilo se usaron a un flujo de 300 µL/min. El ácido fórmico se empleó al 0.05%, 0.2% y 0.35% v/v en la fase móvil. El volumen de inyección fue de 1 µL. El  $V_{spray}$  se evaluó a 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 kV. La temperatura del nebulizador se ajustó a 350 °C y la temperatura del capilar a 320 °C. El nitrógeno (>99%) se obtuvo de un

generador NM32LA (*Peak Scientific*, Inchinnan, STK, Reino Unido). La adquisición de los espectros se hizo inicialmente en el modo de barrido completo (*Full Scan*), la resolución del *Orbitrap-MS* se estableció en 70000 (*Full Width at Half Maximun*, at  $m/z$  200  $R_{FWHM}$ ); el control automático de ganancia (AGC) fue de  $3 \times 10^6$ ; el tiempo máximo de inyección a la *C-trap* fue de 200 ms y el rango de masas de  $m/z$  80-1000. Las moléculas protonadas se fragmentaron en la celda HCD con energías de colisión de 10, 20, 30 y 40 eV. Los espectros de masas se registraron en el modo de fragmentación de todos los iones AIF (*All-Ion-Fragmentation*) para cada energía de colisión, a un  $R_{FWHM}$  de 35000, AGC de  $3 \times 10^6$  y un tiempo de inyección de 50 ms en la cámara *C-trap*, todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de  $m/z$  80-1000. La calibración del instrumento LC/MS se realizó, usando una solución para iones positivos *Pierce LTQ Velos ESI* (*Thermo Scientific*, Rockford, IL, EE. UU.).

Los datos se procesaron en el *software Thermo Xcalibur<sup>TM</sup> Roadmap*, Version 3.1.66.10. La identificación de los compuestos se realizó midiendo masas exactas de iones  $[M]^+$  o  $[M+H]^+$ , la composición elemental de moléculas protonadas y de sus iones-producto, además, por comparación de los tiempos de retención,  $t_R$ , de cada sustancia de referencia, con los observados en los cromatogramas de los extractos. Se emplearon las bases de datos de metabolómica (METLIN<sup>TM</sup>, <http://metlin.scripps.edu/>) y fitoquímica (PCIDB, <http://www.genome.jp./db/pcodb>).

La cuantificación de los compuestos presentes en los extractos de las diferentes matrices se llevó a cabo por el método de estándar interno con la sustancia de referencia kaempferol (*Sigma-Aldrich* St. Louis, MO, EE. UU.) como patrón interno, para los extractos

de *L. origanoides*, y por el método de calibración externa con las siguientes sustancias de referencia: catequina, cianidina-3-glucósido, epicatequina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-glucósido, eriodictiol, luteolina, quercetina, naringenina, apigenina y pinocembrina (Véase su procedencia en la **sección 4.1**).

### 3.4.2 *Determinación de figuras analíticas de mérito para el método LC/MS*

**3.4.2.1 Determinación de la repetibilidad del método.** Para determinar la repetibilidad de áreas cromatográficas y de tiempos de retención, se calculó el promedio (**Ecuación 3**), la desviación estándar (**Ecuación 4**) y el coeficiente de variación (**Ecuación 5**).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{Ecuación 3}$$

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

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

Donde:

$\bar{x}$  = Promedio de datos

$x_i$  = Datos

$n$  = Número de datos

$S$  = Desviación estándar

$CV$  = Coeficiente de variación

**3.4.2.1 Determinación de la linealidad, la sensibilidad y los niveles mínimos de detección y cuantificación.** La linealidad, sensibilidad, el nivel mínimo de detección (NMD) y el nivel mínimo de cuantificación (NMC) se determinaron a partir de las curvas de calibración de sustancias de referencia, a saber: catequina, epicatequina, cianidina-3-

glucósido, quercetina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-glucósido, eriodictiol, luteolina, naringenina, apigenina y pinocembrina. Las curvas de calibración se prepararon a partir de una solución *stock* de (1000 mg/L) de cada compuesto y se realizaron diluciones (0.1-10 mg/L) para soluciones de trabajo (calibración). El coeficiente de determinación ( $R^2 > 0.99$ ) 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**).

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{Ecuación 6}$$

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.

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

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 la determinación del nivel mínimo de detección (**Ecuación 9**) y el nivel mínimo de cuantificación (**Ecuación 10**).

$$NMD = \frac{K S_B}{m} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:

K: 3

S<sub>B</sub>: Desviación estándar del blanco

m: Pendiente de la curva de calibración

$$NMC = \frac{K S_B}{m} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde: K= 10

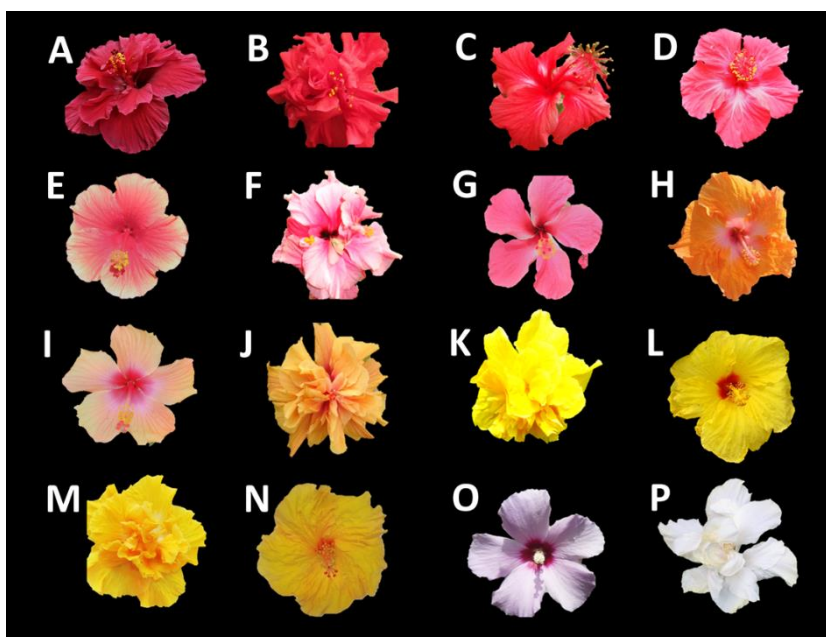
### 3.4.3 *Determinación de la relación entre la composición química, el color y la capacidad antioxidante de cultivares de Hibiscus rosa-sinensis*

Para determinar el color de las flores de 16 cultivares de *Hibiscus rosa-sinensis* (**Figura 7**), se midieron los parámetros colorimétricos sobre la superficie adaxial de pétalos frescos con un microespectrofotómetro STS-VIS (*Ocean Optics*, Dunedin, FL, EE. UU.), tamaño 40 x 42 x 24 mm, con rango de longitudes de onda:  $\lambda=190-650$  nm (UV) y  $\lambda=350-800$  nm (Vis) (

**Figura 8**). Se empleó el sistema CIELAB (Comisión Internacional de Iluminación, escala  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). En este sistema, el valor del parámetro  $L^*$  indica luminosidad, que va de cero (negro) a 100 (blanco), el valor del parámetro  $a^*$  representa el equilibrio entre el color rojo (valor positivo) y el color verde (valor negativo), y el valor del parámetro  $b^*$  representa el equilibrio entre el color amarillo (valor positivo) y el color azul (valor negativo). El valor del parámetro de croma  $C_{ab}^*$  se calculó con una ecuación:  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ , que indica la intensidad del color y el ángulo de tono [ $h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$ ] representa el color básico.

**Figura 7.**

Flores de 16 cultivares de *H. rosa-sinensis* recolectados de población natural. **A-D.** Rojo, **E-G.** Rosado, **H-J.** Naranja, **K-N.** Amarillo, **O.** Lila, **P.** Blanco. Imágenes tomadas por Jesica MEJÍA. En el jardín experimental del CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, fecha: 28 de abril de 2019.

**Figura 8.**

Medición de los parámetros colorímetros de una muestra de *Hibiscus rosa-sinensis* cultivar rojo. Imagen tomada por Jesica MEJÍA. En el laboratorio Marie CURIE ubicado en CENIVAM, Bucaramanga, fecha: 28 de abril de 2019.



Las coordenadas colorimétricas para cada muestra se obtuvieron con el *software Ocean View 1.5.0* (Ocean Optics, Dunedin, FL, EE. UU.), después de la medición de cada pétalo se hizo extracción, y el extracto se analizó en un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas, con ionización por electro nebulización (ESI) (**Sección 4.4.1**). Para cada extracto obtenido de los diferentes cultivares se evaluó la capacidad antioxidante por el método ORAC, según las condiciones descritas en la **Sección 4.5.2.4**.

**3.4.3.1 Cálculos mecano-cuánticos de moléculas presentes en flores.** A partir de la composición química encontrada en los extractos de *H. rosa-sinensis*, se seleccionaron los componentes principales y se realizaron cálculos mecano-cuánticos, basados en la teoría de funcionales de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés) para antocianinas, flavan-3-oles y flavonoles. Los cálculos se realizaron en el Laboratório de Modelagem Molecular & QSAR-3D (ModMolQSAR) de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil. Todos los cálculos se realizaron con el programa GAMESS US (Schmidt *et al.*, 1993). Las geometrías y las energías moleculares totales de las moléculas estudiadas en su estado fundamental se

optimizaron con el método semiempírico Método Paramétrico 6 (PM6) (Stewart, 2007), seguido de DFT con el modelo de funcionalidad de intercambio híbrido B3LYP (Kohn *et al.*, 1996) y la función base 6-311G (d,p). Se calcularon los siguientes parámetros: energía HOMO (orbital molecular ocupado más alto), energía LUMO (orbital molecular no ocupado más bajo), *Band Gap* (E<sub>bg</sub>), dureza química ( $\eta$ ), potencial químico ( $\mu$ ) y potencial de ionización (IP).

Adicionalmente, los espectros de absorción de las moléculas estudiadas se calcularon como excitaciones electrónicas verticales de las estructuras en el estado fundamental, utilizando la teoría funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) y la función base B3LYP / 6-311G (d, p) (Anouar *et al.*, 2012). Las diez excitaciones de menor energía se calcularon con sus respectivas longitudes de onda ( $\lambda$ ) y la contribución de los orbitales moleculares que participaron en la excitación electrónica.

### 3.5 Actividad biológica

#### 3.5.1 *Determinación de la capacidad antioxidante*

**3.5.1.1 Desarrollo y validación del ensayo de decoloración del  $\beta$ -caroteno.** La capacidad antioxidante de los extractos hidro-alcohólicos, supercríticos y de las sustancias de referencia se midió, según el procedimiento reportado por Mikami *et al.* (2008), con algunas modificaciones. Se empleó un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc. Modulos<sup>TM</sup> Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, CA, EE. UU.) en el módulo de absorbancia y se usaron microplacas transparentes de poli(estireno) de 96 pozos. Para la preparación de las muestras, se tomaron 50 mg del extracto y se disolvieron en 1 mL de etanol absoluto. La mezcla se agitó a 3000 rpm por dos minutos, se llevó a ultrasonido por

30 min y se centrifugó por 15 min. A partir de esta solución, se prepararon las respectivas diluciones (100 a 4000 µg/L) en microplacas que se incubaron a 45 °C (10 min).

De cada muestra, se tomaron 10 µL y se adicionaron 190 µL de una emulsión de β-caroteno, que se preparó como se describe a continuación: se tomaron 50 µL de una solución *stock* de β-caroteno (5 mg/mL) y se mezclaron en un tubo cónico con Tween® 40 (100 mg) y ácido linoléico (10 mg). La mezcla se agitó (3000 rpm, 10 s) y el cloroformo se evaporó con flujo de nitrógeno (3 min), a la mezcla evaporada se le adicionaron 3 mL de una solución de K<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>8</sub>, al 1 %, como agente oxidante y la mezcla se aforó con agua tipo 1 en un balón de 25 mL. La lectura de la absorbancia se realizó a λ=450 nm, a una temperatura de 45 °C, durante 60 min. El porcentaje de inhibición de la decoloración del β-caroteno se calculó, según la **Ecuación 11**.

$$\text{Inhibición, \%} = \left( \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde:

$$A_{\text{blanco}} = \text{Absorbancia}_{0 \text{ min}} - \text{Absorbancia}_{60 \text{ min}}$$

$$A_{\text{muestra}} = \text{Absorbancia}_{0 \text{ min}} - \text{Absorbancia}_{60 \text{ min}}$$

El porcentaje de inhibición obtenido se usó para calcular los valores de µmol Trolox®/g de muestra, con la realización previa de una curva de calibración. Cada medición se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio ± la desviación estándar.

### **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad**

La linealidad y la sensibilidad del método se determinaron a partir de curvas de calibración de Trolox® (13-55 µM). El coeficiente de determinación mayor que  $R^2=0.99$  se empleó como criterio de linealidad. Los errores en los valores de las pendientes y de los cortes del eje Y (**Ecuación 6**) se expresaron como las desviaciones estándar de la pendiente y del intercepto (**Ecuaciones 7 y 8**).

### **Determinación de los límites de detección y de cuantificación**

Los niveles mínimos de detección y de cuantificación se calcularon, usando la curva de calibración de Trolox® (13-55 µM). Para la determinación del nivel mínimo de detección, se empleó la **Ecuación 9**, de la **Sección 4.4.2.1** y para el nivel mínimo de cuantificación, la **Ecuación 10**, **Sección 4.4.2.1**.

### **Evaluación de la precisión: repetibilidad y reproducibilidad**

Dependiendo de los factores que se pueden variar en un ensayo (temperatura, humedad, luminosidad, analista, equipo de medición, reactivos o el día en que se realiza el ensayo), se pueden obtener dos tipos de precisión, a saber: la repetibilidad y la reproducibilidad. La repetibilidad proporciona la menor variabilidad que se puede presentar en los resultados sin modificar ninguna de las variables nombradas previamente. La repetibilidad para este método se evaluó por triplicado, durante cinco días empleando a una solución de Trolox® (15 µM). Un coeficiente de variación (**Ecuación 5**, **Sección 4.4.2.1**) que no supere el 10 %, puede indicar que el método es repetible.

Por otro lado, la reproducibilidad proporciona la mayor variabilidad de los resultados y se obtiene al modificar alguno de los factores que pueden afectar el resultado final. Para determinar la reproducibilidad del método implementado, se cambió de analista y el día de análisis.

### **Evaluación de la exactitud del método.**

La exactitud es una medida que se refiere a cuán cerca del valor real o aceptado se encuentra el valor medido. Para determinar la exactitud del método implementado, se comparó el % de inhibición de una solución de  $\alpha$ -tocoferol (100 mg/L) con el valor reportado por Pereira *et al.* (2017) para la misma sustancia a la misma concentración, este valor se tomó como real o verdadero. Para determinar la exactitud, se empleó la **Ecuación 12**.

$$\text{Exactitud} = \left( \frac{V_{Lit} * - V_{exp}}{V_{Lit} *} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde:

$V_{lit} *$  = Valor de la literatura tomado como verdadero

$V_{exp}$  = Valor experimental

### **Determinación de la robustez**

La robustez de un método es la capacidad para soportar algunas variaciones en los parámetros analíticos, sin cambiar significativamente la precisión y la confiabilidad del resultado final. Para determinar la robustez, se varió la concentración del etanol empleado en

la preparación de la placa; en el método implementado se trabajó con etanol absoluto y en el método modificado etanol al 80%. Adicionalmente, se usaron dos lotes de ácido linoleico de la marca *Sigma-Aldrich*. Para determinar si hubo variación significativa entre los datos obtenidos por los dos métodos, se realizó un análisis estadístico ANOVA.

**3.5.1.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>.** La capacidad de las sustancias presentes en los extractos para atrapar el catión-radical ABTS<sup>•+</sup>, se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Re *et al.* (1999), con algunas modificaciones (Arias, 2012). El catión-radical se preparó al mezclar el ABTS (7 mM) y el PDS (2.45 mM), en *buffer* acetato (pH 4.5), se dejó reaccionar en la oscuridad a 7 °C, durante 24 h, se adicionó el catión-radical (190 µL) de absorbancia  $0.70 \pm 0.20$  a las diluciones de las muestras en etanol (10 µL), posteriormente, se agitó durante 2 min, a 25 °C, y se registró la absorbancia a  $\lambda=750$  nm, durante 60 min, tiempo después del cual se determinó el porcentaje de inhibición. Se utilizó Trolox<sup>®</sup> como estándar de control. El porcentaje de inhibición se midió a partir de la diferencia entre la absorbancia del blanco y la absorbancia de la muestra, el valor obtenido fue empleado para calcular los µmol Trolox<sup>®</sup>/g de extracto, usando una curva de calibración. Las determinaciones se realizaron en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus<sup>TM</sup> II Microplate Multimode Reader*, (Sunnavale, CA, EE. UU.) con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos y un módulo de absorbancia. Cada medición se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar.

**3.5.1.3. Ensayo de decoloración por HPLC-ABTS<sup>+</sup> *on-line*.** La capacidad antioxidante medida por el ensayo ABTS<sup>+</sup> de cada compuesto presente en los extractos estudiados, se determinó en un sistema HPLC 1200 *Infinity* (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un derivatizador *post-columna Pinnacle PCX* (Pickering Laboratories, Mountain View, CA, EE. UU.), siguiendo la metodología descrita por Kusznierevich *et al.* (2011) y Sierra (2020), con modificaciones. La solución *stock* de ABTS<sup>+</sup> se preparó al mezclar ABTS (110 mL, 2 mM, en agua Tipo I) con PDS (0.7 mM), la solución se dejó reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 17 h hasta obtener un catión-radical estable. La concentración de la solución del catión-radical de trabajo fue de 79  $\mu$ M con absorbancia 0.71  $\pm$  0.02. Cada extracto (10 mg) se disolvió en una solución metanólica (1 mL, 50% v/v, en agua Tipo I) y se pasó a través de un filtro PVDF (0.22  $\mu$ m). Se empleó la rutina (20 mg/L) como estándar interno. Las muestras fueron diluidas (50, 100, 250 y 500 veces) y analizadas usando un detector de arreglo de diodos (DAD), a  $\lambda$ =245, 270 y 290 nm, y un detector de longitud de onda múltiple (MWD), a  $\lambda$ =734. La fase móvil fue A: agua (0.5% ácido fórmico) y B: acetonitrilo. El flujo fue de 1 mL/min y el volumen de inyección, 10  $\mu$ L. Se utilizó Trolox<sup>®</sup> como estándar de control, los datos obtenidos se procesaron con el *software AT ChemStation* (Version B.0.03-SR1). La identificación de los compuestos fenólicos se realizó por comparación de los tiempos de retención y los espectros UV-Vis con los de las sustancias de referencia, a saber: ácido gálico, cianidina-3,5-glucósido, delphinidina-3-glucósido, catequina, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido, pelargonidina-3-glucósido, epicatequina, cianidina, pelargonidina, eriodictiol-glucósido, taxifolina, rutina, ácido elágico, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-glucósido, ácido rosmarínico, quercetina, eriodictiol, luteolina, naringenina, apigenina, kaempferol, sakuranetina, pinocembrina,

galangina, y BHT. La capacidad antioxidante se determinó a partir de una curva de calibración con Trolox<sup>®</sup>. Las mediciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio en  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de muestra  $\pm$  desviación estándar.

**3.5.1.4 Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC).** La capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) se determinó para cada extracto siguiendo la metodología descrita por Ou *et al.* (2001) y Huang *et al.* (2005), con algunas modificaciones. La protección antioxidante se midió a partir de la diferencia entre el área bajo la curva (ABC) de cada muestra y el ABC del blanco. Se adicionó fluoresceína (FL) (150  $\mu\text{L}$ ,  $8.16 \times 10^{-5}$  mM) a las diluciones de las muestras en *buffer* fosfato (pH 7.4), posteriormente, la mezcla se incubó a 37 °C, durante 18 min, y se adicionó AAPH (25  $\mu\text{L}$ , 153 mM). Durante 80 min se registró la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína (FL), a las longitudes de onda  $\lambda=490$  nm, para excitación, y  $\lambda=510$ , nm para emisión. Se utilizó Trolox<sup>®</sup> como estándar de control. El área neta obtenida se utilizó para calcular los  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto, usando una curva de calibración. Las determinaciones se hicieron por triplicado en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, CA, EE. UU.) con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos, y un módulo de fluorescencia. Los resultados se expresaron como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar.

**3.5.1.5. Determinación del índice de capacidad antioxidante (ICA).** Debido a que no existe un método estándar y único para determinar la capacidad antioxidante (Niki *et al.*, 2000), en esta investigación, se incluyeron métodos cuyo mecanismo se da por HAT como en los ensayos ORAC y de la decoloración del  $\beta$ -caroteno, o ET, en los ensayos ABTS<sup>+</sup> y

HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup>. Con el fin de estandarizar los resultados de la capacidad antioxidante medida por los diferentes métodos, se propuso calcular una medida matemática, a la cual se llamó índice de capacidad antioxidante (ICA, **Ecuación 13**), el cual tiene en cuenta la contribución de los diferentes ensayos evaluados, además, permite jerarquizar y organizar los resultados obtenidos en una escala de cero a uno, donde cero es el valor mínimo y uno el valor máximo. Para normalizar los valores, se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos por los métodos ORAC, ABTS<sup>+</sup> y de decoloración β-caroteno para los extractos hidroalcohólicos de cuatro cultivares de *H. rosa-sinensis*, y los seis extractos obtenidos a partir de la biomasa residual de *L. origanoides*, el valor obtenido para cada muestra se dividió entre el valor más alto determinado para cada ensayo, de tal forma que el extracto que presentó la actividad antioxidante más alta por cada método obtuvo un valor de uno. Los resultados normalizados permitieron organizar los extractos de mayor a menor capacidad antioxidante.

$$\text{ICA} = \sum(\text{Valor ORAC} \times 0.33) + (\text{Valor ABTS}^+ \times 0.33) + (\text{Valor } \beta - \text{caroteno} \times 0.33)$$

### **Ecuación 13**

Donde:

- Valor ORAC = Resultado normalizado de capacidad antioxidante obtenido por el ensayo ORAC.
- Valor ABTS<sup>+</sup> = Resultado normalizado de capacidad antioxidante obtenido por el ensayo de decoloración ABTS<sup>+</sup>.
- Valor β-caroteno = Resultado normalizado de capacidad antioxidante obtenido por el ensayo de decoloración del β-caroteno.

### **3.5.2 Determinación de la actividad fotoprotectora de extractos**

El factor de protección solar de los extractos hidroalcohólicos y obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de las plantas bajo estudio se determinó siguiendo la metodología *in vitro*

descrita por Mansur *et al.* (1986). En este método espectrofotométrico, el extracto (10 mg) se disolvió en etanol absoluto (10 mL), posteriormente, se diluyó para obtener una concentración final de 0.2 mg/mL, condición establecida por el autor para crear una correlación con el método *in vivo* y se registraron las absorbancias de cada solución en el rango de  $\lambda=290$  nm a  $\lambda=320$  nm, con intervalos de 5 nm, para las mediciones se empleó una cubeta de cuarzo de 1 cm. Los análisis se realizaron por triplicado y el FPS se calculó, según la **Ecuación 14**, desarrollada por Mansur *et al.* (1986). El índice de protección solar (IPS) corresponde a los valores normalizados del FPS, en una escala de cero a uno, donde cero es el valor mínimo y uno el valor máximo.

$$\text{FPS} = \text{FC} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda) \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde:

FPS = Factor de protección solar

FC = 10 (Factor de corrección)

EE( $\lambda$ ) = Efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda  $\lambda$

I( $\lambda$ ) = Intensidad del sol en la longitud de onda  $\lambda$

Abs( $\lambda$ ) = Absorbancia de la solución en la longitud de onda  $\lambda$

La relación entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación de cada longitud de onda EE ( $\lambda$ )x I( $\lambda$ ) es una constante determinada por Sayre *et al.* (1980) (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Constante determinada por Sayre *et al.* (1980).

Longitud de onda, nm	290	295	300	305	310	315	320	Total
EE( $\lambda$ )x I( $\lambda$ )	0,0150	0,0817	0,2874	0,3278	0,1864	0,0839	0,0180	1,000

### 3.5.3 Actividad citotóxica y sensibilizante

Las actividades citotóxica y sensibilizante, de los extractos obtenidos de las matrices bajo estudio, se determinaron siguiendo la metodología implementada en el Laboratorio de Arbovirus del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), de la Universidad Industrial de Santander, dirigido por la profesora Dra. Raquel Ocazonez.

#### Líneas celulares

Para los análisis de citotoxicidad y la actividad sensibilizante se emplearon líneas celulares humanas de riñón embrionario (HEK-293, CRL-1573TM), de cáncer de hígado (HepG-2, CRL-11997TM), monocitos (THP-1, ATCC® TIB.202TM) y fibroblastos de xeroderma pigmentoso (XP4PA y XP12RO-SV, donados por el doctor Carlos F. Martins del Instituto de Ciências Biomedicas, Universidade de São Paulo, Brasil.

**3.5.3.1 Determinación de la actividad citotóxica.** La actividad citotóxica se determinó siguiendo la metodología descrita por Mosmann, (1983) y Ocazonez *et al.* (2010). Las líneas celulares con extractos, en diferentes concentraciones, que sembraron en placas de 96 pozos e incubaron durante 72 h, a 37 °C; posteriormente, el medio de cultivo se descartó

y se adicionó una solución de MTT [sal de bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] a cada pozo (20  $\mu$ L, 5 mg/mL); las placas se incubaron nuevamente, durante 4 h, a 37 °C, se retiró el MTT y, enseguida, se adicionó dimetilsulfóxido (DMSO, 100  $\mu$ L). La intensidad del color (absorbancia) en cada pozo se cuantificó en un espectrofotómetro *Multiskan Go* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE. UU.), a una longitud de onda  $\lambda=580$  nm, se incluyeron células tratadas con DMSO, a diferentes concentraciones, y células no tratadas como control. El ensayo se realizó por duplicado en tres ensayos independientes. Los valores promedio de absorbancia de los experimentos de células tratadas con los extractos se corrigieron con el valor promedio de los controles y la actividad se expresó en  $\mu$ g/ml como concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>). Para identificar los extractos con menor toxicidad, se usó una estrategia de jerarquización propuesta por Velandia *et al.* (2016), en la cual para cada extracto se calculó la jerarquía ponderada individual (J<sub>pi</sub>) con base en la concentración citotóxica media CC<sub>50</sub>, para cada línea celular. La sumatoria de las jerarquías individuales ( $\Sigma J_{Pi}$ ) se usó como indicador de similitud y las muestras se organizaron en orden descendente, según este valor. Los resultados se expresaron como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar.

**3.5.3.2 Determinación de la actividad sensibilizante.** Para conocer el efecto sensibilizante a la dermatitis alérgica de contacto (DAC), se siguió la metodología descrita por Nukada *et al.* (2008). Se emplearon células THP-1 (monocitos humanos), con extractos en diferentes concentraciones, que se sembraron en placas de 48 pozos y se incubaron durante

24 h, a 37 °C; posteriormente, la concentración de IL-8 en el medio de cultivo se determinó por ELISA con un *kit* comercial (*Invitrogen* KHC0081) adquirido con *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, EE. UU.). Cada extracto se evaluó por duplicado en dos ensayos independientes, en cada uno se incluyeron controles (células tratadas con 2-aminofenol, compuesto sensibilizante, inductor de IL-8 y células sin tratamiento). El efecto sensibilizante se consideró cuando la concentración de IL-8 en células expuestas a los extractos fue mayor ( $p \geq 0.05$ ), comparada con la del control (células no-expuestas). Los resultados se expresaron como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar. El índice de actividad sensibilizante (IAS) corresponde a los valores normalizados de IL-8 secretados por las células THP-1 en presencia de los extractos hidro-alcohólicos, en una escala de cero a uno, donde cero es el valor mínimo y uno, el máximo.

#### **3.5.4 Determinación de la actividad biológica total**

Para seleccionar el extracto que presentó las mejores características biológicas (citotoxicidad y actividad sensibilizante bajas, capacidad antioxidante, y factor de protección solar altos), se calculó la actividad biológica total, según la **Ecuación 15**, para la cual se sumaron los índices de capacidad antioxidante (ICA) (**Sección 4.5.1.5**), de protección solar (IPS) (**Sección 4.5.2**), y las jerarquías individuales ( $\Sigma JPi$ ) (**Sección 4.5.3.1**), y se restó el índice de actividad sensibilizante (IAS) (**Sección 4.5.3.2**).

$$\text{Actividad biológica total} = \text{ICA} + \Sigma JPi + \text{IPS} - \text{IAS} \qquad \text{Ecuación 15}$$

Donde

ICA: Índice de capacidad antioxidante

$\Sigma JPi$ : Sumatoria de la jerarquía ponderada individual (citotoxicidad)

IAS: Índice de actividad sensibilizante.

IPS: Índice de protección solar

### 3.6 Desarrollo de una formulación fitocosmética con propiedades fotoprotectoras y antioxidantes

El desarrollo de la formulación se realizó en el Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG), de la Facultad de Farmacia adscrita al Centro de Ciencias de la Salud (CCS) de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil, bajo la dirección del doctor Eduardo Ricci. Para la elaboración del prototipo de fotoprotector solar, se realizó una formulación base, los ingredientes se presentan en la **Tabla 8**. A la formulación base, se le adicionó 1% del extracto que fue seleccionado por presentar las mejores propiedades biológicas (capacidad antioxidante y fotoprotectora altas, y actividades citotóxicas y sensibilizantes bajas) (**Sección 4.5.4**).

**Tabla 8.**

*Porcentaje en peso de los ingredientes utilizados en la formulación fotoprotectora.*

Fase	Componente	Función	Gel-crema, %
A	Solución acuosa de metilisotiazolinona	Conservante	0.3
	Carboxipolimetileno	Modificador reológico	0.5
	Aminometilpropanol, 95%	Controlador de pH	0.2
	Agua destilada	Diluyente	70
B	Polisorbato 80	Emulsificante	10
	Dietilamino hidrobenczoil hexil benzoato	Filtro solar	8
	Octilmetoxicinamato	Filtro solar	10

Para la elaboración de la crema base se mezclaron los componentes de la fase A y de la fase B por separado, cada mezcla se calentó a 65 °C y se agitó a 1500 rpm. Posteriormente, se adicionó lentamente la fase B en la fase A, hasta obtener una mezcla homogénea, a la cual

se le incorporó el extracto que fue seleccionado por tener las mejores propiedades biológicas (capacidad antioxidante y fotoprotectora altas, y actividades citotóxicas y sensibilizantes bajas).

### **3.6.1 Evaluación de la estabilidad acelerada**

El estudio de la estabilidad fisicoquímica de la formulación fitocosmética con propiedades fotoprotectoras y antioxidantes, se basó en la norma brasilera “Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos” y en la normatividad europea “*Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products*”. Con base en los protocolos de las normas anteriores, la formulación se almacenó bajo tres condiciones de temperatura diferentes (7, 40 y 25 °C), durante 90 días. Para evaluar la estabilidad de las formulaciones, se realizaron medidas de las propiedades fisicoquímicas (pH, color, factor de protección solar *in vitro*, viscosidad y separación de fases), durante los días 0, 30, 60 y 90.

**4.6.1.1 Evaluación del pH.** El pH se midió por inmersión del electrodo (modelo 922, *Bante Instruments*, Sugar land, TX, EE. UU.) en las formulaciones, a 25 °C. El pH-metro fue calibrado previamente con soluciones patrón de pH 4.0 y 10.0 (*Hanna Instruments*, Smithfield, RI, EE. UU.). Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como el valor medido  $\pm$  desviación estándar.

**4.6.1.2 Viscosidad.** La viscosidad se midió con un viscosímetro digital rotativo (modelo DV-II, *Brookfield*<sup>®</sup>, Waukesha, WI, EE. UU.) con *spindle* número 96 y velocidades de rotación de 0.3, 0.6, 1.5, 3, 6, 12, 30 y 60 rpm. El *spindle* fue sumergido verticalmente en

cada formulación (50 g) a 25 °C. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como el valor medio  $\pm$  desviación estándar.

**4.6.1.3 Ensayo de centrifuga.** El ensayo de separación de fases se llevó a cabo en una centrifuga (modelo Avanti J-25, *Beckman Coulter*, Fullerton, CA, EE. UU.). Cada formulación (10 g) se centrifugó a 3500 rpm, durante 30 min, a 25 °C. Después de centrifugadas las muestras, se observó si hubo separación de fases y, adicionalmente, si hubo cambios en la coloración, el cual se midió a través de toma de fotografías bajo las mismas condiciones de luz. Las mediciones se realizaron por triplicado.

**4.6.1.4 Determinación del factor de fotoprotección *in vitro*.** El factor de protección solar hace referencia al número de veces que un fotoprotector aumenta la capacidad de defensa de la piel frente al eritema o enrojecimiento previo a la quemadura solar. Para la determinación del FPS existen varias metodologías y es posible que para un mismo producto se encuentren valores de FPS distintos, según el método de medición utilizado.

Las pruebas de FPS *in vitro*, se realizaron en un analizador de transmitancia UV-2000S (*Labsphere*, North Sutton, NH, EE. UU.) (Véase **Figura 9**), en el cual se empleó una placa de cuarzo de 25 cm<sup>2</sup> con cinta *Transpore*<sup>TM</sup> de la misma área, adherida a la placa. La formulación fotoprotectora (2.0 mg/cm<sup>2</sup>) se depositó sobre la placa y esparció uniformemente, la aplicación del prototipo se realizó con el uso de micropipeta sobre la balanza analítica y el esparcimiento, con dediles de látex en movimientos estandarizados para obtener una capa uniforme. Después de 15 min, se hizo la lectura de cada placa. Para la preparación del blanco, se empleó glicerina como referencia del 100% de transmitancia,

luego, se hicieron mediciones de los valores de FPS. Cada medición se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar.

### **Figura 9.**

*Analizador de transmitancia UV-2000S (Labsphere, North Sutton, NH, EE. UU.). Fotografía tomada por Jesica MEJÍA, en el laboratorio de Desenvolvimento Galênico (LADEG), Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil, fecha: 10 de junio 2018.*



### **3.6.2 Evaluación de fotoestabilidad**

El ensayo de fotoestabilidad se realizó en el Laboratório de Microbiologia e Avaliação Genotóxica (LAMIAG), de la Facultad de Farmácia de la Universidad Federal do Rio de Janeiro, Brasil. El ensayo de fotoestabilidad para el prototipo fotoprotector, se realizó en un simulador solar (*Oriel Model 91192-1000, Newport Corp., Irvine, CA, EE. UU.*) (Véase **Figura 10**), que emitía  $21.7 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de UVA y  $1.58 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de UVB, se utilizó un dosímetro *Vilber Lourmat VLX-3-W* (Marne-la-Vallée, Francia) con fotoceldas de  $\lambda=312 \text{ nm}$ , para UVB, y  $\lambda=365 \text{ nm}$ , para UVA; y una potencia de alrededor de  $1000 \text{ W/m}^2$ . La emisión final de trabajo fue una relación UVB/UVA de 1/14 (93.21% UVA y 6.79% UVB),

que está de acuerdo con los valores promedio medidos para el verano en Río de Janeiro, Brasil (-22.9 latitud y longitud -43.17) (Hossy *et al.*, 2013; Hossy *et al.*, 2017; Schuch *et al.*, 2017).

**Figura 10.**

*Simulador solar (Oriel Model 91192-1000, Newport Corp., EE. UU.) Fotografía tomada por Jesica MEJÍA, en el Laboratorio de Microbiología e Avaliação Genotóxica (LAMIAG), Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil, fecha: 10 de junio 2018, por la autora. Junio 2018, Rio de Janeiro-Brasil.*



La tasa de dosis de UVB fue de  $1.2 \text{ J/m}^2\text{s}$  y la de UVA, de  $20 \text{ J/m}^2\text{s}$ ; los tratamientos se realizaron a diferentes tiempos de irradiación y de dosis (**Tabla 9**). Inmediatamente después de irradiar las muestras, se hicieron las medidas del factor de fotoprotección *in vitro* siguiendo la metodología descrita en la **Sección 4.6.1.4**. Cada medición se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar.

**Tabla 9.**

*Correspondencia entre las dosis de UVA y UVB y el tiempo de irradiación en el simulador solar.*

Dosis UVB, kJ/m <sup>2</sup>	Dosis UVA, kJ/m <sup>2</sup>	Tiempo de irradiación
0	0	0
2.5	41.64	34 min 42 s
3	49.98	41 min 39 s
4	66.70	55 min 35 s
5	83.30	1 h 9 min 25 s
7.5	124.98	1 h 44 min 9 s
10	166.64	2 h 18 min 52 s

### 3.6.3 Determinación del factor de oclusión

Para la determinación del efecto oclusivo del prototipo con propiedades fotoprotectoras y antioxidantes, se siguió la metodología descrita por Teeranachaideekul *et al.* (2008) con algunas modificaciones. Se emplearon copas de vidrio de 40 mL con diámetro de 4.6 cm, cada copa contenía agua destilada (30 g) y fueron cubiertas con estrato córneo de *Crotalus durissus*, donado por el serpentario del Instituto Vital Brazil, ubicado en Rio de Janeiro, Brasil. La muestra (13.3 mg/cm<sup>2</sup>) se espació y homogeneizó sobre sobre el estrato corneo con dediles de látex en movimientos estandarizados para obtener una capa uniforme. Posteriormente, las muestras se almacenaron en la estufa a 40 °C, durante 48 h. El peso de cada copa de vidrio se registró a las 8, 24, 32 y 48 h. Se empleó como referencia (blanco) copas de vidrio con estrato conreo sin muestra. Cada medición se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar. El factor de oclusión (F) se calculó con la **Ecuación 16**.

$$F = \left[ \left( \frac{A-B}{A} \right) \times 100 \right]$$

**Ecuación 15**

Donde:

A= Pérdida de agua sin muestra (referencia).

B= Pérdida de agua con muestra.

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 Identificación botánica**

La identificación botánica de los tres quimiotipos de *L. origanoides* se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá) y fue realizada por el botánico, doctor José Luis Fernández. La identificación de los diferentes cultivares de flores de *Hibiscus rosa-sinensis* se realizó en el Herbario UIS, Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander, Escuela de Biología, (sede Bucaramanga). En la **Tabla 10** se relaciona la identificación taxonómica de las especies bajo estudio.

**Tabla 10.**

*Identificación taxonómica de las especies estudiadas.*

<b>Especie</b>	<b>Quimiotipo o cultivar</b>	<b>Familia</b>	<b>Código</b>
<i>Lippia origanoides</i>	Timol		519799
	Carvacrol	Verbenaceae	512075
	Felandreno		519798
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	Rojo		20884
	Amarillo		20882
	Naranja	Malvaceae	20885
	Rosado		20883

## 5.2 Diseños experimentales

Para la extracción de flavonoides a partir de las matrices de biomasa residual obtenida después de la destilación de *L. origanoides* y de flores liofilizadas de *H. rosa-sinensis* se empleó un diseño experimental  $2^4$ , para un total de 16 experimentos y un diseño factorial fraccionado  $2^{5-1}$  de resolución V, cada diseño tuvo cuatro réplicas en el punto central, respectivamente. Un análisis de varianza se realizó a los datos de cada diseño experimental

y se determinaron los efectos principales, a través de la prueba de *Fisher*, a un nivel de confianza del 95% (Véanse **Tablas 11** y **12**). El observable empleado para cada diseño experimental fue la capacidad antioxidante medida por el ensayo ORAC.

**Tabla 11.**

*Resultados del análisis de la varianza aplicado al diseño factorial  $2^4$ , para la extracción de flavonoides a partir de la biomasa residual de *L. origanoides* con efectos individuales y binarios. A: Relación material-solvente; B: Relación etanol: agua; C: Temperatura y D: Tiempo de extracción.*

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor <i>p</i>
A	405278	1	405278	0,5	0,50
B	164339	1	164339	0,2	0,67
C	465544	1	465544	0,8	0,37
D	3,24E+06	1	3,24E+06	5,9	0,03
AB	90705,9	1	90705,9	0,1	0,75
AC	28766,9	1	28766,9	0,0	0,86
AD	155278	1	155278	0,2	0,67
BC	1,74E+06	1	1,74E+06	3,2	0,10
BD	232513	1	232513	0,3	0,61
CD	869629	1	869629	1,6	0,23
Error total	7,69E+06	14	549286		
Total (corr.)	1,51E+07	19			
F <sub>crítico</sub> *	4,6				

\*Valor calculado con el *software* Microsoft Excel, versión 2016.

**Tabla 12.**

*Resultados del análisis de la varianza aplicado al diseño factorial fraccionado  $2^{5-1}$ , para la extracción de flavonoides a partir de flores de *H. rosa-sinensis* con efectos individuales y*

binarios. **A**: Relación etanol: agua; **B**: Concentración de HCl; **C**: Temperatura; **D**: Relación material-solvente y **E**: Tiempo de extracción.

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
A	1443000	1	1443000	1,6	0,2747
B	21084200	1	21084200	23,36	0,0084
C	4688310	1	4688310	5,19	0,0849
D	5,26E+04	1	5,26E+04	0,06	0,8212
E	625286	1	625286	0,69	0,452
AB	4856510	1	4856510	5,38	0,0812
AC	37733,1	1	37733,1	0,04	0,848
AD	1235990	1	1235990	1,37	0,3069
AE	296208	1	296208	0,33	0,5974
BC	32670,6	1	32670,6	0,04	0,8584
BD	47415,1	1	47415,1	0,05	0,83
BE	1012540	1	1012540	1,12	0,3493
CD	479903	1	479903	0,53	0,5063
CE	9,84E+04	1	9,84E+04	0,11	0,7578
DE	14580,6	1	14580,6	0,02	0,905
Error total	3610400	4	902599		
Total (corr.)	3,96E+07	19			

F<sub>crítico</sub>\* 7,7

\*Valor calculado con el *software* Microsoft Excel, versión 2016

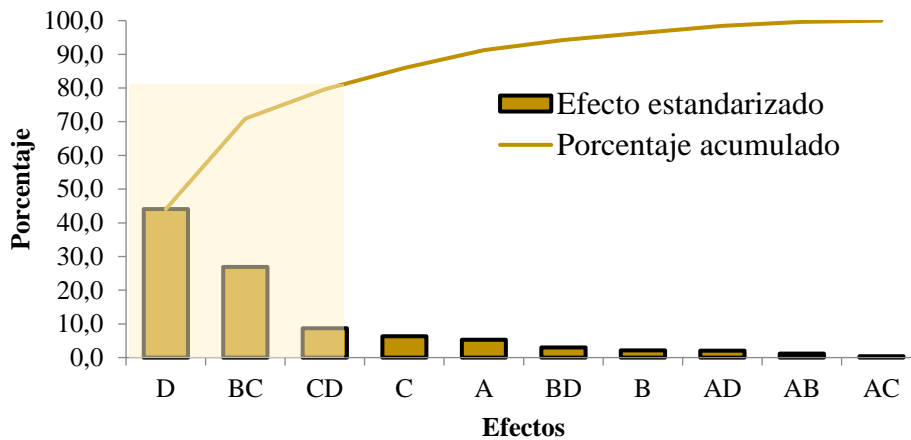
En la **Tabla 11**, se presentan los resultados del análisis de la varianza aplicado al diseño factorial 2<sup>4</sup>, la variable del tiempo de extracción, representada por D (5.9), presentó el mayor efecto significativo sobre la capacidad antioxidante (CA).

Los resultados del ANOVA del diseño factorial fraccionado 2<sup>5-1</sup> para flores de *H. rosa-sinensis*, se presentan en la **Tabla 12**, se observa, que la variable de la concentración del HCl representada por B (23.36), tuvo el mayor efecto significativo sobre la CA.

Los efectos individuales y binarios para los dos diseños experimentales se corroboraron, usando de los gráficos de Pareto (Véanse **Figura 11** y **12**), y se observó que la variable D, y las interacciones BC y CD representaron al menos el 86% de variación de la respuesta evaluada para el diseño de la biomasa de *L. origanoides*. A pesar de que la relación etanol:agua/ temperatura (BC, 3.2) y la relación temperatura/tiempo de extracción (CD, 1.6) no superaron el valor de  $F_{\text{crítico}}$  (4.6) (Véase **Tabla 11**), se tuvieron en cuenta como variables para incorporarlas al modelo matemático. En el caso del diseño planteado para las flores de *H. rosa-sinensis*, las variables B, C y la interacción AB representaron al menos el 85% de la variación de la respuesta, lo que indica que, al variar el tiempo de extracción, se observó un efecto significativo sobre la capacidad antioxidante de los extractos. En el diseño experimental de *H. rosa-sinensis*, la temperatura (Variable C, 5.19) y la interacción entre la relación etanol: agua/concentración de HCl (AB, 5.38) no superaron el valor de  $F_{\text{crítico}}$  (7.70), sin embargo, se tuvieron en cuenta para el modelo matemático, ya que el valor de efecto obtenido de estas variables estuvo cerca al valor de  $F_{\text{crítico}}$ .

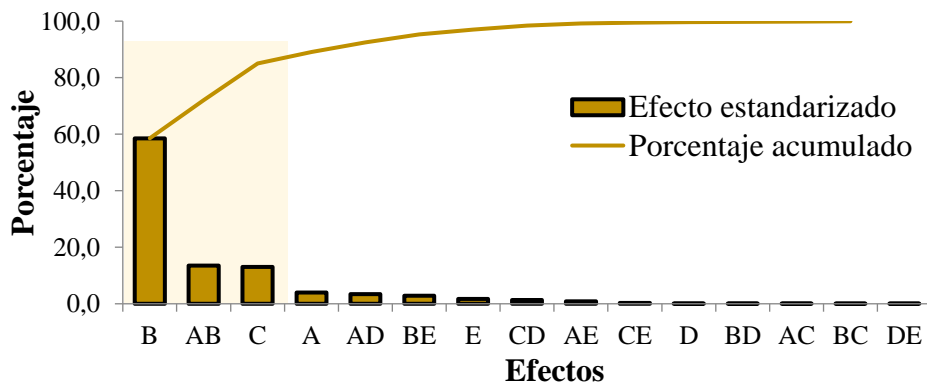
**Figura 11.**

Gráfico de Pareto para los efectos estandarizados en el diseño experimental planteado para extractos, con alta capacidad antioxidante, obtenidos a partir de biomasa residual de *L. origanoides*. **A:** Relación material-solvente; **B:** Relación etanol: agua; **C:** Temperatura y **D:** Tiempo de extracción.



**Figura 12.**

Gráfico de Pareto para los efectos estandarizados en el diseño experimental planteado para extractos, con alta capacidad antioxidante, obtenidos a partir de flores de *H. rosa-sinensis*. **A:** Relación etanol:agua; **B:** Concentración de ácido HCl; **C:** Temperatura; **D:** Relación material-solvente y **E:** Tiempo de extracción.



Una vez seleccionadas las variables para cada diseño experimental y que tuvieron efecto sobre el observable (capacidad antioxidante alta), se propusieron diferentes modelos matemáticos, sin embargo, se escogió en cada caso, el modelo que presentó el mejor ajuste, a partir de los parámetros de diagnóstico  $R^2$ ,  $R^2_{ajustado}$  y el error relativo medio de calibración (RMSEC, por sus siglas en inglés). Para realizar la calibración y validación del modelo seleccionado, se realizaron experimentos adicionales, en los cuales los datos se distribuyeron en dos grupos, un conjunto de datos para calibración y, otro, para validación; posteriormente, se aleatorizó la distribución de los experimentos entre los dos conjuntos. Para la multiplicación de matrices y obtención de los modelos finales se empleó el *software Microsoft Office Excel*, versión 2016. En la **Tabla 13**, se presentan los modelos matemáticos que predijeron las mejores condiciones para extractos, con alta capacidad antioxidante, obtenidos de las matrices vegetales estudiadas.

**Tabla 13.**

*Modelos matemáticos que predijeron las mejores condiciones para la extracción de flavonoides a partir de la biomasa residual de L. origanoides y de flores Hibiscus rosa-sinensis.*

<b>Matriz</b>	Biomasa residual de <i>L. origanoides</i>	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>
<b>Modelo matemático</b>	$ORAC = 5082,06 + 154,20 * C + 467,87 * D - 1304,18 * (CD)^2 - 346,91 * (BC)$	$ORAC = 3338 + 251 * A + 446 * B + 45 * C - 306 * D - 38(AB) - 319 * (AB)^2$
<b>Variables</b>	A: Relación material-solvente, g/mL B: Etanol: agua, % C: Temperatura, °C D: Tiempo de extracción, min	A: Etanol en agua, % B: Concentración de HCl, % C: Temperatura, °C D: Relación material/solvente, g/mL E: Tiempo de extracción, min
<b>Calibración</b>	$R^2$ $R^2_{ajustado}$	0,95 0,93
		0,98 0,96

	<b>LOF</b>	0,00	0,00
	<b>RMSEC</b>	176	433
<b>Validación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	0,97	0,99
	<b>R<sup>2</sup><sub>ajustado</sub></b>	0,89	0,98
	<b>LOF</b>	0,00	0,00
	<b>RMSEV</b>	223	446

Para determinar las condiciones óptimas para la extracción de flavonoides de ambas matrices, los modelos matemáticos reportados en la **Tabla 13** se derivaron e igualaron a cero y se resolvieron los sistemas de ecuaciones para encontrar el valor para cada variable. Una vez determinados los valores óptimos, se hicieron las extracciones por triplicado, bajo las condiciones predichas para cada matriz vegetal (Véanse **Tabla 14** y **15**) y se midió la capacidad antioxidante de cada extracto, usado por el ensayo ORAC.

**Tabla 14.**

*Condiciones óptimas para la extracción de flavonoides a partir de la biomasa residual de *L. origanoides*.*

<b>Símbolo</b>	<b>Variables independientes</b>	<b>Unidad</b>	<b>Condición óptima</b>
<b>A</b>	Relación material-solvente	g/mL	1:40
<b>B</b>	Etanol: agua, %	v/v	70:30
<b>C</b>	Temperatura	°C	47
<b>D</b>	Tiempo de extracción	min	23

**Tabla 15.**

*Condiciones óptimas para la extracción de flavonoides a partir de flores de H. rosa-sinensis.*

Símbolo	Variables independientes	Unidad	Condición óptima
A	Etanol: agua, %	v/v	52.5:47.5
B	Concentración de HCl, %	v/v	0.5
C	Temperatura	°C	50
D	Relación material-solvente	g/mL	1:40
E	Tiempo de extracción	min	15

A partir de los datos experimentales obtenidos, bajo las condiciones predichas como óptimas y el valor predicho por cada modelo matemático, se calculó el error relativo y el error cuadrático medio (RMSE) (**Tabla 16**).

**Tabla 16.**

*Valores de capacidad antioxidante predichos y experimentales para extractos de H. rosa-sinensis y de la biomasa residual (después de la destilación) de L. origanoides.*

Matriz	Capacidad antioxidante, μmol Trolox <sup>®</sup> /g extracto		RMSE	% Error
	Experimental	Predicho		
Biomasa residual <i>L. origanoides</i>	4690	5073	371	7.3
	4730	5073		
	4697	5073		
<i>H. rosa-sinensis</i>	3495	3645	139	2.7
	3539	3645		
	3491	3645		

De la **Tabla 16**, se observa que el porcentaje error calculado a partir de los valores de capacidad antioxidante experimentales y predichos va desde 2.7% a 7.3%, con ello, se demostró que los modelos matemáticos calculados lograron predecir correctamente el

potencial antioxidante, según las condiciones experimentales encontradas para matriz vegetal.

El solvente más empleado para aislar flavonoides fue una mezcla de solventes orgánicos y agua; el metanol ha sido un disolvente ampliamente usado, sin embargo, es tóxico y no es práctico para obtener compuestos bioactivos que serán empleados luego como ingredientes naturales en las industrias alimenticios y farmacéuticos. El etanol, es el disolvente más utilizado por su baja toxicidad, sin embargo, se utiliza en mezcla con el agua, ya que se ha demostrado que al adicionar cierta cantidad agua se logra obtener una eficacia más alta de la extracción de flavonoides, debido a que permite facilitar la transferencia de masa entre la matriz vegetal y el solvente (Zhang *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2016). No obstante, la concentración a la que se debe emplear el etanol dependerá de cada matriz, los componentes para extraer y otras condiciones operacionales.

En esta investigación, se observó que para la extracción de flavonoides a partir de la biomasa residual de *L. origanoides*, el etanol al 70%, fue la mezcla que permitió obtener extractos con la capacidad antioxidante más alta. Sin embargo, para las flores de *H. rosa-sinensis*, con la mezcla de etanol-agua (52.5:47.5 v/v), acidificada al 0.5% con HCl, se logró obtener la eficiencia de extracción de flavonoides más alta. Estos resultados fueron congruentes con los reportados por Zhong *et al.* (2019), Koyu *et al.* (2018), Pham *et al.* (2020), quienes emplearon mezclas de etanol-agua desde 50:50 hasta 70:30 (v/v), para extraer flavonoides de *D. indicum*, de frutos de *Morus nigra* y de hojas de *C. hindsii*, respectivamente. Sin embargo, dos Santos *et al.* (2021), Afshari *et al.* (2015), Ali *et al.* (2014) y Ghaffar *et al.* (2012), emplearon etanol entre el 75 y 80%, para extraer compuestos fenólicos

de flores y hojas de *H. rosa-sinensis*. Coelho *et al.* (2015) estandarizaron las condiciones para la extracción de compuestos de *L. origanoides*, y reportaron que la mezcla etanol-agua (1:1 v/v) fue la que aumentaba el rendimiento de extracción, pero, recientemente, Bautista *et al.* (2021), también indicaron que el etanol al 60%, aumentó la extracción de flavonoides asistida por microondas, de *L. origanoides*.

Con respecto a la temperatura, se observó que, la temperatura óptima de trabajo fue de 47 °C para la biomasa residual de *L. origanoides* y 50 °C para las flores de *H. rosa-sinensis*. Esta variable es importante para tener en cuenta ya que altas temperaturas producen una disminución de la viscosidad del disolvente y la tensión superficial, lo que facilita la penetración del disolvente en la muestra, favoreciendo la transferencia de los compuestos bioactivos intracelulares de la matriz vegetal (Zhao *et al.*, 2017). No obstante, temperaturas superiores a 100 °C, pueden reducir el rendimiento de extracción por descomposición de los compuestos de interés (Pimentel *et al.*, 2018). Las temperaturas óptimas determinadas en este trabajo fueron reportadas por Wang *et al.* (2018), Md *et al.* (2019). Pero Pérez *et al.* (2020), también, optimizaron las condiciones para la extracción de antocianinas en *H. rosa-sinensis*, y reportaron 60 °C como la temperatura óptima de trabajo.

Los resultados de la optimización mostraron un buen ajuste con los modelos matemáticos propuestos para la extracción de flavonoides a partir de flores de *H. rosa-sinensis* y de la biomasa residual obtenida después de la destilación de *L. origanoides* ( $R^2 = 0.98$  y  $0.95$ ), respectivamente.

### 5.3 Rendimientos de extracción

Los rendimientos de extracción se calcularon, usando los valores de peso seco, para lo cual se tuvo en cuenta el peso del extracto obtenido liofilizado, sobre el peso del material vegetal seco. En la

**Tabla 17**, se reportan los rendimientos para los extractos de cuatro cultivares de flores de *H. rosa-sinensis* y de la biomasa residual de *L. origanoides* para tres quimiotipos (timol, carvacrol y felandreno). Los resultados se expresaron como el valor promedio  $\pm$  desviación

Espece	Quimiotipo o cultivar	Extracto	Rendimiento, % p/p ( $\pm$ SD, $n=3$ )
<i>L. origanoides</i>	Timol	Hidro-alcohólico	10.1 $\pm$ 0.12
		CO2 supercrítico	1.2 $\pm$ 0.06
	Carvacrol	Hidro-alcohólico	9.8 $\pm$ 0.23
		CO2 supercrítico	1.5 $\pm$ 0.16
	Felandreno	Hidro-alcohólico	9.5 $\pm$ 0.16
		CO2 supercrítico	1.4 $\pm$ 0.20
<i>H. rosa-sinensis</i>	Rojo		29.4 $\pm$ 0.84
	Rosado		26.5 $\pm$ 0.43
	Naranja	Hidro-alcohólico	27.9 $\pm$ 0.45
	Amarillo		25.6 $\pm$ 0.76

estándar ( $n=3$ ).

**Tabla 17.**

*Rendimiento (%) de los extractos vegetales de H. rosa-sinensis y de la biomasa residual de L. origanoides.*

<b>Especie</b>	<b>Quimiotipo o cultivar</b>	<b>Extracto</b>	<b>Rendimiento, % p/p (<math>\pm</math>SD, n=3)</b>
<i>L. origanoides</i>	Timol	Hidro-alcohólico	10.1 $\pm$ 0.12
		CO <sub>2</sub> supercrítico	1.2 $\pm$ 0.06
	Carvacrol	Hidro-alcohólico	9.8 $\pm$ 0.23
		CO <sub>2</sub> supercrítico	1.5 $\pm$ 0.16
	Felandreno	Hidro-alcohólico	9.5 $\pm$ 0.16
		CO <sub>2</sub> supercrítico	1.4 $\pm$ 0.20
<i>H. rosa-sinensis</i>	Rojo		29.4 $\pm$ 0.84
	Rosado		26.5 $\pm$ 0.43
	Naranja	Hidro-alcohólico	27.9 $\pm$ 0.45
	Amarillo		25.6 $\pm$ 0.76

De las matrices vegetales estudiadas, las flores de *H. rosa-sinensis* presentaron rendimientos de extracción mayores en comparación con los extractos obtenidos a partir de la biomasa residual de *L. origanoides*. Los rendimientos de extracción para los cuatro cultivares de *Hibiscus* en esta investigación fueron comparables con los reportados por Sobhy *et al.* (2017), quienes obtuvieron extractos con acetato de etilo, metanol, etanol y agua, y los rendimientos de extracción variaron desde 20.9% hasta 29.8%, siendo el extracto metanólico el que presentó el mayor rendimiento. Ali *et al.* (2014), también, obtuvieron extractos con etanol y metanol, reportaron rendimientos de extracción de 18.3% y 23.2%, respectivamente.

Sin embargo, Rao *et al.* (2014), reportaron un rendimiento del 10.3% para la extracción de flores, empleando agua; este valor fue más bajo que el obtenido en este trabajo, y también por Ali *et al.* (2014) y Sobhy *et al.* (2017).

Para los extractos hidro-alcohólicos, obtenidos a partir de la biomasa residual de *L. origanoides*, los rendimientos estuvieron en el rango de 9.5-10.1%, mientras que para los extractos aislados con CO<sub>2</sub> supercrítico estuvieron en el rango de 1.2-1.5%. En general, los rendimientos logrados al usar la extracción con solvente asistida por ultrasonido fueron mayores en comparación con los obtenidos en la extracción con fluido supercrítico.

Los procesos de extracción con fluidos supercríticos dependen de la difusión molecular en la fase fluida, ya que incluso dentro de la fase sólida, existe la transferencia de masa a través de una solución de solvente impregnada en el sólido (difusión interna) y soluto solubilizado, que deja el sólido por los poros capilares (difusión externa) (Tzia y Liadakis, 2003). Los valores de rendimiento más altos se asocian a solventes que favorecen la difusión efectiva con el tamaño de partícula de los sustratos extraíbles: a menor tamaño de partícula hay mayor área de contacto, con lo cual aumenta el área de difusión, como se ha demostrado para la extracción de antioxidantes de la uva (Pinelo *et al.*, 2006). En este trabajo, se utilizó el mismo tamaño de partícula para el material vegetal usado en las extracciones con solventes y por SFE, el efecto de mejora de la extracción con solventes, solo se atribuye a su poder de solvatación. Por lo tanto, la mezcla hidro-etanólica resultó ser un mejor solvente para aumentar la difusión a la fase fluida que el CO<sub>2</sub> supercrítico, modificado con etanol.

#### 4.1 Caracterización por UHPLC-ESI<sup>+</sup>-Orbitrap-MS de extractos hidro-alcohólicos y obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico.

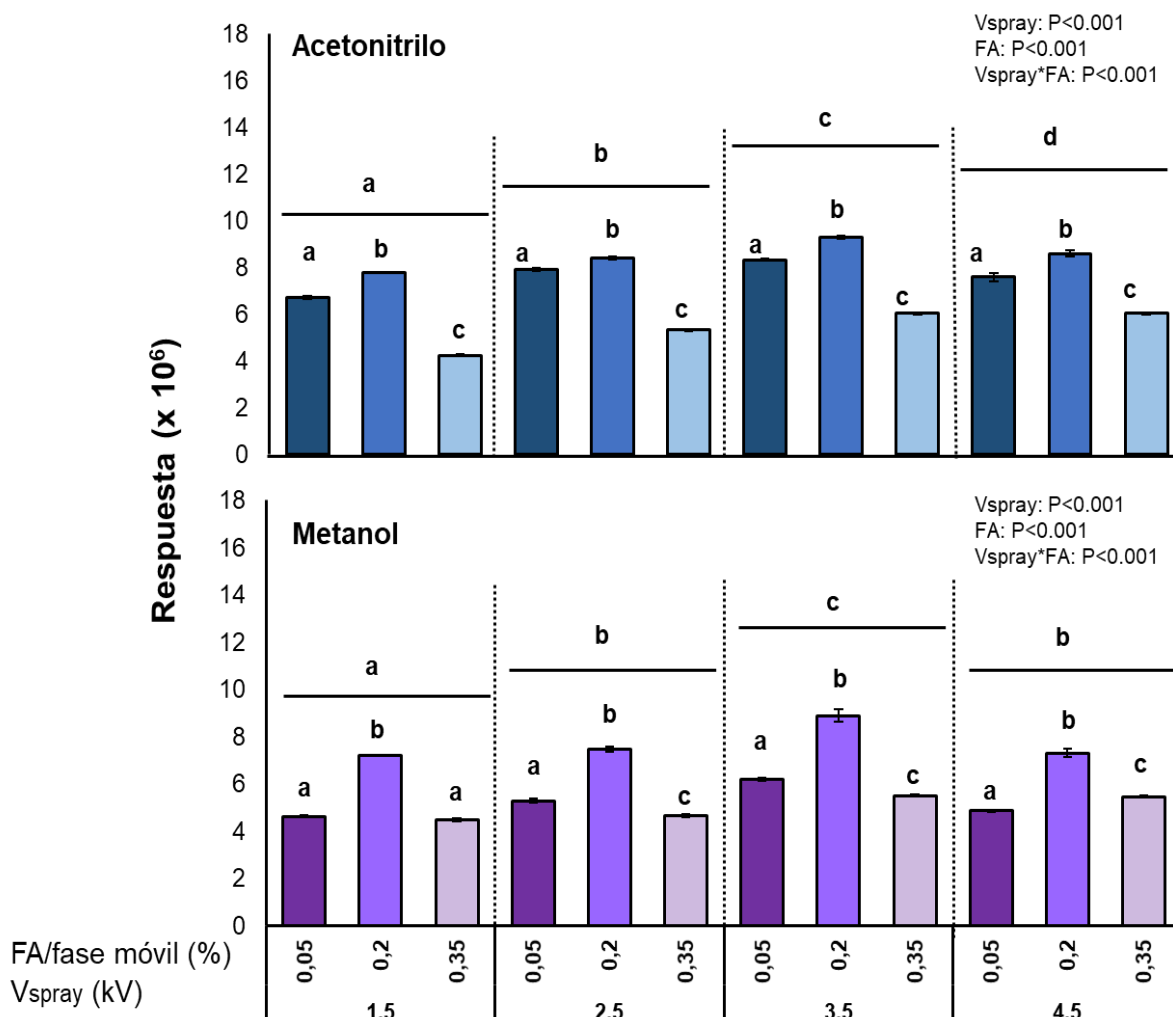
##### 4.1.1 Condiciones de análisis por UHPLC-ESI<sup>+</sup>-Orbitrap-MS

La antocianina cianidina-3-glucósido se usó para determinar si la adición de ácido fórmico (AF) a diferentes concentraciones (0.05, 0.2 o 0.35%) en la fase móvil (FA/agua o FA/acetonitrilo) o (FA/agua o Fa/metanol), junto con la variación del  $V_{spray}$  entre 1.5 y 4.5 kV, influían sobre la respuesta del analizador *Orbitrap-MS* (corriente iónica del analito *target*).

En la **Figura 13**, se muestra la influencia de la concentración de ácido fórmico en las fases móviles y el voltaje de electronebulización ( $V_{spray}$ ) sobre la corriente iónica de los iones [M]<sup>+</sup> de cianidina-3-glucósido (0,5 mg/L). Los resultados se expresaron como el valor promedio ± el error estándar,  $n=3$ . Se realizó un análisis de varianza ANOVA.

**Figura 13.**

*Influencia de la concentración de ácido fórmico en las fases móviles (acetonitrilo o metanol) y el voltaje de electronebulización ( $V_{spray}$ ) sobre la corriente iónica de los iones  $[M]^+$  de cianidina-3-glucósido (0,5 mg/L). Promedio  $\pm$  error estándar,  $n=3$ . ANOVA, las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95% de confianza.*



Según los resultados del ANOVA (95% de confianza) y de la comparación de múltiples rangos (Tukey, HSD,  $p < 0,05$ ), en el experimento donde la fase móvil fue

acetonitrilo, sí existió diferencia significativa entre los cuatro grupos analizados, sin embargo, en el análisis realizado con fase móvil metanol, los grupos donde el  $V_{spray}$  fueron 2.5 kV y 4.5 kV, no hubo diferencias honestamente significativas. La concentración de FA tanto para la fase móvil de acetonitrilo como en la fase móvil metanólica, modificadas al 0,2% con FA, produjo una respuesta mayor en el analizador *Orbitrap*-MS para la antocianina, a los diferentes voltajes usados. Al comparar los resultados obtenidos con los diferentes  $V_{spray}$ , la corriente iónica de los iones  $[M]^+$  de cianidina-3-glucósido (0,5 mg/L) fue mayor cuando se usó el  $V_{spray}$  a 3.5 kV y fase móvil al 0,2% de FA. Sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa, entre los resultados obtenidos con  $V_{spray}$  de 3.5 kV y fase móvil (acetonitrilo o metanol), con FA al 0.2%, con lo que se determinó que el uso de acetonitrilo o metanol no influía sobre la respuesta de ionización de las moléculas estudiadas. Por lo tanto, para el análisis de flavonoides en las diferentes matrices vegetales usadas, de esta investigación, se empleó como fase móvil acetonitrilo al 0.2% de FA, y un  $V_{spray}$  a 3.5 kV.

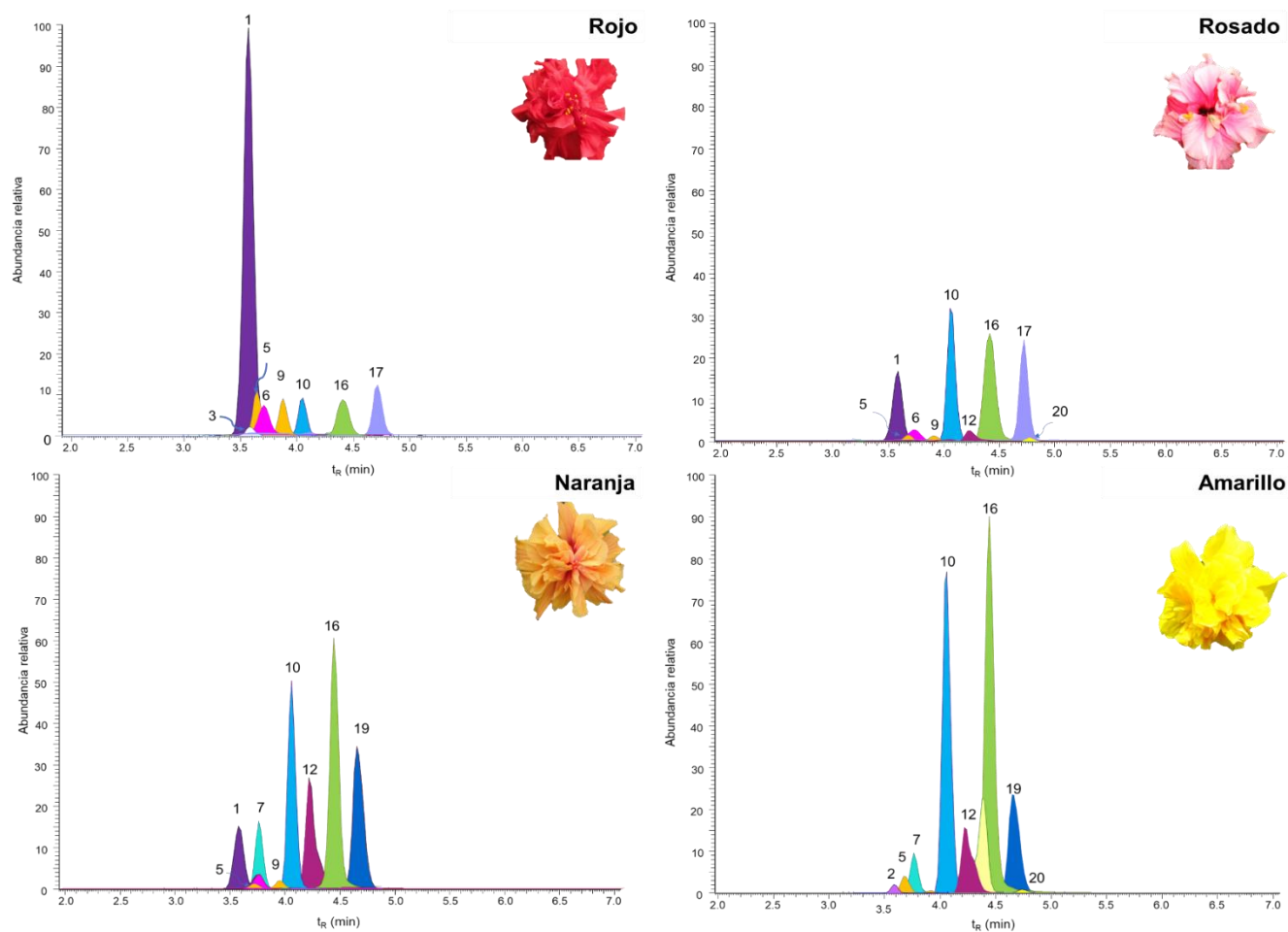
#### **4.1.2 Identificación por UHPLC-ESI<sup>+</sup>-Orbitrap-MS de flavonoides presentes en los extractos de cultivares de *H. rosa-sinensis*, y quimiotipos de *L. origanoides*.**

El análisis realizado por UHPLC-ESI<sup>+</sup>-*Orbitrap*-MS permitió detectar 20 flavonoides en los 16 cultivares de flores de *H. rosa-sinensis* (**Tabla 18**). Se identificaron tres antocianinas, once flavonoles, dos flavan-3-oles, dos flavanonoles, una flavona y una flavanonona. Las únicas agliconas detectadas fueron catequina y epicatequina, los demás compuestos fueron derivados glicosilados de los respectivos flavonoides. En la **Figura 14**,

se presentan algunos perfiles cromatográficos obtenidos por LC/MS (*Orbitrap*) de los extractos hidro-alcohólicos de los cuatro cultivares de *H. rosa-sinensis*.

Figura 14.

Perfiles cromatográficos obtenidos por LC/MS (Orbitrap), de los extractos hidro-alcohólicos de cuatro cultivares de *H. rosa-sinensis*. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 18**.



**Tabla 18.**

Masas exactas obtenidas por UHPLC-ESI+ -Orbitrap-MS, de iones  $[M]^+$  o moléculas protonadas  $[M+H]^+$ , de flavonoides presentes en extractos hidro-alcohólicos de flores de *H. rosa-sinensis*.

Nº Fig. 14	Clasificación	Compuesto	Fórmula	Masa calculada		Masa Exp.	Error, Δ ppm	HCD, eV	Iones producto			Criterio de Identificación	Referencias
				$[M]^+$	$[M+H]^+$				Fragmento	Fórmula	m/z (%)		
1	Antocianina	Cianidina-sofórosido	$C_{27}H_{31}O_{16}$	611.16066	-	611.16132	1.07	20	$[M-2C_6H_{10}O_5]^+$	$C_{15}H_{11}O_6$	287.05493 (100)	a,b	Nakamura <i>et al.</i> (1990) Barnes y Schug, (2011)
									$[M-2C_6H_{10}O_5-C_6H_4O_4]^+$	$C_9H_7O_2$	147.04404 (1)		
									$[M-2C_6H_{10}O_5-C_8H_6O_3]^+$	$C_7H_5O_3$	137.02324 (1)		
									$[M-2C_6H_{10}O_5-C_8H_6O_4]^+$	$C_7H_5O_2$	121.02866 (1)		
2	Flavonol	Quercetina-hexurónido-hexósido	$C_{27}H_{28}O_{18}$	-	641.13484	641.13501	0.26	20	$[(M+H)-C_6H_{10}O_5]^+$	$C_{21}H_{19}O_{13}$	479.08209 (100)	a,b	Roriz <i>et al.</i> (2014)
									$[(M+H)-C_6H_{10}O_5-C_6H_8O_6]^+$	$C_{15}H_{11}O_7$	303.04999 (43)		
									$[(M+H)-C_6H_{10}O_5-C_6H_8O_6-H_2O]^+$	$C_{15}H_9O_6$	285.03949 (2)		
									$[(M+H)-C_6H_{10}O_5-C_6H_8O_6-C_8H_6O_3]^+$	$C_7H_5O_4$	153.01836 (1)		
3	Flavanonol	Taxifolina-dihexósido	$C_{27}H_{32}O_{17}$	-	629.17122	629.17078	0.71	10	$[(M+H)-C_6H_{10}O_5]^+$	$C_{21}H_{23}O_{12}$	467.11832 (15)	a,b	Lin <i>et al.</i> (2007)
									$[(M+H)-2C_6H_{10}O_5]^+$	$C_{15}H_{13}O_7$	305.06561 (100)		
									$[(M+H)-2C_6H_{10}O_5-H_2O]^+$	$C_{15}H_{11}O_6$	287.05496 (40)		
									$[(M+H)-2C_6H_{10}O_5-C_8H_8O_3]^+$	$C_7H_5O_4$	153.01832 (2)		
4	Antocianina	Cianidina-sambubiósido	$C_{26}H_{29}O_{15}$	581,15009	-	581.15039	0.50	20	$[M-C_6H_{10}O_5-C_5H_8O_4]^+$	$C_{15}H_{11}O_6$	287.05508 (100)	a,b	Salem <i>et al.</i> (2014) Barnes y Schug, (2011)
									$[M-C_6H_{10}O_5-C_5H_8O_4-C_6H_4O_4]^+$	$C_9H_7O_2$	147.04404 (1)		
									$[M-C_6H_{10}O_5-C_5H_8O_4-C_8H_6O_3]^+$	$C_7H_5O_3$	137.02339 (66)		
									$[M-C_6H_{10}O_5-C_5H_8O_4-C_8H_6O_4]^+$	$C_7H_5O_2$	121.02853 (1)		
5	Flavan-3-ol	Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$	-	291.08631	291.08636	0.17	10	$[(M+H)-C_6H_6O_5]^+$	$C_9H_9O_3$	165.05470 (25)	a,b,c	dos Santos <i>et al.</i> (2021)
									$[(M+H)-C_8H_8O_3]^+$	$C_7H_7O_3$	139.03903 (100)		
									$[(M+H)-C_8H_8O_4]^+$	$C_7H_7O_2$	123.04424 (47)		

Tabla 18. Continuación

6	Antocianina	Cianidina-3-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.10784	-	449.10818	0.77	20	[M-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>	287.05515 (100)	a,b,c	Li <i>et al.</i> (2014) Barnes y Schug, (2011)
									[M-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>5</sub> O <sub>3</sub>	137.02344 (25)		
									[M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	121.02854 (1)		
7	Flavonol	Kaempferol-hexurónido-hexósido	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> O <sub>17</sub>	-	625.13992	625.14044	0.82	20	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	463.08743 (100)	a,b	Roriz <i>et al.</i> (2014)
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.05490 (45)		
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -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>	153.01833(1)		
8	Flavonol	Quercetina-trihexósido	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>22</sub>	-	789.20840	789.20880	0.50	20	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>17</sub>	627.15594 (3)	a,b	Li <i>et al.</i> (2018)
									[(M+H)-2C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	465.10339 (60)		
									[(M+H)-3C <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>	303.05011 (100)		
9	Flavan-3-ol	Epicatequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	-	291.08631	291.08626	0.14	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	165.05473 (25)	a,b,c	dos Santos <i>et al.</i> (2021)
									[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	139.03902 (100)		
									[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	123.04424 (47)		
10	Flavonol	Quercetina-dihexósido	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	-	627.15557	627.15613	0.88	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	465.10281 (16)	a,b	Shen <i>et al.</i> (2021) Li <i>et al.</i> (2018)
									[(M+H)-2C <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>	303.04990 (100)		
									[(M+H)-2C <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>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01819 (1)		
11	Flavonol	Kaempferol-desoxihexósido-hexósido	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-	595.16574	595.16632	0.96	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	433.11310 (20)	a,b	Pascoal <i>et al.</i> (2015)
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.05502 (100)		
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -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>	153.01822(1)		
12	Flavonol	Kaempferol-dihexósido	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	-	611.16066	611.16132	1.01	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.10754 (20)	a,b	Pascoal <i>et al.</i> (2015)
									[(M+H)-2C <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>	287.05508 (100)		
									[(M+H)-2C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	269.04465 (1)		
									[(M+H)-2C <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>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01814 (1)		

Tabla 18. Continuación

13	Flavonol	Kaempferol-desoxihexósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	-	433.11292	433.11292	0.68	20	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.05508 (100)	a,b	Pascoal <i>et al.</i> (2015)
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -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>	153.01820 (1)		
14	Flavonol	Quercetina-hexurónido	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub>	-	479.08201	479.08203	0.03	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>7</sub>	303.04968 (100)	a,b	Vadivel, (2016)
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	285.03899 (1)		
15	Flavanonol	Didridro kaempferol-hexurónido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	-	465.10275	465.10297	0.45	20	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	289.07037 (100)	a,b	Li <i>et al.</i> (2018)
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -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>	153.01805 (10)		
16	Flavonol	Quercetina-3-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	-	465.10275	465.10300	0.52	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>	303.05005 (100)	a,b,c	dos Santos <i>et al.</i> (2021)
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6F</sub>	285.03960 (1)		
									[(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>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01799 (1)		
17	Flavanona	Naringenina-hexurónido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-	449.10784	449.10770	0.31	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	273.07559 (100)	a,b	Zheng <i>et al.</i> (2018)
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01829(8)		
18	Flavonol	Kaempferol-hexurónido	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	-	463.08670	463, 08710	0.86	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>6</sub>	287.05490 (45)	a,b	Pascoal <i>et al.</i> (2015)
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -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>	153.01833(1)		
19	Flavonol	Kaempferol-3-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-	449.10784	449.10784	0.56	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>	287.04718 (100)	a,b,c	dos Santos <i>et al.</i> (2021); March y Miao, (2004)
									[(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>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01855 (4)		
20	Flavona	Apigenina-hexurónido	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	-	447.09218	447.09216	0.05	10	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub>	429.08162 (1)	a,b	Zheng <i>et al.</i> (2018)
									[(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>	271.05997(45)		
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01824 (17)		
									[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	121.02857 (1)		

<sup>a</sup> Identificación tentativa basada en iones [M]<sup>+</sup> o moléculas protonadas [M+H]<sup>+</sup>, reportados en la literatura para el género *Hibiscus* spp (dos Santos *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2014; Pascoal *et al.*, 2015).

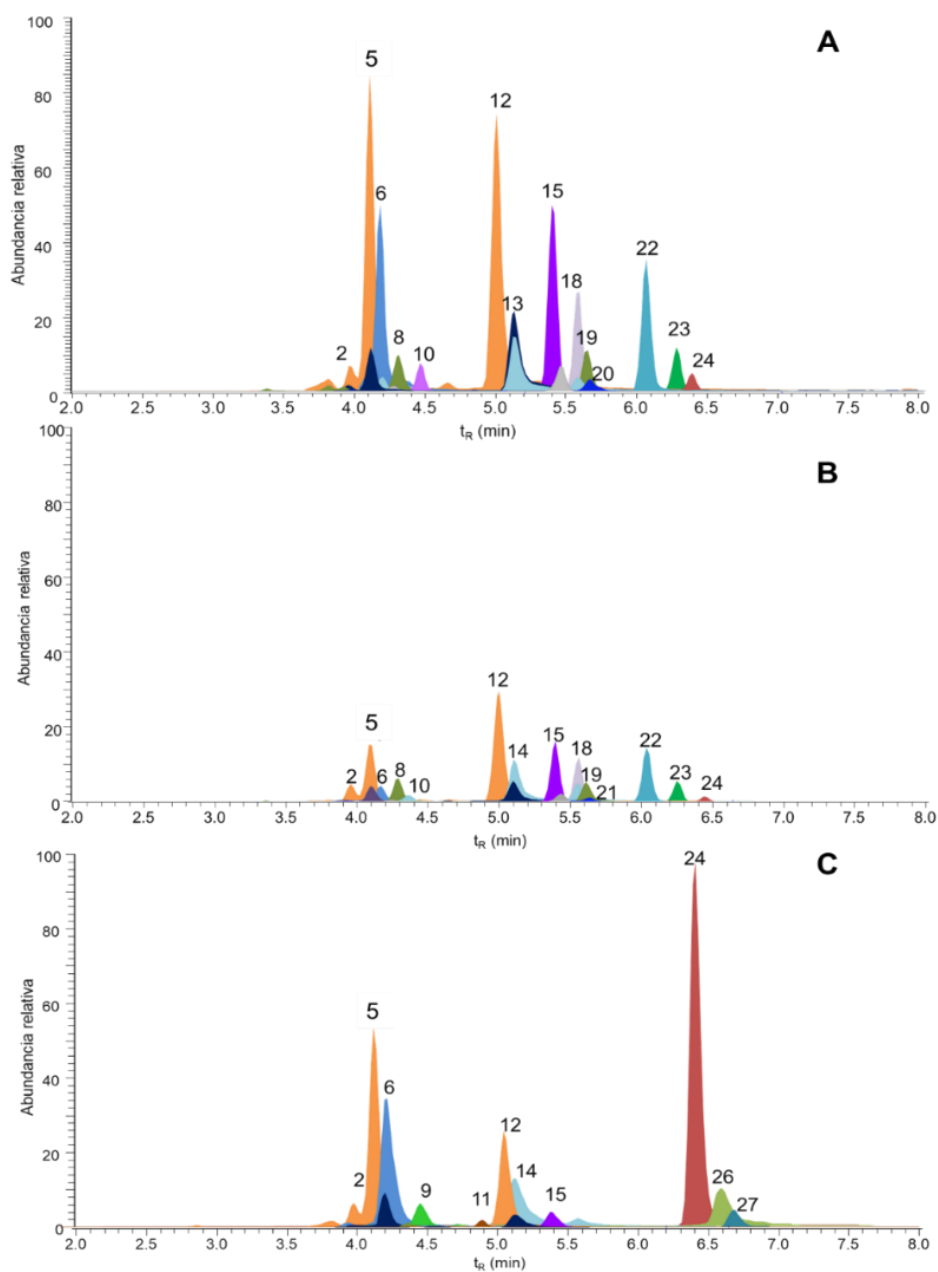
<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en el estudio del patrón de fragmentación (ESI<sup>+</sup>-HRMS) y consulta con lo reportado en artículos científicos y base de datos espectrales (METLIN<sup>TM</sup>, <http://metlin.scripps.edu/>) y fitoquímica (PCIDB, <http://www.genome.jp/db/pcodb/>).

<sup>c</sup> Identificación confirmatoria basada en espectro de masas (ESI<sup>+</sup> -HRMS) y en la comparación con espectros de masas y t<sub>R</sub> de sustancias de referencia certificada.

El análisis por LC/MS permitió detectar 28 flavonoides en los extractos obtenidos de la biomasa residual de *L. origanoides*; entre los compuestos fenólicos, se identificaron once flavonas, ocho flavanonas, cinco flavonoles, dos flavanonoles, dos chalconas y algunos derivados glicosilados. En la **Figura 15** se presenta el perfil cromatográfico de los extractos obtenidos con solvente de tres quimiotipos de *L. origanoides* después de la destilación de la planta.

**Figura 15.**

Corrientes iónicas extraídas (EIC), obtenidas por UHPLC-ESI<sup>+</sup>-Orbitrap-MS, de moléculas protonadas [M+H]<sup>+</sup> presentes en los extractos hidro-alcohólicos de la biomasa residual de *L. origanoides*. **A.** Quimiotipo Timol; **B.** Quimiotipo Carvacrol; **C.** Quimiotipo Felandreno. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 19**.



**Tabla 19.**

Masas exactas obtenidas por UHPLC-ESI<sup>+</sup>-Orbitrap-MS, de iones de moléculas protonadas [M+H]<sup>+</sup>, presentes en los extractos hidroalcohólicos y obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de *Lippia organoides*.

N° Fig. 15	Clasificación	Compuesto	Fórmula	Masa [M+H] <sup>+</sup>		Error, Δ ppm	HCD, eV	Iones producto			Criterios de Identificación	Referencias
				Calculada	Experimental			Fragmento	Fórmula	m/z (%)		
1	Flavanonol	Taxifolina-hexósido	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	467.11840	467.11829	0.24	20	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	305.06561 (44)	a,b	Demarque <i>et al.</i> (2016); Lin <i>et al.</i> (2007); Ma <i>et al.</i> (1997); Sólyom <i>et al.</i> (2014)
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.05496 (8)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01832 (72)		
2	Flavonol	Quercetina-3-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	465.10275	465.10259	0.35	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>	303.04971 (100)	a,b,c	Leitão <i>et al.</i> (2017); Leyva <i>et al.</i> (2016); Lin <i>et al.</i> 2007; Ma <i>et al.</i> 1997)
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	285.03970 (1)		
								[(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>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01811 (1)		
3	Flavanona	Eriodictiol desoxihexósido	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	435.12857	435.12845	0.28	30	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	289.07086 (100)	a,b	Pereira <i>et al.</i> (2013)
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	271.05937 (1)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -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>7</sub> O <sub>3</sub>	163.03883 (25)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -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>	153.01846 (39)		
4	Flavona	Luteolina desoxihexósido-hexósido	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	595.16575	595.16524	0.86	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>	449.10864 (11)	a,b	Gu <i>et al.</i> (2012)
								[(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>	287.05530 (100)		
								[(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>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01832 (9)		
								[(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>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	137.02325 (1)		
5	Flavanona	Eriodictiol hexósido	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	451.12349	451.12327	0.48	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	289.07062 (100)	a,b	Pereira <i>et al.</i> (2013)
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	271.06027 (2)		
								[(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>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01810 (7)		

Tabla 19. Continuación

6	Flavona	Luteolina hexósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449.10839	449.10791	1.07	20	[(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>	287.05515 (100)	a,b	Lin <i>et al.</i> (2007)
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	245.04386 (1)		
								[(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>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01837 (27)		
								[(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>5</sub> O <sub>3</sub>	137.02220 (1)		
7	Chalcona	Hydroxy phloretin hexósido	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	453.13914	453.13872	0.92	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	291.08615 (17)	a,b	Lin <i>et al.</i> (2007)
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	273.07559 (4)		
								[(M+H)-C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01837 (4)		
8	Flavanonol	Taxifolina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	305.06557	305.06548	0.30	30	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287.05487 (37)	a,b	Leitão <i>et al.</i> (2017) Cortés <i>et al.</i> (2021)
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	259.06003 (1)		
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-2CO] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	231.06512 (41)		
								[(M+H)-2H <sub>2</sub> O-2CO] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	213.05463 (14)		
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01826 (72)		
9	Flavonol	Galangina-hexósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	433.11292	433.11291	0.02	20	[(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>	271.06012 (70)	a,b	Gu <i>et al.</i> (2012)
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	229.04935 (7)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	163.03894 (3)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01825 (8)		
10	Flavona	Apigenina-hexósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	433.11292	433.11287	0.11	30	[(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>	271.06012 (100)	a,b	Lin <i>et al.</i> (2007)
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	253.04997 (2)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	243.06558 (6)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01848 (15)		
								[(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>5</sub> O <sub>2</sub>	121.02852 (1)		

Tabla 19. Continuación

11	Chalcona	Phloridzina	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	437.14422	437.14386	0.82	10	[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub>	275.09131 (18)	a,b	Lin <i>et al.</i> (2007)
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub>	257.08081 (5)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	169.04961 (6)		
12	Flavanona	Eriodictiol	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	289.07121	289.07105	0.57	20	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	271.05969 (4)	a,b,c	Lin <i>et al.</i> (2007); Leitão <i>et al.</i> (2017)
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	243.05995 (0.3)		
								[(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>	179.03374 (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>7</sub> O <sub>3</sub>	163.03882 (100)		
13	Flavonol	Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	303.05047	303.05044	0.12	20	[(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>	153.01810 (81)	a,b,c	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>6</sub>	285.03787 (1)		
								[(M+H)-2CO] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	247.06012 (1)		
14	Flavona	Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	287.05556	287.05529	0.92	30	[(M+H)-H <sub>2</sub> O-2CO] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	229.04951 (1)	a,b,c	Lin <i>et al.</i> (2007)
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01836 (8)		
								[(M+H)-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	245.04393 (1)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179.03409 (1)		
15	Flavanona	Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	273.07629	273.07621	0.28	20	[(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>	153.01822 (42)	a,b,c	Lin <i>et al.</i> (2007); Leitão <i>et al.</i> (2017)
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	137.02327 (12)		
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	255.06464 (1)		
								[(M+H)-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	231.06487 (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>	153.01810 (100)		
[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179.03371 (1)										
[(M+H)-3C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	147.04393 (65)										

Tabla 19. Continuación

16	Flavanona	Hesperetina	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	303.08631	303.08620	0.35	20	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	285.07529 (1)	a,b	Madeiros <i>et al.</i> (2014)
								[(M+H)-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	261.07568 (1)		
								[(M+H)-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179.03389 (1)		
								[(M+H)-C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01828 (100)		
17	Flavanona	Pinobanksin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	273.07629	273.07621	0.28	10	[(M+H)-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	151.07553 (1)	a,b	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>4</sub>	255.06499 (12)		
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	227.07016 (30)		
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O-2CO] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	199.07542 (5)		
18	Flavona	Crisoeriol	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	301.07066	301.07036	0.99	30	[(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>	153.01822 (18)	a,b	Lin <i>et al.</i> (2007)
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.04718 (100)		
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	258.05222 (1)		
								[(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>	153.01855 (4)		
19	Flavona	Apigenina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	271.06064	271.06042	0.82	40	[(M+H)-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	149.05977 (1)	a,b,c	Stashenko <i>et al.</i> (2013)
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O	119.04939 (1)		
								[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	253.04997 (1)		
								[(M+H)-CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	243.06558 (6)		
20	Flavona	Flavona dimetilada	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	331.08123	331.08106	0.50	20	[(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>	153.01836 (100)	a,b	Cortés <i>et al.</i> (2021)
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	121.02830 (1)		
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	316.05801 (12)		
								[(M+H)-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	301.07095 (16)		
								[(M+H)-2CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	273.07587 (2)		
								[(M+H)-C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01845 (7)		

Tabla 19. Continuación

21	Flavona	Flavona dimetilada	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	331.08123	331.08097	0.80	20	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	316.05795 (11)	a,b	Leyva <i>et al.</i> (2016)
								[(M+H)-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	301.003436 (14)		
								[(M+H)-2CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	273.04022 (1)		
								[(M+H)-C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01839 (5)		
22	Flavona	Cirsimaritina	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	315.08631	315.08605	0.83	30	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	300.06265 (19)	a,b	Cortés <i>et al.</i> (2021)
								[(M+H)-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	285.03961 (1)		
								[(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>	282.05215 (94)		
								[(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>	254.05727 (100)		
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-2CO] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	226.06232 (6)		
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	197.04445 (1)		
23	Flavanona	Sakuranetina	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	287.09140	287.09132	0.28	20	[(M+H)-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub>	245.08090 (1)	a,b	Lin <i>et al.</i> (2007)
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	193.04971 (1)		
								[(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>	167.03386 (50)		
								[(M+H)-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	147.04402 (36)		
24	Flavanona	Pinocebrina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	257.08138	257.08132	0.20	20	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	239.06998 (1)	a,b,c	Lin <i>et al.</i> (2007) Leitão <i>et al.</i> (2017)
								[(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>	215.07010 (3)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179.03415 (3)		
								[(M+H)-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01816 (100)		
								[(M+H)-3C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O	131.04918 (67)		
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330.07339 (12)		
25	Flavona	Tricetina trimetilada	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	345.09687	345.09659	0.80	30	[(M+H)-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	315.05063 (10)	a,b	Lin <i>et al.</i> (2007)
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312.06262 (18)		
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284.06769 (20)		
								[(M+H)-C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.01817 (44)		

Tabla 19. Continuación

26	Flavonol	Galangina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	271.06064	271.06051	0.49	30	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	253.04956 (10)	a,b,c	Lin <i>et al.</i> (2007)
								[(M+H)-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	229.04935 (8)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	163.03894 (5)		
								[(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>	153.01825 (26)		
								[(M+H)-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	145.02840 (1)		
27	Flavonol	Galangina metilada	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	285.07575	285.07563	0.42	30	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.05219 (100)	a,b	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>	242.05734 (23)		
								[(M+H)-CH <sub>3</sub> -CO-HCO] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	213.05461 (7)		
								[(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>	153.01830 (35)		
28	Flavona	Apigenina metilada	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	285.07575	285.07687	0.37	30	[(M+H)-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.05219 (90)	a,b	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>	242.05734 (23)		
								[(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>	153.01848 (30)		

<sup>a</sup> Identificación tentativa basada en moléculas protonadas [M+H]<sup>+</sup>, reportados en la literatura para el género *Lippia* spp. (Lin *et al.*, 2007; Madeiros *et al.*, 2014; Leitão *et al.*, 2017; Cortés *et al.*, 2021).

<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en el estudio del patrón de fragmentación (ESI<sup>+</sup> -HRMS) y consulta con lo reportado en artículos científicos y base de datos espectrales, (METLIN<sup>TM</sup>, <http://metlin.scripps.edu/>) y fitoquímica (PCIDB, <http://www.genome.jp/db/pcodb>).

<sup>c</sup> Identificación confirmatoria basada en espectros de masas (ESI<sup>+</sup> -HRMS) y por comparación con espectros de masas y t<sub>R</sub> de sustancias de referencia certificadas.

### 4.1.3 *Patrones de fragmentación de flavonoides en los espectros de masas, obtenidos por ESI<sup>+</sup>-Orbitrap*

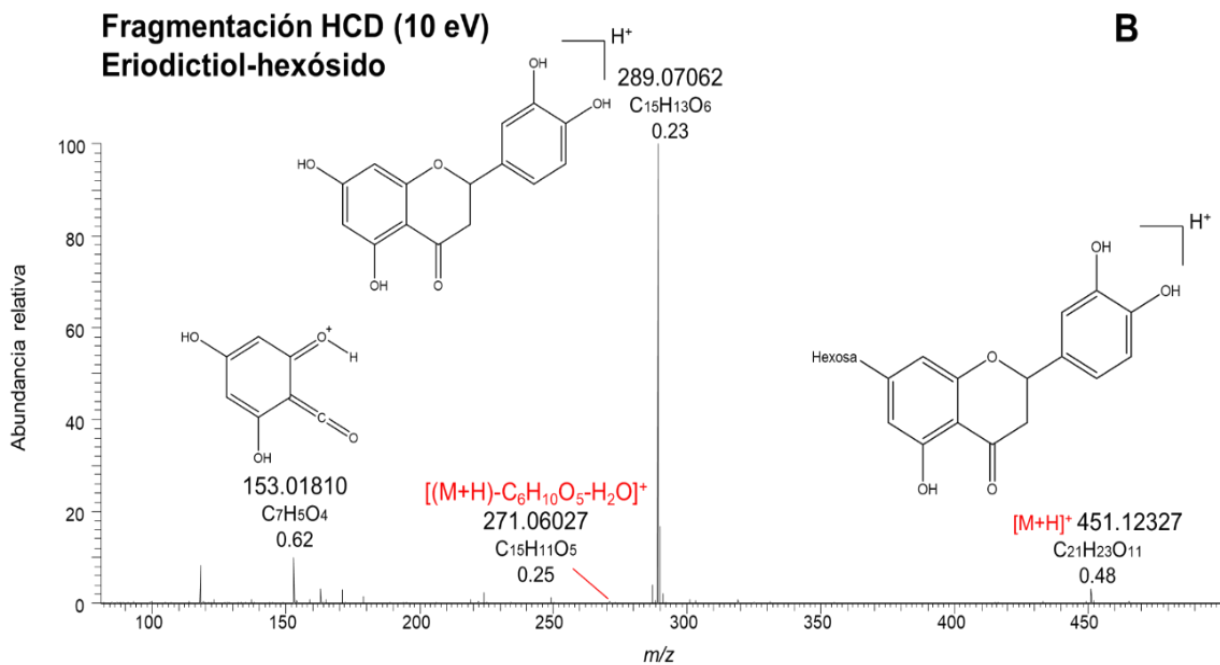
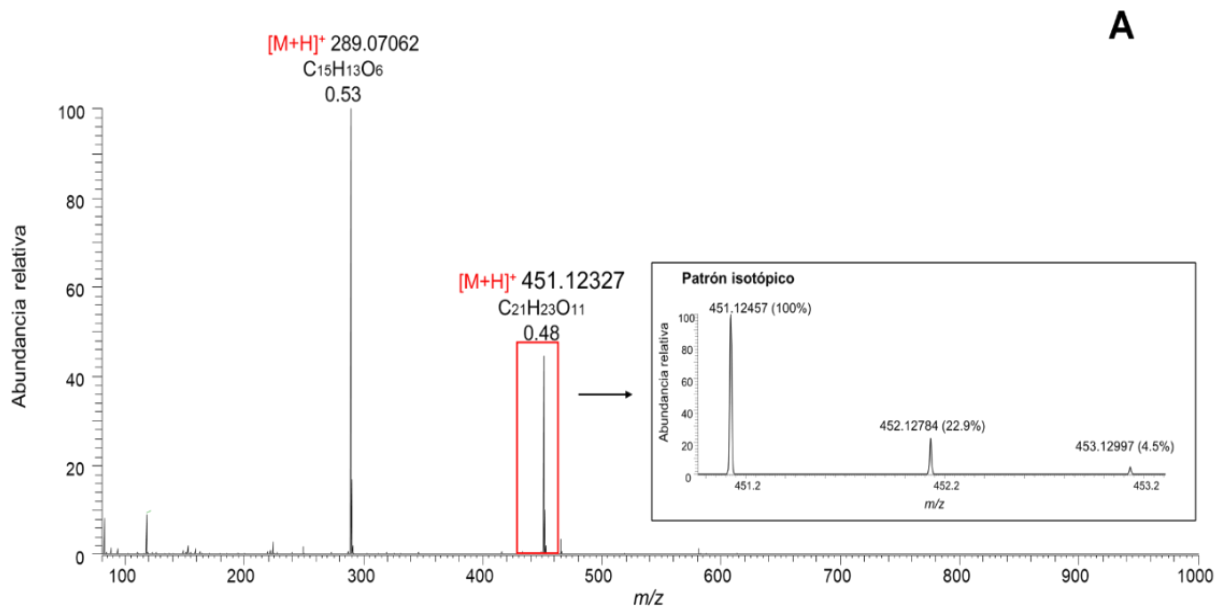
El análisis por LC/MS (*Orbitrap*), permitió identificar flavonoides en las matrices vegetales estudiadas, ellos se clasificaron en antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanonas entre otros; la medición de masas se llevó a cabo con exactitud  $\Delta\text{ppm} < 1.1$ . El patrón isotópico para los iones  $[M]^+$  o las moléculas protonadas  $[M+H]^+$  fue similar al patrón isotópico calculado a partir de *enviPat Web 2.4*. (Véase **Figura 16**).

El análisis de espectros, obtenidos con diferentes energías en la cámara de colisiones activadas, a 10, 20, 30 y 40 eV, permitió observar los patrones de fragmentación característicos para flavonoides, que incluyen la pérdida de moléculas neutras como hexosas ( $C_6H_{10}O_5$ ), hexúronidos ( $C_6H_8O_6$ ), moléculas de  $H_2O$ ,  $CO$  y  $C_2H_2O$ , además de la ruptura del anillo C. A continuación, se muestran los fragmentos característicos para las principales familias de flavonoides detectados en las matrices vegetales estudiadas.

En los espectros de masas (HCD, 20 eV) de las antocianinas detectadas únicamente en algunos cultivares de *H. rosa-sinensis*, se observaron tres fragmentos característicos (**Tabla 20**). El fragmento más abundante  $\Phi_1$  en  $m/z$  287.05515 (100%) correspondió a la aglicona de cianidina, que se obtuvo por la pérdida de los respectivos azúcares. Los fragmentos  $\Phi_2$  y  $\Phi_3$  fueron generados por las rupturas de los enlaces C(9)-O(1) y C(2)-C(3), C(9)-O(1) y C(3)-C(4) del catión pirilio, respectivamente. Barnes y Schug, (2011), reportaron estos mismos fragmentos para la cianidina-3,5-glucósido.

**Figura 16.**

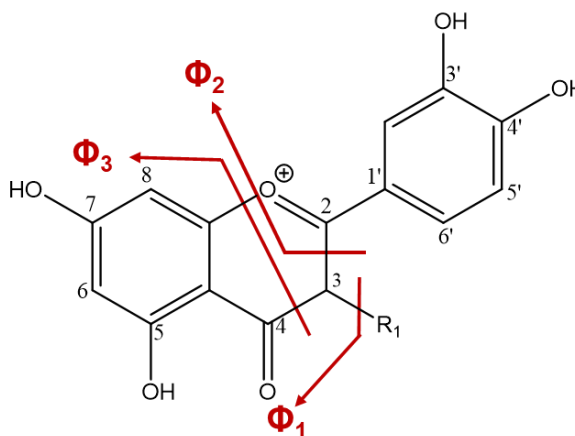
*Espectros de masas, obtenidos por ESI<sup>+</sup>-Orbitrap. A. Relación isotópica del ion [M+H]<sup>+</sup> en m/z 451.12327 de eriodictiol-hexósido, adquirido en modo full scan. B. Fragmentos típicos en el espectro de masas del eriodictiol-hexósido.*



**Tabla 20.**

*Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) en los espectros de masas de las antocianinas, encontradas en los extractos hidro-alcohólicos de algunos cultivares de H. rosa-sinensis.*

## Antocianinas



Compuesto	R <sub>1</sub>	HCD, eV	Iones fragmento, m/z (I,%)			
			[M] <sup>+</sup>	Φ <sub>1</sub>	Φ <sub>2</sub>	Φ <sub>3</sub>
Cianidina-soforósido	2C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	20	611.16066	287.05493 (100)	137.02336 (3)	121.02866 (1)
Cianidina-sambubiósido	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	20	581.15009	287.05508 (100)	137.02339 (66)	121.02854 (1)
Cianidina-3-glucósido	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	20	449.10784	287.05515 (100)	137.02344(25)	121.02853 (1)

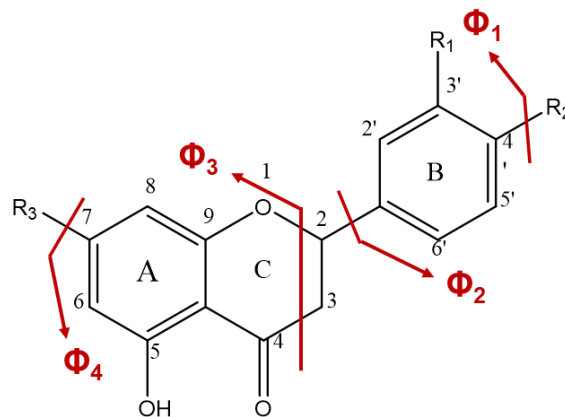
En los cultivares de *H. rosa-sinensis* solo se detectó la flavanona naringenina-hexurónido, mientras que en los extractos obtenidos de la biomasa residual de *L. origanoides*, se detectaron pinocembrina, naringenina, hesperetina, sakuranetina, eriodictiol y algunos de sus derivados glicosilados. En los espectros de masas de las flavanonas (**Tabla 21**) aparecen cuatro fragmentos característicos, sin embargo, solo  $\Phi_1$  y  $\Phi_4$  se detectaron para los compuestos glicosilados, como la naringenina-hexurónido y los derivados hexósido y desohexósido del eriodictiol.

Otra característica particular para las flavanonas fue la pérdida del anillo B, conducente a la formación del ion  $\Phi_2$  en  $m/z$  179.03374, con intensidades relativamente bajas (1% - 9%). El fragmento más abundante fue  $\Phi_3$  en  $m/z$  153.01810 (80% - 100%) para las agliconas naringenina, pinocembrina, eriodictiol y hesperetina, sin embargo, para la sakuranetina, que tiene un grupo  $-OCH_3$  en la posición siete, el ion se registró  $\Phi_3$   $m/z$  167.03386 (50%). En los espectros de masas de las flavanonas se registró también la pérdida de agua  $[M+H-H_2O]^+$  (Véase **Tabla 19**). Las flavanonas glicosiladas experimentaron la pérdida de agua después de la pérdida del respectivo glicósido; se obtuvieron los siguientes iones característicos: eriodictiol  $[M+H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^+$  ( $C_{15}H_{11}O_5^+$ ,  $m/z$  271.05969), naringenina  $[M+H-C_6H_8O_6-H_2O]^+$  ( $C_{15}H_{11}O_4^+$ ,  $m/z$  255.06464), hesperetina  $[M+H-H_2O]^+$  ( $C_{16}H_{13}O_5^+$ ,  $m/z$  285.07529) y pinocembrina  $[M+H-H_2O]^+$  ( $C_{15}H_{11}O_3^+$ ,  $m/z$  239.06998). Tsimogiannis *et al.* (2007) reportaron también los fragmentos  $\Phi_2$  y  $\Phi_3$  en los espectros de masas del eriodictiol y la hesperetina.

**Tabla 21.**

*Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) de los iones característicos en los espectros de masas para las flavanonas encontradas en los extractos obtenidos de la biomasa residual de L. origanoides o de flores de H. rosa-sinensis.*

## Flavanonas



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	HCD, eV	Iones fragmento, m/z (I,%)				
					[M+H] <sup>+</sup>	Φ <sub>1</sub>	Φ <sub>2</sub>	Φ <sub>3</sub>	Φ <sub>4</sub>
Naringenina	H	OH	OH	20	273.07629	-	179.03371 (1)	153.01810 (100)	-
Naringenina-hexúronido	O	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	OH	20	449,10784	273.07559(100)	179.03365 (1)	153.01829 (3)	-
Pinocembrina	H	H	OH	20	257.08138	-	179.03415 (3)	153.01816 (100)	-
Eriodictiol	OH	OH	OH	20	289.07121	-	179.03374 (9)	153.01810 (81)	-
Eriodictiol-hexósido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	10	451.12349	-	-	153.01810 (7)	289.07062 (100)
Eriodictiol-desoxihexósido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	30	435.12857	-	-	153.01846 (15)	289.07086 (23)
Hesperetina	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	20	303.08631	-	179.03389 (1)	153.01828 (100)	-
Sakuranetina	H	OH	OCH <sub>3</sub>	10	287.09140	-	-	167.03386 (50)	-

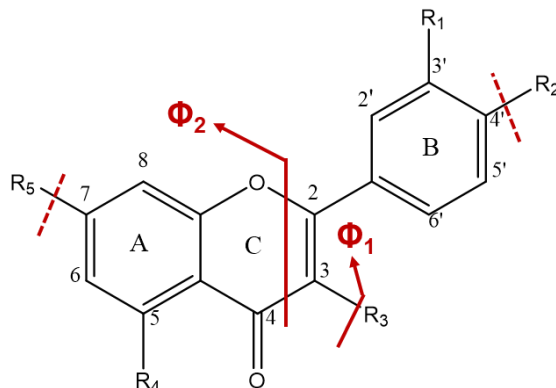
En los cultivares de *H. rosa-sinensis* se detectaron principalmente flavonoles, como la quercetina, el kaempferol y sus derivados glicosilados (**Tabla 22**). En los extractos de los tres quimiotipos *L. origanoides*, también, se detectaron quercetina y quercetina-3-glucósido, sin embargo, solo en el extracto aislado del quimiotipo Felandreno se detectó el flavonol galangina y sus derivaos metilados y glicosilados.

En los espectros de masas de los flavonoles, el fragmento  $\Phi_1$  se produjo por la pérdida del grupo sustituyente  $R_3$ , que, según los diferentes compuestos identificados pueden ser hexosa ( $C_6H_{10}O_5$ ,  $m/z$  162.05227); desoxihexosa ( $C_6H_{10}O_4$ ,  $m/z$  146.05736) y hexúronido ( $C_6H_8O_6$ ,  $m/z$  176.03153). Dentro del grupo de compuestos identificados, se detectaron flavonoles diglicosilados y triglicosilados, que también pueden tener grupos sustituyentes  $R_2$  y  $R_5$ , los cuales, al fragmentarse, pierden moléculas neutras de azúcares, generando las respectivas agliconas. Los flavonoles presentaron una ruptura tipo Retro Diels-Alder en el anillo C, generando el fragmento  $\Phi_2$  en  $m/z$  153.01836 (Tsimogiannis *et al.*, 2007; Leitão *et al.*, 2017).

**Tabla 22.**

*Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) de los iones característicos en los espectros de masas de los flavonoles encontrados en los extractos obtenidos de la biomasa residual de L. organoides o de flores de H. rosa-sinensis.*

## 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 fragmento, m/z (I,%)				
							[M+H] <sup>+</sup>	Φ <sub>1</sub>	[(M+H)-R <sub>2</sub> -R <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	[(M+H)-R <sub>3</sub> -R <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	Φ <sub>2</sub>
Quercetina-hexurónido-hexósido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	20	641.13484	479.08209 (100)	-	303.04999 (50)	153.01836 (1)
Quercetina-trihexósido	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	20	789.20840	627.15594 (3)	465.10339 (50)	-	153.01836 (15)
Quercetina-dihexósido	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	20	627.15613	-	303.04990 (100)	-	153.01819 (1)
Quercetina-hexurónido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	OH	OH	20	479.08201	303.04968 (100)	-	-	153.01825 (1)
Quercetina-3-glucósido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	OH	10	465.10275	303.05005 (100)	-	-	153.01799 (1)
Quercetina	OH	OH	OH	OH	OH	30	303.04992	-	-	-	153.01836 (42)
Kaempferol-hexurónido-hexósido	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	20	625.13992	463.08743 (100)	-	287.05490 (45)	153.01833 (1)
Kaempferol-desoxihexósido-hexósido	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	10	595.16574	433.11310 (100)	-	287.05502 (20)	153.01822 (1)
Kaempferol-dihexósido	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	10	611.16066	449.10754 (20)	-	287.05508 (100)	153.01814 (1)
Kaempferol-desoxihexósido	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	OH	OH	10	433.11292	287.05508 (100)	-	-	153.01820 (1)
Kaempferol-hexurónido	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	OH	OH	20	463.08670	287.05490 (45)	-	-	153.01833 (1)
Kaempferol-3-glucósido	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	OH	10	449.10784	287.05566 (100)	-	-	153.01813 (1)

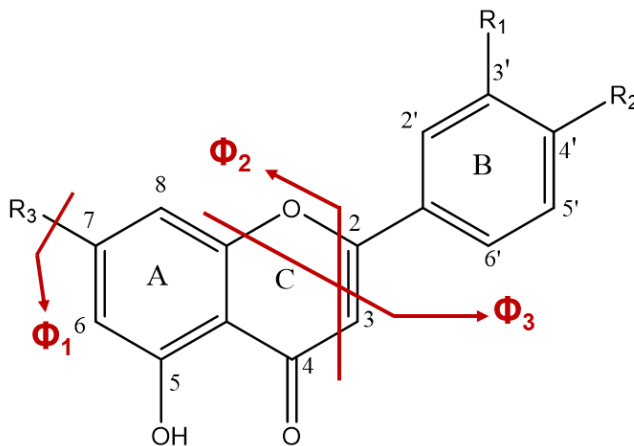
Otra familia de compuestos, detectados principalmente en los extractos de *L. origanoides*, fueron las flavonas (**Tabla 23**), entre las cuales se encontraron apigenina, luteolina y derivados glicosilados. En los espectros de masas de las flavonas, aparecen los iones producto de la pérdida de la molécula de hexosa, acompañada de la aparición de un fragmento  $\Phi_1$   $[M+H-hexosa]^+$  en  $m/z$  271.06012 ( $C_{15}H_{10}O_5^+$ , 100%), para la apigenina, y  $\Phi_1$   $[M+H-hexosa]^+$  en  $m/z$  287.05515 ( $C_{15}H_{10}O_6^+$ , 100%), para la luteolina.

Para las flavonas, se detectaron, adicionalmente, los fragmentos  $\Phi_2$  en  $m/z$  153.01810 ( $C_7H_5O_4^+$ , 9% - 100%) y  $\Phi_3$  en  $m/z$  121.02830 ( $C_7H_5O_2^+$ , 1%), para la apigenina y  $\Phi_3$  en  $m/z$  137.02327 ( $C_7H_5O_3^+$ , 12%), para la luteolina; estos fragmentos fueron productos de la ruptura del anillo C y, también, se habían reportado por varios autores (Lin *et al.*, 2007; Tsimogiannis *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007; Leitão *et al.*, 2017).

**Tabla 23.**

*Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) de los iones característicos en los espectros de masas de las flavonas encontradas en los extractos obtenidos de la biomasa residual de L. organoides o de flores de H. rosa-sinensis.*

## Flavonas



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	HCD, eV	Iones fragmento, m/z (I,%)			
					[M+H] <sup>+</sup>	Φ <sub>1</sub>	Φ <sub>2</sub>	Φ <sub>3</sub>
Apigenina	H	OH	OH	40	271.06064	-	153.01836 (100)	121.02830 (1)
Apigenina-hexósido	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	30	433.11292	271.06012 (100)	153.01848 (15)	121.02852 (1)
Luteolina	OH	OH	OH	30	287.05556	-	153.01822 (42)	137.02327 (12)
Luteolina-hexósido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	20	449.10839	287.05515 (100)	153.01837 (27)	137.02220 (1)
Luteolina-desoxihexósido-hexósido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup> C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	10	595.16575	287.05530 (100)	153.01832 (9)	137.02325 (1)

### 5.4.5 Repetibilidad en las áreas cromatográficas y tiempos de retención de sustancias de referencia.

En la **Tabla 24**, se reportan las repetibilidades de los tiempos de retención, y las áreas cromatográficas obtenidas para los flavonoides, analizados por UPLC-ESI-Orbitrap-MS. Las inyecciones de las soluciones se realizaron por triplicado, por LC/MS, bajo las mismas condiciones, reportadas en la **Sección 4.4.2** de este manuscrito.

**Tabla 24.**

*Repetibilidad de tiempos de retención ( $t_R$ ) y de áreas cromatográficas de sustancias de referencia de flavonoides, analizados por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS.*

Nº Fig. 17	Compuesto	Fórmula	Masa experimental	$t_{R\pm s}$ , min <sup>a</sup>	CV, % <sup>b</sup>	Área $\pm s$ , cuentas x 10 <sup>6</sup>	CV, % <sup>b</sup>
1	Catequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	291.08636	3.5 $\pm$ 0.01	0.2	160 $\pm$ 13.3	8.2
2	Cianidina-3- glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.10818	3.5 $\pm$ 0.01	0.4	169 $\pm$ 0.8	0.5
3	Epicatequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	291.08626	3.7 $\pm$ 0.01	0.2	190 $\pm$ 9.8	5.2
4	Quercetina-3- glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	465.10300	4.2 $\pm$ 0.01	0.3	128 $\pm$ 1.2	0.2
5	Kaempferol- glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449.10809	4.4 $\pm$ 0.01	0.2	210 $\pm$ 15.0	7.3
6	Eriodictiol	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	289.07066	5.0 $\pm$ 0.01	0.1	470 $\pm$ 24.1	5.1
7	Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	287.05501	5.1 $\pm$ 0.01	0.3	820 $\pm$ 31.6	3.9
8	Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	303.04992	5.1 $\pm$ 0.01	0.3	330 $\pm$ 16.2	4.9
9	Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	273.07569	5.4 $\pm$ 0.01	0.3	620 $\pm$ 27.0	4.3
10	Apigenina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	271.06003	5.5 $\pm$ 0.01	0.1	1920 $\pm$ 10.4	0.5
11	Pinocembrina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	257.08083	6.3 $\pm$ 0.01	0.1	1550 $\pm$ 58.8	3.8

<sup>a</sup> Promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ), material de referencia (10 mg/L).

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

Según los resultados de la **Tabla 24**, los coeficientes de variación para los tiempos de retención de las sustancias analizadas estuvieron entre 0.1% y 0.4%, y para las áreas cromatográficas entre 0.2% y 8.2%. Los resultados obtenidos de la repetibilidad de estos dos parámetros analíticos están dentro de los rangos aceptados para tiempos de retención (2%) y para áreas cromatográficas (10%), según las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP, por sus siglas en inglés) (ISO 8466-1:1990).

La **Tabla 25**, contiene los resultados obtenidos para la linealidad, sensibilidad, el nivel mínimo de detección (NMD), y el nivel mínimo de cuantificación (NMC) del método empleado para cuantificar flavonoides en las matrices bajo estudio por UPLC-ESI-*Orbitrap*-MS. El rango lineal para las sustancias analizadas varió desde 0.1 mg/L a 10 mg/L, solo para el kaempferol-3-glucósido el rango fue de 1 mg/L a 10 mg/L; el NMD varió desde 0.03 mg/L a 0.1 mg/L y el NMC estuvo en el rango de 0.1 mg/L a 0.22 mg/L. El coeficiente de determinación para todos los flavonoides fue  $R^2 > 0.99$ , que muestra la linealidad del método empleado en el rango de las concentraciones evaluadas para las respectivas sustancias.

**Tabla 25.**

*Linealidad y sensibilidad determinadas para sustancias de referencia de flavonoides, analizados por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS.*

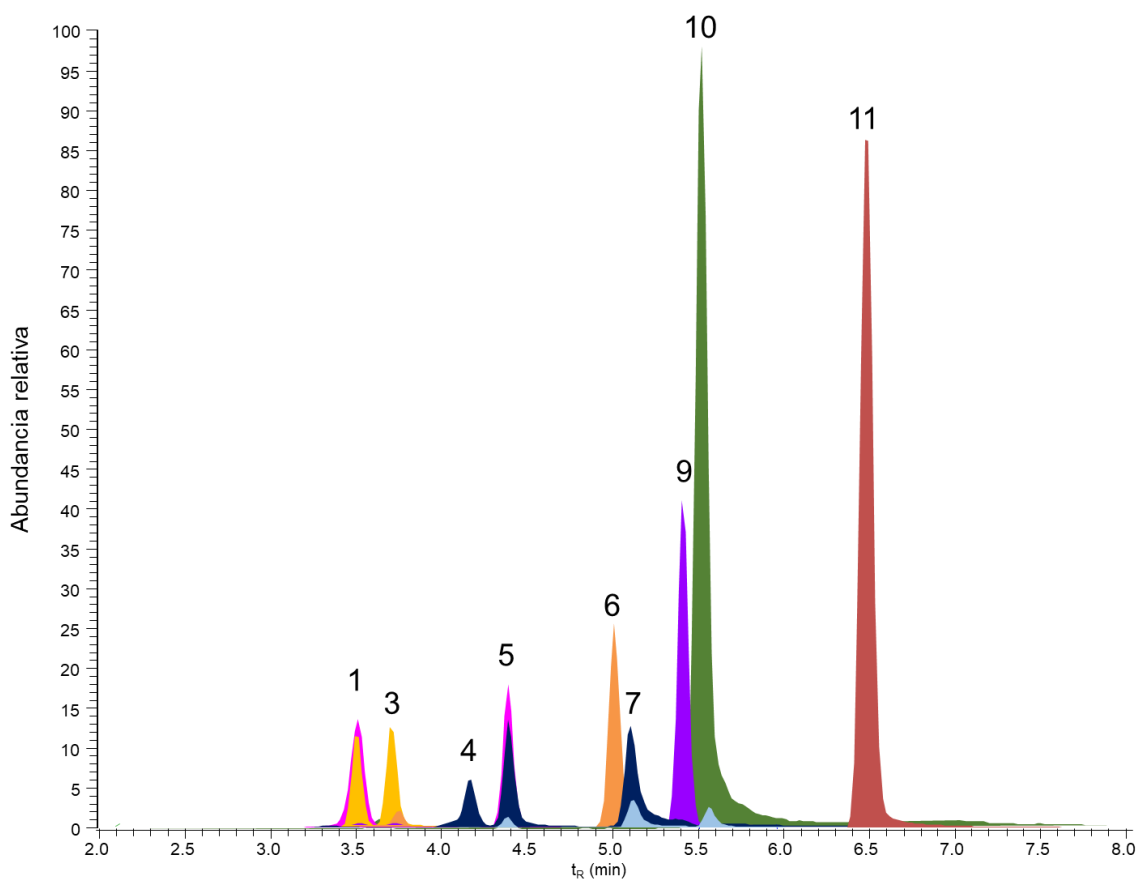
Nº Fig. 17	Compuesto	Rango, mg/L	Ecuación <sup>a</sup>	Sm <sup>b</sup>	R <sup>2</sup>	[mg/L]	
						NMD	NMC
1	Catequina	0.5-10	$y = 16119x + 2 \times 10^6$	273	0.9989	0.05	0.15
2	Cianidina-3-glucósido	0.1-10	$y = 16965x + 581235$	184	0.9994	0.03	0.1
3	Epicatequina	0.1-10	$y = 18937x + 4 \times 10^6$	540	0.9959	0.04	0.12
4	Quercetina-3-glucósido	0.5-10	$y = 13120x - 920324$	321	0.9982	0.04	0.13
5	Kaempferol-glucósido	1.0-10	$y = 21296x - 4 \times 10^6$	460	0.9986	0.1	0.3
6	Eriodictiol	0.5-10	$y = 46792x + 1 \times 10^7$	1539	0.9968	0.03	0.1
7	Luteolina	0.5-10	$y = 81744x - 3 \times 10^6$	759	0.9997	0.04	0.14
8	Quercetina	0.5-10	$y = 33417x + 4 \times 10^6$	693	0.9983	0.07	0.22
9	Naringenina	0.1-10	$y = 62966x + 1 \times 10^7$	1738	0.9962	0.03	0.1
10	Apigenina	0.5-10	$y = 198312x + 9 \times 10^7$	8855	0.9921	0.1	0.3
11	Pinocembrina	0.5-10	$y = 152266x + 3 \times 10^7$	1585	0.9995	0.04	0.14

<sup>a</sup> Curvas de calibración realizadas por el método de estándar externo.

<sup>b</sup> Sm: desviación estándar de la pendiente.

**Figura 17.**

*Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por UHPLC-ESI<sup>+</sup>-Orbitrap-MS, de iones [M]<sup>+</sup> o moléculas protonadas [M+H]<sup>+</sup> de las sustancias de referencia de flavonoides. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 24**.*



#### 5.4.5 Composición de flavonoides en extractos de flores de *H. rosa-sinensis* y *L. origanoides*.

El contenido de flavonoides en las matrices estudiadas se determinó por LC/MS, usando a través de los métodos de estándar interno y calibración externa, tal como se indica en la **Sección 4.4.2.1**. En los extractos de flores de *H. rosa-sinensis*, los resultados se expresaron en equivalentes de cianidina-3-glucósido, para las antocianinas, y como equivalente de quercetina-3-glucósido y de kampferol-3-glucósido, para el resto de las sustancias, excepto para la catequina y epicatequina. En los extractos de *L. origanoides*, los resultados se expresaron como equivalentes de kaempferol para las sustancias de las cuales no se disponían patrones de referencia. Las áreas cromatográficas de los flavonoides se obtuvieron a partir de la corriente iónica total con la masa exacta de iones  $[M]^+$  o moléculas protonadas  $[M+H]^+$ . Las ecuaciones de las diferentes curvas de calibración se reportan en la **Tabla 25**.

En la **Tabla 26**, se reporta el contenido de compuestos fenólicos (mg/g) presentes en extractos obtenidos con solvente y con CO<sub>2</sub> supercrítico de material vegetal de *L. origanoides* sin destilar y después de su destilación. Al comparar la composición química de los extractos, las diferencias fueron notables. Aun cuando, en la extracción SFE se usó alta presión y etanol como modificador de la polaridad del fluido supercrítico, estas condiciones solo favorecieron a la extracción principalmente de agliconas (Rajaei *et al.*, 2005; Stashenko *et al.*, 2013; Wigfield *et al.*, 1996), mientras que, en la extracción con alcohol-agua fue posible aislar y detectar adicionalmente nueve derivados glicosilados.

Las flavanonas fueron los compuestos mayoritarios detectados en los extractos de los tres quimiotipos de *L. origanoides* estudiados. Al comparar las cantidades de los diferentes compuestos presentes en los extractos obtenidos tanto de material vegetal sin destilar como de biomasa residual, se observaron cambios sustanciales en la composición de flavonoides. En la mayoría de los casos hubo una clara disminución en la concentración de estos compuestos, independientemente de la técnica de extracción usada, que se asoció a una posible degradación térmica o enzimática que pudieron sufrir algunos compuestos fenólicos después del proceso de destilación y secado (Kyi *et al.*, 2005; Chaaban *et al.*, 2017).

Durante el proceso de destilación, el material vegetal de *L. origanoides* estuvo expuesto por casi alrededor de 1,5 h al vapor sobrecalentado (>100 °C), posteriormente, la biomasa residual se secó al sol durante una semana. Durante este proceso, según Kyi *et al.* (2005), se inician reacciones enzimáticas. El material seco luego fue molido, en esta última etapa, durante la molienda, también, fue posible alcanzar temperaturas altas debido a la fricción del material vegetal (Jewiarz *et al.*, 2020). Todos estos factores influyen significativamente sobre la estabilidad de los flavonoides, como lo han reportado Sólyom *et al.* (2014) y Chaaban *et al.* (2017).



BÚSQUEDA DE COMPUESTOS ACTIVOS PARA COSMÉTICOS

132

12	Eriodictiol	12.0±2.0	12.3±2.0	12.0±2.0	4.5±0.03	8.5±0.54	4.4±0.05	5.1±0.04	4.9±0.1	5.6±0.2	4.9±0.2	2.9±0.1	0.44±0.1
13	Quercetina	7.2±0.5	6.4±0.50	1.6±0.30	1.5±0.10	0.6±0.06	1.6±0.06	< NMD	< NMD	0.08±0.02	1.0±0.07	0.06±0.03	0.16±0.01
14	Luteolina	3.3±0.15	2.4±0.10	2.7±0.30	1.1±0.05	3.3±0.23	2.4±0.05	0.42±0.02	0.43±0.07	0.39±0.01	0.46±0.07	0.06±0.01	0.06±0.01
15	Naringenina	53±2.0	5±0.2	28.0±3.0	1.4±0.05	2.7±0.08	0.5±0.07	15.3±1.14	4.4±0.1	7.0±0.7	4.6±0.2	0.8±0.1	1.06±0.05
16	Hesperetina <sup>1</sup>	1.6±0.1	0.5±0.02	2.3±0.1	0.17±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	1.84±0.03	1.72±0.08	1.3±0.1	0.77±0.01	0.17±0.02	0.06±0.01
17	Pinobanksina <sup>1</sup>	< NMD	< NMD	< NMD	< NMD	3±0.2	< NMD	< NMD	< NMD	< NMD	< NMD	0.63±0.04	< NMD
18	Crisoeriol <sup>1</sup>	4.9±0.2	1.8±0.07	7.2±0.5	0.70±0.04	0.2±0.01	0.2±0.01	3.5±0.15	2.3±0.1	3.0±0.1	1.3±0.1	0.18±0.01	0.04±0.01
19	Apigenina	2.9±0.19	0.3±0.01	1.44±0.01	0.13±0.01	< NMD	< NMD	0.44±0.04	0.13±0.02	0.17±0.01	0.14±0.01	< NMD	< NMD
20	Flavona dimetilada <sup>1</sup>	0.5±0.1	0.3±0.02	1.1±0.05	0.1±0.04	< NMD	< NMD	1.04±0.08	0.75±0.02	0.64±0.06	0.23±0.01	0.08±0.01	0.06±0.01
21	Flavona dimetilada <sup>1</sup>	0.26±0.02	< NMD	< NMD	< NMD	0.1±0.01	0.1±0.01	< NMD	< NMD	< NMD	0.03±0.01	0.03±0.01	< NMD
22	Cirsimaritina <sup>1</sup>	4.8±0.2	2.2±0.11	4.9±0.1	0.9±0.04	0.7±0.07	0.2±0.01	5.0±0.21	3.5±0.1	5.0±0.4	2.34±0.04	0.5±0.03	0.05±0.01
23	Sakuranetina <sup>1</sup>	2.2±0.2	0.7±0.03	0.81±0.07	0.32±0.02	0.5±0.05	0.1±0.01	3.28±0.21	4.0±0.2	3.5±0.2	3.1±0.29	2.11±0.13	1.42±0.08
24	Pinocembrina	3.8±0.04	0.13±0.006	0.35±0.01	0.03±0.01	25±0.6	5.5±0.18	1.8±0.04	2.0±0.1	0.4±0.04	0.67±0.04	56.1±1.4	48.3±1.0
25	Tricetina trimetilada <sup>1</sup>	0.12±0.01	0.05±0.001	0.1±0.01	0.03±0.001	0.2±0.01	0.1±0.001	0.30±0.02	0.17±0.02	0.1±0.02	0.06±0.01	0.13±0.01	< NMD
26	Galangin <sup>1</sup>	< NMD	< NMD	< NMD	< NMD	16±0.1	2.3±0.08	< NMD	< NMD	< NMD	< NMD	20±1.0	7.2±0.2
27	Galangina metilada <sup>1</sup>	< NMD	< NMD	< NMD	< NMD	1.1±0.02	0.7±0.07	< NMD	< NMD	< NMD	< NMD	4.3±0.3	4.1±0.2
28	Apigenina metilada <sup>1</sup>	0.1±0.02	0.07±0.04	0.04±0.01	0.03±0.01	< NMD	< NMD	0.85±0.04	0.66±0.05	0.20±0.02	0.15±0.02	< NMD	< NMD

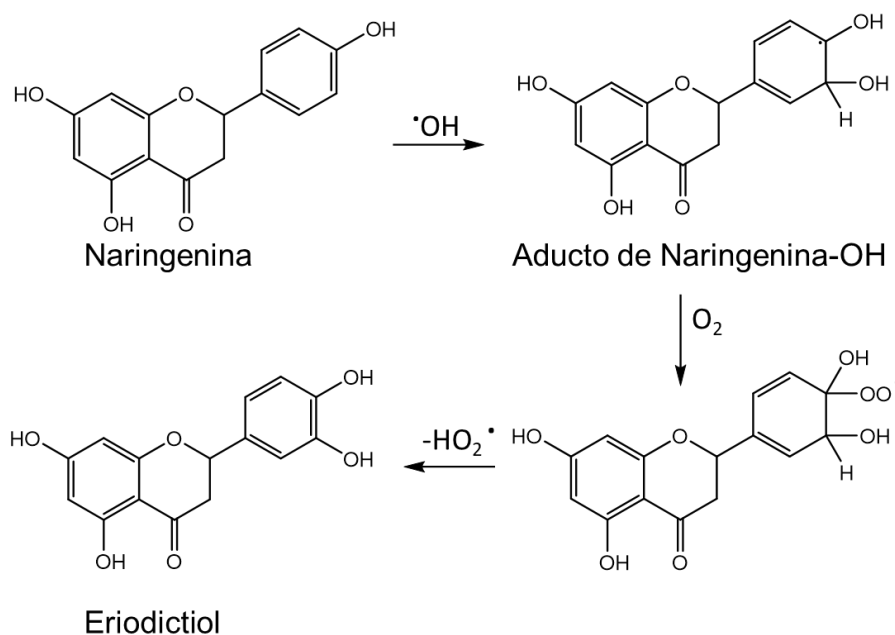
<sup>1</sup> Cantidad expresada como equivalentes de kaempferol.

Las temperaturas altas tienen un efecto negativo sobre la estabilidad de los flavonoides y su actividad biológica, y, según Según Chaaban *et al.* (2017), los flavonoides glicosilados son compuestos más resistentes al tratamiento térmico que los flavonoides-aglicona. En esta investigación, se corroboró que los flavonoides glicosilados fueron los compuestos que presentaron menor degradación en comparación con las agliconas, lo que está relacionado con la estructura y sus diferentes sustituyentes glicosídicos (Chaaban *et al.*, 2017). La enzima  $\beta$ -glucosidasa es responsable de la hidrólisis catalítica de azúcares en flavonoides glicosilados para producir las diferentes agliconas, como en el caso de las antocianidinas que son altamente inestables y se oxidan fácilmente en presencia de polifenol oxidasa o peroxidasa generando productos que ya no poseen la misma actividad biológica que sus precursores (Zhang *et al.*, 2005).

De los compuestos analizados, la flavanona naringenina fue la aglicona que más se degradó, su concentración en los extractos hidro-alcohólicos disminuyó al menos de cinco a veinte veces. Dentro del grupo de flavanonas identificadas, el eriodictiol no presentó una aparente degradación, sin embargo, este compuesto es un producto de oxidación de la naringenina (Véase **Figura 18**) (Nagy *et al.*, 2008), con esto fue posible, explicar por qué las concentraciones de eriodictiol no se vieron afectadas después del proceso de destilación. Posiblemente, en la medida que la naringenina se degradaba, se producía eriodictiol, en cantidades que compensaron al eriodictiol que ya se había degradado. Tanto la naringenina como el eriodictiol habían sido reportados previamente por, Lin *et al.* (2007), de Oliveira *et al.* (2013), Medeiros *et al.* (2014), Leitão *et al.* (2017), y Cortés *et al.* (2021).

**Figura 18.**

Reacción de oxidación de la naringenina a eriodictiol. Adaptado de Nagy *et al.* (2008).



En el extracto de *L. origanoides*, quimiotipo Felandreno, la pinocembrina fue el componente mayoritario presente tanto en extractos hidro-alcohólicos (5-25 mg/g), como supercríticos (48.3-56.1 mg/g), obtenidos del material vegetal fresco y después de la destilación. Se lograron, sin embargo, extraer mayores cantidades de pinocembrina con la mezcla supercrítica  $\text{CO}_2$ -etanol, lo cual está relacionado con su estructura, que no tiene sustituyentes hidroxilo en el anillo B, lo que la convierte en un compuesto menos polar. La pinocembrina ha sido encontrada en extractos de orégano por Cortés *et al.* (2021), Leitão *et al.* (2017), Lin *et al.* (2007), Stashenko *et al.* (2013) y de Oliveira *et al.* (2013).

La flavona apigenina se detectó en los extractos hidro-alcohólicos y supercríticos de dos de los tres quimiotipos (timol y carvacrol), en el extracto del quimiotipo Felandreno se detectó su isómero (galangina), además, de sus derivados metilados y glicosilados. Cortés *et al.* (2021) y Lin

*et al.* (2007) encontraron la galangina y metil-galangina en los extractos hidro-etanólicos e hidro-metanólicos de *L. origanoides*. Tanto en los extractos hidro-etanólicos como en los obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico del material vegetal sin destilar y después de su destilación de *L. origanoides* de los tres quimiotipos bajo estudio, se detectaron las agliconas taxifolina, eriodictiol, naringenina, circimartina, sakuranetina, luteolina, y pinocembrina descritos previamente por Cortés *et al.* (2021), Leitão *et al.* (2017), de Oliveira *et al.* (2013) y Lin *et al.* (2007). Junto con los compuestos previamente descritos en extractos hidro-metanólicos de *L. origanoides*. Lin *et al.* (2007), también encontraron quercetina, florizina y derivados glicosilados de luteolina y apigenina.

Medeiros *et al.* (2014), encontraron eriodictiol, naringenina y hesperetina en la fracción del extracto de *L. origanoides* obtenido con diclorometano, también, evaluaron la actividad antibacteriana, y reportaron que el extracto de diclorometano presentó actividad contra *S. aureus*, y concluyeron que esta actividad no se debía a la naringenina, compuesto mayoritario.

En la **Tabla 27** se reporta el contenido de compuestos fenólicos (mg/g) presentes en los extractos hidro-alcohólicos de los cuatro principales cultivares de *H. rosa-sinensis*. En la **Tabla 28**, se reporta el contenido de flavonoides totales (mg/g) organizados por subfamilias para los 16 cultivares de flores de analizados. Los códigos de las diferentes flores se muestran en la **Figura 7**.

**Tabla 27.**

Contenido de compuestos fenólicos (mg/g) presentes en extractos hidro-alcohólicos de flores de *H. rosa-sinensis* de diferentes cultivares.

Nº Fig. 14	Compuesto	Cultivar, mg/g de extracto, ( $\pm$ s, n=3)			
		Rojo	Naranja	Rosado	Amarillo
1	Cianidina-sofórosido <sup>1</sup>	21 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,07	2,4 $\pm$ 0,18	-
2	Quercetina-hexurónido-hexósido <sup>2</sup>	0,1 $\pm$ 0,01	1,0 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,06
3	Taxifolina-dihexósido <sup>2</sup>	1,5 $\pm$ 0,18	-	0,2 $\pm$ 0,00	-
4	Cianidina-sambubiósido <sup>1</sup>	1,1 $\pm$ 0,13	-	-	-
5	Catequina	1,5 $\pm$ 0,10	0,2 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,04	0,2 $\pm$ 0,02
6	Cianidina-3-glucósido <sup>1</sup>	1,5 $\pm$ 0,15	1,1 $\pm$ 0,11	1,0 $\pm$ 0,06	-
7	Kaempferol-hexurónido-hexósido <sup>3</sup>	-	1,7 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,02	0,6 $\pm$ 0,06
8	Quercetina -trihexósido	-	-	0,2 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,01
9	Epicatequina	1,1 $\pm$ 0,08	0,2 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	-
10	Quercetina-dihexósido <sup>2</sup>	1,5 $\pm$ 0,24	8,2 $\pm$ 0,88	6,8 $\pm$ 0,22	8,2 $\pm$ 0,08
11	Kaempferol-desoxihexósido-hexósido <sup>3</sup>	0,2 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,01	0,3 $\pm$ 0,04
12	Kaempferol-dihexósido <sup>3</sup>	-	3,1 $\pm$ 0,29	0,6 $\pm$ 0,01	1,3 $\pm$ 0,01
13	Kaempferol-desoxihexósido <sup>3</sup>	0,3 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,01	1,5 $\pm$ 0,01	2,6 $\pm$ 0,06
14	Quercetina-hexurónido <sup>2</sup>	0,2 $\pm$ 0,01	0,7 $\pm$ 0,01	0,7 $\pm$ 0,03	1,2 $\pm$ 0,09
15	Didridrokaempferol-hexurónido <sup>3</sup>	0,1 0,01	-	0,3 0,02	-
16	Quercetina-3-glucósido <sup>2</sup>	2,0 $\pm$ 0,03	11 $\pm$ 0,6	7 $\pm$ 1,01	11 $\pm$ 0,5
17	Naringenina-hexurónido <sup>2</sup>	2,4 $\pm$ 0,15	-	7,0 $\pm$ 0,55	-
18	Kaempferol-hexurónido <sup>3</sup>	-	0,8 $\pm$ 0,04	0,2 $\pm$ 0,00	0,9 $\pm$ 0,15
19	Kaempferol-glucósido <sup>3</sup>	-	5,1 $\pm$ 0,33	-	2,7 $\pm$ 0,27
20	Apigenina-hexurónido <sup>2</sup>	0,3 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01

<sup>1</sup> Cantidad expresada como equivalentes de cianidina-3-glucósido.

<sup>2</sup> Cantidad expresada como equivalentes de quercetina-3-glucósido.

<sup>3</sup> Cantidad expresada como equivalentes de kaempferol-3-glucósido

**Tabla 28.**

*Flavonoides totales, organizados por subfamilias, encontrados en las flores de H. rosa-sinensis de diferentes cultivares.*

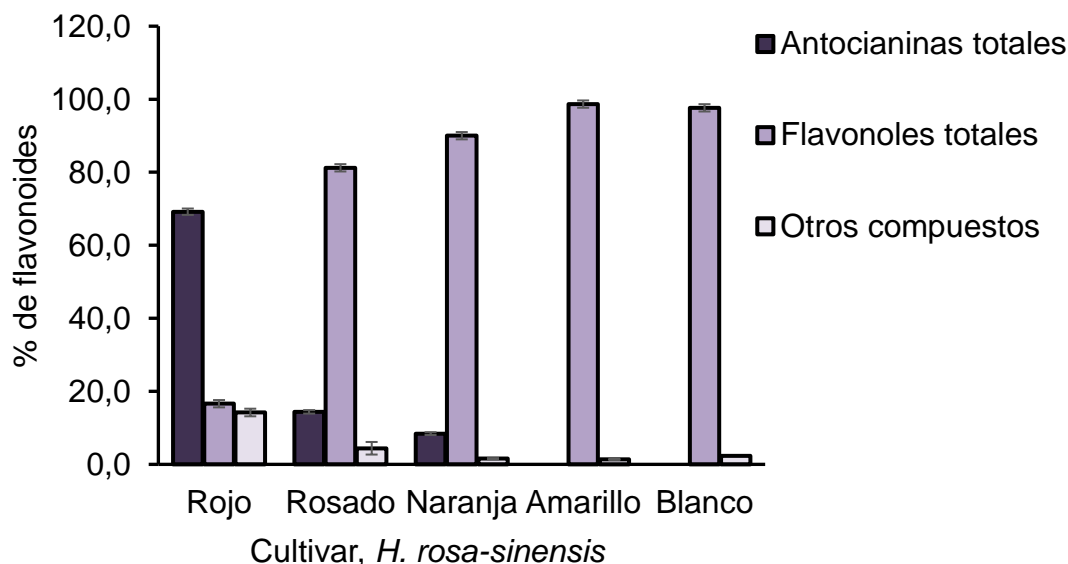
Cultivar		Flavonoides totales (mg flavonoide/g de extracto) (valor $\pm$ s, n=3)				
Muestra	Código	Antocianinas	Flavonoles	Flavan-3-ol	Flavanonoles	Flavonas
Rojo	A	19,9 $\pm$ 0,9	14,9 $\pm$ 0,9	0,91 $\pm$ 0,01	1,48 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,001
Rojo	B	23,6 $\pm$ 0,6	5,7 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2	0,31 $\pm$ 0,02
Rojo	C	21,8 $\pm$ 0,9	8,0 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1	0,53 $\pm$ 0,04
Rojo	D	19,8 $\pm$ 0,9	6,2 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,2
Rosado	E	6,6 $\pm$ 0,1	15,8 $\pm$ 0,7	0,23 $\pm$ 0,01	0,59 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,003
Rosado	F	3,4 $\pm$ 0,2	19 $\pm$ 1,0	0,31 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,01
Rosado	G	9,8 $\pm$ 0,5	17,8 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,1	0,95 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,04
Naranja	H	1,6 $\pm$ 0,1	34 $\pm$ 1	0,14 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,03
Naranja	I	1,7 $\pm$ 0,1	28 $\pm$ 1	0,23 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,002	0,16 $\pm$ 0,01
Naranja	J	3,0 $\pm$ 0,1	32 $\pm$ 1	0,34 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,001	0,13 $\pm$ 0,01
Amarillo	K	-	29 $\pm$ 1	0,22 $\pm$ 0,02	-	0,17 $\pm$ 0,03
Amarillo	L	-	23,9 $\pm$ 0,5	0,050 $\pm$ 0,002	-	0,25 $\pm$ 0,01
Amarillo	M	-	19,2 $\pm$ 0,8	0,92 $\pm$ 0,02	-	0,56 $\pm$ 0,02
Amarillo	N	0,30 $\pm$ 0,01	16,0 $\pm$ 0,5	0,20 $\pm$ 0,03	-	0,22 $\pm$ 0,01
Lila	O	1,1 $\pm$ 0,1	12,3 $\pm$ 0,6	0,35 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01
Blanco	P	-	12,6 $\pm$ 0,6	0,021 $\pm$ 0,003	-	0,28 $\pm$ 0,02

Dentro de los compuestos detectados en los cultivares de *H. rosa-sinensis* (Véanse **Tabla 27** y **28**), las antocianinas y los flavonoles representaron del 69% al 99% de la composición total de flavonoides, los flavan-3-oles, flavanonoles, flavonas y flavononas variaron desde el 1% hasta el 14 %. En la **Figura 19**, se presenta el porcentaje de flavonoides, según el cultivar estudiado. A través de estos análisis, se estableció que la concentración de flavonoles totales fue inversamente proporcional al contenido de antocianinas totales, la cantidad de flavonoles varió, según el cultivar así: blanco= amarillo > naranja > rosado > rojo, siendo el cultivar rojo el que presentó mayor concentración de antocianinas, en el cultivar blanco y en tres muestras de cultivares amarillos no se detectaron antocianinas.

En la **Figura 19**, los flavanonoles, flavononas, flavonas y flavan-3-oles (catequina y epicatequina) se representaron bajo la etiqueta de otros compuestos, estos últimos se detectaron en mayor concentración en los cultivares rojos. La cianidina-soforósido fue el componente mayoritario en el cultivar rojo, los flavonoles (quercetina-hexurónido-hexósido, quercetina-dihexósido, quercetina-hexurónido, quercetina-3-glucósido, kaempferol-desoxihexósido-hexósido y el kaempferol-desoxihexósido) fueron los compuestos en común detectados en los cuatro cultivares de flores. La quercetina-3-glucósido fue el componente mayoritario en los cultivares rosado, naranja y amarillo.

**Figura 19.**

*Distribución de flavonoides en los extractos hidro-etanólicos obtenidos de diferentes cultivares de H. rosa-sinensis.*



Hasta la fecha, no se encontraron reportes en la literatura, sobre la composición de flavonoides estudiada por LC/MS de *H. rosa-sinensis*, según el cultivar analizado. Los estudios cualitativos de los trabajos fitoquímicos realizados por Faten *et al.* (2012), Garg *et al.* (2012), Patel *et al.* (2012), Rao *et al.* (2014), y Wahid *et al.* (2019), describen alcaloides, cumarinas, taninos, saponinas y flavonoides. Sin embargo, algunos autores sí han encontrado varios flavonoides como catequina, epicatequina, quercetina, kaempferol y algunos derivados glicosilados (dos Santos *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2014; Pascoal *et al.*, 2015).

Dentro de las antocianinas identificadas en esta investigación se encontraron cianidina-3-glucósido descrita, previamente por Li *et al.* (2014), cianidina-sambubiósido reportada en extractos de *H. sabdariffa* (Salem *et al.*, 2014) y cianidina-soforósido, la cual se detectó en mayor

concentración en el cultivar rojo, este compuesto fue reportado por primera vez en *H. rosa-sinensis* por Nakamura *et al.* (1990), quienes aislaron este compuesto y lo caracterizaron por RMN.

















Shen *et al.* (2021), aislaron quercetina-soforósido a partir del extracto hidro-etanólico de flores de *H. rosa-sinensis*, y estudiaron su potencial terapéutico contra la enfermedad de Alzheimer, demostraron que el tratamiento con este flavonol glicosilado disminuyó eficientemente el deterioro de la memoria y mejoró el aprendizaje en ratones con disfunción cognitiva inducida por escopolamina; los autores concluyeron que podría usarse como neuroprotector. En esta investigación se hizo la identificación tentativa de quercetina-dihexósido, debido a que no se contaba con la sustancia de referencia comercial certificada.

Zaki *et al.* (2017) aislaron luteolina-7-glucósido a partir del extracto hidro-metanólico de hojas de *H. rosa-sinensis*, y evaluaron el efecto antioxidante e hipoglicémico, concluyeron que el extracto de hojas de *Hibiscus* tenía efectos hipoglucémicos e hipocolesterolémicos significativos en ratas diabéticas que podían conducir a una disminución del estrés oxidativo y una mejora del funcionamiento del hígado. Dentro de los componentes detectados en los cultivares bajo estudio, no se detectó la luteolina-7-glucósido, de manera confirmatoria, se identificó su isómero el kaempferol-3-glucósido.

#### ***4.1.4 Relación entre la composición química, el color y la capacidad antioxidante en los cultivares de H. rosa-sinensis bajo estudio.***

En la **Tabla 29**, se muestran los parámetros colorimétricos, usando el sistema CIELAB, obtenidos para cada muestra. Los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , se convirtieron en coordenadas RGB a través de la aplicación <http://colorizer.org/>.

**Tabla 29.***Parámetros colorimétricos CIELAB medidos para diferentes cultivares de flores de H. rosa-sinensis.*

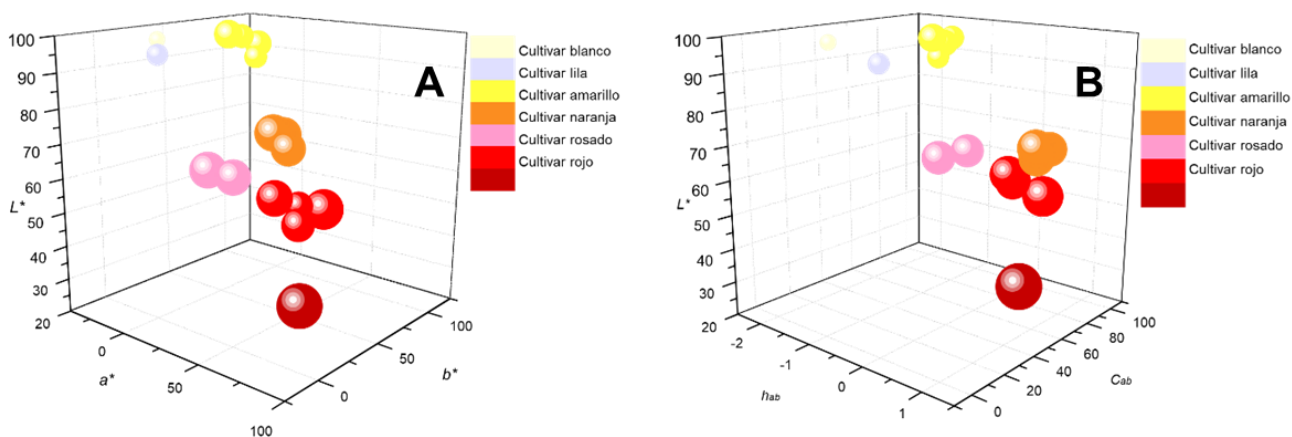
Cultivar		Parámetros CIELAB (valor $\pm$ s, $n=5$ )					Actividad antioxidante	Color*
Muestra	Código	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de extracto	
Rojo	A	28 $\pm$ 2.4	65 $\pm$ 4.1	35 $\pm$ 3.6	73 $\pm$ 2.1	0.5 $\pm$ 0.07	3840 $\pm$ 74	
Rojo	B	54 $\pm$ 0.9	65 $\pm$ 3.6	53 $\pm$ 2.4	84 $\pm$ 2.9	0.7 $\pm$ 0.04	3480 $\pm$ 64	
Rojo	C	61 $\pm$ 1.1	64 $\pm$ 1.8	24 $\pm$ 1.5	68 $\pm$ 2.2	0.4 $\pm$ 0.01	3200 $\pm$ 100	
Rojo	D	56 $\pm$ 2.8	77 $\pm$ 2.8	15 $\pm$ 0.5	78 $\pm$ 2.7	0.2 $\pm$ 0.01	2900 $\pm$ 133	
Rosado	E	58 $\pm$ 2.2	69 $\pm$ 0.3	26 $\pm$ 1.4	74 $\pm$ 0.6	0.4 $\pm$ 0.02	2900 $\pm$ 126	
Rosado	F	69 $\pm$ 3.4	41 $\pm$ 3.4	-6 $\pm$ 0.8	42 $\pm$ 3.3	-0.2 $\pm$ 0.03	3200 $\pm$ 132	
Rosado	G	69 $\pm$ 1.6	57 $\pm$ 0.4	-7 $\pm$ 1.5	57 $\pm$ 0.2	-0.1 $\pm$ 0.03	3130 $\pm$ 33	
Naranja	H	73 $\pm$ 0.8	35 $\pm$ 2.5	51 $\pm$ 1.5	62 $\pm$ 2.1	1.0 $\pm$ 0.03	3250 $\pm$ 40	
Naranja	I	69 $\pm$ 3.2	44 $\pm$ 2.6	51 $\pm$ 3.1	68 $\pm$ 3.0	0.9 $\pm$ 0.04	3200 $\pm$ 135	
Naranja	J	72 $\pm$ 2.0	37 $\pm$ 3.1	58 $\pm$ 1.0	68 $\pm$ 2.3	1.0 $\pm$ 0.03	3000 $\pm$ 77	
Amarillo	K	93 $\pm$ 1.0	-8.1 $\pm$ 0.04	93 $\pm$ 0.3	93 $\pm$ 0.3	-1.5 $\pm$ 0.01	2580 $\pm$ 53	
Amarillo	L	96 $\pm$ 2.3	-16 $\pm$ 0.8	77 $\pm$ 1.6	79 $\pm$ 1.5	-1.4 $\pm$ 0.01	2440 $\pm$ 90	
Amarillo	M	95 $\pm$ 3.2	-18 $\pm$ 1.5	91 $\pm$ 0.8	93 $\pm$ 1.1	-1.4 $\pm$ 0.01	2100 $\pm$ 99	
Amarillo	N	90 $\pm$ 0.6	-7 $\pm$ 0.5	89 $\pm$ 2.3	89 $\pm$ 2.2	-1.5 $\pm$ 0.01	1930 $\pm$ 72	
Lila	O	96 $\pm$ 1.7	5 $\pm$ 1.1	-0.7 $\pm$ 0.04	6 $\pm$ 1.1	-0.1 $\pm$ 0.03	1850 $\pm$ 87	
Blanco	P	99 $\pm$ 4.6	-4 $\pm$ 1.2	9 $\pm$ 1.5	10 $\pm$ 1.6	-1.1 $\pm$ 0.09	1580 $\pm$ 41	

\*Representación cromática de las coordenadas RGB

A partir de los datos de la **Tabla 29**, se realizaron gráficos de dispersión de burbujas 3D presentados con escala de colores (**Figura 20**), donde se muestran los resultados de las coordenadas colorimétricas CIELAB en función de la capacidad antioxidante, la cual está representada gráficamente a través del tamaño de la burbuja; la actividad antioxidante varió desde 1580 a 3840  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto, siendo la burbuja que representa el cultivar blanco la de menor tamaño, hasta la burbuja del cultivar rojo (tono más oscuro) que tiene el valor de actividad antioxidante más alto. La escala de colores cambia, según el cultivar analizado, para un total de seis cultivares (blanco, lila, amarillo, naranja, rosado y rojo).

### Figura 20.

*Gráfico de dispersión de burbujas 3D representado con escala de colores que corresponden a los diferente cultivares de flores de *H. rosa-sinensis* estudiados, según: A. Los parámetros colorimétricos CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ); B. Los parámetros colorimétricos CIELAB ( $L^*$ ,  $C_{ab}$ ,  $h_{ab}$ ). Los tamaños de las burbujas son proporcionales a la actividad antioxidante que varió de 1580 a 3840  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto.*



En la **Figura 20A y 20B**, se observa cómo el cultivar rojo (de tonalidad más oscura) se separa de las otras burbujas rojas, debido a que presenta valores de  $L^*$  menores (28) en comparación al grupo de rojos (54-61). Entre más claro fue el color de la flor (cultivar blanco, lila y amarillo), los valores de  $L^*$  eran más grandes en comparación con los del resto de las flores estudiadas. Gráficamente, se observó que estos cultivares fueron distintos al resto de muestras. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Wan *et al.* (2019), quienes demostraron que a mayores concentraciones de pelargonidina-3,5-diglucósido en pétalos de rosas, el valor de  $L^*$  era menor, con lo que concluyen que el color rojo de los pétalos de las rosas se debe al contenido más alto de antocianinas.

En la naturaleza, los colores son señales importantes que muestran advertencias (disuasión de depredadores) o recompensas (atracción de polinizadores). Existen tres rutas biosintéticas que producen compuestos (betalainas, carotenoides y antocianinas), a los cuales se les atribuyen los colores en flores y frutos (Grotewold, E. 2006 y Tanaka *et al.*, 2008). Las tonalidades amarilla y roja se asocian a las rutas biosintéticas de las betalainas y carotenoides, entre tanto, la ruta de la biosíntesis de antocianinas genera una amplia variedad de colores que va desde el amarillo ( $\lambda=480$  nm), naranja, azul, hasta el rojo ( $\lambda=730$  nm) (Tanaka *et al.*, 2008), en la cual, participan varios derivados de flavonoides, desde compuestos incoloros como los flavonoles, hasta pigmentos coloreados como las antocianinas, taninos y proantocianidinas (Koes *et al.*, 2005).

El color de flores y frutos, ricos en antocianinas, está influenciado por el número de grupos hidroxilo, su grado de metilación, la naturaleza y número de moléculas de azúcar unidos a la aglicona, el pH, la co-pigmentación que puede resultar de varias asociaciones

intermoleculares entre dos antocianinas idénticas (autoasociación) o entre una antocianina con otros compuestos fenólicos (co-pigmentación intermolecular) (Olivas *et al.*, 2016), la complejación con un ion metálico para formar un complejo  $\pi$ - $\pi$ , el color puede variar desde naranja, hasta rojo, rosa y púrpura a azul (Yoshida *et al.*, 2009). Gordillo *et al.* (2015), sugirieron que los flavonoles y los flavan-3-oles, a pesar de ser compuestos incoloros, pueden desempeñar un papel en la pigmentación, a través de la copigmentación con antocianinas, además, indicaron que la copigmentación con flavonoles puede hacer que las antocianinas sean más estables. Bakowska *et al.* (2003), reportaron complejos de ciandina-3-glucósido y flavonas aisladas de *Scutellaria baicalensis*.

Para analizar la relación entre el color de las flores, la capacidad antioxidante y el contenido de flavonoides presentes en los pétalos de cultivares de *H. rosa-sinensis*, se calcularon los coeficientes de correlación de *Pearson* de los parámetros de color, el valor de ORAC y el contenido de antocianinas, flavonoles, flavan-3-oles, flavanonoles, flavonas y flavanonas. La relación entre estos parámetros se muestra en un mapa de calor (Véase **Figura 21**). De los flavonoides detectados en las flores de *Hibiscus*, las antocianinas, los flavan-3-ol y los flavanonoles fueron los compuestos que presentaron una correlación positiva alta con el valor de ORAC, es decir, con el aumento de la concentración de estos compuestos, incrementó la capacidad antioxidante. Algunos derivados glicosilados de quercetina y las quercetinas totales, también, presentaron correlaciones positivas con el valor de ORAC, pero menores en comparación con las otras sustancias. De todos los compuestos identificados, los kaempferoles, resultaron ser las sustancias que menor correlación revelaron con la capacidad antioxidante. Adicionalmente, se observó que hubo una correlación negativa entre los



El mecanismo que regula el color en los pétalos de los cultivares de *Hibiscus* estudiados es poco conocido (Hammad, 2009), sin embargo, a través de las correlaciones del mapa de calor (**Figura 21**) se logró asociar el color de la siguiente forma: los parámetros  $a^*$ ,  $h$  y  $C$  se correlacionaron positivamente con el valor de ORAC, los valores  $L^*$  se correlacionaron negativamente con la capacidad antioxidante, mientras que el parámetro  $b^*$  presentó una correlación negativa pequeña. Entre más clara la tonalidad de las flores (blancas, amarillas o lilas), éstas presentaron valores de  $L^*$  más altos y valores de capacidad antioxidante más bajos, usando el método ORAC para su medición. El efecto contrario se observó en las flores de tonalidades más oscuras (rojas>rosadas>naranjas), a valores de  $L^*$  más bajos, la capacidad antioxidante aumentó, y, con ella, la concentración de antocianinas, flavan-3-oles y flavanones.

Estudios han explorado la relación entre el color de diferentes flores, rosas (Wan *et al.*, 2019), lirios de agua (Zhu *et al.*, 2012), narcisos (Li *et al.*, 2015), manzano silvestre (Tai *et al.*, 2014), canola (Yin *et al.*, 2019) y la composición química. Los resultados obtenidos en este estudio comparativo de cultivares de *H. rosa-sinensis* fueron congruentes con los reportados por Wan *et al.* (2019), quienes estudiaron la relación del color en cultivares de rosas y reportaron que el cultivar rojo presentó la mayor concentración de antocianinas, y que los cultivares amarillo, naranja y rosado la concentración más alta de carotenoides y flavonoles, además, reportaron que las agliconas de kaempferol y quercetina fueron los flavonoles predominantes en las rosas. Según Tai *et al.* (2014), la mayor concentración de antocianinas en flores de manzano silvestre está relacionado con la cantidad de la enzima

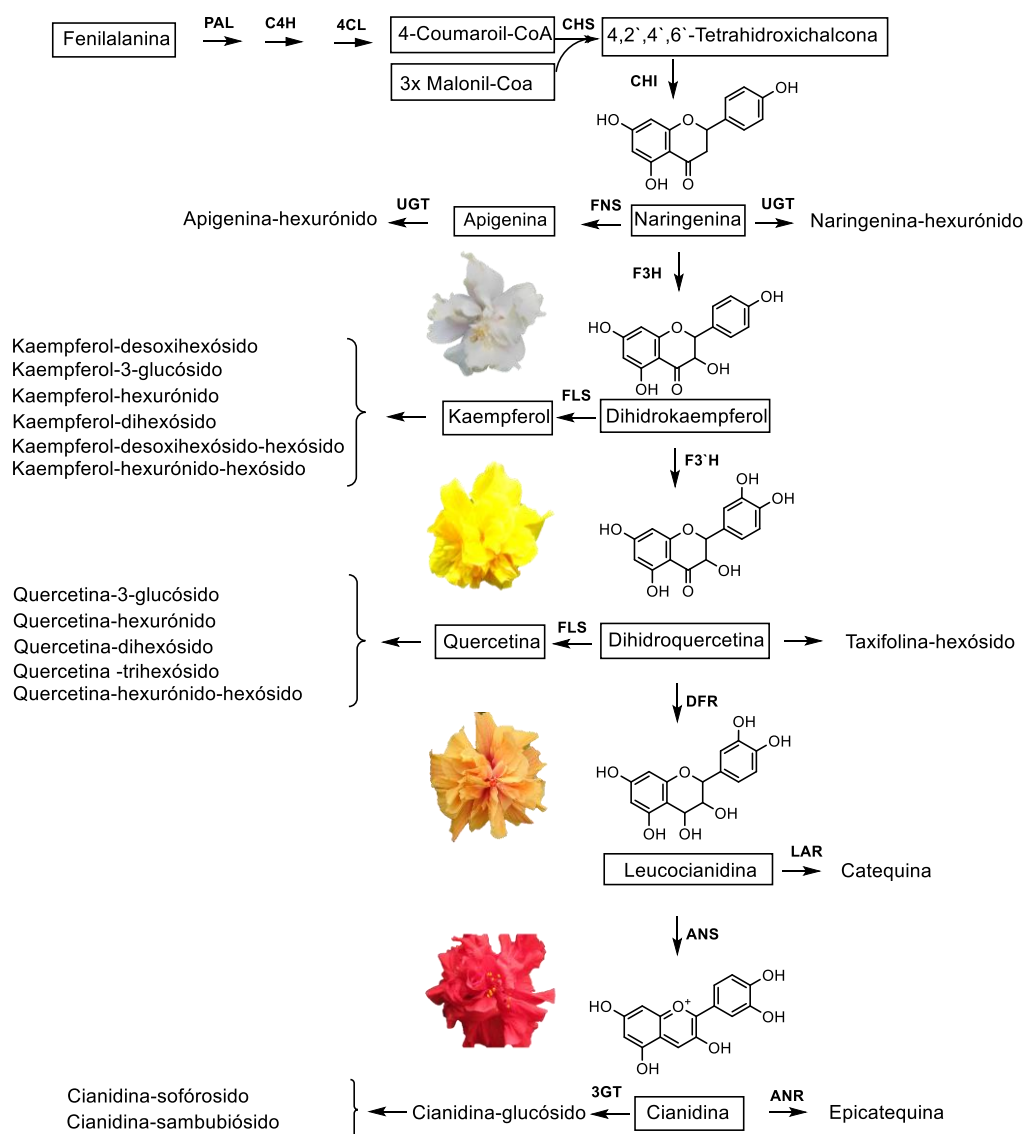
chalcona sintasa, que regula la biosíntesis de antocianinas, y, como consecuencia, es la responsable de la coloración roja y la variación del color en los pétalos de los cultivares de manzano.

Según Yin *et al.* (2019), los componentes principales detectados en los pétalos rojos y rosados de *Brassica napus*, fueron derivados de epicatequina, quercetina e isorhamnetina, mientras que en los pétalos amarillos y blancos detectaron derivados de kaempferol. En las flores de *Hibiscus* bajo estudio, los derivados glicosilados de quercetina fueron los componentes mayoritarios en los cultivares rosado, naranja y amarillo. Yin *et al.* (2019) reportaron que derivados del ácido hidroxicinámico, malato de sinapoilo, naringenin-7-*O*-glucósido, cianidin-3-glucósido, cianidina-3,5-di-*O*-glucósido, petunidin-3-*O*- $\beta$ -glucopiranosido, isorhamnetina-3-*O*-glucósido, kaempferol-3-*O*-glucósido-7-*O*-glucósido, quercetina-3,4'-*O*-di-glucopiranosido, quercetina-3-*O*-glucósido y delphinidin-3-*O*-glucósido posiblemente fueron mayores contribuyentes a la variedad de colores en los pétalos en *Brassica napus*.

Los flavan-3-oles (catequina y epicatequina), se detectaron principalmente en el cultivar rojo, lo cual se puede explicar a través de la ruta biosintética de estos compuestos (**Figura 22**), ya que el precursor de la catequina es la leucoantocianidina, a partir de ella se biosintetizan las antocianidinas precursoras de la epicatequina y las antocianinas. Una mayor biodisponibilidad de antocianidinas puede dar lugar a la biosíntesis de flavan-3-oles. Mientras que en el cultivar blanco (**P**) (Véase **Figura 7**), no se detectaron antocianinas, ni antocianidinas, y la concentración de flavan-3-ol fue 120 veces inferior a la del cultivar rojo (**B**) (Véase **Figura 7**).

**Figura 22.**

*Esquema general de la biosíntesis de flavonoides en flores de Hibiscus rosa-sinensis. PAL (Fenilalanina-amonio liasa), C4H (Cinamato-4-hidroxisilasa), 4CL (4-Cumarato CoA ligasa), CHI (Flavanona chalcona isomerasa), FNS (Flavanona sintasa), UGT (Glucuroniltransferasa), F3H (Flavanona-3-hidroxisilasa), FLS (Flavonol sintasa), F3'H (Flavonoide-3`hidroxisilasa), DFR (Dihidroflavonol-4-reductasa), LAR (Leucoantocianidina reductasa), ANS (Antocianina sintasa), ANR (Antocianidina reductasa), 3GT (Antocianidina-3-glucosiltransferasa). Adaptado de: Hammerbacher et al. (2019), Gerats, T. y Strommer, (2008) y Hong et al. (2014).*

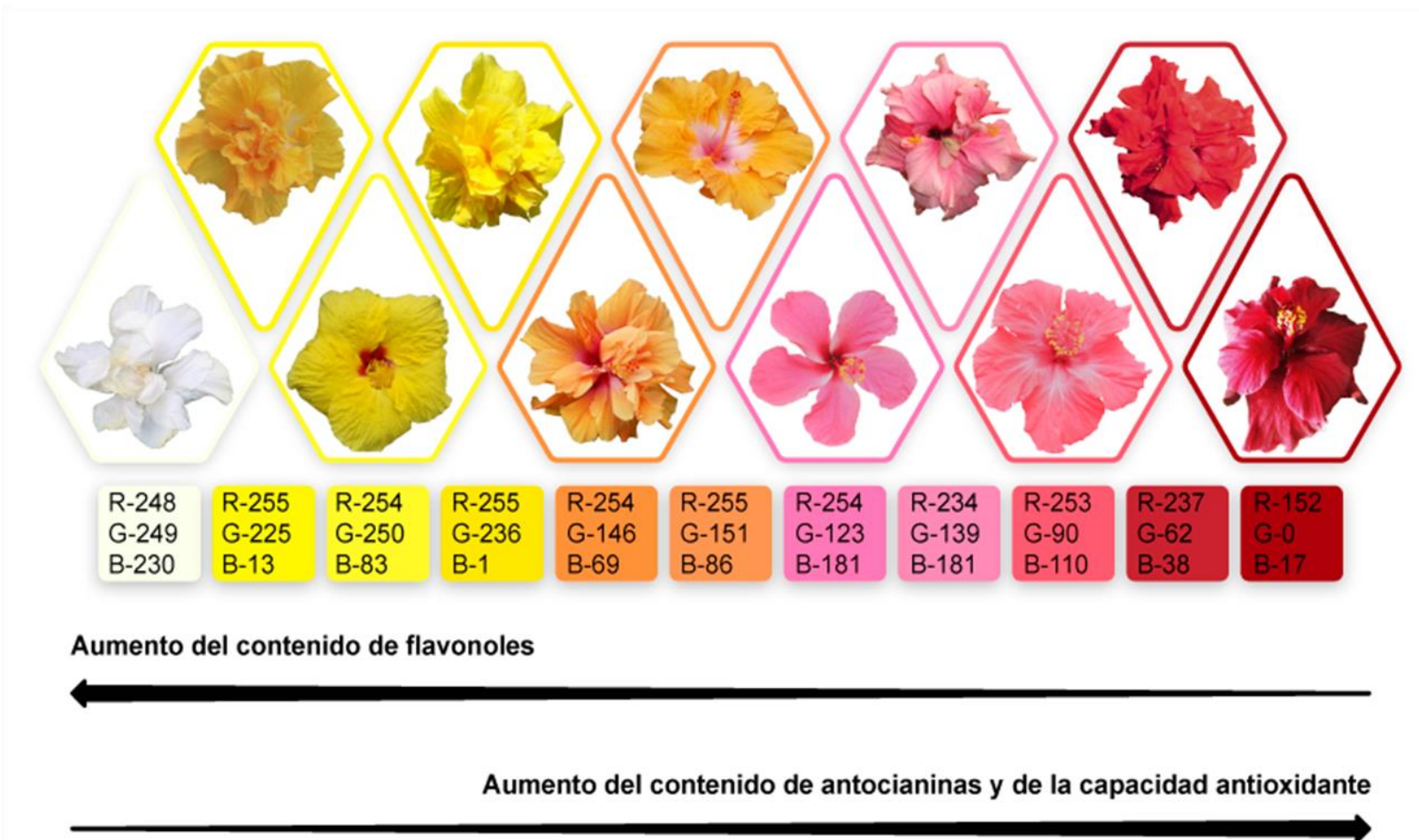


Patel *et. al.* 2012, realizaron un estudio fitoquímico comparativo de para los cultivares rojo, rosado, naranja, amarillo y blanco de hojas, tallos y raíces de *Hibiscus rosa-sinensis* y reportaron que el cultivar rojo y blanco presentaron el mayor y el menor contenido total de fenoles, respectivamente. Hasta donde se conoce, este trabajo de investigación es el primer estudio comparativo sobre composición de flavonoides presentes en extractos de diferentes cultivares de flores de *Hibiscus rosa-sinensis*.

A partir de toda la información obtenida y analizada, en la **Figura 23** se muestra una representación gráfica, que relaciona el color, la capacidad antioxidante y la composición química de extractos en cuanto al contenido de antocianinas y flavonoles. El esquema muestra el aumento de la capacidad antioxidante a través de la flecha negra, que inicia en el cultivar blanco y finaliza en el cultivar rojo. El contenido de flavonoles fue inversamente proporcional al contenido de antocianinas, flavan-3-oles y flavanonoles totales. Dentro del esquema floral se encuentran los valores de la representación cromática de las coordenadas RGB obtenidas para cada cultivar a través del sistema CIELAB.

**Figura 23.**

*Representación gráfica de la relación entre el color, la actividad antioxidante y la composición química para diferentes cultivares de flores de H. rosa-sinensis.*



Para el estudio de la relación entre el color de las flores de *H. rosa-sinensis* y los metabolitos secundarios (fenoles) presentes en los extractos, desde el punto de vista mecano-cuántico, se seleccionaron las tres familias de compuestos principales detectadas en los cultivares, a saber: (1) antocianinas, (2) flavonoles y (3) flavan-3-oles, para los cuales se calcularon los valores de la energía HOMO, energía LUMO, *Band Gap* ( $E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$ ), potencial de ionización (IP), dureza química ( $\eta$ ) y suavidad ( $s$ ), las longitudes de onda ( $\lambda$ ) y la contribución de los orbitales moleculares que participaron en la excitación electrónica para seis compuestos fenólicos, que se listan en la **Tabla 30**.

Los orbitales de frontera HOMO (orbital molecular ocupado más alto) y el LUMO (orbital molecular no ocupado más bajo) son parámetros que se relacionan con la estabilidad cinética y la reactividad de una molécula. El valor HOMO indica la capacidad que tiene una sustancia para donar electrones y está relacionado directamente con el potencial de ionización, mientras que el valor LUMO, muestra la capacidad de una molécula para aceptar electrones (Santos *et al.*, 2018). El *band gap*, es un parámetro importante para evaluar la estabilidad química molecular; los compuestos que presentan baja reactividad y alta estabilidad tienen valores de *band gap* grandes. Tanto la dureza ( $\eta$ ), como la suavidad ( $s$ ) son índices de reactividad global que permiten determinar la resistencia o tendencia de un sistema a sufrir cambios en su densidad electrónica y están relacionados directamente con la diferencia de energía entre los orbitales HOMO y LUMO (Galván *et al.*, 2015).

**Tabla 30.**

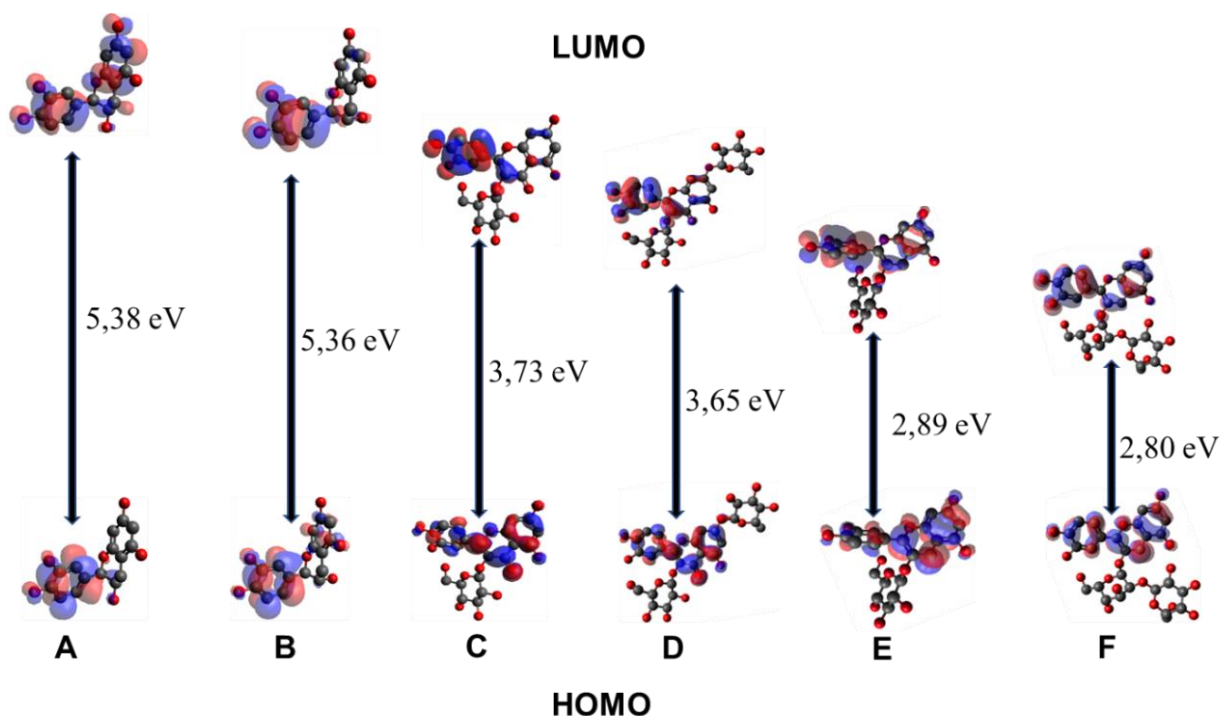
*Descriptores moleculares, transiciones (nm) y orbitales moleculares (MO) calculados para algunos flavonoides presentes en los cultivares de H. rosa-sinensis, usando el método B3LYP / 6-311 + G (d, p).*

Familia de sustancias	Compuesto	HOMO, eV	LUMO, eV	Band gap, eV	Potencial de ionización, kJ/mol	Dureza, eV	Suavidad, eV	$\lambda$ calculada, nm	$\lambda$ experimental, nm	MO
Antocianina	Cianidina-hexósido	-8,57	-5,68	2,89	827	1,45	0,69	500	500	H → L (98%)
	Cianidina-dihexósido	-8,93	-6,12	2,8	862	1,4	0,71	500	516	H → L (97%)
Flavonol	Quercetina-hexósido	-5,5	-1,77	3,73	531	1,86	0,54	372 258	354 256	H → L (98%) H-1 → L+1 (77%)
	Quercetina-dihexósido	-6,01	-2,37	3,65	580	1,82	0,55	381 263	352 256	H → L (97%) H-1 → L+1(73%)
Flavan-3-ol	Catequina	-5,99	-0,63	5,36	578	2,68	0,37	259	280	H → L (88%)
								236	230	H → L+2 (84%)
	Epicatequina	-6,01	-0,63	5,38	580	2,69	0,37	260 239	280 230	H → L (75%) H → L+2 (64%)

En la **Figura 24**, se muestran los orbitales de frontera HOMO, LUMO y el *band gap* calculados para los seis flavonoides. La fases positiva y negativa se representan en color rojo y azul, respectivamente.

**Figura 24.**

*Orbitales de frontera HOMO, LUMO y band gap para: A. Epicatequina, B. Catequina, C. Quercetina-hexósido, D. Quercetina-dihexósido, E. Cianidina-hexósido, F. Cianidina-dihexósido.*



La catequina y la epicatequina son flavan-3-oles, que no poseen un enlace doble entre los carbonos dos y tres en el anillo C, pero tienen dos grupos hidroxilo en las posiciones 4' y 5' en el anillo B. Los resultados teóricos obtenidos fueron similares a los valores experimentales ( $\lambda=230$  nm y  $\lambda=280$  nm). Los picos máximos calculados a  $\lambda=236$  nm y  $\lambda=239$  nm son productos de la transición entre HOMO y LUMO+2 (84% y 64%), mientras que

la absorción a  $\lambda=259$  nm y  $\lambda=260$  nm se describe por la transición entre los orbitales HOMO y LUMO (88 y 75%). Según los orbitales moleculares (Véanse **Figura 24 A** y **24B**), es posible observar que la mayor densidad electrónica en la catequina y la epicatequina está en el anillo de catecol (anillo B), con poca participación de los anillos A y C. La ausencia de un doble enlace entre los carbonos dos y tres impide el efecto de resonancia en la molécula, ya que reduce la conjugación. Como consecuencia, la absorción en la molécula se ve afectada porque pierde su eficiencia de deslocalización electrónica y el resultado es la absorción a longitudes de onda más cortas, por lo tanto, estos compuestos de manera individual no aportan al color de las flores de *Hibiscus* spp.

La cianidina-hexósido y la cianidina-dihexósido pertenecen al grupo de las antocianinas. La carga positiva sobre el oxígeno del anillo C (catión flavilio) aumenta significativamente la conjugación en las moléculas, además, la presencia de grupos -OH en la estructura desplaza la absorción a longitudes de onda más largas, en comparación con los otros flavonoides, hacia la región visible entre  $\lambda=450$  nm y  $\lambda=600$  nm (Sinopoli *et al.*, 2017).

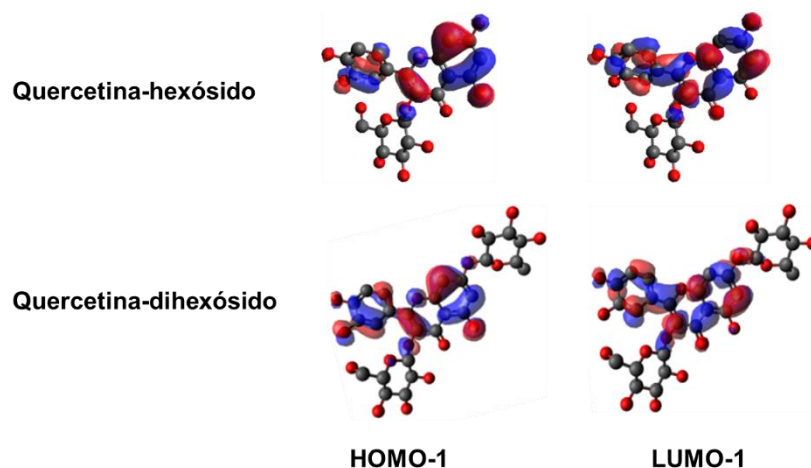
Se describe que las antocianinas muestran un pico en la región visible a  $\lambda=500$  nm debido al sistema hidroxil-cinamoilo del anillo B y un pico en la región de  $\lambda=240-280$  nm debido al sistema benzoilo del anillo A (Wollenweber and Dietz, 1981). En la **Figura 24**, en las moléculas **E** y **F**, es posible observar, que, en la parte de la región de la aglicona en la cianidina, se da la mayor distribución electrónica y la absorción a  $\lambda=500$  nm se describe por la transición entre los orbitales HOMO y LUMO (97 y 98%). Esta banda de absorción máxima alrededor de  $\lambda=500$  nm (azul) es la responsable de la variedad de colores rojos que

se observan en frutas y flores, esta gamma de tonalidades varía con la concentración de antocianinas, el número y la posición de los grupos hidroxilo, el pH y la copigmentación que puede surgir en la presencia otros compuestos (Anouar *et al.*, 2012).

En los espectros UV experimentales de la quercetina-hexósido, y dihexósido (flavonoles) estos compuestos se observan dos bandas ( $\lambda=256$  nm y  $\lambda=354$  nm). La banda de absorción ubicada en el rango de  $\lambda=352$ - $354$  nm, puede atribuirse a los anillos B y C, como lo describen Rice *et al.* (1996). Esto se debe a que la transición de mayor contribución obtenida en esta región es entre HOMO y LUMO, y se puede observar la mayor deslocalización electrónica en estos anillos (**Figura 24**, moléculas **C** y **D**). En contraste, la banda de absorción en la región de  $\lambda=256$  nm puede atribuirse al anillo A (Rice *et al.*, 1996), sin embargo, la transición entre los orbitales HOMO-1 y LUMO+1 para esta región muestra la densidad electrónica ubicada en los tres anillos (**Figura 25**) y no solo en el anillo A; es posible observar los lóbulos más grandes concentrados en ese anillo y no se nota ninguna participación del glicósido en las transiciones.

**Figura 25.**

*Orbitales moleculares que participan en la transición de  $\lambda=256$  nm para los derivados glicosilados de quercetina.*



Los valores de  $[\Delta E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}]$  variaron, según la subfamilia de flavonoides, así: flavanoles > flavonoles > antocianinas, siendo la epicatequina y la catequina las moléculas que presentaron los mayores valores de *band gap*. Esta diferencia energética coincidió con la reportada por Murakami, *et al.* (2015), quienes hicieron el estudio de las propiedades mecano-cuánticas para la quercetina, catequina, epicatequina y resveratrol y reportaron valores de  $[\Delta E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}]$  de 3.63, 5.45, 5.69 y 4.05 eV, respectivamente.

Las antocianinas presentaron los valores más bajos de *band gap*, lo que indica que fueron las más reactivas dentro de los compuestos estudiados, y mostraron la mayor actividad antioxidante: esta predicción coincidió con los resultados que se mostraron en el mapa de calor (**Figura 21**), donde las antocianinas tenían una correlación positiva con la capacidad antioxidante; además, los cultivares de tonalidades rojas presentaron las concentraciones de antocianinas más altas, y así mismo, valores de ORAC. Estos resultados concuerdan con lo

reportado por Patel *et al.* (2012), quienes evaluaron el contenido total de flavonoides en extractos metanólicos obtenidos a partir de hojas para cinco cultivares de *H. rosa-sinensis* y concluyeron que su contenido expresado en mg de ácido gálico /g de extracto aumentaba en los cultivares en el siguiente orden: blanco  $\leq$  amarillo < naranja < rosado < rojo. En esta investigación, se encontró que tanto la actividad antioxidante, como el contenido de antocianinas en flores presentó la tendencia similar a la reportada por Patel *et al.* (2012) para las hojas de *H. rosa-sinensis*.

Dentro de los parámetros calculados por métodos mecano-cuánticos para flavonoides, se determinó que los flavonoles y flavan-3-oles presentaron los valores más bajos (530-580 kJ/mol) de potencial de ionización (PI) que las antocianinas (827-862 kJ/mol). Según los valores de PI calculados, las antocianinas, aparte de ser los principales responsables de la coloración en cultivares rojos, rosados y naranjas, son las moléculas más reactivas y con menor capacidad electro-donadora, de ahí, que su capacidad antioxidante se manifiesta más a través del mecanismo HAT, mientras que para los flavonoles y flavan-3-oles el mecanismo ET es más favorable; estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ma *et al.* (2020).

La dureza y la suavidad son descriptores moleculares importantes de la reactividad de las moléculas. De los compuestos estudiados, las antocianinas poseen el valor de dureza más bajo, lo que indica su mayor suavidad, por lo tanto, son las moléculas más reactivas. Los resultados obtenidos para los flavonoles coinciden con los reportados por Zheng *et al.* (2017), quienes calcularon los valores de esos descriptores para quercetina y sus derivados.

A través de estos análisis, fue posible afirmar, que el color en los cultivares rojo, rosado, naranja y amarillo de *H. rosa-sinensis* estuvo relacionado directamente con la concentración de antocianinas detectadas, cuyos máximos de absorción experimentales estaban en el rango de  $\lambda=500$  nm a  $\lambda=516$  nm (**Tabla 30**) y la interacción intermolecular con compuestos no coloreados (flavonoles, flavan-3-oles, flavanonas y flavonas), cuyos máximos de absorción van desde  $\lambda=280$  a  $\lambda=354$  nm, mientras que, en el cultivar lila, la apigenina-hexurónido fue, posiblemente, uno de los compuestos responsables de la coloración, ya que, según Asen y Horowitz (1974), la apigenina-4'-*O*- $\beta$ -glucósido-7-*O*-glucurónido fue un copigmento en las flores de *Centaurea cyanus* de tonalidad azul-lila.

## **4.2 Actividad biológica de extractos hidro-alcohólicos y obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico.**

### **4.2.1 Capacidad antioxidante**

**5.2.1.1 Implementación del ensayo de decoloración del β-caroteno.** A continuación, se muestran los resultados del desarrollo y validación del método de decoloración de β-caroteno, implementado en un sistema de microplacas. El método fue validado empleando como sustancias de referencia Trolox<sup>®</sup>, α-tocoferol y BHT.

#### **Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.**

La evaluación de la linealidad y sensibilidad se realizaron con base en las curvas de calibración para el Trolox<sup>®</sup> ( $n=5$ ) en el rango de 13 a 55 μM, en el cual se encontraron ecuaciones lineales con pendientes de  $1.617 \pm 0.04$  e interceptos de  $-11.79 \pm 1.55$ . La desviación estándar de la pendiente (0.04) mostró que la precisión del método fue aceptable, además los coeficientes de determinación  $R^2 > 0.99$  permitieron concluir que el método fue lineal en el rango de concentración evaluado.

#### **Determinación de los niveles mínimos de detección y cuantificación.**

Los valores de los niveles mínimos de detección y de cuantificación se calcularon a partir de la curva de calibración (13-55 μM de Trolox<sup>®</sup>,  $n=5$ ) como la concentración de Trolox<sup>®</sup> que proporcionó una relación  $3S_{Y/X}$  para el NMD y de  $10S_{Y/X}$  para el NMC. Los

valores obtenidos experimentalmente con base en la curva de calibración fueron  $4 \pm 0.2 \mu\text{M}$  y  $13 \pm 1.3 \mu\text{M}$ , respectivamente.

### Evaluación de la precisión: repetibilidad y reproducibilidad.

La repetibilidad del método se evaluó mediante la medición de una solución de Trolox® (15  $\mu\text{M}$ ), por triplicado, durante cinco días. En la **Tabla 31**, se muestra que los coeficientes de variación (CV, %) de las mediciones realizadas todos los días y entre los cinco días, no superaron el 10%, lo que indica que el método es repetible. El porcentaje de inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno en presencia de Trolox® (15  $\mu\text{M}$ ) fue de  $9.7 \pm 0.4$ , con un coeficiente de variación del 4.6 %.

**Tabla 31.**

*Repetibilidad del valor del porcentaje de inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno en presencia de Trolox® (15  $\mu\text{M}$ ) analizadas por espectrofotometría UV-Vis.*

Parámetro	Inhibición, %					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Entre días
<X>	9,6	9,9	10,3	9,6	9,1	9,7
S	0,6	0,5	0,7	0,1	0,6	0,4
CV, %	6,5	4,9	6,8	1,0	6,4	4,6

Para determinar la reproducibilidad del método implementado, se evaluó la decoloración de  $\beta$ -caroteno en una solución de  $\alpha$ -tocoferol (100 mg/L), por triplicado, mientras se cambiaron las siguientes variables: el analista y el día de análisis. Los resultados se muestran en la **Tabla 32**

**Tabla 32**, donde se observa que los coeficientes de variación estuvieron entre 1% y 2,2%, valores aceptados por las Buenas Prácticas de Laboratorio; con estos resultados se concluyó que el método implementado fue reproducible

**Tabla 32.**

*Reproducibilidad del porcentaje de inhibición (%) obtenido por el método de decoloración del  $\beta$ -caroteno para el  $\alpha$ -tocoferol (100 mg/L).*

<b>Analista</b>	<b>Réplicas</b>			<b>&lt;X&gt;, n=3</b>	<b>S</b>	<b>CV, %</b>
<b>A-día 1</b>	68,8	69,9	70,0	69,6	0,7	1,0
<b>B-día 2</b>	71,2	70,4	68,2	69,9	1,5	2,2

### **Evaluación de la exactitud del método.**

La exactitud del método implementado se midió por la diferencia de los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición (69.6%) de la decoloración del  $\beta$ -caroteno en presencia de  $\alpha$ -tocoferol (100 mg/L) con el valor reportado (70.29%) por Pereira *et al.* (2017) para la misma sustancia. Se encontró que la diferencia entre el valor de referencia aceptado y el encontrado experimentalmente fue de 0.98%, lo que muestra que la precisión del método fue aceptable.

### **Evaluación de la robustez**

Para determinar la robustez del método, se varió la concentración del etanol y, también, se emplearon dos lotes diferentes de ácido linoleico de la marca *Sigma-Aldrich*. A partir de los datos obtenidos, se realizó un análisis estadístico ANOVA. En la **Tabla 33**, se presentan los resultados de los datos para el método sin modificar y para el método modificado, donde se observa que el estadístico F calculado fue menor que el F crítico, lo que muestra que no hubo diferencia significativa entre los datos comparados, con lo que se

concluye que el método implementado no se afectó por las pequeñas variaciones aplicadas y fue robusto.

**Tabla 33.**

*Robustez del método de decoloración del  $\beta$ -caroteno en presencia de Trolox<sup>®</sup> (15  $\mu$ M).*

Método sin modificar	Método modificado	F calculado	F crítico
9,6	8,8		
9,7	7,9		
8,4	9,4	0,747	5,31
8,7	8,5		
9,6	9,6		
9,2	8,8		

**5.2.1.2 Capacidad antioxidante, de extractos medida por los ensayos ORAC, ABTS<sup>+</sup>,  $\beta$ -caroteno y por HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup>.** En la **Tabla 34** se presentan los valores de capacidad antioxidante medida, usando los diferentes ensayos de ORAC, ABTS<sup>+</sup>,  $\beta$ -caroteno y por el método HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup> de extractos hidro-alcohólicos y obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de las plantas bajo estudio. Los valores de capacidad antioxidante, obtenidos por los métodos ABTS<sup>+</sup>, ORAC y  $\beta$ -caroteno, para las sustancias de referencia BHT y  $\alpha$ -tocoferol fueron comparables con los reportados por otros investigadores (Sierra, L. 2020).

**Tabla 34.**

Valores de la capacidad antioxidante medidos por los ensayos de ORAC, ABTS<sup>+</sup>,  $\beta$ -caroteno, y por el método de HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup> de extractos hidro-alcohólicos y obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de las plantas bajo estudio.

Muestra	Quimiotipo o cultivar	Extracto	Capacidad antioxidante $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto}$ ( $\pm\text{s}$ , $n=3$ )			
			ORAC	ABTS <sup>+</sup>	$\beta$ -caroteno	HPLC-DAD-ABTS <sup>+</sup>
<i>L. origanoides</i>	Timol	Hidro-alcohólico	7800 $\pm$ 190	1670 $\pm$ 90	45 $\pm$ 0.6	1640 $\pm$ 56
		Supercrítico	1550 $\pm$ 60	450 $\pm$ 25	21 $\pm$ 0.4	340 $\pm$ 9
	Carvacrol	Hidro-alcohólico	2410 $\pm$ 40	620 $\pm$ 17	13 $\pm$ 0.1	540 $\pm$ 13
		Supercrítico	1180 $\pm$ 42	550 $\pm$ 6	20 $\pm$ 0.6	490 $\pm$ 9
	Felandreno	Hidro-alcohólico	4690 $\pm$ 70	1590 $\pm$ 20	33 $\pm$ 0.7	1560 $\pm$ 25
		Supercrítico	2630 $\pm$ 50	465 $\pm$ 11	18 $\pm$ 0.2	450 $\pm$ 6
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Roja	Hidro-alcohólico	3490 $\pm$ 84	1450 $\pm$ 52	11 $\pm$ 0.1	1460 $\pm$ 9
	Rosada		3200 $\pm$ 132	1170 $\pm$ 71	10 $\pm$ 0.1	1190 $\pm$ 2
	Naranja		3000 $\pm$ 77	1250 $\pm$ 64	9 $\pm$ 0.1	1270 $\pm$ 2
	Amarilla		2580 $\pm$ 73	1050 $\pm$ 50	7 $\pm$ 0.1	1030 $\pm$ 10
Sustancias de referencia	BHT	-	660 $\pm$ 4	1800 $\pm$ 149	460 $\pm$ 5.9	2470 $\pm$ 44
	$\alpha$ -Tocoferol	-	550 $\pm$ 13	920 $\pm$ 63	499 $\pm$ 0.7	-

En el ensayo ORAC, los extractos hidro-alcohólicos y los extractos supercríticos de las matrices estudiadas, presentaron una capacidad antioxidante mayor que los antioxidantes de referencia, *i.e.*,  $\alpha$ -tocoferol ( $550 \pm 13 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  sustancia) y BHT ( $660 \pm 4 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  sustancia). Sin embargo, en el ensayo ABTS<sup>+</sup>, todos los extractos hidro-alcohólicos presentaron capacidad antioxidante (CA) mayor que el  $\alpha$ -tocoferol ( $920 \pm 64 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  sustancia), pero menor que el BHT ( $1800 \pm 149 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  sustancia), y por el ensayo de decoloración del  $\beta$ -caroteno, ninguno de los extractos evaluados presentó CA más alta que los antioxidantes de referencia.

Para los extractos hidro-alcohólicos de *H. rosa-sinensis* se encontró que la capacidad antioxidante varió según el cultivar, así: rojo > rosado  $\geq$  naranja > amarillo, siendo el cultivar rojo el que presentó or capacidad antioxidante más alta, medida por los métodos ORAC, ABTS<sup>+</sup> y del  $\beta$ -caroteno. Estos resultados concordaron con los reportados por Sheth y De, (2012), y Patel *et al.* (2012), quienes evaluaron la capacidad antioxidante, por el método DPPH, de cuatro cultivares sencillos (rojo, rosado, amarillo y blanco) de flores de *H. rosa-sinensis*, y para hojas, tallos y raíces de cultivares rojos, rosados, naranja, amarillo y blanco, respectivamente. Ambas investigaciones reportaron que el cultivar rojo presentó el mayor contenido de flavonoides y la mayor actividad atrapadora de radicales, en comparación con los cultivares de otros colores.

Rajesh *et al.* (2011), evaluaron la capacidad antioxidante por ABTS<sup>+</sup> de los extractos hidro-etanólicos de partes aéreas de *H. rosa-sinensis*, y concluyeron que el efecto del extracto y de los estándares sobre los catión-radicales ABTS<sup>+</sup> cambió en el siguiente orden: BHT > extracto >  $\alpha$ -tocoferol. Los valores de ABTS<sup>+</sup>, obtenidos en este trabajo, para los cuatro

cultivares estudiados mostraron la misma tendencia reportada por Rajesh *et al.* (2011), así: BHT (1800) > cultivares (1050-1450) >  $\alpha$ -tocoferol (920)  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  sustancia. Khan *et al.* (2014) también reportaron que la capacidad antioxidante medida por el método DPPH para extractos etanólicos y metanólicos de *H. rosa-sinensis* fue menor que el BHT.

Recientemente, Petkova *et al.* (2021), reportaron la capacidad antioxidante evaluada por los métodos ABTS<sup>•+</sup> (149 $\pm$ 4  $\mu\text{M TE}^{\text{®}}/\text{g}$ ) y ORAC (25400 $\pm$  344  $\mu\text{M TE}^{\text{®}}/\text{g}$ ) de los extractos de flores de *H. rosa-sinensis*, obtenidos con extracción con solvente asistida por la radiación de microondas. Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos en la presente investigación, estos difieren en orden (10 veces); esto puede estar relacionado con las condiciones, del método de extracción empleado o el cultivar estudiado.

Se encontró que los extractos hidro-alcohólicos, obtenidos a partir de la biomasa residual de *L. origanoides*, presentaron capacidades antioxidantes más altas, que los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico, siendo el extracto hidro-alcohólico del quimiotipo timol el que mostró la actividad antioxidante más alta (7800 $\pm$ 190  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  sustancia) por el ensayo ORAC, al menos doce veces superior a la de los antioxidantes de referencia (BHT y  $\alpha$ -tocoferol), que son ampliamente usados en las industrias cosméticas, de alimentos y de aseo personal (Shitole *et al.*, 2022).

Recientemente, Cortés *et al.* (2021), reportaron la composición química y la actividad antioxidante, evaluada por los métodos DPPH<sup>•</sup> y ORAC, de los extractos de *L. graveolens*. Los valores obtenidos en el ensayo DPPH<sup>•</sup> (7.54-8.79 mg Trolox/mL de extracto) fueron al

menos tres veces más altos que los determinados en el ensayo ORAC (1.65-1.66 mg Trolox/mL de extracto), los autores explicaron que la diferencia de los resultados entre los métodos puede estar relacionada con mecanismos de acción diferentes de cada ensayo. En el presente trabajo, se emplearon los métodos ORAC y  $\beta$ -caroteno, que se basan en reacciones químicas de transferencia de átomo de hidrógeno, mientras que en el método ABTS<sup>+</sup> suceden reacciones químicas con transferencia de electrón (Plaza *et al.*, 2014), aunque según Apak *et al.* (2013 y 2016), en los métodos DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>+</sup> también puede ocurrir reacciones HAT. Sin embargo, los valores de capacidad antioxidante tanto para extractos hidro-etanólicos como obtenidos con el CO<sub>2</sub> supercrítico de biomasa residual de *L. origanoides*, medida por el método ORAC (1180-7800  $\mu$ mol Trolox®/g muestra) fueron más altos que los determinados por el ensayo ABTS<sup>+</sup> (450-1760  $\mu$ mol Trolox®/g muestra).

Córdoba Y (2020) reportó los valores de capacidad antioxidante medidos por los ensayos ORAC y ABTS<sup>+</sup>, tanto para extractos hidro-alcohólicos (10400-15400 y 950-2490  $\mu$ mol Trolox/g muestras, respectivamente), como para extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de *L. origanoides* (1670-4130 y 690-1220  $\mu$ mol Trolox/g muestras, respectivamente). Esos valores fueron más altos que los obtenidos en esta investigación. Esta disminución de la CA depende mucho del material vegetal empleado, debido a que, en este trabajo, se usó la biomasa residual, obtenida después del proceso de destilación. Altas temperatura (>100 °C) pueden afectar la estabilidad de los compuestos fenólicos extraídos y degradarlos, como lo demuestran Timoteo *et al.* (2015), quienes explican que la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de *Lippia alba* pudo disminuir por el proceso de cocción.

Los resultados de CA obtenidos en esta investigación fueron má altos que los reportados por Su *et al.* (2007), quienes evaluaron la capacidad antioxidante de los extractos acetona/agua (50:50, v/v) de hojas de orégano y reportaron valores obtenidos por los métodos de ORAC (1230  $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$  muestra) y ABTS<sup>•+</sup> (337  $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$  muestra). Las diferencias en los resultados de la capacidad antioxidante<sup>3</sup> para los extractos de orégano de monte pueden estar relacionadas con el solvente y el material vegetal usado durante la extracción (Gutiérrez *et al.*, 2018).

El ensayo de decoloración del  $\beta$ -caroteno ha sido empleado para evaluar la capacidad antioxidante de aceites esenciales y de extractos, obtenidos de diferentes matrices como hojas, semillas y hongos (Sarrazin *et al.*, 2015). Pero, hasta la fecha no se encontraron reportes sobre la capacidad antioxidante evaluada por este método para extractos de las matrices vegetales bajo estudio. Ninguno de los extractos evaluados presentó capacidad antioxidante superior a los antioxidantes de referencia. Esto se puede explicar, ya que en el ensayo de decoloración del  $\beta$ -caroteno, los antioxidantes hidrofóbicos presentan mayor eficiencia en la capacidad antioxidante que los antioxidantes hidrofílicos (flavonoides), por la disponibilidad de estos en las fases; aquellos que se combinan mejor en la fase lipídica interactuarán más eficientemente con los radicales peroxilo (Miraliakbari, 2008).

El ensayo de decoloración del  $\beta$ -caroteno podría ser comparado con el método de peroxidación lipídica, debido a que en ambos métodos se emplea ácido linoleico, que se oxida para generar radicales peroxilo ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), los cuales reaccionan con el  $\beta$ -caroteno para formar un radical de  $\beta$ -caroteno estable, que pierde sus propiedades cromóforas y su color naranja característico, lo que se puede observar por absorbancia a  $\lambda=470$  nm (Jayaprakasha, 2001),

mientras que en el método de peroxidación lipídica, se cuantifica el hexanal, producto final de la oxidación de ácidos linoleico y linolénico (Stashenko *et al.*, 2000).

Khan *et al.* (2014) reportaron que tanto los extractos etanólicos como extractos metanólicos de flores de *H. rosa-sinensis* presentaron porcentajes de inhibición de la peroxidación lipídica del 61.2% y 75.8%, respectivamente, sin embargo, estos valores fueron menores que el del BHT el del (82%). Recientemente, Kalpana *et al.* (2021), reportaron que las antocianinas extraídas de flores rojas de *H. rosa-sinensis* redujeron la peroxidación lipídica y los niveles de radicales libres en los tejidos hepáticos de ratas diabéticas, aumentando la defensa antioxidante enzimática y no enzimática.

Elansary y Mahmoud (2015), reportaron que los extractos acuosos y metanólicos de hojas de *Origanum majorana* exhibieron actividades antioxidantes altas por los ensayos de decoloración de  $\beta$ -caroteno (81-90%) y DPPH<sup>\*</sup> (IC<sub>50</sub> 8.2-9.3  $\mu$ g/mL). De los extractos evaluados en esta investigación, el extracto de *L. origanoides*, quimiotipo timol, tuvo la capacidad antioxidante más alta en el ensayo  $\beta$ -caroteno, sin embargo, 10 veces más baja que la inferior al BHT.

Damasceno *et al.* (2011), evaluaron la capacidad antioxidante del aceite esencial y de los extractos metanólicos y acuosos, obtenidos con acetado de etilo de *Lippia grandis* y reportaron que el aceite esencial presentó el mayor porcentaje de inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno (42.5%) en comparación con el de los extractos (21.5-31.8%), sin embargo, ninguno superó a los antioxidantes de referencia BHA (86.9%) y Trolox<sup>®</sup> (87.5%). Sarrazin *et al.* (2015) reportaron porcentajes de inhibición de 85% para el aceite

esencial de *L. origanoides* y de 93% para el Trolox<sup>®</sup>, empleando la misma metodología. En esta investigación ninguno de los extractos obtenidos de *L. origanoides*, presentó capacidad antioxidante superior a la del BHT y  $\alpha$ -tocoferol.

En la **Tabla 35** se presentan los resultados de la capacidad antioxidante medida por el ensayo HPLC-ABTS<sup>++</sup> para algunos ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoles, flavonas, flavanonas y flavanoles. Los resultados para las diferentes sustancias se expresaron en  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de sustancia y  $\text{mmol Trolox}^{\text{®}}/\text{mmol}$ , y se compararon con los reportados por Tabart *et al.* (2009), Awika *et al.* (2005), y Cai *et al.* (2006). Los números de la **Tabla 35** corresponden a los compuestos que se presentan en el perfil cromatográfico obtenido por HPLC con derivatizador de sustancias de referencia antes (DAD, A.  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, B.  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>++</sup> (**Figura 26**).

El aporte a la capacidad antioxidante medida por el ensayo HPLC-ABTS<sup>++</sup> de cada uno los compuestos presentes en los extractos hidro-alcohólicos de *H. rosa-sinensis*, y en los extractos hidro-alcohólicos y obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de la biomasa residual de *L. origanoides* se presentan en los **Anexos A, C y E**. La identificación de los compuestos por HPLC-DAD-ABTS<sup>++</sup>, se realizó comparando los tiempos de retención y espectros UV-Vis, de las sustancias con los patrones de referencia reportados en la **Tabla 35** y datos de la literatura (Kasiotis *et al.*, 2017). Los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC con derivatizador poscolumna, para cada una de las matrices estudiadas se reportan en los **Anexos B y D**.

**Tabla 35.**

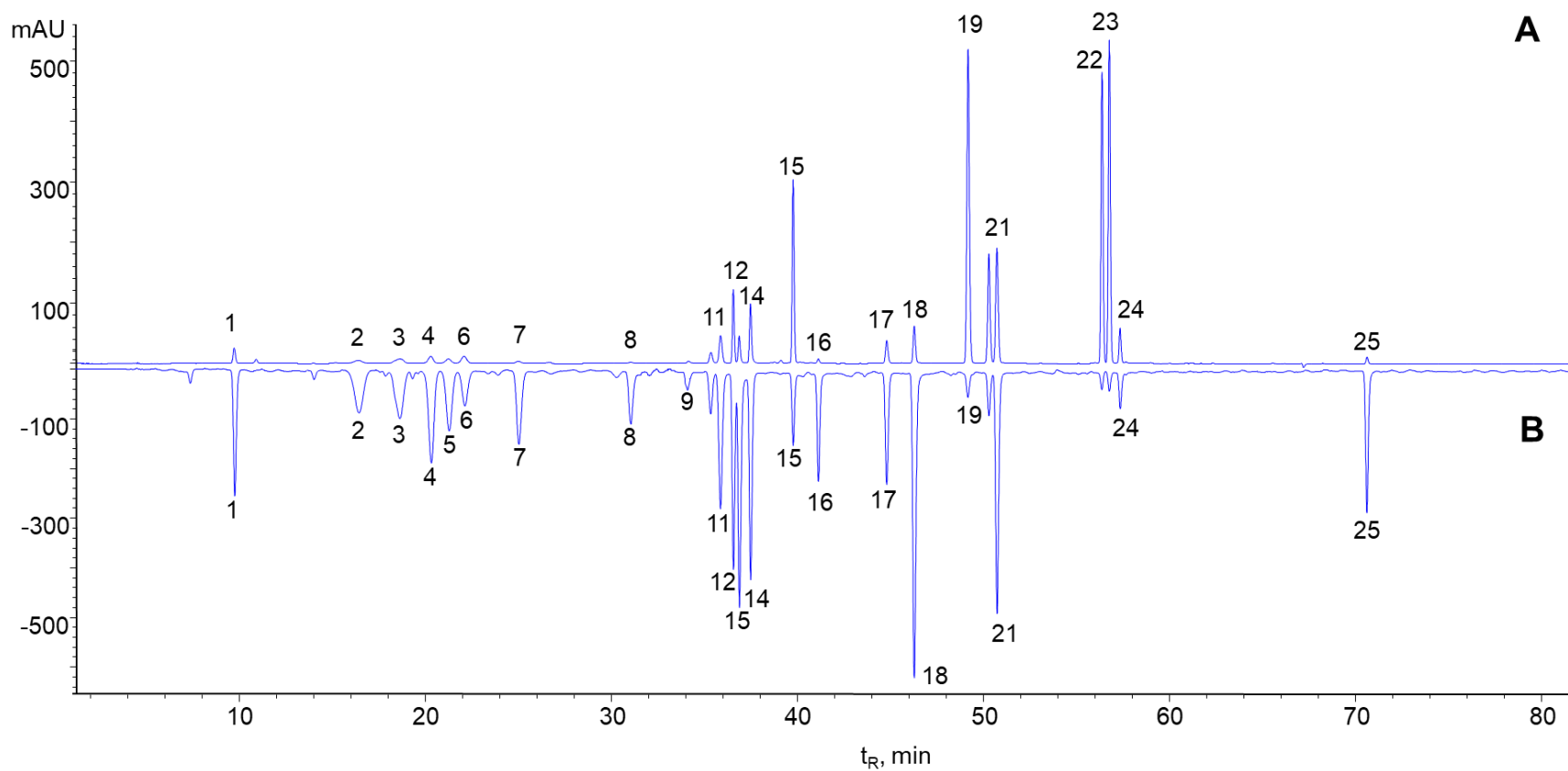
*Capacidad antioxidante, medida por HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup>, de sustancias de referencia de compuestos fenólicos, utilizados en este estudio.*

Nº Fig. 26	tr, min	Compuesto	λ, nm	μmol Trolox <sup>®</sup> /g sustancia*	mmol Trolox <sup>®</sup> /mmol
1	9.7	Ácido gálico	226 <sup>max</sup> , 272	13200 ± 488	2.2 ± 0.08
2	16.4	Cianidina-3,5 glucósido	278 <sup>max</sup> , 514	9028 ± 167	5.5 ± 0.10
3	18.6	Delfinidina-3-glucósido	276, 445 <sup>h</sup> , 524 <sup>max</sup>	13100 ± 87	6.1 ± 0.04
4	20.3	Ciandina-3-glucósido	280, 445 <sup>h</sup> , 516 <sup>max</sup>	11900 ± 185	5.4 ± 0.08
5	21.3	Ciandina-3-rutinósido	280, 516 <sup>max</sup>	10400 ± 567	6.1 ± 0.34
6	22.1	Pelargonidina-3-glucósido	276, 310, 430, 500 <sup>max</sup>	7000 ± 93	3.1 ± 0.04
7	25.0	Epicatequina	227 <sup>max</sup> , 280	6020 ± 20	1.8 ± 0.01
8	31.1	Cianidina	276, 435 <sup>h</sup> , 524 <sup>max</sup>	15300 ± 956	4.4 ± 0.27
9	34.2	Pelargonidina	268, 330, 424, 513 <sup>max</sup>	3400 ± 115	0.9 ± 0.03
10	35.4	Eriodictiol-glucósido	230, 284 <sup>max</sup> , 330 <sup>h</sup>	5020 ± 25	2.3 ± 0.01
11	35.9	Taxifolina	245 <sup>max</sup> , 305 <sup>h</sup> , 368	6600 ± 224	2.0 ± 0.07
12	36.6	Rutina	256 <sup>max</sup> , 295, 355	4460 ± 17	2.7 ± 0.01
13	36.9	Ácido elágico	254 <sup>max</sup> , 305, 368	45400 ± 404	13.7 ± 0.12
14	37.5	Quercetina-3-glucósido	256 <sup>max</sup> , 295, 354	6210 ± 48	2.8 ± 0.02
15	39.8	Kaempferol-3-glucósido	266 <sup>max</sup> , 305 <sup>h</sup> , 348	910 ± 25	0.4 ± 0.01
16	41.1	Ácido rosmarínico	228, 295 <sup>h</sup> , 330 <sup>max</sup>	20980 ± 217	7.6 ± 0.08
17	44.8	Eriodictiol	230, 288 <sup>max</sup> , 330 <sup>h</sup>	5790 ± 64	1.7 ± 0.02
18	46.3	Quercetina	254, 314 <sup>h</sup> , 370 <sup>max</sup>	16170 ± 71	4.9 ± 0.02
19	49.2	Naringenina	230 <sup>max</sup> , 289, 320 <sup>h</sup>	330 ± 9	0.1 ± 0.01
20	50.3	Apigenina	222 <sup>max</sup> , 268, 337	1430 ± 33	0.4 ± 0.01
21	50.7	Kaempferol	222 <sup>max</sup> , 266, 367	6190 ± 72	1.7 ± 0.02
22	56.4	Sakuranetina	288 <sup>max</sup> , 324 <sup>h</sup>	320 ± 22	0.1 ± 0.01
23	56.8	Pinocembrina	290 <sup>max</sup> , 324 <sup>h</sup>	330 ± 3	0.1 ± 0.01
24	57.4	Galangina	266 <sup>max</sup> , 310, 360	2820 ± 93	0.8 ± 0.03
25	70.6	BHT	230 <sup>max</sup> , 278	2470 ± 44	0.5 ± 0.01

\* Valor promedio ± desviación estándar (n=3).

**Figura 26.**

*Perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de sustancias de referencia de compuestos fenólicos, antes A.  $\lambda=270\text{ nm}$  y después B.  $\lambda=734\text{ nm}$  de su reacción con el catión-radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$ . La identificación de los picos aparece en la **Tabla 35**.*



Dentro de los compuestos identificados en las matrices bajo estudio, se detectaron principalmente antocianinas, flavonoles, flavan-3-oles, flavonas, flavanonas, entre otros. La capacidad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de su estructura química (Cai *et al.*, 2006; Plaza *et al.*, 2014). Según Plaza *et al.* (2014), existen características en la estructura química de los flavonoides que pueden contribuir a la capacidad antioxidante, entre las cuales se destacan las siguientes: **a**). La presencia de un grupo catecol en el anillo B; **b**). Un grupo pirogalol (grupos hidroxilo en las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B) combinado con la función 4-oxo en el anillo de pirano anillo C; **c**). La presencia de un enlace doble en posición C-2, C-3 y **d**). La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5.

De la **Tabla 35**, se puede observar que los ácidos fenólicos (elálgico y rosmarínico), la quercetina y la cianidina fueron los compuestos con mayor capacidad antioxidante, debido a que sus estructuras químicas cumplen con varias características como el grupo catecol que da mayor estabilidad al producto de oxidación o varios enlaces dobles que permiten la deslocalización de electrones. Según Cai *et al.* (2006) la glicosilación de los flavonoides disminuye su capacidad antioxidante en comparación con las agliconas correspondientes debido al efecto del impedimento estérico; el mismo fenómeno ocurre cuando los grupos hidroxilo se metilan (Xia *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos en esta investigación, corroboraron la disminución del potencial antioxidante en los derivados glicosilados de cianidina, quercetina, kaempferol y eriodictiol.

Según las investigaciones de varios autores, los terpenos, flavonoides y los ácidos fenólicos del orégano tienen propiedades antioxidantes (Cortés *et al.*, 2021; Leyva *et al.*,

2016; Stashenko *et al.*, 2008). De las flavanonas (eriodictiol, pinocembrina, naringenina, hesperetina y sakuranetina) presentes en los extractos de *L. origanoides* solo el eriodictiol cumple con el grupo catecol en el anillo B, y con la función 4-oxo en el anillo C. Según los resultados obtenidos por el método HPLC-ABTS<sup>+</sup>, la capacidad antioxidante del eriodictiol fue al menos 17 veces superior a la de las otras flavanonas estudiadas. A pesar de que el eriodictiol y sus derivados glicosilados carecen del doble enlace en las posiciones C2-C3, estos compuestos aportaron principalmente a la capacidad antioxidante (34-48%) de los extractos hidro-alcohólicos de los tres quimiotipos estudiados.

La pinocembrina y la sakuranetina, cumplen solamente con la función 4-oxo en el anillo C en sus estructuras, también contribuyeron a la capacidad antioxidante en los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de *L. origanoides*. La sakuranetina aportó el 30% de la capacidad antioxidante en el extracto de *L. origanoides*, quimiotipo carvacrol, mientras que la pinocembrina, el 23%, en el del quimiotipo felandreno. El eriodictiol, la sakuranetina y la pinocembrina han sido compuestos detectados en propóleos griegos que contribuyen a la capacidad antioxidante (Kasiotis *et al.*, 2017).

Según Deng *et al.* (2020), el eriodictiol se considera como la mejor flavanona natural, debido a sus excelentes funciones terapéuticas en la neuroprotección, la actividad cardioprotectora, la sustancia tiene efectos analgésicos, antioxidantes y antiinflamatorios, antipiréticos, entre otros. Bower *et al.* (2014), encontraron una correlación positiva entre el contenido total de fenoles y los valores de capacidad antioxidante obtenidos para el eriodictiol, naringenina, hispidulina y circimaritina presentes en los extractos de *O. majorana*.

Cojocariu *et al.* (2019), reportaron que el eriodictiol, presente como eriodictiol 7-*O*-glucósido en el extracto de *Chrysanthellum americanum* aumentó la actividad antioxidante enzimática y no enzimática en el sistema circulatorio, el hígado y el colon de ratas *Wistar* con síndrome de intestino irritable. Xia *et al.* (2019), también, reportaron que el eriodictiol contribuyó notoriamente una contribución a la actividad antioxidante en extractos de hojas de *Artemisia argyi*.

De todos los compuestos identificados en las matrices bajo estudio, la quercetina y sus derivados glicosilados fueron los únicos flavonoles que cumplían con la mayoría de las características en la estructura química que, según Plaza *et al.* (2014), podían contribuir a la capacidad antioxidante. La quercetina tuvo una actividad antioxidante alta (>16000  $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}$ /g sustancia), además, en los extractos hidro-alcohólicos de *L. origanoides*, quimiotipos timol y carvacrol la mezcla luteolina-quercetina aportó entre el *ca.* 18% de la capacidad antioxidante total. Timoteo *et al.* (2015), sugieren que la luteolina y la luteolina-glucurónido son las moléculas responsables de la actividad antioxidante en diferentes quimiotipos de *Lippia alba*. Los derivados glicosilados de quercetina fueron los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante en los cultivares rosado (43%), naranja (57%) y amarillo (62%) de *H. rosa-sinensis*, estudiados en el presente trabajo, mientras que en el cultivar rojo los derivados glicosilados de quercetina solo aportaron el 9% de la capacidad antioxidante.

Según Boots *et al.* (2011), la quercetina es el flavonol que secuestra radicales (ROS, RNS) más eficiente tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, incluso es varias veces más activo mayor que los antioxidantes endógenos, *e.g.*, el glutatión y la vitamina E (Arts *et al.*, 2004),

lo que se puede explicar por la presencia de dos farmacóforos antioxidantes (grupo catecol en el anillo B, y grupos OH las posiciones 3,5 y 7 de los anillos A-C) dentro de la molécula que tienen la configuración para la eliminación de radicales libres (Heijnen *et al.*, 2002).

La galangina es un flavonol similar a la quercetina, sin embargo, las dos se diferencian en el grupo catecol, que la quercetina posee en el anillo B. Según los análisis realizados por el método HPLC-ABTS<sup>+</sup>, la galangina tuvo una actividad antioxidante similar a la del BHT (>2800  $\mu\text{molTrolox}^{\circledR}/\text{g}$  sustancia), además, aportó el 69% a la capacidad antioxidante del extracto, obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico de *L. origanoides*, quimiotipo felandreno. Según Aloud *et al.* (2017), la galangina disminuyó el estrés oxidativo y aumentó el estado antioxidante en ratas diabéticas, lo que fue asociado con la presencia de los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 que donan fácilmente el hidrógeno para formar una radical fenoxilo estable (Plaza *et al.*, 2014).

Dentro del grupo de antocianinas estudiadas, la cianidina tuvo la actividad antioxidante más alta (>15000  $\mu\text{molTrolox}^{\circledR}/\text{g}$  sustancia), que fue al menos seis veces superior a la del BHT. Esta propiedad antioxidante de la cianidina se ha atribuido a su capacidad de deslocalización de electrones, además, el átomo de oxígeno, cargado positivamente en el anillo C, lo convierte a un mejor antioxidante donador de hidrógeno en comparación con proantocianidinas oligoméricas y otros flavonoides (Kong *et al.*, 2003).

La cianidina-soforósido fue el componente mayoritario detectado en el cultivar rojo de *H. rosa-sinensis*, y fue el responsable de aportar el menos el 50% de la capacidad antioxidante, junto con la mezcla catequina-ciandina-3-glucósido que aportó el 16% a la

capacidad antioxidante. En los cultivares naranja y rosado, la cianidina-soforósido también se detectó, pero en concentraciones más bajas que en el cultivar rojo, la sustancia aportó el 15% y 16% de la CA, respectivamente. La cianidina-3-glucósido y la cianidina-sambubiósido detectadas en los cultivares rojos, rosado y naranjas de *H. rosa-sinensis* han sido encontrados en *Hibiscus sabdariffa* como potentes antioxidantes (Maciel *et al.*, 2018).

A pesar de que el material vegetal de *L. origanoides* estudiado correspondía a la biomasa residual, obtenida después el proceso de destilación, y obtención aceite esencial, según los resultados obtenidos por el método HPLC-ABTS<sup>+</sup>, se detectaron los terpenos-fenólicos, timol y carvacrol, en los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico, además se determinó que estos compuestos, fueron los responsables de aportar principalmente al potencial antioxidante de sus respectivos quimiotipos. El timol contribuyó al 71% de la actividad antioxidante, mientras que la mezcla timol-carvacrol proporcionó el 35% de la capacidad antioxidante en el quimiotipo carvacrol. Ündeğer *et al.* (2009), reportaron que el timol y el carvacrol tuvieron actividad antioxidante moderada *in vitro*, además, indicaron que la cantidad de ROS neutralizados por las sustancias timol y carvacrol dependían de la concentración evaluada, el timol disminuía la producción de ROS, mientras que con el carvacrol tenía el efecto contrario, con lo que se evidenció que no fue raro que en los compuestos fenólicos se haya observado una actividad tanto antioxidante como prooxidante, a diferentes dosis.

Huang *et al.* (2005), resaltan que no existe un método único para evaluar la capacidad antioxidante en diferentes matrices: lo recomendable es emplear varios ensayos basados en diferentes mecanismos de acción. En este trabajo, se usaron cuatro métodos, a saber: ORAC,

ABTS<sup>+</sup>,  $\beta$ -caroteno y HPLC-ABTS<sup>+</sup>. Sin embargo, para estandarizar los resultados, usando Trolox<sup>®</sup> como referencia, y para poder seleccionar el extracto que presentó el mejor potencial antioxidante, se propuso calcular una medida matemática, a la cual se llamó índice de capacidad antioxidante (ICA), que permitió ponderar los resultados y jerarquizarlos. En la **Tabla 36**, se presentan los resultados del índice de la capacidad antioxidante calculado como se reporta en la **Sección 4.5.1.5**, para todos los extractos evaluados.

**Tabla 36.**

Valores del ICA calculados para extractos de *H. rosa-sinensis* y de *L. origanoides*.

Planta	Quimiotipo o cultivar	Tipo de extracto	Índice de Capacidad antioxidante (ICA)	#
<i>L. origanoides</i>	Timol	Hidro-alcohólico	1.00 <sup>a</sup>	1
	Felandreno		0.59 <sup>a</sup>	2
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Roja	Hidro-alcohólico	0.41 <sup>a</sup>	3
	Rosada		0.34 <sup>a</sup>	4
	Naranja		0.32 <sup>a</sup>	5
	Amarilla		0.24 <sup>a</sup>	6
<i>L. origanoides</i>	Felandreno	Supercrítico	0.18 <sup>b</sup>	7
	Carvacrol	Hidro-alcohólico	0.17 <sup>a</sup>	8
	Timol	Supercrítico	0.03 <sup>b</sup>	9
	Carvacrol	Supercrítico	0.00 <sup>b</sup>	10

Según los resultados presentes en la **Tabla 36**, el extracto hidro-alcohólico de *L. origanoides*, quimiotipo timol, mostró las mejores propiedades antioxidantes, medidas por los métodos evaluados, seguido de los extractos hidro-alcohólicos de *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, y de flores de *H. rosa-sinensis*, cultivar rojo.

### 4.2.2 Actividad fotoprotectora

En la **Tabla 37** se muestran los resultados del factor de protección solar (FPS) obtenidos para los extractos de *H. rosa-sinensis* y de *L. origanoides*. Según la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (ANVISA), una sustancia con FPS  $\geq 6$  es aceptada para emplearse como ingrediente en productos fotoprotectores (ANVISA, 2019), siempre y cuando no sea tóxica (citotóxica, genotóxica, etc) o alergénica.

**Tabla 37.**

*Valores de factor de protección solar obtenidos para los extractos de flores de H. rosa-sinensis y de biomasa residual de L. origanoides.*

Muestra	Cultivar	Extracto	FPS, $n=3$	Índice de protección solar (IPS)*
<i>H. rosa-sinensis</i>	Rojo	Hidro-alcohólico	6.09 $\pm$ 0,009	0.4
	Naranja		5.17 $\pm$ 0.097	0.2
	Rosado		4.37 $\pm$ 0.050	0.3
	Amarillo		2.0 $\pm$ 0.02	0.0
<i>L. origanoides</i>	Timol	Hidro-alcohólico	12.33 $\pm$ 0.035	1.0
		Supercrítico	2.34 $\pm$ 0.021	0.0
	Carvacrol	Hidro-alcohólico	4.44 $\pm$ 0.016	0.2
		Supercrítico	2.71 $\pm$ 0.014	0.1
	Felandreno	Hidro-alcohólico	8.52 $\pm$ 0.013	0.6
		Supercrítico	2.89 $\pm$ 0.033	0.1
Mezcla 1 <sup>a</sup>	T-F	Hidro-alcohólico	9.18 $\pm$ 0.012	0.7
Mezcla 2 <sup>b</sup>	HR-HN	Hidro-alcohólico	5.22 $\pm$ 0.065	0.3

\*El IPS corresponde a los valores normalizados del FPS, en una escala de 0 a 1, siendo 0 el valor mínimo y 1 el valor máximo.

<sup>a</sup> La **Mezcla 1**, está conformada por la combinación de los extractos hidro-alcohólicos de *L. origanoides*, quimiotipos timol y felandreno.

<sup>b</sup> La **Mezcla 2**, está conformada por la combinación de los extractos de flores de *H. rosa-sinensis*, cultivares rojo y naranja.

De la **Tabla 37**, se observa que los extractos hidro-alcohólicos, obtenidos de biomasa residual de *L. origanoides*, quimiotipos timol y felandreno, presentaron los valores de FPS más altos. Sin embargo, se prepararon dos mezclas adicionales para evaluar el efecto sinérgico, aditivo o antagónico entre los extractos que mostraron la mayor actividad fotoprotectora. La **Mezcla 1** se preparó en una relación 1:1 de los extractos hidro-alcohólicos de los quimiotipos timol y felandreno, y la **Mezcla 2**, en una relación 1:1 de los extractos de flores de los cultivares rojo y naranja. Se observó que el valor de FPS de las mezclas, no superó -en ninguno de los casos-, el valor más alto obtenido para cada extracto individual, con lo que se puede concluir que se dio un efecto antagónico en las mezclas evaluadas.

En el caso de *L. origanoides*, el valor de la mezcla tuvo una diferencia significativa con respecto al extracto del quimiotipo felandreno ( $p < 0.050$ ), según la prueba de *t*. No obstante, fue menor que el obtenido para el quimiotipo timol. En los extractos de *Hibiscus*, se presentó el mismo fenómeno, dado que el valor de la mezcla no presentó diferencias significativas con respecto a los dos extractos evaluados ( $p > 0.050$ ), según la prueba *t*.

#### 4.2.3 Actividad citotóxica

En la **Tabla 38**, se comparan los perfiles de citotoxicidad y se presenta la agrupación jerárquica, según las concentraciones citotóxicas medias ( $CC_{50}$ ) determinadas para los extractos de cuatro cultivares de flores de *H. rosa-sinensis*, y para los extractos de tres quimiotipos de *L. origanoides*, obtenidos de biomasa residual, después de la destilación del material vegetal. Las categorías de citotoxicidad, adoptadas para la interpretación de la

actividad, se basaron en los valores de concentración que reducían la viabilidad al 50% (CC<sub>50</sub>), a saber: baja (>250 µg/mL), media (101-250 µg/mL), alta (≤ 100 µg/mL).

**Tabla 38.**

*Perfiles de citotoxicidad de extractos de cuatro cultivares de flores de H. rosa sinensis, y de tres quimiotipos de biomasa residual de L. origanoides.*

Planta	Quimiotipo o cultivar	HEK293	HEPG2	MRC5	XP12RO	XP4PA	ΣJPI
<i>H. rosa sinensis</i>	Rojo						1,0
	Rosado						1,0
	Amarillo						1,0
	Naranja						0,8
<i>L. origanoides</i>	Carvacrol <sup>a</sup>						0,4
	Felandreno <sup>a</sup>						0,4
	Timol <sup>a</sup>						0,4
	Timol <sup>b</sup>						0,3
	Carvacrol <sup>b</sup>						0,2
	Felandreno <sup>b</sup>						0,2

a: Obtenido con extracción con solventes.

b: Obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico

ΣJPI: Sumatoria de la jerarquía ponderada individual

**Línea celular HEK293:** Células humanas de riñón embrionario

**Línea celular MRC-5 :** Células humanas de fibroblastos normales de pulmón

**Línea celular HEPG-2:** Células humanas de hígado –carcinoma

**Línea celular XP4PA:** Células humanas de fibroblastos de xeroderma pigmentoso embrionario

**Línea celular XP12RO:** Células humanas de fibroblastos de xeroderma pigmentoso de piel

Los extractos analizados se clasificaron según su tendencia a la toxicidad, siguiendo la metodología de Velandia *et al.* (2016), para cada extracto se calculó la jerarquía ponderada individual (JPI) con base en la concentración citotóxica media CC<sub>50</sub>, para cada línea celular.

La sumatoria de las jerarquías individuales ( $\Sigma JPi$ ) se usó como indicador de similitud y las muestras se organizaron en orden descendente, según este valor.

De la **Tabla 38**, se observa que en los primeros lugares se ubicaron los extractos con  $CC_{50}$  entre 251 y 500  $\mu\text{g/mL}$ ; los primeros extractos se consideraron los menos citotóxicos y, en orden descendente, fueron en el siguiente rango: *H. rosa-sinensis* cultivares rojo ( $1 \leq$  rosado ( $1 \leq$  amarillo ( $1 <$  naranja ( $0.8$ ). En los últimos lugares se ubicaron los extractos de *L. origanoides*, obtenidos con  $\text{CO}_2$  supercrítico, con  $CC_{50}$  entre 100 y 250  $\mu\text{g/mL}$ , donde se muestra que para *L. origanoides* el orden de citotoxicidad fue el siguiente: timol ( $0.3 <$  carvacrol ( $0.2 \leq$  felandreno ( $0.2$ ).

En todas las líneas celulares estudiadas, los cuatro cultivares de *H. rosa-sinensis* presentaron toxicidad baja ( $> 250 \mu\text{g/mL}$ ), con lo que se concluyó que este tipo de extractos no causaba ningún efecto sobre las líneas celulares normales (sanas) y las cancerígenas. Estos resultados fueron congruentes con los reportados por Ali *et al.* (1996) y dos Santos Júnior *et al.* (2010), quienes no consideraron tóxicos los extractos metanólicos de hojas de *H. rosa-sinensis*, evaluados en las líneas celulares HELA (carcinoma cervical), B16 (piel murina), HL-60 (leucemia humana), MCF-7 (cáncer de mama) y HCT-8 (colon humano).

Entre los compuestos, identificados en las flores de *H. rosa-sinensis*, se encontraron flavonoides, del tipo antocianinas (cianidina-soforósido y cianidina-3-glucósido), flavonoles (quercetina, kaempferol y sus derivados glicosilados), flavanoles (catequina y epicatequina), entre otros, que podían ser los responsables de la ausencia de la citotoxicidad en todas las líneas celulares evaluadas (Lopez *et al.*, 2002). Sin embargo, según los resultados reportados

por Ali, Ö. (2010) y Goldberg *et al.* (2017), los extractos acuosos de flores sí podían inhibir o detener el crecimiento celular, asociado a los compuestos de bajo peso molecular presentes en los extractos.

La actividad citotóxica de *L. origanoides* se ha evaluado principalmente para el aceite esencial. Según Velandia *et al.* (2016), el AE de *L. origanoides* presenta actividad citotóxica media, evaluada en las líneas celular HEK293 (riñón embrionario), HEPG2 (carcinoma hepático), HELA MCF7, B16F10 (piel de ratón) y VERO (riñón de mono), la  $CC_{50}$  varió en el rango de 156.6 a 192.6  $\mu\text{g/mL}$ . Neira *et al.* (2018), reportaron que los aceites esenciales de *L. origanoides* mostraron efectos tóxicos en las células THP-1 (monocitos leucémicos humanos), la toxicidad varió en el siguiente orden: quimiotipo carvacrol ( $CC_{50}$ :  $43.72 \pm 10 \mu\text{g/mL}$ ) > timol ( $CC_{50}$ :  $52.5 \pm 8.1 \mu\text{g/mL}$ ) > felandreno ( $CC_{50}$ :  $76.3 \pm 7.5 \mu\text{g/mL}$ ). Quintero *et al.* (2017) reportaban que el aceite esencial tenía propiedades anti-genotóxicas, que se potencializaban, según el quimiotipo de la planta.

En cuanto a la actividad de los extractos, Raman *et al.* (2018) reportaron que el extracto obtenido con  $\text{CO}_2$  supercrítico de hojas y tallos de *L. origanoides*, alteraba la fosforilación oxidativa, y desencadenaba la apoptosis irreversible en células cancerígenas de glándula mamaria (MDA-MB-231). Sivira *et al.* (2011), encontraron que el extracto etanólico de *L. origanoides* fue tóxico para el ácaro *Tetranychus cinnabarinu*, y, por tanto, el extracto presentaba actividad acaricida.

En esta investigación, se encontró que los extractos hidro-alcohólicos, obtenidos a partir de la biomasa residual de *L. origanoides*, quimiotipos felandreno y carvacrol,

presentaron la toxicidad baja ( $> 250 \mu\text{g/mL}$ ) para las líneas celulares HEK-293 y HEPG-2, y toxicidad media (101-250  $\mu\text{g/mL}$ ) para los fibroblastos MRC-5. El extracto de *L. origanoides* quimiotipo timol, tuvo toxicidad baja ( $> 250 \mu\text{g/mL}$ ), para HEPG-2, y toxicidad media (101-250  $\mu\text{g/mL}$ ), para HEK-293. Tanto los extractos hidro-alcohólicos como los obtenidos con  $\text{CO}_2$  supercrítico, presentaron la toxicidad alta ( $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ ) para las líneas cancerígenas de fibroblastos XP4PA-SV y XP12RO-SV, que pueden ser más susceptibles a la muerte celular debido a que expresan niveles más altos de la proteína supresora p53 (Washio *et al.*, 1999).

#### 4.2.4 *Actividad sensibilizante*

Antes de evaluar la actividad sensibilizante, se realizó un tamizaje con el fin de descartar aquellos extractos que presentaron la toxicidad alta, la actividad antioxidante baja y el factor de protección solar bajo, esto debido a que el interés de esta investigación se centró en obtener extractos que se puedan usar como posibles ingredientes en productos cosméticos. Se tuvieron en cuenta estos criterios para el ensayo de sensibilización, y no se evaluaron los extractos obtenidos con  $\text{CO}_2$  supercrítico de *Lippia*, que no cumplían con los criterios expuestos anteriormente. Los monocitos de origen humano, al ser estimulados lipopolisacáridos (LPS) tienen la capacidad de producir IL-8 en concentraciones fácilmente detectables, es por esto, que la línea celular THP-1 se seleccionó para evaluar el efecto sensibilizante de los extractos hidro-alcohólicos (Nukada, *et al.*, 2008). En la **Tabla 39**, se reportan los valores de las concentraciones de interleuquina 8 (IL-8), secretada por las células de monocitos humanos (THP-1), en presencia de los extractos hidro-alcohólicos de

los cuatro cultivares de *H. rosa-sinensis* y de los extractos obtenidos de la biomasa residual de tres quimiotipo de *L. origanoides*.

**Tabla 39.**

*Evaluación de la actividad sensibilizante en células THP-1 de los extractos de flores de H. rosa-sinensis y de extractos, obtenidos de biomasa residual de L. origanoides.*

Muestra	Quimiotipo o cultivar	IL-8 [pg/mL]	<i>p</i> *	Índice de actividad sensibilizante (IAS)**
<i>H. rosa-sinensis</i>	Rojo	200 ± 110	0.14	0.1
	Rosado	140 ± 21	0.17	0.0
	Amarillo	220 ± 34	0.97	0.2
	Naranja	300 ± 100	0.57	0.1
<i>L. origanoides</i>	Timol	270 ± 48	0.29	0.1
	Carvacrol	1040 ± 50	0.01	1.0
	Felandreno	500 ± 71	0.98	0.4
Sin sensibilizante		250 ± 77	-	-
Con sensibilizante (2-aminofenol)		1080 ± 44	0.01	-

\* Cada ensayo representa el valor promedio ± la desviación estándar de tres experimentos independientes.

\*\*El IAS corresponde a los valores normalizados de IL-8, secretados por las células THP-1, en presencia de los extractos hidro-alcohólicos, en una escala de 0 a 1, donde 0 es el valor mínimo y 1 el valor máximo.

Las células tratadas con el extracto de *L. origanoides*, quimiotipo carvacrol, incrementaron cuatro veces la liberación de IL-8 en comparación con las células sin tratamiento: este extracto produjo el mayor efecto sensibilizante (IAS=1) de todas las muestras analizadas. La actividad de estos extractos no mostró diferencias honestamente significativas ( $p < 0.050$ ), según la prueba de *Tukey*, con respecto a las células sin sensibilizante. De los extractos florales evaluados, ninguno incentivó la secreción de IL-8, en monocitos de sangre periférica, con lo cual no se exhibió un efecto sensibilizante asociado a dermatitis alérgica de contacto. Sin embargo, para el caso de *L. origanoides*, de los tres

quimiotipos estudiados, el extracto del quimiotipo carvacrol produjo mayor efecto sensibilizante ( $1040 \pm 50$  pg/mL) de IL-8, en comparación con los extractos de *L. origanoides*, quimiotipos felandreno ( $500 \pm 71$  pg/mL) y timol ( $270 \pm 48$  pg/mL), con lo cual el extracto de *L. origanoides*, quimiotipo carvacrol, fue descartado, por ser catalogado como alérgeno promotor de dermatitis alérgica de contacto (DAC).

Según Parise *et al.* (2015), los compuestos sensibilizantes son aquellos que incrementan la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. El incremento de IL-8, como indicador temprano de respuesta inmune, se reconoce como señalizador de sensibilización a la dermatitis alérgica de contacto (Nukada *et al.*, 2008). Los extractos naturales son mezclas complejas que pueden contener componentes que son considerados como potenciales sensibilizadores, por ejemplo, el absoluto extraído de *Evernia prunastri*, que ha demostrado que el ácido úsnico, y los fenilbenzoatos, presentes en el absoluto, pueden provocar respuestas alérgicas en algunas personas (Bernard *et al.*, 2003 y Thune *et al.*, 1982).

Neira *et al.* (2018) evaluaron el efecto de irritación dérmica e hipersensibilidad de contacto en ratones hembra nulíparas BALB/c de ocho a diez semanas de edad, con aceites esenciales de tres quimiotipos de *L. origanoides*. Los autores reportaron que el tratamiento con los aceites de los quimiotipos timol y carvacrol, sin diluir (100%), indujeron eritema y edema de severo a grave, en la zona expuesta de los ratones. El aceite esencial, del quimiotipo felandreno no produjo ningún tipo de irritación o enrojecimiento. Los aceites esenciales de *L. origanoides* quimiotipos timol y carvacrol, en concentración del 50%, mostraron un ligero enrojecimiento en la zona de exposición durante las primeras 24 h, efecto que, posteriormente, fue reversible, al 10%, estos aceites no fueron irritantes.

De los seis extractos, a los que se les evaluó la actividad sensibilizante, solo el extracto hidro-alcohólico de *L. origanoides*, quimiotipo carvacrol, puede ser catalogado como alérgeno promotor de DAC, ya que las células THP-1 estimuladas con este extracto y con 2-aminofenol (control positivo) produjeron concentraciones de IL-8 en el rango de 1040-1080 pg/mL. Por el contrario, los extractos hidroalcohólicos de los cuatro cultivares de *H. rosa-sinensis* y del extracto de *L. origanoides*, quimiotipo timol, no tuvieron efecto sensibilizador, debido a que la concentración de IL-8 en células THP-1 no tratadas y tratados fue similar. Skiba *et al.* (2016), demostraron que los flavonoides quercetina, kaempferol, galangina y algunas flavonas lograron inhibir la liberación de IL-8 en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) infectadas con *H. pylori*. En esta investigación, los flavonoides presentes en los extractos hidro-alcohólicos podrían ser los responsables de la ausencia de producción de IL-8.

En la **Tabla 40**, se muestran los valores de la actividad biológica total calculada como se describe en la **Sección 4.5.4**, para los extractos de *H. rosa-sinensis* y de los extractos, obtenidos biomasa residual de *L. origanoides*; con base en estos resultados fue posible seleccionar el extracto hidroalcohólico de *L. origanoides*, quimiotipo timol, como candidato para ser incorporado como principio activo en una formulación cosmética con propiedades fotoprotectoras, ya que este extracto presentó las capacidades antioxidante y fotoprotectora más altas, no tuvo efecto sensibilizador, la citotoxicidad fue media, para las líneas normales, y alta, para las líneas cancerígenas.

**Tabla 40.**

*Actividad biológica total calculada para los extractos de flores de H. rosa-sinensis y para los extractos, obtenidos de la biomasa residual de L. organoides.*

Muestra	Quimiotipo o cultivar	ICA	$\Sigma$ JPi	IAS	IPS	Actividad biológica total
<i>L. organoides</i>	Timol	1.0	0.4	0.1	1.0	2.3
	Carvacrol	0.2	0.4	1.0	0.2	-0.2
	Felandreno	0.6	0.4	0.4	0.6	1.2
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Rojo	0.4	1.0	0.1	0,4	1.7
	Rosado	0.3	1.0	0.0	0,2	1.5
	Naranja	0.3	1.0	0.2	0,3	1.4
	Amarilla	0.2	0.8	0.1	0.0	0.9

ICA: Índice de capacidad antioxidante

$\Sigma$ JPi: Sumatoria de la jerarquía ponderada individual (citotoxicidad)

IAS: Índice de actividad sensibilizante

IPS: Índice de protección solar

### 4.3 Desarrollo de un prototipo cosmético fotoprotector

#### 4.3.1 Evaluación de la estabilidad acelerada

En la **Tabla 41**, se presentan los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos pH y FPS del prototipo fotoprotector, medidos durante los 90 días en el experimento de la estabilidad acelerada.

**Tabla 41.**

*Valores de pH y FPS obtenidos durante la evaluación de la estabilidad acelerada para el prototipo fotoprotector.*

<b>Día</b>	<b>Temperatura, °C</b>	<b>pH</b>	<b>FPS</b>
0	25	5.8 ± 0.08	43 ± 2
	7	5.74 ± 0.003	43 ± 2
30	25	5.71 ± 0.002	45 ± 2
	40	5.7 ± 0.01	44 ± 2
	7	5.8 ± 0.03	44 ± 1
60	25	5.7 ± 0.01	42 ± 2
	40	5.7 ± 0.11	44 ± 1
	7	5.7 ± 0.10	44 ± 1
90	25	5,7 ± 0.01	45 ± 2
	40	5.7 ± 0.01	44 ± 2

Los valores de pH variaron de 5.7 a 5.8 (Véase **Tabla 41**), y estuvieron dentro del rango apropiado para este tipo de formulaciones tópicas, que deben tener el pH de la piel (4.6-5.9), lo cual es importante para mantenerla saludable, segura y sin irritaciones (Lukić *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2017). Los resultados de las pruebas de estabilidad acelerada mostraron que el prototipo cosmético fue estable en diferentes condiciones de su almacenamiento: no se observó crecimiento de microorganismos, lo anterior, se debe al manejo de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en la elaboración de dicha emulsión, que evitó la contaminación cruzada y la aparición de microorganismos.

Los valores de FPS, no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.050$ ), según la prueba  $t$ , que indica que la formulación fotoprotectora fue estable bajo las diferentes condiciones de su almacenamiento durante los 90 días.

El FPS es un parámetro que refleja la eficacia de un producto de protección solar y da una medida del porcentaje de rayos UVB bloqueados por el producto. Cuando se aplica correctamente, un protector solar con un FPS de 15, 30, 50 o 100 puede bloquear hasta el 93, 97, 98 y 99% de los rayos UVB, respectivamente (Kumar *et al.*, 2017). La formulación base sin extracto tuvo un FPS de  $25 \pm 2$ , mientras que el prototipo que incorpora el extracto de hidro-alcohólico, obtenido de la biomasa residual de *L. organoides*, quimiotipo timol, presentó un FPS de  $43 \pm 2$  y logró bloquear hasta el 97% de la radiación UVB, inclusive después de irradiarse en el simulador solar a  $10 \text{ kJ/m}^2$ .

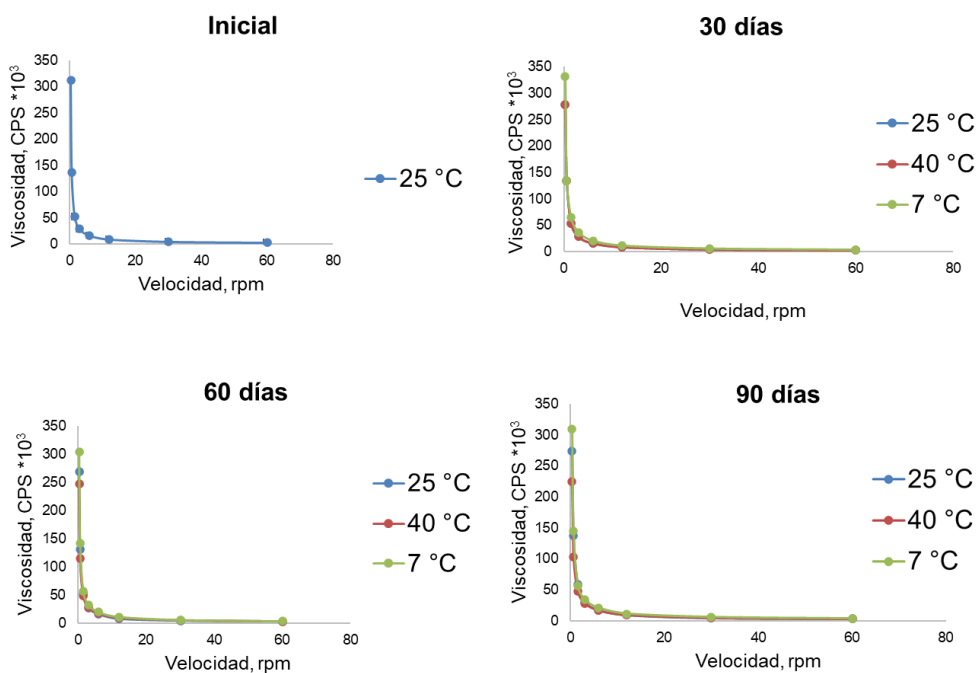
Estos resultados demuestran el efecto sinérgico entre los compuestos bioactivos presentes en el extracto de *L. organoides* y los filtros solares UV de la fórmula base. Con ellos se concluye que los flavonoides del extracto bloquearon eficazmente los rayos UVB y proporcionaron una protección UV razonable. La FDA y el Grupo de Trabajo de Servicios Preventivos de EE. UU., sugieren el uso de un protector solar de amplio espectro con un FPS  $\geq 15$  (FDA, 2011; Grossman *et al.*, 2018), mientras La Academia Estadounidense de Dermatología recomienda el uso de protectores solares de amplio espectro y además resistentes al agua con un FPS  $\geq 30$  (AAD, 2019).

En la **Figura 27**, se muestran los resultados de la variación de la viscosidad para el prototipo fotoprotector con la velocidad de rotación. De las gráficas, se puede observar que

las formulaciones almacenadas bajo tres condiciones de temperatura diferentes presentaron el mismo patrón de comportamiento durante los 90 días de prueba, donde la viscosidad disminuyó con la velocidad, propiedad característica de fluidos no newtonianos con comportamiento pseudoplástico (Morais *et al.*, 2005; Chassenieux *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2014). Esta propiedad pseudoplástica del prototipo cosmético es favorable, ya que el prototipo diseñado es de uso tópico y debe tener facilidad para su aplicación sobre la piel (Shin *et al.*, 2014).

**Figura 27.**

*Variación de la viscosidad para el prototipo fotoprotector con la velocidad de rotación.*

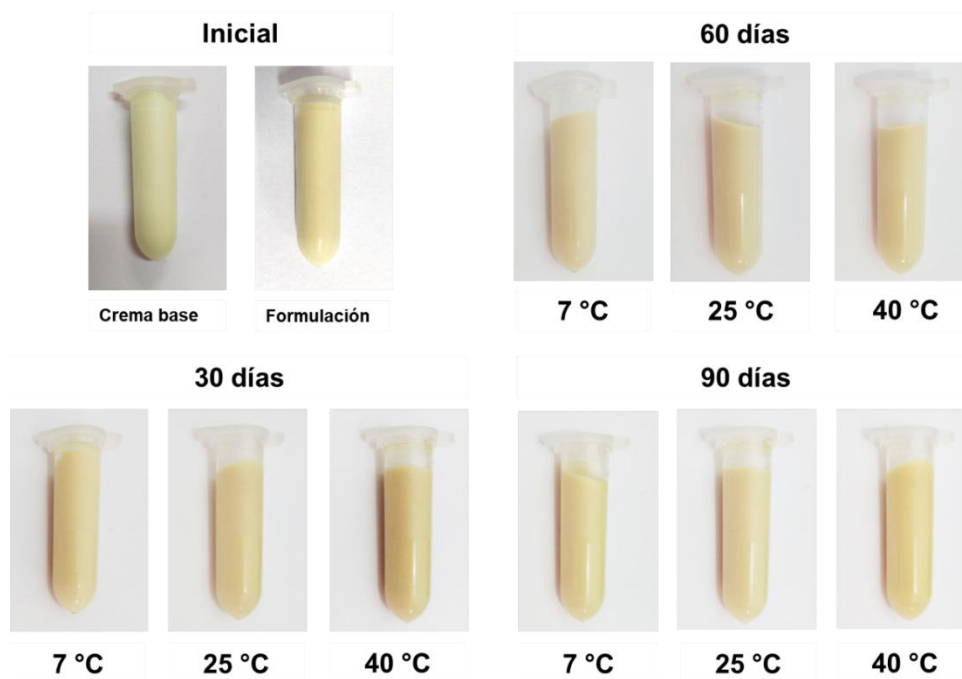


En la **Figura 28**, se muestran las fotografías del prototipo formulado, que resultó ser estable bajo las diferentes condiciones de almacenamiento durante los 90 días. En ninguna de las muestras analizadas hubo separación de las fases, después de centrifugarlas a 3500

rpm durante 30 min. En formulaciones de cremas, la separación de fases juega un papel importante en la determinación de la estabilidad del producto, la ruptura de la emulsión se produce en una formulación cosmética debido a las diferencias de densidad entre dos fases (Kumar *et al.*, 2017). En el prototipo formulado tampoco hubo cambios observables en el color bajo ninguna de las condiciones de temperatura durante el período de observación, con lo que se puede concluir que la emulsión preparada fue estable y presentaba una coloración final *beige*.

### Figura 28.

*Resultados de la estabilidad del color y de la emulsión para el prototipo fotoprotector a diferentes temperaturas. Imágenes tomadas por Jesica MEJÍA, en el laboratorio de Desenvolvimento Galênico (LADEG), Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil, fecha: marzo a mayo de 2018.*

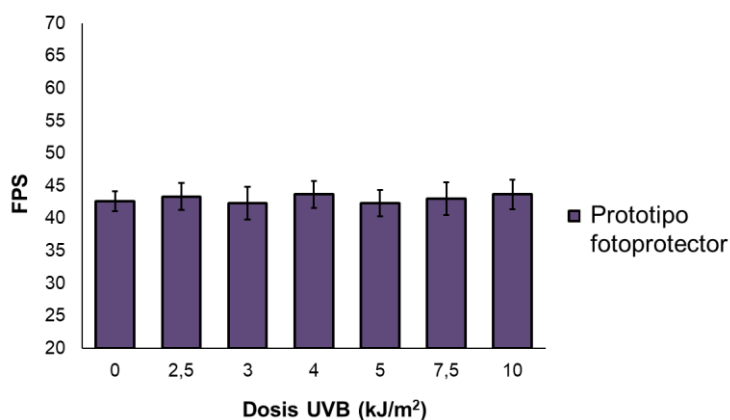


### 4.3.2 Evaluación de la fotoestabilidad

En la **Figura 29** se muestra la gráfica de dosis de irradiación frente a los valores de FPS para la formulación que incorporan extracto hidro-alcohólico obtenido de la biomasa residual de *L. origanoides*, quimiotipo timol.

#### Figura 29.

*Factor de protección solar obtenido frente a diferentes dosis de radiación UVB para la formulación fotoprotectora que incorporan extracto hidro-alcohólico obtenido de la biomasa residual de L. origanoides, quimiotipo timol.*



Romanhole *et al.* (2016), realizaron el ensayo de fotoestabilidad para tres formulaciones comerciales a 50 y 200 J/cm<sup>2</sup> y encontraron que dos formulaciones mostraron un comportamiento no fotoestable, ya que presentaron cambios significativos en sus espectros de absorción UV, después de someterse a la radiación. Solo una formulación fue considerada como fotoestable, según sus resultados, además, los autores resaltaron la importancia de realizar estudios de estabilidad para formulaciones de protección solar para uso en interiores y exteriores. A menudo, las formulaciones combinan filtros UV cuya eficacia y seguridad deben ser comprobadas. Sin embargo, en la investigación de Romanhole

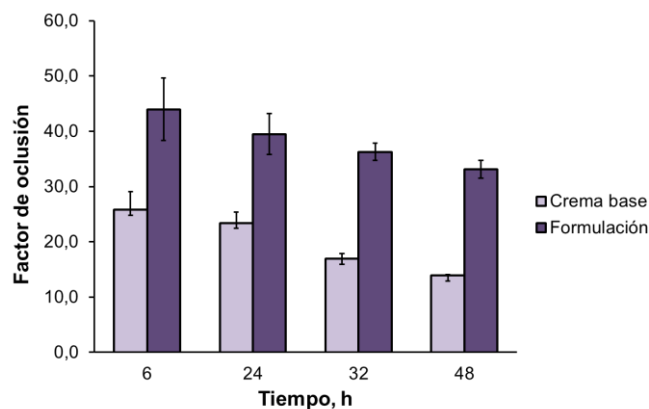
*et al.* (2016), se empleó una dosis 200 veces más alta que la que se usó ( $10 \text{ kJ/m}^2$ ) en este trabajo; no obstante, es necesario mencionar que la dosis de radiación de  $200 \text{ J/cm}^2$ , constituye un valor demasiado alto, que no se observa naturalmente en la superficie de la tierra.

### 4.3.3 Determinación del factor de oclusión

El estrato córneo está formado principalmente por queratina, agua y lípidos. Mantener el grado de hidratación de la piel ayuda a mantenerla intacta, ya que una pérdida excesiva de agua al ambiente puede provocar grietas (Wissing y Muller, 2002). El factor de oclusión (**F**) es un parámetro que ayuda a evaluar la capacidad de la formulación para mantener la piel hidratada. Los protectores solares son productos cosméticos de aplicación tópica, cuya función principal es proteger la piel de los rayos UV. En la **Figura 30**, se muestra el factor de oclusión para la crema base y para el prototipo fotoprotector, evaluado en un sistema de estrato corneo de *Crotalus durissus*.

#### Figura 30.

*Factor de oclusión para la crema base y el prototipo fotoprotector en un sistema de estrato corneo de Crotalus durissus.*



Durante el proceso de esparcimiento de la crema base y del prototipo fotoprotector se observó que, al cubrir toda el área, ambas lograron formar una capa homogénea sobre el papel de filtro. Después de 48 h de la prueba, la crema base y el prototipo fotoprotector que contenía extracto hidro-alcohólico obtenido de la biomasa residual de *L. origanoides*, presentaron un factor de oclusión de  $14 \pm 0.2$  y  $33 \pm 1.6$ , respectivamente.

Una formulación con capacidad oclusiva tiende a retrasar la pérdida de agua del estrato corneo al medio ambiente debido a la formación de películas en la piel (Wissing y Muller, 2002). El factor de oclusión se mide en una escala de 0 a 100, donde cero representa un efecto no oclusivo y 100 representa la oclusividad máxima: el prototipo cosmético con el extracto de *L. origanoides* generó un efecto oclusivo sobre el estrato corneo de *Crotalus durissus*, en comparación, con el de la formulación base. Esto puede relacionarse con los compuestos glicosilados presentes en el extracto, ya que los grupos hidroxilo interactúan con el agua a través de puentes de hidrógeno (Chen *et al.*, 2012).

Esos resultados concuerdan con lo reportado por Miller T (2009), quien corroboró que los flavonoides, al interactuar con una mezcla agua/aceite, funcionan como humectantes para hidratar la piel. El efecto oclusivo que genera el prototipo desarrollado le otorga una característica importante, al ser un cosmético de uso diario que se emplea principalmente cuando las personas se exponen, por diferentes periodos de radiación solar, y su piel puede sufrir quemaduras, deshidratación, fotoenvejecimiento entre otras consecuencias (Saucedo *et al.*, 2020).

## 5 CONCLUSIONES

En las áreas de ciencias exactas y farmacéuticas el foco principal de las investigaciones es hallar fuentes nuevas de compuestos biológicamente activos que puedan ser utilizados en diferentes industrias. Los resultados de esta tesis doctoral son el primer reporte en Colombia, sobre la composición química y el potencial biológico de las flores de *H. rosa-sinensis* y del material vegetal de *L. origanoides* después de su destilación, y su potencial para ser utilizados como ingredientes naturales.

A través, de los diseños experimentales  $2^4$  y fraccionado  $2^{5-1}$ , cada uno con dos niveles, cuatro réplicas en el centro, se determinaron las condiciones experimentales que permitieron obtener extractos hidro-alcohólicos con capacidad antioxidante alta, a partir de la biomasa residual de *L. origanoides* y de flores de *H. rosa-sinensis*, respectivamente. Estas condiciones fueron las siguientes: relación de material vegetal/solvente (1:40 g/mL), relación etanol: agua (70:30 y 52,5:47,5%, v/v, respectivamente), temperatura (47 °C y 50 °C, respectivamente), tiempo de extracción (23 y 15 min, respectivamente).

El análisis por UHPLC-ESI(+)-MS, permitió identificar 20 compuestos presentes en los extractos obtenidos de 16 cultivares de flores de *H. rosa-sinensis*, así: tres antocianinas, once flavonoles, dos flavan-3-oles, dos flavanonoles, una flavona y una flavanona. Las únicas agliconas detectadas fueron catequina y epicatequina, los demás compuestos fueron derivados glicosilados de los respectivos flavonoides. La cianidina-soforósido fue el componente mayoritario en el cultivar rojo ( $21,0 \pm 0,6$  mg/g de extracto). Todos los extractos de *H. rosa-sinensis* estudiados tuvieron en común diferentes cantidades relativas de los

flavonoles (quercetina-hexurónido-hexósido, quercetina-dihexósido, quercetina-hexurónido, quercetina-3-glucósido, kaempferol-desoxihexósido-hexósido y el kaempferol-desoxihexósido).

El análisis por LC/MS de los extractos obtenidos con solventes y con CO<sub>2</sub> supercrítico modificado con etanol, de la biomasa residual de *L. origanoides* (quimiotipos timol, carvacrol y felandreno) permitió detectar 28 flavonoides. Entre los compuestos fenólicos, se identificaron once flavonas, ocho flavanonas, cinco flavonoles, dos flavanonoles, dos chalconas y algunos derivados glicosilados. En los extractos, obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico modificado con etanol, se detectaron únicamente agliconas, de manera general, las flavanonas (eriodictiol y pinocembrina) fueron los compuestos mayoritarios detectados en los extractos obtenidos de todos los quimiotipos estudiados de *L. origanoides*.

Al comparar las cantidades de los diferentes flavonoides extraídos tanto de material vegetal sin destilar como de biomasa residual de *L. origanoides*, se observó una disminución en su concentración, asociada con una posible degradación térmica o enzimática debido al proceso de destilación. Para los quimiotipos, de *L. origanoides*, timol y carvacrol, se observó la transformación parcial de la naringenina a eriodictiol, lo que es muy conveniente porque el eriodictiol tiene mayor interés biológico y valor comercial que su precursor la naringenina. Los resultados muestran que el residuo sólido, generado en grandes cantidades en la industria de aceites esenciales del orégano de monte tiene un gran potencial, para ser aprovechado como materia prima en la obtención de extractos con alta capacidad antioxidante e interés biológico.

El estudio de la relación entre el color, la capacidad antioxidante y la composición de flavonoides, llevado a cabo con los 16 cultivares de flores de *H. rosa-sinensis*, mostró que hubo correlación positiva de la capacidad antioxidante de los extractos florales con el contenido de antocianinas, flavan-3-oles y flavanoles totales, mientras que la correlación fue negativa para flavonoles. La capacidad antioxidante y los contenidos de antocianinas, flavan-3-oles y flavonoles más altos se registraron en los extractos de flores de color más oscuro, como el rojo.

La cianidina-soforósido y los derivados glicosilados de quercetina, fueron los principales responsables de la capacidad antioxidante de los extractos de flores de *H. rosa-sinensis*, su contenido aumentó, según el cultivar así: amarillo < naranja ≤ rosado < rojo. En los extractos hidro-alcohólicos de *L. origanoides*, el eriodictiol y sus derivados glicosilados fueron los compuestos que aportaron más a la actividad antioxidante (ca. 33% al 43%). Para los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico la galangina, pinocembrina, sakuranetina, timol y carvacrol contribuyeron en mayor grado a la capacidad antioxidante, según el quimiotipo estudiado.

Sobre la actividad fotoprotectora de los extractos obtenidos de las especies vegetales bajo estudio, se determinó que el factor de protección solar para los extractos de las flores (2-6.09) fue más bajo que para los extractos aislados de la biomasa residual de orégano de monte (2.7-12.3), siendo el extracto hidro-alcohólico de *L. origanoides* quimiotipo timol, el de mayor valor de FPS ( $12.33 \pm 0.035$ ). No se observaron efectos aditivo o sinérgico cuando se mezclaron los extractos de las mismas especies.

Los extractos hidro-alcohólicos y los obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico modificado con etanol, aislados a partir de la biomasa residual de *L. origanoides* presentaron toxicidad baja ( $> 250 \mu\text{g/mL}$ ) y media (101-250  $\mu\text{g/mL}$ ) según las líneas celulares evaluadas. Sin embargo, todos los extractos de *L. origanoides* tuvieron toxicidad alta ( $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ ) para líneas cancerígenas de fibroblastos; solo el extracto hidro-alcohólico de *L. origanoides* quimiotipo carvacrol, podría ser catalogado como un alérgeno promotor de dermatitis alérgica de contacto.

Los extractos aislados de los cultivares (rojo, rosado, naranja y amarillo) de *H. rosasinesis* presentaron toxicidad baja ( $> 250 \mu\text{g/mL}$ ), ya que no causaron ningún efecto sobre las líneas celulares normales (sanas) y las cancerígenas. Tampoco, incentivaron la secreción de IL-8, en monocitos de sangre periférica. Por lo tanto, los extractos florales no inducirían dermatitis alérgica de contacto.

El prototipo cosmético diseñado en este trabajo incorporó el extracto hidroalcohólico de *L. origanoides*, quimiotipo timol, como principio activo. Se mostró que fue un producto estable con propiedades fisicoquímicas (FPS 44, pH 5.7, color *beige*), pseudoplásticas y oclusivas favorables. Con los resultados del prototipo fotoprotector, se evidenció que sí es posible realizar un aprovechamiento integral de la planta de *L. origanoides* al agregar valor a la biomasa residual obtenida después de la destilación, y aún más a un producto terminado, además, de contribuir al problema de eliminación de residuos de material vegetal generados en la industria de aceites esenciales.

## 6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las plantas que se emplearon para este trabajo de investigación fueron colectadas, gracias al permiso del Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados (N° 101, 3 de junio de 2014), otorgado por el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible.

## 7 INFORMACION DE FINANCIAMIENTO

El trabajo de investigación doctoral fue financiado por MINCIENCIAS, Convocatoria 647 del año 2014, Doctorados Nacionales. Convocatoria Ecosistema Científico-Colombia Científica, Fondo Francisco José de Caldas, contrato RC-FP44842-212-2018, programa Bio-RETO XXI-15:50.

## 8 DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Durante la investigación doctoral se publicó un artículo científico, una patente. La estudiante de doctorado participó como co-auotora en dos artículos. Los resultados de esta investigación se presentaron en al menos cinco eventos nacionales e internacionales en las modalidades tanto oral como póster. Adicionalmente, se participó en la codirección de tres proyectos de pregrado, y actualmente hay una solicitud de patente.

### ARTÍCULO CIENTÍFICO

Arias, J., Mejía, J., Córdoba, Y., Martínez, J., Stashenko, E., and del Valle, J. Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO<sub>2</sub> after steam distillation. *Ind. Crops Prod.* **2020**, 146, 1-9.

## **PATENTE**

Stashenko, E., Durán, D., Martínez, J., Córdoba, Y., Arias, A., Mejía, J., y Tavera, C. **2018**. Method for making full use of *Lippia origanoides*. Patente N° WO2018122654A1. Bucaramanga: Colombia. *Google Patents*. Consultado: 17 de noviembre de 2021.

## **SOLICITUD DE PATENTE**

Sierra, L.; Mejía, J.; Martínez, J.; Stashenko, E. y Durán, C. Antioxidant dyestuff. En Colombia, **2017**, CO2017013354A1.

## **CODIRECCIÓN DE TRABAJOS DE GRADO**

Carrillo K. Estudio de la composición química y evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de la flor de *Brownea macrophylla* obtenidos por diferentes técnicas de aislamiento. Trabajo de Grado. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander, **2017**.

Díaz, L. Identificación por GC-MS y LC-MS de metabolitos secundarios aislados de *Medinilla myriantha* (Melastomataceae) y evaluación de su actividad antioxidante. Trabajo de Grado. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander, **2017**.

Ceballos, G. Estudio de las condiciones de extracción de polifenoles a partir de flores de *Hibiscus rosa-sinensis* (Familia Malvaceae). Trabajo de Grado. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander, **2018**.

**PARTICIPACIÓN EN EVENTOS NACIONALES E INTERNACIONALES**

Mejia, J., Ocazonez, R., Quintero, E., Ricci, E., Martinez, J. y Stashenko, E. Desarrollo de fotoprotectores solares con base en extractos aislados de biomasa residual de *L. origanoides*. Congreso Latinoamericano de Química 2020, Cartagena- Colombia, 11-15 de octubre del 2021. Modalidad: presentación oral.

Mejia, J., Ceballos, G., Sierra, L., Martinez, J. y Stashenko, E. *Hibiscus rosa-sinensis*: estudio de la relación entre la composición química, la capacidad antioxidante y el color. Congreso Latinoamericano de Química 2020, Cartagena- Colombia, 11-15 de octubre del 2021. Modalidad: póster.

Mejia, J., Ceballos, G., Sierra, L., Martinez, J. y Stashenko, E. *Optimization of flavonoid solvent extraction from tropical flowers. 23<sup>rd</sup> International Symposium on Advance in Extraction Technologies*. Alicante, España, 30 de junio al 2 de julio de 2021. Modalidad: póster.

Mejia, J., Ceballos, G., Sierra, L., Martinez, J. y Stashenko, E. Optimizacion de la extracción de flavonoides en flores de *Hibiscus rosa-sinensis*. 16<sup>a</sup> Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales (AMIPRONAT). Zacatecas, México, 19-21 de mayo de 2021. Modalidad: póster.

Mejia, J., Arias, J., Cordoba, Y., Sierra, L., Martinez, J. y Stashenko, E. *Chemical composition determined by UHPLC-ESI-Orbitrap-MS and evaluation of antioxdiant*

*potential of Lippia organoides extracts before and after plant steam distillation. 48<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques. Milán, Italia, 16-20 de junio de 2019. Modalidad: póster.*

Stashenko, E., Mejia, J., Sierra, L. and Martinez, J. *Obtaining and análisis tropical flower colorants for their use in tempera paintings. 48<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques. Milán, Italia, 16-20 de junio de 2019. Modalidad: póster.*

Mejia, J., Ocazonez, R., Velandia, S., Martinez, J. y Stashenko, E. *Study of chemical composition and evaluation of the antioxidant, cytotoxic and sensitizing potential of isolated extracts of Hibiscus rosa-sinensis and the residual biomass of Lippia organoides. International Conference Renewable plans resources: chemistry, technology, medicine RR2017. San Petersburgo, Rusia, 18-22 de septiembre del 2017. Modalidad: póster.*

**BIBLIOGRAFIA**

- AAD. (2019). Declaración de la Academia Estadounidense de Dermatología sobre la seguridad del protector solar. Disponible en: <https://bit.ly/3qzNmJT>. Consultado el 8 de julio de 2021.
- Acosta, L. (2010). Growing, harvest and postharvest processing of *Artemisia annua* L. *Rev. Cubana Plant Med.*, 15, 75-95.
- Adhirajan, N., Ravi, T., Shanmugasundaram, N. y Babu, M. (2003). *In vivo* and *in vitro* evaluation of hair growth potential of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. *J. Ethnopharmacol.*, 88, 226-235.
- Afaq, F. y K Katiyar, S. (2011). Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 11, 1200-1215.
- Afify, A. y Hassan, H. (2016). Free radical scavenging activity of three different flowers *Hibiscus rosa-sinensis*, *Quisqualis indica* and *Senna surattensis*. *Asian Pac J Trop Biomed.*, 6, 771-777.
- Afshari, K., Samavati, V. y Shahidi, S. (2015). Ultrasonic-assisted extraction and *in-vitro* antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf. *Int. J. Biol Macromol.*, 74, 558-567.
- Ali, A., Mackeen, M., El-Sharkawyl, S, Hamidi, J., Ismail, N., Ahmadi, F. y Lajis, N. (1996). Antiviral and cytotoxic activities of some plants used in malaysian indigenous medicine. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, 19, 129-136.
- Ali, K., Ali, R., Mukhtar, A., Hussain, Z., Anjum, S., Mansha, A. y Yar, M. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn flower extracts. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 27, 469-479.
- Ali, Ö. (2010). Cytotoxicity of *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract. *Caryologia.*, 63, 157-161.
- Aloud, A., Veeramani, C., Govindasamy, C., Alsaif, M., El, A. y Al-Numair, K. (2017). Galangin, a dietary flavonoid, improves antioxidant status and reduces hyperglycemia-mediated oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox Report.*, 22, 290-300.
- Andrade, L., Orozco, M., Correa, C. y Davey, C. (2015). Fungistatic effect of extracts and essential oils of *Lippia organoides* H.B.K. and *Thymus vulgaris* L. as alternative management of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Acta Agron.*, 64, 93-99.

- Anouar, E., Gierschner, J., Duroux, J. y Trouillas, P. (2012). UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chem.*, 131, 79-89.
- ANVISA. Resolução RDC N° 30 del 1 de junio de 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Disponible en: <http://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/fotos/assets/uploads/regulatorios/bef6e-RDC30.pdf>. Fecha de consulta: 25 de octubre de 2019.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K., Özyürek, M. y Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.*, 85, 957–998.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S. y Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 57, 292-304.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. y Çapano, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT) and lipid peroxidation assays. *J. Agric. Food Chem.*, 64, 1028–1045.
- Arias, G. (2012). Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citriodora*, cultivadas en el municipio Sucre (Santander). Tesis de Maestría. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander., Bucaramanga, 66-70.
- Arias, J., Mejía, J., Córdoba, Y., Martínez, J., Stashenko, E. y del Valle, J. (2020). Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO<sub>2</sub> after steam distillation. *Ind. Crops Prod.*, 146, 1-9.
- Arts, M., Dallinga, J., Voss, H., Haenen, G. y Bast, A. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.*, 88, 567-570.
- Asen, S. and Horowitz, R. (1974). Apigenin 4'-O-β-D-glucoside 7-O-β-D)-glucuronide: the pigment in the blue pigment of *Centaurea cyanus*. *Phytochemistry.*, 13, 1219-1223.

- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas, REDUCA (Biología), Fisiología Vegetal., Madrid, España., 2, 119-145.
- Awika, J., Rooney, L. y Waniska, R. (2005). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chem.*, 90, 293-301.
- Awika, J., Rooney, L., Wu, X., Prior, R. y Cisneros, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6657-6662.
- Aybastier, Ö., Isik, E., Sahin, S. y Demir, C. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. *Ind. Crops Prod.*, 44, 558-565.
- Bakowska, A., Kucharska, A. Z. y Oszmiański, J. (2003). The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex. *Food Chem.*, 81, 349-355.
- Barnes, J. y Schug, K. (2011). Structural characterization of cyanidin-3,5-diglucoside and pelargonidin-3,5-diglucoside anthocyanins: Multi-dimensional fragmentation pathways using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight mass spectrometry. *Int. J Mass Spectrom.*, 308, 71-80.
- Bautista, I., Aguilar, C., Martínez, G., Torres, C., Iliina, A., Flores, A. y Chávez, M. (2021). Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) as source of bioactive compounds: A Review. *Molecules.*, 26, 51-56.
- Battle, C. (2005). Factor de protección solar. Criterios de elección de un fotoprotector. *OFFARM.*, 24, 65-72.
- Benzie, I. y Szeto, Y. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 633-636.
- Bernard, G., Giménez, E., Rastogi, S., Heydorn, S., Johansen, J., Menné, T. y Lepoittevin, J. (2003). Contact allergy to oak moss: search for sensitizing molecules using combined bioassay-guided chemical fractionation, GC-MS, and structure-activity relationship analysis. *Arch. Dermatol. Res.*, 295, 229-235.
- Bhat, S., Nagasampagi, B. y Sivakumar, M. (2005). Chemistry of natural products, Springer, New York, EE. UU. 1-21.
- Boots, A., Drent, M., de Boer, V., Bast, A. y Haenen, G. (2011). Quercetin reduces markers

- of oxidative stress and inflammation in sarcoidosis. *Clin. Nutr.*, *30*, 506-512.
- Botterweck, A., Verhagen, H., Goldbohm, R., Kleinjans, J. y Brandt, P. (2000). Intake of butylated hydroxyanisol and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food Chem. Toxicol.*, *38*, 599-605.
- Bower, A., Hernandez, L., Berhow, M. y de Mejia, E. (2014). Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase iv. *J. Agric. Food Chem.*, *62*, 6147-6158.
- Brand, Y., Galili, L., Badani, H., Hovav, R. y Galili, S. (2012). Total phenolic content and antioxidant activity of red and yellow quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds as affected by baking and cooking conditions. *J. Food Nutr. Sci.*, *3*, 1150-1155.
- Cai, Y., Sun, M., Xing, J., Luo, Q. y Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.*, *78*, 2872-2888.
- Cavalcanti, R., Santos, D. y Meireles, M. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Res. Int.*, *44*, 499-509.
- Celis, C. (2007). Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *L. organoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia Verbenácea. Trabajo de grado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander., Bucaramanga, *15*, 115-117, 121-125.
- Chaaban, H., Ioannou, I., Chebil, L., Slimane, M., Gérardin, C., Paris, C. y Ghou, M. (2017). Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *J. Food Process. Preserv.*, *41*, 1-12.
- Chassenieux, C., Nicolai, T. y Benyahia, L. (2011). Rheology of associative polymer solutions. *COCIS.*, *16*, 18-26.
- Chen, C., Zhang, H., Xiao, W., Yong, Z. y Bai, N. (2007). High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries. *J. Chromatogr. A.*, *1154*, 250-259.
- Chen, C., Li, W. Z., Song, Y. C., Weng, L. y Zhang, N. (2012). Hydrogen bonding analysis of hydroxyl groups in glucose aqueous solutions by a molecular dynamics simulation study. *Bull. Korean Chem. Soc.*, *33*, 2238-2246.

- Chhabra, R., Bucher, J., Wolfe, M. y Portier, C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Program: an overview. *Int J. Hyg. Environ. Health.*, 206, 437-445.
- Chiari, B., Trovatti, E., Pecoraro, É., Corrêa, M., Cicarelli, R., Ribeiro, S. y Isaac, V. (2014). Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for health care application. *Ind. Crop. Prod.*, 52, 389-393.
- Coelho, A., Lima, N., Moura, A., de Sousa, T., Morais, I., Carvalho, G., Cunha, F., Medeiros, M., Vasconcelos, E., Oliveira, A., Arcanjo, D., Nunes, L. y Citó, A. (2015). Optimization and standardization of extraction method from *Lippia origanoides* H.B.K.: Focus on potential anti-hypertensive applications. *Ind Crops Prod.*, 78, 124-130.
- Cojocariu, R., Ciobica, A., Balmus, I. M., Guenne, S., Trifan, A., Stanciu, C. y Lefter, R. (2019). Antioxidant capacity and behavioral relevance of a polyphenolic extract of *Chrysanthellum americanum* in a rat model of irritable bowel syndrome. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019, 1-14.
- Córdoba, Y. (2013). Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos y aceites esenciales de seis especies de *Lippia* spp. (Familia Verbenácea), por diferentes métodos (ABTS<sup>+</sup>, ORAC y monitoreo de peroxidación lipídica). Trabajo de investigación, Mestría. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 108-117.
- Córdoba, Y. (2019). Estudio de la composición química y las actividades antioxidante y fotoprotectora de los extractos de damiana y orégano de monte, cultivadas de Santander. Tesis Doctoral. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 96-105.
- Cortés, M., Flores, H., Orozco, I., León, C., Suárez, Á., Estarrón, M. y López, I. (2021). Identification and quantification of phenolic compounds from Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) hydroethanolic extracts and evaluation of Its antioxidant capacity. *Molecules.*, 26, 1-18.
- Damasceno, E., Silva, J., Andrade, E., Sousa, P. y Maia, J. (2011). Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. *Rev. Bras de Farmacogn.*, 21, 78-85.

- de Barros, P. de Lima Costa, D., Santana, A. y Leal, G. (2019). Fractions of the *Lippia origanoides* extract induce the polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase enzymes in *Solanum lycopersicum*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 153, 79-88.
- de Oliveira, F. Barbosa, F., Mafezoli, J., Maria da Conceição, F., Neto, M. y Guedes, M. (2013). Chemical constituents of *Lippia rigida schauer* (Verbenaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 51, 328-330.
- Demarque, D., Crotti, A., Vessecchi, R., Lopes, J. y Lopes, N. (2016). Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 33, 432-455.
- Demasi, S., Caser, M., Donno, D., Enri, S. R., Lonati, M. y Scariot, V. (2021). Exploring wild edible flowers as a source of bioactive compounds: New perspectives in horticulture. *Folia Hortic.*, 33, 1-22.
- Deng, Z., Hassan, S., Rafiq, M., Li, H., He, Y., Cai, Y. y Yan, T. (2020). Pharmacological activity of eriodictyol: the major natural polyphenolic flavanone. *Evid-Based Complement. Alters. Med.*, 2020, 1-11.
- Dolatabadi, J. y Kashanian, S. (2010). A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. *Food Res Int.*, 43, 1223-1230.
- dos Santos Júnior, H., Oliveira, D., de Carvalho, D., Pinto, J., Campos, V., Mourão, A., Pessoa, C., de Moraes, M. y Costa, L. (2010). Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *J. Nat. Med.*, 64, 231-238.
- dos Santos, N., Gori, A., Raffaelli, A., Ferrini, F. y Brunetti, C. (2021). Phenolic Compounds from leaves and flowers of *Hibiscus roseus*: Potential skin cosmetic applications of an under-investigated species. *Plants.*, 10, 1-16.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. y Mérillon, J. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food. Chem.*, 57, 1768-1774.
- Dwivedi, R., Pandey, S. y Tripathi, V. (1977). Role of japapushpa (*Hibiscus rosa-sinensis*) in the treatment of arterial hypertension. A trial study. *J. Res. Indian Med.*, 12, 13-36.

- Edris, A. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.*, *21*, 308–323.
- Elansary, H. y Mahmoud, E. (2015). Egyptian herbal tea infusions' antioxidants and their antiproliferative and cytotoxic activities against cancer cells. *Nat. Prod. Res.*, *29*, 474–479.
- Elmets, C., Singh, D., Tubesing, K., Matsui, M., Katiyar, S. y Mukhtar, H. (2001) Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J. Am. Acad. Dermatol.*, *44*, 425-432.
- Engin, A., Bukan, N., Kurukahvecioglu, O., Memis L. y Engin, A. (2011). Effect of butylated hydroxytoluene (E321) pretreatment versus L-arginine on liver injury after sub-lethal dose of endotoxin administration. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, *32*, 457–464.
- Exarchou, V., Fiamegos, Y., Van, T., Nanos, C. y Vervoort, J. (2006). Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. *J. Chromatogr. A.*, *1112*, 293–302.
- Faten, R., Ghaffar, A. y El-Elaimy, I. (2012). *In vitro*, antioxidant and scavenging activities of *Hibiscus rosa sinensis* crude extract, *J. Appl. Pharm. Sci.*, *2*, 51-58.
- FDA. (2011). Requisitos para los productos de protección solar de venta libre (OTC) comercializados en los EE. UU. Disponible en: <https://bit.ly/3AcaeDJ>. Consultado el 8 de julio de 2021.
- Farr, J., Sigurdson, G., y Giusti, M. (2018). Influence of cyanidin glycosylation patterns on carboxypyrananthocyanin formation. *Food Chem.*, *259*, 261-269.
- Galván, J., Gil, D., Lanús, H. y Altabef, A. (2015). Theoretical study on the molecular structure and vibrational properties, NBO and HOMO–LUMO analysis of the POX3 (X= F, Cl, Br, I) series of molecules. *J. Mol. Struct.*, *1081*, 536-542.
- García, A., de Pascual, T., Santos, B. y Rivas, G. (2004). Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem.*, *1*, 13-18.
- García, A., Girones, A., León, P., Moreno, D., Stinco, C., Meléndez, A. y Ruales, J. (2017). Banana passion fruit [*Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey]: micro-encapsulation, phytochemical composition and antioxidant capacity. *Molecules.*, *22*, 1-12.

- Garg, D., Shaikh, A., Muley, A. y Marar, T. (2012). *In-vitro* antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves. *Free Rad. Antiox.*, 2, 41-46.
- Gauthaman, K., Saleem, M., Thanislas, P., Prabhu, V., Krishnamoorthy, K., Devaraj, N. y Somasundaram, J. (2006). Cardioprotective effect of the *Hibiscus rosa-sinensis* flowers in an oxidative stress model of myocardial ischemic reperfusion injury in rat. *BMC Complement Altern. Med.*, 6, 1-8.
- Gerats, T. y Strommer, J. (2008). *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. Springer Science & Business Media. (Nueva York, EE. UU.). 271-274.
- Ghaffar, F. y El-Elaimy, I. (2012). *In vitro* antioxidant and scavenging activities of *Hibiscus rosa sinensis* crude extract. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2, 51-58.
- Giampieri, F., Alvarez, J., Tulipani, S., Gonzáles, A., Santos, C., Bompadre, S. y Battino, M. (2012). Photoprotective potential of strawberry (*Fragaria ananassa*) extract against UV-A irradiation damage on human fibroblasts. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 2322-2327.
- Gilani, A., Bashir, S., Janbaz, K. y Shah, A. (2005). Presence of cholinergic and calcium channel blocking activities explains the traditional use of *Hibiscus rosa-sinensis* in constipation and diarrhoea. *J. Ethnopharmacol.*, 102, 94–289.
- Goldberg, K., Yin, A., Mupparapu, A., Retzbach, E., Goldberg, G. y Yang, C. (2017). Components in aqueous *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract inhibit *in vitro* melanoma cell growth. *J. Tradit. Complemt. Med.*, 7, 45-49.
- Gómez, A., Gómez, M., Arráez, D., Segura, A. y Fernández, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1 220–1234.
- Gross, J. (1987). *Pigments in fruits*, Ed. Academic Press, London, England, 59-85.
- Grossman, D., Curry, S., Owens, D., Barry, M., Caughey, A., Davidson, K., Doubeni, C., Epling, J., Kemper, A., Krist, A., Kubik, M., Landefeld, S., Mangione, C., Silverstein, M., Simon, M. y Tseng, C. (2018). Behavioral counseling to prevent skin cancer: US preventive services task force recommendation statement. *JAMA*, 319, 1134-1142.
- Grotewold, E. (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 761-780.

- Gu, D., Yang, Y., Abdulla, R. y Aisa, H. (2012). Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26, 83-100.
- Gutiérrez, E., Picos, M., Leyva, N., Criollo, M., Vazquez, G. y Heredia, J. (2018). Flavonoids and phenolic acids from oregano: Occurrence, biological activity and health benefits. *Plants.*, 7, 1-23.
- Halliwell, B. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Meth. Enzymol.*, 186, 1-85.
- Hamid, A., Aiyelaagbe, O., Usman, L., Ameen, O. y Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *Afr. J. Pure Appl Chem.*, 4, 142-151.
- Hammad, I. (2009). Genetic variation among *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae) of different flower colors using ISSR and isozymes. *Aust. J. Basic and App. Sci.*, 3, 113-125.
- Hammerbacher, A., Kandasamy, D., Ullah, C., Schmidt, A., Wright, L. y Gershenzon, J. (2019). Flavanone-3-hydroxylase plays an important role in the biosynthesis of spruce phenolic defenses against bark beetles and their fungal associates. *Front. Plant Sci.*, 10, 1-15.
- Hanson, J. (2013). Natural products, the secondary metabolites. 1<sup>st</sup> Ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom.,10-21.
- Havsteen, B. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, 96, 67-202.
- Heijnen, C., Haenen, G., Minou, R., Stalpers, E. y Bast, A. (2002). Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Rad. Res.*, 36, 575-581.
- Hernandes, C., Pina, E., Taleb, S., Bertoni, B., Cestari, I., Espanha, L., Varanda, E., Camilo, K., Martinez, E., França, S. y Pereira, A. (2017). *Lippia origanoides* essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. *J. Appl. Microbiol.*, 122, 900-910.
- Hong, G., Wang, J., Zhang, Y., Hochstetter, D., Zhang, S., Pan, Y. y Wang, Y. (2014) Biosynthesis of catechin components is differentially regulated in dark-treated tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Physiol. Biochem.*, 78, 49-52.

- Hooper, L. y Cassidy, A. (2006). A review of the health care potential of bioactive compounds. *J. Sci. Food. Agric.*, 86, 1805–1813.
- Hossy, B., Leitão, A., Luz, F., Santos, E., and Allodi, S., Padula, M. y Miguel, N. (2013). Effects of a sunscreen formulation on albino hairless mice: a morphological approach. *Arch. Dermatol. Res.*, 305, 535-544.
- Hossy, B., Leitão, A., Santos, E., Matsuda, M., Rezende, L., Rurr, J., Pinto, A., Ramos-E-Silva, M., Pádula, M. y Miguel, N. (2017). Phototoxic assessment of a sunscreen formulation and its excipients: An *in vivo* and *in vitro* study. *J. Photochem. Photobiol.*, 1173, 545-550.
- Huang, D., Ou, B. y Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856.
- Hui, L., Bo, C. y Shouzhuo, Y. (2005,). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmodies* Oliv. (*E. ulmodies*). *Ultrason Sonochem.*, 12, 295–300.
- Iarc monographs. (1986). Some naturally occurring and synthetic food componets, furocoumarins and ultraviolet radiation.. Fecha de consulta: 15 de abril de 2016. Disponible en línea <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mono40.pdf>
- IPCS<sub>a</sub> International Programe on Chemical Safety. (1999). Evaluation of national assessment of intake of butylated hidroxyanisol (BHA). Fecha de consulta: 17 de mayo de 2016. Disponible en línea <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je23.htm>.
- IPCS<sub>b</sub> International Programe on Chemical Safety. (1999). Evaluation of national assessment of intake of butylated hidroxytoluene (BHT). Fecha de consulta: 17 de mayo de 2016. Disponible en línea <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je24.htm>.
- ISO 8466-1:1990. 1a Ed. (1990). Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: statistical evaluation of the linear calibration function. 1-8.
- Iverson, F. (1999). *In vivo* studies on butylated hidroxyanisole. *Food Chem. Toxicol.*, 37, 993-997.

- Janarny, G., Ranaweera, K. y Gunathilake, K. (2021). Antioxidant activities of hydro-methanolic extracts of Sri Lankan edible flowers. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 35, 1-8.
- Jayaprakasha, G., Singh, R. y Sakariah, K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem.*, 73, 285–290.
- Jeong, S., Kim, B., Kang, H., Ku, H. y Cho, J. (2005). Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. *Toxicology.*, 208, 49–62.
- Jewiarz, M., Wróbel, M., Mudryk, K. y Szufa, S. (2020). Impact of the drying temperature and grinding technique on biomass grindability. *Energies.*, 13, 1-22.
- Jing, W., Baoguo, S., Yanping, C., Yuan, T. y Xuehong, L. (2008) Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem.*, 106, 804–810.
- Kähkönen, M., Hopia, A. y Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 4076-4082.
- Kale, S., Ghoge, P., Ansari, A., Waje, A. y Sonawane, A. (2010). Formulation and *in-vitro* determination of sun protection factor of *Nigella sativa* Linn. seed oil sunscreen cream. *Int. J. Pharmtech Res.*, 2, 2194–2197.
- Kalpana, V., Mary, J., Mini, S., Soumya, N. y Mondal, S. (2021). *Hibiscus rosa sinensis* L. anthocyanins prevent lipid peroxidation and improve antioxidant status in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Bioact. Compd. Health Dis.*, 4, 240-255.
- Kangatharalingam, N., Pierce, M., Bayles, M. y Essenberg, M. (2002). Epidermal anthocyanin production as an indicator of bacterial blight resistance in cotton. *Physiol Mol. Plant Pathol.*, 61, 189–195.
- Kaplan, D., Igyártó, B. y Gaspar, A. (2012). Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.*, 12, 114-124.
- Kasiotis, K., Anastasiadou, P., Papadopoulos, A. y Machera, K. (2017). Revisiting Greek propolis: chromatographic analysis and antioxidant activity study. *PloS one.*, 12, 1-27.

- Kasture, V., Chopde, C. y Deshmukh, V. (2000). Anticonvulsive activity of *Albizzia lebeck*, *Hibiscus rosa-sinensis* and *Butea monosperma* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.*, *71*, 65–75.
- Khan, Z., Naqvi, S., Mukhtar, A., Hussain, Z., Shahzad, S., Mansha, A. y Mahmood, N. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus Rosa-sinensis* Linn flower extracts. *Pak. J. Pharm. Sci.*, *27*, 469-474.
- Kohn, W., Becke, A. y Parr, R. (1996). Density functional theory of electronic structure. *J.Phys. Chem. A.*, *100*, 12974-12980.
- Kim, B., Kim, N., Kim, J., Akimitsu, K., Chong, Y. y Ahn, J. (2009). Flavonoid o-diglucosyltransferase from rice: molecular cloning and characterization. *J. Plant Biol.*, *52*, 41-48.
- Koes, R., Verweij, W. y Quattrocchio, F. (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.*, *10*, 236-242.
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T. y Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.*, *64*, 923-933.
- Koyu, H., Kazan, A., Demir, S., Haznedaroglu, M. Z. y Yesil, O. (2018). Optimization of microwave assisted extraction of *Morus nigra* L. fruits maximizing tyrosinase inhibitory activity with isolation of bioactive constituents. *Food Chem.*, *248*, 183–191.
- Krinsky, N. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *200*, 248-254.
- Kumar, S., Akhtar, M., Ahmad, S., Abas, F., Ismail, I., Rukayadi, Y. y Shaari, K. (2017). Utilization of the ethyl acetate fraction of *Zanthoxylum rhetsa* bark extract as an active ingredient in natural sunscreen formulations. *Ind Crop Product.*, *96*, 165-172.
- Kusznierewicz, B., Piasek, A., Bartoszek, A. y Namiesnik, J. (2011). Application of a commercially available derivatization instrument and commonly used reagents to HPLC on-line determination of antioxidants. *J. Food Comp. Anal.*, *24*, 1073-1080.
- Kyi, T., Daud, W., Mohammad, A., Wahid, M., Kadhum, A. y Talib, M. (2005). The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. *Int. J Food Sci. Technol.*, *40*, 323-331.

- Lattanzio, V. (2003). Bioactive polyphenols: their role in quality and storability of fruit and vegetables. *J. Appl. Bot.*, 77, 128–146.
- Lattanzio, V., Cardinali, A. y Palmieri, S. (1994). The role of phenolics in the postharvest physiology of fruits and vegetables: browning reactions and fungal diseases. *Ital. J. Food Sci.*, 6, 3–22.
- Leitão, S., Leitão, G., Vicco, D., Pereira, J., de Moraes, G., Oliveira, D. y 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*. *J. Chromatogr. A.*, 1520, 83-90.
- Leong, L. y Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.*, 76, 69-75.
- Leyva, N., Nair, V., Bang, W., Cisneros, L. y Heredia, J. (2016). Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Ethnopharmacol.*, 187, 302–312.
- Li, A., Li, S., Li, H., Xu, D., Xu, X. y Chen, F. (2014). Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *J. Funct. Foods.*, 6, 319-330.
- Li, X., Lu, M., Tang, D. y Shi, Y. (2015). Composition of carotenoids and flavonoids in narcissus cultivars and their relationship with flower color. *PLoS One.*, 10, 1-14.
- Li, Z., Lee, H., Liang, X., Liang, D., Wang, Q., Huang, D. y Ong, C. (2018). Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of 12 cruciferous vegetables. *Molecules.*, 23, 1-16.
- Lin, L., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. y Harnly, J. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *J. Food Compos. Anal.*, 20, 361–369.
- Lopez, M., Galvez, M., Martin, C. y Ayuso, M. (2002). Cytotoxicity of flavonoids on cancer cell lines. Structure-activity relationship. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 27, 891-932.
- Lukić, M., Pantelić, I. y Savić, S. (2021). Towards optimal pH of the skin and topical formulations: From the current state of the art to tailored products. *Cosmetics.*, 8, 1-18.
- Ma, Y., Feng, Y., Diao, T., Zeng, W. y Zuo, Y. (2020). Experimental and theoretical study on antioxidant activity of the four anthocyanins. *J. Mol. Struct.*, 1204, 1-24.

- Ma, Y., Li, Q., Van Den Heuvel, H. y Claeys, M. (1997). Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, *11*, 1357–1364.
- Maciel, L., do Carmo, M., Azevedo, L., Dagher, H., Molognoni, L., de Almeida, M. y Rosso, N. (2018). *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins-rich extract: Chemical stability, *in vitro* antioxidant and antiproliferative activities. *Food Chem. Toxicol.*, *113*, 187-197.
- Majolo, C., da Rocha, S., Chagas, E., Chaves, F. y Bizzo, H. (2016). Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *Aquacul Res.*, *48*, 1-8.
- Mak, Y., Chuah, L., Ahmad, R. y Bhat, R. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus* (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) and Cassia (*Senna bicapsularis* L.) flower extracts. *J. King. Saud. Univ. Sci.*, *25*, 275-282.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, *79*, 727–747.
- Manlan, Z., Xuchen, Z., Qingyan, S., Hui, L., Peixing, Z., Huijin, Z., Yanjun, X., Lijin, W. y Liangsheng, W. (2012). Relationship between the composition of flavonoids and flower colors variation in tropical water lily (*Nymphaea*) cultivars. *PLoS One.*, *7*, 1-11.
- Mansur, J., Breder, M., Mansur, M. y Azulay, R. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Na. Bras. Dermatol.*, *61*, 121-124.
- March, R. y Miao, X. (2004). A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *Int. J Mass Spectrom.*, *231*, 157-167.
- Mateos, R., Baeza, G., Sarriá, B. y Bravo, L. (2018). Improved LC-MS<sup>n</sup> characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. *Food Chem.*, *241*, 232-241.
- Md, A., Abd, S., Zaidan, U., Halmi, M. y Zainudin, B. (2019). Optimization of an ultrasound-assisted extraction condition for flavonoid compounds from cocoa shells (*Theobroma cacao*) using response surface methodology. *Molecules.*, *24*, 1-16.

- Medeiros, F., Gouveia, F., Bizzo, H., Vieira, R. y Menezzi, C. (2016). Fungicidal activity of essential oils from Brazilian *Cerrado* species against wood decay fungi. *Int Biodeterior Biodegradation.*, 114, 87-93.
- Medeiros, H., Cerqueira, F., Pereira, A., Arcanjo, D., Cavalcanti, B., De Abreu, A., Douglas, H., Alves, D., Da Silva, R., Oliveira, T., Freire, M., Lopes, A. y Dantas, J. (2014). Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity in vitro by *Lippia origanoides* H.B.K. in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed Res. Int.*, 2014, 1-7.
- Merken, H. y Beecher, G. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A Review. *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 577-599.
- Mikami, I., Yamaguchi, M., Shinmoto, H. y Tsushida, T. (2009). Development and validation of a microplate-based  $\beta$ -carotene bleaching assay and comparison of antioxidant activity (AOA) in several crops measured by  $\beta$ -carotene bleaching, DPPH and ORAC assays. *Food Sci. Technol. Res.*, 15, 171-178.
- Miller, R., Owens, S. y Rørslett, B. (2011). Plants and colour: Flowers and pollination. *Opt Laser Technol.*, 43, 282-294.
- Miller, T. (2009). Clinical testing to uphold an anti-aging claim. *Skin Aging Handbook*. William Andrew Publishing., New York, EE.UU. 363-389.
- Miraliakbari, H. y Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chem.*, 111, 421-427.
- Mircea, C. y Draghia, L. (2014). Allergenic and toxic compounds in ornamental plants-a review. *Bull UASVM Hort.*, 71, 180-184.
- Miyazawa, M., Ito, Y., Yoshida, Y., Sakaguchi, H. y Suzuki, H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro.*, 21, 428-437.
- Molnár, I. y FüzfaI, Z. (2005). Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *J. Chromatogr. A.*, 1073, 201-227.
- Moqbel, F., Naik, P., Najma, H. y Selvaraj, S. (2011). Antidiabetic properties of *Hibiscus rosa sinensis* L. leaf extract fractions on non-obese diabetic (NOD) mouse. *Indian J. Exp. Biol.*, 49, 24-29.

- Morais, G., Santos, O., Masson, D., Oliveira, W. y Rocha, P. (2005). Development of O/W emulsions with annatto oil (Bixaorellana) containing liquid crystal. *J. Disp. Sci. Technol.*, *26*, 591-596.
- Morton, J. (1981). Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Vol. I. Thomas Publisher., Springfield, Illinois, EE.UU. 745-750.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, *65*, 55-63.
- Muñoz, A., Kouznetsov, V. y Stashenko, E. (2009). Composición y capacidad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, *trans*-anetol o estragol. *Revista UISSalud.*, *41*, 287-294.
- Nagy, T., Ledolter, K. y Solar, S. (2008). Oxidation of naringenin by gamma-radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, *77*, 728-733.
- Nakamura, Y., Hidaka, M., Masaki, H., Seto, H. y Uozumi, T. (1990). Major anthocyanin of the flowers of *Hibiscus* (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). *Agr Biol Chem.*, *54*, 3345-3346.
- Neeru, V. y Sharma, S. (2008). Biologically active compounds from the genus *Hibiscus*. *Pharm Biol.*, *46*, 145-153.
- Neira, L., Mantilla, J., Stashenko, E. y Escobar, P. (2018). Toxicidad, genotoxicidad y actividad anti-Leishmania de aceites esenciales obtenidos de cuatro (4) quimiotipos del género. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromát.*, *17*, 68-83.
- Niki, E. y Noguchi, N. (2000). Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method?. *Life.*, *50*, 323-329.
- Nukada, Y., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Hirota, M., Ito, Y., Sakaguchi, H., Sasa, H. y Nishiyama, N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro.*, *26*, 1150-1160.
- Nukada, Y., Miyazawa, M., Kosaka, N., Ito, Y., Sakaguchi, H. y Nishiyama, N. (2008). Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *J. Toxicol. Sci.*, *33*, 175-185.
- Nunes, A., Vieira, Í., Queiroz, D., Leal, A., Maia, S., Muniz, D. y Coutinho, H. (2018). Use of flavonoids and cinnamates, the main photoprotectors with natural origin. *Adv.*

*Pharmacol. Sci.*, 2018, 1-9.

- Ocazonez, R., Meneses, R., Torres, F. y Stashenko, E. (2010). Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication *in vitro*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 105, 304-309.
- Olivas, F., García, J., Martínez, N., Cárdenas, A., Mendoza, S., Álvarez, E. y Wall, A. (2016). Cyanidin-3-O-glucoside: Physical-chemistry, foodomics and health effects. *Molecules.*, 21, 1-30.
- Ou, B., Hampsch, M. y Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 4619-4626.
- Ozdemir, F., Demirata, B. y Apak, R. (2016). Determination of synthetic food colorants in powder beverage samples by on-line HPLC–cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) Assay with post-column detection. *Chromatographia.*, 79, 199-208.
- Pagano, I., Sánchez, A., Mendiola, J., Campone, L., Cifuentes, A., Rastrelli, L. y Ibañez, E. (2018). Selective extraction of high-value phenolic compounds from distillation wastewater of basil (*Ocimum basilicum* L.) by pressurized liquid extraction. *Electrophoresis.*, 39, 1884-1891.
- Parise, C., Sá-Rocha, V. y Moraes, J. (2015). Skin sensitizer identification by IL-8 secretion and CD86 expression on THP-1 cells. *Toxicol. In Vitro.*, 30, 1-7.
- Pascoal, A., Quirantes, R., Fernando, A. L., Alexopoulou, E. y Segura, A. (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of kenaf leaves. *Ind Crops Prod.*, 78, 116-123.
- Pascual, M., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. y Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology. A review. *J. Ethnopharmacol.*, 76, 201-214.
- Patel, R., Patel, A., Desai, A. y Nagee, A. (2012). Study of secondary metabolites and antioxidant properties of leaves, stem and root among *Hibiscus rosa-sinensis* cultivars. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, 3, 719-725.
- Pearson, J., Lee, S., Suresh, H., Low, M., Nang, M., Singh, A., Lamin, F., Kazzem, M., Sullivan, S. y Khoo, C. (2014). The liquid chromatographic determination of chlorogenic and caffeic acids in Xu Duan (*Dipsacus asperoides*) raw herb. *ISRN Anal. Chem.*, 2014, 1-6.

- Pelvan, E., Olgun, E., Karadağ, A. y Alasalvar, C. (2018). Phenolic profiles and antioxidant activity of Turkish tumbul hazelnut samples (natural, roasted, and roasted hazelnut skin). *Food Chem.*, 244, 102-108.
- Pereira, D., Pinheiro, R., Heldt, L., Moura, C., Bianchin, M., Almeida, J. y Carpes, S. (2017). Rosemary as natural antioxidant to prevent oxidation in chicken burgers. *Food Sci. Technol.*, 37, 17-23.
- Pereira, O., Peres, A., Silva, A., Domingues, M. y Cardoso, S. (2013). Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. *Food Res. Int.*, 54, 1773-1780.
- Perera, W., Bizzo, H., Gama P., Alviano C., Salimena F., Alviano D. y Leitão S. (2017). Essential oil constituents from high altitude Brazilian species with antimicrobial activity: *Baccharis parvidentata* Malag., *Hyptis monticola* Mart. ex Benth. and *Lippia organoides* Kunth. *J. Essent. Oil Res.*, 29,1-8.
- Pérez, J., Sánchez, L., Barrios, E. y Sumaya, M. (2020). Kinetics of solid-liquid extraction of anthocyanins obtained from *Hibiscus rosa-sinensis*. *Rev Mex Ing Quim.*, 19, 813-826.
- Petkova, D., Mihaylova, D., Deseva, I., Denev, P. y Krastanov, A. (2021). Green approach to obtain extracts of seven edible flowers. In *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, 1031, 1-9.
- Pham, D., Nguyen, H., Nguyen, T., Ho, H., Trinh, T., Riyaphan, J. y Weng, C. (2020). Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from *Celastrus hindsii* leaves using response surface methodology and evaluation of their antioxidant and antitumor activities. *Biomed Res. Int.*, 2020. 1-9.
- Pillai, S. y Mini, S. (2016). Polyphenols rich *Hibiscus rosa sinensis* Linn. petals modulate diabetic stress signalling pathways in streptozotocin-induced experimental diabetic rats. *J. Funct. Foods.*, 20, 31-42.
- Pimentel, M., Borrás, I., Lozano, J., Arráez, D., Martínez, A. y Segura, A. (2018). Fluids supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive compounds from *Hibiscus sabdariffa*. *J. Supercrit. Fluid.*, 147, 213–221.
- Pinelo, M., Arnous, A. y Meyer, A. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 579–590.

- Plaza, M., Pozzo, T., Liu, J., Gulshan Ara, K. Z., Turner, C. y Nordberg, E. (2014). Substituent effects on in vitro antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, *62*, 3321-3333.
- Prior, R., Wu, X. y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, *53*, 4290-4302.
- Proestos, C., Boziaris, I., Nychas, G. y Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.*, *95*, 664-671.
- Quintero, N., Córdoba, Y., Stashenko, E. y Fuentes, J. (2017). Antigenotoxic effect against ultraviolet radiation-induced DNA damage of the essential oils from *Lippia* species. *Photochem. Photobiol.*, *93*, 1063-1072.
- Rajaei, A., Barzegar, M. y Yamini, Y. (2005). Supercritical fluid extraction of tea seed oil and its comparison with solvent extraction. *Eur. Food Res. Technol.*, *220*, 401-405.
- Rajesh, M., Sreenivas, S. A., Sakarkar, D. M. y Choudhury, A. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of *Hibiscus rosa-sinensis* extract. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, *5*, 2027-2034.
- Raman, V., Aryal, U, Hedrick, V., Ferreira, R, Fuentes, J, Stashenko, E, Morris, L. y Camarillo, I. (2018). Proteomic analysis reveals an extract of the plant *Lippia origanoides* suppresses mitochondrial. *J. Proteom. Res.*, *17*, 3370-3383.
- Ramírez, L., Isaza, J., Veloza, L., Stashenko, E. y Marín, D. (2009). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia origanoides* de diferentes orígenes de Colombia. *CIENCIA*, *17*, 313-321.
- Randhawa, S. y Bahna, S. (2009). Hypersensitivity reactions to food additives. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, *9*, 278-283.
- Rao, K., Geetha, K., Raja, A. y Banji, D. (2014). Quality control study and standardization of *Hibiscus rosa-sinensis* l. flowers and leaves as per who guidelines. *J. Pharmacog Phytochem.*, *3*, 29-37.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice, C. (1999). Antioxidant activity applying as improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, *26*, 1231-1237.

- Rengarajan, S., Melanathuru, V., Govindasamy, C., Chinnadurai, V. y Elsadek, M. (2020). Antioxidant activity of flavonoid compounds isolated from the petals of *Hibiscus rosa sinensis*. *J. King Saud Univ. Sci.*, 32, 2236-2242.
- Ribeiro, G., da Rocha, C., Veloso, W., Fernandes, R., da Silva, I., y Tanaka, A. (2019). Determination of the catechin contents of bioactive plant extracts using disposable screen-printed carbon electrodes in a batch injection analysis (BIA) system. *Microchem. J.*, 146, 1249-1254.
- Rice, C., Miller, N. y Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933-956.
- Rijke, E., Out, P., Niessen, W., Ariese, F., Gooijer, C. y Brinkman, U. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr. A.*, 1112, 31-63.
- Romanhole, R., Ataide, J., Cefali, L., Moriel, P. y Mazzola, P. (2016). Photostability study of commercial sunscreens submitted to artificial UV irradiation and/or fluorescent radiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 162, 45-49.
- Roriz, C., Barros, L., Carvalho, A., Santos, C. y Ferreira, I. (2014). *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Int. Food Res. J.*, 62, 684-693.
- Ruban, P. y Gajalakshmi, K. (2012). *In vitro* antibacterial activity of *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract against human pathogens. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2, 399-403.
- Sachdewa, A. y Khemani, L. (2003). Effect of *Hibiscus rosa-sinensis* ethanol flower extract on blood glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetes in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 89, 61-66.
- Sachdewa, A., Nigam, R. y Khemani, L. (2001). Hypoglycemic effect of *Hibiscus rosa sinensis* L. leaf extract in glucose and streptozotocin induced hyperglycemic rats. *Indian J. Exp. Biol.*, 39, 284-286.
- Saewan, N. y Jimtaisong, A. (2013). Photoprotection of natural flavonoids. *J App. Pharm Sci*, 3, 129-141.
- Saha, A. y Basak, B. (2020). Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants. *Ind Crop Prod.*, 145, 1-16.

- Sahidi, F. y Zhong Y. (2005). Bailey's industrial oil and fat products. John Wiley & Sons., New York, EE. UU. *12*, 493-498.
- Salem, M., Olivares, J. y Salem, A. (2014). Studies on biological activities and phytochemicals composition of *Hibiscus* species-A review. *Life Sci.*, *11*, 1-8.
- Sánchez, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.*, *8*, 121-137.
- Sánchez, R., Izquierdo, M., Quílez, M., Herraiz, D., Santana, O. y Jordán, M. (2018). Solid residues from the distillation of *Salvia lavandulifolia* Vahl as a natural source of antioxidant compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, *95*, 1277-1284.
- Santana, O., Polissiou, M., Izquierdo, M., Astraka, K., Tarantilis, P., Herraiz, D. y Sánchez, R. (2014). Polyphenol composition, antioxidant and bioplagueicide activities of the solid residue from hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. *Ind Crop Prod.*, *59*, 125-134.
- Santos, B., da Silva, A., Bello, M., Gonçalves, A., Gouvêa, T., Rodrigues, R. y Rodrigues, C. (2018). Molecular modeling for the investigation of UV absorbers for sunscreens: triazine and benzotriazole derivatives. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, *356*, 219-229.
- Sarrazin, S., Da Silva, L., Oliveira, R., Raposo, J., Da Silva, J., Salimena, F., Maia, J. y Mourão, R. (2015). Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Lipids Health Dis*, *14*, 145.
- Sathasivam, R., Muthuraman, M. y Park, S. (2022) Intensification of supercritical fluid in the extraction of flavonoids: A comprehensive review. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, *118*, 1-12.
- Saucedo, G., Vallejo, R. y Giménez, J. (2020) Effects of solar radiation and an update on photoprotection. *An. Pediatr.*, *92*, 1-9.
- Schmidt, K., Baldrige, J., Boatz, S., Elbert, M., Gordon, J., Jensen, S., Koseki, N., Matsunaga, K. y Nguyen, S. (1993). General atomic and molecular electronic structure system, *J. Comput. Chem.*, *14*, 1347-1363.
- Schuch, A., Moreno, N., Schuch, N., Menck, C. y Garcia, C. (2017). Sunlight damage to cellular DNA: focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic. Biol. Med.*, *107*, 110-124.

- Segev, A., Badani, H., Kapulnik, Y., Shomer, I., Oren-Shamir, M. y Galili, S. (2010) Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colored chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Food Sci.*, 75, 115–119.
- Seyyednejad, M., Haniyed, K., Daranpour, E. y Motamedi, H. (2010). A survey on *Hibiscus rosa-sinensis*, *Alcea rosea* L. and *Malva neglecta* Wallr as antibacterial agents. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 3, 351-355.
- Shem, Y., Galili, S., Badani, H., Segev, A., Hedvat, I. y Hovav, R. (2012). Determination of total polyphenol, flavonoid and anthocyanin contents and antioxidant capacities of skins from peanut (*Arachis hypogaea*) lines with different skin colors. *J. Food. Biochem.*, 36, 301–308.
- Shen, H., Zheng, Y., Chen, R., Huang, X. y Shi, G. (2021). Neuroprotective effects of quercetin 3-O-sophoroside from *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. on scopolamine-induced amnesia in mice. *J. Funct. Foods.*, 76, 1-12.
- Sheth, F. y De, S. (2012). Evaluation of comparative antioxidant potential of four cultivars of *Hibiscus rosa-sinensis* L. by HPLC-DPPH method. *Free Rad. Antioxid.*, 2, 73-78.
- Shin, S., Cho, J. y Kim, S. (2014). Shear thinning behavior of calcium silicate-based mold fluxes at 1623 K. *J. Am. Ceram. Soc.*, 97, 3263-3269.
- Shitole, S., Shinde, S., Waghmare, S. y Kamble, H. (2022) A Review On: Preservatives used in pharmaceuticals and impacts on health. *Iconic Res. Eng. J.*, 5, 131-140.
- Sierra, L. (2020) Estudio de la composición química y evaluación de las actividades antioxidante y fotoprotectora de extractos de flores de plantas tropicales cultivadas en Colombia. Tesis Doctoral. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 130-134.
- Sivira, A., Sanabria, M., Valera, N. y Vásquez, C. (2011). Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia origanoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). *Neotrop. Entomol.*, 40, 375-379.
- Skiba, M., Szendzielorz, K., Mazur, B. y Król, W. (2016). The inhibitory effect of flavonoids on interleukin-8 release by human gastric adenocarcinoma (AGS) cells infected with cag PAI (+) *Helicobacter pylori*. *Cent-Eur. J. Immunol.*, 41, 1-7.
- Sobhy, E., Abd, K. y Abd, H. (2017). Potential antibacterial activity of *Hibiscus rosa sinensis*

- Linn flowers extracts. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 6, 1066-1072.
- Sólyom, K., Solá, R., Cocero, M.J. y Mato, R. (2014). Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food Chem.*, 159, 361–366.
- Souza, L., Fonseca, F., Silva, J., Silva, A., Silva, J. y Martins, E. (2018). Antioxidant activity and flavonoid content in *Lippia origanoides* Kunth. *Rev. Cuba. Plantas Med.*, 23, 1-7.
- Sreeramulu, D. y Raghunath, M. (2011). Antioxidant and phenolic content of nuts, oil seeds, milk and milk products commonly consumed in India. *Food Nutr. Sci.*, 2, 422-427.
- Stashenko, E. y Martínez, J. (2018). The expression of biodiversity in the secondary metabolites of aromatic plants and flowers growing in Colombia, *Potential of essential oil*, 4, 59-86.
- Stashenko, E., Martínez, J. y Ruíz, C. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC/MS and principal component analysis. *J. Sep. Sci.*, 33, 93-103.
- Stashenko, E., Martínez, J., Cala, M., Durán, D. y Caballero, D. (2013). Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *J. Sep. Sci.*, 36, 192-202.
- Stashenko, E., Puertas, M., Salgar, W., Delgado, W. y Martínez, J. (2000). Solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A.*, 886, 175-181.
- Stashenko, E., Ruiz, C., Muñoz, A., Castañeda, M. y Martínez, J. (2008). Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. *Nat. Prod. Commun.*, 3, 563-566.
- Stewart, J. (2007). Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.*, 13, 1173-1213.
- Su, L., Yin, J., Charles, D., Zhou, K., Moore, J. y Yu, L. (2007). Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon, and oregano leaf. *Food Chem.*, 100, 990-997.

- Sun, B., Leandro, M., de Freitas, V. y Spranger, M. (2006). Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, *1128*, 27–38.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. y Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.*, *113*, 1226-1233.
- Tai, D., Tian, J., Zhang, J., Song, T. y Yao, Y. (2014). A *Malus crabapple* chalcone synthase gene, McCHS, regulates red petal color and flavonoid biosynthesis. *PLoS One.*, *9*, 1-13.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, EE.UU., 283-307.
- Tanaka, Y., Sasaki, N. y Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.*, *54*, 733–749.
- Teeranachaideekul, V., Boonme, P., Souto, E., Müller, R. y Junyaprasert, V. (2008). Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *J. Control Release.*, *128*, 134-141.
- Teles, S., Pereira J., Muniz de Oliveira, L., Malheiro, R., Lucchese A. y Silva, F. (2014). *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. *Ind. Crops Prod.*, *60*, 217-225.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. y Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Composition Anal.*, *19*, 669–675.
- Thune, P., Solberg, Y., McFadden, N., Staerfelt, F. y Sandberg, M. (1982). Perfume allergy due to oak moss and other lichens. *Contact Derm.*, *8*, 396–400.
- Timoteo, P., Karioti, A., Leitão, S., Vincieri, F. y Bilia, A. (2015). A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of brazilian *Lippia alba*. *Food Chem.*, *175*, 366–373.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ Chem. Lett.*, *4*, 147–157.

- Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G. y Oreopoulou, V. (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules.*, 12, 593-606.
- Tzia, C. y Liadakis, G. (2003). *Extraction Optimization in Food Engineering*, 1<sup>st</sup> Ed. CRC Press, Boca Raton. New York, EE. UU. 150-156.
- Ündeğer, Ü., Başaran, A., Degen, G. y Başaran, N. (2009). Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 2037-2043.
- Upadhyay, S., Upadhyay, P., Vinode, R. y Dixit, V. (2013). Effect of ethanolic fraction of *Hibiscus rosa sinensis* l., leaves in androgenic alopecia. *Egypt. Dermatol. Online J.*, 9, 1-7.
- Vadivel, V. (2016). Distribution of flavonoids among Malvaceae family members—A review. *Int. J Green Pharm.*, 10, 33-45.
- Vankar, P. y Srivastava, J. (2008). Comparative study of total phenol, flavonoid contents and antioxidant activity in *Canna indica* and *Hibiscus rosa sinensis*: Prospective natural food dyes. *Int. J. Food Eng.*, 4, 1-15.
- Velandia, S., Flechas, M., Stashenko, E., y Ocazonez. R. (2016). Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de Colombia para investigación con base en su citotoxicidad. *Vitae.*, 23, 18-29.
- Velasco, M., Sarruf, F., Oliveira, C., Silva, A., Consiglieri, V., Kaneko, T. y Baby, A. (2012). Influence of a bioactive substance on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions. *Biomed. Biopharm. Res.*, 9, 119-130.
- Wahid, S., Tasleem, S. y Jahangir, S. (2019). Phytochemical profiling of ethanolic flower extract of *Hibiscus rosa-sinensis* and evaluation of its antioxidant potential. *World J. Pharm. Res.*, 8, 161-168.
- Wan, H., Yu, C., Han, Y., Guo, X., Luo, L., Pan, H., Zheng, T., Wang, J., Cheng, T. y Zhang, Q. (2019). Determination of flavonoids and carotenoids and their contributions to various colors of rose cultivars (*Rosa* spp.). *Front. Plant Sci.*, 10, 1-14.
- Wang, B., Qu, J., Luo, S., Feng, S., Li, T., Yuan, M. y Ding, C. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from olive (*Olea europaea*) leaves, and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. *Molecules.*, 23, 1-14.

- Wang, L. y Weller, C. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.*, *17*, 300–312.
- Washio, F., Ueda, M., Ito, A. y Ichihashi, M. (1999). Higher susceptibility to apoptosis following ultraviolet B irradiation of xeroderma pigmentosum fibroblasts is accompanied by upregulation of p53 and downregulation of bcl-2. *Br. J Dermatol.*, *140*, 1031-1037.
- Watson, R. (2014). Polyphenols in plants: Isolation, purification and extract preparation. 1<sup>st</sup> Ed., Elsevier Science Limited, Waltham, MA, EE.UU., *231*, 103-157.
- Wigfield, Y., Selwyn, J., Khan, S. y McDowell, R. (1996). Comparison of supercritical fluid extraction and solvent extraction of twenty-two organochlorine pesticides from eggs. *Chemosphere.*, *32*, 841–847.
- Wissing, S. y Müller, R. (2002). The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. *Int. J Pharm.*, *242*, 377-379.
- Wollenweber, E. y Dietz, V. (1981). Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry.*, *20*, 869–932.
- Xia, J., Zhao, B., Zan, J., Wang, P. y Chen, L. (2019). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Artemisiae Argyi folium* by HPLC-MS/MS and discovery of antioxidant ingredients based on relevance analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *175*, 1-8.
- Xiu, L., Chao, J., Yan, S., Min, Y. y Xiao, C. (2009). Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. *Food Chem.*, *113*, 692–700.
- Xu, B., Yuan, S. y Chang, S. (2007). Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *J. Food Sci.*, *72*, 167–177.
- Yasuyuki, N., Makoto, H., Haruhiko, M., Haruo, S. y Takeshi, U. (1990). Major anthocyanin of the flowers of *Hibiscus (Hibiscus rosa-sinensis L.)*. *Agric. Biol. Chem.*, *54*, 3345-3346.
- Yin, N., Wang, S., Jia, L., Zhu, M., Yang, J., Zhou, B. y Qu, C. (2019). Identification and characterization of major constituents in different-colored rapeseed petals by UPLC–HESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, *67*, 11053-11065.

- Yoshida, K., Mori, M. y Kondo, T. (2009). Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat. Prod. Rep.*, *26*, 884-915.
- Zaki, L., Mohamed, S., Bashandy, S., Morsy, F., Tawfik, K. y Shahat, A. (2017). Hypoglycemic and antioxidant effects of *Hibiscus rosa-sinensis L.* leaves extract on liver and kidney damage in streptozotocin induced diabetic rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, *11*, 161-169.
- Zeng, X., Su, W., Zheng, Y., Liu, H., Li, P., Zhang, W. y Yao, H. (2018). UFLC-Q-TOF-MS/MS-based screening and identification of flavonoids and derived metabolites in human urine after oral administration of exocarpium *Citri grandis* extract. *Molecules.*, *23*, 1-15.
- Zhang, Z., Li, D., Wang, L., Ozkan, N., Chen, X. y Mao, Z. (2007). Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Sep. Purif. Technol.*, *57*, 17-24.
- Zhang, Z., Pang, X., Xuwu, D., Ji, Z. y Jiang, Y. (2005). Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chem.*, *90*, 47-52.
- Zhao, Z., Liu, P., Wang, S. y Ma, S. (2017). Optimization of ultrasound, microwave and soxhlet extraction of flavonoids from *Millettia speciosa champ* and evaluation of antioxidant activities *in vitro*. *J. Food Meas. Charact.*, *11*, 1947-1958.
- Zheng, Y., Deng, G., Liang, Q., Chen, D., Guo, R. y Lai, R. (2017). Antioxidant activity of quercetin and its glucosides from propolis: A theoretical study. *Sci. Rep.*, *7*, 1-11.
- Zhong, L., Liu, Y., Xiong, B., Chen, L., Zhang, Y. y Li, C. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* by response surface methodology. *J. Anal. Methods Chem.*, *15*, 1-10.
- Zhong, L., Zhang, Y., Chi, R. y Yu, J. (2016). Optimization of microwave-assisted ethanol reflux extraction process of flavonoids and saponins simultaneously from *Radix astragali* using response surface methodology. *Food Sci. Technol. Res.*, *22*, 759-770.
- Zhu, M., Zheng, X., Shu, Q., Li, H., Zhong, P., Zhang, H. y Wang, L. (2012). Relationship between the composition of flavonoids and flower colors variation in tropical water lily (*Nymphaea*) cultivars. *PLoS One.*, *7*, 1-11.

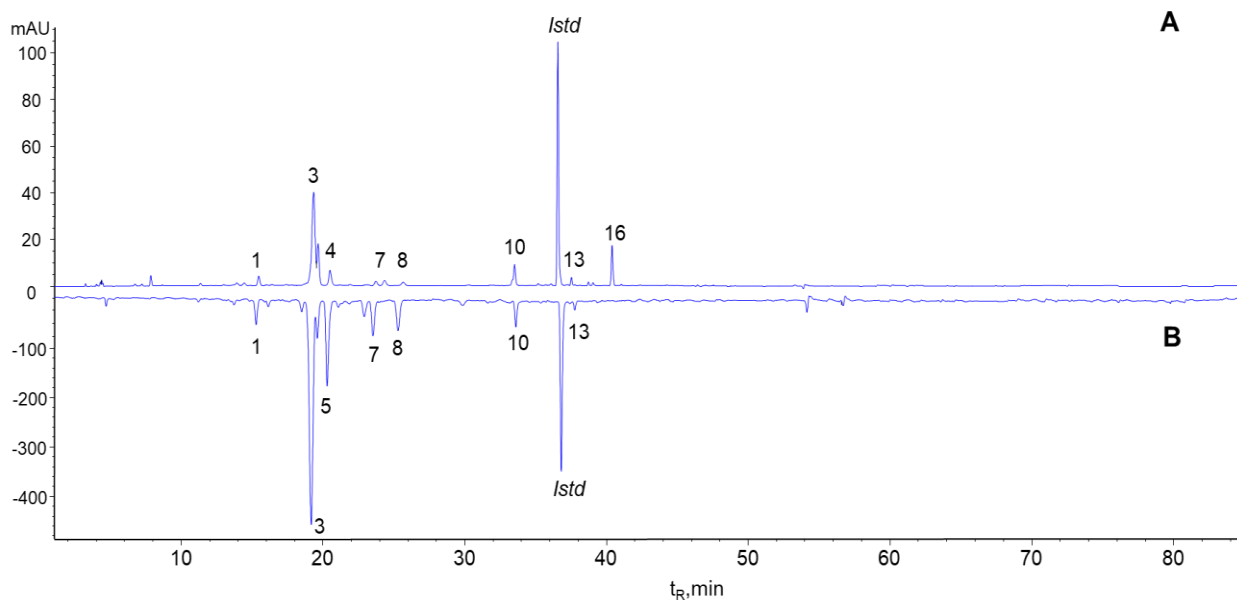
## ANEXOS

Anexo A. Capacidad antioxidante de compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos de cuatro cultivares de *H. rosa-sinensis*.

Nº Fig A1-A4	Compuesto	$\lambda$ , nm	$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g muestra seca}^1$ , (Porcentaje de capacidad antioxidante)								Criterio de identificación	Referencias
			Rojo		Rosado		Naranja		Amarillo			
1	Ácido fenólico	240, 295 <sup>h</sup> , 330 <sup>max</sup>	65±3	4%	49±1	4%	27±1	2%	30.0±0.4	3%	a,b	Pearson <i>et al.</i> , 2014
2	Ácido fenólico	232, 314 <sup>max</sup>	-		31±1	3%	-		24.0±0.3	2%	a,b	Pearson <i>et al.</i> , 2014
3	Ciandina-soforósido	240, 280 <sup>max</sup> , 514	733±8	50%	193±3	16%	190±3	15%	-		a,b	Farr <i>et al.</i> , 2018
4	Flavanona	284 <sup>max</sup> , 330 <sup>h</sup>	95±0.4	6%	148±1	12%	31±1	2%	-		a,b	Kim <i>et al.</i> , 2009
5	Catequina+ciandina-3- glucosido	-	229±4	16%	116±2	10%	85±1	7%	89.0±0.1	9%	a,b,c	Farr <i>et al.</i> , 2018
6	Derivado glicosilado de quercetina	254 <sup>max</sup> , 295, 354	57±0.4	4%	55±1	5%	69±1	5%	30.0±0.3	3%	a,b	Chen <i>et al.</i> , 2007
7	Flavanona	284 <sup>max</sup> , 330 <sup>h</sup>	96±3	7%	51±1	4%	41±1	3%	-		a,b	Kim <i>et al.</i> , 2009
8	Epicatequina	227 <sup>max</sup> , 280	107±0.2	7%	40±1	3%	40±1	3%	-		a,b,c	Chen <i>et al.</i> , 2007
9	Derivado de kaempferol + derivado de ácido fenólico	-	-		-		-		40.0±0.1	4%	a,b	Pearson <i>et al.</i> , 2014
10	Derivado glicosilado de quercetina	256 <sup>max</sup> , 295, 355	59±0.2	4%	353±1	30%	401±1	32%	381.0±0.4	37%	a,b	Chen <i>et al.</i> , 2007
11	Derivado glicosilado de kaempferol	266 <sup>max</sup> , 305 <sup>h</sup> , 348	-		-		33±1	3%	35.0±0.3	3%	a,b	Chen <i>et al.</i> , 2007
12	Derivado glicosilado de quercetina	256 <sup>max</sup> , 295, 355			57±1	5%	50±1	4%	115±2	11%	a,b	Chen <i>et al.</i> , 2007
13	Quercetina-glucósido	256 <sup>max</sup> , 295, 354	20±0.1	1%	100±2	8%	257±2	20%	226.0±0.2	22%	a,b,c	Chen <i>et al.</i> , 2007
14	Derivado glicosilado de kaempferol	266 <sup>max</sup> , 305 <sup>h</sup> , 348	-		-		-		-		a,b,c	Kim <i>et al.</i> , 2009
15	Kaempferol-glucósido	266 <sup>max</sup> , 305 <sup>h</sup> , 348	-		-		21±1	2%	18±1	2%	a,b,c	Kim <i>et al.</i> , 2009
16	Flavanona	284 <sup>max</sup> , 330 <sup>h</sup>	-		-		-		12.0±0.3	1%	a,b	Kim <i>et al.</i> , 2009
17	Derivado de kaempferol	266, 320 <sup>h</sup> , 366	-		-		24±1	2%	30.0±0.1	3%	a,b	Kim <i>et al.</i> , 2009

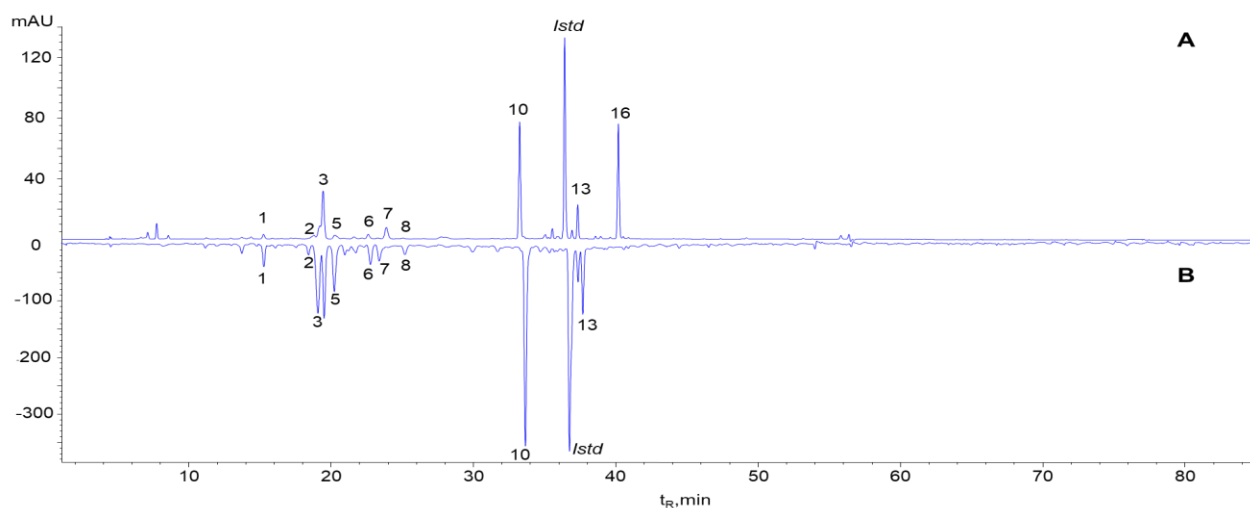
<sup>1</sup> Valor promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=2$ . <sup>max</sup> Máximo. <sup>h</sup> Hombro.<sup>a</sup> Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y por comparación con señales típicas  $\lambda$  (nm) para compuestos fenólicos.<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y por comparación con espectro UV-Vis reportado en artículos científicos (Chen *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Pearson *et al.*, 2014 y Farr *et al.*, 2018).<sup>c</sup> Identificación confirmatoria basada en espectro UV-Vis y por comparación con espectro UV-Vis y  $t_r$  de sustancia de referencia certificada.

**Anexo B.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de los extractos hidro-alcohólicos obtenidos de diferentes cultivares de *H. rosa sinensis*, antes **A.**  $\lambda=270$  nm y después **B.**  $\lambda=734$  nm de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup>



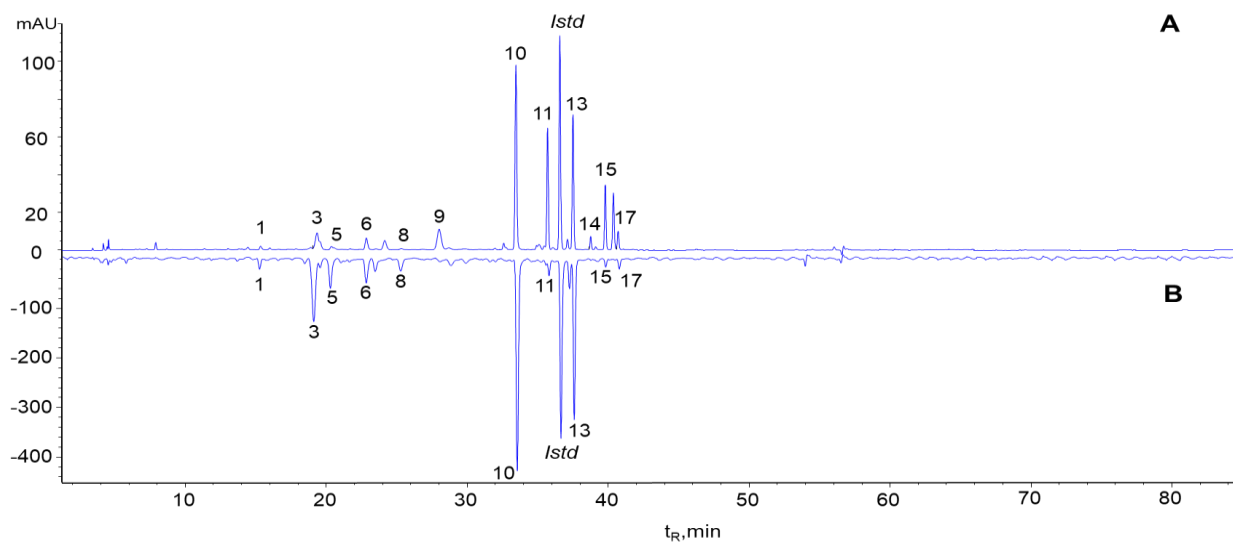
**Figura A1.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto de *H. rosa sinensis*, cultivar rojo, antes (DAD, **A.**  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup>. La identificación de los picos aparece en el

#### ANEXO A.

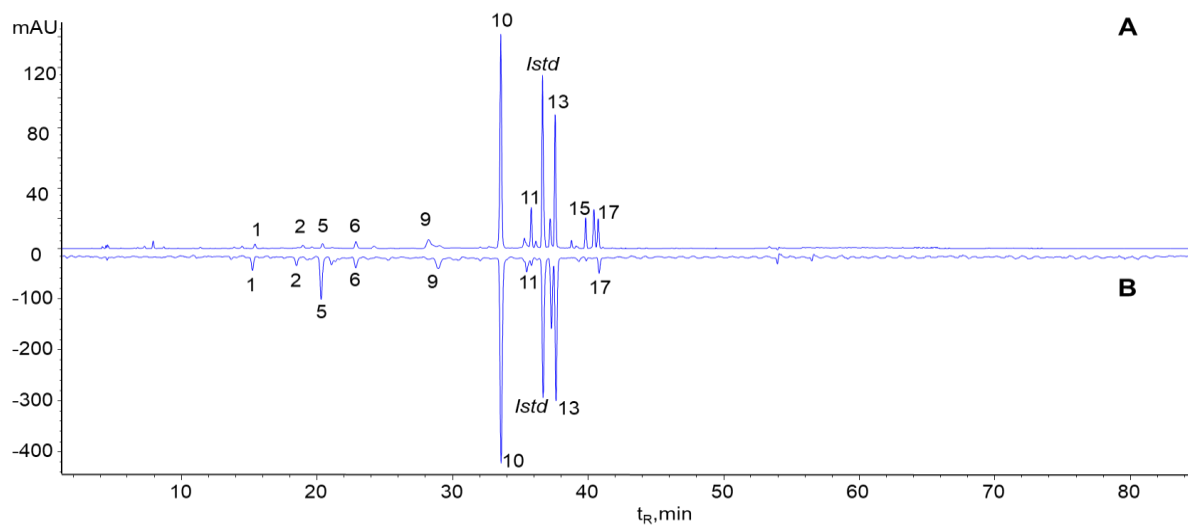


**Figura A2.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto de *H. rosa sinensis*, cultivar rosado, antes (DAD, **A.**  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup>. La identificación de los picos aparece en el

#### ANEXO A.



**Figura A3.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto de *H. rosa sinensis*, cultivar naranja, antes (DAD, **A.**  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical  $ABTS^{+\bullet}$ . La identificación de los picos aparece en el **ANEXO A.**



**Figura A4.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto de *H. rosa sinensis*, cultivar amarillo, antes (DAD, **A.**  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical  $ABTS^{+\bullet}$ . La identificación de los picos aparece en el **ANEXO A.**

Anexo C. Capacidad antioxidante de compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos de biomasa residual de *L. origanoides*.

Nº Fig A5-A7	Compuesto	$\lambda$ , nm	$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g muestra seca}^{\text{1}}$ , (Porcentaje de capacidad antioxidante)						Criterio de Identificación	Referencias
			Timol		Carvacrol		Felandreno			
1	Ácido fenólico	260 <sup>max</sup> , 295 <sup>h</sup>	40±5	2%	65±1	12%	54±2	3%	a	Pearson <i>et al.</i> , 2014
2	Derivado glicosilado de eriodictiol	230, 284 <sup>max</sup> , 340 <sup>h</sup>	200±5	12%	40±1	7%	232±2	15%	a,b	Lin <i>et al.</i> , 2007.
3	Acido fenólico	228, 295 <sup>h</sup> , 330 <sup>max</sup>	54±1	3%	64±5	12%	132±4	8%	a	Pearson <i>et al.</i> , 2014
4	Eriodictiol-glucósido	230, 284 <sup>max</sup> , 330 <sup>h</sup>	294±1	18%	63±1	12%	296±2	19%	a,b,c	Lin <i>et al.</i> , 2007.
5	Acido fenólico	230, 295 <sup>h</sup> , 315 <sup>max</sup>	83±3	5%	42±2	8%	-	-	a	Pearson <i>et al.</i> , 2014
6	Derivado de quercetina	254 <sup>max</sup> , 314 <sup>h</sup> , 370	117±1	7%	61±1	11%	195±2	12%	a,b	Chen <i>et al.</i> , 2007
7	Luteolin-hexósido	254 <sup>h</sup> , 268 <sup>h</sup> , 346 <sup>max</sup>	188±6	12%	28±1	5%	190±3	13%	a, b	Kim <i>et al.</i> , 2009
8	Flavanona	230, 286 <sup>max</sup>	180±16	11%	-	-	208±4	11%	a	Kim <i>et al.</i> , 2009
9	Flavanona	230, 286 <sup>max</sup>	-	-	-	-	52±1	3%	a	Kim <i>et al.</i> , 2009
10	Eriodictiol	230, 288 <sup>max</sup> , 330 <sup>h</sup>	210±16	13%	77±3	14%	35±2	2%	a,b,c	Lin <i>et al.</i> , 2007.
11	Luteolina+ Quercetina	-	277±3	17%	98±1	18%	78±3	5%	a,b,c	Tsimogiannis <i>et al.</i> , 2007
12	Naringenina	230 <sup>max</sup> , 289, 320 <sup>h</sup>	-	-	-	-	-	-	a,b,c	Lin <i>et al.</i> , 2007.
13	Apigenina	222 <sup>max</sup> , 268, 337	-	-	-	-	-	-	a,b,c	Lin <i>et al.</i> , 2007.
14	Pinocembrina	290 <sup>max</sup> , 324 <sup>h</sup>	-	-	-	-	86±1	6%	a,b,c	Lin <i>et al.</i> , 2007.

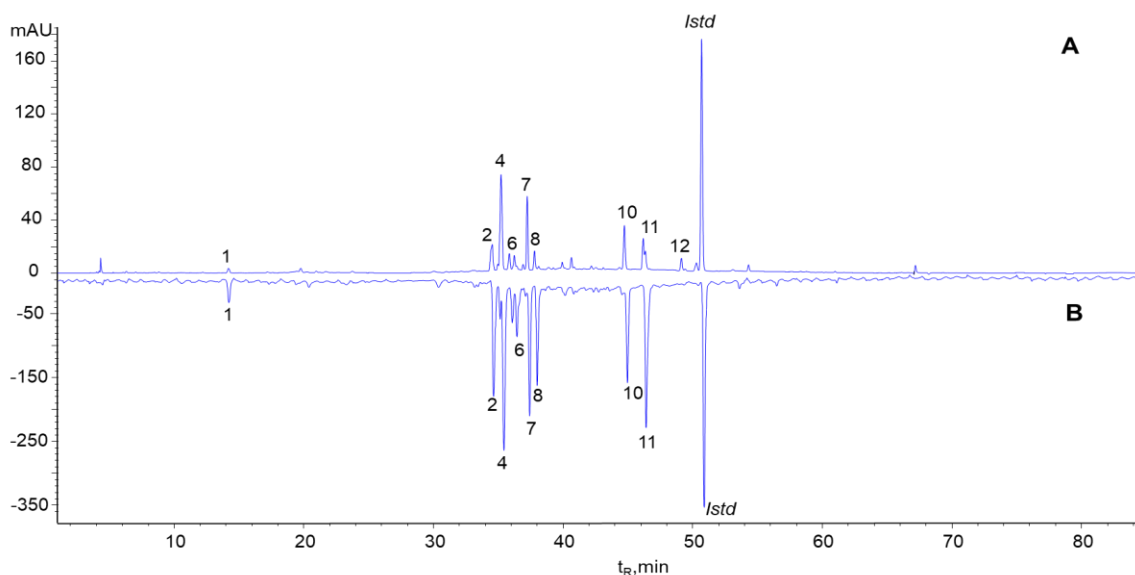
<sup>1</sup> Valor promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=2$ . <sup>max</sup> Máximo. <sup>h</sup> Hombro.

<sup>a</sup> Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y por comparación con señales típicas  $\lambda$  (nm) para compuestos fenólicos.

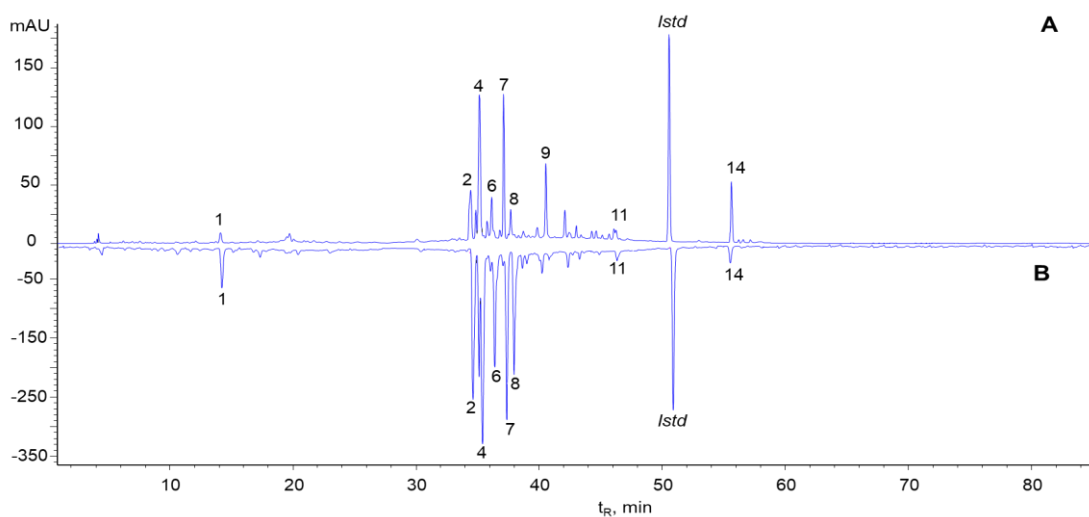
<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y por comparación con espectro UV- Vis reportado en artículos científicos (Lin *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009 y Pearson *et al.*, 2014)

<sup>c</sup> Identificación confirmatoria basada en espectro UV- Vis y por comparación con espectro UV- Vis y  $t_r$  de sustancia de referencia certificada.

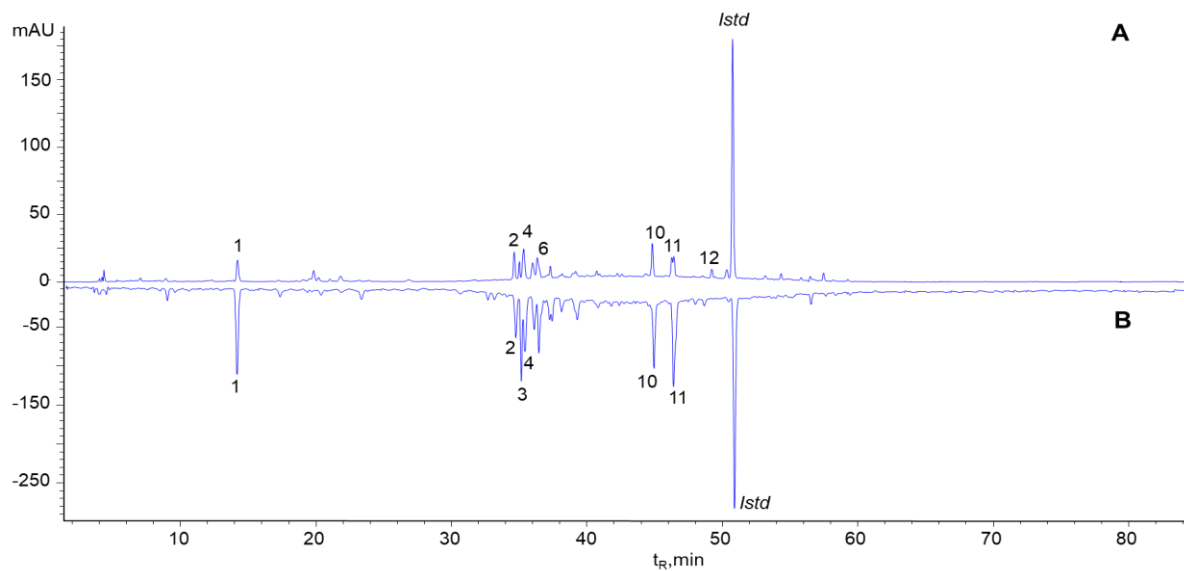
**Anexo D.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC con derivatizador, para extractos hidro-alcohólicos obtenidos a partir de biomasa residual de *L. origanoides* de diferentes quimiotipos, antes (DAD, **A.**  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup>.



**Figura A5.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto hidroalcohólico aislado de la biomasa residual de *L. origanoides*, quimiotipo Timol, antes (DAD, **A.**  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>•+</sup>. La identificación de los picos aparece en el **ANEXO C**.



**Figura A6.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto hidroalcohólico aislado de la biomasa residual de *L. origanoides*, quimiotipo Felandreno, antes (DAD, **A.**  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>•+</sup>. La identificación de los picos aparece en en el **ANEXO C**.



**Figura A7.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto hidroalcohólico aislado de la biomasa residual de *L. origanoides*, quimiotipo Carvacrol, antes (DAD, **A**,  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B**,  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup>. La identificación de los picos aparece en el **ANEXO C**.

**Anexo E.** Capacidad antioxidante de compuestos presentes en los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de la biomasa residual de *L. origanoides*.

N° Fig A9-A11	Compuesto	λ, nm	μmol Trolox®/g muestra seca <sup>1</sup> , (Porcentaje de capacidad antioxidante, %)				Criterios de identificación	Referencias	
			Timol	Carvacrol	Felandreno				
1	Eriodictiol	230, 288 <sup>max</sup> , 330 <sup>h</sup>	-	50±1	10%	-	a,b,c	Lin <i>et al.</i> , 2007. Tsimogiannis <i>et al.</i> , 2007	
2	Luteolina+ Quercetina	-	-	64±1	13%	-	a,b,c	Tsimogiannis <i>et al.</i> , 2007	
3	No identificado	334 <sup>max</sup> , 274	47±4	14%	54±3	11%	-		
4	Sakuranetina	288 <sup>max</sup> , 324 <sup>h</sup>	-	146±3	30%	-	a,b,c	Lin <i>et al.</i> , 2007	
5	Pinocembrina	290 <sup>max</sup> , 324 <sup>h</sup>	-	-	83±1	23%	a,b,c	Lin <i>et al.</i> , 2007	
6	Galangina	266 <sup>max</sup> , 310, 360	-	-	248±1	69%	a,b,c	Tsimogiannis <i>et al.</i> , 2007	
7	Carvacrol	226 <sup>max</sup> , 276	49±3	15%	94±1	20%	-	a,b,c	Lin <i>et al.</i> , 2007
8	Metilgalangina	266 <sup>max</sup> , 310, 360	-	-	35±1	10%	a,b	Lin <i>et al.</i> , 2007	
9	Timol	226 <sup>max</sup> , 276	239±2	71%	74±1	15%	-	a,b,c	Lin <i>et al.</i> , 2007

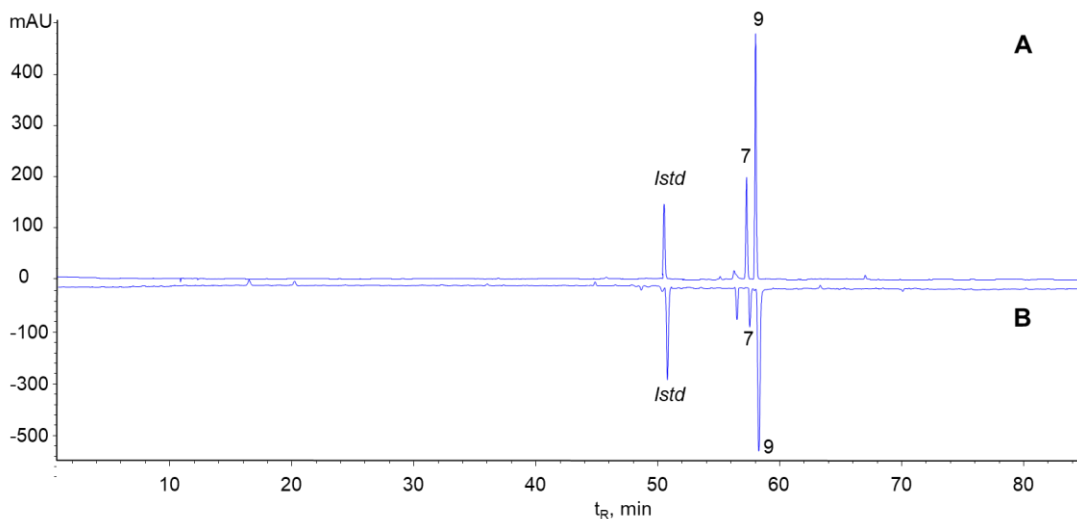
<sup>1</sup> Valor promedio ± desviación estándar, n=2. <sup>max</sup> Máximo. <sup>h</sup> Hombro.

<sup>a</sup> Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y por comparación con señales típicas λ (nm) para compuestos fenólicos.

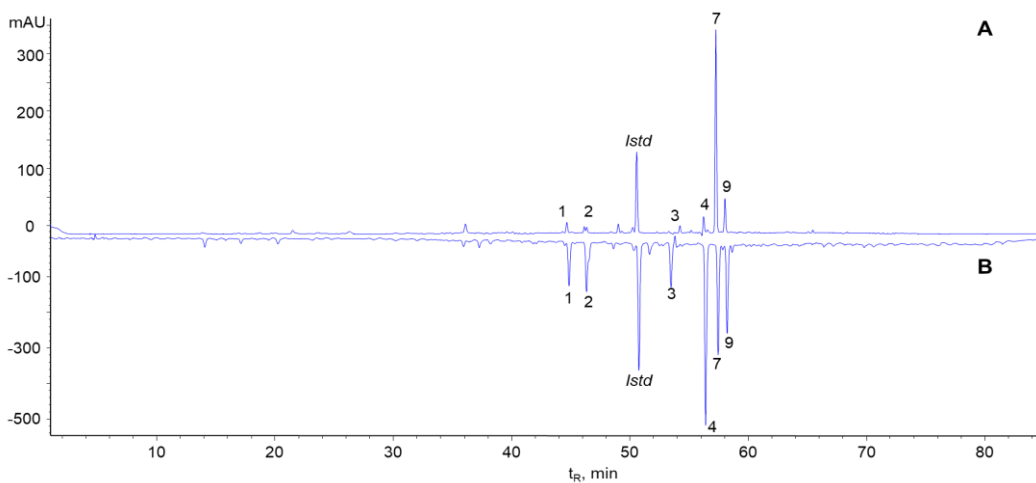
<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y por comparación con espectro UV- Vis reportado en artículos científicos (Lin *et al.*, 2007; Tsimogiannis *et al.*, 2007)

<sup>c</sup> Identificación confirmatoria basada en espectro UV- Vis y por comparación con espectro UV- Vis y t<sub>R</sub> de sustancia de referencia certificada.

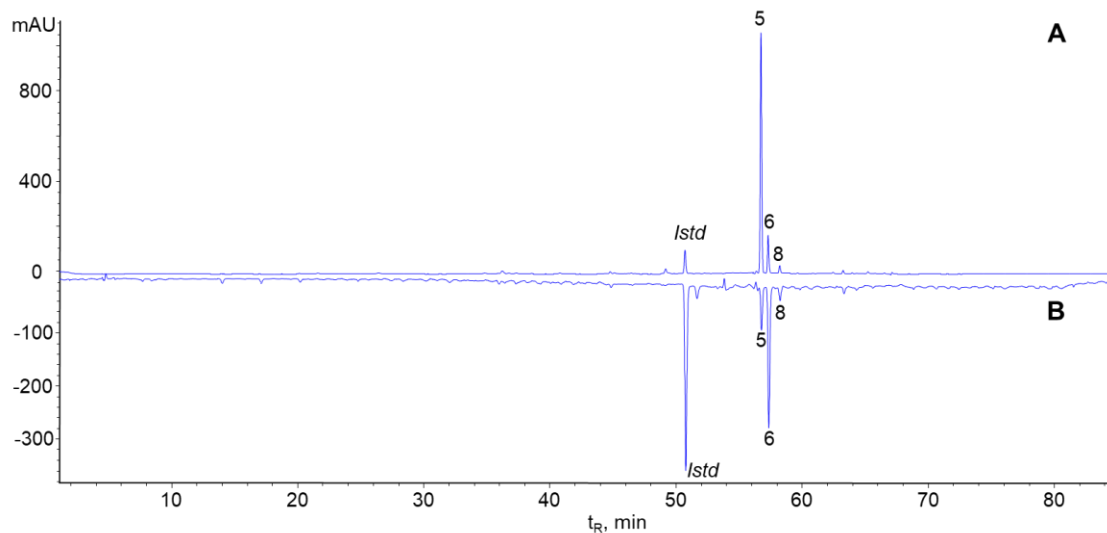
**Anexo F.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de los extractos aislados con CO<sub>2</sub> supercrítico de *L. origanoides*, de diferentes quimiotipos, antes (DAD, **A.**  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup>.



**Figura A9.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto aislado con  $\text{CO}_2$  supercrítico de la biomasa residual de *L. origanoides*, quimiotipo Timol, antes (DAD, **A**,  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B**,  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ . La identificación de los picos aparece en el **ANEXO E**.



**Figura A10.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto aislado con  $\text{CO}_2$  supercrítico de la biomasa residual de *L. origanoides*, quimiotipo Carvacrol, antes (DAD, **A**,  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B**,  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ . La identificación de los picos aparece en el **ANEXO E**.



**Figura A11.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto aislado con CO<sub>2</sub> supercrítico de la biomasa residual de *L. origanoides*, quimiotipo Felandreno, antes (DAD, **A**.  $\lambda=270$  nm) y después (MWD, **B**.  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup>. La identificación de los picos aparece en el **ANEXO E**.