

Caracterización de extractos MSPD de hojas de híbridos entre las especies *Lippia alba*, *L. origanoides* y *Lantana canescens*

Edwin Fernando Rugeles Garzón

Trabajo de grado para optar al título de Químico

Directora:

Elena E. Stashenko

PhD. en Química Instrumental

Codirector:

Jairo R. Martínez

Ph.D. en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2025

Agradecimientos

A mis padres, pilares de mi existencia, su amor incondicional ha sido mí refugio e impulso. Gracias por su paciencia, por enseñarme que el aprendizaje y el crecimiento no tienen límites, y por demostrarme que, como en toda buena reacción, el tiempo y el esfuerzo dan los mejores resultados. Sus enseñanzas me han impulsado a ser un elemento mejor en esta sociedad, y cada paso en este camino lleva su huella grabada como un espectro en mi corazón.

A mis profesores y directores de tesis, Elena E. STASHENKO y Jairo R. MARTÍNEZ, su guía ha sido el catalizador perfecto para mi crecimiento académico y personal. Gracias por mostrarme que la química de la vida no se limita a reacciones en un laboratorio, sino que reside en el arte de enseñar, corregir y compartir con los demás. Sus palabras y enseñanzas le han dado estructura a mi formación como profesional, pero, sobre todo, como ser humano. De ustedes aprendí que la verdadera sabiduría no solo es capaz de transformar compuestos, sino también almas, despertando en mí el deseo de siempre buscar más, de ser más. Aunque partir de este Edén de conocimientos, experiencias y amistades me llena de nostalgia, sé que llevo en mi interior el potencial necesario (70 eV) para convertirme en un gran químico y desde el fondo de mi corazón agradezco todo lo que pude compartir con ustedes.

A la Dra. Lady SIERRA, gracias por ser esa fuerza nuclear fuerte que nos unía a todos. De usted, aprendí a enfrentar las adversidades con firmeza y a tener para cada problema una solución, siempre con una sonrisa que rompe cualquier tensión superficial. Gracias por enseñarme que, en

la tabla periódica de la vida, la disciplina, la constancia y la empatía son los elementos que nos permiten destacar e inspirar.

A mi grupo de investigación, juntos hemos destilado momentos difíciles y otros, de completa alegría. También, hemos compartido la entalpía humana necesaria para que el entorno fuera un verdadero hogar. Gracias por ser ese soporte en las dificultades, por alegrar mis días y demostrarme que, como en una mezcla heterogénea, cada uno aporta algo único e invaluable para el equilibrio de una gran familia.

A mis amigas más especiales, Jeimmy ÁLVAREZ, Darlyng POVEDA y Leidy MARÍN, ustedes han sido el disolvente de mis tristezas y el medio ideal en el que pude crecer y ser yo mismo. Gracias por estar a mi lado durante toda la carrera, por acompañar mi transformación profesional, y por ser el enlace que une el pasado con el presente, recordándome que, incluso en los procesos más complejos, el amor y la amistad son las fuerzas que mantienen todo unido y en perfecto equilibrio.

Al Centro de Investigación en Biomoléculas UIS, CIBIMOL, CROM-MASS y CENIVAM, a la Universidad Industrial de Santander, Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Facultad de Ciencias y Escuela de Química, por su apoyo.

Al proyecto “Constelación biodiversa: confluencia de saberes en el Jardín Botánico Experimental Consentido”, financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la UIS [GRANT N° 3736].

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	17
1. Estado del arte.....	20
2. Marco teórico	24
2.1 Familia Verbenáceae.....	24
2.2 Género lippia.....	25
2.2.1 Lippia alba (Mill.) Britton & P.Wilson.....	26
2.2.2 Lippia origanoides Kunth	26
2.3 Género Lantana.....	27
2.3.1 Lantana canescens.....	28
2.4 Hibridaciones	29
2.4.1 Hibridaciones interespecíficas	29
2.4.2 Hibridaciones intergenéricas.....	29
2.5 Metabolitos secundarios de plantas	30
2.5.1 Terpenos.....	31
2.5.2 Fenoles	31
2.6 Técnicas de extracción.....	32
2.6.1 Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida.....	32
2.7 Técnicas analíticas	33
2.7.1 Cromatografía de gases.....	33
2.7.2 Cromatografía líquida	34

2.8 Detectores	35
2.8.1 Detector selectivo de masas	35
2.8.2 Detector de ionización en llama.....	35
2.8.3 Analizador de masas Orbitrap.....	36
3. Objetivos	37
3.1 Objetivo general.....	37
3.2 Objetivos específicos	37
4. Metodología	38
4.1 Reactivos y solventes.....	39
4.2 Recolección de material vegetal	39
4.3 Extracción usando dispersión de la matriz en fase solida.....	41
4.4 Análisis químico de los extractos de plantas bajo estudio.....	44
4.4.1 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	44
4.4.2 Análisis por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama	46
4.4.3 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	47
5. Resultados y discusión.....	49
5.1 Identificación taxonómica.....	49
5.2 Cultivos experimentales de las plantas y establecimiento de cruces	51
5.3 Caracterización morfológica.....	51
5.3.1 Caracterización morfológica del híbrido <i>Lippia alba</i> (citral) x <i>L. organoides</i> (timol)	51
5.3.2 Caracterización morfológica del híbrido <i>Lantana canescens</i> x <i>Lippia organoides</i> (timol)	53
5.4 Evaluación de parámetros de extracción.....	54

5.5 Caracterización química de los extractos obtenidos por MSPD de hojas, usando diclorometano como solvente de elución.....	58
5.6 Caracterización química por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de los extractos MSPD de hojas de plantas bajo estudio, usando metanol como solvente de elución.....	68
6. Divulgación de resultados.....	86
7. Conclusiones.....	87
Referencias Bibliográficas.....	89

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Número de publicaciones, por especie, relacionadas por año de publicación. Fecha de consulta: 5 abril de 2023. Periodo de observación: 2004-2023.....	22
Tabla 2. Número de publicaciones según la ecuación de búsqueda utilizada. Fecha de consulta: 5 abril de 2023. Periodo de observación: 1999-2023	22
Tabla 3. Matriz de experimentos y variables evaluadas para el diseño factorial 2 ³ para la extracción MSPD de <i>Lippia origanoides</i> , bajo estudio (n=3).....	43
Tabla 4. Identificación botánica de los tres parentales estudiados en el presente trabajo.	50
Tabla 5.	52
Tabla 6. Comparación morfológica entre <i>Lantana canescens</i> , <i>L. origanoides</i> (Timol) y su híbrido.....	54
Tabla 7. Resultados del análisis de varianza para evaluar el efecto de las condiciones de extracción sobre el área calculada de picos GC de extractos MSPD de hojas frescas de la especie <i>Lippia origanoides</i>	55
Tabla 8. Resumen del modelo y coeficientes usados en el presente estudio.	56
Tabla 9. Mejores condiciones de extracción por MSPD encontradas para la especie <i>L.</i> <i>origanoides</i>	58
Tabla 10. Composiciones químicas obtenidas por GC/MS de los extractos aislados por MSPD de <i>Lippia alba</i> , <i>L. origanoides</i> y su híbrido, <i>L. alba</i> x <i>L. origanoides</i>	60
Tabla 11. Composiciones químicas obtenidas por GC/MS de los extractos obtenidos de <i>Lantana canescens</i> , <i>L. origanoides</i> y su híbrido.	66

Tabla 12. Composiciones químicas determinadas por UHPLC/ESI ⁺ /Orbitrap-HRMS con base en moléculas protonadas [M+H] ⁺ y deprotonadas [M-H] ⁻ presentes en los extractos MSPD de hojas de <i>L. origanoides</i>	70
Tabla 13. Composiciones químicas determinadas por UHPLC/ESI ⁺ /Orbitrap-HRMS con base en moléculas protonadas [M+H] ⁺ y deprotonadas [M-H] ⁻ presentes en los extractos MSPD de hojas de <i>L. alba</i>	75
Tabla 14. Composiciones químicas determinadas por UHPLC/ESI ⁺ /Orbitrap-HRMS con base en moléculas protonadas [M+H] ⁺ presentes en los extractos MSPD de hojas de <i>Lantana canescens</i>	77
Tabla 15. Patrones de herencia de metabolitos secundarios en híbridos de <i>Lippia alba</i> , <i>L. origanoides</i> y <i>Lantana canescens</i> : comparativa de compuestos parentales vs. descendencia	80

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología del presente estudio.....	38
Figura 2. Especies identificadas <i>Lippia alba</i> , <i>L. origanoides</i> y <i>Lantana</i>	40
Figura 3. Montaje para las extracciones por MSPD del material vegetal y obtención de los extractos	42
Figura 4. Cromatógrafo de gases AT 6890 Plus, equipado con un detector selectivo de masas MS 5973 Network.....	45
Figura 5. Cromatógrafo de gases AT 6890N, acoplado a un detector de ionización en llama (FID)	47
Figura 6. Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia Vanquish TM acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive	49
Figura 7. Gráfico de Pareto para los efectos estandarizados en el diseño experimental planteado para extractos, obtenidos de los extractos MSPD de hojas frescas de <i>L. origanoides</i>	57
Figura 8. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS de los extractos de hojas: A. <i>L. origanoides</i> ; B. <i>L. alba</i> y C. <i>L. alba</i> x <i>L. origanoides</i> . Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de cada pico cromatográfico en la Tabla 10.....	59
Figura 9. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS de los extractos de hojas de: A. <i>Lippia origanoides</i> ; B. <i>Lantana canescens</i> y C. <i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i> . Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de cada pico cromatográfico en la Tabla 11.....	65

Figura 10. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ deprotonadas $[M-H]^-$, en extractores aislados por MSPD de <i>L. origanoides</i> obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo full scan Columna Zorbax Eclipse C ₁₈ . Véase la identificación de los picos en la Tabla 12	74
Figura 11. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ deprotonadas $[M-H]^-$, en extractores aislados por MSPD de <i>L. alba</i> obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo full scan Columna Zorbax Eclipse C ₁₈ . Véase la identificación de los picos en la Tabla 13.....	76
Figura 12. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$, en extractores aislados por MSPD de <i>Lantana canescens</i> obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo full scan Columna Zorbax Eclipse C ₁₈ . Véase la identificación de los picos en la Tabla 14.	78
Figura 13. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de floretina $[M+H]^+$ en m/z 275.09140, a 10 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD.	81
Figura 14. Espectro de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la luteolina-7-arabinopiranosil-glucósido. Véase la señal $[M + H]^+$ en m/z 581.14917, a 10 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD.	82
Figura 15. Espectro de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS del erodictiol. Véase la señal $[M + H]^+$ en m/z 289.07047, a 30 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD.	84

Figura 16. Espectro de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la dicranenona A. Véase la señal $[M + H]^+$ en m/z 289.17952, a 40 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD..... 85

Figura 17. Espectros de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de un compuesto no identificado presente en el extracto por MSPD de *Lippia alba*. Véase la señal $[M + H]^+$ en m/z 227.12697, a 20 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. 86

Glosario

<i>AE</i>	<i>Aceites esenciales</i>
<i>AT</i>	<i>Agilent Technologies</i>
<i>CA</i>	<i>California</i>
<i>CENIVAM</i>	<i>Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.</i>
<i>CIBIMOL</i>	<i>Centro de Investigación en Biomoléculas.</i>
<i>CINTROP</i>	<i>Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales.</i>
<i>d_f</i>	<i>Espesor de la fase estacionaria</i>
<i>D.I.</i>	<i>Diámetro interno.</i>
<i>e.g.</i>	<i>Exemple gratia (Por ejemplo).</i>
<i>EI</i>	<i>Electron Ionizaion (Ionización con electrones).</i>
<i>ESI</i>	<i>Electrospray Ionization (Ionización por electronebulización).</i>
<i>ET</i>	<i>Electron transfer (Transferencia de electrones).</i>
<i>et al.</i>	<i>Et alli (y otros)</i>
<i>eV</i>	<i>Electrón-voltio</i>
<i>f.e.</i>	<i>Fase estacionaria.</i>
<i>FID</i>	<i>Flame Ionization Detector (Detector de ionización de llama).</i>
<i>GC</i>	<i>Gas Chromatography (Cromatografía de gases)</i>
<i>HAT</i>	<i>Hydrogen Atom Transfer (Transferencia de átomo de hidrógeno).</i>
<i>HCD</i>	<i>Higher-Energy Collision Dissociation Cell (Celda de colisiones activadas de alta energía).</i>

<i>HRMS</i>	<i>High-Resolution Mass Spectrometry (Espectrometría de masas de alta resolución)</i>
<i>IRL</i>	<i>Índice(s) de retención lineal(es)</i>
<i>ISTD</i>	<i>Internal Standard (estándar interno)</i>
<i>LC/MS</i>	<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas)</i>
<i>m/z</i>	<i>Relación masa/carga</i>
<i>MS</i>	<i>Mass Spectrometry (Espectrometría de masas o espectro de masas, según el contexto)</i>
<i>MSPD</i>	<i>Solid-phase matrix dispersion (Dispersión de la matriz en fase sólida).</i>
<i>Orbitrap-MS</i>	<i>Orbitrap Mass Spectrometry (Espectrometría de masas Orbitrap)</i>
<i>t_R</i>	<i>Tiempo de retención</i>
<i>UHPLC</i>	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia).</i>

Resumen

Título: Caracterización de extractos MSPD de hojas de híbridos entre las especies *Lippia origanoides*, *L. alba* y *Lantana canescens* *

Autor: Edwin Fernando Rugeles Garzón **

Palabras Clave: *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Lantana canescens*, hibridación, extractos, GC/MS, LC/MC

Descripción:

La familia Verbenaceae incluye a *Lippia alba*, *L. origanoides* y *Lantana canescens*, conocidas por sus propiedades bioactivas. Se recolectaron hojas de estas especies y sus híbridos en el CENIVAM (Bucaramanga, Colombia). Los extractos se obtuvieron mediante dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y se analizaron por GC/MS, GC/FID y UHPLC-ESI+/-Orbitrap-HRMS. El timol, el geranial y el *trans*- β -cariofileno fueron los principales compuestos en *L. origanoides*, *L. alba* y *L. canescens*, respectivamente, según el análisis por GC/MS. Por UHPLC-Orbitrap-MS, los compuestos principales identificados fueron la floretina en *L. origanoides*, un compuesto no identificado en *L. alba* (*m/z* 227.12778), y dicranenona A en *L. canescens*. Los híbridos intergenéricos heredaron los compuestos mayoritarios del parental femenino, mientras que los flavonoides eriodictiol y apigenina estuvieron ausentes. En total, se identificaron 40 compuestos en los extractos, destacando su diversidad química. Este estudio demuestra la viabilidad de realizar polinizaciones manuales para producir híbridos en la familia Verbenaceae, aportando la primera caracterización química de extractos MSPD de estas especies y sus híbridos, con potencial para el desarrollo de productos bioactivos.

* Trabajo de investigación

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko PhD. en Química Instrumental Codirector: Jairo R. Martínez Ph.D. en Química

Abstract

Title: Characterization of MSPD extracts from leaves of hybrids between the species *Lippia origanoides*, *L. alba* and *Lantana canescens**

Author(s): Edwin Fernando Rugeles Garzón**

Key Words: *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Lantana canescens*, hybridization, extracts, GC/MS, LC/MC

Description:

The Verbenaceae family includes *Lippia alba*, *L. origanoides*, and *Lantana canescens*, known for their bioactive properties. Leaves from these species and their hybrids were collected at CENIVAM (Bucaramanga, Colombia). Extracts were prepared using solid-phase matrix dispersion (MSPD) and analyzed by GC/MS, GC/FID, and UHPLC-ESI+/-Orbitrap-HRMS. Thymol, geranial, and *trans*- β -caryophyllene were the main compounds in *L. origanoides*, *L. alba*, and *L. canescens*, respectively, based on GC/MS analysis. By UHPLC-Orbitrap-MS, the main compounds identified were phloretin in *L. origanoides*, an unidentified compound (m/z 227.12778) in *L. alba*, and dicranenone A in *Lantana canescens*. Intergeneric hybrids inherited major compounds from the female parent, while flavonoids such as eriodictyol and apigenin were absent. In total, 40 compounds were identified, highlighting their chemical diversity. This study demonstrates the feasibility of manual pollination to produce hybrids within the Verbenaceae family, providing the first chemical characterization of MSPD extracts from these species and their hybrids, with potential applications in bioactive product development.

* Research Work

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko PhD. en Química Instrumental Codirector: Jairo R. Martínez Ph.D. en Química

Introducción

El desarrollo de la tecnología de modificación genética (GM) ha sido un tema de amplio debate en las últimas décadas. Por un lado, ha permitido introducir características beneficiosas en cultivos, como resistencia a sequías, tolerancia a enfermedades y mayor rendimiento de compuestos bioactivos (Gómez-Rodríguez *et al.*, 2022). Sin embargo, también ha generado inquietudes sobre su impacto en la salud humana y en el ambiente, incluyendo el riesgo de transferencia genética no controlada entre especies que podría comprometer ecosistemas agrícolas y naturales (Nahrung *et al.*, 2009). En este contexto, la hibridación se posiciona como un fenómeno biológico clave, no solo en el proceso de especiación vegetal, sino también en su capacidad para combinar características deseables de las especies parentales, por ejemplo, para una mayor resistencia a factores bióticos y abióticos y para la diversificación de metabolitos secundarios (Jägermeyr, J., *et al.* 2022). Este proceso es particularmente relevante en plantas medicinales y aromáticas, porque los metabolitos secundarios tienen usos farmacéuticos, cosméticos y agroindustriales, y representa una estrategia crucial para garantizar el uso sostenible y seguro de estas especies.

En Colombia, uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, se encuentran especies de la familia Verbenaceae como *Lippia alba*, *L. origanoides* y *Lantana canescens*. Estas plantas, además de ser utilizadas en la medicina tradicional, tienen un alto contenido de metabolitos secundarios bioactivos. *L. alba* se utiliza para el tratamiento de afecciones respiratorias y gastrointestinales (Bolson *et al.*, 2015), mientras que *L. origanoides* se usa en medicina popular por sus efectos antifúngicos y antioxidantes (Stashenko *et al.*, 2010; Brandão *et*

al., 2021); por su parte, *Lantana canescens* posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Lencina *et al.*, 2021). Estas propiedades refuerzan su potencial terapéutico e industrial y resaltan la necesidad de estudios detallados que permitan explorar y aprovechar estas características. Por lo tanto, es importante encontrar métodos confiables, rápidos para detectar y monitorear la composición química de las plantas, no solo con herramientas que facilitan comparaciones entre parentales e híbridos, sino que también ayudan a identificar compuestos específicos y establecer diferencias clave en sus perfiles metabólicos. La presente investigación contribuye a resolver problemas teóricos y prácticos al emplear estrategias de análisis químico que permiten explorar la compatibilidad entre cruces naturales y artificiales, además de usar los perfiles químicos como marcadores útiles en la caracterización taxonómica.

El propósito de este trabajo fue determinar la composición química de extractos obtenidos mediante dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) de hojas de *Lippia alba*, *L. organoides* y *Lantana canescens*, así como de sus híbridos. La bióloga Ariadna SILVA realizó los híbridos y llevó a cabo su caracterización morfológica (Silva Morales, 2024), mientras que la identificación botánica de los parentales se realizó en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander, dirigido por el Prof. Dr. Andrés Felipe CASTAÑO GONZÁLEZ. Se utilizó un diseño experimental para obtener las mejores condiciones de extracción, se usaron dos solventes elución a saber; diclorometano, con el cual el análisis del extracto se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) y cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (GC/FID) y metanol con el cual el análisis del extracto se llevó acabo por cromatografía de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas *Orbitrap* (UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS).

Entre los resultados más destacados vale la pena mencionar, que en *L. alba* se identificaron 15 compuestos (> 0.1 %), en *L. origanoides*, 21 compuestos (> 0.1 %); en *Lantana canescens*, 23 compuestos (> 0.1 %). En el híbrido de *Lippia alba* x *L. origanoides* se identificaron 13 compuestos (> 0.1 %) y en los híbridos de *Lantana canescens* x *Lippia origanoides* se detectaron como compuestos mayoritarios los mismos de su parental hembra (todos, > 0.1 %). En este trabajo por primera vez se estudió la composición química de extractos MSPD de los tres parentales mencionados y de sus híbridos, así como la composición química de *Lantana canescens*, lo que contribuye al conocimiento de esta familia de plantas.

Los resultados de este estudio se presentan en diversos congresos internacionales, como el 3d *Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry*, IBERO-2022, XI Congreso Colombiano de Cromatografía (COCOCRO), el XIX Congreso Latinoamericano de Cromatografía (COLACRO), el XVI Simposio Latinoamericano de Química Analítica Ambiental (LASEAC), el XXVI Simposio Internacional en Avances en Tecnologías de Extracción (EXTECH), el III Simposio Panamericano de Aceites Esenciales (SPAEE) y el *Workshop* de Avances Recientes en la Preparación de Muestras (WARPA), realizado del 13 al 15 de noviembre de 2024 en Bucaramanga, Colombia. Los siguientes resultados se expusieron bajo la modalidad de presentación oral, “Chemical characterization by GC/MS and LC/MS of *Lippia origanoides*, *L. alba*, *Lantana canescens* and their hybrids MSPD extracts”.

Este proyecto de grado forma parte del estudio “La constelación biodiversa: confluencia de saberes en el Jardín Botánico Experimental Consentido”, financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander (N° 3736) y del Programa “Bio-Reto XXI 15:50”, financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación e ICETEX. El permiso de colecta fue otorgado a través del contrato N° 270, que permite el acceso a

recursos genéticos y productos derivados con fines de bioprospección, suscrito por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Industrial de Santander.

1. Estado del arte

La revisión bibliográfica sobre *L. alba* (pronto alivio) se llevó a cabo con énfasis en su quimiotipo citral. Se estudió la información sobre compuestos presentes en los aceites esenciales (AE) y extractos de esta especie, Con una atención especial en los estudios que emplearon técnicas analíticas como GC/MS, GC/FID y LC/MS. Se usó la base de datos *Scopus* (Elsevier), empleando la ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("*Lippia alba*") AND (citral). Periodo de búsqueda fue 2004-2023 (Véase Tabla 1). Se encontraron 114 artículos, de los cuales 43 estaban relacionados con ciencias agrícolas y biológicas y 42, con farmacología, toxicología y farmacia. También, se observó una predominancia de publicaciones provenientes de Brasil, con un total de 76; Colombia contribuyó con 25 artículos. Silva *et al.* (2022) indica que los AE de *L. alba*, quimiotipo citral y la fracción rica en carvona de *L. origanoides*, quimiotipo felandreno y *Turnera diffusa*, exhibieron una actividad antiviral fuerte. Quintero *et al.* (2017) mencionan que *p*-cimeno, geraniol, carvacrol, timol, citral y 1,8-cineol encontrados en los AE del género *Lippia* tienen propiedades antigenotóxica. Jaramillo *et al.* (2012) afirman que los AE de plantas colombianas tienen propiedades *anti-quorum sensing* (anti-QS) de cadena corta en *Escherichia coli* con el plásmido pJBA132, destacándose especialmente el de *L. alba*; además, su quimiotipo citral presentó actividad anti-QS de cadena larga, en *Pseudomonas putida* que contiene el plásmido pRK-C12.

La revisión bibliográfica se realizó para *L. origanoides* (orégano de monte), usando la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY ("*Lippia origanoides*") AND (*thymol*), durante el período de 2004-2023. Un total de 77 artículos se han publicado, uno de revisión y dos, encuestas cortas. En Brasil se realizaron estudios plasmados en 39 artículos, mientras que Colombia, 38. Se ha estudiado la actividad antibacteriana, *antibiofilm* y anti-QS de los AE de plantas aromáticas contra bacterias patógenas, encontrando que los AE de *L. origanoides*, quimiotipo timol-carvacrol, tenían una actividad antimicrobiana más alta, además, de inhibir la formación de biopelículas y tener propiedades moduladoras del QS contra *Chromobacterium violaceum* (Cáceres *et al.*, 2020), *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Martínez *et al.*, 2023). Por otro lado, Sánchez *et al.* (2016) describe que el AE de *L. origanoides*, quimiotipo timol timol, tiene un efecto biocida sobre microorganismos, por consiguiente, un potencial alto de este AE es como producto contra los fitopatógenos *Pytophthora infestans* y *Alternaria solanien* en cultivos de papa.

Para el estudio bibliográfico sobre *Lantana canescens* se usó la ecuación TITLE-ABS-KEY ("*Lantana canescens*"). Se hallaron 14 artículos de los cuales solo tres mencionan la composición química de sus AE. Dambolena *et al.* (2010) reportaron en la composición química del AE de *L. canescens* un 24.8 % de hidrocarburos sesquiterpénicos. Sena Filho *et al.* (2010) afirman fue posible discriminar entre grupos de taxones de *Lantana* en función de sus marcadores químicos, además de proporcionar más información sobre el uso de *trans*- β -cariofileno como marcador químico para especies pertenecientes al género *Lantana*. Peralta-Bohórquez *et al.* (2011) mencionan que los compuestos volátiles aislados de las hojas de *L. canescens* fueron *trans*- β -cariofileno (13.5 %), germacreno D (10.3 %) y oct-1-en-3-ol (8.4 %) y un último artículo que aparece, fue sobre la composición volátil de flores de *L. canescens* analizadas mediante microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) junto con GC/MS (Pino *et al.*,

2011). En la Tabla 1, se presentan los registros de publicaciones reportados en la última década sobre *lippia alba*, quimiotipo citral y *L. origanoides*, quimiotipo timol aumentando hasta el 2019. Sin embargo, *L. canescens* ha sido estudiada escasamente, lo que representa una oportunidad para explorar el potencial de las aplicaciones de esta especie. La revisión bibliográfica, también se llevó a cabo usando cinco ecuaciones de búsqueda diferentes relacionadas con los análisis cromatográficos y sobre los híbridos de estas plantas (Véase **Tabla 2**).

Tabla 1.

Número de publicaciones, por especie, relacionadas por año de publicación. Fecha de consulta: 5 abril de 2023. Periodo de observación: 2004-2023

Nombre de la especie	Número de publicaciones, por año				
	2004	2005-2009	2010-2014	2015-2019	2020-2023
<i>L. alba</i> , quimiotipo citral	7	16	25	47	22
<i>L. origanoides</i> , quimiotipo timol	1	3	14	31	28
<i>L. canescens</i>	-	4	6	2	-

Nota. Tomado de: Scopus (Elsevier).

Tabla 2.

Número de publicaciones según la ecuación de búsqueda utilizada. Fecha de consulta: 5 abril de 2023. Periodo de observación: 1999-2023

N°	Ecuación de búsqueda	N° de publicaciones
1	("chromatography" OR "GC/MS" OR "LC/MS") AND ("plant hybrids" OR "hybrid plants") AND ("chemical composition" OR "chemical profile")	7
2	("gas chromatography" OR "liquid chromatography") AND ("mass spectrometry") AND ("hybrid plants" OR "plant hybridization") AND ("chemical composition")	4

N°	Ecuación de búsqueda	N° de publicaciones
3	("GC/MS" OR "LC/MS") AND ("hybrid plants" OR "plant crossbreeding") AND ("chemical analysis" OR "chemical constituents")	1
4	("chromatographic analysis" OR "mass spectrometry") AND ("hybrid plants" OR "plant breeding") AND ("chemical profile")	6
5	("hybridization" OR "crossbreeding") AND ("plant chemistry" OR "phytochemical analysis") AND ("gas chromatography" OR "liquid chromatography")	3

Nota. Tomado de: Scopus (Elsevier).

Isidorov *et al.* (2019) estudió los compuestos orgánicos volátiles (VOC) presentes en las yemas de híbridos artificiales de abedules utilizando la técnica microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME, por sus siglas en inglés). Al comparar los VOC de los híbridos con los de los parentales, se encontró que la descendencia tiende a mostrar una herencia dominante alineada con la línea materna; además, los híbridos poseen una composición química distintiva que podría ayudar a determinar su origen cuando las características morfológicas no siempre son concluyentes. Para evaluar cómo se alimentan las plagas en relación con ciertas características de las plantas, Nahrung *et al.* (2009) estudiaron la interacción del escarabajo *Paropsis atomaria* con las especies parentales, *Corymbia citriodora subsp. Variegata* (planta hospedadora), *Corymbia torelliana* y sus híbridos. La investigación mostró que las características físicas y químicas de las hojas de plantas híbridas del género *Corymbia* eran “intermedias” con las de sus parentales. Los híbridos no fueron más susceptibles a las plagas, pero sí generaban pupas más pequeñas que las alimentadas con especies parentales. La elección de la planta por parte del herbívoro tiene una base química, lo que sugiere que podría ser posible desarrollar resistencia contra esta plaga en estos árboles de importancia comercial. Selvaraj *et al.* (2002) identificaron los metabolitos secundarios de los AE de hojas y cáscara de *Citrus aurantifolia*, *C. latifolia* y su híbrido (*C. latifolia* × *C.*

aurantifolia). Este estudio concluyó que el híbrido presentaba características de ambos parentales, por un lado, no tenía semillas al igual que *C. latifolia*, pero su composición química era similar a la de *C. aurantifolia*. Después de emplear las cinco ecuaciones de búsqueda en *Scopus* (Elsevier), encontraron 12 artículos) (Véase Tabla 2). Esto indica una exploración científica aun escasa en el ámbito de la cromatografía aplicada al de estudios de composición química de híbridos de plantas. Igualmente, hallaron estudios relacionados con híbridos entre las especies *Lippia alba*, *L. origanoides* y *Lanata canescens*.

2. Marco teórico

2.1 Familia Verbenáceae

La familia Verbenaceae, que se ubica dentro del orden Lámiales, representa un conjunto diverso y cosmopolita de plantas angiospermas, abarca una variedad estimada de 36 géneros y cerca de 1150 especies distintas (*World Flora Online*, 2023c). Las plantas de esta familia se encuentran distribuidas en las regiones subtropicales y tropicales, con una representación notable en Colombia, un país que se caracteriza por su megadiversidad (Bernal *et al.*, 2019). En cuanto a la variabilidad de sus formas, las Verbenáceas abarcan desde especies herbáceas hasta arbóreas y lianas. La forma de sus flores, usualmente con simetría bilateral y agrupadas en inflorescencias, así como sus frutos que toman la forma de drupas o nueces, proporcionan una visión de la adaptación y variedad típicas de esta familia (Munir, 1993).

En Colombia, las Verbenáceas poseen una presencia relevante en la flora nativa y desempeñan un rol significativo tanto cultural como económico, con 13 géneros y 74 especies (Bernal *et al.*, 2019). Varias especies se utilizan en la medicina tradicional, mientras que otras se emplean en las industrias cosmética y farmacéutica (Bernal *et al.*, 2019). La familia Verbenaceae posee numerosas plantas ornamentales (Decuyper *et al.*, 2020), con géneros como *Lantana* y *Verbena*, que son muy apreciados en horticultura. Algunas especies, como *Lippia alba* y *L. origanoides*, son utilizadas como condimentos y hierbas aromáticas (Stashenko *et al.*, 2008).

2.2 Género lippia

El género *Lippia* crece mayormente en zonas tropicales, aunque se han reportado algunas de sus especies en África y Madagascar (Pascual *et al.*, 2001). Este género comprende 119 especies (World Flora Online, 2023b). Colombia, cuenta con aproximadamente cinco especies que contribuyen a su biodiversidad (Bernal *et al.*, 2019).

Varias especies de *Lippia* se han utilizado en la medicina tradicional por mucho tiempo. *L. alba*, conocida comúnmente como "pronto alivio" en Colombia, es una de las especies más usadas para diferentes tratamientos de problemas digestivos y enfermedades respiratorias (Stashenko *et al.*, 2010). Algunas especies de *Lippia* se utilizan en las industrias cosmética y farmacéutica debido gracias a sus compuestos bioactivos (Criollo *et al.*, 2007). Las especies de *Lippia* son conocidas por su diversa composición química, que incluye una amplia gama de metabolitos secundarios (Stashenko *et al.*, 2010). Esta composición química puede variar entre las especies e incluso entre los individuos de una misma especie, dando lugar a diferentes quimiotipos.

2.2.1 *Lippia alba* (Mill.) Britton & P. Wilson

La planta *L. alba*, de la familia Verbenaceae, es un arbusto perenne que puede alcanzar hasta tres metros de altura, con hojas opuestas y ovadas y flores pequeñas agrupadas en inflorescencias. Las flores pueden variar en color desde el blanco hasta el rosa, dependiendo de la localidad y la genética de la planta *L. alba*. Se distribuye extensamente en América Latina, en países como Colombia, Brasil y Argentina (*World Flora Online*, 2023b). Su gran diversidad y su composición química rica en compuestos volátiles, en la que se destacan citral, limoneno, nerol y *trans*- β -cariofileo (Caballero-Gallardo., *et al.*, 2022), permiten tener varias aplicaciones de las plantas por sus efectos antimicrobianos, antiinflamatorios y ansiolíticos (Bolson *et al.*, 2015)

2.2.2 *Lippia organoides* Kunth

L. organoides Kunth, comúnmente conocida como "orégano mexicano" u "orégano de monte", es una planta medicinal y aromática que pertenece a la familia Verbenaceae. Las hojas de *L. organoides* son opuestas, simples y de forma elíptica a lanceolada, con bordes enteros o ligeramente dentados. La superficie de las hojas es lisa y de color verde brillante; las hojas desprenden una fragancia característica cuando se frota. Las flores de *L. organoides* son pequeñas y se agrupan en inflorescencias terminales llamadas espigas. Estas inflorescencias están compuestas por numerosas flores tubulares de color blanco a ligeramente rosado. Los frutos son pequeñas drupas que contienen una sola semilla. Esta especie es nativa de América Latina y se encuentra principalmente en México, América Central y el Caribe. *L. organoides* ha sido objeto

de numerosos estudios debido a sus propiedades medicinales y su composición química diversa (Soares *et al.*, 2017).

En cuanto a su composición química, *L. origanoides* exhibe una variabilidad considerable debido a la presencia de diferentes quimiotipos. Entre los principales quimiotipos identificados se encuentran los de timol, carvacrol y linalool (Stashenko *et al.*, 2010), según el componente mayoritario en los AE. El quimiotipo timol de *L. origanoides* se conoce por el contenido alto de timol, un monoterpeno fenólico. El timol es reconocido por sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes, lo que le confiere a *L. origanoides*, quimiotipo timol, un potencial terapéutico significativo (Vicuna *et al.*, 2009). Junto con el estudio de la composición química, *L. origanoides*, también se han ampliamente estudiados sus usos medicinales. En la medicina, los preparados se utiliza para tratar afecciones gastrointestinales, respiratorias y como agentes analgésicos y antiinflamatorios (Bruna, T. *et al.*, 2013). Estudios científicos han respaldado algunas de estas propiedades medicinales y han demostrado la eficacia de los extractos de *L. origanoides* en el tratamiento de enfermedades como el dengue (Quintero, 2022).

2.3 Género *Lantana*

Este género cuenta con de 147 especies en el mundo (*World Flora Online*, 2023a) y 18 especies en Colombia (Bernal *et al.*, 2019). El género *Lantana* comprende una serie de arbustos perennes, ampliamente conocidos por sus vistosas y fragantes flores. Las especies de *Lantana* presentan hojas opuestas, rugosas y pelosas, con bordes dentados (Sanders, 2012). Las flores de estas plantas se agrupan en inflorescencias llamadas *capitulum* y varían en color desde amarillo, naranja y rojo hasta blanco y púrpura. Los frutos de *Lantana* son drupas que contienen una o dos

semillas (Sanders, 2012). Los estudios sobre este género han sido amplios, dada su importancia en química, biología y horticultura (Viljoen *et al.*, 1999). Las especies de *Lantana* se distribuyen en climas subtropicales y tropicales alrededor del mundo, con una notable concentración en América Central y del Sur (Sanders, 2006). Este género es reconocido por su resistencia a plagas y enfermedades, así como por su capacidad para prosperar en una amplia gama de condiciones del suelo (Ayub *et al.*, 2011).

Los terpenos y flavonoides presentes en las plantas del género *Lantana*, según estudios, contribuyen significativamente a su resistencia a patógenos y plagas, y también parecen ser responsables de algunas de sus actividades farmacológicas (Pavela, 2016). Se ha encontrado, por ejemplo, que el lantadeno A, un triterpenoide, tiene potencial como agente anticancerígeno (Pandey *et al.*, 2012). En cuanto a su uso en horticultura, las plantas del género *Lantana* son apreciadas por su floración prolongada y por sus vistosas flores de variados colores (Sanders, 2006).

2.3.1 *Lantana canescens*

L. canescens es un arbusto perenne generalmente erecto, que puede alcanzar alturas de uno a dos metros. Las hojas son opuestas, de forma ovalada a oblonga, y poseen bordes aserrados. La superficie de la hoja es áspera y cubierta de pelusa, lo que le da un aspecto grisáceo, de ahí el nombre "*canescens*", que significa "canoso". La planta tiene inflorescencias globulares de flores de diversos colores que varían desde blanco, amarillo, naranja y rosa hasta púrpura (Sanders, 2012). La plata se conoce por variedad de metabolitos secundarios, especialmente triterpenoides y flavonoides (Ayub *et al.*, 2010). Es una especie nativa de América, distribuida desde México hasta

Sudamérica, incluyendo Colombia, crece en diversas regiones, desde zonas costeras hasta áreas montañosas, en una amplia gama de condiciones ecológicas (Aymard, 1996).

2.4 Hibridaciones

2.4.1 Hibridaciones interespecíficas

La hibridación interespecífica es un fenómeno biológico que se refiere al proceso de cruce entre dos especies diferentes dentro del mismo género (Seehausen, 2004). Este cruce puede ser producto de la interacción natural en ambientes donde las especies coexisten o inducido en entornos controlados con fines científicos o de mejoramiento genético. Estos híbridos resultantes pueden presentar una combinación de características de ambas especies parentales, dando lugar a individuos con una diversidad genética significativamente más alta (Seehausen, 2004). Algunos híbridos pueden ser infértiles debido a incompatibilidades genéticas; sin embargo, en otros casos, los híbridos son fértiles y si pueden participar en futuros eventos de cruce, lo que potencialmente podría dar lugar a nuevas especies en un proceso conocido como especiación híbrida (Mallet, 2007).

2.4.2 Hibridaciones intergenéricas

A diferencia de la hibridación interespecífica, la hibridación intergenérica se produce cuando dos especies de diferentes géneros se cruzan para formar un híbrido (Rieseberg *et al.*, 2007). Esta hibridación es menos común en la naturaleza debido a las mayores diferencias

genéticas y morfológicas que suelen existir entre los géneros; sin embargo se ha observado en varias ocasiones en contextos de laboratorio o en condiciones controladas (Rieseberg *et al.*, 2007). Un ejemplo notable de hibridación intergenérica es la creación de trigo moderno, que es el producto de múltiples eventos de hibridación intergenérica que tuvieron lugar hace miles de años (Feldman *et al.*, 2012). Este proceso ha permitido la transferencia de características deseables entre géneros y ha jugado un papel crucial en la mejora de cultivos y la producción de alimentos a nivel mundial.

2.5 Metabolitos secundarios de plantas

Los metabolitos secundarios son compuestos producidos por las plantas que no participan directamente en el crecimiento y desarrollo de las mismas, pero que tienen un papel importante en la interacción de la planta con su entorno y su adaptación (Wink, 2010). Los metabolitos secundarios se pueden dividir en varias clases principales: terpenos, fenoles y alcaloides, entre otros (Dixon, 2001). Compuestos de cada uno de estos grupos tiene una amplia diversidad de estructuras y funciones. Estos compuestos desempeñan un papel crucial en la defensa de las plantas contra herbívoros y patógenos, la atracción de polinizadores y la adaptación a las condiciones ambientales (Moore, 2001). Muchos metabolitos secundarios tienen propiedades farmacológicas y se utilizan para la producción de medicamentos.

2.5.1 Terpenos

Los terpenos son metabolitos secundarios biosintetizados por plantas que abarcan más de 30,000 compuestos conocidos que poseen una gran diversidad estructural, los terpenos han sido y ampliamente estudiados por sus roles en la defensa de las plantas y la comunicación con su entorno (Langenheim, 1994). Los terpenos se clasifican en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos, dependiendo del número de unidades de isopreno que contienen (Dewick, 2002). Cada clase de terpenos tiene su propia diversidad de estructuras y funciones. La biosíntesis de terpenos comienza con la formación de unidades de isopreno, que luego se ensamblan y modifican para formar una diversidad amplia de sustancias terpenicas que se encuentran en las plantas (Chen, 2012). Los terpenos tienen una amplia gama de aplicaciones en medicina y tecnología; algunos se usan como principios activos en fármacos, mientras que otros se utilizan en la industria de fragancias y para la producción de biocombustibles (Tholl, 2006).

2.5.2 Fenoles

Se estima que hay más de 8000 compuestos fenólicos encontrados distribuidos en todo el reino vegetal (Cheynier, 2013). Los fenoles se clasifican en varios grupos, entre ellos, se destacan fenoles simples, cumarinas, lignanos, taninos y flavonoides. Todos ellos contienen al menos un anillo aromático con un grupo hidroxilo (OH) (Dai & Mumper, 2010). Los compuestos fenólicos se derivan metabólicamente del ácido shikímico y del ácido acético, a través de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides. Este proceso involucra una serie de reacciones enzimáticas que llevan a la diversidad de compuestos fenólicos en las plantas (Vogt, 2010). Los fenoles biológicos

juegan un papel importante en la defensa de las plantas contra los herbívoros y patógenos, en la atracción de polinizadores y en la protección contra la radiación UV, regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Treutter, 2005). Los compuestos fenólicos tienen una amplia gama de aplicaciones, por ejemplo, en la industria alimentaria y de bebidas se usan por sus propiedades de sabor y color (Panche *et al.*, 2016).

2.6 Técnicas de extracción

2.6.1 Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida

La extracción por dispersión del matiz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés, *matrix solid-phase dispersion*), es un método de preparación de muestra que combina la extracción y purificación (*clean-up*) en un solo paso. Fue desarrollado originalmente por Barker (Barker, 2007) en 1989 y ha sido ampliamente utilizado en diversas áreas, de química analítica y la ciencia de los alimentos. MSPD, la matriz se dispersa físicamente en un sorbente sólido, que puede ser sílice o alúmina. La mezcla homogeneizada se carga en una columna, con un pequeño tapón en el fondo para mantener el material en su lugar. Luego, se realiza la extracción con un solvente apropiado para eluir los analitos de interés. La selección adecuada de agente dispersante y eluyente reduce la co-extracción de compuestos indeseables (Barker, 2000). MSPD ha sido utilizada para analizar de una variedad grande de muestras, entre ella, alimentos, tejidos biológicos y muestras ambientales; En general, una amplia gama de analitos, desde compuestos polares hasta no polares (Barker, 2007).

2.7 Técnicas analíticas

2.7.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es un método de separación de compuestos, basado en la distribución de analitos entre una fase estacionaria y una fase móvil gaseosa. La fase estacionaria puede ser un líquido o un polímero sólido, mientras que la fase móvil es un gas inerte, como helio, nitrógeno o hidrogeno (Grob & Barry., 2004).

Un cromatógrafo de gases típico consta de una fuente de gas (fase móvil), un inyector, una columna cromatográfica, un detector y un sistema de adquisición de datos. La elección del detector depende del tipo de compuestos que se están analizando. Algunos de los detectores más comunes incluyen el detector de ionización de llama (FID), el detector de captura de electrones (ECD) y el detector de espectrometría de masas (MS) (Grob & Barry., 2004). La cromatografía de gases se utiliza en una amplia gama de aplicaciones, entre ellas, análisis forense, medioambiental, análisis de alimentos, bebidas, industria petroquímica, aromas, fragancias, productos naturales, entre otros (Grobb *et al.*, 2004).

La GC se utiliza ampliamente para analizar los VOC y compuestos semi-volátiles. Las moléculas analizables por GC típicamente tienen pesos moleculares menores que 500 Da y deben ser termoestables. Esto incluye una amplia gama de compuestos como hidrocarburos, alcoholes, ésteres, cetonas, aldehídos, amidas y compuestos organoclorados y organofosforados, entre otros (Grobb *et al.*, 2004). En contraste, los compuestos que no son volátiles o que se descomponen a temperaturas altas no son adecuados para GC; entre ellos figuran moléculas grandes y polares como las proteínas y polisacáridos, así como sustancias ionizadas y sales. Algunos compuestos de

peso molecular no alto, que no son volátiles o termoestables, pueden ser derivatizados para facilitar su análisis por GC (McNair *et al.*, 2009).

2.7.2 Cromatografía líquida

La cromatografía líquida (LC) implica el proceso de distribución de los analitos entre dos fases: una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida. La fase móvil se selecciona en función de la naturaleza de la mezcla de los compuestos que se van a separar. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido soportado en un sólido o una capa líquida sobre una superficie sólida (Baker, 2012). Un cromatógrafo líquido estándar consta de un sistema de bombeo de fase móvil, un inyector de muestras, una columna cromatográfica, un detector y sistema de adquisición de datos. Los detectores más comunes en LC incluyen detectores de luz (UV-VIS), de arreglo de diodos (DAD), de fluorescencia (FLD), de índice de refracción (RI) y detectores de espectrometría de masas (MS) (Baker, 2012). La LC se utiliza en muchas aplicaciones, que incluyen análisis de fármacos y metabolitos en muestras biológicas, análisis de alimentos y bebidas, control de calidad en la industria farmacéutica, análisis de compuestos orgánicos en muestras medioambientales, entre otros (Baker, 2012).

2.8 Detectores

2.8.1 *Detector selectivo de masas*

El espectrómetro de masas (MS) es un instrumento que mide la relación de masa-carga de los iones. La muestra se ioniza primero en una fuente de iones, y luego los iones se aceleran en un campo eléctrico. Los iones se separan, según su relación m/z en un analizador de masas, y sus corrientes se miden en un detector de iones (Sparkman, 2007). Diferentes tipos de espectrómetros de masas se clasifican, dependiendo del tipo de analizador de masas que utilizan. Los más comunes incluyen el cuadrupolo (Q), trampa de iones (IT) y tiempo de vuelo (TOF). El MS se utiliza a menudo en combinación con técnicas cromatográficas, como la cromatografía de gases (GC/MS) y la cromatografía líquida (LC/MS). En estos sistemas, la salida del cromatógrafo se introduce en la fuente de iones del MS o en una interfaz; la técnica permite la identificación y la cuantificación de los compuestos de la muestra después de la separación cromatográfica de sus componentes. El MS se utiliza en análisis forense, análisis ambiental, investigación biomédica, “ómicas”, i.e., la proteómica, metabolómica, e industria farmacéutica, (Sparkman, 2007).

2.8.2 *Detector de ionización en llama*

El detector de ionización en llama (FID) en el cual se aprovecha la ionización que sucede en una llama mantenida por la combustión de la mezcla de hidrógeno y aire para convertir a los compuestos orgánicos en especies ionizadas a medida que salen del sistema cromatográfico. Los iones, iones-radicales que se forman en la llama generan una corriente eléctrica que se mide y que

es proporcional a la concentración de los compuestos en la muestra. El FID consta de una fuente de hidrógeno y aire, un ignitor para producir la llama, y dos electrodos que miden la corriente entre ellos. Los compuestos orgánicos se combustionan en la llama, formando iones, iones-radicales que se mueven a través de la llama, creando una corriente eléctrica que es medida por los electrodos (Zhou *et al.*, 2003).

2.8.3 Analizador de masas Orbitrap

El *Orbitrap* es un tipo de analizador de masas que se basa en el principio de la resonancia ciclotrónica de iones. Los iones son atrapados en un campo eléctrico y oscilan a lo largo del eje del dispositivo mientras orbitan alrededor de él. La frecuencia de oscilación (eje Z) es directamente proporcional a la relación m/z de los iones, lo que permite determinar indirectamente sus masas (Hu *et al.*, 2005). Un *Orbitrap* típico consta de tres electrodos: un electrodo central y dos electrodos externos en forma de media luna. Los iones se inyectan en un dispositivo y se atrapan por el campo eléctrico generado por los electrodos. Los iones oscilan a lo largo del eje del *Orbitrap* y generan una señal de imagen que, se convierte en un espectro de masas a través de una transformada de Fourier (Hu *et al.*, 2005). El *Orbitrap* se utiliza en combinación con la cromatografía líquida (LC/MS) y la cromatografía de gases (GC/MS). También puede ser combinado con otros analizadores de masas en configuraciones híbridas, como la trampa de iones linear (LTQ-*Orbitrap*) y el Q *Exactive*, que incorporan un analizador de cuadrupolo y un *Orbitrap* (Scigelova *et al.*, 2006).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar los metabolitos secundarios aislados de hojas de *Lippia alba*, *L. origanoides*, *Lantana canescens* y sus híbridos, usando la dispersión de la matriz en fase sólida, GC/MS/FID y LC/MS, para determinar, si existen algunas variaciones químicas la composición de metabolitos secundarios de estas especies y sus híbridos.

3.2 Objetivos específicos

Determinar los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles presentes en los extractos obtenidos de hojas de los híbridos de *Lippia alba*, *L. origanoides* y *Lantana canescens* utilizando las técnicas GC/MS/FID y LC/MS.

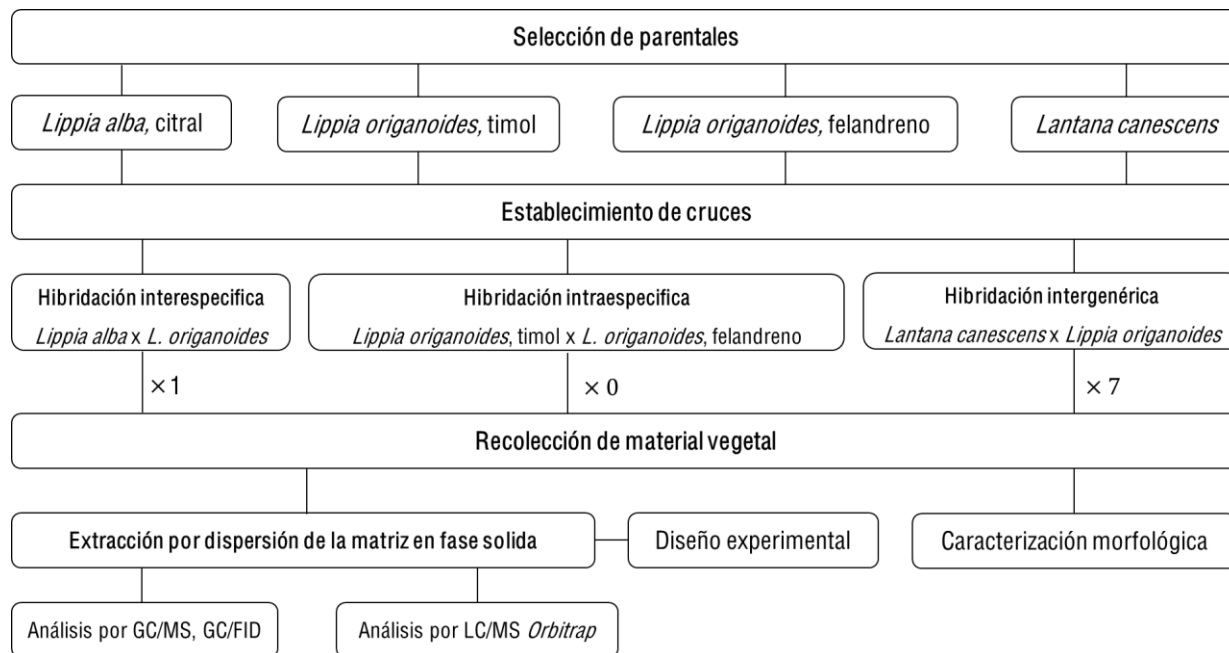
Comparar los perfiles de metabolitos secundarios de las especies *Lippia alba*, *L. origanoides* y *Lantana canescens* y sus híbridos, con el propósito de hallar similitudes y diferencias en sus composiciones químicas.

4. Metodología

El objetivo principal de este trabajo fue realizar un análisis comparativo de las composiciones químicas de extractos obtenidos a partir de las hojas de *Lippia alba*, *L. origanoides* y *Lantana canescens*, utilizadas como parentales, así como de sus híbridos generados por cruces. Se presenta el esquema general de la metodología empleada, que integra los principales pasos experimentales realizados para alcanzar los objetivos planteados (Véase **Figura 1**).

Figura 1.

Diagrama de flujo de la metodología del presente estudio.



4.1 Reactivos y solventes

Para el desarrollo de este trabajo, se usaron en experimentos y para análisis α -pineno (98%), canfeno (95%), sabineno (95%), β -mirceno (94%), α -felandreno (98%), α -terpineno (97%), *p*-cimeno (99%), limoneno (97%), 1,8-cineol (99%), γ -terpineno (96%), (97%), terpinen-4-ol (95%), α -terpineol (90%), *trans*- β -cariofileno (98.5%), timol (97%), geranial (97%), α -humuleno (96%), germacreno D (90%), óxido de cariofileno (95%), el gel de sílice C₁₈ modificada, todos adquiridos a *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EE. UU.). Metanol, grado LC/MS, *iso*-propanol (98%), formiato de amonio ($\geq 99\%$) y agua Tipo I (sistema de purificación Millipore DirectQ™) se obtuvieron de *Merck* (Darmstadt, Alemania). La mezcla de *n*-alcanos C₈-C₄₀ y el *n*-tetradecano se obtuvieron de *AccuStandard Inc.* (New Haven, CT, EE. UU.). Los gases helio, aire, hidrógeno y nitrógeno (99.995%) se compraron a la empresa Messer (Bucaramanga, Colombia). Metanol y etanol comerciales (96%), a SUQUIN (Bucaramanga, Colombia).

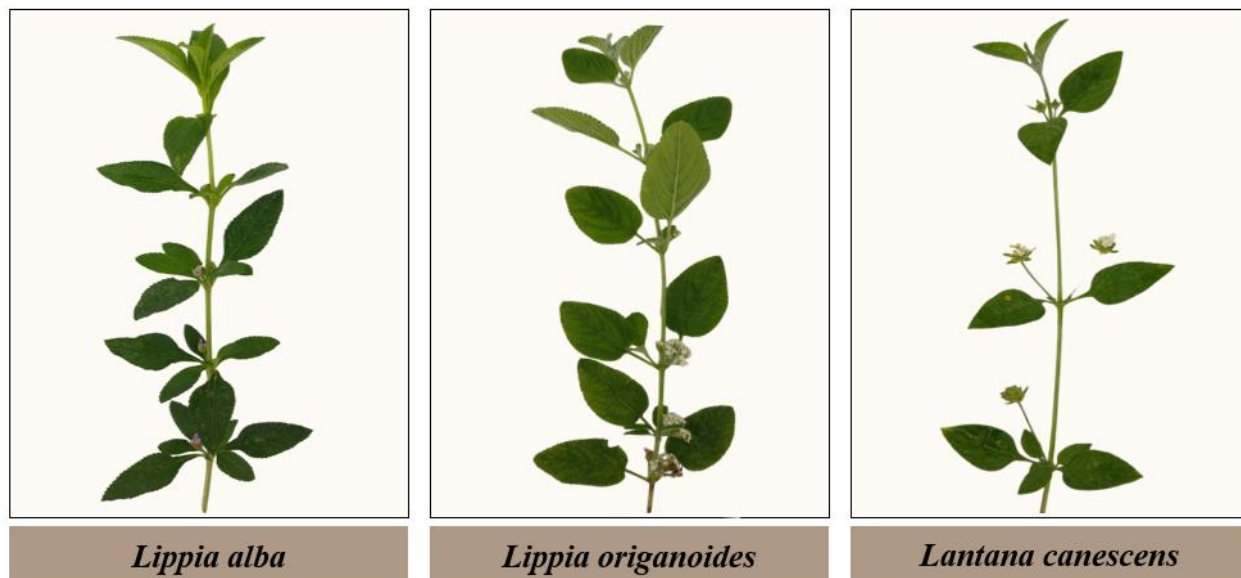
4.2 Recolección de material vegetal

La identificación taxonómica de las especies *Lippia alba*, *L. organoides* y *Lantana canescens* (Figura 2) fue realizada en el Herbario de la Universidad Industrial de Santander por el profesor Dr. Andrés Felipe CASTAÑO GONZÁLEZ, de la Escuela de Biología. El material vegetal, recolectado pertenece al Estado colombiano según el Contrato N ° 270 de acceso a recursos genéticos y productos derivados, suscrito entre la Universidad Industrial de Santander (UIS) y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Las *Exsiccatae* de las plantas

estudiadas se depositaron en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander con su respectivo número de *voucher*.

Figura 2.

Especies identificadas Lippia alba, L. origanoides y Lantana



Nota. Fotografía de Edwin F. RUGELES. Lugar: Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), UIS, Bucaramanga. Fecha: 24 de junio de 2024.

Las plantas se cultivaron y fueron recolectadas en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), ubicado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander, en Bucaramanga, Santander, Colombia (7°8'25,18''N, 73°6'57,25''O). De cada especie, se recolectaron hojas frescas, los extractos se prepararon usando MSPD; se realizaron tres réplicas por cada muestra.

4.3 Extracción usando dispersión de la matriz en fase sólida

Para las especies bajo estudio, se desarrolló un diseño experimental, usando material vegetal de *Lippia origanoides*, seleccionada como parental común debido a su participación en los híbridos generados. Se implementó un diseño factorial 2^3 con punto central, siguiendo la metodología propuesta por Liu *et al.* (2015), adaptada con algunas modificaciones para esta investigación. Este diseño permitió obtener las condiciones de extracción mediante MSPD. El procedimiento incluyó la evaluación de tres factores experimentales: 1. tiempo de maceración (A), 2. relación material vegetal:agente dispersante (B) y 3. volumen de solvente (C). Cada combinación factorial se midió una sola vez, mientras que el punto central se analizó por triplicado. Este enfoque permitió encontrar las condiciones de extracción para garantizar una adecuada caracterización de los metabolitos secundarios presentes en las especies y sus híbridos. En el presente diseño experimental, el área calculada (c) de los picos GC se utilizó como el observable para evaluar el rendimiento de extracción en función de los factores seleccionados, como se muestra en la Ecuación 1.

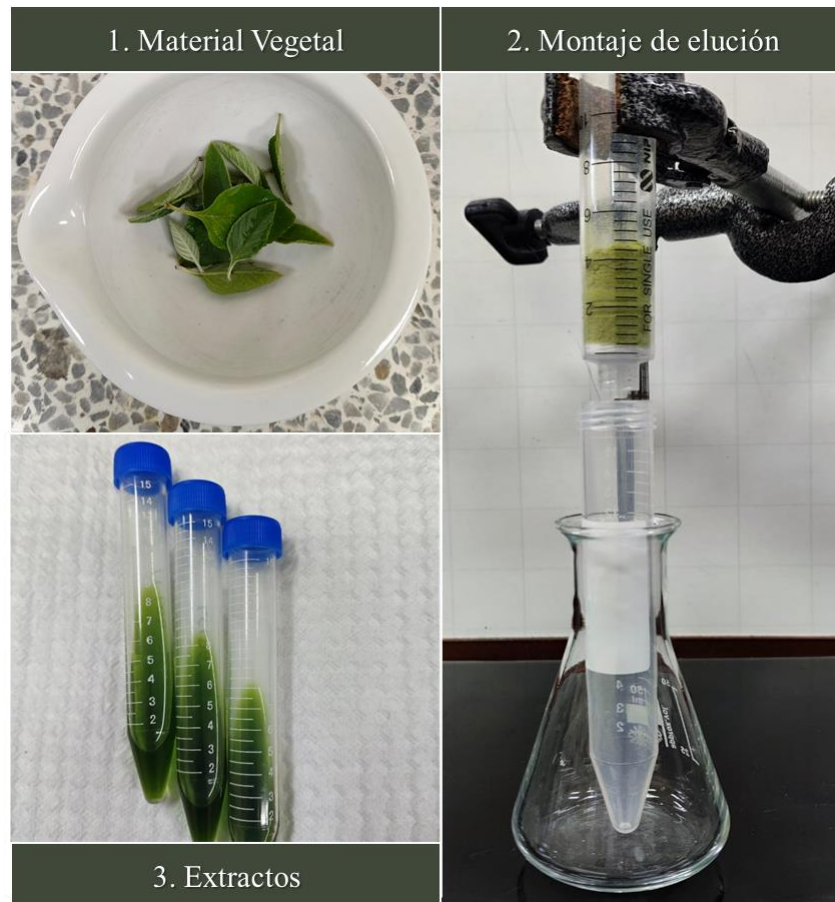
El cálculo del área calculada de los picos GC se realizó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Área (c)} = \frac{A_x - A_{istd}}{A_{istd}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde: A_x = suma de todas las áreas de los picos GC de los compuestos identificados, corresponde a las señales de los compuestos detectados en el análisis cromatográfico; A_{istd} = área del pico GC del estándar interno, es el área cromatográfica correspondiente a un compuesto de referencia previamente añadido a la muestra para normalizar las mediciones y corregir posibles variaciones en el proceso analítico.

Figura 3.

Montaje para las extracciones por MSPD del material vegetal y obtención de los extractos



Nota. Fotografía de Edwin F. RUGELES. Lugar: Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), UIS, Bucaramanga. Fecha: 16 de enero de 2024.

Tabla 3.

Matriz de experimentos y variables evaluadas para el diseño factorial 2³ para la extracción MSPD de Lippia origanoides, bajo estudio (n=3)

N° de experimentos	Efecto	Factores codificados			Área (c) GC,
		A	B	C	
1	(1)	-	-	-	12,2
2	a	+	-	-	15,1
3	b	-	+	-	21,9
4	ab	+	+	-	19,5
5	c	-	-	+	16,2
6	ac	+	-	+	10,2
7	bc	-	+	+	23,5
8	abc	+	+	+	15,0
Niveles de los factores					
Variables		Bajo (-)		Alto (+)	
A. Tiempo de maceración (min)		4		12,0	
B. Proporción de material vegetal y C ₁₈ (g)		1:1		1:3	
C. Volumen de solvente (mL)		3		5,0	

Los extractos MSPD de los parentales y de los híbridos se obtuvieron siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 3. Hojas frescas (0.5 g) se mezclaron con el agente dispersante (1.5 g) en una proporción de 1:3, utilizando un mortero para homogeneizar la muestra y obtener un polvo seco (Véase Figura 3). Esta mezcla fue empaquetada en un cartucho de jeringa, equipado en su base con un filtro de algodón adsorbente. Las extracciones se realizaron utilizando dos solventes diferentes, diclorometano y etanol (3 mL cada uno), asegurando un aislamiento adecuado de los metabolitos secundarios. Los extractos obtenidos se llevaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno (N₂) y, posteriormente, se liofilizaron en bandejas *VirTis AdVantage Plus* (SP *Scientific, Gardiner, New York, EE. UU.*). Los extractos secos se almacenaron a 4 °C en completa oscuridad para preservar su estabilidad química. Cada extracción se llevó a cabo por triplicado.

4.4 Análisis químico de los extractos de plantas bajo estudio

4.4.1 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Las muestras para análisis se prepararon a partir del extracto (1 mg) disuelto en una solución de *n*-tetradecano (250 ppm en diclorometano, 1 mL). La muestra (2 μ L) se inyectó a un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC/MS). El análisis se realizó en un cromatógrafo GC 6890 *Plus* (Agilent Technologies (AT), Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector selectivo de masas MSD 5973 *Network* (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.) usando ionización por electrones (EI, 70 eV). El modo de inyección fue *split* (30:1) y la temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C. La temperatura del horno cromatográfico se programó desde 50 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min), a una velocidad de 5 °C/min, y luego, hasta 230 °C (10 min), a una velocidad de 5 °C/min. Cuando se utilizó la columna DB-5MS, se añadió otra rampa de temperatura hasta 275 °C (15 min), a una velocidad de 10 °C/min (Figura 4). Las temperaturas de la cámara de ionización y del cuadrupolo fueron de 230 y 150 °C, respectivamente. El rango de masas fue m/z 45-450 u, con velocidad de adquisición de 3.58 *scan/s*. Los datos se procesaron en el *software* MSDChemStation G1701DA (AT, Palo Alto, California (CA), EE. UU.). Se emplearon dos columnas: una apolar, DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, EE. UU.) con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μ m, d_f , y una columna polar, DB-WAX (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), con fase estacionaria de poli(etilenglicol) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μ m, d_f .

Figura 4.

Cromatógrafo de gases AT 6890 Plus, equipado con un detector selectivo de masas MS 5973 Network



Nota. Fotografía de Edwin F. RUGELES. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS, UIS, Bucaramanga. Fecha: 2 de marzo de 2024.

Como criterios para la identificación de los compuestos se utilizaron los índices de retención lineales (IRL), los cuales se calcularon a partir de una mezcla de hidrocarburos que abarca desde C₈ hasta C₄₀ (Ecuación 2). Los espectros de masas obtenidos se compararon con aquellos disponibles en bases de datos de referencia (Adams, 2007; Wiley, 2008; NIST, 2017) y con los espectros de sustancias estándar disponibles.

$$IRL = 100n + 100 \left(\frac{t_{R(x)} - t_{R(n)}}{t_{R(N)} - t_{R(n)}} \right) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde: IRL = índice de retención lineal del compuesto de interés, n y N = números de átomos de carbonos del n -alcano que eluye antes (n) o después (N) del compuesto de interés, $t_{R(x)}$ = tiempo de retención del compuesto de interés (x), $t_{R(n)}$ y $t_{R(N)}$ = tiempos de retención del n -alcano que eluye antes (n) y después del compuesto de interés, respectivamente

4.4.2 Análisis por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama

La cuantificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de los parentales e híbridos se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases AT 6890N (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector de ionización en llama (GC/FID). Se empleó una columna apolar DB-5MS (J&W *Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.), con una fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), de 60 m x 0.25 mm D.I. y 0.25 μm d_f . Las condiciones cromatográficas, como el tipo de gas de arrastre, el flujo y la programación de temperatura del horno, fueron las mismas que las utilizadas en el análisis por GC/MS (Figura 5). El extracto fue inyectado en la misma cantidad que en el análisis por GC/MS.

Figura 5.

Cromatógrafo de gases AT 6890N, acoplado a un detector de ionización en llama (FID)



Nota. Fotografía de Darlyng F. POVEDA. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS, UIS, Bucaramanga. Fecha: 10 de mayo de 2023.

4.4.3 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Las muestras se pesaron (1 mg) y se disolvieron en fase móvil (1 mL de mezcla de metanol-agua 50:50, 0.1 % de ácido fórmico y 5 mM de formiato de amonio), para una concentración final de 1000 mg/L. Los patrones de referencia se pesaron (1 mg), se disolvieron en la misma fase móvil, y se tomó una alícuota (2 μ L), de una concentración final de 2 mg/L, para el análisis LC/MS.

Los compuestos fenólicos se analizaron en un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia *Vanquish™* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE. UU.), equipado con un compartimento de columna controlado termostáticamente (40 °C) (Véase Figura 6). La separación cromatográfica se realizó en una columna *Zorbax Eclipse XDB C₁₈* 50 mm L x 2.1 mm de D.I., tamaño de partícula

de 1.8 μm (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.). El caudal de la fase móvil fue de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ y contenía: (A) agua (0.1 % ácido fórmico + 5 mM formiato de amonio) y (B) MeOH (0.1% ácido fórmico + 5 mM formiato de amonio). La condición de gradiente inicial fue 100 % A, que cambió linealmente a 100 % B en 8 min, se mantuvo durante 4 min, volvió a 100 % A en 1 min, y así permaneció durante 3 min. El volumen de inyección fue de 2 μL . El cromatógrafo líquido fue conectado a un espectrómetro de masas *Q-Exactive Plus Orbitrap* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania) con una fuente de ionización por electronebulización con calentamiento (HESI-II). El voltaje de capilar fue 3.5 kV. La temperatura del nebulizador se fijó en 350 $^{\circ}\text{C}$ y la temperatura del capilar en 320 $^{\circ}\text{C}$. El gas de secado y el gas auxiliar (N_2) se ajustaron a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. El nitrógeno (pureza >99 %) se obtuvo en un generador (NM32LA, *Peak Scientific*, Escocia, Reino Unido). Los iones inyectados a la celda HCD (*Higher-Energy Collision Dissociation Cell*), después de su almacenamiento en *C-Trap*, se fragmentaron con energías de colisión normalizadas por pasos discretos en un intervalo de 10 eV a 70 eV. El rango de masas escaneado en el espectrómetro de masas fue m/z 80-1000. Los datos se obtuvieron y analizaron con el *software Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ Chromatography Data System* (CDS), versión 7.2, y el *software Thermo XCalibur 3.1* (*Thermo Scientific*, San José, CA, EE. UU.). La identificación de los compuestos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención (t_R), espectros de masas, relaciones isotópicas y fórmulas moleculares exactas con los de las sustancias-patrón y los de las bases de datos HMDB 4.0 y *MassBank*. Los datos MS fueron adquiridos en los modos de ionización de iones positivos y negativos.

Figura 6.

Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia Vanquish™ acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive



Nota. Fotografía de Darlyng F. POVEDA. Lugar: Laboratorio Alexander MAKÀROV de CROM-MASS, UIS, Bucaramanga. Fecha: 10 de mayo de 2023.

5. Resultados y discusión

5.1 Identificación taxonómica

La identificación botánica de las especies parentales *Lippia alba*, *L. origanoides* y *Lantana canescens* fue llevada a cabo en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial

de Santander, por el El Dr. Andrés Felipe CASTAÑO GONZÁLEZ, botánico y profesor de la Escuela de Biología de la UIS, quien realizó la caracterización taxonómica de estas especies, cuyos resultados se resumen en la Tabla 4.

Los híbridos fueron obtenidos mediante polinización manual por la bióloga Ariadna SILVA MORALES (Silva Morales, 2024). La identificación y confirmación taxonómica fue realizada por el Dr. Robert Tulio GONZÁLEZ, botánico y profesor de cátedra de la Universidad Nacional de Colombia (sede Palmira), adscrito como investigador al Centro de Investigaciones CENIVAM-UIS.

Tabla 4.

Identificación botánica de los tres parentales estudiados en el presente trabajo.

Nombre científico	Nombre común	Familia	Número de especies	Distribución	Número de voucher*
<i>Lippia alba</i>	Pronto alivio		119	Antillas, América Central y América del Sur hasta Argentina	22032
<i>L. origanoides</i>	Orégano de monte, orégano mexicano	Verbenaceae	119	Norte de México hasta el norte de Argentina	22036
<i>Lantana canescens</i>	Hierva de Javillas		147	Estados Unidos, América Central, norte de América del Sur	22194

Nota. *Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander

5.2 Cultivos experimentales de las plantas y establecimiento de cruces

La hibridación manual fue realizada por la bióloga Ariadna SILVA MORALES, quien entregó al CENIVAM un total de 14 plantas híbridas, que correspondieron a: 1 híbrido interespecífico entre *Lippia alba*, quimiotipo citral y *L. origanoides*, quimiotipo timol; 13 híbridos intergenéricos provenientes del cruce entre *Lantana canescens* y *L. origanoides*, quimiotipo timol. No se logró obtener ninguna planta en la hibridación intraespecífica de *Lippia origanoides* (quimiotipo timol) × *L. origanoides* (quimiotipo felandreno). La hibridación se llevó a cabo de forma manual utilizando plumas de pavo para recolectar el polen del parental masculino, *L. origanoides*. Posteriormente, el polen fue transferido cuidadosamente al estigma de los parentales femeninos, *L. alba* y *Lantana canescens*. Para evitar la interferencia de polinizadores externos, las inflorescencias y las flores se cubrieron con capuchas protectoras. Los híbridos se cultivaron en un sustrato compuesto por arena (70 %) y materia orgánica (30 %) bajo condiciones controladas en el vivero N °1 del CENIVAM. Las plántulas permanecieron en el vivero durante cuatro meses, hasta alcanzar un crecimiento promedio de 20 cm. Las plantas seleccionadas para este estudio correspondieron a las de mayor tamaño.

5.3 Caracterización morfológica

5.3.1 Caracterización morfológica del híbrido *Lippia alba* (citral) x *L. origanoides* (timol)

La caracterización morfológica del híbrido, *Lippia alba* (citral) × *L. origanoides* (timol) y sus parentales fue realizada por la bióloga Ariadna SILVA MORALES (Silva Morales, 2024). El

híbrido presentó una combinación de rasgos heredados de ambos progenitores, con predominancia de características maternas. Morfología foliar: el cruce heredó la forma lanceolada de la madre, con un tamaño reducido en comparación con los progenitores. Inflorescencia y flores: la estructura capituliforme y el color lila de la corola sufrieron una influencia marcada de la madre, aunque el tamaño del tubo corolino reflejó la influencia del padre; frutos: el híbrido presentó frutos más pequeños, similares en color y forma a los del padre; altura y nodos: el híbrido tuvo un crecimiento intermedio, con una altura más cercana a la de la madre y distancias entre nodos dentro del rango de ambos parentales. Este análisis mostró que el híbrido presentó rasgos predominantes de la madre en estructuras vegetativas y reproductivas, pero con una contribución del padre en características como el tamaño de la flor y el fruto. En la Tabla 5 se observan las demás características morfológicas de las plantas.

Tabla 5.

Comparación morfológica entre Lippia alba (Cital), L. organoides (Timol) y su híbrido

Característica	Híbrido (<i>L. alba</i> × <i>L. organoides</i>)	Madre (<i>L. alba</i>)	Padre (<i>L. organoides</i>)
Morfología foliar			
Altura, cm	120	150	300
Distancia entre nodos, cm	2 a 3.5	1.5 a 4	1 a 4
Tamaño de hojas, cm	2.5 a 4 × 1 a 2	2 a 5 × 1 a 2.5	2 a 6.5 × 1 a 3.5
Forma de la hoja	Lanceolada	Lanceolada	Ovada
Color del haz	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde llamativo
Color del envés	Verde claro, tomentoso	Verde opaco, tomentoso	Verde grisáceo, tomentoso
Peciolos, cm	0.4 a 0.6	0.5 a 0.15	0.6 a 0.20
Morfología de Inflorescencias y flores			
Inflorescencia	Espigas capituliformes	Espigas capituliformes	Racemosa

Característica	Híbrido (<i>L. alba</i> × <i>L. origanoides</i>)	Madre (<i>L. alba</i>)	Padre (<i>L. origanoides</i>)
Color de las brácteas y tamaño de los pedúnculos, cm	Verdes, 0.6	Verdes, 0.8	Verdes, 0.4 a 0.10
Tamaño de la flor, cm	0.5	0.4	0.3
Color y tamaño de la corolla, cm	Lila a morado, tubo blanco, 0.3	Lila a morado, tubo blanco, 0.15	Blanca, tubo amarillo pálido, 0.3
Morfología de los órganos reproductivos			
Gineceo, cm	Estilo transparente, 0.13 Estigma verde	Estilo transparente, 0.1 Estigma verde	Estilo, 0.18 Estigma blanco
Fruto, cm	Cápsula seca grisácea, 0.06	Subesférico grisáceo a café, 0.12	Café con tricomas blancos, 0.1

5.3.2 Caracterización morfológica del híbrido *Lantana canescens* × *Lippia origanoides* (timol)

Al igual que con el híbrido interespecífico, este híbrido intergenérico fue morfológicamente más similar al parental femenino que al parental masculino. Altura y distancia entre nodos: el híbrido presentó un crecimiento intermedio con distancias entre nodos más amplias, similar a las características maternas; hojas: la forma ovada de las hojas fue similar a ambos progenitores, aunque el tamaño se encontró reducido respecto al de la madre; inflorescencia y flores: el cruce heredó la estructura capitular axilar de la madre, con un tamaño de flor intermedio; el color blanco de la corola fue otro rasgo compartido entre ambos progenitores; gineceo y fruto: el estilo más corto y el estigma amarillo claro fueron diferentes con respecto a los de los parentales, mientras que el fruto presentó una mayor similitud al de la madre, en términos de tamaño y color. En la Tabla 6 se observan las demás características morfológicas de estas plantas.

Tabla 6.

Comparación morfológica entre *Lantana canescens*, *L. origanoides* (Timol) y su híbrido

Característica	Híbrido (<i>Lantana canescens</i> × <i>L. origanoides</i>)	Madre (<i>Lantana canescens</i>)	Padre (<i>L. origanoides</i>)
Morfología foliar			
Altura, cm	85	200	300
Distancia entre nodos, cm	3.0 a 6.0	3.0 a 5.0	1.0 a 4.0
Tamaño de hojas, cm	1.5 a 4.0 × 1.0 a 2.7	2.0 a 5.5 × 1.0 a 3.0	2.0 a 6.5 × 1.0 a 3.5
Forma de la hoja	Ovadas	Ovadas	Ovadas
Color del haz	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde llamativo
Color del envés	Verde claro, tomentoso	Verde opaco, tomentoso	Verde grisáceo, tomentoso
Tamaño de peciolo, cm	0.4 a 1.0	0.6 a 1.0	0.6 a 2.0
Morfología de Inflorescencias y flores			
Inflorescencia	Capitulares axilares	Capitulares axilares	Racemosas
Pedúnculos, cm	1.0 a 2.3	1.0 a 3.0	0.4 a 1.0
Tamaño de la flor, cm	0.7	1	0.3
Tamaño del tubo corolino, cm	0.3	0.4	0.3
Color de la corola	Blanco	Blanco	Blanco
Morfología de los órganos reproductivos			
Gineceo, cm	Estilo, 0.08	Estilo, 0.1	Estilo, 0.18
	Estigma amarillo claro	Estigma verde	Estigma blanco

5.4 Evaluación de parámetros de extracción

Para la extracción de hojas frescas de las plantas bajo estudio, se empleó un diseño experimental 2³, utilizando la especie *Lippia origanoides*, el parental en común para varios híbridos. El diseño tuvo un triplicado en el punto central. Un análisis de varianza se realizó a los

datos del 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 7 y 8). El observable empleado para el diseño experimental fue el área de picos GC calculada.

Tabla 7.

Resultados del análisis de varianza para evaluar el efecto de las condiciones de extracción sobre el área calculada de picos GC de extractos MSPD de hojas frescas de la especie Lippia origanoides

Fuente	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Modelo	8	150.845	18.8557	7.07	0.13
Lineal	3	113.252	37.7505	14.15	0.067
A	1	24.346	24.346	9.13	0.094
B	1	87.135	87.1346	32.67	0.029
C	1	1.771	1.771	0.66	0.501
Interacciones 2 vías	3	36.496	12.1655	4.56	0.185
AB	1	7.809	7.8089	2.93	0.229
AC	1	28.217	28.2167	10.58	0.083
BC	1	0.471	0.4709	0.18	0.715
Interacción 3 vías	1	0.998	0.9982	0.37	0.603
Curvatura	1	0.099	0.0993	0.04	0.865
Error	2	5.334	2.6672	-	-
Total	10	156.18	-	-	-

Nota. Valor $p < 0.05$ indica que es significativamente diferente de cero, con un nivel de confianza del 95 %.

Se presentan los resultados del análisis de varianza (ANOVA) aplicado al diseño experimental 2³ que permitió evaluar los efectos individuales y combinados de las variables A (tiempo de maceración), B (relación material vegetal: dispersante C₁₈) y C (volumen de solvente) sobre el área calculada de los picos GC (Véase Tabla 7). La tabla ANOVA muestra que el efecto

principal B (relación 1:3) fue el más significativo con un valor $p = 0.029$, lo que indica que tuvo una influencia fuerte y positiva sobre el observable. El efecto de A (tiempo de maceración) tuvo una tendencia de ser importante ($p = 0.094$), mientras que C (volumen de solvente) no mostró mayor relevancia ($p = 0.501$). En cuanto a las interacciones de dos vías, A*C (tiempo y volumen) se observó una influencia moderada ($p = 0.083$), lo que sugiere que el tiempo de maceración afectó el resultado dependiendo del volumen. Las demás combinaciones, así como la interacción de tres vías (ABC), no resultaron significativas ($p > 0.05$). Finalmente, la curvatura fue no significativa ($p = 0.865$), confirmando que el modelo lineal fue adecuado para describir los resultados obtenidos.

Tabla 8.

Resumen del modelo y coeficientes usados en el presente estudio.

Término	Efecto	Coficiente	SE Coef	T-Value	P-Value
Constante	-	16.699	0.577	28.92	0.001
A	-3.489	-1.744	0.577	-3.02	0.094
B	6.601	3.3	0.577	5.72	0.029
C	-0.941	-0.471	0.577	-0.81	0.501
AB	-1.976	-0.988	0.577	-1.71	0.229
AC	-3.756	-1.878	0.577	-3.25	0.083
BC	-0.485	-0.242	0.577	-0.42	0.715
ABC	0.706	0.353	0.577	0.61	0.603

Nota. Valor $p < 0.05$ indica que es significativamente diferente de cero, con un nivel de confianza del 95 %.

La regresión lineal ajustada mediante los coeficientes obtenidos (Véase Tabla 8) permitió predecir el área calculada de los picos GC (Y) en función de los factores evaluados. La siguiente fue la ecuación de regresión:

$$Y = -11.1 + 2.64A + 9.07B + 5.18C - 0.600AB - 0.646C \\ - 0.95BC + 0.088ABC$$

Ecuación 3

En la Ecuación 3, el coeficiente positivo de B (+9.07) resalta su impacto predominante sobre el aumento del área calculada de los picos GC al utilizar la relación 1:3. El efecto del tiempo de maceración ($A = 2.64$) fue menos relevante, mientras que el volumen de solvente (C) mostró un efecto mínimo. Además, las interacciones AC y AB tuvieron contribuciones pequeñas pero negativas. El modelo indica un R^2 ajustado fue del 96.58%, lo cual confirma que el modelo lineal explicó adecuadamente la variabilidad observada en los datos. Además, el diagrama de Pareto (Véase Figura 7) muestra los efectos estandarizados de cada factor y sus combinaciones. El factor B (relación material vegetal: dispersante C_{18}) superó claramente el umbral de significancia, 4.303. Lo que confirmó su importancia dominante.

Figura 7.

*Gráfico de Pareto para los efectos estandarizados en el diseño experimental planteado para extractos, obtenidos de los extractos MSPD de hojas frescas de *L. origanoides**

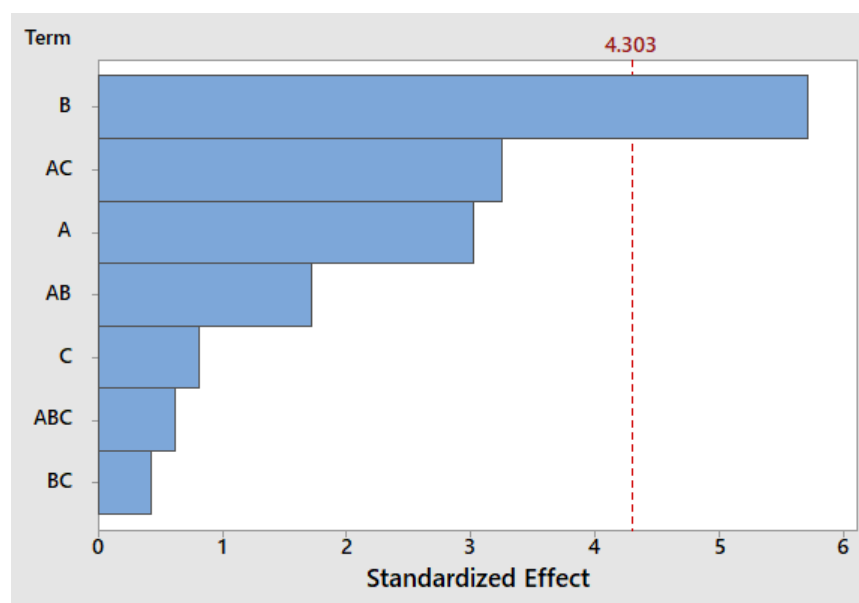


Tabla 9.

Mejores condiciones de extracción por MSPD encontradas para la especie L. origanoides.

Variables seleccionadas	
A. Tiempo de maceración, min	4
B. Proporción material vegetal y dispersante C ₁₈ , g	1:3
C. Volumen de solvente, mL	3

5.5 Caracterización química de los extractos obtenidos por MSPD de hojas, usando diclorometano como solvente de elución

Los metabolitos secundarios aislados por MSPD de hojas frescas, se analizaron por GC/MS, utilizando los siguientes parámetros de integración de los picos cromatográficos: área de rechazo del pico GC fue igual a 0.1 y umbral de integración, *threshold*, 16.5. Los perfiles cromatográficos, obtenidos por GC/MS en una columna apolar (DB-5MS) de los extractos de *Lippia alba*, *L. origanoides* y *L. alba x L. origanoides* se muestran en la Figura 8. Se realizó una comparación de los espectros de masas y de los IRL experimentales calculados para columnas con fases estacionarias apolar, con los reportados en la literatura (Babushock *et al.* 2011), de bases de datos (Adams, NIST y Wiley) y con las sustancias de referencia disponibles en el laboratorio CROM-MASS.

En la Tabla 10, se reportan los compuestos detectados en los extractos de *Lippia alba*, *L. origanoides* y *L. alba x L. origanoides*, en total se identificaron 54 compuestos con áreas de picos GC relativas superiores al 0.1%. Los resultados indican que en hojas predominan monoterpenos oxigenados, siendo para *L. alba* (67 %), *L. origanoides* (70 %) y para *L. alba x L. origanoides* (36 %).

Figura 8.

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS de los extractos de hojas: A. L. origanoides; B.

L. alba y C. L. alba x L. origanoides. Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).

Véase la identificación de cada pico cromatográfico en la Tabla 10

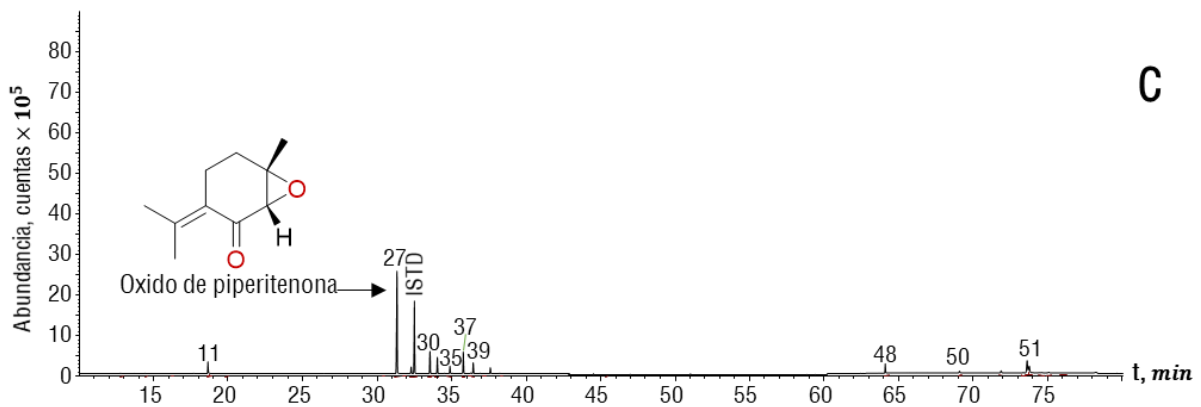
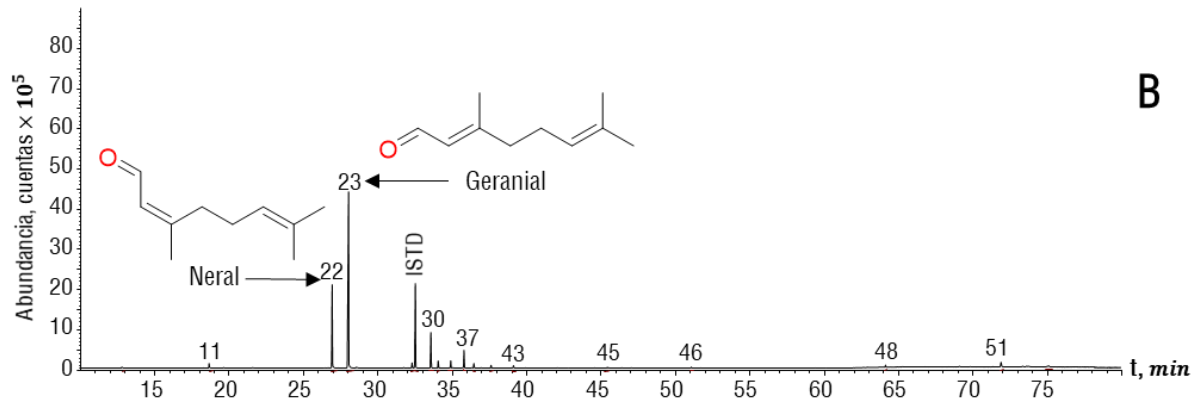
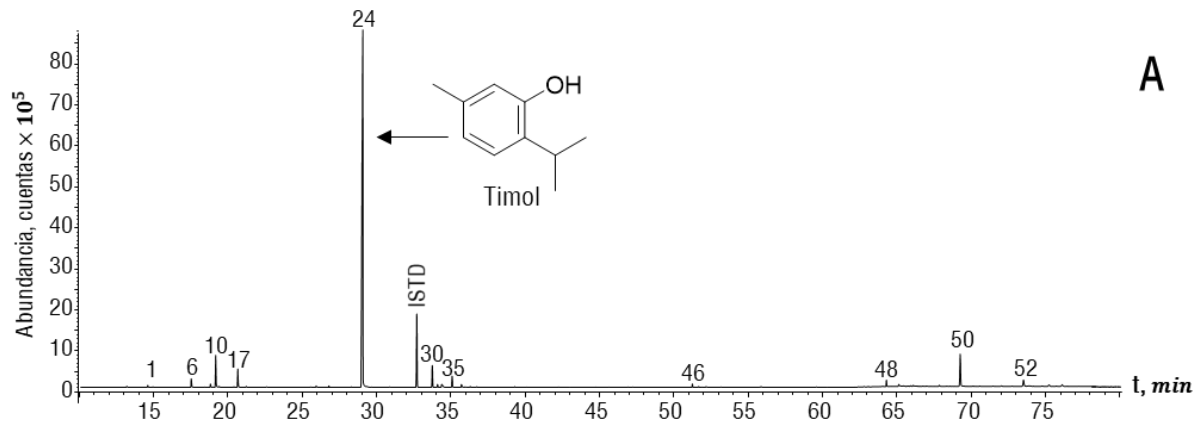


Tabla 10.

Composiciones químicas obtenidas por GC/MS de los extractos aislados por MSPD de *Lippia alba*, *L. origanoides* y su híbrido, *L. alba x L. origanoides*

N° Fig 8	Compuesto	Familia	Índices de retención lineales (DB-5MS)		Cantidad relativa, % $\bar{x} \pm s$, (n = 3)					
			Exp	Lit	<i>L. alba</i>		<i>L. origanoides</i>		<i>L. alba x L. origanoides</i>	
1	α -Tujeno ^{a, b}	HM	926	930 [1]	-	-	0.290	\pm 0.003	-	-
2	α -Pinoeno ^{a, b, c}	HM	933	932 [1]	-	-	-	-	-	-
3	Canfeno ^{a, b, c}	HM	950	954 [1]	-	-	-	-	-	-
4	Sabineno ^{a, b, c}	HM	973	975 [1]	-	-	-	-	-	-
5	β -Terpineno ^{a, b}	HM	973	988 [3]	-	-	-	-	-	-
6	β -Mirceno ^{a, b, c}	HM	989	990 [1]	-	-	1.64	\pm 0.01	-	-
7	α -Felandreno ^{a, b, c}	HM	1007	1002 [1]	-	-	-	-	0.283	\pm 0.007
8	Δ^3 -Careno ^{a, b}	HM	1010	1011 [1]	-	-	-	-	-	-
9	α -Terpineno ^{a, b, c}	HM	1018	1017 [1]	-	-	0.402	\pm 0.004	-	-
10	<i>p</i> -Cimeno ^{a, b, c}	HM	1026	1024 [1]	-	-	3.40	\pm 0.01	-	-
11	Limoneno ^{a, b, c}	HM	1031	1029 [1]	1.10	\pm 0.01	-	-	4.90	\pm 0.06
12	β -Felandreno ^{a, b}	HM	1032	1025 [1]	-	-	-	-	-	-
13	1,8-Cineol ^{a, b, c}	MO	1033	1031 [1]	-	-	-	-	-	-
14	β -Ocimeno ^{a, b}	HM	1036	1044 [3]	-	-	-	-	-	-
15	<i>cis</i> - β -Ocimeno ^{a, b}	HM	1036	1037 [1]	-	-	-	-	-	-
16	<i>trans</i> - β -Ocimeno ^{a, b}	HM	1047	1050 [1]	-	-	-	-	-	-
17	γ -Terpineno ^{a, b}	HM	1059	1059 [1]	-	-	2.30	\pm 0.01	-	-
18	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno ^{a, b}	MO	1073	1070 [1]	-	-	0.240	\pm 0.002	-	-

N° Fig 8	Compuesto	Familia	Índices de retención lineales (DB-5MS)		Cantidad relativa, % $\bar{x} \pm s$, (n = 3)					
			Exp	Lit	<i>L. alba</i>		<i>L. origanoides</i>		<i>L. alba x L. origanoides</i>	
19	Terpinoleno ^{a, b}	HM	1087	1088 [1]	-	-	-	-	-	
20	Terpinen-4-ol ^{a, b, c}	MO	1185	1177 [1]	-	0.320	± 0.001	-	-	
21	Metil-timil-éter ^{a, b}	MO	1232	1235 [1]	-	0.181	± 0.010	-	-	
22	Neral ^{a, b}	MO	1241	1242 [2]	16.110	± 0.002	-	-	-	
23	Geranial ^{a, b, c}	MO	1272	1270 [2]	51.34	± 0.03	-	-	-	
24	Timol ^{a, b, c}	MO	1295	1290 [1]	-	67.80	± 0.03	-	-	
25	δ-Elemeno ^{a, b}	HS	1337	1338 [3]	-	-	-	-	-	
26	Acetato de timol ^{a, b}	MO	1347	1355 [3]	-	0.140	± 0.008	-	-	
27	Óxido de piperitenona ^{a, b}	MO	1365	1366 [1]	-	-	-	36.40	± 0.07	
28	α-Copaeno ^{a, b}	HS	1379	1376 [1]	-	-	-	-	-	
29	β-Elemeno ^{a, b}	HS	1393	1390 [1]	15.30	± 0.04	-	3.010	± 0.009	
30	<i>trans</i> -β-Cariofileno ^{a, b, c}	HS	1427	1427 [3]	6.00	± 0.01	2.813	± 0.003	7.050	± 0.008
31	γ-Elemene ^{a, b}	HS	1434	1433 [3]	-	-	-	-	-	
32	<i>trans</i> -α-Bergamoteno ^{a, b}	HS	1437	1434 [1]	-	0.4010	± 0.0005	-	-	
33	α-Guaieno ^{a, b}	HS	1441	1437 [1]	1.070	± 0.004	-	4.310	± 0.004	
34	Timoquinona ^{a, b}	MO	1445	1559 [3]	-	0.770	± 0.003	-	-	
35	α-Humuleno ^{a, b, c}	HS	1464	1468 [3]	1.250	± 0.002	1.390	± 0.002	2.400	± 0.006
36	3- <i>terc</i> -Butil-4-metoxifenol ^{a, b}	MO	1481	1490 [3]	-	0.430	± 0.001	-	-	
37	Germacreno D ^{a, b, c}	HS	1488	1481 [1]	2.72	± 0.01	-	6.00	± 0.02	

N° Fig 8	Compuesto	Familia	Índices de retención lineales (DB-5MS)		Cantidad relativa, % $\bar{x} \pm s$, (n = 3)						
			Exp	Lit	<i>L. alba</i>		<i>L. origanoides</i>		<i>L. alba x L. origanoides</i>		
38	Biciclogermacreno ^{a, b}	HS	1502	1500 [1]	-	-	-	-	-	±	
39	α -Bulneseno ^{a, b}	HS	1507	1509 [3]	0.530	± 0.003	-	-	3.00	±	0.06
40	β -Bisaboleno ^{a, b}	HS	1530	1531 [1]	-	-	-	-	-	-	
41	<i>trans</i> - α -Bisaboleno ^{a, b}	HS	1543	1544 [1]	0.553	± 0.004	-	-	1.873	±	0.002
42	Germacreno B ^{a, b}	HS	1568	1559 [1]	-	-	-	-	-	-	
43	Óxido de cariofileno ^{a, b, c}	SO	1592	1583 [1]	0.450	± 0.002	-	-	-	-	
44	Pachulol ^{a, b}	SO	1687	1683 [3]	-	-	-	-	-	-	
45	Neofitadieno ^{a, b}	HD	1836	1836 [3]	0.390	± 0.001	-	-	-	±	
46	Fitol ^{a, b}	DO	2108	2116 [2]	0.630	± 0.008	1.170	± 0.005	-	±	
47	Palmitato de caprilo ^{a, b}	AG	2496	2501 [3]	-	-	-	-	-	±	
48	Escualeno ^{a, b}	HT	2810	2832 [3]	0.500	± 0.001	0.92	± 0.02	3.60	±	0.04
49	N.I.	-	-	-	-	-	0.60	± 0.03	-	-	
50	α -Tocoferol ^{a, b}	DO	3130	3136 [3]	-	-	3.370	± 0.004	-	-	
51	Estigmasterol ^{a, b}	TO	3263	3248 [3]	0.83	± 0.01	-	-	1.14	±	0.04
52	γ -Sitosterol ^{a, b}	TO	3323	3321 [3]	-	-	0.840	± 0.002	1.03	±	0.03
53	β -Amirina ^{a, b}	TO	3369	3337 [3]	-	-	-	-	-	-	
54	α -amirina ^{a, b}	TO	3415	3376 [3]	-	-	0.20	± 0.04	-	-	
HM	Hidrocarburos monoterpénicos				1.060	± 0.006	8.00	± 0.01	5.14	±	0.03
MO	Monoterpenos oxigenados				67.50	± 0.01	69.83	± 0.02	36.40	±	0.04
HS	Hidrocarburos sesquiterpénicos				29.10	± 0.02	5.53	± 0.01	28.10	±	0.04

N° Fig 8	Compuesto	Familia	Índices de retención lineales (DB-5MS)		Cantidad relativa, % $\bar{x} \pm s$, (n = 3)				
			Exp	Lit	<i>L. alba</i>		<i>L. origanoides</i>		<i>L. alba x L. origanoides</i>
SO	Sesquiterpeno oxigenados				1.073	± 0.004	-	-	-
HD	Hidrocarburos diterpénicos				0.389	± 0.004	-	-	±
DO	Diterpenos oxigenados				0.627	± 0.008	4.535	± 0.004	7.62 ± 0.01
HT	Hidrocarburos triterpénicos				0.499	± 0.008	0.92	± 0.01	2.20 ± 0.03
EA	Éster de ácidos grasos								
G									±
TO	Triterpenos oxigenados				0.836	± 0.006	1.00	± 0.02	1.03 ± 0.02
a	Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia > 90%).								
b	Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna y DB-5MS.								
c	Identificación confirmatoria basada en sustancias de referencia (STD), <i>i.e.</i> , α -pineno (98%, IRL _{DB-5MS} = 937), canfeno (95%, IRL _{DB-5MS} = 954), sabineno (95%, IRL _{DB-5MS} = 97), β -mirceno (94%, IRL _{DB-5MS} = 989), α -felandreno (98%, IRL _{DB-5MS} = 1007), α -terpineno (97%, IRL _{DB-5MS} = 1020), <i>p</i> -cimeno (99%, IRL _{DB-5MS} = 1028), limoneno (97%, IRL _{DB-5MS} = 1033), 1,8-cineol (99%, IRL _{DB-5MS} = 1036), γ -terpineno (96%, IRL _{DB-5MS} = 1066), geranial (97%, IRL _{DB-5MS} = 1270), timol (97%, IRL _{DB-5MS} = 1290), terpinen-4-ol (95%, IRL _{DB-5MS} = 1187), α -terpineol (90%, IRL _{DB-5MS} = 1202), <i>trans</i> - β -cariofileno (98.5%, IRL _{DB-5MS} = 1434), α -humuleno (96%, IRL _{DB-5MS} = 1470), germacreno D (90%, IRL _{DB-5MS} = 1490) y óxido de cariofileno (95%, IRL _{DB-5MS} = 1598), por comparación de espectros de masas (MS; EI, 70 eV, >90% de concordancia) y tiempos de retención (t_R).								
[1]	Adams (2007).								
[2]	Babushok <i>et al.</i> (2011).								
[3]	NIST (2017).								

En los espectros de *L. alba*, quimiotipo citral, geranial (51.3 %) y neral (16.1 %) fueron los compuestos principales. Lo que es consistente con los hallazgos de (García Quintero, 2022), quien reportó cantidades similares para el quimiotipo citral en extractos de *L. alba* obtenidos en el CENIVAM. En Brasil Santos *et al.* (2018) identificaron el quimiotipo citral, predominante en plantas de *L. alba* cultivadas en condiciones tropicales. En *L. origanoides*, el compuesto principal identificado fue timol (67.8 %), correspondiente al material vegetal del quimiotipo timol, lo que coincide con los reportes de (Mejía Medina, 2022), quien observó una predominancia de timol, así como de felandreno y carvacrol en extractos de *L. origanoides* recolectados en el CENIVAM. El quimiotipo timol de *L. origanoides* está asociado con actividades antimicrobianas y antifúngicas (Stashenko *et al.*, 2010). Un estudio realizado en Brasil por Trevisan *et al.* (2016) encontró que los quimiotipos timol y carvacrol eran predominantes en *L. origanoides*, con variaciones en su composición química debido a factores ambientales y de cultivo. El híbrido interespecífico (*L. alba* x *L. origanoides*) presentó un perfil químico “intermedio”, dominado por óxido de piperitenona (36.4 %) y *trans*- β -cariofileno (7.05 %), con una combinación de características heredadas de ambos progenitores. La presencia de óxido de piperitenona, un compuesto ausente en los parentales, indica que los híbridos pueden generar perfiles químicos novedosos. Según Santos *et al.* (2018), este tipo de recombinación genética es común en híbridos del género *Lippia*.

Figura 9.

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS de los extractos de hojas de: A. *Lippia organoides*; B. *Lantana canescens* y C. *L. canescens* x *L. organoides*. Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de cada pico cromatográfico en la Tabla

11

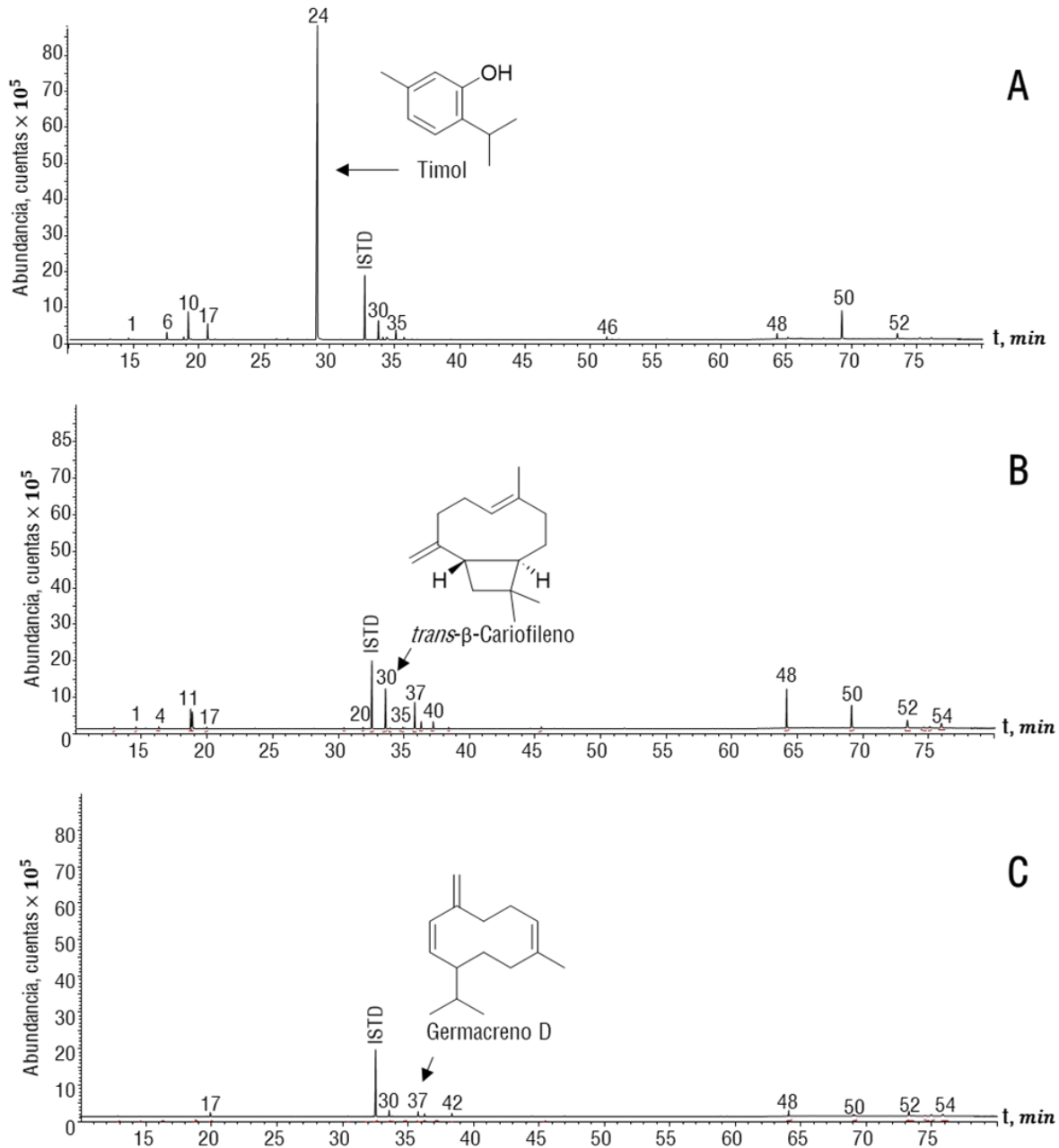


Tabla 11.

Composiciones químicas obtenidas por GC/MS de los extractos obtenidos de Lantana canescens, L. origanoides y su híbrido.

Nº Fig 9	Compuesto	Cantidad relativa, % $\bar{x} \pm s$, (n = 3)								
		<i>L. canescens</i>	<i>L. origanoides</i>	<i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i>						
				1	2	3	4	5	6	7
1	α -Tujeno ^{a,b}	0.60 \pm 0.01	0.290 \pm 0.003	-	-	-	-	-	-	0.21 \pm 0.01
2	α -Pinoeno ^{a,b,c}	0.300 \pm 0.005	-	-	-	-	-	-	-	0.60 \pm 0.01
3	Canfeno ^{a,b,c}	0.92 \pm 0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Sabineno ^{a,b,c}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	β -Terpineno ^{a,b}	-	-	-	-	-	0.60 \pm 0.01	-	-	-
6	β -Mirceno ^{a,b,c}	-	1.64 \pm 0.01	-	-	-	-	-	-	-
7	α -Felandreno ^{a,b,c}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Δ^3 -Careno ^{a,b}	-	-	-	0.6 \pm 0.01	0.690 \pm 0.003	-	0.40 \pm 0.01	-	-
9	α -Terpineno ^{a,b,c}	-	0.402 \pm 0.004	-	0.2 \pm 0.05	-	-	-	-	0.210 \pm 0.004
10	p-Cimeno ^{a,b,c}	-	3.40 \pm 0.01	-	0.750 \pm 0.003	0.870 \pm 0.007	0.300 \pm 0	0.70 \pm 0.02	-	1.20 \pm 0.01
11	Limoneno ^{a,b,c}	8.50 \pm 0.03	-	-	0.71 \pm 0.01	0.920 \pm 0.007	3.81 \pm 0.07	0.60 \pm 0.01	1.22 \pm 0.02	3.54 \pm 0.02
12	β -Felandreno ^{a,b}	-	-	-	-	1.02 \pm 0.01	-	-	-	1.183 \pm 0.003
13	1,8-Cineol ^{a,b,c}	5.0 \pm 0.1	-	-	-	-	3.20 \pm 0.05	-	-	-
14	β -Ocimeno ^{a,b}	-	-	-	-	-	-	-	-	0.490 \pm 0.007
15	<i>cis</i> - β -Ocimeno ^{a,b}	0.60 \pm 0.05	-	-	-	-	-	0.73 \pm 0.01	-	-
16	<i>trans</i> - β -Ocimeno ^{a,b}	0.630 \pm 0.005	-	-	-	-	-	-	-	0.60 \pm 0.02
17	γ -Terpineno ^{a,b}	0.740 \pm 0.001	2.30 \pm 0.01	3.1 \pm 0.3	6.1 \pm 0.1	7.30 \pm 0.03	1.40 \pm 0.04	5.0 \pm 0.1	1.60 \pm 0.01	7.20 \pm 0.05
18	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno ^{a,b}	-	0.240 \pm 0.002	-	-	-	-	-	-	-
19	Terpinoleno ^{a,b}	-	-	-	0.64 \pm 0.05	0.70 \pm 0.02	-	-	-	-
20	Terpinen-4-ol ^{a,b,c}	-	0.320 \pm 0.001	-	-	-	-	-	-	-
21	Metil-timil-éter ^{a,b}	-	0.181 \pm 0.010	-	-	-	-	-	-	-
22	Neral ^{a,b}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Geranial ^{a,b,c}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Timol ^{a,b,c}	-	67.80 \pm 0.03	-	-	-	-	-	-	-
25	δ -Elemeno ^{a,b}	1.00 \pm 0.01	-	-	1.60 \pm 0.04	1.62 \pm 0.07	-	1.9 \pm 0.03	-	-
26	Acetato de timilo ^{a,b}	-	0.140 \pm 0.008	-	-	-	-	-	-	-
27	Óxido de piperitenona ^{a,b}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	α -Copaeno ^{a,b}	0.580 \pm 0.007	-	-	-	-	0.40 \pm 0.01	-	-	-
29	β -Elemeno ^{a,b}	-	-	1.50 \pm 0.07	-	-	-	-	0.72 \pm 0.02	1.64 \pm 0.05
30	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a,b,c}	13.90 \pm 0.05	2.813 \pm 0.003	6.0 \pm 0.2	18.2 \pm 0.1	19.16 \pm 0.04	9.10 \pm 0.01	15.0 \pm 0.2	5.390 \pm 0.006	24.22 \pm 0.03

Tabla 11. Continuación

31	γ -Elemene ^{a,b}	-	-	3.01 ± 0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
32	<i>trans</i> - α -Bergamoteno ^{a,b}	1.101 ± 0.004	0.4010 ± 0.0005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	α -Guaieeno ^{a,b}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Timoquinona ^{a,b}	-	0.770 ± 0.003	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	α -Humuleno ^{a,b,c}	0.74 ± 0.01	1.390 ± 0.002	0.64 ± 0.06	6.30 ± 0.03	7.21 ± 0.02	0.50 ± 0.04	0.80 ± 0.03	3.80 ± 0.01	11.10 ± 0.02	-	-
36	3- <i>terc</i> -Butil-4-metoxifenol ^{a,b}	-	0.430 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Germacreno D ^{a,b,c}	8.10 ± 0.01	-	-	3.12 ± 0.01	6.00 ± 0.06	2.30 ± 0.03	6.90 ± 0.02	-	2.80 ± 0.04	-	-
38	Biciclogermacreno ^{a,b}	2.023 ± 0.002	-	5.11 ± 0.01	3.33 ± 0.08	3.30 ± 0.06	1.83 ± 0.02	3.32 ± 0.01	0.80 ± 0.01	1.40 ± 0.03	-	-
39	α -Bulneseno ^{a,b}	-	-	2.00 ± 0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
40	β -Bisaboleno ^{a,b}	2.650 ± 0.008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	<i>trans</i> - α -Bisaboleno ^{a,b}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	Germacreno B ^{a,b}	0.11 ± 0.02	-	0.383 ± 0.007	-	-	-	-	-	-	-	-
43	Óxido de cariofileno ^{a,b,c}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	Pachulol ^{a,b}	-	-	-	1.0 ± 0.2	-	-	-	-	-	-	-
45	Neofitadieno ^{a,b}	1.450 ± 0.003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	Fitol ^{a,b}	-	1.170 ± 0.005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Palmitato de caprilo ^{a,b}	-	-	-	11.71 ± 0.09	1.2 ± 0.2	1.80 ± 0.02	1.6 ± 0.1	-	-	-	-
48	Escualeno ^{a,b}	12.30 ± 0.01	0.92 ± 0.02	5.50 ± 0.02	2.50 ± 0.03	3.90 ± 0.04	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.04	1.592 ± 0.009	2.43 ± 0.02	-	-
49	N.I.	-	0.60 ± 0.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	α -Tocoferol ^{a,b}	7.62 ± 0.02	3.370 ± 0.004	5.11 ± 0.03	2.50 ± 0.03	-	-	2.73 ± 0.03	-	2.60 ± 0.01	-	-
51	Estigmasterol ^{a,b}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	γ -Sitosterol ^{a,b}	2.90 ± 0.05	0.840 ± 0.002	5.0 ± 0.1	3.40 ± 0.02	3.32 ± 0.01	3.00 ± 0.09	3.3 ± 0.1	1.71 ± 0.03	2.51 ± 0.02	-	-
53	β -Aminirina ^{a,b}	0.450 ± 0.009	-	-	1.583 ± 0.008	-	-	1.3 ± 0.02	-	-	-	-
54	α -Aminirina ^{a,b}	1.60 ± 0.04	0.20 ± 0.04	2.0 ± 0.2	1.73 ± 0.07	1.44 ± 0.02	-	1.3 ± 0.1	0.90 ± 0.08	1.3 ± 0.1	-	-
HM	Hidrocarburos monoterpenicos	12.41 ± 0.03	8.00 ± 0.01	3.13 ± 0.01	9.12 ± 0.07	11.50 ± 0.02	6.01 ± 0.05	7.40 ± 0.06	3.0 ± 0.1	15.1 ± 0.3	-	-
MO	Monoterpenos oxigenados	5.0 ± 0.1	69.83 ± 0.02	-	-	-	3.20 ± 0.03	-	-	-	-	-
HS	Hidrocarburos sesquiterpenicos	51.52 ± 0.04	5.53 ± 0.01	24.0 ± 0.1	35.01 ± 0.09	44.60 ± 0.08	15.50 ± 0.06	30.0 ± 0.1	12.2 ± 0.2	44.0 ± 0.4	-	-
SO	Sesquiterpeno oxigenado	-	-	-	22.0 ± 0.1	-	-	-	-	-	-	-
HD	Hidrocarburos diterpénicos	1.447 ± 0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DO	Diterpenos oxigenados	7.62 ± 0.01	4.535 ± 0.004	5.11 ± 0.02	2.45 ± 0.02	-	-	2.73 ± 0.01	-	2.573 ± 0.005	-	-
HT	Hidrocarburos triterpénicos	12.250 ± 0.007	0.92 ± 0.01	5.5 ± 0.02	2.46 ± 0.02	3.89 ± 0.02	1.35 ± 0.05	1.78 ± 0.02	1.7 ± 0.2	2.4 ± 0.01	-	-
EAG	Éster de ácidos grasos	-	-	-	11.71 ± 0.05	1.24 ± 0.01	1.80 ± 0.01	1.6 ± 0.1	-	-	-	-
TO	Triterpenos oxigenados	4.95 ± 0.04	1.00 ± 0.02	6.4 ± 0.1	6.71 ± 0.04	4.78 ± 0.02	2.98 ± 0.05	5.9 ± 0.1	2.5 ± 0.05	3.90 ± 0.08	-	-

a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia > 90%).

b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna y DB-5MS.

c Identificación confirmatoria basada en sustancias de referencia (STD), *i.e.*, α -pineno (98%, IRL_{DB-5MS}= 937), canfeno (95%, IRL_{DB-5MS}= 954), sabineno (95%, IRL_{DB-5MS}= 97), β -mirceno (94%, IRL_{DB-5MS}= 989), α -felandreno (98%, IRL_{DB-5MS}= 1007), α -terpineno (97%, IRL_{DB-5MS}= 1020), *p*-cimeno (99%, IRL_{DB-5MS}= 1028), limoneno (97%, IRL_{DB-5MS}= 1033), 1,8-cineol (99%, IRL_{DB-5MS}= 1036), γ -terpineno (96%, IRL_{DB-5MS}= 1066), geranial (97%, IRL_{DB-5MS}= 1270), timol (97%, IRL_{DB-5MS}= 1290), terpinen-4-ol (95%, IRL_{DB-5MS}= 1187), α -terpineol (90%, IRL_{DB-5MS}= 1202), *trans*- β -cariofileno (98.5%, IRL_{DB-5MS}= 1434), α -humuleno (96%, IRL_{DB-5MS}= 1470), germacreno D (90%, IRL_{DB-5MS}= 1490) y óxido de cariofileno (95%, IRL_{DB-5MS}= 1598), por comparación de espectros de masas (MS; EI, 70 eV, >90% de concordancia) y tiempos de retención (*t_R*).

Los sesquiterpenos *trans*- β -cariofileno y α -humuleno fueron los compuestos mayoritarios identificados en *Lantana canescens*, aunque en menores cantidades en comparación con las de *Lippia origanoides*. Esta especie ha sido muy poco estudiada, pero los resultados coinciden con investigaciones como las de Dambolena *et al.* (2010) y Peralta-Bohórquez *et al.* (2011), quienes también reportaron la presencia de los sesquiterpenos *trans*- β -cariofileno y α -humuleno. El híbrido intergenérico heredo parcialmente las características químicas tanto del parental masculino, *L. origanoides* como del parental femenino, *Lantana canescens*. El compuesto predominante en los siete híbridos fue el *trans*- β -cariofileno, con cantidades relativas desde 5.39 ± 0.006 % hasta 24.22 ± 0.03 %, lo que indica una influencia química del parental *Lantana canescens*. Sin embargo, la presencia de monoterpenos oxigenados como el acetato de timolo sugiere una contribución de *L. origanoides*. Estos resultados podrían deberse a que los cloroplastos maternos influyen predominantemente en la síntesis de metabolitos secundarios (McKinnon *et al.*, 2010), mientras que la herencia nuclear del parental masculino aporta características específicas.

5.6 Caracterización química por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de los extractos MSPD de hojas de plantas bajo estudio, usando metanol como solvente de elución

Los estudios realizados por (Stashenko *et al.*, 2004), (García Quintero, 2022) y (Mejía Medina, 2022) han documentado la composición química de *L. alba* y *L. origanoides*. Sin embargo, hasta el momento, no se han reportado análisis químicos de híbridos entre estas especies, ni estudios relacionados con extractos de *Lantana canescens* o cruces que la incluyan. Tampoco se encontraron hasta la fecha trabajos que utilicen la técnica MSPD para la extracción de compuestos fenólicos en estas plantas.

El análisis de los metabolitos secundarios presentes en los extractos MSPD de hojas de las especies mencionadas se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS) en modo de adquisición dual de iones positivos y negativos. En la corriente iónica total, los compuestos se detectaron usando las masas exactas de moléculas protonadas $[M+H]^+$ o deprotonadas $[M-H]^-$, con un error de masa menor de Δ ppm < 5 . El patrón isotópico de las moléculas fue concordante con el calculado por el *software Thermo XCalibur* 3.1. Además, se estudió el patrón de fragmentación de los iones $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$, obtenido con diferentes energías de colisión activada (10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 eV) en una celda *higher-energy collision dissociation cell* (HCD). La energía de colisión seleccionada fue aquella que permitió observar de manera más clara tanto los iones producto como la señal del ion precursor $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$.

En la Tabla 12 se muestran los 16 compuestos detectados en los extractos de *L. origanoides*, de los cuales 13 se identificaron tentativamente y tres, de manera confirmatoria, usando sustancias-patrón (erodictiol, quercetina y luteína). La Figura 9 muestra las corrientes iónicas extraídas (EIC) adquiridas por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, en modo *full scan*, de los compuestos detectados.

Tabla 12.

Composiciones químicas determinadas por UHPLC/ESI⁺/Orbitrap-HRMS con base en moléculas protonadas [M+H]⁺ y deprotonadas [M-H]⁻ presentes en los extractos MSPD de hojas de *L. origanoides*.

N° Fig 10.	t _R , min	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales (%)		Error Δppm	HCD, eV	Iones-productos, (%)		
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻			Fragmentos	Fórmula	m/z
31	6.14	No identificado	C ₃₀ H ₂₈ O ₁₃	597.16026 (22)	595.14461	-0.69	20	[(M+H)-C ₅ H ₆ O ₆] ⁺	C ₂₅ H ₂₃ O ₇ (75)	435.143 82
								[(M+H)-C ₁₅ H ₁₈ O ₇] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ (43)	287.055 01
								[(M+H)-C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁] ⁺	C ₉ H ₇ O ₂ (100)	147.044 05
13	5.06	Luteolina 7-arabinopiranosil-glucósido ^{a, b}	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	581.15009 (87)	579.13444	-1.59	10	[(M+H)-C ₅ H ₈ O ₄] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ (100)	449.107 83
								[(M+H)-C ₅ H ₈ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ (25)	287.055 01
25	5.64	Tetrahidroxiflavanona-acetilglucósido ^{a, b}	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	493.13405 (15)	491.1184	-0.78	10	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₇ H ₁₅ O ₇ (11)	331.081 22
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₂ H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ (100)	289.070 66
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₂ H ₂ O-C ₉ H ₆ O ₃] ⁺	C ₆ H ₇ O ₃ (3)	127.038 97
14	5.06	Luteolina-7-glucósido ^{a, b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.10783 (67)	447.09218	-0.58	10	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ (100)	287.055 01
10	4.81	Naringenina 4-O-galactósido ^{a, b}	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	435.12857	433.11292 (92)	-0.78	10	[(M-H)-CH ₂ O ₂] ⁻	C ₁₉ H ₃₁ O ₈ (100)	387.201 34
								[(M-H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ (42)	271.060 09

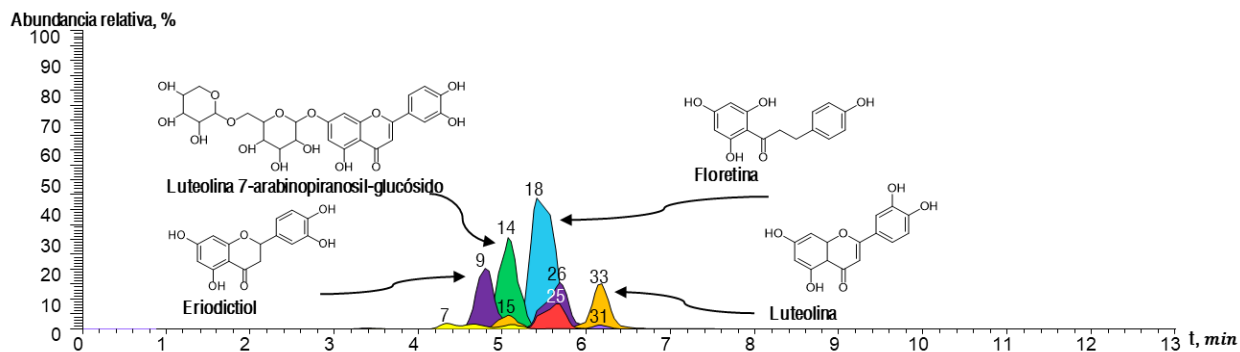
N° Fig 10.	t_R , min	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales (%)		Error Appm	HCD, eV	Iones-productos, (%)		
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻			Fragmentos	Fórmula	m/z
17	5.20	Isómero de naringenina 4- <i>O</i> -galactósido ^{a, b}	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	435.12857	433.11292 (2)	-1.14	30	[(M-H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ (100)	271.060 09
								[(M-H)-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₆ O] ⁻	C ₉ H ₅ O ₄ (4)	177.018 23
								[(M-H)-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₈ H ₈ O] ⁻	C ₇ H ₃ O ₄ (15)	151.002 58
								[(M-H)-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₇ H ₄ O ₄] ⁻	C ₈ H ₇ O (2)	119.049 14
								[(M-H)-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₉ H ₆ O ₄] ⁻	C ₆ H ₅ O (2)	93.0334 9
22	5.54	Isómero de naringenina 4- <i>O</i> -galactósido ^{a, b}	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	435.12857	433.11292 (15)	-2.48	10	[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₁₈ H ₂₉ O ₉ (100)	389.180 6
								[(M-H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ (100)	271.060 09
7	4.69	Taxifolina ^{a, b, c}	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	305.06557 (89)	303.04992	-0.69	10	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ (56)	287.055 01
								[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₁ O ₅ (100)	259.060 09
								[(M+H)-H ₂ O- 2CO] ⁺	C ₁₃ H ₁₁ O ₄ (13)	231.065 18
								[(M+H)-3H ₂ O- 2CO] ⁺	C ₉ H ₇ O ₅ (32)	195.028 79
								[(M+H)-C ₈ H ₈ O ₃] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄ (65)	153.018 23
9	4.79	Isómero de eriodictiol ^{a, b}	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	289.07066 (37)	287.05501	0.69	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ (1)	271.060 09
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O] ⁺	C ₉ H ₇ O ₄ (6)	179.033 88

N° Fig 10.	t_R , min	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales (%)		Error Appm	HCD, eV	Iones-productos, (%)		
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻			Fragmentos	Fórmula	m/z
26	5.67	Eriodictiol ^{a, b, c}	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	289.07066 (69)	287.05501	0.69	30	[(M+H)-C ₇ H ₄ O ₄] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄ (100)	153.018 23
								[(M+H)-C ₆ H ₆ O ₃] ⁺	C ₉ H ₇ O ₃ (50)	163.038 97
								[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ (4)	271.060 09
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O] ⁺	C ₉ H ₇ O ₄ (10)	179.033 88
								[(M+H)-C ₇ H ₄ O ₄] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄ (92)	153.018 23
								[(M+H)-C ₆ H ₆ O ₃] ⁺	C ₉ H ₇ O ₃ (100)	163.038 97
33	6.39	Luteolina ^{a, b, c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.05501 (100)	285.03936	-0.92	60	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₉ O ₅ (5)	269.044 44
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₂] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄ (65)	153.018 23
								[(M+H)-C ₇ H ₄ O ₄] ⁺	C ₈ H ₇ O ₂ (30)	135.044 05
15	5.08	Isómero de luteolina ^{a, b}	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.05501 (100)	285.03936	-1.13	60	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₉ O ₅ (8)	269.044 44
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₂] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄ (62)	153.018 23
								[(M+H)-C ₇ H ₄ O ₄] ⁺	C ₈ H ₇ O ₂ (27)	135.044 05
18	5.41	Floretina ^{a, b}	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	275.09140 (12)	273.07575	-1.13	10	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₃ O ₄ (4)	257.080 83
								[(M+H)-C ₇ H ₆ O] ⁺	C ₈ H ₉ O ₄ (24)	169.049 53

N° Fig 10.	t _R , min	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales (%)		Error Appm	HCD, eV	Iones-productos, (%)		
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻			Fragmentos	Fórmula	m/z
8	4.71	Hipolaetina ^{a, b}	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.04992 (34)	301.03427	-0.81	70	[(M+H)-C ₈ H ₈ O ₄] ⁺	C ₇ H ₇ O (100)	107.049 14
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₂] ⁺	C ₇ H ₅ O ₅ (47)	169.013 14
								[(M+H)-C ₇ H ₄ O ₅] ⁺	C ₈ H ₇ O ₂ (68)	135.044 05
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₂ - -CH ₂ O ₂] ⁺	C ₆ H ₃ O ₃ (3)	123.007 67
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₂ - CH ₂ O ₂ -CO ₂] ⁺	C ₅ H ₃ O ₂ (3)	95.0127 5
16	5.14	Isómero de quercetina ^{a, b}	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.04992 (7)	301.03427	-1.41	70	[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₃] ⁺	C ₈ H ₅ O ₄ (8)	165.018 23
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₄] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄ (100)	153.018 23
								[(M+H)-C ₇ H ₅ O ₃] ⁺	C ₇ H ₅ O ₃ (44)	137.023 32
29	6.02	Quercetina ^{a, b, c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.04992 (39)	301.03427	-1.89	60	[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₃] ⁺	C ₈ H ₅ O ₄ (8)	165.018 23
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₄] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄ (100)	153.018 23
								[(M+H)-C ₇ H ₅ O ₃] ⁺	C ₇ H ₅ O ₃ (44)	137.023 32
a	Identificación basada en el estudio del patrón de fragmentación y comparación con los espectros de masas de las bases de datos HMDB 4.0 (Wishart <i>et al.</i> , 2009) y MassBank (MassBank Consortium, <i>s. f.</i>).									
b	Identificación basada en datos de la literatura científica sobre especies del género <i>Lippia</i> (García Quintero, 2022; Stashenko <i>et al.</i> , 2004)									
c	Identificación confirmatoria basada en la comparación de espectros de masas y el tiempo de retención (t _R) con los compuestos patron de luteolina (≥98 %), erodictiol (≥98 %), quercetina (≥98 %), taxifolina (≥98), adquiridos a Sigma-Aldrich.									

Figura 10.

Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ deprotonadas $[M-H]^-$, en extractores aislados por MSPD de *L. origanoides* obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo full scan Columna Zorbax Eclipse C₁₈. Véase la identificación de los picos en la Tabla 12



En la Tabla 13 se muestran los 12 compuestos detectados en los extractos de *Lippia alba*, de los cuales nueve se identificaron tentativamente y tres, de manera confirmatoria, usando una sustancias-patrón (naringenina, apigenina, apigenina-7-glucorónido). La Figura 11 muestra las corrientes iónicas extraídas (EIC) por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, adquiridas en modo full scan, de los compuestos detectados.

Tabla 13.

Composiciones químicas determinadas por UHPLC/ESI⁺/Orbitrap-HRMS con base en moléculas protonadas [M+H]⁺ y deprotonadas [M-H]⁻ presentes en los extractos MSPD de hojas de *L. alba*

N° fig 11	t _R , min	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales		Error Δppm	HCD, eV
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻		
1	3.59	Isómero del glucósido de hidroxycumarina ^{a, b}	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	325.09179	323.07614	-0.55	10
5	4.34	No identificado ^a	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	227.12778	225.11213	-3.59	20
6	4.50	Isómero del glucósido de hidroxycumarina ^{a, b}	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	325.09179	323.07614	-1.77	10
11	4.88	Isómero del glucósido de hidroxycumarina ^{a, b}	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	325.09179	323.07614	-1.77	10
20	5.46	Isómero del glucósido de hidroxycumarina ^{a, b}	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	325.09179	323.07614	-1.96	10
21	5.5	Apigenina-7-glucurónido ^{a, b, c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	447.09218	445.07653	-2.37	20
23	5.54	Tricina 7-O-glucurónido ^{a, b}	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	507.11331	505.09766	-1.97	20
24	5.59	Luteolina-7-glucósido ^{a, b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.10783	447.09218	-1.55	30
7	5.71	Luteolina ^{a, b}	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.05501	285.03936	-0.07	60
30	6.05	Glucósido de hidroxycumarina ^{a, b}	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	325.09179	323.07614	-0.36	10
32	6.19	Naringenina ^{a, b, c}	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.07575	271.06009	-2.06	40
34	6.80	Apigenina ^{a, b, c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.06009	269.04444	-0.82	60

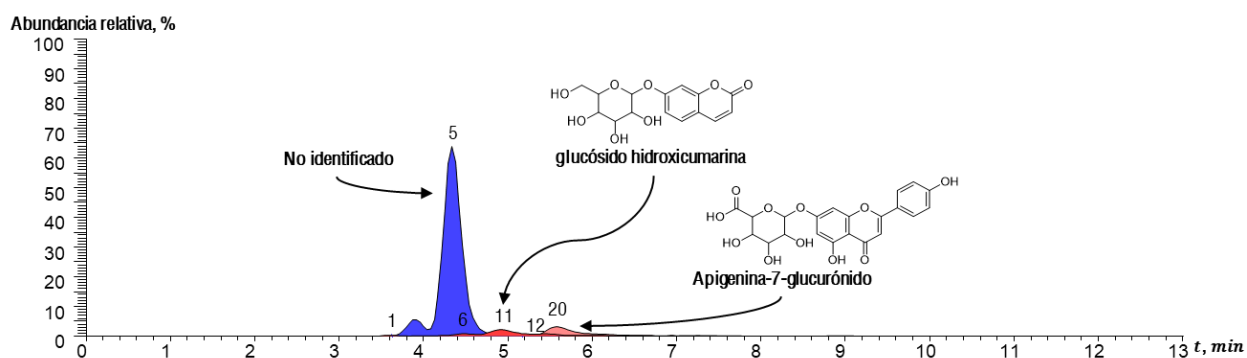
^a Identificación basada en el estudio del patrón de fragmentación y comparación con los espectros de masas de las bases de datos HMDB 4.0 (Wishart *et al.*, 2009) y *MassBank* (*MassBank Consortium, s. f.*).

^b Identificación basada en datos de la literatura científica sobre especies del género *Lippia* (Mejía Medina, 2022; Lin *et al.*, 2007)

^c Identificación confirmatoria basada en la comparación del espectro de masas y el tiempo de retención (t_R) de los compuestos patrón de naringenina (≥98 %), apigenina (≥98 %), apigenina-7-glucurónido (≥98 %), adquiridos a *Sigma-Aldrich*.

Figura 11.

Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ deprotonadas $[M-H]^-$, en extractos aislados por MSPD de *L. alba* obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo full scan Columna Zorbax Eclipse C₁₈. Véase la identificación de los picos en la Tabla 13.



En la Tabla 14 se muestran los 12 compuestos detectados en los extractos de *Lantana canescens*, identificados tentativamente. Figura 12 muestra las corrientes iónicas extraídas (EIC) de los compuestos detectados por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, adquiridas en modo full scan,

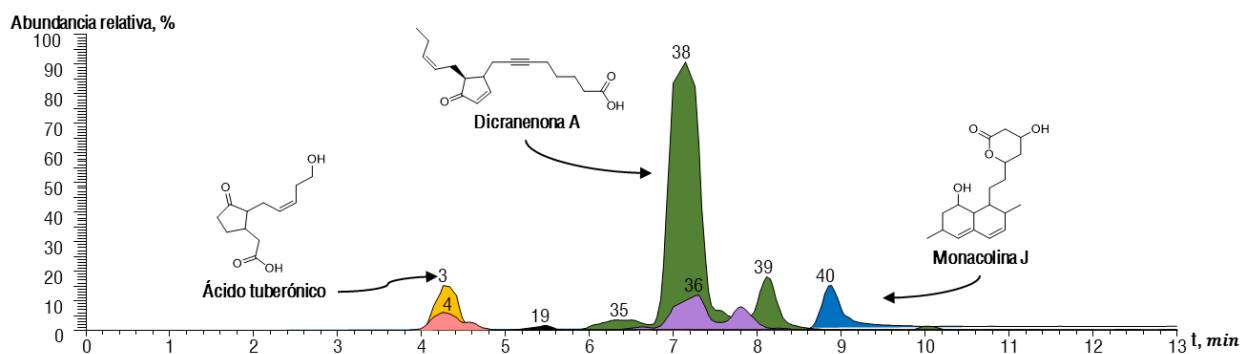
Tabla 14.

Composiciones químicas determinadas por UHPLC/ESI⁺/Orbitrap-HRMS con base en moléculas protonadas [M+H]⁺ presentes en los extractos MSPD de hojas de *Lantana canescens*.

N° Fig 12	t _R , min	Compuestos	Fórmula	Masa experimental	Error	HCD, eV
				[M+H] ⁺	Δppm	
2	4.26	Ácido tuberónico glucosido ^a	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	389.18060	-0.56	20
3	4.26	Ácido tuberónico ^a	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	227.12778	-3.25	30
4	4.26	Ácido 4,5-didehidrojasmónico ^a	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	209.11722	-2.85	30
12	4.99	Glucurónido de escutellareína ^a	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	463.08710	-2.11	10
19	5.45	Quercetina ^{a, c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.04992	-1.41	60
28	5.84	Luteolina ^a	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.05501	-2.94	70
35	7.15	Isómero de dicranenona A ^a	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	289.17982	-2.93	40
36	7.3	Desoxifitoprostano J1-II ^a	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	291.19547	-4.31	40
37	7.45	Naringenina 4- <i>O</i> -galactósido ^a	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	435.12857	-4.35	20
35	7.53	Dicranenona A ^a	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	289.17982	-3.57	40
39	8.11	Isómero de dicranenona ^a	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	289.17982	1.06	40
40	8.84	Monacolina J ^a	C ₁₉ H ₂₈ O ₄	321.20603	-1.17	30
a	Identificación basada en el estudio del patrón de fragmentación y comparación con los espectros de masas de las bases de datos HMDB 4.0 (Wishart <i>et al.</i> , 2009) y MassBank (MassBank Consortium, <i>s. f.</i>).					
c	Identificación confirmatoria basada en la comparación del espectro de masas y el tiempo de retención (t _R) del compuestos patrón de quercetina (≥98 %) adquiridos a Sigma-Aldrich.					

Figura 12.

Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$, en extractos aislados por MSPD de *Lantana canescens* obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo full scan Columna Zorbax Eclipse C₁₈. Véase la identificación de los picos en la Tabla 14.



En la Tabla 15 se muestran los 22 compuestos que se detectados en los extractos de parentales *Lippia alba*, *L. origanoides* y *Lantana canescens*. Es evidenció que los híbridos heredaron la mayoría de los compuestos de los parentales femeninos (*Lippia alba* y *Lantana canescens*). Esto incluye metabolitos secundarios clave como la luteolina y la naringenina, que están presentes los híbridos. Los ácidos tuberónico glucósido y 4,5-didehidrojasmónico, exclusivos de *Lantana canescens*, también se detectaron en los híbridos, lo que confirma la influencia materna en la herencia de metabolitos. Aunque *L. origanoides* aportó compuestos como la eriodictiol, la apigenina y derivados de flavonoides, no todos estos metabolitos secundarios se detectaron en los híbridos, lo que podría estar relacionado con mecanismos genéticos que regulan la expresión de rutas biosintéticas en los híbridos. Los compuestos derivados de luteolina y naringenina fueron heredados tanto del parental femenino como del masculino. Esto sugiere que ciertas rutas biosintéticas son compartidas entre las especies parentales y se expresan en los híbridos, según afirman los autores (Selvaraj, 2022). Si eriodictiol y la apigenina, aunque presentes

en los parentales, no se detectaron en los híbridos. Esto podría estar relacionado con la regulación epigenética o con la represión de ciertas rutas biosintéticas durante el desarrollo de los híbridos. La influencia predominante del parental femenino en híbridos fue coherente con los estudios realizados por McKinnon *et al.* (2010), quienes explicaron cómo el genoma del cloroplasto se heredaba típicamente de la madre y regulaba muchas de las rutas metabólicas clave.

Tabla 15.

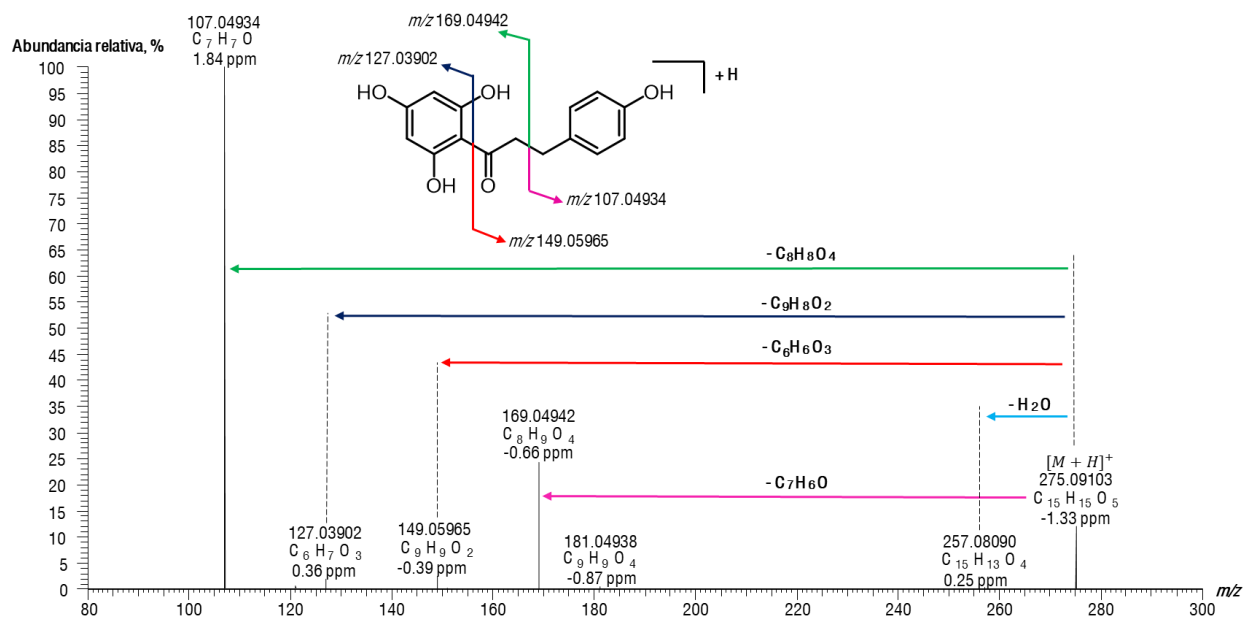
Patrones de herencia de metabolitos secundarios en híbridos de Lippia alba, L. origanoides y Lantana canescens: comparativa de compuestos parentales vs. descendencia

Compuestos	<i>Lippia alba</i>	<i>L. origanoides</i>	<i>Lantana canescens</i>	<i>Lippia alba</i> x <i>L. origanoides</i>	<i>Lantana canescens</i> x <i>L. origanoides</i>							
					1	2	3	4	5	6	7	
Taxifolina	X	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hipolaetina	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Naringenina 4- <i>O</i> -galactósido	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Luteolina 7-arabinopiranosil-glucósido	X	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Luteolina-7-glucósido	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Floretina	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acetilglucósido de tetrahidroxiflavanona	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Eriodictiol	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Quercetina	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Luteolina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ácido tuberónico glucósido	X	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ácido tuberónico	X	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ácido 4,5-didehidrojasónico	X	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glucurónido de escutellareína	X	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dicranenona A	X	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Monacolina J	X	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Deoxyphytoprostana J1-II	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Apigenina-7-glucurónido	✓	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
Tricina 7- <i>O</i> -glucurónido	✓	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
Glucósido de hidroxicumarina	✓	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
Naringenina	✓	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
Apigenina	✓	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
✓	Compuesto detectado en la muestra											
X	Compuesto no detectado en la muestra, por el nivel mínimo de detección											

En los extractos MSPD obtenidos de hojas *Lippia origanoides*, el compuesto mayoritario detectado fue la floretina. En la Figura 13 se muestra su espectro ($[M+H]^+$, m/z 275.09103), La fragmentación incluye una deshidratación $[(M+H)-H_2O]^+$, generando un ion en m/z 257.08090. Posteriormente, una ruptura bencílica genera dos fragmentos en m/z 169.04942 $[(M+H)-C_8H_8O_4]^+$ y en m/z 107.04934 $[(M+H)-C_8H_8O_4]^+$; mientras que la ruptura produce un ion en m/z 149.05965 $[(M+H)-C_6H_6O_3]^+$ y 127.03902 $[(M+H)-C_9H_8O_2]^+$.

Figura 13.

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de floretina $[M+H]^+$ en m/z 275.09140, a 10 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD.



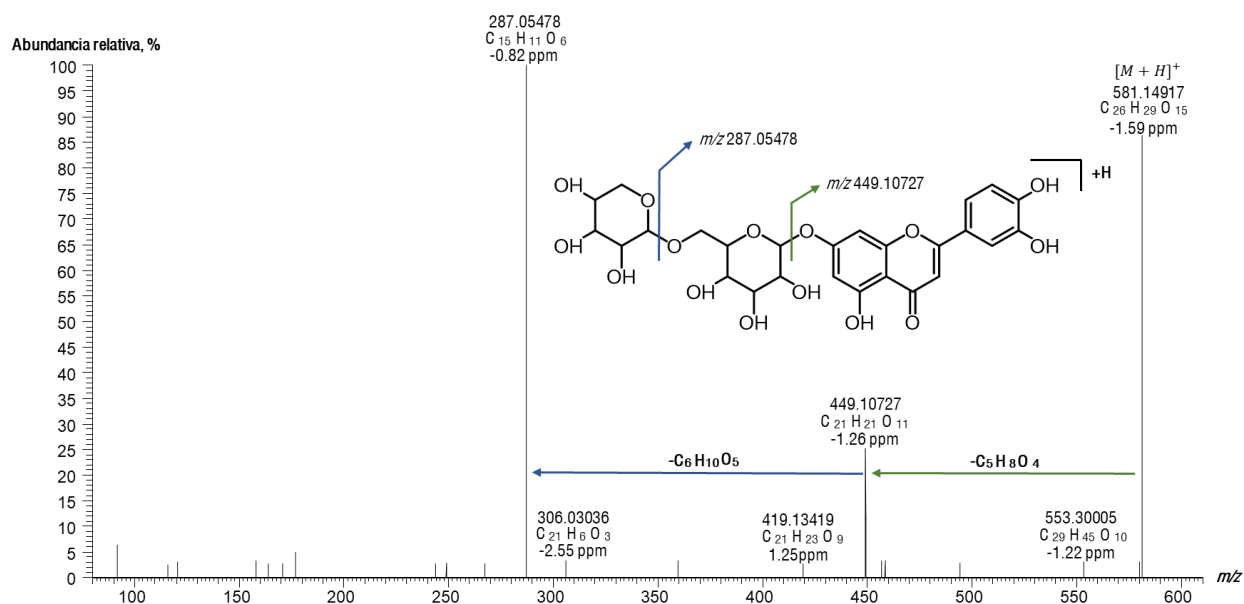
La floretina un antioxidante poderoso encontrado en hojas y frutos de manzanos (Picinelli, Dapena *et al.*, 1995) y extraído de las hojas de *L.origanoides* ha demostrado poseer propiedades alelopáticas inhibiendo el crecimiento y cambiando la morfología de las raíces de *Arabidopsis*

thaliana, (Stanišić, 2019). La floretina también inhibe los transportadores SGLT1 y SGLT2, reduciendo la absorción de glucosa en el intestino y los riñones, con aplicaciones potenciales en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Chan *et al.*, 1962).

Otro compuesto mayoritario fue la luteolina-7-arabinopiranosil-glucósido. En la Figura 14 se muestra el espectro de masas de la luteolina-7-arabinopiranosil-glucósido ($[M-H]^+$, m/z 581.14917), La fragmentación incluye una ruptura de un primer azúcar $[(M+H)-C_5H_8O_4]^+$ generando un ion en m/z 449.10727. Posteriormente, la ruptura de un glucósido genera un fragmento en m/z 287.05478 $[(M+H)-C_6H_{10}O_5]^+$ relacionado con la estructura base de un flavonoide.

Figura 14.

Espectro de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la luteolina-7-arabinopiranosil-glucósido. Véase la señal $[M + H]^+$ en m/z 581.14917, a 10 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD.

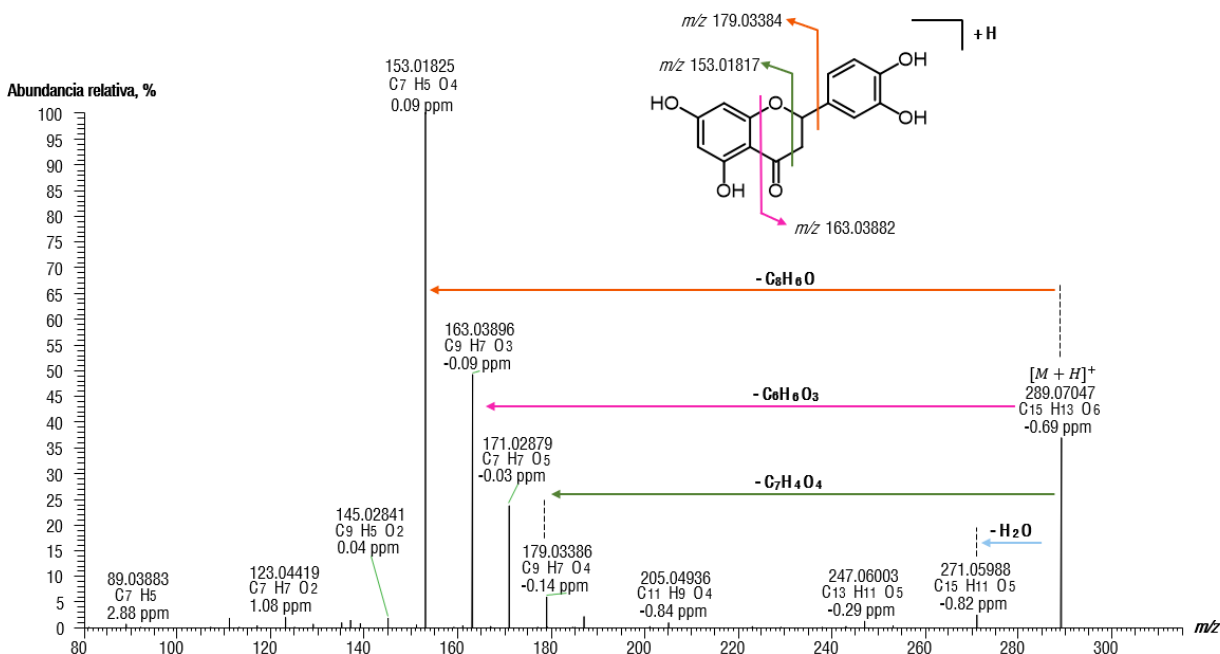


El tercer compuesto mayoritario fue el erodictiol. En la Figura 15 se muestra el espectro de masas del erodictiol ($[M-H]^+$, m/z 289.07047). La primera fragmentación principal incluye la pérdida de una molécula de agua $[(M+H)-H_2O]^+$, lo que genera un fragmento en m/z 271.05988. Posteriormente, se observa la eliminación de $[(M+H)-C_8H_6O]^+$, para formar un fragmento en m/z 153.01817. Adicionalmente, ocurre la pérdida de $[(M+H)-C_8H_6O_3]^+$, generando un ion en m/z 163.03896, y la eliminación de $[(M+H)-C_7H_4O_4]^+$, que da lugar al fragmento en m/z 179.03386.

El erodictiol es un flavonoide con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas, estudiado por su capacidad para modular procesos inflamatorios y combatir microorganismos patógenos. Además, presenta actividad neuroprotectora, mejorando el aprendizaje y la memoria, y actúa como antagonista del receptor TRPV1, lo que lo hace prometedor en el manejo del dolor sin efectos adversos significativos (Rossato, 2014; Souza *et al.*, 2018).

Figura 15.

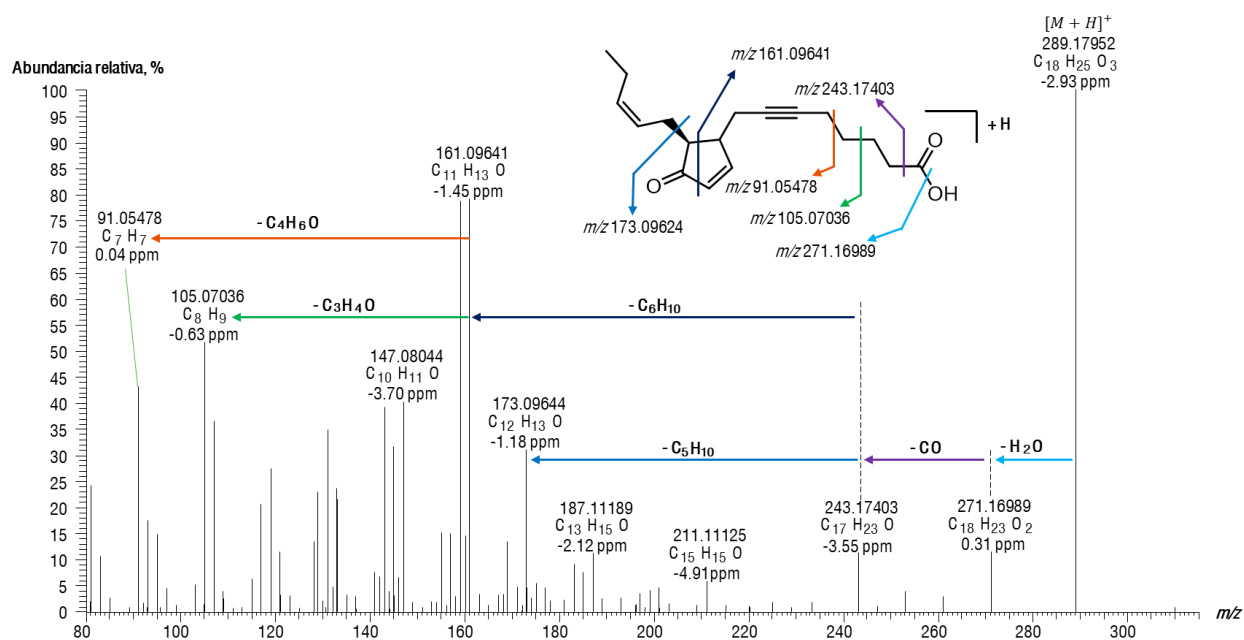
Espectro de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS del erodictiol. Véase la señal $[M + H]^+$ en m/z 289.07047, a 30 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD.



En la Figura 16 se muestra el espectro de masas de la dicranenona A ($[M+H]^+$, m/z 289.17952), compuesto principal de los extractos de hojas de *Lantana canescens*. La primera fragmentación incluye la pérdida de una molécula de agua $[(M+H)-H_2O]^+$, generando un fragmento en m/z 271.16989. En paralelo, se observa la eliminación de un grupo carbonilo $[(M+H)-CO]^+$, lo que produce un fragmento en m/z 243.17403; y luego, ocurre la pérdida de C_5H_{10} , formación del ion m/z 173.09644, paralelamente a este proceso hay una pérdida de C_6H_{10} y aparición del fragmento m/z 161.09641.

Figura 16.

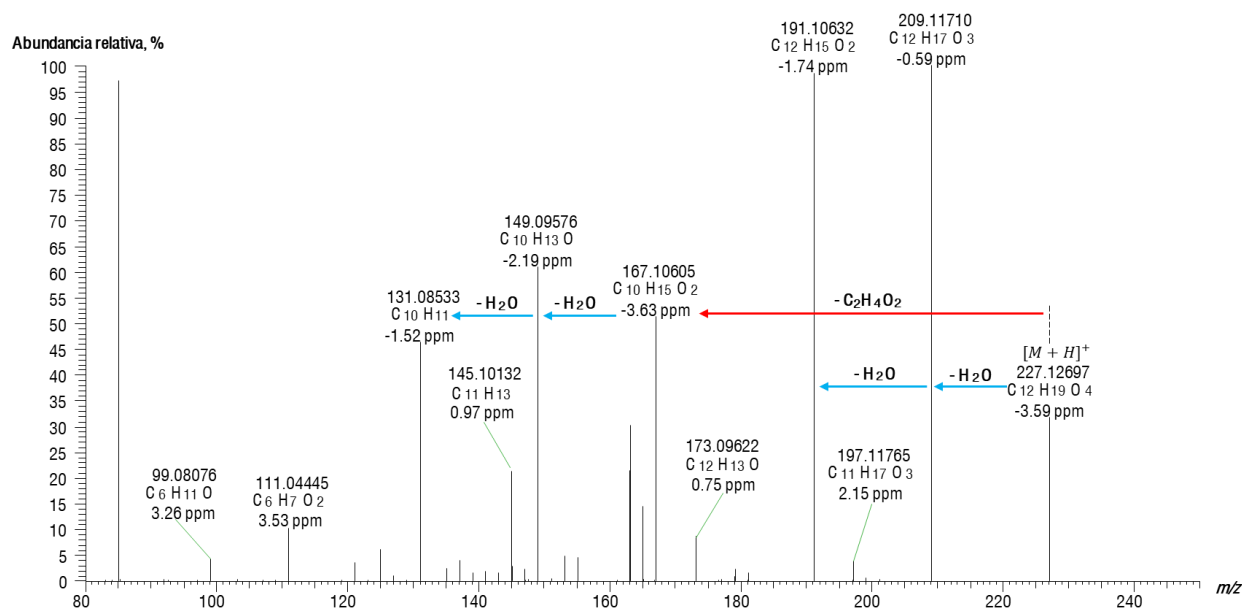
Espectro de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la dicranenona A. Véase la señal $[M + H]^+$ en m/z 289.17952, a 40 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD



En la Figura 17 se muestra el espectro de masas del compuesto oxigenado no identificado con masa exacta ($[M+H]^+$ en m/z 227.12697), compuesto principal de los extractos de hojas de *Lippia alba*. Se observan varias pérdidas de moléculas de agua $[(M+H)-H_2O]^+$, correspondientes a fragmentos m/z 209.11710 y m/z 191.10632; fragmentos $([M+H]^+$ en m/z 149.09576 y m/z 131.08533) son productos de pérdida de moléculas de H₂O del ion $([M+H]^+$ en m/z 167.10605).

Figura 17.

Espectros de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de un compuesto no identificado presente en el extracto por MSPD de *Lippia alba*. Véase la señal $[M + H]^+$ en m/z 227.12697, a 20 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD.



6. Divulgación de resultados

Durante el proyecto de grado, los resultados parciales del trabajo se presentaron a eventos nacionales e internacionales en modalidad oral y póster.

Eventos nacionales e internacionales:

3d *Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry*, IBERO-2022. Modalidad póster.

XI Congreso Colombiano de Cromatografía (COCOCRO), el XIX Congreso Latinoamericano de Cromatografía (COLACRO), el XVI Simposio Latinoamericano de Química

Analítica Ambiental (LASEAC), el XXVI Simposio Internacional en Avances en Tecnologías de Extracción (EXTECH), el III Simposio Panamericano de Aceites Esenciales (SPAЕ) y el *Workshop* de Avances Recientes en la Preparación de Muestras (WARPA), realizado del 13 al 15 de noviembre de 2024 en Bucaramanga, Colombia. Los siguientes resultados se expusieron bajo la modalidad de presentación oral, “Chemical characterization by GC/MS and LC/MS of *Lippia origanoides*, *L. alba*, *Lantana canescens* and their hybrids MSPD extracts”

7. Conclusiones

En el presente estudio se analizaron las hibridaciones realizadas por la bióloga Ariadna Silva entre *Lippia alba*, *L. origanoides* y *Lantana canescens*, logrando la obtención de híbridos intergenéricos con un éxito más alto en comparación con los híbridos intragenéricos. La caracterización morfológica de los cruzamientos reveló una mayor similitud con los parentales femeninos en morfología; la forma y el tamaño de las hojas, el tipo de inflorescencia y la estructura floral. Estos resultados sugieren un predominio de la herencia materna, reflejando el papel determinante de los genes cloroplásticos en el desarrollo fenotípico de los híbridos. No obstante, también se observaron características intermedias, lo cual demuestra la capacidad hibridación entre especies taxonómicamente distantes.

El análisis químico por GC/MS evidenció que los compuestos mayoritarios en *L. origanoides*, *L. alba* y *L. canescens* fueron timol ($67,80 \pm 0,03$ %), geranial ($51,34 \pm 0,03$ %) y *trans*- β -cariofileno ($13,90 \pm 0,05$ %), respectivamente. En el híbrido *L. alba* \times *L. origanoides*, el

componente principal fue el óxido de piperitenona ($36,40 \pm 0,07$ %), mientras que en los siete híbridos de *L. canescens* × *L. origanoides* se detectaron diversas concentraciones de *trans*- β -cariofileno: $6,0 \pm 0,2$ %, $18,2 \pm 0,1$ %, $19,16 \pm 0,04$ %, $9,10 \pm 0,01$ %, $15,0 \pm 0,02$ %, $5,390 \pm 0,006$ % y $24,22 \pm 0,03$ %.

Mediante UHPLC-ESI+/-Orbitrap-HRMS se identificaron 40 compuestos en total: 16 en *L. origanoides*, 12 en *L. alba* y 12 en *L. canescens*. Los compuestos principales fueron la floretina ([M-H]⁺, m/z 275,09140), un compuesto no identificado ([M-H]⁺, m/z 227,12778) y dicranenona A ([M-H]⁺, m/z 289,17982), respectivamente. Algunos compuestos derivados de la luteolina y la naringenina fueron heredados por ambos progenitores; sin embargo, otros como el eriodictiol y la apigenina no fueron detectados en los híbridos. Los metabolitos predominantes heredados por los híbridos provinieron en su mayoría del parental femenino, incluyendo terpenos, flavonoides y ácidos fenólicos.

Este trabajo representa un aporte significativo al conocimiento fitoquímico de especies del género *Lippia* y *Lantana* en Colombia. Es el primer reporte sobre cruces intergenéricos entre las especies *L. alba*, *L. origanoides* y *L. canescens*, y sobre la aplicación de la técnica MSPD para la extracción de compuestos fenólicos en extractos de *L. canescens*. La información generada es relevante para investigaciones futuras enfocadas en ingredientes naturales con potencial terapéutico y en aplicaciones dentro de la medicina, contribuyendo así al aprovechamiento sostenible de la biodiversidad colombiana.

Referencias Bibliográficas

- Adams, R. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4a Ed. *Allured Publishing Corporation*. Carol Stream, IL, EE. UU. 1-698.
- Agrawal, A. A. (2007). Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(2), 103-109.
- Aymard, G. (2023). *Lantana canescens* Kunth en Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis (Eds.). 2015. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Ayub, A., Begum, S., Ali, S. N., Ali, S. T., & Siddiqui, B. S. (2019). Triterpenoids from the aerial parts of *Lantana camara*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 21(2), 141–149.
- Babushok, V., Linstrom, P., & Zenkevich, I. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 40. 1-47
- Baker, D. R. (2012). Liquid chromatography: Fundamentals and instrumentation. *Analytical Techniques in the Sciences*. John Wiley & Sons.
- Barker, S. A. (2000). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 43(1-3), 1-42.
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid-phase dispersion. In: *Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 49, pp. 265-285). Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

- Bernal González, R. Gradstein, S. R. & Celis Pacheco, M. (2016). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Volumen I: Capítulos introductorios, líquenes a *Lythraceae*. Universidad Nacional de Colombia.
- Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis (Eds.). 2019. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Bolson, Hefler, S. R., Dall'Oglio Chaves, E. I., Gasparotto Junior, A. & Cardozo Junior, E. L. (2015). Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 161, 1–10.
- Brandão, R. M., Ferreira, V. R. F., Batista, L. R., Alves, E., Santiago, W. D., Barbosa, R. B., ... & Cardoso, M. D. G. (2021). Antifungal activity and the effect of the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth on *Aspergillus mycotoxins* production. *J Crop Sci*, 15, 1005-1012.
- Caballero-Gallardo, Fuentes-López, K., Stashenko, E. E. & Olivero-Verbel, J. (2022). Chemical composition, repellent action, and toxicity of essential Oils from *Lippia origanoides*, *L. alba* Chemotypes, and *Pogostemon cablin* on adults of *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insects*, 14(1), 41, 1-14.
- Cáceres Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9(4), 147, 1–15.
- Chan, S. S., & Lotspeich, W. D. (1962). Comparative effects of phlorizin and phloretin on glucose transport in the cat kidney. *American Journal of Physiology – Legacy Content*, 203(6), 975–979.

- Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., & Pichersky, E. (2012). The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal*, 66(1), 212-229.
- Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2-3), 153-177.
- Cordell, G. A. (2000). Biodiversity and drug discovery--a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, 55(6), 463-480.
- Criollo-Mendoza, Ramos-Payán, R., Contreras-Angulo, L. A., Gutiérrez-Grijalva, E. P., León-Félix, J., Villicaña, C., Angulo-Escalante, M. A., & Heredia, J. B. (2022). Cytotoxic activity of polyphenol extracts from three oregano species: *Hedeoma patens*, *Lippia graveolens* and *Lippia palmeri*, and antiproliferative Potential of *Lippia graveolens* against two types of breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7). *Molecules*, 27(16), 5240.
- Dai, J. & Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, analysis and their Antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Dambolena, J., Zunino, M. P., Lucini, E. I., Zygadlo, J. A., Banchio, E., Biurrun, F., Rotman, A., & Ahumada, O. (2010). Aromatic plants of northwest Argentina. Constituents of the essential oils of aerial parts of seven Verbenaceae: *Lantana* and *Aloysia*. *The Journal of Essential Oil Research*, 22(4), 289–293.
- Decuyper, Claps, L. E. & Valle, E. E. D. (2020). Primer reporte de *Ceroplastes granáis* (Hemiptera: Coccidae) en plantas ornamentales de *Duranta erecta* var. lemon L. (Verbenaceae) en la provincia de Entre Ríos, Argentina. *Agriscientia*, 37(2), 51–60.

- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: A biosynthetic approach* (2nd Ed.). Chichester, United Kingdom: *John Wiley & Sons*. 608
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843–847.
- Feldman, M. & Levy, A. A. (2012). Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics*, 192(3), 763-774.
- García Quintero, C. A. (2022). Caracterización química y fraccionamiento de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos obtenidos de *Lippia alba* y *Turnera diffusa* [Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander]. Universidad Industrial de Santander.
- Gómez-Rodríguez, O., Retes-Manjarrez, J. E., & Stashenko, E. E. (2022). Genética de la resistencia a *Phytophthora capsici* de la línea de chile 41-1 (*Capsicum annuum*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 45(2), 211–224
- Grob, R. O., & Barry, E. F. (2004). *Modern practice of gas chromatography*. Hoboken, NJ, USA: *John Wiley & Sons*. 648 páginas.
- Heinrich, M., Appendino, G., Efferth, T., Fürst, R., Izzo, A. A., Kayser, O., Pezzuto, J. M. (2020). Best practice in research – Overcoming common challenges in phytopharmacological research. *Journal of Ethnopharmacology*, 246, 112230.
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. & Graham Cooks, R. (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(4), 430-443.
- Isidorov, A., Stocki, M. & Vetchnikova, L. (2019). Inheritance of specific secondary volatile metabolites in buds of white birch *Betula pendula* and *Betula pubescens* hybrids. *Trees*, 33(5), 1329–1344.

- Jaramillo-Colorado, L., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. E., Wagner-Döbler, I. & Kunze, B. (2012). Anti-quorum sensing activity of essential oils from Colombian plants. *Natural Product Research*, 26(12), 1075–1086.
- Jägermeyr, J., Müller, C., Ruane, A. C., Rosenzweig, C. (2021). Impactos climáticos en la agricultura global emergen antes en la nueva generación de modelos climáticos y de cultivos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(15), 4563–4572.
- Langenheim, J. H. (1994). Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, 20(6), 1223-1280.
- Lencina, Bonfa Moslaves, I. S., de Araujo Isaias Muller, J., Carvalho, R., Amianti, C., Bonfim, I., Alves, F. M., Carollo, C. A., Candeloro, L., Alves dos Santos Júnior, A., Brentan da Silva, D. & Toffoli Kadri, M. C. (2021). *Lantana canescens* (Kunth) inhibits inflammatory and hyperalgesic responses in murine models. *Journal of Ethnopharmacology*, 280, 114461.
- Lin, L., Mukhopadhyay, S., Robbins, R., and Harnly, J. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *J. Food Compos. Anal.*, 2007, 20, 361–369.
- Liu, Y., Wang, H. & Cai, X. (2015). Optimization of the extraction of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi using the response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (4), 2336–2343.
- Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature*, 446 (7133), 279-283.
- Martínez, J. A., Stashenko, E. E., Sáez, R. T., Zafra, G., & Ortiz, C. (2023). Effect of essential oil from *Lippia organoides* on the transcriptional expression of genes related to quorum sensing, biofilm formation, and virulence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 12(5), 845.

MassBank. Disponible en: www.massbank.eu/MassBank/. Fechas de consulta: enero de 2024 a diciembre de 2024.

Mazid, M., Khan, T. A. & Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2), 232-249.

McKinnon, G. E., Smith, J. J., & Potts, B. M. (2010). Recurrent nuclear DNA introgression accompanies chloroplast DNA exchange between two eucalypt species. *Molecular Ecology*, 19(7), 1367–1380.

McNair, Miller, J. M., Settle, F. A. & McNair. (2011). Basic concepts and terms. In *Basic Gas Chromatography*. Wiley.

Mejía Medina, J. J. (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 [Tesis doctoral, Universidad Industrial de Santander].

Mittermeier, R. A., Robles Gil, P., & Mittermeier, C. G. (1997). *Megadiversity: Earth's Biologically Wealthiest Nations*. CEMEX.

The NIST mass spectral search program (2.3). (2017). Standard reference data program of the National Institute of Standards and Technology.

Moore, B. S. (2005). Biosynthesis of marine natural products: microorganisms (Part A). *Natural Product Reports*, 22(5), 580-593.

Munir, A. A. (1993). A taxonomic revision of the genus *Premna* L. (Verbenaceae) in Australia. *Journal of the Adelaide Botanic Gardens*, 15(2), 129-145.

- Nahrung, Waugh, R., & Andrew Hayes, R. (2009). *Corymbia* species and hybrids: chemical and physical foliar attributes and implications for herbivory. *Journal of Chemical Ecology*, 35(9), 1043–1053.
- Panche, A. N., Diwan, A. D. & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, 1-20
- Pandey, G., Madhuri, S., & Sundar, S. (2012). Medicinal plants for treatment of cancer: A brief review. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 120–128.
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., & Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3), 201-214.
- Pavela, R. (2016). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174-187.
- Peralta-Bohórquez, M. E., Quijano-Célis, C. E., Gaviria, M., Vanegas-López, C., & Pino, J. A. (2011). Essential oil from leaves of *Lantana canescens* and *L. lopez-palacii* grown in Colombia. *Natural Product Communications*, 6(2), 247–249
- Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 237-243.
- Picinelli, A., Dapena, E., & Mangas, J. J. (1995). Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance: A preliminary study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2273–2278.
- Pino, J., Quijano-Celis, C. E., & Peralta-Bohórquez, A. F. (2011). Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Lantana canescens* Kunth. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 14(1), 30–37.

- Quintero Ruiz, N., Cordoba Campo, Y., Stashenko, E. E. & Fuentes, J. L. (2017). Antigenotoxic effect against ultraviolet radiation-induced DNA damage of the essential oils from *Lippia* species. *Photochemistry and Photobiology*, 93(4), 1063-1072.
- Rieseberg, L. H. (1997). Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28(1), 359-389.
- Rieseberg, L. H., & Willis, J. H. (2007). Plant speciation. *Science*, 317(5840), 910-914.
- Rieseberg, L. H., Raymond, O., Rosenthal, D. M., Lai, Z., Livingstone, K., Nakazato, T., Durphy, J. L., Schwarzbach, A. E., Donovan, L. A., & Lexer, C. (2003). Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*, 301(5637), 1211-1216.
- Rossato, M. F. (2014). Eriodictyol as a TRPV1 receptor antagonist with antioxidant activity [Tesis de Maestría, Universidade Federal de Santa Maria]. Repositorio institucional UFSM.
- Sánchez, G. C., Benavides, A. M. H. & Martínez, J. M. A. (2016). Aceite esencial de *Lippia origanoides* como posible producto biorracional en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). *Vitae*, 23(1), S526–S530.
- Sanders, R. W. (2006). Taxonomy of *Lantana* sect. *Lantana* (Verbenaceae): I. correct application of *Lantana camara* and associated names. *Sida, Contributions to Botany*, 385-421.
- Sanders, R. W., Harley, R. M., & Govaerts, R. (2012). Taxonomy of *Lantana* sect. *Lantana* (Verbenaceae): II. Taxonomic revision. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 6(2), 403–441.
- Santos, G. et al. (2012). Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 465-473.

- Santos, P. A., *et al.* (2018). Composition and bioactivity of essential oils of *Lippia alba* chemotypes in Brazil. *Phytochemistry Reviews*, 17(4), 1-12.
- Seehausen, O. (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(4), 198-207.
- Selvaraj, Prasad, M. B. N. V. & Venkateshwarlu, G. (2002). Profiles of essential oils of peel and leaf of a new citrus hybrid, *Citrus latifolia* Tanaka x *Citrus aurantifolia* Swingle. *The Journal of Essential Oil Research*, 14(5), 369–371.
- Sena Filho, Xavier, H. S., Barbosa Filho, J. M., & Durringer, J. M. (2010). A chemical marker proposal for the *Lantana* genus: Composition of the essential oils from the leaves of *Lantana radula* and *L. canescens*. *Natural Product Communications*, 5(4), 635–640.
- Sharma, O. P., Makkar, H. P., & Dawra, R. K. (1988). A review of the toxicity of *Lantana camara* (Lantana) in animals. *Clinical Toxicology*, 26(5-6), 371-391.
- Sharma, O. P., Sharma, S., Pattabhi, V., Mahato, S. B. & Sharma, P. D. (2007). A review of the hepatotoxic plant *Lantana camara*. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(4), 313-352.
- Silva Morales, A. (2024). Hibridación inter-específica, intra-específica e inter-genérica, de plantas *Lippia origanoides* Kunth, *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton y P. Wilson y *Lantana canescens* Kunth bajo condiciones controladas
- Silva-Trujillo, L. S., Quintero-Rueda, E. P., Stashenko, E. E., Conde-Ocazonez, S. M., Rondón-Villarreal, P., & Ocazonez, R. E. (2022). Essential oils from Colombian plants: Antiviral potential against dengue virus based on chemical composition, in vitro and in silico analyses. *Molecules*, 27(20), 6844.

- Soares, B. V., & Tavares-Dias, M. (2013). Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia*, 3(1), 109–123.
- Soares, Cardoso, A. C. F., Campos, R. R., Gonçalves, B. B., Santos, G. G., Chaves, F. C. M., Chagas, E. C., & Tavares-Dias, M. (2017). Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae)
- Souza, R. G., Pereira, P. A. P., Queiroz, J., & Borges, L. (2018). Health benefits of eriodictyol: A review on its anti-inflammatory and antioxidant effects. *Nutritional Reviews*, 76(10), 725–732.
- Stanišić, M. J. (2019). Potencial alelopático de los metabolitos secundarios de raíces pilosas de manzana: el efecto de floretina y floridzina en cultivo in vitro [Tesis doctoral, Universidad de Belgrado]. Repositorio Institucional de la Universidad de Belgrado.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 93–103.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., & Marín, C. A. (2010). Composición química y quimiotipos de *Lippia origanoides* en Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(3), 245–250.
- Trevisan, M. T. S., Bezerra, M. Z. B., Almeida, F. R. R., Silva, M. H. L., Lima, M. A. A., & Santiago, G. M. P. (2016). Variabilidad en aceites esenciales de *Lippia origanoides* en Brasil. *Natural Products Research*, 30(12), 1402–1409
- Vicuña Giraldo, J. A., Stashenko, E. E., & Fuentes Lorenzo, J. L. (2009). Efecto antígeno tóxico de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K., del timol y del carvacrol contra

el daño en el ADN inducido por bleomicina en el SOS Chromotest UIS. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 38(2), 252–267.

Viljoen, A. M., Subramoney, S., Van Vuuren, S. F., Baser, K. H. C., & Demirci, B. (2005). The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 271-277.

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2-20.

Wishart, D., Knox, C., Guo, A. C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D. D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S., Mandal, R., Sinelnikov, I., Xia, J., Jia, L., Cruz, J. A., Lim, E., Sobsey, C. A., Shrivastava, S., Huang, P., Forsythe, I. (2009). The human metabolome database. *Nucleic Acids Res.* <https://hmdb.ca/>.

Wink, M. (2010). Introduction: Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. En M. Wink (Ed.), *Annual plant reviews volume 40: Biochemistry of plant secondary metabolites*. Oxford, Reino Unido: Wiley-Blackwell.

World Flora Online (2023)a: *Lantana* L. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000020568>.

World Flora Online (2023)b: *Lippia* L. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000021924>.

World Flora Online (2023)c: *Verbenaceae* J.St.-Hil. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-7000000635>.

Zhou, S. (2003). Quantitation of lipid classes by thin-layer chromatography with flame ionization detection. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 7(1).