

Estudio de la composición química y evaluación de la capacidad fotoprotectora *in vitro* contra la radiación UVA y UVB de extractos de algunas plantas medicinales cultivadas en Colombia

Sheylla Tatiana REYES ATUESTA

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar el título de Magister en Química

Directora:

Elena E. STASHENKO

Codirector:

Jairo René MARTÍNEZ MORALES

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Maestría en Química

Bucaramanga, Colombia

2023

### **Dedicatoria**

A mi madre Luz Mary, a mi padre Waldir, a mi hermano Harvey y a mi pareja Julián por el apoyo constante y por su amor.

### **Agradecimientos**

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

A mis compañeros y amigos de laboratorio Félix Muñoz, Johana Rosero, Juan Camilo Henríquez y Silvia Muñoz por su amistad y su ayuda.

A mis coordinadores Rogerio Saavedra y Lady Sierra por su orientación en el desarrollo del trabajo de investigación.

A la Universidad Industrial de Santander, la escuela de Química.

Agradezco el apoyo financiero del 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.

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

**Tabla de contenido**

	Pág.
Introducción .....	18
1. Marco referencial .....	20
1.1 Plantas bajo estudio.....	20
1.1.1 <i>Achyrocline saturejoides</i> .....	20
1.1.2 <i>Achyrocline bogotensis</i> .....	22
1.1.3 <i>Lantana colombiana</i> .....	24
1.2 Radiación ultravioleta y las plantas .....	25
1.3 Fotoprotección .....	27
1.3.1 Agentes de fotoprotección-mecanismos de acción .....	27
1.3.2 Metabolitos secundarios de las plantas con la actividad fotoprotectora .....	28
1.4. Antioxidantes .....	30
1.4.1 Agentes antioxidantes-mecanismo de acción .....	30
1.4.2 Metabolitos secundarios de las plantas con actividad antioxidante.....	31
1.5. Determinación de la capacidad antioxidante y fotoprotectora de extractos naturales .....	32
1.5.1 Métodos para evaluar la capacidad fotoprotectora <i>in vitro</i> .....	32
1.5.2 Métodos para evaluar la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .....	36
2. Objetivos .....	38
2.1 Objetivo general.....	38

3. Materiales y métodos .....	38
3.1 Reactivos.....	38
3.2 Material vegetal .....	39
3.2.1 Recolección e identificación botánica .....	39
3.3 Obtención de extractos.....	39
3.3.1 Extracción con solvente asistida con ultrasonido .....	39
3.3.2 Diseño de experimentos.....	40
3.4 Análisis instrumental .....	41
3.4.1 Determinación de figuras de mérito para el método LC/MS.....	41
3.4.2 Análisis por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS.....	44
3.5 Actividad fotoprotectora.....	46
3.5.1 Determinación del factor de protección <i>in vitro</i> .....	46
3.5.2 Determinación de la longitud de onda crítica .....	47
3.5.3 Relación de absorbancia UVA1/UV según los criterios de clasificación establecidos en la resolución propuesta por la FDA .....	48
3.5.4 Ensayos de fotoestabilidad de los extractos.....	48
3.6 Actividad antioxidante .....	49
3.6.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS <sup>+</sup> .....	49
3.6.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo <i>on-line</i> HPLC-DAD-ABTS <sup>+</sup> .....	50
4. Resultados y discusión.....	51
4.1 Identificación botánica.....	51
4.2 Diseños experimentales .....	52

4.2.1 Efecto del porcentaje de etanol .....	55
4.2.2 Efecto de la temperatura .....	57
4.2.3 Efecto del tiempo .....	58
4.3 Análisis de composición química de los extractos aislados de las especies vegetales bajo estudio .....	59
4.3.1 Figuras analíticas de mérito del análisis por UHPLC-ESI- <i>Orbitrap</i> -MS .....	59
4.3.2 Identificación y cuantificación por UHPLC-ESI- <i>Orbitrap</i> -MS de compuestos fenólicos presentes en los extractos hidroalcohólicos de <i>A. saturejoides</i> , <i>A. bogotensis</i> y <i>L. colombiana</i> ..	63
4.4 Actividad biológica de los extractos hidroalcohólicos de las especies bajo estudio .....	79
4.4.1 Evaluación de la capacidad fotoprotectora .....	79
4.4.2 Capacidad antioxidante e identificación de compuestos antioxidantes en los extractos de las plantas bajo estudio .....	83
4.4.3 Efecto de la radiación UVA en los extractos de las plantas bajo estudio. ....	90
5. Conclusiones .....	93
6. Información de financiamiento .....	95
7. Divulgación de resultados .....	96
Referencias bibliográficas .....	98
Apéndices .....	120

**Lista de figuras**

**Figura 1** Arbusto de *Achyrocline saturejoides* (Lam.) DC. (familia Asteraceae). Fotografía tomada por el químico Cristian Oliveros el día 13 de diciembre de 2019, en Betulia, Santander. .... 21

**Figura 2** Relación de publicaciones de *A. saturejoides*, según el área de estudio. Fecha de búsqueda: 18 de enero de 2023. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 1973-2023. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“*Achyrocline saturejoides*”)..... 22

**Figura 3** Arbusto de *Achyrocline bogotensis* (Kunth. DC.), (familia Asteraceae). Fotografía tomada por el químico Cristian Oliveros el día 8 de noviembre de 2020, en Concepción, Santander. .... 23

**Figura 4** Arbusto con flores de *Lantana colombiana* López-Pal, (familia Verbenaceae). Fotografía tomada por el químico Cristian Oliveros el día 8 de noviembre del 2020, en Concepción, Santander..... 24

**Figura 5** Corrientes iónicas extraídas (EIC), de las moléculas protonadas y deprotonadas de las sustancias patrón, obtenidas por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS. Véase la identificación de los picos en la **Tabla 8**. .... 60

**Figura 6** Espectro de masas, obtenido por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS (Vcap: 3.5 kV, HCD: 20 eV), del ácido clorogénico presente en el extracto hidroalcohólico de *A. saturejoides*. ..... 64

**Figura 7** Estructura química base de los flavonoides. .... 67

**Figura 8** Fragmentos principales y característicos encontrados en los espectros de masas de los ácidos hidroxicinámicos de tipo éster detectados en los extractos obtenidos de *A. saturejoides* y *A. bogotensis*. .... 71

- Figura 9** Fragmentos principales y característicos encontrados en los espectros de masas de los flavonoles detectados en los extractos obtenidos de *A. saturejoides* y *A. bogotensis*. ..... 72
- Figura 10** Fragmentos principales y característicos encontrados en los espectros de masas de los flavonas detectadas en los extractos obtenidos de *A. saturejoides*, *A. bogotensis* y *L. colombiana*.  
..... 73
- Figura 11** Fragmentos principales y característicos encontrados en los espectros de masas de las flavanonas detectados en los extractos obtenidos de *A. saturejoides*, *A. bogotensis* y *L. colombiana*.  
..... 74
- Figura 12** Fragmentos principales y característicos encontrados en los espectros de masas de los feniletanoides glicosilados detectados en el extracto de *L. colombiana*..... 75
- Figura 13** Distribución por familia de compuestos, detectados por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS, en los extractos hidroalcohólicos de las plantas estudiadas..... 77
- Figura 14** Compuestos fenólicos que contienen en su estructura el grupo catecol..... 87
- Figura 15** Factor de protección solar obtenido en diferentes periodos de irradiación UVA para los extractos hidroalcohólicos de las plantas estudiadas. A. Extractos de *A. saturejoides*; B. Extractos de *A. bogotensis*; C. Extractos de *L. colombiana*. ..... 92
- Figura 16** Cambios en los espectros de absorción en la región UV (240-400 nm) de los extractos hidroalcohólicos de las plantas bajo estudio, en función del tiempo de irradiación. .... 93

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1</b> Estructuras químicas de derivados de mono- y dihidroxi- ácido cinámico y flavonoides glucosiladas junto con sus propiedades espectrales UV.....	30
<b>Tabla 2</b> Protocolos para determinar el factor de protección solar <i>in vitro</i> .....	35
<b>Tabla 3</b> Métodos de evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	37
<b>Tabla 4</b> Factores estudiados para la extracción de compuestos fenólicos en las plantas bajo estudio.....	41
<b>Tabla 5</b> Valores de las constantes usadas para el cálculo del factor de protección solar <i>in vitro</i> .....	47
<b>Tabla 6</b> Identificación taxonómica de las especies estudiadas.....	52
<b>Tabla 7</b> Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables de respuesta: rendimiento de extracción, potencial antioxidante y potencial fotoprotector.....	54
<b>Tabla 8</b> Repetibilidad de tiempos de retención ( $t_R$ ) y de áreas cromatográficas de sustancias patrón de compuestos fenólicos, analizados por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS.....	61
<b>Tabla 9</b> Linealidad y sensibilidad determinadas para las sustancias patrón de compuestos fenólicos analizadas por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS.....	62
<b>Tabla 10</b> Actividad antioxidante medida por el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS <sup>+</sup> de los extractos hidroalcohólicos estudiados.....	84
<b>Tabla 11</b> Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos que aportaron a la actividad antioxidante de los extractos <i>A. saturejoides</i> , <i>A. bogotensis</i> y <i>L. colombiana</i> .....	89
<b>Tabla 12</b> Coeficientes de absortividad de los extractos hidroalcohólicos de <i>A. saturejoides</i> , <i>A. bogotensis</i> y <i>L. colombiana</i> .....	91

### Lista de apéndices

<b>Apéndice A.</b> Resultados de los diseños experimentales (diseño factorial $2^3$ ) para las plantas bajo estudio. ....	120
<b>Apéndice B.</b> Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para <i>A. saturejoides</i> .....	123
<b>Apéndice C.</b> Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para <i>A. bogotensis</i> .....	124
<b>Apéndice D.</b> Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para <i>L. colombiana</i> .....	126
<b>Apéndice E.</b> Gráficos de Pareto para evaluar los efectos de las variables: <b>A.</b> Temperatura; <b>B.</b> Tiempo de extracción y <b>C.</b> Porcentaje de etanol, sobre el rendimiento de extracción de las especies bajo estudio. ....	128
<b>Apéndice F.</b> Gráficos de Pareto para evaluar los efectos de las variables: <b>A.</b> Temperatura; <b>B.</b> Tiempo de extracción y <b>C.</b> Porcentaje de etanol, sobre el potencial fotoprotector de las especies bajo estudio. ....	129
<b>Apéndice G.</b> Gráficos de Pareto para evaluar los efectos de las variables: <b>A.</b> Temperatura; <b>B.</b> Tiempo de extracción y <b>C.</b> Porcentaje de etanol, sobre el potencial antioxidante de las especies bajo estudio. ....	130
<b>Apéndice H.</b> Identificación y cuantificación realizada por UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS de los compuestos fenólicos detectados en extractos hidroalcohólicos de las especies de investigación del género <i>Achyrocline</i> . ....	131
<b>Apéndice I.</b> Espectros de masas [ESI <sup>±</sup> -HRMS] de los compuestos fenólicos identificados en los extractos hidroalcohólicos de <i>A. saturejoides</i> y <i>A. bogotensis</i> . ....	135

<b>Apéndice J.</b> Identificación y cuantificación realizada por UHPLC-ESI- <i>Orbitrap</i> -HRMS de los compuestos fenólicos detectados en el extracto hidroalcohólico de <i>L. colombiana</i> .....	140
<b>Apéndice K.</b> Espectros de masas [ESI <sup>+/-</sup> -HRMS] de los compuestos fenólicos identificados en el extracto de <i>L. colombiana</i> .....	143
<b>Apéndice L.</b> Resultados de los parámetros de fotoprotección de los diseños experimentales (diseño factorial 2 <sup>3</sup> ) para las plantas bajo estudio. ....	149
<b>Apéndice M.</b> Perfil cromatográfico del extracto de <i>A. saturejoides</i> obtenido por HPLC con derivatizador. ....	150
<b>Apéndice N.</b> Perfil cromatográfico del extracto de <i>A. bogotensis</i> obtenido por HPLC con derivatizador. ....	152
<b>Apéndice O.</b> Perfil cromatográfico del extracto de <i>L. colombiana</i> obtenido por HPLC con derivatizador. ....	154

**Siglas, abreviaturas y acrónimos**

AAPH	<i>2,2'-Azobisisobutyramidinium dihydro chloride</i> [Cloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)].
<i>A. bogotensis</i>	<i>Achyrocline bogotensis</i> (“cenizo”).
ABTS <sup>+</sup>	<i>2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid</i> [Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico)].
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de varianza).
ARN	Ácido ribonucleico.
AS/NZS	<i>Australia Standard/ New Zealand Standard</i> (Estándar australiano/ estándar de Nueva Zelanda).
<i>A. saturojoides</i>	<i>Achyrocline saturojoides</i> (“marcela”).
AT	<i>Agilent Technologies</i> .
BHT	Butilhidroxitolueno.
<i>ca.</i>	<i>Circa</i> (Aproximadamente).
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas.
CIG	Concentración inhibitoria significativa.
col.	Colaboradores
COLIPA	<i>European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association</i> (Asociación Europea de Cosméticos, Productos de Tocador y Perfumería).

CPD	<i>Cyclobutane Pyrimidine Dimer</i> (Dímeros de pirimidina ciclobutano).
DAD	<i>Diode-Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos).
$d_f$	Espesor de la fase estacionaria.
DIN	<i>Deutsches Institut für Normung</i> (Instituto alemán para la normalización).
DPPH	2,2-Difenil-1-picrihidracio.
EAU	<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> (Extracción asistida por ultrasonido).
EIC	<i>Extracted ion current</i> (Corriente iónica extraída).
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización).
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> (por ejemplo).
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (y otros).
eV	Electrón-voltio.
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de alimentos y medicamentos).
FP-UVA	<i>Ultraviolet A Protection Factor</i> (Factor de protección de UVA).
FRAP	<i>Ferric Reducing Ability of Plasma</i> (Capacidad de reducción del hierro).
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i> (Transferencia de un átomo de hidrogeno).
HCD	<i>Higher-Energy Collision Dissociation Cell</i> (Celda de disociación de alta energía).
HESI-II	<i>Heated Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización termostataada).
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).

HRMS	<i>High-Resolution Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas de alta resolución).
d.i.	Diámetro interno ( $\mu\text{m}$ ).
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organización Internacional de Normalización).
ISTD	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno).
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (Es decir).
<i>L. colombiana</i>	<i>Lantana colombiana</i> .
L	Longitud de la columna cromatográfica (m o cm).
LC/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección).
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Límite de cuantificación).
MED	<i>Minimal Erythematous Dose</i> (Dosis mínima de eritema).
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometría de masas).
m s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar.
MWD	<i>Multiple Wave Detector</i> (Detector de onda múltiple).
<i>m/z</i>	Relación masa-carga.
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i> (Reparación por escisión de nucleótidos).
NI	Compuestos no identificado
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radical de oxígeno).
PDS	Peroxodisulfato de potasio.
PPD	<i>Persistent Pigment Darkening</i> (Oscurecimiento persistente del pigmento).

RDA	Reacción de retro Diels-Alder.
Ref.	Referencias
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies reactivas de oxígeno).
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (Especies reactivas de nitrógeno).
SET	<i>Single Electron Transfer</i> (Tranferencia de un electrón).
SPF	<i>Sun Protection Factor</i> (Factor de protección solar).
TIC	<i>Total ion current</i>
$t_R$	Tiempo de retención.
TRAP	<i>Total Reactive Antioxidant Potential Assay</i> (Potencial de captación de radicales totales).
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de titanio.
UHPLC	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia).
UV	Ultravioleta.
UVA	Ultravioleta A, (320-400 nm).
UVB	Ultravioleta B, (280-320 nm).
UVC	Ultravioleta C, (100-280 nm).
UIS	Universidad Industrial de Santander.
ZnO	Óxido de zinc.

## Resumen

**Título:** Estudio de la composición química y evaluación de la capacidad fotoprotectora *in vitro* contra la radiación UVA y UVB de extractos de algunas plantas medicinales cultivadas en Colombia\*.

**Autora:** Sheylla Tatiana Reyes Atuesta \*\*

**Palabras clave:** *Achyrocline saturejoides*, *Achyrocline bogotensis*, *Lantana colombiana*, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, actividad fotoprotectora.

### Descripción:

Las sustancias naturales pueden utilizarse como ingredientes para mejorar las propiedades de productos de protección solar, ya que algunos compuestos fenólicos juegan un papel importante como fotoprotectores. En este trabajo de investigación se estudiaron extractos hidroalcohólicos obtenidos de las especies *Achyrocline saturejoides*, *A. bogotensis* y *Lantana colombiana*, que son plantas nativas de América del Sur. En la medicina tradicional se han utilizado para el tratamiento de enfermedades de la piel y otras dolencias.

Los extractos hidroalcohólicos se analizaron por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS. El potencial fotoprotector se evaluó según los siguientes parámetros: el factor de protección solar por el método de Mansur (SPF *in vitro*), la relación UVA1/UV y la estimación de la longitud de onda crítica ( $\lambda_c$ ). La actividad antioxidante se determinó por el método de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup> y por el método *on-line* HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup>. Se evaluó la fotoestabilidad de los extractos frente a la radiación UVA ( $\lambda = 365$  nm, 40 mW/cm<sup>2</sup>).

En los extractos hidroalcohólicos se identificaron 38 compuestos diferentes entre lo que figuraron ácidos hidroxicinámicos, ésteres de ácido cafeico, flavonoles, flavonas, flavanonas, fenilpropanoides e isoflavonas. En la prueba *on-line* HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup>, se observó que la capacidad antioxidante total de los extractos estudiados se debió en gran parte a la presencia de ésteres de ácido cafeico y flavonoles, como la quercetina y algunos derivados glicosilados. De acuerdo con los resultados de los parámetros de protección, todos los extractos podrían utilizar en productos de protección solar; los extractos de las plantas del género *Achyrocline* se consideraron como agentes de protección media y, los extractos de *A. saturejoides* y *L. colombiana* como sustancias de amplio espectro ( $\lambda_c \geq 370$  nm). Los extractos de *A. bogotensis* y *A. saturejoides* fueron estables a la radiación UVA, ya que después de 2 h de irradiación conservaron el 90 % de su capacidad antioxidante.

\*Trabajo de investigación

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

### Abstract

**Title:** Chemical composition and evaluation *in vitro* of the photoprotective capacity againsts UVA and UVB radiation of extracts obtained from some medicinal plants cultivated in Colombia.

**Author:** Sheylla Tatiana Reyes Atuesta\*\*

**Key Words:** *Achyrocline saturejoides*, *Achyrocline bogotensis*, *Lantana colombiana*, phenolic compounds, antioxidants, photoprotective activity.

### Description:

There is a growing interest in the search for natural sources that can be used as ingredients to improve the properties of sun protection products because some phenolic compounds present in plants play an important role as photoprotectors. In this work, we studied hydroalcoholic extracts obtained from the species *Achyrocline saturejoides*, *A. bogotensis* and *Lantana colombiana*, which are native plants of South America and have been used in traditional medicine for the treatment of skin diseases and other diseases.

The hydroalcoholic extracts were analyzed by UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-HRMS. The photoprotective potential was evaluated according to the following parameters: the sun protection factor by the Mansur method ( $SPF_{in vitro}$ ), the ratio UVA1/UV and the estimation of the critical wavelength ( $\lambda_c$ ). The antioxidant activity was determined by the ABTS<sup>+</sup> assay and the *on-line* HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup> method. The photostability of the extracts against UVA radiation ( $\lambda = 365$  nm, 40 mW/cm<sup>2</sup>) was evaluated.

In the hydroalcoholic extracts, 38 different compounds were identified, including hydroxycinnamic acids, caffeic acid esters, flavonols, flavones, flavanones, phenylpropanoids, and isoflavones. In the *on-line* HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup> method, it was shown that the total antioxidant capacity of the extracts studied was largely due to the presence of caffeic acid esters and flavonols, such as quercetin and some glycosylated derivatives. According to the results of the protection parameters, all the extracts could be used in sun protection products; extracts from plants of the genus *Achyrocline* are considered medium protection agents, and extracts from *A. saturejoides* and *L. colombiana* as broad-spectrum substances ( $\lambda_c \geq 370$  nm). The extracts of *A. bogotensis* and *A. saturejoides* were stable to UVA radiation, since after 2 h of irradiation they retained 90 % of their antioxidant capacity.

\* Graduation Project

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

## Introducción

Las radiaciones con que interactúan los sistemas biológicos tienen distintos orígenes; pueden proceder de radiaciones electromagnéticas resultantes de la energía emitida por el sol (Monteith, 1972) o de fuentes artificiales como lámparas de luz blanca, luces monocromáticas (Hillenkamp, 1980) y de luz ultravioleta (Caldwell *et al.*, 2007). La radiación ultravioleta (UV) hace parte del espectro electromagnético solar y puede dividirse en tres regiones: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) y UVC (100-280 nm) (Modenese *et al.*, 2018). Las radiaciones UVA y UVB son importantes en diferentes procesos biológicos; sin embargo, la sobreexposición a este rango de energía electromagnética genera alteraciones fotoquímicas implicadas en el envejecimiento celular y en otros efectos más nocivos como la inducción de cáncer (Thomas *et al.*, 1983).

Para prevenir y minimizar el daño efectuado por la radiación UV en la piel, se han desarrollado protectores solares compuestos por sustancias orgánicas e inorgánicas, que pueden absorber o reflejar un amplio espectro del rango UV. No obstante, se sigue en la constante búsqueda de compuestos para el desarrollo de cosméticos hipoalergénicos y que puedan ser compatibles con la piel (Mota *et al.*, 2020). Existe un interés creciente en la incorporación de productos naturales que mejoren las propiedades de los protectores solares, y que posean otros efectos benéficos a largo plazo, no sólo en la prevención de la penetración de la radiación nociva, sino en la reducción del estrés oxidativo y los efectos dañinos causados en el ADN (Saewan *et al.*, 2015).

Las plantas son fuentes de una gran diversidad de moléculas naturales útiles en la fotoprotección que pueden actuar al mismo tiempo como antioxidantes (Dimitrios, 2006). Muchos

compuestos fenólicos extraídos de plantas, tales como flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides y alcaloides, tienen potencial fotoprotector (Cefali *et al.*, 2016) y antioxidante similar al de las vitaminas E y C (Vinson *et al.*, 1995). Estos compuestos tienen grupos fenólicos, que pueden estabilizar radicales libres, ya sea por la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o por su capacidad de transferir electrones a una especie radical (SET) (Pisoschi *et al.*, 2016). Adicionalmente, algunos estudios han demostrado que los polifenoles tienen otras actividades biológicas como antimicrobiana (Ríos *et al.* 2005), antibacteriana (Sharma *et al.*, 2017) y antiinflamatoria (Maione *et al.*, 2016).

La presente investigación se efectuó en el Centro de Investigación CENIVAM, en el marco del Programa Bio-Reto XXI 15:50 “Desarrollo de bio-productos para los sectores salud, agropecuario y cosmético, como resultado del estudio de la biodiversidad colombiana”. El foco principal del presente trabajo fue contribuir en la búsqueda de ingredientes naturales, biológicamente activos que puedan ser utilizados en el sector cosmético como protectores solares y antioxidantes naturales. El objetivo del trabajo de investigación fue aportar información sobre la composición química y determinar los potenciales fotoprotector y antioxidante de extractos vegetales obtenidos de tres especies cultivadas y recolectadas en el departamento de Santander, las cuales fueron: *Achyrocline saturejoides* (“marcela”), *A. bogotensis* (“cenizo”) y *Lantana colombiana* (“cariquito”). En ciertas regiones del país estas plantas se utilizan en infusiones y decocciones para el tratamiento de enfermedades de la piel y para aliviar procesos inflamatorios (Fonnegra-Gómez *et al.*, 2011; Ghisalberti, 2000).

Con esta investigación se logró identificar y cuantificar algunos de los compuestos fenólicos presentes en los extractos y determinar las sustancias responsables de la capacidad antioxidante. Entre los hallazgos más importantes de este trabajo figura, por primera vez obtenida

la información sobre la composición química del extracto hidroalcohólico de *L. colombiana* y la identificación de nuevos compuestos en los extractos de *A. saturejoides* y *A. bogotensis*, que no se han reportado, hasta la fecha, en la literatura científica. Los extractos de estas plantas podrían usarse como fuentes de sustancias con propiedades fotoprotectoras y antioxidantes, y pueden ser de interés para el sector cosmético.

## 1. Marco referencial

### 1.1 Plantas bajo estudio

#### 1.1.1 *Achyrocline saturejoides*

La especie *A. saturejoides* (familia Asteraceae), conocida en Colombia, por su nombre común como “marcela” o “vira-vira”, es una hierba de *ca.* 2 m de altura, ramificada, con hojas lineales de hasta 5 cm de largo, que están cubiertas de un tejido aracnoideo lanoso. Sus flores son dimórficas, debido a la usencia de flores femeninas; tienen una coloración blanca-amarillenta, con lóbulos erectos y, con pelos glandulares sésiles y vesiculares (Deble, 2007). En ciertas regiones del país se utiliza en infusiones y decocciones para el tratamiento de enfermedades de la piel, para aliviar procesos inflamatorios y tratar dolores renales (Fonnegra-Gómez *et al.*, 2011).

Los extractos de esta planta se caracterizan por su alto contenido de polifenoles y flavonoides, en los que se incluyen compuestos de la familia de los ácidos hidroxicinámicos como el ácido cafeico, el ácido clorogénico, derivados de ácido ferúlico e isómeros de ácidos dicafeoilquínico, también, flavonoles como quercetina y derivados metilados como la 3-*O*-metilquercetina y el 3,7-dimetilquercetina (Broussalis *et al.*, 1988; de Souza *et al.*, 2002; Sagawa *et al.*, 2005; Retta *et al.*, 2012).

**Figura 1**

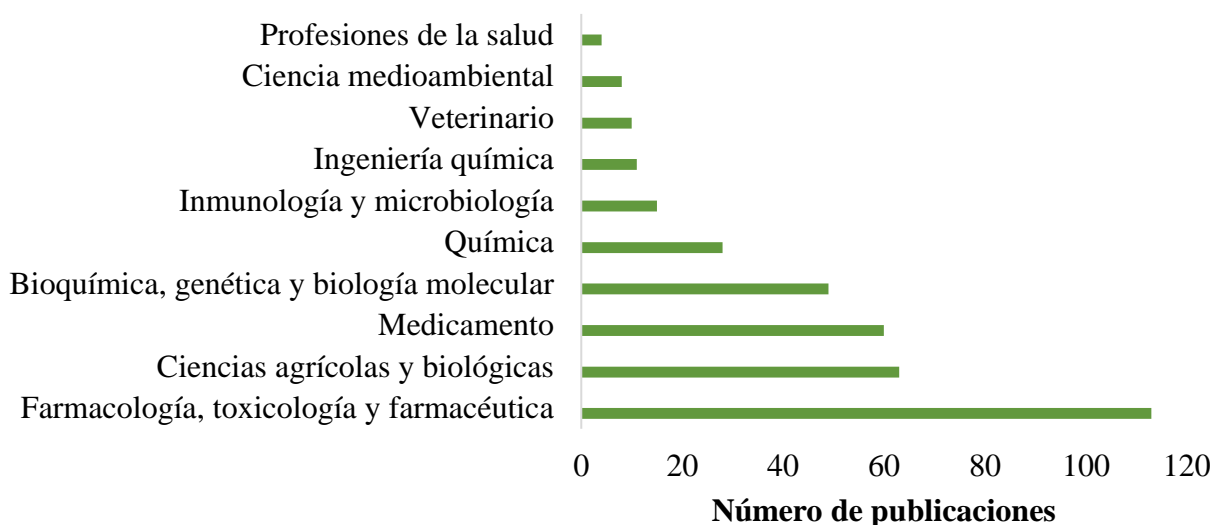
*Arbusto de Achyrocline saturejoides (Lam.) DC. (familia Asteraceae). Fotografía tomada por el químico Cristian Oliveros el día 13 de diciembre de 2019, en Betulia, Santander.*



Los estudios sobre *A. saturejoides* se han enfocado en la evaluación de las propiedades biológicas de sus componentes químicos para aplicaciones en farmacología, toxicología y farmacéutica (Véase **Figura 2**). Los resultados más comunes muestran que la planta presenta propiedades útiles en el tratamiento y prevención de la dermatitis alérgica de contacto (Machado *et al.*, 2020), también como cicatrizante (Balestrin *et al.*, 2021) y un posible tratamiento para el cáncer de tipo melanoma amelanótico (Doneda *et al.*, 2021). En la base de datos de la Comisión Europea de Ingredientes Cosméticos (CosIng, por sus siglas en inglés) los extractos obtenidos de flores y partes aéreas de esta planta se enlistan como ingredientes que aportan fragancia y acondicionan la piel para mantenerla saludable (Bravo *et al.*, 2020).

**Figura 2**

*Relación de publicaciones de A. saturejoides, según el área de estudio. Fecha de búsqueda: 18 de enero de 2023. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 1973-2023. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“Achyrocline saturejoides”).*



**1.1.2 Achyrocline bogotensis**

*Achyrocline bogotensis* (familia Asteraceae) conocida por su nombre común como “cenizo”, es una especie, nativa de Sur América y cultivada en Colombia. Es una hierba medicinal de ca. 1 m de altura. Sus hojas son lineales, de 5 cm de largo; la superficie adaxial de las hojas están cubiertas de un tejido aracnoideo lanoso. Crece en altitudes entre los 2800 y 3200 m s.n.m. La planta se usa en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades de la piel o para el tratamiento de la prostatitis (Paniagua-Zambrana *et al.*, 2020)

**Figura 3**

*Arbusto de Achyrocline bogotensis (Kunth. DC.), (familia Asteraceae). Fotografía tomada por el químico Cristian Oliveros el día 8 de noviembre de 2020, en Concepción, Santander.*



Hay pocos estudios sobre la composición química de los extractos obtenidos de esta planta; sin embargo, algunas de las investigaciones publicadas mencionan que la mayoría de los compuestos presentes en los extractos son flavonoides. Sagawa *et al.* (2005) aislaron de extractos metanólicos obtenidos de las partes aéreas de *A. bogotensis* cinco dímeros de ciclobutano, aquiródimeros y flavonas metiladas. Thomas *et al.* (2012) evaluaron los efectos citotóxicos de la flavona 3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona, aislada de hojas de *A. bogotensis*. Los investigadores observaron que la flavona indujo la muerte celular (>50 %) en células cancerígenas de humanos de colon (HCT116), páncreas (MIA PaCa) y de mama (SK-BR3).

### 1.1.3 *Lantana colombiana*

#### Figura 4

*Arbusto con flores de Lantana colombiana López-Pal, (familia Verbenaceae). Fotografía tomada por el químico Cristian Oliveros el día 8 de noviembre del 2020, en Concepción, Santander.*



*Lantana colombiana* (familia Verbenaceae) es una planta nativa de América del Sur, distribuida en Colombia, Ecuador y Bolivia, su nombre común es “cariquito” (Aymard, 2022). Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre la composición química y las actividades antioxidantes y fotoprotectora en la base de datos *Scopus (Elsevier)* el 18 de enero de 2023, usando la ecuación *TITLE-ABS-KEY* (“*Lantana y colombiana y chemical composition*”), (“*Lantana y colombiana y*

*antioxidants*) y (“*Lantana y colombiana* y *photoprotective activity*) y no se encontraron resultados basados en estas palabras clave. Sin embargo, el cirsiol ha sido encontrado en extractos hidroalcohólicos de *L. fucana*, que pertenece al mismo género *Lantana* (Julião *et al.*, 2009).

Se hallaron algunos estudios relacionados a la actividad antioxidante de *L. camara* y *L. montevidensis*, plantas del mismo género. Mahdi-Pour *et al.* (2012) investigaron la actividad antioxidante por el método de DPPH<sup>•</sup> de extractos metanólicos de varias partes de *L. camara*. Los resultados mostraron que los extractos obtenidos de la parte aérea de planta presentaron mayor potencial antioxidante, especialmente, en los extractos obtenidos a partir de las hojas; y lo correlacionaron con contenido alto de compuestos fenólicos totales. Barros *et al.* (2017) determinaron la actividad antioxidante por el método DPPH<sup>•</sup> de extractos hidroalcohólico (etanol) y acuoso de *L. montevidensis*, obtenidos de hojas. Según los valores que obtuvieron de IC<sub>50</sub>, la capacidad para eliminar el radical DPPH<sup>•</sup> del extracto acuoso fue dos veces mayor que la del extracto hidroalcohólico (108 µg/mL y 290,5 µg/mL, respectivamente).

## 1.2 Radiación ultravioleta y las plantas

La importancia de estudiar la radiación ultravioleta como factor ambiental influyente en los procesos biológicos de las plantas se basa en comprender los mecanismos que estos organismos desarrollan tanto de reparación como de adaptación, y conocer que sustancias intervienen en estos procesos (Bornman, 1989).

La absorción de los fotones UVB por el ADN desencadena la formación de dímeros de pirimidina-ciclobutano (CPDs) y, en menor proporción, la formación de fotoproductos (6-4). También se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden oxidar algunos componentes celulares, incluyendo al ADN, produciendo modificaciones genéticas. Estas modificaciones en el

ADN, aparte de ser mutagénicas, interrumpen el metabolismo celular (Nawkar *et al.*, 2013). La tolerancia que desarrollan las plantas a la exposición a los rayos UVB depende del equilibrio que exista entre las reacciones dañinas que se desencadenan y las respuestas de reparación y adaptación de las células.

Se han estudiado los procesos de reparación del ADN en plantas del género *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2000); estas investigaciones han proporcionado información acerca de algunos mecanismos asociados con los procesos de reparación, dentro de los cuales se encuentran: i) la foto-reactivación que se lleva a cabo por fotoliasas. Los CPDs y los fotoproductos (6-4), ambos inducidos por la irradiación UV, tienen estructuras de dímero de timina que se escinden directamente por la CPD liasa o la fitoliasa (6-4) (Pakker *et al.*, 2000); ii) la reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés), que se basa en reparar el sitio específico en las hebras del ADN, mediante el reconocimiento y la escisión de la región dañada, y se completa mediante la síntesis de ADN (Bray *et al.*, 2005) y iii) las respuestas moleculares al estrés genotóxico mediante la detección de daños en el ADN, el cual es un requisito esencial para minimizar los efectos nocivos de las genotoxinas sobre el crecimiento celular.

Como respuesta de adaptación, la radiación UVB induce la acumulación de metabolitos secundarios, que, a su vez, cumplen otras funciones fisiológicas. Las bajas dosis de radiación UV estimulan la vía general de biosíntesis de los fenilpropanoides, lo que resulta en la acumulación de flavonoides y ésteres. La acumulación de flavonoides se produce principalmente en la capa superior de células epidérmicas; menos del 10% de la radiación UVB incidente se transmite a través de la epidermis (Hutzler *et al.*, 1998). Los flavonoides también tienen la capacidad de capturar radicales libres, lo que podría dar una protección adicional a las células que acumulan estos compuestos (Burda *et al.*, 2001).

### 1.3 Fotoprotección

#### 1.3.1 Agentes de fotoprotección-mecanismos de acción

La fotoprotección mediada por bloqueadores solares se ocupa de la reducción de la transmisión de los rayos UV, específicamente, de los rayos UVB y UVA, sobre las capas de la piel. Según el mecanismo de acción, los agentes de fotoprotección pueden ser clasificados como filtros físicos o inorgánicos y filtros químicos u orgánicos (Latha *et al.*, 2013). Los filtros físicos son sustancias de origen mineral, que actúan como una barrera que refleja, dispersa y algunos casos absorbe la radiación UV. Dentro de este grupo de compuestos se destacan el dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) y el óxido de zinc (ZnO) (Villalobos-Hernández *et al.*, 2006). Sus propiedades de protección solar se pueden atribuir a varios factores como el tamaño de las partículas, el número de partículas (concentración), la forma cristalina, el índice de refracción, los medios de dispersión y las propiedades de los semiconductores; la combinación de absorción y dispersión conduce a una cobertura de “amplio espectro” (UVA y UVB) para los filtros solares inorgánicos (Dransfield, 2000). Las desventajas de estos filtros solares son su apariencia visual, debido a la consistencia sólida y los residuos blancos de pigmentación en la piel (Maier *et al.*, 2005).

El principio de fotoprotección en protectores solares orgánicos es la absorción de la radiación UV. En general, su estructura química consta de compuestos aromáticos y dos grupos funcionales que actúan como "dadores de electrones" o "aceptores de electrones"; las alteraciones en la estructura de una molécula conjugada por estos grupos funcionales pueden cambiar las características de absorbancia. Tras la irradiación UV, la molécula tiende a deslocalizar los electrones para alcanzar un estado de menor energía (Cockell *et al.*, 1999). Actualmente, los filtros orgánicos más utilizados incluyen avobenzona, oxibenzona, octocrileno, derivados de salicilatos (homosalato y etilhexilsalicilato) y derivados de cinnamatos (octil-metoxicinnamato [OMC])

(Osterwalder *et al.*, 2016). La eficiencia de las sustancias químicas como filtros se debe principalmente a las propiedades fisicoquímicas, *e.g.*, coeficiente de absorción y espectros de absorción, que, a su vez, se relacionan con la estructura química (Daly *et al.*, 2016).

### 1.3.2 Metabolitos secundarios de las plantas con la actividad fotoprotectora

Los compuestos fenólicos cumplen un rol muy importante en la interacción de las plantas con el ambiente; dentro de sus funciones figura la protección de las plantas contra el estrés biótico (*e.g.*; plagas microbianas, herbívoros) y el estrés abiótico (*e.g.*; contaminación del aire, metales pesados, radiación UVB) (Bourgaud *et al.*, 2001). Los fenilpropanoides y flavonoides usualmente se encuentran acumulados en las vacuolas centrales de células guardianas, células epidérmicas y células subepidérmicas de las hojas (Hutzler *et al.*, 1998). Se ha sugerido durante mucho tiempo que los flavonoides (**Tabla 1**) cumplen múltiples funciones en la fotoprotección y podrían filtrar las longitudes de onda solares más energéticas que llegan a las hojas (Agati *et al.*, 2010; Agati *et al.*, 2013).

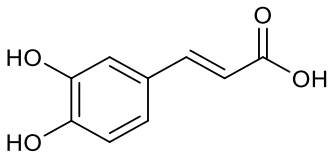
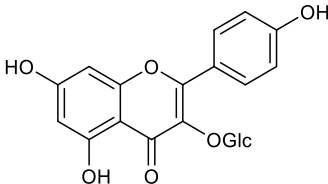
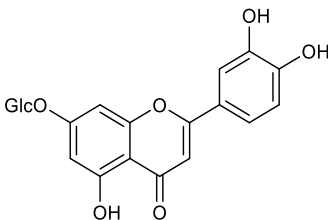
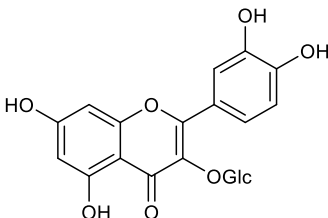
Algunos extractos extraídos de especies vegetales de diferentes géneros presentan en su composición química compuestos en común; por esta razón, se han realizado estudios complementarios sobre los efectos fotoprotectores de esas sustancias. Svobodová *et al.* (2003) realizaron estudios de extractos obtenidos de diferentes fuentes vegetales en la prevención del daño cutáneo inducido por rayos UV. Los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa* y *C. reflexum* mostraron una disminución de eritema cutáneo inducido por radiación UV-B, en humanos. Los extractos tenían en común la presencia de kaempferol, rutina, derivados de quercetina, ácido cinámico, ácido cafeico, ácido ferúlico y *p*-cumarina.

Las formulaciones que contienen un 40% de extractos hidroalcohólicos de propolio tienen un valor del factor de protección solar (SPF, por sus siglas en inglés) de 10 (Dos Reis *et al.*, 2009). Gregoris *et al.* (2011) reportaron los componentes químicos de los extractos etanólicos de propolio, entre ellos, identificaron tres ácidos (ácido cafeico, éster feniletílico del ácido cafeico y cafeato de 1,1-dimetilalilo) y tres flavonoides (kaempferol, quercetina y galanginina), que son conocidos por ser agentes antioxidantes efectivos y por tener una alta velocidad de absorción de la radiación UV. Los estudios sobre la capacidad fotoprotectora de *Euterpe oleracea* mostraron que los extractos previnieron la muerte celular de fibroblastos e incrementaron su producción, después de la radiación UV (Gordon *et al.*, 2012). Esos efectos se atribuyeron al alto contenido de compuestos fenólicos como cianidina 3-glucósido, cianidina 3-rutinósido, peonidina 3-rutinósido, peonidina 3-glucósido, cianidina 3-*O*-sambubiósido, quercetina, flavonoides de orientina y sus derivados, como también, proantocianidinas.

García Forero *et al.* (2019) estudiaron los efectos fotoprotector y antígenotóxico contra la radiación UV-B de los flavonoides apigenina, naringenina y pinocembrina. Los tres flavonoides absorbieron radiación UV; la apigenina y la pinocembrina fueron capaces de reducir los daños en el ADN, principalmente, en la formación de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD, por sus siglas en inglés), que generan mutaciones conocidas como huellas genéticas UV y desencadenan procesos inflamatorios, causando inmunosupresión y cáncer de piel.

**Tabla 1**

*Estructuras químicas de derivados de mono- y dihidroxi- ácido cinámico y flavonoides glucosiladas junto con sus propiedades espectrales UV.*

Metabolito	Estructura molecular	$\lambda_{\text{máx}}$ UVB/UVA ( $\pm 2$ nm)
Ácido cafeico		327
Kaempferol 3-O-glucósido		351
Luteolina 7-O-glucósido		348
Quercetina 3-O-glucósido		355

## 1.4. Antioxidantes

### 1.4.1 Agentes antioxidantes-mecanismo de acción

Una definición amplia sobre el término antioxidante fue dada por Halliwell y Gutteridge en 1995, quienes definieron que un antioxidante como una sustancia que, cuando está presente en baja concentración, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de un compuesto (Halliwell y

Gutteridge, 1995). Los antioxidantes se pueden clasificar, según su actividad, como (a) antioxidantes enzimáticos y (b) no enzimáticos (Soleimani *et al.*, 2018). Los antioxidantes enzimáticos funcionan descomponiendo y eliminando los radicales libres; las enzimas antioxidantes convierten los productos oxidativos peligrosos en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y luego en agua y oxígeno, a través de varios procesos en presencia de cofactores como cobre, zinc, manganeso y hierro. Algunos ejemplos de enzimas antioxidantes son la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-P<sub>x</sub>) y la superóxido dismutasa (SOD) (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

Los antioxidantes no enzimáticos pueden clasificarse en dos tipos: (a) antioxidantes naturales y (b) antioxidantes sintéticos. Algunos ejemplos de antioxidantes naturales son la vitamina C, la vitamina E, los polifenoles extraídos de plantas y los carotenoides, entre otros (Nimse *et al.*, 2015). Los antioxidantes no enzimáticos funcionan interrumpiendo uno de los pasos de la reacción en cadena para la formación de radicales libres que son: (a) iniciación; (b) propagación en cadena y (c) terminación a través de varios mecanismos químicos: (a) por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), (b) por transferencia de un solo electrón (SET) y (c) como agentes quelante de metales de transición (Santos-Sánchez *et al.*, 2019). La vitamina E, por ejemplo, funciona como un inhibidor de las etapas de iniciación y terminación durante la peroxidación lipídica en las membranas celulares y varias partículas lipídicas, incluidas lipoproteínas de baja densidad (LDL), estabilizando radicales peroxilo de lípidos ( $LOO\cdot$ ) (Witting *et al.*, 1997).

#### **1.4.2 Metabolitos secundarios de las plantas con actividad antioxidante**

Los metabolitos secundarios de las plantas con actividad antioxidante son clasificados como antioxidantes naturales. Se tratan de compuestos polifenoles que se encuentran en todos los

tejidos y órganos de la planta (Williams *et al.*, 2004) y pueden funcionar como: (a) agentes reductores, (b) estabilizadores de radicales libres, (c) como agentes quelantes de metales de transición pro-oxidantes y (d) como inhibidores de la formación de oxígeno singlete. Los antioxidantes naturales más comunes son los flavonoides (flavonoles, flavonas, flavanonas e isoflavonas), derivados del ácido cinámico, cumarinas y tocoferoles (Pratt, 1992).

La biosíntesis de antioxidantes naturales aumenta más en especies sensibles al estrés biótico que en especies que son tolerantes y que se adaptan fácilmente al medio en el que crecen. Las plantas que son sometidas a condiciones de estrés severo acumulan preferentemente flavonoides con grupos hidroxilo en el anillo B, que son eliminadores efectivos de especies reactivas de oxígeno (Rice-Evans *et al.*, 1996). Tattini *et al.* (2004) estudiaron la acumulación de varios polifenoles, particularmente, flavonoides e hidroxycinamatos, en hojas de *Ligustrum vulgare* expuestas a un incremento de luz solar en condiciones de estrés por sequía o con riego. Los investigadores observaron que la biosíntesis de quercetina 3-*O*-rutinósido, luteolina 7-*O*-glucósido y equinacósido aumentó en respuesta a la radiación solar.

## **1.5. Determinación de la capacidad antioxidante y fotoprotectora de extractos naturales**

### **1.5.1 Métodos para evaluar la capacidad fotoprotectora *in vitro***

Según la definición dada por la FDA, el factor de protección solar (SPF, por sus siglas en inglés) es una medida de cuánta energía solar (radiación UV) se requiere para producir eritema (quemadura solar) en la piel protegida (es decir, en presencia de un protector solar) en relación con la cantidad de energía solar necesaria para producir eritema en la piel desprotegida (Food and Drug Administration, 2023); este parámetro permite comparar directamente la protección que ofrecen los filtros solares. Existe un problema en usar solo el valor de SPF para describir la efectividad de

un protector solar, ya que este parámetro principalmente indica la efectividad contra la radiación UVB de un producto, pero no es un indicador significativo de protección contra la radiación UVA (Schalka *et al.*, 2011). Dado que se han demostrado los efectos nocivos de los rayos UVA (De Grujil, 2002), se han propuesto la determinación de otros índices dentro de los cuales se destacan los siguientes: i) el factor de protección UVA (FP-UVA), ii) relación UVA/UVB, y iii) longitud de onda crítica ( $\lambda_c$ ); algunos han sido incluidos en las guías de la ISO (*International Organization for Standardization*), COLIPA (*European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*) y FDA (*Food and Drug Administration* de los Estados Unidos) (Matts *et al.*, 2010).

Se han implementado métodos *in vivo*, oficialmente aceptados por las organizaciones FDA y COLIPA para evaluar la efectividad de la protección de los filtros solares (Diffey, 2003). Sin embargo, los métodos *in vivo* son laboriosos y controvertidos por razones éticas (Schalka *et al.*, 2011). Por lo tanto, se ha propuesto la utilización de métodos *in vitro*; por lo general, en estos métodos se mide la absorción o la transmisión de la radiación UV del producto de protección solar (Kaur *et al.*, 2010). Castanedo- Cázares *et al.* (2014), en un estudio sobre la valoración *in vitro* de protectores solares comerciales existentes en Latinoamérica, reportan un alto grado de correlación ( $r^2=0,94$ ) comparando los análisis de SPF *in vivo* y los resultados obtenidos con el método SPF *in vitro*, el cual entra en la clasificación de los métodos espectrofotométricos basados en la medida de transmisión. Pissavani *et al.* (2018), realizaron un estudio para validar los resultados obtenidos de los valores de SPF *in vitro* con los de SPF *in vivo* para productos comerciales; los resultados fueron comparados con los criterios de aceptación desarrollados por la norma internacional ISO TC217/WG7 “*Sun Protection Test Methods Working Group*”. Los datos obtenidos revelaron una correlación ( $r^2$ ) de 0,88 entre los valores de SPF *in vitro* y los SPF *in vivo*.

Hasta la fecha no se podría concluir con certeza de que existe un método *in vitro* ampliamente aceptado, ya que varios parámetros conocidos y desconocidos pueden afectar las medidas de transmisión de películas dispersas (sustratos de la prueba), como la composición multifacética de los protectores solares; también pueden haber limitaciones técnicas de los dispositivos de medición, así como la utilización de sustratos que puedan ser reproducibles a las características de la piel (Rohr *et al.*, 2010). Bendová *et al.* (2007) realizaron un estudio en conjunto con tres laboratorios independientes, para comparar los resultados de referencia de valores de SPF obtenidos por la implementación del método *in vivo* descrito por COLIPA, con los resultados de tres métodos para determinar el SPF *in vitro* basados en espectroscopía de transmisión difusa o mediciones de transmisión UV de sustratos transparentes a la radiación UV a los cuales se les aplicó una capa de un producto protector solar; los investigadores observaron una alta variabilidad de los resultados obtenidos aplicando los métodos *in vitro* y dedujeron que la principal razón correspondería a la selección del sustrato que simule la superficie de la piel humana y la aplicación homogénea del producto. En la [referencia](#) se encuentra un listado de algunos protocolos *in vitro* que se utilizan para realizar pruebas de capacidad fotoprotectora.

**Tabla 2**

*Protocolos para determinar el factor de protección solar in vitro.*

<b>Método</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ref.</b>
ISO-24443 (2012)	<p>Norma internacional que describe el procedimiento para determinar el factor de protección UVA en productos finales.</p> <p>En este método la muestra se esparce sobre un sustrato rugoso, y queda una película delgada del producto. Se mide la transmitancia UV antes y después de la exposición a una dosis controlada de radiación proveniente de una fuente UV definida.</p> <p>Los valores de transmitancia se ajustan matemáticamente, de tal manera que el valor de SPF <i>in vitro</i> se pueda comparar con el valor de SPF <i>in vivo</i>.</p>	Stiefel <i>et al.</i> (2015)
Relación UVA/UVB (2010)	<p>La relación UVA/UVB es un criterio que refleja la relación entre la atenuación integral de la radiación UVA sobre la UVB. Cuanto más cercana sea la relación a 1, más similares serán los valores integrales de atenuación tanto para UVA como para UVB.</p> <p>En este protocolo el producto se esparce sobre una capa de 1,3 mg/cm<sup>2</sup> o de 2 mg/cm<sup>2</sup>, y se mide la absorción en el rango UVB (290-320 nm) y UVA (320-400 nm); luego, se comparan las relaciones de las áreas bajo la curva del rango respectivo de medición.</p>	Velasco <i>et al.</i> (2008)
FDA (2011)	<p>Esta versión se basa en el método descrito en la ISO 24443.</p> <p>El agente protector se esparce sobre una capa de 0,75 mg/cm<sup>2</sup>. Luego, se mide la absorción en el rango de 290- 400 nm. El factor de protección UVA (FP-UVA) se calcula como 1/3 del SPF, según lo determinado por el método PPD <i>in vivo</i> o un grado equivalente de protección obtenido por cualquier método <i>in vitro</i>.</p> <p>La longitud de onda crítica (<math>\lambda_c</math>) es el punto donde se encuentra el 90% del área bajo la curva, comenzando en el extremo UVB (290 nm). Un protector solar con un valor de <math>\lambda_c &gt; 370</math> nm, satisface los requisitos de protección UVB/UVA y se considera un protector de amplio espectro.</p>	Padera <i>et al.</i> (2011)
COLIPA (UVAPF) (2011)	<p>Esta versión se basa en el método descrito en la ISO 24443 y en el FDA (2011).</p> <p>La relación FP-UVA/SPF y la longitud de onda crítica (<math>\lambda_c</math>); se calculan por espectrofotometría de absorción.</p>	Padera <i>et al.</i> (2011)

### 1.5.2 Métodos para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro*

No existen métodos internacionalmente unificados para medir la capacidad antioxidante, debido a la disparidad en las condiciones que se desarrollan estas metodologías y en parte, a la complejidad de los sistemas y diversidad de las matrices que necesitan ser evaluadas. Existen algunas aproximaciones sobre la clasificación de los métodos para medir la actividad antioxidante; se pueden clasificar los métodos como directos o indirectos. En los métodos indirectos se estudia la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre (*e.g*; DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>+</sup>). Por su parte, los métodos directos se basan en el estudio del efecto antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema (*e.g*; peroxidación lipídica) (Shahidi *et al.*, 2015). Otra manera de clasificar los métodos es de acuerdo con el mecanismo durante el cual sucede el proceso oxidante (Santos-Sánchez *et al.*, 2019). En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se resumen las características de algunos de los métodos que más se utilizan para evaluar la capacidad antioxidante.

**Tabla 3**

*Métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro..*

<b>Método</b>	<b>Mecanismo de reacción</b>	<b>Características</b>	<b>Ref</b>
Potencial de captación de radicales totales (TRAP)	HAT	Este método utiliza un espectrómetro de luminiscencia para medir el decaimiento de la fluorescencia de la R-ficoeritrina durante una reacción de peroxidación controlada. Los valores de TRAP se calculan a partir de la duración de la fase de retraso causada por el antioxidante en comparación con la de Trolox.	Somogyi <i>et al.</i> (2007)
Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)	HAT	Es un método espectrofotométrico que se basa en la inhibición de radicales peroxilo inducidos por la oxidación iniciada por la descomposición química de azo-compuestos como el AAPH.	Singh <i>et al.</i> (2008)
Ensayo de decoloración del radical DPPH	SET o HAT	Método colorimétrico basado en la medida de la capacidad de los compuestos antioxidantes para estabilizar radicales DPPH·.	Kedare <i>et al.</i> (2011)
Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS <sup>+</sup>	SET o HAT	Método colorimétrico basado en reducción de la coloración verde/azul producida por la reacción del catión-radical ABTS <sup>+</sup> con el antioxidante presente en la muestra.	Re <i>et al.</i> (1999)

*Nota: <sup>a</sup>HAT (Hydrogen Atom Transfer); SET (Single Electron Transfe*

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Estudiar mediante técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas la composición química de los extractos obtenidos con disolventes de algunas especies cultivadas en Colombia y evaluar sus capacidades antioxidante y fotoprotectora *in vitro* contra la radiación UVA y UVB.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Reactivos

Para el desarrollo del trabajo de investigación se utilizaron los siguientes reactivos y sustancias patrón: el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS,  $\geq 98$  %), el  $\alpha$ -tocoferol (97 %), el BHT (98,8 %), el ácido gálico (97 %), ácido 3,5-dicafeoilquínico (97 %), eriodictiol ( $\geq 90$  %), naringenina ( $\geq 95$  %), quercetina ( $\geq 98$  %), quercetina 3-glucoside ( $\geq 90$  %) y Trolox<sup>®</sup> ( $\geq 97$  %) que se adquirieron de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EE. UU.). La luteolina 7-glucosido (98 %) y kaempferol 3-O-galactosido (98 %) se obtuvieron de *Chemfaces* (Wuhan, Ubei, China). El ácido clorogénico (99 %) se obtuvo de *Phytolab* (Vestenbergsgreuth, Bavaria, Germany) y luteolina ( $\geq 98$  %), de Chemcruz. El acetonitrilo y el metanol grado HPLC y LC/MS, el formiato de amonio ( $\geq 99$  %) y el persulfato de potasio ( $\geq 98$  %) se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Germany). El agua tipo I se produjo en un equipo purificador *Synergy UV* de Merck Millipore (Molsheim, Francia), disponible en el laboratorio CROM-MASS, UIS (campus principal, Bucaramanga, Colombia).

## **3.2 Material vegetal**

### **3.2.1 Recolección e identificación botánica**

Las plantas (partes aéreas) de *A. saturojoides*, *A. bogotensis* y *L. colombiana* se recolectaron en estado de floración en dos municipios del departamento de Santander, Colombia. Para la recolección y el procesamiento del material vegetal se contó con el permiso de colecta otorgado a través del contrato N° 270 de acceso a recursos genéticos emitido por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. El material vegetal recolectado se secó a la sombra y se procesó en un molino *SM100* (Retsch, Haan, Alemania). Posteriormente, se almacenó en oscuridad.

La identificación botánica de las especies vegetales se llevó a cabo en la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander (sede Bucaramanga). Las *exsiccata* quedaron registradas en el Herbario UIS.

## **3.3 Obtención de extractos**

### **3.3.1 Extracción con solvente asistida con ultrasonido**

La extracción del material vegetal se realizó según la metodología descrita por Pico-Hernández *et al.* (2020) con algunas modificaciones. Las partes aéreas de las plantas bajo estudio, previamente picadas y secadas, se les adicionó una solución de etanol:agua, con relación material vegetal-solvente 1:20. La mezcla se colocó en sonificación a 50 °C durante 1 h y frecuencia de 37 kHz en un equipo de ultrasonido *Elmasonic S30H* (Elma Schmidbquer GmbH, Gießen, Alemania). Para el control de la temperatura del baño ultrasonido se utilizó un baño termostatado de enfriamiento *Fisher Scientific* modelo 901 (Hampton, NH, EE. UU.).

Las soluciones de cada uno de los extractos se filtraron, el exceso de disolvente se removió por rotoevaporación a presión reducida a 50 °C en un rotoevaporador *Heidolph* (Schwabach,

Alemania). Cada uno de los extractos se liofilizaron durante 48 h en un liofilizador de bandejas *Virtis Advance Plus* (SP Scientific, New York, EE.UU.). Los extractos secos se pesaron y se preservaron en frascos ámbar a 4 °C.

### 3.3.2 Diseño de experimentos

La extracción de los compuestos bioactivos está influenciada por diferentes factores, en los que figuran el tipo y estado del material vegetal, la técnica de extracción, la naturaleza química del solvente, el tiempo de extracción, la temperatura, la relación entre material vegetal:solvente, entre otros (Oreopoulou *et al.*, 2019). En el grupo de investigación CIBIMOL se han realizado estudios sobre el efecto que tienen algunos factores del proceso extractivo sobre la capacidad antioxidante de los extractos (Mejía Medina *et al.*, 2022). En esta ocasión, para cada planta bajo estudio, se usó un diseño experimental factorial  $2^3$  con seis réplicas en el punto central para estudiar el efecto del porcentaje de etanol, la temperatura y el tiempo de extracción sobre el rendimiento de extracción, el potencial antioxidante, medido por el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup> y el potencial fotoprotector, medido por el factor de protección solar (SPF) *in vitro*. Los factores y los niveles (-1, +1) estudiados se encuentran en la **Tabla 4**.

La desviación estándar y la varianza del proceso extractivo se calcularon a partir de las seis réplicas realizadas bajo las condiciones de extracción del punto central (Véanse las condiciones de extracción en la **Tabla 4**); estos valores se tomaron como el error experimental de cada punto del diseño realizado para cada especie. La medición de las actividades antioxidante y fotoprotectora se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como valores promedio  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 4**

*Factores estudiados para la extracción de compuestos fenólicos en las plantas bajo estudio.*

Símbolo	Factores	Niveles		
		-1	0	+1
A	Temperatura, °C	40	50	60
B	Tiempo de extracción, min	15	25	35
C	EtOH:H <sub>2</sub> O, %	60	70	80

**3.3.2.1 Tratamiento estadístico de los datos.** Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el *software* estadístico *Statgraphics Centurion XVI.I* (versión de prueba) y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de los efectos de las variables: temperatura, tiempo de extracción y relación EtOH:H<sub>2</sub>O sobre el rendimiento y las actividades antioxidante y fotoprotectora, medidas por métodos *in vitro*, a través de la prueba de Fisher, a un nivel de confianza del 95 %. Se realizó un análisis de correlación entre las variables de respuesta mediante la determinación del coeficiente de correlación de Pearson; el rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y mide la fuerza de la relación lineal entre las variables. También, se realizó una prueba de significancia estadística de las correlaciones estimadas; los valores *p* (<0,05) indicaron correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95 %.

### 3.4 Análisis instrumental

#### 3.4.1 Determinación de figuras de mérito para el método LC/MS

**3.4.1.1 Determinación de figuras de mérito para el método LC/MS.** La determinación de las figuras de mérito se realizó utilizando las sustancias-patrón identificadas de manera confirmatoria en los extractos dentro de las cuales estuvieron: el ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido

clorogénico, eriodictiol, luteolina, quercetina, quercetina 3-glucósido, luteolina 7-glucósido y kaempferol 3-*O*-galactósido.

**3.4.1.1.1 Evaluación de la precisión del método para tiempo de retención y área.** Para determinar la precisión, entendida como la repetibilidad y la reproducibilidad de tiempos de retención y áreas cromatográficas se calculó el promedio (**Ecuación 1**), la desviación estándar (**Ecuación 2**) y el coeficiente de variación (**Ecuación 3**).

**Ecuación 1**

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

**Ecuación 2**

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}|^2}$$

**Ecuación 3**

$$CV, \% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Donde:

$\bar{x}$  = Promedio de datos;

$x_i$  = Datos;

$n$  = Número de datos;

$S$  = Desviación estándar;

CV= Coeficiente de variación

**3.4.1.1.2 Determinación de la linealidad, la sensibilidad y los niveles mínimos de detección y cuantificación.** La linealidad, la sensibilidad y los niveles mínimos de detección y cuantificación se determinaron a partir de las curvas de calibración de las sustancias patrón. Las curvas se construyeron en un rango de (0,1-1,0 mg/L). Se utilizó el

**Ecuación 4**

coeficiente de determinación ( $R^2$ ) (**Ecuación 4**) de la curva de calibración como indicador de linealidad.

$$R^2 = \frac{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(x_i - \bar{x})^2(y_i - \bar{y})^2}}$$

Las desviaciones estándar de la pendiente y el intercepto (**Ecuaciones 6 y 7**) se expresaron como los errores en los valores de la pendiente y el intercepto.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i(Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n - 2}} \tag{Ecuación 5}$$

Donde:

$S_{y/x}$ : Desviación estándar de la recta.

$Y_i$ : Datos experimentales del componente  $i$ .

$\hat{Y}_i$ : Puntos sobre la recta de la regresión calculada.

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i(X_i - \hat{X}_i)^2}} \tag{Ecuación 6}$$

Donde:

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

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i X_i^2}{n \sum_i(X_i - \hat{X}_i)^2}} \tag{Ecuación 7}$$

Donde:

$S_b$ : Desviación estándar de la ordenada ( $b$ ).

Para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación, se usaron las siguientes **Ecuaciones 8 y 9**.

$$LOD = \frac{KS_B}{m} \tag{Ecuación 8}$$

Donde:

LOD: Límite de detección.

K: 3.

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

m: Pendiente de la curva de calibración.

$$LOQ = \frac{KS_B}{m} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:

LOQ: Límite de cuantificación.

K: 10.

### 3.4.2 Análisis por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS

Para la identificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos hidroalcohólicos de *A. saturojoides*, *A. bogotensis* y *L. colombiana* se utilizó un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia *Vanquish*<sup>TM</sup> (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE. UU.), equipado con un compartimento de columna controlado termostáticamente (40 °C). La separación cromatográfica se realizó en una columna *Zorbax Eclipse XDB C<sub>18</sub>* (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, USA) 50 mm L x 2,1 mm de D.I., tamaño de partícula de 1,8 μm). El caudal de la fase móvil que contenía (A) agua (0.1 % ácido fórmico (AF) + 5 mM de formiato de amonio (FA) y (B) MeOH (0,1% AF + 5 mM FA) fue de 300 μL/min. La condición de gradiente inicial fue 100 % A, cambió linealmente a 100 % B en 8 min, se mantuvo durante 4 min, volvió a 100 % A en 1 min y se mantuvo durante 3 min. El volumen de inyección fue de 2 μL. El cromatógrafo líquido se conectó a un espectrómetro de masas *Q-Exactive Plus Orbitrap* (*Thermo Scientific*, Bremen,

Alemania) con una fuente de ionización por electronebulización termostataada (HESI-II), operada en modo de dual (positivo y negativo). El voltaje de capilar fue de 3,5 kV. La temperatura del nebulizador se ajustó a 350 °C; la temperatura del capilar a 320 °C; el gas envolvente y el gas auxiliar (N<sub>2</sub>) se ajustaron a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. El nitrógeno (> 99 %) se obtuvo de un generador NM32LA (*Peak Scientific*, Escocia, Reino Unido). En el modo *full scan*, la resolución del *Orbitrap*-MS se estableció en 70000 (*full-width-at-half-maximum*, en  $m/z$  200,  $R_{FWHM}$ ); el control automático de ganancia (AGC) fue de  $3 \times 10^6$ , el tiempo máximo de inyección a la *C-trap* fue de 200 ms y el rango de masas fue de  $m/z$  100-1000. Las moléculas protonadas y deprotonadas se fragmentaron en la celda HCD (*Higher Energy Collision Dissociation*) con energías de colisión de 10 a 70 eV. Los espectros de masas se registraron en el modo AIF (*all-ion fragmentation*) para cada energía de colisión, a una  $R_{FWHM}$  de 35000, AGC de  $3 \times 10^6$ , tiempo de inyección en la *C-trap* de 50 ms y un rango de masas de  $m/z$  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.), respectivamente. La identificación de los compuestos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención ( $t_R$ ), espectros de masas, patrón isotópico y fórmula molecular exacta con los de las sustancias de referencia y bases de datos. Los datos MS fueron adquiridos en los modos de ionización positivo y negativo.

La cuantificación de los compuestos fenólicos identificados en los extractos de las plantas bajo estudio se realizó usando el método de estándar externo, en modo de adquisición de iones seleccionados (SIM), con sustancias patrón de ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido clorogénico, eriodictiol, luteolina, quercetina, quercetina 3-glucósido, luteolina 7-glucósido y kaempferol 3-O-galactósido.

### 3.5 Actividad fotoprotectora

#### 3.5.1 Determinación del factor de protección *in vitro*

El factor de protección solar *in vitro* se determinó siguiendo la metodología descrita por Mansur *et al.* (1986) y Sayre *et al.* (1979). El extracto hidroalcohólico (5 mg) se disolvió en una solución hidroalcohólica y se agitó en vórtice (2500 rpm, 1 min). La solución se colocó en sonicación a temperatura ambiente (*ca.* 25 °C) durante 20 min a una frecuencia de 37 kHz en un equipo de ultrasonido *Elmasonic* S30H (Elma Schmidbquer GmbH, Gießen, Alemania). La solución se agitó en vórtice (3000 rpm, 1 min) y se centrifugó (6000 rpm, 10 min); a partir de esta solución se realizó una disolución (200 mg/L), condición establecida por Mansur y colaboradores (1986) para que los resultados se pudieran correlacionar con el método *in vivo*. Se adquirió el espectro ultravioleta de la disolución en un espectrofotómetro en miniatura (*FLAME-S-UV-Vis-ES*, FLMS02341) de *Ocean Optics Inc.* (Dunedin, FL, EE. UU.). Se empleó una cubeta de cuarzo de 1 cm. Los datos se procesaron en el software *OceanView* (Versión 1.6.3, 2013). Se tomaron los valores de absorbancia de cada solución evaluada en el rango de  $\lambda = 290$  nm a  $\lambda = 320$  nm, con intervalos de 5 nm, y se calculó el SPF, según la **Ecuación 10**. Las mediciones se realizaron por triplicado.

$$\text{SPF}_{in vitro} = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde:

SPF: factor de protección solar

FC: 10 (factor de correlación)

EE ( $\lambda$ ): efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda  $\lambda$ .

I ( $\lambda$ ): intensidad del sol en la longitud de onda  $\lambda$ .

Abs ( $\lambda$ ): absorbancia de la solución en la longitud de onda  $\lambda$ .

Se utilizaron los valores determinados por Sayre *et al.* (1979) de las constantes de la relación entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación de cada longitud de onda  $EE(\lambda) \times I(\lambda)$  (Véase **Tabla 5**).

**Tabla 5**

*Valores de las constantes usadas para el cálculo del factor de protección solar in vitro.*

Longitud de onda	EE (λ) x I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

**3.5.2 Determinación de la longitud de onda crítica**

Según la FDA (*Food and Drug Administration*), los filtros solares con un valor de longitud de onda crítica *in vitro* superior a  $\lambda = 370$  nm, indicarían que el producto puede satisfacer los requisitos de protección UVB/UVA de amplio espectro (Cole, 2016). La longitud de onda crítica ( $\lambda_c$ ) se calculó mediante la **Ecuación 11**.

$$\int_{290}^{\lambda_c} A_{\lambda} d\lambda = 0,9 \int_{290}^{400} A_{\lambda} d\lambda \tag{Ecuación 11}$$

Donde:

$A_{\lambda}$  : absorbancia monocromática a una longitud de onda  $\lambda$ .

$\lambda_c$  : longitud de onda crítica en nm.

### 3.5.3 Relación de absorbancia UVA1/UV según los criterios de clasificación establecidos en la resolución propuesta por la FDA

La relación de absorbancia UVA1/UV para cada extracto se calculó, usando la **Ecuación 12**:

$$\text{Relación UVA1/UV} = \frac{\int_{340}^{400} A_{\lambda} d\lambda / \int_{340}^{400} d\lambda}{\int_{290}^{400} A_{\lambda} d\lambda / \int_{290}^{400} d\lambda} \quad \text{Ecuación 12}$$

Según la relación de absorbancia UVA1/UV, los protectores solares se asignan a una de cuatro categorías de relación UVA1/UV: (1) protección baja (relación UVA1/UV  $\geq 0,20$ ); (2) protección media (relación UVA1/UV  $\geq 0,40$ ); (3) protección alta (relación UVA1/UV  $\geq 0,70$ ); (4) protección muy alta (relación UVA1/UV  $\geq 0,95$ ) (Moyal, 2010).

### 3.5.4 Ensayos de fotoestabilidad de los extractos

El procedimiento se realizó de acuerdo con las metodologías descritas por Chen *et al.* (2012) y Bakowska *et al.* (2003), con algunas modificaciones. Los ensayos de estabilidad con radiación UV se realizaron utilizando una cámara de radiación *Opsytec Dr. Gröbel* BSL-01 (*Opsytec Dr. Gröbel GmbH*, Ettlingen, Alemania), equipada con lentes LED que irradian a una longitud de onda de  $\lambda=365$  nm (radiación UVA) e irradiancia máxima de 40 mW/cm<sup>2</sup>. Los extractos (10 mg) se irradiaron a una longitud de onda de  $\lambda=365$  nm durante 4 h. La estabilidad se monitoreó en intervalos de 1 h. Se determinó el SPF *in vitro* para calcular el porcentaje de la capacidad fotoprotectora en el tiempo, usando la **Ecuación 13**. También, se calcularon los coeficientes de absorptividad en la longitud de onda máxima de cada uno de los extractos ( $\epsilon_{\lambda}$ ) antes y después de cada periodo de irradiación (Véase **Ecuación 14**). Los coeficientes de absorptividad se expresaron como (absorbancia (A)/cm<sup>-1</sup>(mg de extracto/ mL)) (Mejía-Giraldo *et al.*, 2021).

$$\% \text{ SPF} = \left( \frac{\text{SPF}_{0h} - \text{SPF}_{xh}}{\text{SPF}_{0h}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde:

$\text{SPF}_{0h}$ : el valor del SPF inicial, sin irradiación.

$\text{SPF}_{xh}$ : (x: 1-4 h) el valor del SPF, después de irradiar.

$$\varepsilon = \frac{A_{\lambda}}{lc} \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde:

$\varepsilon$ : coeficiente de absortividad.

A: absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción.

l: longitud de la celda de medición ( 1 cm).

c: concentración de la solución evaluada (0,2 mg/ mL).

### 3.6 Actividad antioxidante

#### 3.6.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>

El ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>•+</sup> se realizó según la metodología descrita por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Se preparó una solución *buffer* de acetato de sodio (20 mM, pH= 4,5). En 50 mL de solución *buffer* se mezclaron el ABTS (192 mg) y el persulfato de potasio (PDS) (33 mg) para producir el catión-radical ABTS<sup>•+</sup> de coloración azul intenso. La mezcla se dejó en ausencia de luz y en refrigeración (*ca.* 4 °C) durante 18 h. Las concentraciones finales del ABTS y el PDS en solución fueron de 7,45 mM y 2,45 mM, respectivamente. A partir de esta solución *stock* se preparó una solución de trabajo con absorbancia de  $0,71 \pm 0,02$ .

Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector de microplacas *Modulus*<sup>®</sup> II (*Turner Biosystems Inc*, Sunnyvale, California, EE. UU.) y se tomaron a una longitud de onda de  $\lambda = 750$  nm y a una temperatura de 25 °C. Se construyó una curva de calibración de Trolox<sup>®</sup> (50-560  $\mu$ M). Para cada concentración de la curva se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la **Ecuación 15**. Los resultados de la actividad antioxidante se expresaron como  $\mu$ mol de Trolox<sup>®</sup>/g de muestra.

$$\text{Inhibición, \%} = 0,1348 (\mu\text{M de Trolox}^{\text{®}}) - 4,6121$$

**Ecuación 15**

Las muestras (extractos y sustancias de referencia) se diluyeron en etanol absoluto, de tal manera que el porcentaje de inhibición del catión-radical ABTS<sup>+</sup> estuviera entre el 10 y 50 %. Para esto, el extracto diluido (10  $\mu$ L) y la solución de trabajo de ABTS<sup>+</sup> (190  $\mu$ L) se depositaron en cada pozo de la placa y se midió la absorbancia durante 60 min.

### **3.6.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo on-line HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup>**

Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método *on-line* HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup>, se utilizó la metodología descrita por Rojas *et al.* (2015), con algunas modificaciones. Se usó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés), *Agilent Technologies* (AT) (Palo Alto, CA, EE. UU.) 1260 *Infinity*, acoplado a un derivatizador poscolumna *Pinnacle PCX*, de la casa fabricante *Pickering Laboratories* (Mountain View, EE. UU.). El HPLC tenía un desgasificador de disolventes integrado a una bomba cuaternaria (G1311C), un inyector automático (G1329B), un compartimiento termostatzado para las columnas (G1316A), un detector de arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés) (G1315D)

y un detector de longitud de onda múltiple (MWD, por sus siglas en inglés) (G1365D), todos de la empresa.

El derivatizador tenía dos bombas de jeringa electrónicas, para flujos continuos; cada jeringa podía almacenar hasta 70 mL. Además, poseía dos mezcladores, un reactor térmico de 1,4 mL (11,5 m, L x 0,4 mm, d.i.), cuya temperatura se podía ajustar de 30 a 130 °C, y un reactor a temperatura ambiente. El derivatizador contaba con un sistema de suministro de nitrógeno, para proteger los reactivos, que podían degradarse con el oxígeno, y un compartimiento para una columna, cuya temperatura se podía ajustar de 30 a 75 °C.

La fase móvil para la preparación de la muestra era una mezcla de agua:metanol al 0,5% de ácido fórmico (reactivos grado HPLC) y, la fase móvil de la corrida cromatográfica consistía en A (ácido fórmico al 0,5% en agua, v/v) y B (acetonitrilo). El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L. Se monitoreaba el cromatograma a  $\lambda = 734$  nm, longitud de onda establecida en el MWD para el registro de la disminución de la absorbancia del catión- radical ABTS<sup>+</sup>.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Identificación botánica

Las plantas fueron identificadas por el biólogo Dr. Robert Tulio González. Los números de *voucher* de las *exsiccatae* fueron almacenados en el Herbario UIS, Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander, Escuela de Biología (sede Bucaramanga). En la **Tabla 6** se encuentra la información de los sitios de colecta y números de *voucher*.

**Tabla 6**

*Identificación taxonómica de las especies estudiadas.*

	Plantas de la investigación		
	<i>Achyrocline saturejoides</i>	<i>A. bogotensis</i>	<i>Lantana colombiana</i>
<b>Familia</b>	<i>Asteraceae</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Verbenaceae</i>
<b>Nombre común</b>	Marcela	Cenizo	Cariaquito
<b>Sitio de colecta</b>	Betulia, Santander	Concepción, Santander	Concepción, Santander
<b>N° voucher</b>	21973	22060	22061

#### 4.2 Diseños experimentales

El rendimiento de extracción y las actividades biológicas de los extractos pueden verse influenciados principalmente por el tipo de la especie botánica, las condiciones climáticas durante su cultivo y el procesamiento del material vegetal (Braga *et al.*, 2016). Esa relación entre “ganancia (rendimiento)” y “beneficio (actividad biológica)” puede revelar el verdadero valor de los extractos de las plantas. Por esta razón, se estudiaron los efectos de la temperatura, tiempo de extracción y el porcentaje de etanol sobre el rendimiento de extracción y los potenciales antioxidante y fotoprotector de cada extracto bajo estudio; también, se analizó la relación entre las variables de respuesta monitoreadas. Para esto, se empleó un diseño factorial 2<sup>3</sup> de resolución V con seis réplicas en las condiciones de extracción del punto central para un total de 14 experimentos. El potencial antioxidante se determinó por el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup> y el potencial fotoprotector por el valor del SPF *in vitro*. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados detallados se encuentran en el **Apéndice A**.

En la **Tabla 7**, están los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables de respuesta: rendimiento de extracción, potencial antioxidante y potencial fotoprotector obtenidas para cada especie. En las tres matrices vegetales se observaron correlaciones negativas entre el rendimiento de extracción y el potencial fotoprotector; para *A. saturejoides* la correlación entre

estas variables fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ); también, se observó una correlación negativa entre el rendimiento de extracción y el potencial antioxidante para los extractos de *A. saturejoides* ( $r = -0,3648$ ). Estas correlaciones negativas indicaron que existe una relación inversa entre las variables, es decir, que se podrían obtener extractos de estas especies con bajos rendimientos de extracción, pero con alta capacidad fotoprotectora y, también, con alta capacidad antioxidante para el caso de los extractos de *A. saturejoides*.

Por otro lado, los coeficientes de correlación entre el rendimiento de extracción y el potencial antioxidante de *A. bogotensis* ( $r = 0,0755$ ) y *L. colombiana* ( $0,1463$ ) fueron positivos cercanos a cero. Ningunas de estas correlaciones fueron significativas. Los coeficientes de correlación cercanos a cero indican que existe una asociación lineal débil entre variables, es decir, que las variables rendimiento de extracción y el potencial antioxidante de las especies *A. bogotensis* y *L. colombiana* están debilmente asociadas (Akoglu, 2018).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Braga *et al.* (2016), quienes estudiaron la correlación entre el rendimiento de extracción, la actividad antioxidante, el contenido de fenoles totales y el contenido de flavonoides en extractos obtenidos de distintas matrices vegetales *Vitis vinífera*, *Mangifera indica* y *Arachis hypogaea*. Los investigadores encontraron correlaciones lineales negativas entre el rendimiento de extracción y el contenido de fenoles totales ( $r = -0,91$ ,  $p < 0,01$ ) y flavonoides totales ( $r = -0,98$ ,  $p < 0,01$ ) y, a su vez, una correlación lineal positiva entre los flavonoides totales y la actividad antioxidante ( $r = 0,92$ ,  $p < 0,01$ ), medida por el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup>.

**Tabla 7**

*Coefficientes de correlación de Pearson entre las variables de respuesta: rendimiento de extracción, potencial antioxidante y potencial fotoprotector*

<b>Correlaciones</b>	<b>Plantas de estudio</b>		
	<i>A. saturejoides</i>	<i>A. bogotensis</i>	<i>L. colombiana</i>
Rendimiento de extracción- potencial fotoprotector	r = -0,575 <i>p</i> = 0,0315	r = -0,2648 <i>p</i> = 0,3602	r = -0,1121 <i>p</i> = 0,7028
Rendimiento de extracción- potencial antioxidante	r = -0,3648 <i>p</i> = 0,1997	r = 0,0755 <i>p</i> = 0,7976	r = 0,1463 <i>p</i> = 0,6177
Potencial fotoprotector-potencial antioxidante	r = 0,8816 <i>p</i> = 0,0000	r = 0,7131 <i>p</i> = 0,0042	r = 0,1587 <i>p</i> = 0,5879

*Nota:* r: coeficiente de correlación de Pearson; *p*: valor de significancia estadística (*p* < 0,05).

Los extractos obtenidos de las plantas pueden exhibir distintas o iguales actividades biológicas y esto se atribuye a la diferencia o similitud entre sus composiciones químicas (Lopes *et al.*, 2011; Meira *et al.*, 2012). Para el caso de las especies de *A. saturejoides* ( $r = 0,8816$ ,  $p < 0,05$ ) y *A. bogotensis* ( $r = 0,7131$ ,  $p < 0,05$ ), que pertenecen al mismo género y tienen composiciones químicas similares, se observó una correlación positiva alta, estadísticamente significativa, entre los potenciales fotoprotector y antioxidante; lo que indica que la actividad fotoprotectora de los extractos de estas especies está relacionada con su actividad antioxidante. La correlación entre estas variables para los extractos de *L. colombiana* ( $r = 0,1587$ ) fue positiva; sin embargo, la relación es baja.

La correlación positiva entre el potencial antioxidante y fotoprotector es un resultado consistente, ya que las plantas como fuentes constantes de compuestos activos pueden sintetizar sustancias que actúen como antioxidantes para combatir o prevenir los daños causados por las

especies reactivas de oxígeno o como fotoprotectores para prevenir el envejecimiento prematuro causado por la exposición a la radiación solar (Stevanato *et al.*, 2014).

Por otro lado, Michiels *et al.* (2012) y otros autores (Bamba *et al.*, 2018; Spigno *et al.*, 2007) mencionan que la cantidad obtenida de extracto, la composición química y, por lo tanto, las actividades biológicas de los extractos varían con las condiciones de extracción; los parámetros que tienen un gran impacto incluyen en particular la composición del solvente de extracción, la temperatura y el tiempo de extracción. En los **Apéndices B-D** están los resultados del análisis de varianza (ANOVA) y los gráficos de Pareto estandarizados (Véansen **Apéndices E-G**), en donde se muestran los efectos de los factores individuales estudiados en esta investigación y sus interacciones sobre las variables de respuesta para las tres matrices vegetales. Las variables sombreadas en los gráficos de Pareto explicaron *ca.* 90 % de la varianza total de los datos.

#### **4.2.1 Efecto del porcentaje de etanol**

El etanol es el solvente más utilizado en laboratorios e industrias afines a la obtención de productos naturales (Chemat *et al.*, 2019), al igual que el agua, que es un buen solvente de extracción para ácidos fenólicos y sus glucosilados, y puede proporcionar un mayor rendimiento de extracción de estos compuestos que los solventes orgánicos (Syukriah *et al.*, 2014). Sin embargo, las soluciones acuosas de etanol son más efectivas en la extracción de compuestos fenólicos, incluidos los flavonoides, que los solventes puros (Dent *et al.*, 2013).

Poh-Yen *et al.* (2018) evaluaron el potencial fotoprotector de extractos de *Graptophyllum pictum* obtenidos con diferentes solventes; los autores encontraron que los extractos con mayor potencial fotoprotector se obtuvieron con etanol y tuvieron una mayor estabilidad al estar expuestos durante 21 días a luz solar. Por esta razón, en esta investigación se utilizó el etanol como

solvente de extracción y se obtuvieron extractos usando la mezcla hidroalcohólica con 60 %, 70 % y 80 % de etanol (v/v).

Los resultados obtenidos de las tres plantas mostraron que el porcentaje de etanol hizo parte de los factores que afectaron de manera significativa ( $p < 0,05$ ) a las variables de respuesta estudiadas. Este factor tuvo un efecto negativo sobre el rendimiento de extracción; con altas concentraciones de etanol en el solvente (80 %, v/v) se obtuvieron bajos rendimientos de extracción. Caso contrario para los potenciales antioxidante y fotoprotector, para lo cual se observó un efecto positivo de este factor, excepto para la especie de *A. bogotensis* (Véansen los **Apéndices E-G**). En el potencial fotoprotector de las especies *A. saturejoides* (71 %) y *L. colombiana* (76 %) fue el efecto más alto, y en el potencial antioxidante de *A. saturejoides*, representó el 32 % de la variabilidad.

En el estudio realizado por Do *et al.* (2014), los autores evaluaron los efectos del solvente de extracción en el contenido de compuestos fenólicos, en la cantidad de flavonoides y en la actividad antioxidante de *Limnophila aromatica*. Los investigadores observaron que al aumentar el porcentaje de etanol en el solvente de extracción disminuía el rendimiento y aumentaba la actividad antioxidante.

Goltz *et al.* (2018) encontraron que una relación EtOH:H<sub>2</sub>O de 70 % (v/v) favorecía la obtención de extractos de *A. saturejoides* con una actividad antioxidante alta. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en esta investigación, ya que una solución hidroalcohólica (etanol, 70 %, v/v), se obtuvo el extracto de *A. saturejoides* con mayor potencial fotoprotector y antioxidante (15,3 y 640  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g de extracto).

#### 4.2.2 Efecto de la temperatura

El incremento de la temperatura de extracción conduce a una mayor permeabilidad de las paredes celulares, mayor solubilidad de los compuestos fenólicos y mayores fenómenos de transferencia de calor y masa a través de la matriz vegetal, lo que incrementa el rendimiento de extracción (Oreopoulou *et al.*, 2019). Esto se observó en esta investigación, cuando el aumento de la temperatura tuvo un efecto positivo sobre el rendimiento de extracción para las plantas bajo estudio. Como efecto individual fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) y el de mayor aporte en la variabilidad de los rendimientos de los extractos de *A. bogotensis* (58 %) y *L. colombiana* (38 %) y, como efecto binario entre la relación EtOH:H<sub>2</sub>O y temperatura (18 %), para *A. saturejoides*.

Se observaron distintos aportes y efectos de este factor sobre el potencial fotoprotector para cada especie vegetal (Véansen **Apéndices E-G**). La temperatura, como factor individual tuvo un efecto negativo para las especies de *A. saturejoides* y *A. bogotensis*, para esta última planta fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) y el más alto (55 %); sin embargo, para *L. colombiana* el efecto individual de la temperatura fue positivo y el efecto binario de la temperatura y el porcentaje de etanol (11 %) fue negativo ( $p < 0,05$ ) y con mayor aporte que el efecto individual (5 %).

Para el caso del potencial antioxidante, se observó que el efecto individual de la temperatura fue negativo para las especies de *A. saturejoides* y *A. bogotensis* y positivo para *L. colombiana*. En las tres matrices, este factor fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) y para el caso de *L. colombiana*, tuvo un mayor aporte (33 %) a la variabilidad de esta respuesta. Sin embargo, los efectos binarios entre la temperatura y el porcentaje de etanol fueron efectos positivos sobre las especies de *A. saturejoides* y *A. bogotensis*, siendo para esta última el efecto más alto (39

%), contrario a *L. colombiana*, para la cual este efecto binario tuvo un efecto negativo sobre el potencial antioxidante y el segundo más alto (25 %).

Miranda *et al.* (2009) tuvieron resultados similares a los de esta investigación relacionados con el efecto de la temperatura sobre la actividad antioxidante de extractos de *Aloe vera*, en donde, observaron un decrecimiento de la capacidad antioxidante, medida por el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), al incrementar la temperatura de extracción. Qu *et al.* (2010) mencionan que este efecto negativo de la temperatura de extracción sobre la actividad antioxidante se deba al hecho de que algunos compuestos fenólicos presentes en los extractos son termosensibles y, por lo tanto, las altas temperaturas pueden reducir su actividad biológica.

#### **4.2.3 Efecto del tiempo**

En las tres variables de respuesta estudiadas se observó que el efecto individual del tiempo de extracción fue positivo. Este efecto fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en el rendimiento de extracción de *L. colombiana*, y en los potenciales antioxidante y fotoprotector de las tres especies bajo estudio. En el potencial antioxidante de *A. saturojoides* fue el efecto más alto (50 %). Los resultados de esta investigación fueron similares a los obtenidos por Vuong *et al.* (2013) quienes observaron que el rendimiento de extracción y la actividad antioxidante de extractos obtenidos de hoja de papaya, se incrementan cuando aumenta el tiempo de extracción de 5-20 min; mientras que la actividad antioxidante más alta se obtuvo con el tiempo de extracción de 20 min.

El uso de ultrasonido potencializa los fenómenos de transferencia de masa y reduce el tiempo de extracción necesario para obtener la máxima recuperación de compuestos fenólicos

(Hossain *et al.*, 2012). El extracto de *A. bogotensis* con altas capacidades antioxidante y fotoprotectora se obtuvo a los 15 min de extracción (nivel bajo del diseño experimental).

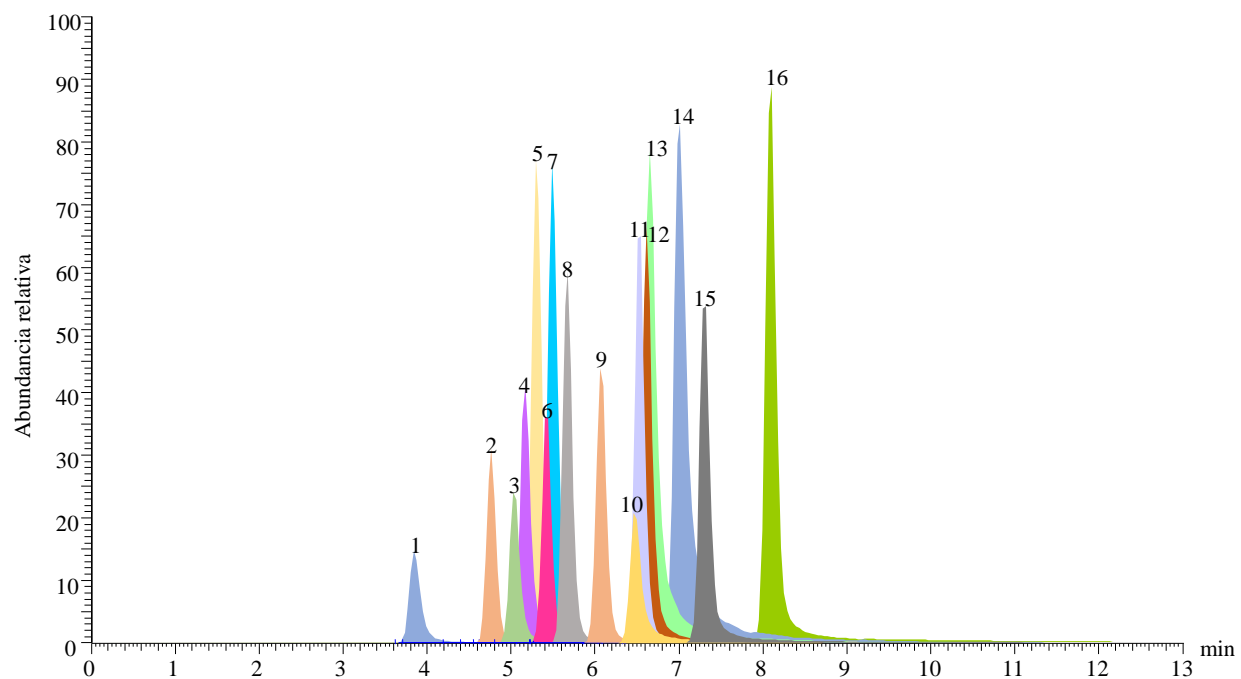
### 4.3 Análisis de composición química de los extractos aislados de las especies vegetales bajo estudio

#### 4.3.1 Figuras analíticas de mérito del análisis por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS

En la **Figura 5** se observan las corrientes iónicas extraídas (EIC, por sus siglas en inglés), obtenidas en modo *full scan*, por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS de las sustancias-patrón utilizadas. En la **Tabla 8** contiene los resultados de medición de la precisión de los tiempos de retención ( $t_R$ ) y las áreas cromatográficas de las sustancias-patrón analizadas por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS en modo de adquisición SIM. Los coeficientes de variación para los tiempos de retención de las sustancias analizadas estuvieron entre 0,1 % y 0,3 % y para las áreas cromatográficas entre 1 % y 10 %. Estos parámetros estuvieron dentro de los rangos aceptados de las Buenas Prácticas de Laboratorio, en donde se establecen que los coeficientes máximos de variación para los tiempos de retención sean menores del 2 % y para las áreas cromatográficas, del 10 % (International Organization for Standardization, 1990). En la **Tabla 9**, se encuentran los resultados de linealidad, sensibilidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del análisis UHPLC-ESI<sup>+/-</sup>-Orbitrap-MS para cuantificar los compuestos fenólicos. Los coeficientes de determinación para todas las sustancias patrón analizadas, dentro de sus respectivos rangos de concentración, fueron  $R^2 > 0,99$ .

**Figura 5**

*Corrientes iónicas extraídas (EIC), de las moléculas protonadas y deprotonadas de las sustancias patrón, obtenidas por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS. Véase la identificación de los picos en la **Tabla 8**.*



**Tabla 8**

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

N° Pico Fig. 5	Compuesto	Fórmula	Masa experimental		$\Delta$ ppm	$t_R \pm s$ , min (n= 3)	CV, %	Áreas $\pm$ s, cuentas $\times 10^{-6}$ (n=3)	CV, %
			[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>					
1	Ácido clorogénico	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-	353,08804	0,67	3,83 $\pm$ 0,01	0,3	10,0 $\pm$ 0,2	2,1
2	Ácido <i>p</i> -cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-	163,03923	1,59	4,76 $\pm$ 0,01	0,2	18,0 $\pm$ 0,4	2,2
3	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	-	515,11957	0,61	5,04 $\pm$ 0,02	0,4	17,2 $\pm$ 0,7	4,0
4	Luteolina 7- <i>O</i> -glucurónido	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	463,08655	-	1,19	5,17 $\pm$ 0,01	0,1	30,0 $\pm$ 0,6	1,9
5	Luteolina 7-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449,10736	-	1,06	5,30 $\pm$ 0,01	0,1	54,0 $\pm$ 0,7	1,3
6	Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	465,10236	-	0,85	5,42 $\pm$ 0,01	0,2	24 $\pm$ 1,3	5,4
7	Apigenina 7-glucurónido	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	447,09174	-	1,01	5,49 $\pm$ 0,01	0,1	50,0 $\pm$ 0,7	1,5
8	Kaempferol 3- <i>O</i> -galactósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449,10745	-	0,85	5,68 $\pm$ 0,02	0,3	30 $\pm$ 1,6	4,8
9	Eriodictiol	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	289,07034	-	1,11	5,84 $\pm$ 0,01	0,2	60 $\pm$ 1,3	2,1
10	Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	303,04962	-	1,01	6,24 $\pm$ 0,01	0,2	40 $\pm$ 3,0	6,5
11	Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	273,07547	-	1,02	6,28 $\pm$ 0,01	0,2	100 $\pm$ 1,2	1,2
12	Nepetina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	317,06531	-	0,85	6,38 $\pm$ 0,01	0,1	103 $\pm$ 1,5	1,5
13	Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	287,05472	-	1,03	6,40 $\pm$ 0,01	0,1	158,0 $\pm$ 0,6	0,4
14	Apigenina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	271,05984	-	0,94	6,75 $\pm$ 0,02	0,2	190 $\pm$ 4,2	2,2
15	Cirsimaritina	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	315,08597	-	1,10	7,05 $\pm$ 0,01	0,1	90 $\pm$ 2,7	3,0
16	Salvigenina	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	329,10168	-	0,85	7,72 $\pm$ 0,02	0,2	1100 $\pm$ 110,4	10,3

Nota: CV: coeficiente de variación.

**Tabla 9**

*Linealidad y sensibilidad determinadas para las sustancias patrón de compuestos fenólicos analizadas por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS.*

N° pico Fig. 5	Compuesto	Rango, µg/mL	Ecuación	R <sup>2</sup>	SB	[µg/mL]	
						LOD	LOQ
1	Ácido clorogénico	1-10	y= 10579546x + 5384607	0,9962	163013	0,04	0,12
2	Ácido p-cumárico	0,06-0,8	y = 11327904x + 178822	0,9969	169533	0,05	0,15
3	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	1-10	y = 27430806x-1096492	0,9959	376882	0,06	0,21
4	Luteolina 7-O-glucurónido	0,02-0,8	y = 11017182x+29375	0,9975	130815	0,04	0,15
5	Luteolina 7-glucósido	0,01-0,6	y = 32235395x + 496774	0,9961	539557	0,04	0,13
6	Quercetina 3-O-glucósido	1-10	y = 11801723x + 3155600	0,9922	316094	0,07	0,22
7	Apigenina 7-glucurónido	0,01-0,8	y = 62514633x+1438948	0,9923	418129	0,08	0,26
8	Kaempferol 3-O-galactósido	0,06- 0,8	y = 29590144x - 336794	0,9989	238708	0,03	0,10
9	Eriodictiol	0,01-0,8	y = 7967209x + 58492	0,9917	159205	0,08	0,26
10	Quercetina	1-10	y = 11276699x + 8409777	0,9885	286829	0,05	0,16
11	Naringenina	0,01-0,8	y = 69568198x+1524067	0,9966	336860	0,05	0,17
12	Nepetina	0,01-0,8	y=86593763,74x-828059,2134	0,9978	303479	0,04	0,12
13	Luteolina	0,01-0,8	y = 62823980x+1555540	0,9946	985061	0,06	0,21
14	Apigenina	0,06-0,8	y = 68012217x+3408037	0,9940	1475833	0,09	0,29
15	Cirsimaritina	0,01-0,8	y = 427026639x+11262593	0,9902	9990938	0,09	0,30
16	Salvigenina	0,06-0,80	y = 910743363x-14489551	0,9944	18241572	0,07	0,23

*Nota:* SB: desviación estándar del intercepto

### **4.3.2 Identificación y cuantificación por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS de compuestos fenólicos presentes en los extractos hidroalcohólicos de *A. saturejoides*, *A. bogotensis* y *L. colombiana***

**4.3.2.1 Patrones de fragmentación de los compuestos fenólicos identificados en los extractos de las plantas bajo estudio.** Con el analizador de masas Q-Orbitrap operado en modo de adquisición simultánea de iones positivos y negativos, fue posible estudiar los patrones de fragmentación de las sustancias identificadas en los extractos hidroalcohólicos de las plantas bajo estudio. En los **Apéndices H y J** se encuentran las tablas y las figuras de las corrientes iónicas extraídas, EIC, obtenidas por UHPLC-ESI<sup>+/-</sup>-Orbitrap-MS, de los compuestos identificados.

Con las masas exactas ( $\Delta$  ppm < 2) de las moléculas (protonadas [M+H]<sup>+</sup> o deprotonadas [M-H]<sup>-</sup>) y los patrones isotópicos se pudieron elucidar las fórmulas moleculares. Los espectros de masas se adquirieron con diferentes energías (HCD: 10-70 eV) en la cámara de colisiones activadas; la energía de la celda HCD se seleccionó de tal manera que en los espectros de masas se observaran las señales tanto de la molécula ionizada como de los iones-producto; en la **Figura 6** se observa como ejemplo el espectro de masas del el ácido clorogénico, que fue uno de los compuestos presentes en los tres extractos vegetales.

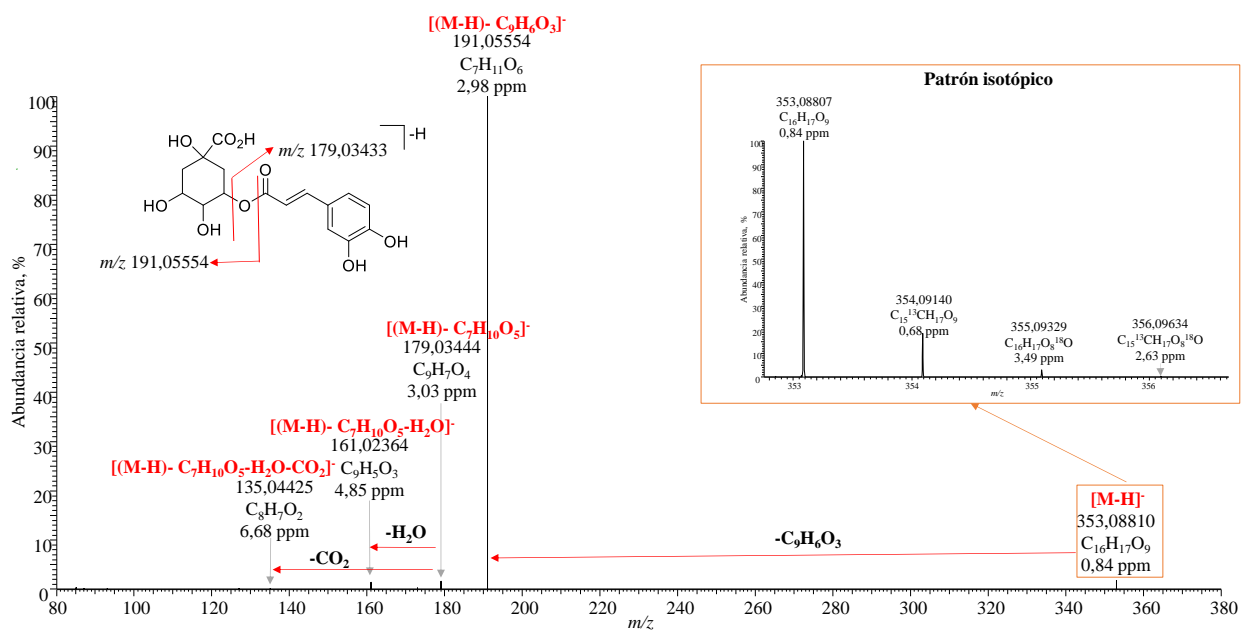
En los extractos de *A. saturejoides*, *A. bogotensis* y *L. colombiana* se pudieron identificar 34 compuestos diferentes, entre los cuales figuraron: derivados de ácidos hidroxicinámicos (8), feniletanoides (4), flavonoles (7), flavonas (12), flavanonas (2) e isoflavonas (1). Con el uso de sustancias-patrón se identificaron de manera confirmatoria 15 de 34 compuestos. Los 19 compuestos restantes se identificaron de manera tentativa mediante el estudio de los patrones de fragmentación de sus moléculas protonadas o deprotonadas obtenidos en modo SIM, por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS; los espectros de masas de estos compuestos se compararon con los espectros de masas reportados en la literatura y en las bases de datos METLIN<sup>TM</sup>

(<http://metlin.scripps.edu/>) y HMDB (<http://hmdb.ca/spectra/ms/search>) (Véansen **Apéndices I y K**).

En los extractos de las tres plantas estudiadas se detectaron ácidos hidroxicinámicos y derivados. En el extracto de *L. colombiana* solo se detectó el ácido *p*-cumárico, que es un compuesto derivado del ácido cinámico; en el espectro de masas de este compuesto se observó el ion-fragmento más abundante en  $m/z$  119,04932 ( $C_8H_7O$ , 100 %) que posiblemente se originó por la descaboxilación del ácido durante la ionización (Wehling *et al.*, 1989); este compuesto ha sido reportado en *L. camara*, que es una especie perteneciente al mismo género *Lantana* (Hussain *et al.*, 2011).

**Figura 6**

*Espectro de masas, obtenido por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS (Vcap: 3.5 kV, HCD: 20 eV), del ácido clorogénico presente en el extracto hidroalcohólico de A. saturejoides.*



Otra familia de compuestos, identificados principalmente en los extractos de *A. saturejoides* y *A. bogotensis*, fueron los ácidos hidroxicinámicos derivados del ácido quínico, los cuales, son sustancias que están compuestas por una o más unidades de ácidos *trans*-cinámicos, como el ácido cafeico y el ácido ferúlico, unido a un ácido quínico a través de un enlace éster (Clifford *et al.*, 2005).

El ácido clorogénico (ácido 3-*O*-cafeoilquínico) se identificó en los extractos hidroalcohólicos de las tres especies estudiadas; este compuesto es un ácido mono-cafeoilquínico y es uno de los más abundantes en la naturaleza (Clifford, 1985). En los espectros de masas de los ácidos mono-cafeoilquínicos obtenidos en ESI/MS (*Q-Orbitrap*) en modo de adquisición de iones negativos (HCD: 20 eV) se observó la señal  $m/z$  353,08670 con fórmula molecular  $C_{16}H_{17}O_9$  que correspondió a la señal de la molécula deprotonada. El ion-producto más abundante fue registrado en  $m/z$  191,05501 ( $C_7H_{11}O_6$ , 100 %) y correspondió al ácido quínico deprotonado, que fue formado por la ruptura del enlace éster entre el ácido cafeico y el ácido quínico. La pérdida de una molécula de agua a partir del ion  $m/z$  191,05501, generó el ion-fragmento con fórmula molecular  $C_7H_9O_5$  en  $m/z$  173,04444. El ion-producto en  $m/z$  179,03388 con fórmula  $C_9H_7O_4$  se identificó como el fragmento del ácido cafeico deprotonado; este ion al perder una molécula de agua y una de dióxido de carbono formó los iones-producto en  $m/z$  161,02332 ( $C_9H_5O_3$ ) y  $m/z$  135,04405 ( $C_8H_7O_2$ ). Clifford y colaboradores (2005) reportaron estos mismos fragmentos para distintos isómeros de ácidos mono-cafeoilquínicos.

En los extractos de *A. saturejoides* y *A. bogotensis* se identificó un compuesto con  $[M-H]^-$  en  $m/z$  367,10235 y fórmula  $C_{17}H_{19}O_9$ ; se observaron los iones-producto en ( $C_{10}H_9O_4^-$ ,  $m/z$  193,04953), ( $C_7H_{11}O_6^-$ ,  $m/z$  191,05501) y ( $C_7H_9O_5^-$ ,  $m/z$  173,04444). Este compuesto se identificó como un isómero del ácido feruloilquínico. El ion-fragmento con fórmula  $C_{10}H_9O_4$  y  $m/z$

193,04980 se generó por la ruptura del enlace éster entre el ácido ferúlico y el ácido quínico; la presencia del ion  $m/z$  191,05550 ( $C_7H_{11}O_6^-$ ) correspondió al ácido quínico deprotonado, el cual por la pérdida de una molécula de agua generó el ion  $m/z$  173,04495. En extractos hidrometanólicos de *A. saturojoides* se ha registrado la presencia de estos compuestos (Marques y Farah, 2009).

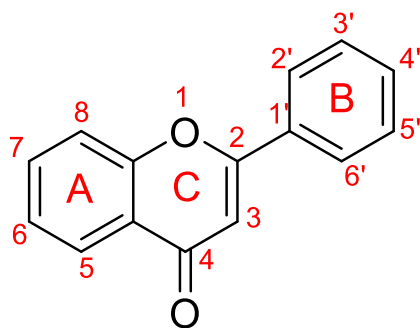
Los ácidos di- y tri-cafeoilquínicos se encontraron únicamente en los extractos de las especies del género *Achyrocline* estudiadas. En los espectros de masa de estos compuestos se registraron iones-producto generados por las pérdidas sucesivas de 162 unidades  $[M-H-C_9H_6O_3]^-$  que correspondieron al fragmento del ácido cafeico. En el espectro de masas del isómero del ácido tri-cafeoilquínico ( $C_{34}H_{30}O_{15}^-$ ,  $m/z$  677,15131) se registraron los iones-producto ( $C_{25}H_{24}O_{12}^-$ ,  $m/z$  515,11840), ( $C_{16}H_{17}O_9^-$ ,  $m/z$  353,08670) y ( $C_7H_{11}O_6^-$ ,  $m/z$  191,05501) y, en los espectros de masas de los ácidos di-cafeoilquínicos (dCQA,  $C_{25}H_{24}O_{12}$ ,  $m/z$  515,11840), como el ácido 3,5-dCQA, se observaron los iones-producto  $C_{16}H_{17}O_9^-$ ,  $m/z$  353,08670) y ( $C_7H_{11}O_6^-$ ,  $m/z$  191,05501). También se registró en los espectros de masas de los ácidos di- y tri-cafeoilquínicos el ion  $m/z$  335,07614 con fórmula  $C_{16}H_{15}O_8$ , que se generó a partir del ion  $m/z$  353 por la pérdida de una molécula de agua. Los iones-fragmento  $m/z$  191 ( $C_7H_{11}O_6$ ) y  $m/z$  179 ( $C_9H_7O_4$ ) correspondieron a las señales de las moléculas deprotonadas de los ácidos quínico y cafeico, respectivamente; las señales  $m/z$  161 y 135 probablemente se generaron a partir del ion  $m/z$  179 por la pérdida de moléculas de agua y dióxido de carbono, respectivamente. Estos compuestos han sido reportados no sólo en la especie *A. saturojoides* sino en otras especies pertenecientes al mismo género (Grassi-Zampieron *et al.*, 2010).

En los extractos de ambas especies de *Achyrocline* se identificó de manera tentativa el ácido tricafeoilaltrárico. En el espectro de masas del compuesto (HCD: 10 eV), se observó el ion

deprotonado  $[M-H]^-$   $m/z$  695 con fórmula  $C_{33}H_{28}O_{17}$  y, dos pérdidas sucesivas de 162 unidades con fórmula  $C_9H_6O_3$ , que se identificaron como fragmentos de ácido cafeico. El ion-fragmento  $m/z$  209 con fórmula  $C_6H_9O_8$  fue compatible con la del ácido altrárico deprotonado (Bouzabata *et al.*, 2022). El ácido tricafeoilaltrárico no ha sido reportado en plantas del género *Achyrocline*, pero si en otras plantas de la familia de las *Asteráceas* como la *Smallanthus sonchifolius* (Takenaka *et al.*, 2003).

### Figura 7

*Estructura química base de los flavonoides.*



Los flavonoides fueron otra familia de compuestos detectados en los extractos de las plantas estudiadas, su estructura química básica consiste en un esqueleto carbona  $C_6-C_3-C_6$ , donde los componentes  $C_6$  son anillos aromáticos (anillo A y B) unidos por tres átomos de carbono que forman un tercer anillo pirano o pirona (anillo C) (Véase **Figura 7**). En los espectros de masas se observaron patrones de fragmentación característicos para los principales subgrupos de estos compuestos fenólicos, que incluyeron la pérdida de moléculas neutras como hexosas ( $C_6H_{10}O_5$ ), hexurónidos ( $C_6H_8O_6$ ), moléculas de  $H_2O$ ,  $CO$ ,  $C_2H_2O$ , grupos metilo ( $CH_3\cdot$ ) y fragmentos generados por la ruptura del anillo C; a continuación, se muestran los iones-producto

característicos para las principales familias de flavonoides detectados en los extractos vegetales estudiados. Se utilizó la nomenclatura propuesta por Ma y colaboradores (1997) para designar los iones-producto identificados en los espectro de masas de las agliconas; las etiquetas  $^{ij}A^+$  y  $^{ij}B^+$  hicieron referencia a los fragmentos que contuvieron los anillos A y B intactos, respectivamente; los superíndices i y j indicaron los enlaces que se rompieron del anillo C.

Solo en los extractos de las plantas estudiadas del género *Achyrocline* se detectaron flavonoles, de los cuales tres fueron compuestos mono-glicosilados y uno di-glicosilado, y algunas agliconas metiladas. En los espectros de masas de estos compuestos se observó la pérdida de moléculas neutras de azúcares que pudo ser una hexosa ( $C_6H_{10}O_5$ ,  $m/z$  162,05227) o un hexurónido ( $C_6H_8O_6$ ,  $m/z$  176,03153) (Véase **Figura 9**) para generar el ion-producto de la respectiva aglicona. En el caso de las agliconas metiladas se observó una pérdida de 15 unidades correspondiente al grupo metilo como radical  $[CH_3]^\cdot$ . Estos grupos sustituyentes en los flavonoles suelen estar en las posiciones R<sub>3</sub> o R<sub>5</sub> (Cuyckens y Claeys, 2004). Los patrones de fragmentación de los flavonoles detectados en los extractos estudiados han sido previamente reportados por Cuyckens y col. (2000) y Ma y col. (1997); los investigadores mencionan que los flavonoles se caracterizan por la presencia de los iones-fragmento  $^{0,2}A^+$  y  $^{0,2}B^+$ , que pueden generarse a partir de la protonación de las posiciones C3 y C2, seguido de una ruptura de los enlaces 0 y 2 del anillo C; otro de los iones característicos de los flavonoles es el ion-fragmento  $^{1,3}A^+$ , que probablemente se forma por una escisión entre el C1 y C3 cuando se protona el C3 y del átomo de oxígeno del éter del anillo C.

En el extracto de *L. colombiana* se detectaron principalmente flavonas, como la apigenina, la luteolina y algunos derivados glicosilados. En los espectros de masa de los compuestos glicosilados se observaron los iones que se generaron a partir de la pérdida de la molécula de su respectivo azúcar; el ion pico de base correspondió a la aglicona. A diferencia de los flavonoles,

en los espectros de masas de las agliconas de las flavonas se observan los iones característicos  $^{1,3}A^+$  y  $^{1,3}B^+$  y no se observa la señal del ion  $^{0,2}A^+$  (Ma *et al.*, 1997) (Véase **Figura 10**). También se identificaron algunas flavonas metiladas como la nepetina, cirsimaritina y la salvigenina. En los espectros de masa de estas moléculas se observa una pérdida de 15 unidades correspondientes al radical metilo ( $CH_3$ ), seguido de la pérdida de algunas moléculas como CO y  $H_2O$ .

En los extractos estudiados se detectaron dos flavanonas. El eriodictiol se detectó solo en el extracto de *A. saturojoides* y la naringenina en el extracto de *L. colombiana*. Los espectros de masa de estos dos compuestos se caracterizan por la presencia del ion pico de base  $^{1,3}A^+$  en  $m/z$  153,01810 (100%) con fórmula  $C_7H_5O_4$  ) junto con el ion complementario  $^{1,3}B^+$ , que se genera por la pérdida del anillo B, producto de una fragmentación de tipo retro Diels-Alder (Fabre *et al.*, 2001). También se observa el ion  $^{1,4}B^+$  que se genera a partir de la ruptura de C1 y C4 del anillo C (Véase **Figura 11** ). Fabre y col. (2001) reportaron también estos fragmentos en los espectros de masas del eriodictiol y la naringenina, obtenidos en modo de adquisición de iones negativos.

La irisolidona es una isoflavona metilada, que se detectó como un compuesto glicosilado en el extracto de *L. colombiana*. En el espectro de masas de este compuesto se observó el ion pico de base  $[M+H-C_6H_8O_6]^+$  ( $C_{17}H_{15}O_6$ ,  $m/z$  315,08582) que correspondió a la aglicona; seguido a esta señal se observó el ion-fragmento  $m/z$  300,06384 producido por la pérdida del grupo metilo.

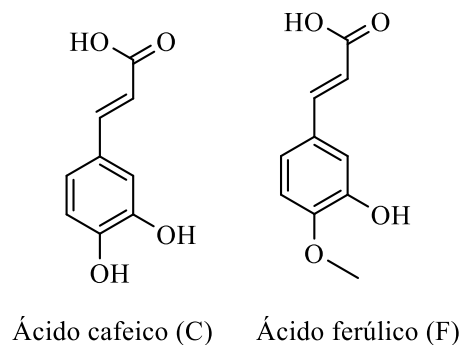
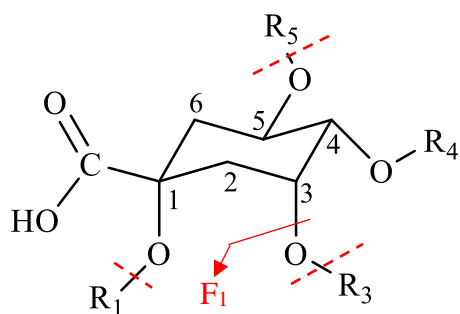
Finalmente, los compuestos identificados como feniletanoides glicosilados fueron detectados sólo en el extracto de *L. colombiana*. Estos compuestos han sido identificados en otras plantas del mismo género y conforman una de las principales familias de las especies de *Lantana* (Sousa y Costa, 2012). Estructuralmente estos metabolitos secundarios se caracterizan por tener fragmentos de ácidos cinámicos, como el ácido cafeico, e hidroxifeniletano unidos a una  $\beta$ -glucopiranososa a través de enlaces éster y glucosídico, respectivamente. Los azúcares como

ramnosa, xilosa, apiosa y otras, también pueden unirse al residuo de glucosa y, en la mayoría de los casos conforma la estructura base de la molécula (Jimenez y Riguera, 1994). En la **Figura 12** se muestra el esquema general de fragmentación de los feniletanoides glicosilados identificados.

En estos compuestos los fragmentos del ácido hidroxicinámico son los grupos más lábiles; por ejemplo, en los espectros de masas de las moléculas identificadas en el extracto de *L. colombiana* estudiado se observó el ion-fragmento  $C_9H_5O_3^-$  en  $m/z$  161,02332 (30-100 %) que correspondió al ion del ácido cafeico deshidratado  $[C_9H_7O_4-H_2O]^-$  (Keefover-Ring *et al.*, 2014). Julião y col. (2009) reportó la presencia de isómeros de fucatósido, incluyendo el fucatósido B, en extractos etanólicos obtenidos de las hojas de *L. fucata*.

**Figura 8**

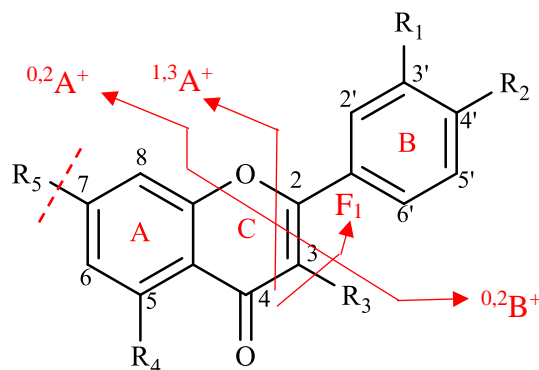
*Fragmentos principales y característicos encontrados en los espectros de masas de los ácidos hidroxicinámicos de tipo éster detectados en los extractos obtenidos de A. saturojoides y A. bogotensis.*



Compuesto	Sustituyentes					HCD, eV	Iones fragmento, m/z (I %)				
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>		[M-H] <sup>-</sup>	[(M-H)-R <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	[(M-H)-R <sub>3</sub> -R <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	[(M-H)-R <sub>3</sub> -R <sub>5</sub> -R <sub>1</sub> ] <sup>-</sup>	F <sub>1</sub>
Ácido clorogénico (ácido 3-O-cafeoilquínico)	H	H	C	H	H	20	353,08810 (2)	191,05554 (100)	-		179,03444 (1)
Isómero de ácido feruloilquínico	H	H	F	H	H	10	367,10342 (34)	191,05550 (100)	-		193,04980 (9)
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	H	H	C	H	C	20	515,11963 (4)	353,08792 (100)	191,05553 (53)	-	179,0343 (29)
Isómero del ácido tricafeoilquínico	C	H	C	H	C	30	677,15131 (2)	515,11987 (14)	353,08810 (89)	191,05553 (37)	179,03430 (82)

**Figura 9**

*Fragmentos principales y característicos encontrados en los espectros de masas de los flavonoles detectados en los extractos obtenidos de A. saturojoides y A. bogotensis.*

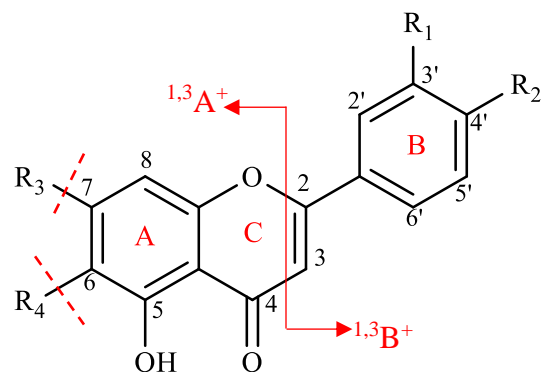


Compuesto	Sustituyentes					HCD, eV	Iones fragmento, m/z (I %)					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>		[M+H] <sup>+</sup>	F <sub>1</sub>	[(M+H)-R <sub>3</sub> -R <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	<sup>0,2</sup> A <sup>+</sup>	<sup>0,2</sup> B <sup>+</sup>	<sup>1,3</sup> A <sup>+</sup>
Isómero de kaempferol dihexósido	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	20	611,16113 (1)	449,10709 (20)	287,05457 (100)	-	-	-
Kaempferol 3-O-galactósido	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	OH	60	4479,10724 (13)	287,05469 (100)	-	-	-	153,01817 (14)
Isómero de quercetina hexurónido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	OH	OH	50	479,08121 (16)	303,04956 (100)	-	165,01817 (5)	137,02327 (5)	153,01819 (5)
Isómero de quercetina hexósido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	OH	OH	60	465,10196 (10)	303,04935 (100)	-	165,01808 (15)	137,02321 (24)	153,01807 (32)
Quercetina	OH	OH	OH	OH	OH	50	303,04993 (100)	-	-	165,01808 (14)	137,02321 (22)	153,01807 (27)
Metilquercetina	OH	OH	CH <sub>3</sub>	OH	OH	50	317,06512 (10)	302,04166 (100)	-	-	137,02328 (3)	-

\*El patrón de fragmentación fue de la molécula deprotonada [M-H]<sup>-</sup>.

**Figura 10**

*Fragmentos principales y característicos encontrados en los espectros de masas de los flavonas detectadas en los extractos obtenidos de A. saturejoides, A. bogotensis y L. colombiana.*

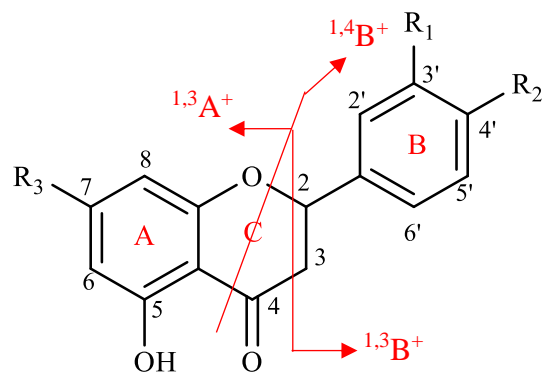


Compuesto	Sustituyentes				HCD, eV	Iones fragmento, m/z (I %)				
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>		[M+H] <sup>+</sup>	[(M+H)-R <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	[(M+H)-R <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	<sup>1,3</sup> A <sup>+</sup>	<sup>1,3</sup> B <sup>+</sup>
Luteolina	OH	OH	OH	H	60	287,05457 (<1)	-	-	153,01811 (44)	135,04401 (20)
Luteolina 7-glucósido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	H	50	449,14264 (4)	287,05466 (100)	-	153,01805 (2)	-
Luteolina 7-O-glucurónido	OH	OH	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	H	10	463,08664 (100)	287,05460 (34)	-	-	-
Apigenina*	H	OH	OH	H	50	269,04562 (66)	-	-	151,00281 (41)	117,03358 (100)
Apigenina 7-glucurónido	H	OH	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	H	20	447,08994 (16)	271,05963 (100)	-	-	-
Nepetina	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	40	317,06525 (<1)	-	302,04184 (100)	-	-
Cirsimaritina	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	40	315,08597 (<1)	300,06259 (46)	-	-	-
Salvigenina	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	40	329,10156 (100)	314,07794 (36)	-	-	-

\*El patrón de fragmentación fue de la de la molécula deprotonada [M-H]<sup>-</sup>.

**Figura 11**

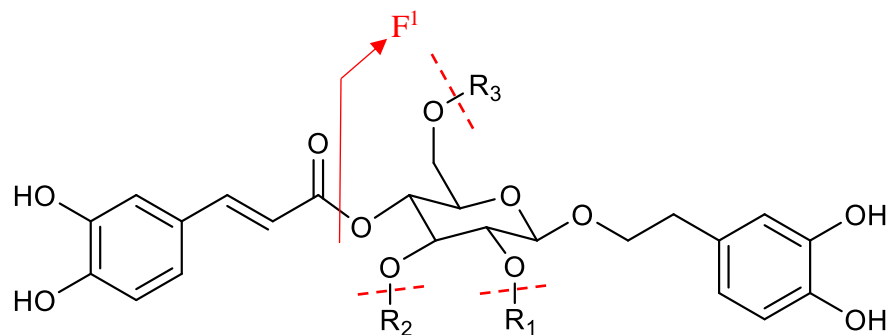
*Fragmentos principales y característicos encontrados en los espectros de masas de las flavanonas detectados en los extractos obtenidos de A. saturojoides, A. bogotensis y L. colombiana.*



Compuesto	Sustituyentes			HCD, eV	Iones fragmento, m/z (I %)			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		[M+H] <sup>+</sup>	<sup>1,3</sup> A <sup>+</sup>	<sup>1,3</sup> B <sup>+</sup>	<sup>1,4</sup> B <sup>+</sup>
Naringenina	H	OH	OH	40	273,07538 (24)	153,01816 (100)	119,04923 (8)	147,04398 (57)
Eriodictiol	OH	OH	OH	40	287,02014 (10)	151,00276 (47)	135,04417 (100)	-

**Figura 12**

*Fragmentos principales y característicos encontrados en los espectros de masas de los feniletanoides glicosilados detectados en el extracto de L. colombiana.*



Compuesto	Sustituyentes			HCD, eV	Iones fragmento, m/z (I %)					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		[M-H] <sup>-</sup>	F <sup>1</sup>	[F <sup>1</sup> -R <sub>1</sub> ] <sup>-</sup>	[F <sup>1</sup> -R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	[F <sup>1</sup> -R <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	[F <sup>1</sup> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
Forsitósido B	H	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	30	755,24213 (14)	593,20929 (52)	-		461,16727 (7)	315,10907 (3)
Fucatósido B	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	H	30	741,22522 (7)	579,19348 (66)	447,15109 (9)	315,10904 (6)	-	-
Conandrósido	H	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	H	20	609,18280 (100)	447,15088 (45)	-	-	315,10913 (1)	-
Verbascósido	H	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	H	20	623,19824 (100)	461,16675 (17)	-	-	315,10907 (3)	-

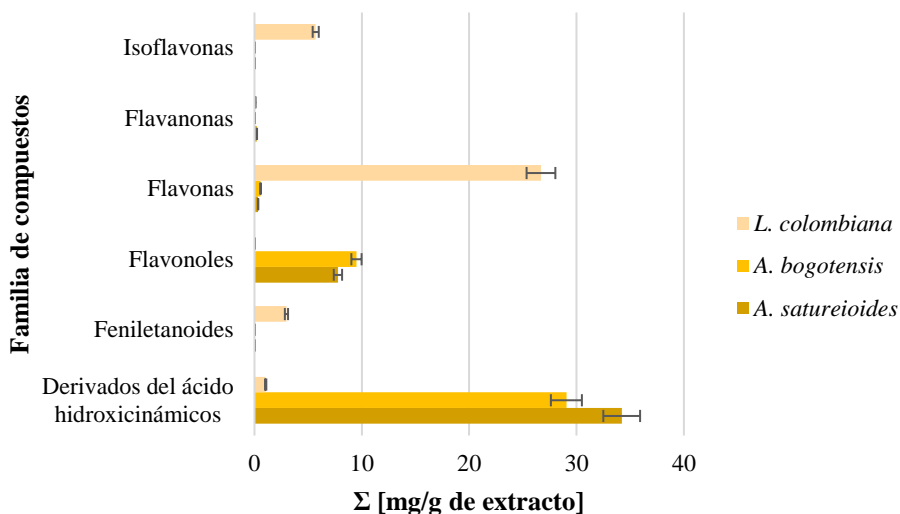
**4.3.2.2 Composición de compuestos fenólicos en los extractos de las plantas bajo estudio.** El contenido de compuestos fenólicos se determinó por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS en modo de operación SIM, usando el método de calibración externa. Para las sustancias identificadas de manera tentativa los resultados de la cuantificación se expresaron como equivalentes de la sustancia-patrón de referenica que se disponía y que tenía la similitud estructural con el analito de interés. Las ecuaciones de las curvas de calibración se reportaron en la **Tabla 9**.

En la **Tablas H1 y J1**, aparecen las cantidades de los compuestos fenólicos (mg /g de extracto), identificados en los extractos hidroalcohólicos de las plantas bajo estudio que tuvieron el valor de SPF *in vitro* más alto. En las **Tablas A1-3 del Apéndice A** se encuentra resaltado el extracto que se utilizó de cada matriz vegetal para la cuantificación de los compuestos fenólicos. En la **Figura 13** se presenta la distribución de las diferentes familias de compuestos fenólicos identificados en las tres especies bajo estudio.

Los derivados de ácidos hidroxicinámicos fueron la familia predominante en los extractos hidroalcohólicos de *A. saturejoides* (80 %) y *A. bogotensis* (74 %). El ácido 3,5-dicafeoilquínico junto con el isómero de ácido dicafeoilquínico ( $C_{25}H_{24}O_{12}$ ,  $[M-H]^-$   $m/z$  515,11963), clasificados como ésteres de ácidos cafeico y quínico (Clifford *et al.*, 2005), fueron los compuestos mayoritarios en los extractos de ambas especies vegetales (**Apéndice H, Tabla H1**). Los ácidos hidroxicinámicos, clorogénico, 3,5-dicafeoilquínico y derivados han sido reportados en *A. saturejoides* (Retta *et al.*, 2012) y en otras especies del mismo género como *A. alata* (Grassi-Zampieron *et al.*, 2010), *A. flaccida* y *A. tomentosa* (Lopez *et al.*, 2007).

**Figura 13**

*Distribución por familia de compuestos, detectados por UHPLC-ESI-Orbitrap-MS, en los extractos hidroalcohólicos de las plantas estudiadas.*



Los flavonoles se detectaron únicamente en los extractos de las plantas del género *Achyrocline* estudiadas; en los extractos de *A. saturejoides* y *A. bogotensis* representaron el 18 % y el 24 %, respectivamente, de la composición total de los compuestos fenólicos identificados; en su mayoría fueron derivados de quercetina. En el extracto de *A. bogotensis* se detectaron en mayor proporción flavonoles en forma de aglicona; la metilquercetina fue el flavonol más abundante (6,5 mg/g); para el caso del extracto de *A. saturejoides* fue el isómero de quercetina hexósido (3 mg/g).

Hasta la fecha, no se encontraron reportes en la literatura sobre la composición y cuantificación sobre flavonoides en los extractos de *A. bogotensis*, pero si hay algunos estudios reportados para extractos de *A. saturejoides*. De Souza y col. (2002) identificaron y cuantificaron la quercetina, luteolina y 3-metilquercetina en extractos hidroalcohólicos obtenidos de inflorescencias de *A. saturejoides*, los autores utilizaron etanol como solvente (40-80 %, v/v). La

cantidad de estos compuestos fue más alta que la encontrada en los extractos de las especies estudiadas en este extracto; sin embargo, la cantidad de quercetina (1,6 mg/g) en el extracto de *A. saturejoides* estudiado fue diez veces mayor que el reportado por Goltz y col. (2018) (0,1 mg/g).

El género de *Lantana* comprende más de 15 especies de las que se han aislado una gran variedad de metabolitos secundarios. Los estudios realizados por Hussain *et al.* (2011), Sousa *et al.* (2012) y de Sena Filho *et al.* (2012) reportaron la presencia de terpenoides, flavonoides, feniletanoides glicosilados y estereoides. Esta investigación es el primer reporte de composición química de un extracto hidroalcohólico obtenido de la especie *L. colombiana*. Las flavonas fueron los compuestos mayoritarios detectados y representaron el 73 % de la composición química total; seguido de la isoflavona (16 %) y los feniletanoides glicosilados (8 %).

La luteolina, luteolina-glicosilados, apigenina y apigenina-glicosilados y flavonas metiladas como la nepetina, la cirsimaritina y la salvigenina fueron algunas de las flavonas identificadas en el extracto. Estos compuestos fenólicos también se han encontrado en otras especies del mismo género; Nagaoy col. (2002) encontraron apigenina y derivados metilados en extractos obtenidos de hojas de *L. montevidensis*. Julião y col. (2009) identificaron salvigenina en extractos obtenidos de hojas de *L. fucata*.

Los feniletanoides glicosilados, comprenden una de las familias características del género *Lantana*, estos compuestos se cuantificaron como equivalente de ácido cafeico; el Forsitósido B fue el feniletanoide mayoritario en el extracto de *Lantana* estudiado. Sousa y col. (2012) reportan cerca de 17 de estos compuestos detectados en diferentes plantas del género; el verbascósido es uno de los compuestos más reportados, se ha identificado en *L. camara* (Herbert *et al.*, 1991), *L. multiflora* (Taoubis *et al.*, 1997), *L. radula* y *L. trifolia* (Sena Filho *et al.*, 2009).

#### 4.4 Actividad biológica de los extractos hidroalcohólicos de las especies bajo estudio

##### 4.4.1 Evaluación de la capacidad fotoprotectora

Se determinaron tres parámetros de fotoprotección *in vitro*: el factor de protección solar por el método de Mansur (SPF *in vitro*), la longitud de onda crítica ( $\lambda_c$ ) y la relación UVA1/UV, con el fin de obtener información sobre las posibles características de protección de los extractos hidroalcohólicos de las plantas estudiadas frente a la radiación UVB (290-320) y UVA de longitud de onda corta (320-340 nm). En el **Apéndice L** se muestran los resultados.

El SPF es uno de los parámetros utilizados a nivel mundial como un indicador que determina el nivel de protección que tiene una sustancia frente a los rayos ultravioleta eficaces para causar enrojecimiento en la piel, que, en gran parte, este efecto está confinado a la radiación UVB (290-320 nm) y UVA de longitud de onda corta (320-340 nm) (Food and Drug Administration, 2023). En la **Tabla L1-Apéndice L** aparecen los valores de SPF *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de las tres especies estudiadas, que fueron obtenidos bajo distintas condiciones de extracción. Los valores de SPF *in vitro* estuvieron en el rango de 7,3 y 17,0. Según la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (ANVISA), una sustancia con  $SPF \geq 6$  es aceptada para emplearse como ingrediente en productos fotoprotectores (ANVISA, 2023) , siempre y cuando no sea tóxica (citotóxica, genotóxica, etc) o alergénica. Por tanto, los extractos de las especies estudiadas en esta investigación, obtenidos en cualquiera de las condiciones de extracción descritas en el **Apéndice L**, podrían ser considerados como ingredientes en productos fotoprotectores promisorios, si carecen también de las toxicidades mencionadas anteriormente.

De cada matriz vegetal se obtuvo un extracto con un valor más alto de SPF; en los extractos de *A. bogotensis* ese valor fue de 17,0, seguido de *A. saturejoides* (15,3) y *L. colombiana* (14,4). Las condiciones en las que se obtuvieron cada uno de estos extracto fueron diferentes. Según las

categorías establecidas en las guías de la *European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* (COLIPA, 2011) y de la *Food and Drug Administration* de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, 2011), los extractos hidroalcohólicos de *A. bogotensis* (17,0) y *A. saturojoides* (15), al haber presentado valores de SPF mayores de 14,9, se catalogarían como agente de protección media. Un protector solar con SPF mayor de 15 puede bloquear hasta el 93 % de los rayos UVB (Kumar *et al.*, 2017), esto indica que los extractos bajo estudio podrían ser productos naturales útiles para aumentar la protección de la piel contra la radiación UVB y UVA de longitud de onda corta.

La relación UVA1/UV es un criterio propuesto por la FDA para garantizar que los productos utilizados como bloqueadores solares puedan cubrir la parte larga del espectro UVA (340-400 nm) (Moyal, 2010), ya que existen estudios que demuestran que la sobre-exposición a esta radiación puede ocasionar inmunosupresión y envejecimiento de la piel (Burke y Wei, 2009). Los valores de la relación UVA1/UV obtenidos de los extractos estudiados comprendieron un rango de 0,54 y 0,74, es decir, podrían presentar una protección entre media y alta, frente a la radiación de longitud de onda larga UVA. El extracto de *L. colombiana* (0,74) presentó el valor de relación UVA1/UV más alto entre los extractos con el SPF estudiados; por tanto, se podría catalogar como un agente de protección alta frente a la radiación UVA1.

La longitud de onda crítica ( $\lambda_c$ ) es otro parámetro considerado como una medida para la evaluación de los agentes de protección solar frente a la radiación UVA. De acuerdo con la FDA (Food and Drug Administration, 2011), la longitud de onda crítica se define como la longitud de onda en la que el área bajo la curva de la absorbancia total de la muestra, entre  $\lambda = 290$  nm y  $\lambda = 240$  nm, corresponde a un 90 %. Los productos de protección solar se clasifican como sustancias de “amplio espectro” cuando su longitud de onda crítica es superior o igual a  $\lambda = 370$  nm (Wang *et*

*al.*, 2008). Con los resultados reportados en la **Tabla L1**, se observa que la mayoría de los extractos hidroalcohólicos obtenidos de *A. saturejoides* y *L. colombiana* presentaron una  $\lambda_c \geq 370$  nm, contrario a los extractos obtenidos de *A. bogotensis* en el que uno de los extractos podría considerarse como un producto natural de amplio espectro.

Los extractos hidroalcohólicos de las plantas estudiadas absorbieron en el rango UVB (290-320 nm), UVA de longitud de onda corta (320-340 nm) y parte del rango UVA de longitud de onda larga (340-400 nm). Las longitudes máximas de absorción de los extractos fueron 298 nm, 307 nm y 303 nm para *A. satureiodes*, *A. bogotensis* y *L. colombiana*, respectivamente; estas longitudes de onda son cercanas a las de los filtros comerciales UVB como el octilmetoxicinamato ( $\lambda_{\text{máx}} = 308$  nm), el ácido 4-aminobenzoico (PABA) ( $\lambda_{\text{máx}} = 277$  nm) (Serpone *et al.*, 2002), la benzofenona-5 ( $\lambda_{\text{máx}} = 286$  nm-323 nm) y el octocrileno ( $\lambda_{\text{máx}} = 304$  nm) (Shaath, 2010).

Las propiedades fotoprotectoras de los productos naturales se atribuyen a la presencia de sustancias con la capacidad de absorber la radiación UV o que actúan como antioxidantes (Radice *et al.*, 2016). Estos compuestos en las plantas se encuentran ubicados de manera óptima cerca o dentro de los sitios de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) para reducir el daño oxidativo inducido por la luz (Agati *et al.*, 2010). En los extractos de las plantas estudiadas del género *Achyrocline* se detectaron varios ácidos hidroxicinámicos, ésteres de ácido cafeico y flavonoles como la quercetina y derivados glicosilados, que poseen propiedades antioxidantes y fotoprotectoras (Svobodová *et al.*, 2003). La actividad protectora de estos compuestos en distintas plantas ha sido estudiada y se ha observado que existe un aumento en la proporción de estos compuestos considerados “antioxidantes efectivos” frente a los “antioxidante poco efectivos” como el kaempferol, la apigenina y sus derivados glicosilados en plantas expuestas a altos niveles de radiación UVB o luz solar (Ryan *et al.*, 1998; Markham *et al.*, 1998; Gerhardt *et*

*al.*, 2008). Esto explica el porqué los extractos de *A. saturejoides* y *A. bogotensis* presentaron valores más altos en los índices de fotoprotección calculados que el extracto de *L. colombiana*.

Hasta ahora, no se encontraron estudios sobre la actividad fotoprotectora de los extractos hidroalcohólicos de *A. bogotensis* y *L. colombiana*; es probable que esta investigación sea el primer reporte sobre la capacidad fotoprotectora de estas plantas.

Se encontraron estudios sobre la capacidad fotoprotectora de los extractos de *Achyrocline saturejoides*. Morquio *et al.* (2005) incorporaron en una base cosmética (2% de extracto, p/p) extractos hidroalcohólicos obtenidos de las partes aéreas de *A. saturejoides* (95%, v/v, etanol). La base se aplicó sobre la piel de la espalda de conejos antes de exponerla a radiación UVA; los investigadores evaluaron el potencial fotoprotector como una medida de la capacidad del extracto para controlar la producción de radicales hidroxilo (OH<sup>·</sup>) cuantificando el ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA). Los autores observaron una disminución significativa de la concentración del ácido 2,3-DHBA, cuando aplicaron la base cosmética que contenía el extracto de *A. saturejoides*.

Balestrin y col. (2016) evaluaron el efecto protector contra el daño cutáneo en piel (oreja) de porcino, inducido por los rayos UV (UVA y UVB) de un hidrogel que contenía nanoemulsiones hechas con extractos hidroalcohólicos (80%, v/v, etanol) de *A. saturejoides*. Los investigadores demostraron que existe un efecto protector de las formulaciones que contenían el extracto ya que los resultados de la cuantificación de proteínas carboniladas, causadas por daño oxidativo, en piel irradiada y tratada con el hidrogel fueron comparables con los resultados obtenidos en piel no irradiada.

#### ***4.4.2 Capacidad antioxidante e identificación de compuestos antioxidantes en los extractos de las plantas bajo estudio***

Los compuestos fenólicos son los antioxidantes muy efectivos de fuentes naturales. Estas sustancias se caracterizan por tener grupos fenilo, acilo (alilo o aliloxi), hidroxilo, o fenoles que contienen anillos aromáticos, como los ácidos hidroxicinámicos y benzoicos, las antocianinas y los flavonoides. La presencia de estos grupos en su estructura química los convierte en compuestos multifuncionales, que pueden actuar, ya sea como agentes reductores, antioxidantes donadores de hidrógeno o electrones o como agentes quelantes (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Actualmente, existen diversos métodos *in vitro*, con distintos enfoques, que permiten exhibir si una sustancia podría o no ser considerada como un compuesto antioxidante. Dada la complejidad química de las matrices vegetales, en esta investigación, se decidió enfocar el estudio y la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos como agentes “atrapadores” de radicales libres. Para esto, se emplearon dos ensayos: (1) el método de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup>, en el que se evaluó la capacidad antirradicalaria total del extracto y (2) el método *on-line* HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup>, con el que se pudo evaluar la actividad antirradicalaria de los distintos compuestos presentes en los extractos estudiados.

El análisis *on-line* HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup>, hace parte de los métodos en los que se llevan a cabo en paralelo reacciones químicas para identificar y cuantificar los compuestos activos presentes en una mezcla compleja (Niederländer *et al.*, 2008). La contribución a la capacidad antioxidante de cada uno de los compuestos identificados se observa como una señal negativa a una  $\lambda = 734$  nm, debido a la disminución en la absorbancia del catión-radical ABTS<sup>+</sup> por acción de un compuesto antioxidante a través del mecanismo de acción de transferencia de electrones (Koleva *et al.*, 2001). En los **Apéndices M-O** se muestran los resultados de la capacidad

antioxidante de los extractos y de los compuestos identificados. La identificación de los compuestos se realizó con base en la comparación de sus tiempos de retención ( $t_R$ ) y espectros ultravioleta con los de sustancias-patrón de ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonas, flavonoles, flavanonas y ésteres de ácido cafeico, también se usaron los datos reportados en la literatura (Grassi-Zampieron *et al.*, 2010; Mabry *et al.*, 1970; Sousa *et al.*, 2012). Los resultados de la actividad antioxidante se expresaron como  $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de extracto y se determinó el aporte de cada uno de los compuestos presentes en los extractos a su capacidad antioxidante.

**Tabla 10**

*Actividad antioxidante medida por el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup> de los extractos hidroalcohólicos estudiados.*

<b>Especie</b>	<b>Actividad antioxidante, <math>\mu\text{mol de Trolox}^{\text{®}}/\text{g}</math> de muestra (<math>\bar{x} \pm s, n=3</math>)</b>
<i>Achyrocline saturejoides</i>	636 $\pm$ 3
<i>Achyrocline bogotensis</i>	860 $\pm$ 31
<i>Lantana colombiana</i>	333 $\pm$ 3
BHT	5200 $\pm$ 194
$\alpha$ -Tocoferol	2320 $\pm$ 36

\*Evaluado a 100 mg/L.

Los extractos hidroalcohólicos tuvieron una actividad antioxidante, medida por el ensayo ABTS<sup>+</sup>, entre el 333 y 636  $\mu\text{mol de Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$  de muestra. La actividad antirradicalaria de los extractos de las plantas del género *Achyrocline* fue dos veces mayor que la del extracto de *Lantana*. El extracto de *A. bogotensis* presentó el valor más alto de la actividad antioxidante, pero menor que el obtenido por los antioxidantes de referencia comerciales BHT y  $\alpha$ -tocoferol.

Sobre *L. colombiana*, no se encontró información relacionada con la actividad antioxidante de sus extractos hidroalcohólicos. Sin embargo, se hallaron algunos estudios sobre *L. cámara* y *L. montevidensis* que son especies del mismo género. Mahdi-Pour y col. (2012) investigaron la actividad antioxidante por el método de DPPH<sup>·</sup> de extractos metanólicos de varias partes de *L. cámara*. Los resultados mostraron que los extractos obtenidos de la parte aérea de la planta presentaron mayor potencial antioxidante, especialmente, en los extractos obtenidos de las hojas, y lo correlacionaron con el alto contenido de compuestos fenólicos totales.

Barros y col. (2017) determinaron la actividad antioxidante por el método DPPH<sup>·</sup> de extractos hidroalcohólico (etanol) y acuoso de hojas de *L. montevidensis*. Según los valores que obtuvieron de IC<sub>50</sub>, la capacidad para eliminar el radical DPPH<sup>·</sup> del extracto acuoso fue dos veces mayor que la del extracto hidroalcohólico (108 µg/mL y 290,5 µg/mL, respectivamente).

No se encontraron registros científicos en las bases de datos *Scopus (Elsevier)* sobre la actividad antioxidante de *A. bogotensis*, aunque hay reportes sobre la actividad antirradicalaria de extractos de *A. saturejoides*, que es una planta que pertenece al mismo género. Salgueiro y col. (2016) estudiaron la actividad antioxidante por el método de ABTS<sup>+</sup> de extractos acuosos de flores de *A. saturejoides*. Los investigadores observaron que, a bajas concentraciones, la infusión presentaba una alta actividad antirradicalaria (IC<sub>50</sub>= 66,5 µg/mL).

Dentro de los compuestos identificados en las matrices vegetales bajo estudio se observó que los derivados del ácido hidroxicinámico fueron los compuestos más abundantes en los tres extractos y los responsables de más del 60 % de la actividad antioxidante total. Uno de los derivados del ácido hidroxicinámico, identificado de manera confirmatoria en los extractos de *Achyrocline*, fue el ácido 3,5-dicafeoilquínico, que aportó más del 20 % del potencial antioxidante total (Véansen **Tablas M1-Apéndice M** y **N1-Apéndice N**).

Se evidenció también que los flavonoles (quercetina y derivados glicosilados), detectados previamente por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS, fueron responsables de la actividad antioxidante de los extractos de *A. saturejoides* (13 %), *A. bogotensis* (17 %) y *L. colombiana* (21 %). La quercetina (7 %) y la quercetina 3-*O*-glucósido (4 %) fueron los principales flavonoles que aportaron a la actividad antioxidante de los extractos de *A. saturejoides* y *A. bogotensis*, respectivamente.

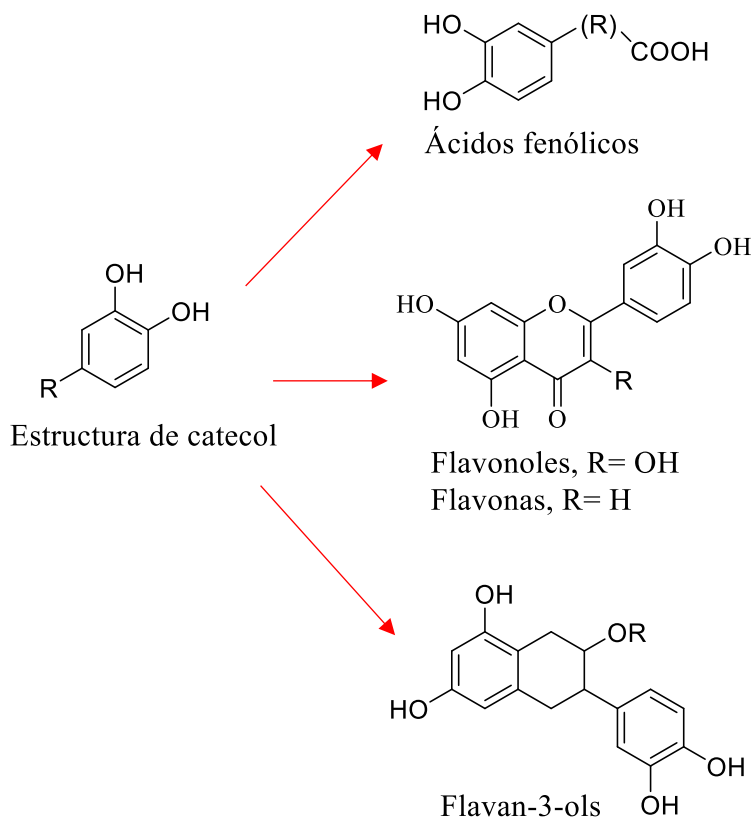
Las flavonas detectadas solamente en los extractos de *A. bogotensis* y *L. colombiana*, y aportaron también a la actividad antioxidante en un 12 % y 10 %, respectivamente. Por la técnica *on line* HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup> no fue posible identificar, de manera confirmatoria algunos de estos compuestos; sin embargo, por LC/MS, con el uso de sustancias-patrón se identificaron en el extracto de *A. bogotensis* la luteolina y luteolina 7-glucósido, y la apigenina y derivados glicosilados en los extractos de *L. colombiana*.

Rösch, *et al.* (2003) mencionaron que, en general, la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es alta cuando en su estructura química tiene la presencia un grupo catecol (Véase **Figura 14**); que tiene la habilidad de formar *o*-quinonas cuando reacciona con especies radicalarias. El ácido clorogénico, los ácidos dicafeoilquínicos y la quercetina tienen en sus estructuras químicas el grupo catecol, estos compuestos aportaron en mayor porcentaje a la actividad antirradicalaria de los extractos estudiados.

La actividad antioxidante de los derivados del ácido hidroxicinámico y sus ésteres depende del número de grupos hidroxilo (Liang *et al.*, 2016). Razzaghi-Asl *et al.*, (2013) mencionan que existe un efecto inductivo de los grupos sustituyentes en el grupo catecol. Los grupos hidroxilo, por ejemplo, reducen la energía del enlace O-H y aumentan la capacidad de captura del átomo de hidrógeno de este tipo de moléculas.

**Figura 14**

*Compuestos fenólicos que contienen en su estructura el grupo catecol.*



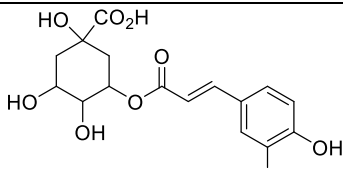
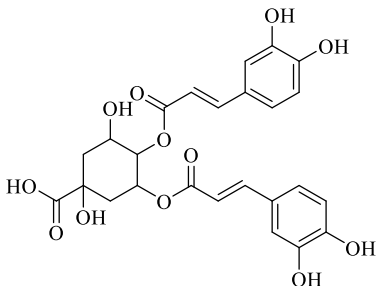
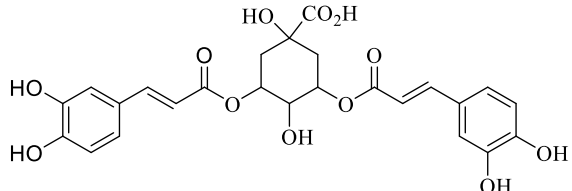
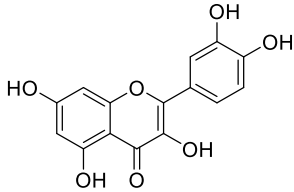
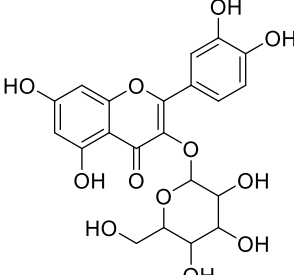
La esterificación de los ácidos hidroxicinámicos disminuye la capacidad acida del fenol y, por tanto, su eficiencia como antioxidante. Cuvelier *et al.* (1992) evaluaron la actividad antioxidante de los ácidos cafeico y clorogénico, el último es un éster de ácido cafeico. Los investigadores observaron que la actividad antioxidante del ácido clorogénico fue menor, sin embargo, en el mismo estudio, evaluaron la actividad antioxidante del ácido rosmarínico, que también es un éster de ácido cafeico, y observaron que el potencial antioxidante fue más alto que la de los ácidos clorogénico y cafeico. La razón de la alta eficiencia antioxidante del ácido rosmarínico se lo atribuyeron a la presencia de dos grupos catecol en su estructura (Shahidi y Chandrasekara, 2010).

Belaouira y col. (2020) mencionan que los derivados del ácido hidroxicinámico de tipo éster que presentan en su estructura dos o más grupos cafeoilato tienen mayor potencial antioxidante que los compuestos con un solo grupo. Esto se debe a que los grupos hidroxilo de estas moléculas contribuyen a la estabilización de especies radicalarias mediante la donación de átomos de hidrógeno y posteriormente se estabilizan como radicales fenoxilo.

La capacidad antioxidante de los flavonoides depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de su estructura química. Según Rice-Evans *et al.* (1996), existen características en la estructura química de los flavonoides que pueden contribuir a la actividad antirradicalaria, entre las cuales figuran las siguientes: a) la estructura *o*-dihidroxi en el anillo B (catecol), que confiere mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de electrones; b) la presencia de un enlace doble en los carbonos 2,3 combinado con la función 4-oxo en el anillo C y c) la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5. La quercetina, es el flavonoide que cumple todas las características mencionadas y por tanto, se considera el antioxidante más efectivo del grupo de los flavonoles. La quercetina en el extracto hidroalcohólico de *A. saturojoides*, fue el compuesto que menos porcentaje de la capacidad antioxidante total aportó (*ca.* 7 %, equivalente a 23  $\mu\text{mol}$  de Trolox®/ g extract), sin embargo, se observa en la **Tabla 11** que la actividad antioxidante de la sustancia-patrón de quercetina fue mayor que la de los ésteres de ácido cafeico evaluados a la misma concentración (20 mg/L).

**Tabla 11**

*Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos que aportaron a la actividad antioxidante de los extractos A. saturejoides, A. bogotensis y L. colombiana.*

Compuesto	Estructura química	$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia
Ácido clorogénico (Éster de ácido cafeico)		6250 ± 78
Ácido 3,4-dicafeoilquínico (Diéster de ácido cafeico)		12790 ± 22
Ácido 3,5-dicafeoilquínico (Diéster de ácido cafeico)		7900 ± 460
Quercetina (Flavonol)		18400 ± 415
Quercetina 3-glucósido (Flavonol)		20400 ± 38

#### 4.4.3 Efecto de la radiación UVA en los extractos de las plantas bajo estudio.

Se evaluó la estabilidad de aquellos extractos hidroalcohólicos de las tres especies estudiadas que tuvieron el valor de SPF más alto. En la **Figura 15** se muestran las gráficas de tiempo de irradiación UVA frente a los valores de SPF para cada extracto.

Kockler y col. (2012) mencionan que se puede considerar un filtro UV estable, si después de un periodo de 2 h de irradiación conserva el 90 % de su capacidad fotoprotectora. Los extractos obtenidos de *A. bogotensis* y *L. colombiana* perdieron menos del 10 % de su capacidad fotoprotectora a las 2 h de irradiación, por tanto, fueron más estables frente a la radiación UVA que el extracto de *A. saturejoides* que perdió el 16 % de su capacidad fotoprotectora en ese periodo de irradiación. El extracto de *A. bogotensis* fue el más estable, ya que después de 4 h de irradiación UVA ( $\lambda = 365$  nm) perdió menos del 10 % de su capacidad fotoprotectora; en este mismo periodo de irradiación, los extractos de *A. saturejoides* y *L. colombiana*, perdieron el 34 % y 13 % de la capacidad fotoprotectora, respectivamente.

La disminución de la capacidad fotoprotectora en los extractos, también se vio reflejada en la disminución de los coeficientes de absorción calculados a las longitudes de absorción máximas respectivas (Véase **Tabla 12**). Estos resultados se reflejan también en la **Figura 15**, en donde se encuentran los espectros de absorción en el rango UV (280-400 nm) de los extractos de las especies estudiadas. Se observó una notable disminución en la absorbancia a las 4 h de irradiación, en los extractos de *L. colombiana* y *A. saturejoides*.

La estabilidad de los compuestos fenólicos puede verse afectada principalmente por factores como la luz o el oxígeno y, también, dependerá de la estructura química (Chaaban *et al.*, 2017). La absorción de luz UV puede inducir reacciones fotoquímicas en estas moléculas, como la isomerización *cis-trans*, la tautomería cetoenólica o la degradación de las moléculas (Kockler

*et al.*, 2012). Choquenot *et al.* (2009) mostraron que a las 2 h de de radiación UVA y UVB, una formulación con ácido clorogénico como principio activo, redujo su capacidad de protección en un 80 % ( $SPF_{0h} = 10,13$  y  $SPF_{2h} = 2,17$ ). Los investigadores mencionan que este decrecimiento puede atribuirse a una reacción de tautomería cetoenólica en la molécula, al igual que sucede con la avobenzona donde el grupo enol cambian después de la irradiación UVA/UVA sin que se degrade la molécula.

**Tabla 12**

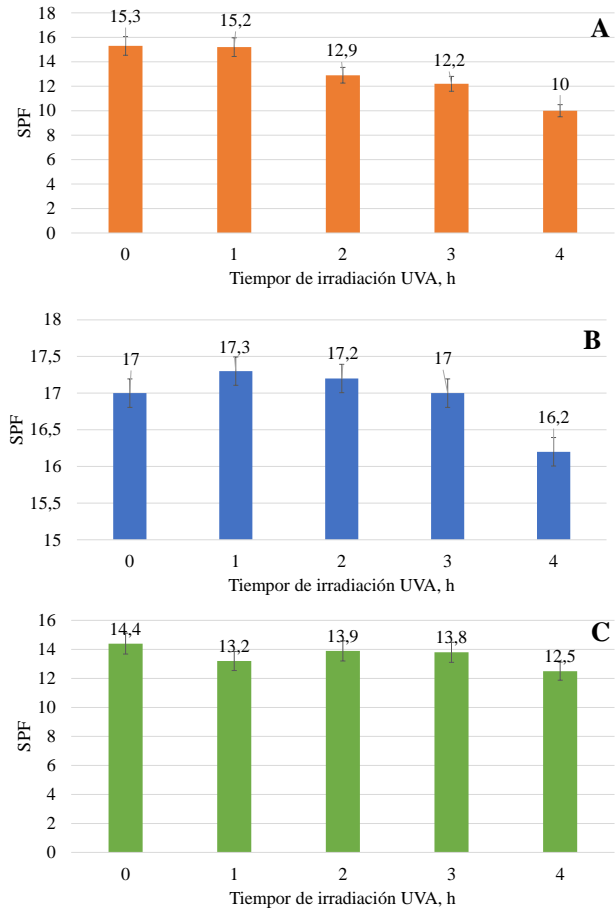
*Coefficientes de absortividad de los extractos hidroalcohólicos de A. saturejoides, A. bogotensis y L. colombiana*

Tiempo de irradiación, h	Coefficientes de absortividad, $\epsilon$ ( $A/cm^{-1}$ (mg de extracto/mL))		
	<i>A. saturejoides</i> $\lambda= 298$ nm	<i>A. bogotensis</i> $\lambda= 307$ nm	<i>L. colombiana</i> $\lambda= 303$ nm
0	7,92	8,91	7,67
1	7,82	8,51	7,11
2	7,23	8,58	6,93
3	6,74	8,44	6,58
4	6,68	8,40	6,07

A las formulaciones con filtros solares orgánicos, frecuentemente, se adicionan compuestos de origen natural para proporcionar a los productos propiedades antioxidantes y mejorar su estabilidad, por ejemplo, los filtros UVA, como la benzofenona-3 y la avobenzona (Parsol), pueden exhibir una fotodegradación y eso limita el desarrollo de filtros solares de amplio espectro (Afonso *et al.*, 2014). de Oliveira y col. (2015) mejoraron la formulación de un filtro UVA con la adición de rutina; este flavonol aumentó la actividad antioxidante de la formulación más de 40 veces en comparación con los filtros UVA solos, sin rutina.

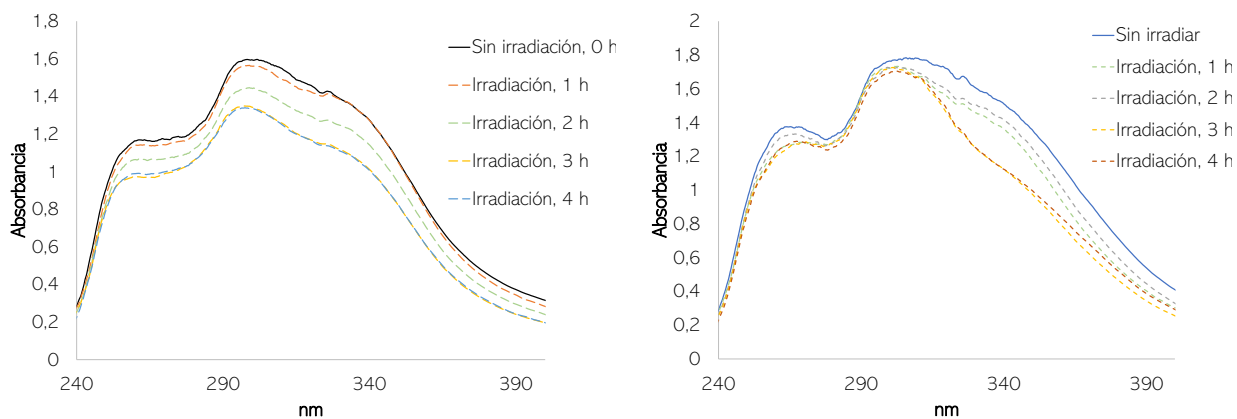
**Figura 15**

*Factor de protección solar obtenido en diferentes periodos de irradiación UVA para los extractos hidroalcohólicos de las plantas estudiadas. A. Extractos de A. saturejoides; B. Extractos de A. bogotensis; C. Extractos de L. colombiana.*



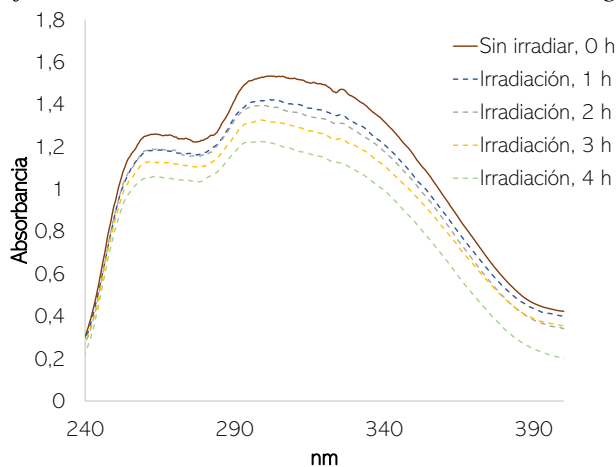
**Figura 16**

*Cambios en los espectros de absorción en la región UV (240-400 nm) de los extractos hidroalcohólicos de las plantas bajo estudio, en función del tiempo de irradiación.*



**A.** Espectros UV del extracto de *A. saturojoide*

**B.** Espectros UV del extracto de *A. bogotensis*



**C.** Espectros UV del extracto de *L. colombiana*

## 5. Conclusiones

Los resultados de este trabajo de investigación, son el primer reporte en Colombia, sobre la composición química y el potencial biológico (antioxidante y fotoprotector) de las especies

*Achyrocline bogotensis* (“cenizo”) y *Lantana colombiana* (“marcela”), y su potencial para ser considerados ingredientes naturales.

Se identificaron por LC/MS 34 compuestos, entre ellos: derivados del ácido hidroxicinámico, ésteres de ácido cafeico, flavonoles, flavonas, isoflavona, flavanonas y feniletanoides. Los ésteres de ácido cafeico y los flavonoles fueron los compuestos mayoritarios en los extractos de *Achyrocline saturejoides* y *A. bogotensis*. En el extracto de *Lantana colombiana* predominaron las flavonas y los feniletanoides. El ácido clorogénico y la luteolina fueron compuestos comunes presentes en los extractos de *A. satureioides*, *A. bogotensis* y *L. colombiana*. El ácido 3,5-dicafeoilquínico fue el compuesto mayoritario en los extractos de *A. satureioides* y *A. bogotensis* (27-30 mg/g de extracto) y una flavona metilada en el extracto de *L. colombiana* (9 mg/ g de extracto).

Los factores de protección solar de los extractos de *A. satureioides*, *A. bogotensis* y *L. colombiana* fueron (SPF > 6) y tuvieron una relación UVA1/UV de protección media y alta (relación UVA1/UV  $\geq$  0,54). Se podrían considerar ingredientes naturales en productos fotoprotectores. Los extractos de *A. bogotensis* (17,0) y *A. satureioides* (15,3) se considerarían, según la FDA, agentes de protección media, y los extractos de *A. saturejoides* ( $\lambda=376$  nm) y *L. colombiana* ( $\lambda=379$  nm) sustancias de amplio espectro. Los extractos de *A. satureioides* y *A. bogotensis* fueron los más estables frente a la radiación UVA ( $\lambda= 365$  nm, 40 mW/cm<sup>2</sup>), ya que conservaron el 90 % de su capacidad fotoprotectora después de 2 h de irradiación.

El extracto de *A. bogotensis* tuvo la actividad antioxidante ( $860 \pm 31 \mu\text{mol}$  de Trolox<sup>®</sup>/g de extracto) más alta, que la de los extractos de *A. saturejoides* ( $636 \pm 3 \mu\text{mol}$  de Trolox<sup>®</sup>/g de extracto) y *L. colombiana* ( $333 \pm 3 \mu\text{mol}$  de Trolox<sup>®</sup>/g de extracto). Los derivados del ácido hidroxicinámico, los ésteres de ácido cafeico y los flavonoles fueron los principales responsables de la capacidad antioxidante de los extractos de las tres plantas estudiadas. Estas sustancias aportaron más del 80 % de la actividad antioxidante total de los extractos estudiados. En los extractos de las plantas del género *Achyrocline* estudiadas, el ácido 3,5-dicafeoilquinico fue el compuesto con la contribución más alta a la actividad antioxidante de esos extractos.

## 6. Información de financiamiento

Este trabajo de investigación fue financiado por Colciencias, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX, Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica y el Fondo Francisco José de Caldas en el marco del programa “Bio-Reto XXI 15:50. Desarrollo de bioproductos para los sectores salud, agropecuario y cosmético, como resultados del estudio de la biodiversidad colombiana”, dentro del proyecto titulado “Extracción, caracterización química de alta resolución de ingredientes naturales a partir de la biodiversidad colombiana, diseño de bioproductos funcionales y estudio de su estabilidad” contrato N° FP44842-212-2018.

## 7. Divulgación de resultados

Durante la investigación se participó en diferentes eventos nacionales e internacional en las modalidades oral y póster.

I SIMPOSIO DE QUÍMICA-UIS, realizado del 3 al 4 de diciembre de 2020, en forma virtual, en modalidad de ponencia oral, con el título: “Estudio de la composición química y evaluación de la capacidad fotoprotectora in vitro contra la radiación UVA y UVB de extractos de algunas plantas medicinales cultivadas en Colombia”.

23<sup>rd</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADVANCES IN EXTRACTION TECHNOLOGIES (ExTech XXIII), realizado del 30 de junio al 2 de julio de 2021, de forma virtual, en modalidad póster, con el título “*Isolation of Turnera pumilia, Achyrocline saturejoides and Chromolaena moritziana extracts and study of their antioxidant and photoprotective activities*”.

El 34° CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA (CLAQ 2020), realizado del 11 al 15 de octubre del 2021 en Cartagena (Colombia), en modalidad póster, con el título “*Analysis by GC-MS of chemical composition of Turnera pumilea and Chromolaena moritziana essential oils, from Santander, Colombia*”.

El 34° CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA (CLAQ 2020), realizado del 11 al 15 de octubre del 2021 en Cartagena (Colombia), en modalidad oral, con el título “*Chemical*”.

*characterization by GC/MS of Achyrocline saturejoides and A. bogotensis, from Santander, Colombia*”.

En el I Día de la Facultad de Ciencias, realizado el 25 de noviembre de 2022 en Bucaramanga, (Colombia), en modalidad póster, con el título “Detección e identificación de compuestos fenólicos antioxidantes en el extracto de *Achyrocline saturejoides* utilizando las técnicas HPLC-ABTS<sup>+</sup> *on line* y UHPLC-ESI<sup>+/-</sup>-*Orbitrap*-HRMS”.

**Referencias bibliográficas**

- Afonso, S., Horita, K., e Silva, J. S., Almeida, I. F., Amaral, M. H., Lobo, J. S. (2014). Photodegradation of avobenzone: stabilization effect of antioxidants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, 36-40.
- Agati, G., Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *The New Phytologist*, 186(4), 786-793.
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 35-45.
- Akoglu, H. (2018). User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency medicine*, 18(3), 91-93.
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (17 de 01 de 2023). *Resolução RDC nº 30 de 1 de junho de 2012*. Obtenido de <http://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/fotos/assets/uploads/regulatorios/bef6eRDC-30.pdf>. Accessed 06 Set 2017.
- Aymard, G. (16 de Diciembre de 2022). *Lantana colombiana López-Pal*. Obtenido de Catálogo de plantas y líquenes de Colombia: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Bakowska, A., Kucharska, A. Z., Oszmiański, J. (2003). The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, 81(3), 349-355.
- Balestrin, L. A., Bidone, J., Bortolin, R. C., Moresco, K., Moreira, J. C., Teixeira, H. F. (2016). Protective effect of a hydrogel containing *Achyrocline satureioides* extract-loaded

- nanoemulsion against UV-induced skin damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*(163), 269-276.
- Balestrin, L. A., Kreutz, T., Silveira Fachel, F., Bidone, J., Gelsleichter, N. E., Koester, L. S., Ferreira Teixeira, H. (2021). *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) extract-loaded nanoemulsions as a promising topical wound healing delivery system: in vitro assessments in human keratinocytes (HaCaT) and HET-CAM irritant potential. *Pharmaceutics*, 13(8), 1241.
- Bamba, B., Shi, J., Tranchant, C. C., Xue, S. J., Forney, C. F., Lim, L. T. (2018). Influence of extraction conditions on ultrasound-assisted recovery of bioactive phenolics from blueberry pomace and their antioxidant activity. *Molecules*, 23(7), 1685.
- Barros, L. M., Duarte, A. E., Waczuk, E. P., Roversi, K., da Cunha, F. B., Rolon, M., Kamdem, J. (2017). Safety assessment and antioxidant activity of *Lantana montevidensis* leaves: contribution to its phytochemical and pharmacological activity. *EXCLI Journal*, 16, 566.
- Belaouira, R., Marchiolini, E., Benayache, F., Benayache, S. (2020). On-line screening and identification of polyphenolic antioxidant compounds of *Convolvulus trabutianus*. *Natural Product Research*, 34(10), 1490-1493.
- Bendová, H., Akrman, J., Krejčí, L., Jírová, D., Kejlová, K., Malý, M. (2007). *In vitro* approaches to evaluation of sun protection factor. *Toxicology in vitro*, 21(7), 1268-1275.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bornman, J. F. (1989). New trends in photobiology: target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 4(2), 145-158.

- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, *161*(5), 839-851.
- Bouzabata, A., Montoro, P., Gil, K. A., Piacente, S., Youssef, F. S., Al Musayeb, N. M., Tuberoso, C. I. (2022). HR-LC-ESI-Orbitrap-MS-based metabolic profiling coupled with chemometrics for the discrimination of different *Echinops spinosus* organs and evaluation of their antioxidant activity. *Antioxidants*, *11*(3), 453.
- Braga, G. C., Melo, P. S., Bergamaschi, K. B., Tiveron, A. P., Massarioli, A. P., Alencar, S. (2016). Extraction yield, antioxidant activity and phenolics from grape, mango and peanut agro-industrial by-products. *Ciência Rural*, *46*, 1498- 1504.
- Bravo, K., Quintero, C., Agudelo, C., García, S., Bríñez, A., Osorio, E. (2020). CosIng database analysis and experimental studies to promote Latin American plant biodiversity for cosmetic use. *Industrial Crops and Products*, *144*, 112007.
- Bray, C. M., West, C. E. (2005). DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytologist*, *168*(3), 511-528.
- Broussalis, A. M., Ferraro, G. E., Gurni, A., Coussio, J. D. (1988). Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, *16*(4), 401-402.
- Burda, S., Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(6), 2774-2779.
- Burke, K. E., Wei, H. (2009). Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. *Toxicology and Industrial Health*, *25*(4-5), 219-224.
- Caldwell, M. M., Bornman, J. F., Ballaré, C. L., Flint, S. D., Kulandaivelu, G. (2007). Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *6*(3), 252-266.

- Castanedo-Cázares, J. P., Martínez-Rosales, K., Hernández-Blanco, D., Valdés-Rodríguez, G., Torres-Álvarez, B. (2014). *In vitro* assessment of commercial sunscreens available in Latin America. *Investigación Clínica*, 55(2), 142-154.
- Cefali, L. C., Ataide, J. A., Moriel, P., Foglio, M. A., Mazzola, P. G. (2016). Plant-based active photoprotectants for sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(4), 346-353.
- Chaaban, H., Ioannou, I., Paris, C., Charbonnel, C., Ghoul, M. (2017). The photostability of flavanones, flavonols and flavones and evolution of their antioxidant activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 336, 131-139.
- Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., Fabiano Tixier, A. S. (2019). Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, 24(16), 3007.
- Chen, Y., Dai, G. (2012). Antifungal activity of plant extracts against *Colletotrichum lagenarium*, the causal agent of anthracnose in cucumber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1937-1943.
- Choquenot, B., Couteau, C., Paparis, E., Coiffard, L. J. (2009). Flavonoids and polyphenols, molecular families with sunscreen potential: determining effectiveness with an *in vitro* method. *Natural Product Communications*, 4(2).
- Clifford, M. N. (1985). Chlorogenic acids. En *Coffee* (págs. 153-202). Dordrecht: Springer.
- Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2900-2911.

- Clifford, M. N., Knight, S., Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 53(10), 3821-3832.
- Cockell, C., Knowland, J. (1999). Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews*, 74(3), 311-345.
- Cole, C. (2016). Sunscreen formulation: optimizing efficacy of UVB and UVA protection. En S. Q. Wang, & H. W. Lim (Edits.), *Principles and Practice of Photoprotection* (págs. 279-280). Suiza: Springer.
- Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 56(2), 324-325.
- Cuyckens, F., Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1-15.
- Cuyckens, F., Ma, Y. L., Pocsfalvi, G., Claeysi, M. (2000). Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. *Analisis*, 28(10), 888-895.
- Daly, S., Ouyang, H., Maitra, P. (2016). Chemistry of sunscreens. En S. Q. Wang, & H. W. Lim, *Principles and Practice of Photoprotection* (págs. 159-178). Suiza: Springer.
- De Grujil, F. (2002). Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin pharmacology and Physiology*, 15(5), 316-320.
- de Oliveira, C. A., Peres, D. D., Rugno, C. M., Kojima, M., de Oliveira Pinto, C. A., Baby, A. R. (2015). Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, 154-159.

- de Sena Filho, J. G., Rabbani, A. R., dos Santos Silva, T. R., da Silva, A. V., Durringer, J. M. (2012). Chemical and molecular characterization of fifteen species from the *Lantana* (*Verbenaceae*) genus. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45, 130-137.
- de Souza, K. B., Schapoval, E. E., & Bassani, V. L. (2002). LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-*O*-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(3-4), 771-777.
- Deble, L. P. (2007). O gênero *Achyrocline* (Less.) DC.(*Asteraceae: Gnaphalieae*) no Brasil. (Doctoral dissertation, Universidade Federal de Santa Maria).
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 84-91.
- Diffey, B. L. (2003). Sun protection factor determination *in vivo* using a single exposure on sunscreen-protected skin. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 19(6), 309-312.
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(9), 505-512.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296-302.
- Doneda, E., Bianchi, S. E., Pittol, V., Kreutz, T., Scholl, J. N., Ibañez, I. L., Bassani, V. (2021). 3-*O*-Methylquercetin from *Achyrocline satureioides*—cytotoxic activity against A375-

- derived human melanoma cell lines and its incorporation into cyclodextrins-hydrogels for topical administration. *Drug Delivery and Translational Research*, 11(5), 2151-2168.
- Dos Reis, G., Valadao, A., De Lima, L., Moreira, M. (2009). Preparación de un protector solar y evaluación de la acción fotoprotectora del propóleo verde del Vale do Aço, Minas Gerais, Brasil. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 282-288.
- Dransfield, G. (2000). Inorganic sunscreens. *Radiation protection dosimetry*, 91(1-3), 271-273.
- European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA). (2011). Method for *in vitro* determination of UVA Protection. In vitro method for the determination of the UVA protection factor and "critical wavelength" values of sunscreen products. *Guidelines March 2011*.
- Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707-715.
- Fonnegra-Gómez, R., & Villa-Londoño, J. (2011). Plantas medicinales usadas en algunas veredas de municipios del altiplano del oriente antioqueño, Colombia. *Actualidades Biológicas*, 33(95), 219-250.
- Food and Drug Administration. (2011). *Department of Health and Human Services. 21 CFR Parts 201 and 310. [Docket N° FDA-1978-N-0018-0693]. Labeling and Effectiveness Testing; Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use. Final Rule. Fed. Regist. 76, 35623-35665.*

- Food and Drug Administration. (2017). *Sun Protection Factor (SPF)*. Recuperado el 10 de 01 de 2023, de Center for drug evaluation and research: <https://www.fda.gov/about-fda/center-drug-evaluation-and-research-cder/sun-protection-factor-spf>
- Garcia Forero, A., Villamizar Mantilla, D., Nunez, L., Ocazonez, R., Stashenko, E., Fuentes, J. (2019). Photoprotective and antigenotoxic effects of the flavonoids apigenin, naringenin and pinocembrin. *Photochemistry and Photobiology*, 95(4), 1010-1018.
- Gerhardt, K. E., Lampi, M. A., Greenberg, B. M. (2008). The effect of far-red light on plant growth and flavonoid accumulation in *Brassica napus* in the presence of ultraviolet B radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 84, 1445-1454.
- Ghisalberti, E. L. (2000). *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Fitoterapia*, 71(5), 467-486.
- Goltz, C., Ávila, S., Barbieri, J. B., Igarashi-Mafra, L., Mafra, M. R. (2018). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from marcela (*Achyrocline satureioides*) extracts. *Industrial Crops and Products*, 115, 227-234.
- Gordon, A., Cruz, A., Cabral, L., de Freitas, S., Taxi, C., Donangelo, C., Marx, F. (2012). Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. *Food chemistry*, 133(2), 256-263.
- Grassi-Zampieron, R., França, L., Carollo, C. A., Vieira, M. D., Oliveros-Bastidas, A., Siqueira, J. (2010). Comparative profiles of *Achyrocline alata* (Kunth) DC. and *A. satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae, applying HPLC-DAD-MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 575-579.
- Gregoris, E., Fabris, S., Bertelle, M., Grassato, L., Stevanato, R. (2011). Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 405(1-2), 97-101.

- Guo, H., Liu, A. H., Ye, M., Yang, M., Guo, D. A. (2007). Characterization of phenolic compounds in the fruits of *Forsythia suspensa* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 21(5), 715-729.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free radical Biology & Medicine*, 18(1), 125-126.
- Herbert, J. M., Maffrand, J. P., Taoubi, K., Augereau, J. M., Gleye, J. (1991). Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinase C. *Journal of Natural Products*, 54(6), 1595-1600.
- Hillenkamp, F. (1980). Interaction between laser radiation and biological systems. En *Lasers in Biology and Medicine* (págs. 37-68). Boston: Springer.
- Hossain, M. B., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'donnell, C., Martin-Diana, A. B., Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 582-590.
- Hussain, F., Ghulam, S., Sher, Z., Ahmad, B. (2011). Allelopathy by *Lantana camara*. *Pakistan Journal of Botany*, 43(5), 2373-2378.
- Hussain, H., Hussain, J., Al-Harrasi, A., & Shinwari, Z. K. (2011). Chemistry of some species genus *Lantana*. *Pakistan Journal of Botany*, 43(3), 51-62.
- Hutzler, P., Fischbach, R., Heller, W., Jungblut, T., Reuber, S., Schmitz, R., Schnitzler, J.-P. (1998). Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany*, 49(323), 953-965.

- International Organization for Standardization. (1990). ISO 8466-1:1990. Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: statistical evaluation of the linear calibration function. *26(6), 1*. Analytical Letters.
- Jimenez, C., Riguera, R. (1994). Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. *Natural Product Reports, 11(6)*, 591-606.
- Julião, L. S., Piccinelli, A. L., Marzocco, S., Leitao, S. G., Lotti, C., Rastrelli, L. (2009). Phenylethanoid glycosides from *Lantana fucata* with *in vitro* anti-inflammatory activity. *Journal of Natural Products, 72(8)*, 1424-1428.
- Kaur, C. D., Saraf, S. (2010). *In vitro* sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacognosy Research, 2(1)*, 22.
- Kedare, S. B., Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology, 48(4)*, 412-422.
- Keefover-Ring, K., Holeski, L. M., Bower, M. D., Clauss, A. D., Lindroth, R. L. (2014). Phenylpropanoid glycosides of *Mimulus guttatus* (yellow monkeyflower). *Phytochemistry Letters, 10*, 132-139.
- Kockler, J., Oelgemöller, M., Robertson, S., Glass, B. D. (2012). Photostability of sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 13(1)*, 91-110.
- Koleva, I. I., Niederländer, H. A., van Beek, T. A. (2001). Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. *Analytical Chemistry, 73(14)*, 3373-3381.
- Krinsky, N. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 200(2)*, 248-254.

- Kumar Santhanam, R., Akhtar, M., Ahmad, S., Abas, F., Ismail, I. S., Rukayadi, Y., Shaari, K. (2017). Utilization of the ethyl acetate fraction of *Zanthoxylum rhetsa* bark extract as an active ingredient in natural sunscreen formulations. *Industrial Crops and Products*, 96, 165-172.
- Latha, M., Martis, J., Shobha, V., Shinde, R. S., Bangera, S., Krishnankutty, B., Kumar, B. N. (2013). Sunscreening agents: a review. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 6(1), 16.
- Li, Q. M., Claeys, M. (1994). Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, 23(7), 406-416.
- Liang, N., Kennepohl, P., Kitts, D. D. (2016). Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. *Food Chemistry*, 213, 251-259.
- Liu, Z., Hossain, G., Islas-Osuna, M. A., Mitchell, D. L., Mount, D. W. (2000). Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: *Arabidopsis* UVH1 DNA repair gene is a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad1. *The Plant Journal*, 21(6), 519-528.
- Lopes, R. M., Agostini-Costa, T. S., Gimenes, M. A., Silveira, D. (2011). Chemical composition and biological activities of *Arachis* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4321-4330.
- Lopez, P. G., Ferraro, G. E., Broussalis, A. M. (2007). Determinación del contenido de derivados cafeilquínicos en especies sudamericanas del género *Achyrocline*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25(4), 571.

- Ma, Y. L., Li, Q. M., Van den Heuvel, H., Claeys, M. (1997). Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357-1364.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (1970). The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. En *The systematic identification of flavonoids* (págs. 41-164). Berlin: Springer.
- Machado, V. S., Camponogara, C., Oliveira, S. M., Baldissera, M. D., Sagrillo, M. R., Gundel, S. D., Da Silva, A. S. (2020). Topical hydrogel containing *Achyrocline satureioides* oily extract (free and nanocapsule) has anti-inflammatory effects and thereby minimizes irritant contact dermatitis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92(4), 2-14.
- Mahdi-Pour, B., Jothy, S. L., Latha, L. Y., Chen, Y., Sasidharan, S. (2012). Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. *Asian Pacific journal of Tropical Biomedicine*, 2(12), 960-965.
- Mahdi-Pour, B., Jothy, S. L., Latha, L. Y., Chen, Y., Sasidharan, S. (2012). Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(12), 960-965.
- Maier, T., Korting, H. (2005). Sunscreens— which and what for? *Skin pharmacology and Physiology*, 18(6), 253-262.
- Maione, F., Russo, R., Khan, H., Mascolo, N. (2016). Medicinal plants with anti-inflammatory activities. *Natural Product Research*, 30(12), 1343-1352.
- Mansur, J. D., Breder, M. N., Mansur, M. D., Azulay, R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 61(3), 121.

- Markham, K. R., Ryan, K. G., Bloor, S. J., Mitchell, K. A. (1998). An increase in the luteolin: apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry*, 48(5), 791-794.
- Marques, V., Farah, A. (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*, 113(4), 1370-1376.
- Matts, P. J., Alard, V., Brown, M. W., Ferrero, L., Gers-Barlag, H., Issachar, N., Wolber, R. (2010). The COLIPA *in vitro* UVA method: a standard and reproducible measure of sunscreen UVA protection. *International Journal of Cosmetic Science*, 32(1), 35-46.
- Meira, M., Silva, E., David, J. M., David, J. P. (2012). Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 682-713.
- Mejía Medina, J. J., Martínez, J. R., Stashenko, E. E. (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 organoides* (Verbenáceas), como posibles ingredientes en productos. 83-91. Bucaramanga, Santander, Colombia: Tesis doctoral. Universidad Industrial de Santander.
- Mejía-Giraldo, J. C., Winkler, R., Puertas-Mejía, M. (2021). Novel UV filters from *Pentacalia pulchella* extracts with photoprotective properties and antioxidant activity. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 20(12), 1585-1597.
- Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Dommès, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130(4), 986-993.

- Miketova, P., Schram, K. H., Whitney, J., Kearns, E. H., Timmermann, B. N. (1999). Mass spectrometry of 3, 5-and 4, 5-dicaffeoylquinic acids and selected derivatives. *Journal of Mass Spectrometry*, 34(12), 1240-1252.
- Miranda, M., Maureira, H., Rodriguez, K., Vega-Gálvez, A. (2009). Influence of temperature on the drying kinetics, physicochemical properties, and antioxidant capacity of *Aloe vera* (*Aloe Barbadensis* Miller) gel. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 297-304.
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A., Zujko, M. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, 63(1), 68-78.
- Modenese, A., Korpinen, L., Gobba, F. (2018). Solar radiation exposure and outdoor work: an underestimated occupational risk. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), 2063.
- Monteith, J. (1972). Solar radiation and productivity in tropical ecosystems. *Journal of Applied Ecology*, 9(3), 747-766.
- Morquio, A., Rivera-Megret, F., Dajas, F. (2005). Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* ('Marcela'). *Phytotherapy Research*, 19(6), 486-490.
- Mota, M. D., da Boa Morte, A. N., e Silva, L. R., Chinalia, F. A. (2020). Sunscreen protection factor enhancement through supplementation with Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) ethanolic extract. *ournal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 205, 111837.
- Moyal, D. (2010). UVA protection labeling and *in vitro* testing methods. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(4), 516-523.
- Nagao, T., Abe, F., Kinjo, J., Okabe, H. (2002). Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship. *Biol Pharm Bull*, 25, 875-879.

- Nawkar, G. M., Maibam, P., Park, J. H., Sahi, V. P., Lee, S. Y., Kang, C. H. (2013). UV-induced cell death in plants. *International Journal of Molecular Science*, 14(1), 1608-1628.
- Niederländer, H. A., van Beek, T. A., Bartasiute, A., Koleva, I. I. (2008). Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1210(2), 121-134.
- Nimse, S., Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advance*, 5(35), 27986-28006.
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V. (2019). Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. *Polyphenols in Plants*, 243-259.
- Osterwalder, U., Hareng, L. (2016). Global UV filters: current technologies and future innovations. En S. Q. Wang, H. W. Lim, *Principles and Practice of Photoprotection* (págs. 179-197). Suiza: Springer.
- Padera, F., Shelton, C. (2011). Sunscreen testing according to COLIPA 2011/FDA final rule 2011 using UV/Vis LAMBDA spectrophotometers. *PerkinElmer, Inc*, 1-9.
- Pakker, H., Beekman, C., Breeman, A. (2000). Efficient photoreactivation of UVBR-induced DNA damage in the sublittoral macroalga *Rhodymenia pseudopalmata* (Rhodophyta). *European Journal of Phycology*, 35(2), 109-114.
- Paniagua-Zambrana, N., Bussmann, R., Romero, C. (2020). *Achyrocline alata* (Kunth) DC. *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae. *Ethnobotany of the Andes*, 1-5.

- Pico-Hernández, S. M., Murillo-Méndez, C. J., López-Giraldo, L. J. (2020). Extraction, separation, and evaluation of antioxidant effect of the different fractions of polyphenols from cocoa beans. *Revista Colombiana de Química*, 49(3), 19-27.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., Predoi, G. (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Pissavini, M., Tricaud, C., Wiener, G., Lauer, A., Contier, M., Kolbe, L., Matts, P. J. (2018). Validation of an *in vitro* sun protection factor (SPF) method in blinded ring-testing. *International Journal of Cosmetic Science*, 40(3), 263-268.
- Poh-Yen, K., Lay-Jing, S., Hanani, F. (2018). *In vitro* evaluation of photoprotective potential of the different solvent extracts of *Graptophyllum pictum* leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(1), 147-151.
- Pratt, D. (1992). Natural antioxidants from plant material. En D. E. Pratt, *Phenolic compounds in food and their effects on health II* (págs. 54-71). Washington: ACS Publications.
- Qu, W., Pan, Z., Ma, H. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 16-23.
- Radice, M., Manfredini, S., Ziosi, P., Dissette, V., Buso, P., Fallacara, A., Vertuani, S. (2016). Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. *Fitoterapia*, 114, 144-162.
- Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F., Firuzi, O. (2013). Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. *Current medicinal chemistry*, 20(36), 4436-4450.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Retta, D., Dellacassa, E., Villamil, J., Suárez, S. A., Bandoni, A. L. (2012). Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. *Industrial Crops and Products*, 38, 27-38.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Ríos, J. L., Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 80-84.
- Rohr, M., Klette, E., Ruppert, S., Bimzcok, R., Klebon, B., Heinrich, U., Zastrow, L. (2010). *In vitro* sun protection factor: still a challenge with no final answer. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(4), 201-212.
- Rojas, J. P., Stashenko, E., Stashenko, E. E. (2015). Estudio de extractos de mora de castilla y de cáscara de plátano hartón para su uso como antioxidantes naturales en emulsiones de aceite en agua. 132. Bucaramanga, Santander, Colombia: Tesis doctoral. Universidad Industrial de Santander.
- Rösch, D., Bergmann, M., Knorr, D., Kroh, L. W. (2003). Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4233-4239.
- Ryan, K. G., Markham, K. R., Bloor, S. J., Bradley, J. M., Mitchell, K. A., Jordan, B. R. (1998). UVB radiation induced increase in quercetin: kaempferol ratio in wild-type and transgenic lines of *Petunia*. *Photochemistry and photobiology*, 68(3), 323-330.

- Saewan, N., Jimtaisong, A. (2015). Natural products as photoprotection. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 14(1), 47-63.
- Sagawa, T., Takaishi, Y., Fujimoto, Y., Duque, C., Osorio, C., Ramos, F., Ahmed, S. U. (2005). Cyclobutane dimers from the colombian medicinal plant *Achyrocline bogotensis*. *Journal of Natural Products*, 68(4), 502-505.
- Salgueiro, A. C., Folmer, V., da Rosa, H. S., Costa, M. T., Puntel, G. O. (2016). *In vitro* and *in silico* antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 6-14.
- Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*, 10, 1-29.
- Sayre, R. M., Agin, P. P., LeVee, G. J., Marlowe, E. (1979). A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas. *Photochemistry and Photobiology*, 29(3), 559-566.
- Schalka, S., Reis, V. (2011). Sun protection factor: meaning and controversies. *Anais brasileiros de dermatologia*, 86, 507-515.
- Sena Filho, J. G., Nimmo, S. L., Xavier, H. S., Barbosa-Filho, J. M., Cichewicz, R. H. (2009). Phenylethanoid and lignan glycosides from polar extracts of *Lantana*, a genus of Verbenaceous plants widely used in traditional herbal therapies. *Journal of Natural Products*, 72(7), 1344-1347.
- Serpone, N., Salinaro, A., Emeline, A. V., Horikoshi, S., Hidaka, H., Zhao, J. (2002). An *in vitro* systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(12), 970-981.

- Shaath, N. A. (2010). Ultraviolet filters. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(4), 464-469.
- Shah, M., Alharby, H. F., Hakeem, K. R. (2020). *Lantana camara*: a comprehensive review on phytochemistry, ethnopharmacology and essential oil composition. *Lett Appl Nano Biomed Sci.*, 9(3), 199-207.
- Shahidi, F., Chandrasekara, A. (2010). Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 147-170.
- Shahidi, F., Zhong, Y., Shahidi, F., Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
- Sharma, A., del Carmen Flores-Vallejo, R., Cardoso-Taketa, A., Villareal, M. L. (2017). Antibacterial activities of medicinal plants used in mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 208, 264-329.
- Sierra Prada, L. J., Stashenko, E. E., Martínez Morales, J. R. (2020). Estudio de la composición química y evaluación de las actividades antioxidante y fotoprotectora de extractos de flores de plantas tropicales cultivadas en Colombia. 175. Bucaramanga: Tesis doctoral. Universidad Industrial de Santander.
- Singh, S., Singh, R. P. (2008). *In vitro* methods of assay of antioxidants: an overview. *Food Reviews International*, 24(4), 392-415.
- Soleimani, M., Dehabadi, L., Wilson, L., Tabil, L. (2018). Antioxidants classification and applications in lubricants. En D. Johnson, *Tribology, lubricants and additives* (pág. 23). Estados Unidos de América: IntechOpen.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, 28(4), 41-55.

- Sousa, E. O., Costa, J. G. (2012). Genus *Lantana*: chemical aspects and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 1115-1180.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208.
- Stevanato, R., Bertelle, M., Fabris, S. (2014). Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(1), 71-77.
- Stiefel, C., Schwack, W. (2015). Photoprotection in changing times—UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(1), 2-30.
- Svobodová, A., Psotová, J., Walterová, D. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 147(2), 137-145.
- Syukriah, A. N., Liza, M. S., Harisun, Y., Fadzillah, A. A. (2014). Effect of solvent extraction on antioxidant and antibacterial activities from *Quercus infectoria* (Manjakani). *International Food Research Journal*, 21(3), 1031.
- Takenaka, M., Yan, X., Ono, H., Yoshida, M., Nagata, T., Nakanishi, T. (2003). Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 793-796.
- Taubis, K., Fauvel, M. T., Gleye, J., Moulis, C., Fouraste, I. (1997). Phenylpropanoid glycosides from *Lantana camara* and *Lippia multiflora*. *Planta Medica*, 63(02), 192-193.

- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D., Agati, G. (2004). Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist*, 163(3), 547-561.
- Thomas, C. M., Wood III, R. C., Wyatt, J. E., Pendleton, M. H., Torrenegra, R. D., Rodriguez, O. E., Ramsauer, V. P. (2012). Anti-neoplastic activity of two flavone isomers derived from *Gnaphalium elegans* and *Achyrocline bogotensis*. *PloS one*, 7(6), e39806.
- Thomas, R. F., Scotto, J. (1983). Estimating increases in skin cancer morbidity due to increases in ultraviolet radiation exposure. *Cancer Investigation*, 1(2), 119-126.
- Velasco, M., Sarruf, F., Salgado-Santos, I., Haroutiounian-Filho, C., Kaneko, T., Baby, A. (2008). Broad spectrum bioactive sunscreens. *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1-2), 50-57.
- Villalobos-Hernández, J., Muller-Goymann, C. (2006). Artificial sun protection: sunscreens and their carrier systems. *Current Drug Delivery*, 3(4), 405-415.
- Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M., Jang, J. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2800-2802.
- Vuong, Q. V., Hirun, S., Roach, P. D., Bowyer, M. C., Phillips, P. A., Scarlett, C. J. (2013). Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. *Journal of Herbal Medicine*, 3(3), 104-111.
- Wang, S. Q., Stanfield, J. W., Osterwalder, U. (2008). *In vitro* assessments of UVA protection by popular sunscreens available in the United States. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 59(6), 934-942.

- Wehling, K., Niester, C., Boon, J. J., Willemse, M., Wiermann, R. (1989). *p*-Coumaric acid—a monomer in the sporopollenin skeleton. *Planta*, 179(3), 376-380.
- Williams, C. A., Grayer, R. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 21(4), 539-573.
- Witting, P., Upston, J., Stocker, R. (1997). Role of  $\alpha$ -tocopheroxyl radical in the initiation of lipid peroxidation in human low-density lipoprotein exposed to horse radish peroxidase. *Biochemistry*, 36(6), 1251-1258.

Apéndices

Apéndice A. Resultados de los diseños experimentales (diseño factorial 2<sup>3</sup>) para las plantas bajo estudio.

Tabla A1. Resultados obtenidos para la *A. saturejoides*

Experimento N°	Variables estudiadas			Variables de respuesta		
	Temp., °C	Tiempo, min	Porcentaje de etanol, %	Rendimiento, % <sup>a</sup>	SPF <sup>b</sup>	Actividad antioxidante por ABTS <sup>+</sup> , μmol Trolox <sup>®</sup> /g extracto <sup>b</sup>
1	60	15	60:40	2,68	7,3 ± 0,1	290 ± 14
2	40	15	80:20	1,55	13,1 ± 0,2	437 ± 6
3	40	15	60:40	3,09	8,7 ± 0,2	430 ± 3
4	60	35	60:40	3,08	10,2 ± 0,3	480 ± 12
5	60	35	80:20	2,37	13,5 ± 0,4	550 ± 20
6	40	35	80:20	2,36	13,0 ± 0,2	560 ± 11
7	40	35	60:40	3,39	11,9 ± 0,1	500 ± 14
8	60	15	80:20	2,59	15,0 ± 0,2	500 ± 5
9	50	25	70:30	2,10	15,0 ± 0,3	640 ± 16
10	50	25	70:30	2,28	15,3 ± 0,1	636 ± 3
11	50	25	70:30	2,06	15,2 ± 0,2	640 ± 4
12	50	25	70:30	2,59	-	-
13	50	25	70:30	2,20	-	-
14	50	25	70:30	2,14	-	-

<sup>a</sup> La desviación estándar y el coeficiente de variación del proceso extractivo se calcularon a partir de las extracciones realizadas bajo las condiciones del punto central y fueron 0,19 y 8,6 %, respectivamente.

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

**Tabla A2.** Resultados obtenidos para la *A. bogotensis*

Experimento N°	Variables estudiadas			Variables de respuesta		
	Temp., °C	Tiempo, min	Porcentaje de etanol, %	Rendimiento, % <sup>a</sup>	SPF <sup>b</sup>	Actividad antioxidante por ABTS <sup>+</sup> , μmol Trolox <sup>®</sup> /g extracto <sup>b</sup>
1	60	15	60:40	3,85	13,7 ± 0,2	540 ± 21
2	40	15	80:20	2,26	15,3 ± 0,3	610 ± 10
3	40	15	60:40	3,19	17,0 ± 0,3	860 ± 31
4	60	35	60:40	4,77	13,4 ± 0,3	680 ± 11
5	60	35	80:20	3,93	15,6 ± 0,2	800 ± 24
6	40	35	80:20	2,40	15,4 ± 0,3	670 ± 19
7	40	35	60:40	3,43	16,8 ± 0,1	810 ± 27
8	60	15	80:20	3,40	10,3 ± 0,3	580 ± 11
9	50	25	70:30	3,84	13,0 ± 0,2	670 ± 8
10	50	25	70:30	3,34	12,7 ± 0,3	670 ± 3
11	50	25	70:30	3,24	13,0 ± 0,7	650 ± 3
12	50	25	70:30	3,77	-	-
13	50	25	70:30	3,36	-	-
14	50	25	70:30	3,30	-	-

<sup>a</sup> La desviación estándar y el coeficiente de variación del proceso extractivo se calcularon a partir de las extracciones realizadas bajo las condiciones del punto central y fueron 0,26 y 7,6 %, respectivamente.

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

**Tabla A3.** Resultados obtenidos para la *L. colombiana*

Experimento N°	Variables estudiadas			Variables de respuesta		
	Temp., °C	Tiempo, min	Porcentaje de etanol, %	Rendimiento, % <sup>a</sup>	SPF <sup>b</sup>	Actividad antioxidante por ABTS <sup>+</sup> , μmol Trolox <sup>®</sup> /g extracto <sup>b</sup>
1	60	15	60:40	2,83	11,5 ± 0,2	304 ± 3
2	40	15	80:20	1,55	13,0 ± 0,1	356 ± 1
3	40	15	60:40	1,41	9,0 ± 0,4	270 ± 2
4	60	35	60:40	3,58	11,0 ± 0,4	493 ± 10
5	60	35	80:20	2,63	14,0 ± 0,4	337 ± 2
6	40	35	80:20	1,25	14,4 ± 0,1	333 ± 3
7	40	35	60:40	3,40	9,4 ± 0,1	252 ± 4
8	60	15	80:20	2,63	12,5 ± 0,3	370 ± 3
9	50	25	70:30	1,87	10,4 ± 0,5	370 ± 7
10	50	25	70:30	1,67	11,0 ± 0,3	375 ± 3
11	50	25	70:30	1,96	11,1 ± 0,2	375 ± 1
12	50	25	70:30	1,74	-	-
13	50	25	70:30	1,80	-	-
14	50	25	70:30	1,89	-	-

<sup>a</sup> La desviación estándar y el coeficiente de variación del proceso extractivo se calcularon a partir de las extracciones realizadas bajo las condiciones del punto central y fueron 0,11 y 5,9 %, respectivamente.

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

**Apéndice B.** Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para *A. saturejoides*

**Tabla B1.** Análisis de varianza aplicado al diseño factorial 2<sup>3</sup>, para el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de material seco de *A. saturejoides* con efectos individuales y binarios. **A.** Temperatura; **B.** Tiempo; **C.** Porcentaje de etanol.

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor Fisher	Valor p
A	0,0136125	1	0,0136125	0,36	0,5725
B	0,208013	1	0,208013	5,57	0,0648
C	1,41961	1	1,41961	37,98	0,0016
AB	0,108112	1	0,108112	2,89	0,1497
AC	0,391612	1	0,391612	10,48	0,0230
BC	0,0015125	1	0,0015125	0,04	0,8485
Error puro	0,186883	5	0,0373767		
Total (corr.)	3,06649	13			
F crítico*	6,61				

\* Valor calculado con el *software* Microsof Excel.

**Tabla B2.** Análisis de varianza aplicado al diseño factorial 2<sup>3</sup>, para el potencial fotoprotector de compuestos fenólicos a partir de material seco de *A. saturejoides* con efectos individuales y binarios. **A.** Temperatura; **B.** Tiempo; **C.** Porcentaje de etanol.

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor Fisher	Valor p
A	0,06125	1	0,06125	1,21	0,3217
B	2,53125	1	2,53125	49,96	0,0009
C	34,0312	1	34,0312	671,67	0,0000
AB	0,36125	1	0,36125	7,13	0,0443
AC	3,78125	1	3,78125	74,63	0,0003
BC	7,41125	1	7,41125	146,27	0,0001
Error puro	0,253333	5	0,0506667		
Total (corr.)	92,5036	13			
F crítico*	6,61				

\* Valor calculado con el *software* Microsof Excel.

**Tabla B3.** Análisis de varianza aplicado al diseño factorial  $2^3$ , para el potencial antioxidante de compuestos fenólicos a partir de material seco de *A. saturojoides* con efectos individuales y binarios. **A.** Temperatura; **B.** Tiempo; **C.** Porcentaje de etanol.

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor Fisher	Valor p
A	1431,13	1	1431,13	23,32	0,0048
B	23436,1	1	23436,1	381,90	0,0000
C	15051,1	1	15051,1	245,27	0,0000
AB	276,125	1	276,125	4,50	0,0874
AC	5671,13	1	5671,13	92,41	0,0002
BC	946,125	1	946,125	15,42	0,0111
Error puro	306,833	5	61,3667		
Total (corr.)	151395	13			
F crítico*	6,61				

\* Valor calculado con el *software* Microsof Excel.

**Apéndice C.** Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para *A. bogotensis*

**Tabla C1.** Análisis de varianza aplicado al diseño factorial  $2^3$ , para el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de material seco de *A. bogotensis* con efectos individuales y binarios. **A.** Temperatura; **B.** Tiempo; **C.** Porcentaje de etanol.

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor Fisher	Valor p
A	2,72611	1	2,72611	40,38	0,0014
B	0,418613	1	0,418613	6,20	0,0552
C	1,32031	1	1,32031	19,56	0,0069
AB	0,143112	1	0,143112	2,12	0,2052
AC	0,0561125	1	0,0561125	0,83	0,4037
BC	0,0300125	1	0,0300125	0,44	0,5345
Error puro	0,33755	5	0,06751		
Total (corr.)	5,05974	13			
F crítico*	6,61				

\* Valor calculado con el *software* Microsof Excel.

**Tabla C2.** Análisis de varianza aplicado al diseño factorial  $2^3$ , para el potencial fotoprotector de compuestos fenólicos a partir de material seco de *A. bogotensis* con efectos individuales y binarios.

A. Temperatura; B. Tiempo; C. Porcentaje de etanol.

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor Fisher	Valor p
A	16,5313	1	16,5313	112,32	0,0001
B	3,00125	1	3,00125	20,39	0,0063
C	2,31125	1	2,31125	15,70	0,0107
AB	3,25125	1	3,25125	22,09	0,0053
AC	0,45125	1	0,45125	3,07	0,1403
BC	4,35125	1	4,35125	29,56	0,0029
Error puro	0,735883	5	0,147177		
Total (corr.)	45,2429	13			
F crítico*	6,61				

\* Valor calculado con el *software* Microsoft Excel.

**Tabla C3.** Análisis de varianza aplicado al diseño factorial  $2^3$ , para el potencial antioxidante de compuestos fenólicos a partir de material seco de *A. bogotensis* con efectos individuales y binarios.

A. Temperatura; B. Tiempo; C. Porcentaje de etanol.

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor Fisher	Valor p
A	15312,5	1	15312,5	173,47	0,0000
B	17112,5	1	17112,5	193,86	0,0000
C	6612,5	1	6612,5	74,91	0,0003
AB	15312,5	1	15312,5	173,47	0,0000
AC	97812,5	1	97812,5	428,37	0,0000
BC	4512,5	1	4512,5	51,12	0,0008
Error puro	441,355	5	88,271		
Total (corr.)	101008	13			
F crítico*	6,61				

\* Valor calculado con el *software* Microsoft Excel.

**Apéndice D.** Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para *L. colombiana*

**Tabla D1.** Análisis de varianza aplicado al diseño factorial 2<sup>3</sup>, para el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de material seco de *L. colombiana* con efectos individuales y binarios. **A.** Temperatura; **B.** Tiempo; **C.** Porcentaje de etanol.

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor Fisher	Valor p
A	2,06045	1	2,06045	183,04	0,0000
B	0,7442	1	0,7442	66,11	0,0005
C	1,2482	1	1,2482	110,89	0,0001
AB	0,11045	1	0,11045	9,81	0,0259
AC	0,09245	1	0,09245	8,21	0,0352
BC	1,1552	1	1,1552	102,62	0,0002
Error puro	1,53949	5	0,219927		
Total (corr.)	6,95044	13			
F crítico*	6,61				

\* Valor calculado con el *software* Microsof Excel.

**Tabla D2.** Análisis de varianza aplicado al diseño factorial 2<sup>3</sup>, para el potencial fotoprotector de compuestos fenólicos a partir de material seco de *L. colombiana* con efectos individuales y binarios. **A.** Temperatura; **B.** Tiempo; **C.** Porcentaje de etanol.

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor Fisher	Valor p
A	1,28	1	1,28	8,73	0,0317
B	0,98	1	0,98	6,68	0,0491
C	21,125	1	21,125	144,03	0,0001
AB	0,08	1	0,08	0,55	0,4934
AC	3,125	1	3,125	21,31	0,0058
BC	1,125	1	1,125	7,67	0,0394
Error puro	0,733333	5	0,697449		
Total (corr.)	32,5971	13			
F crítico*	6,61				

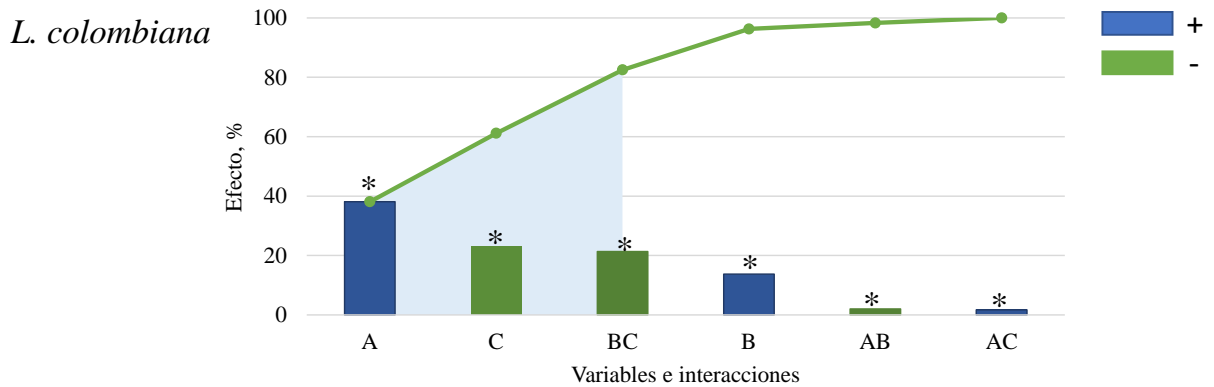
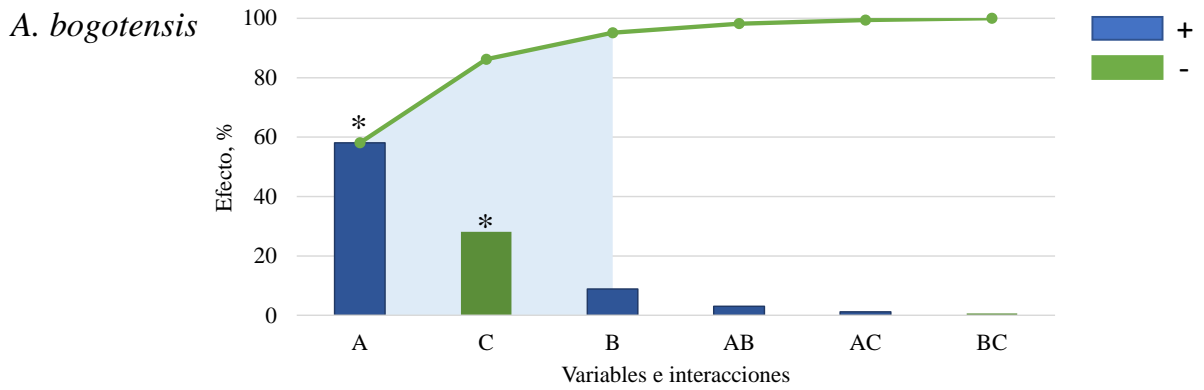
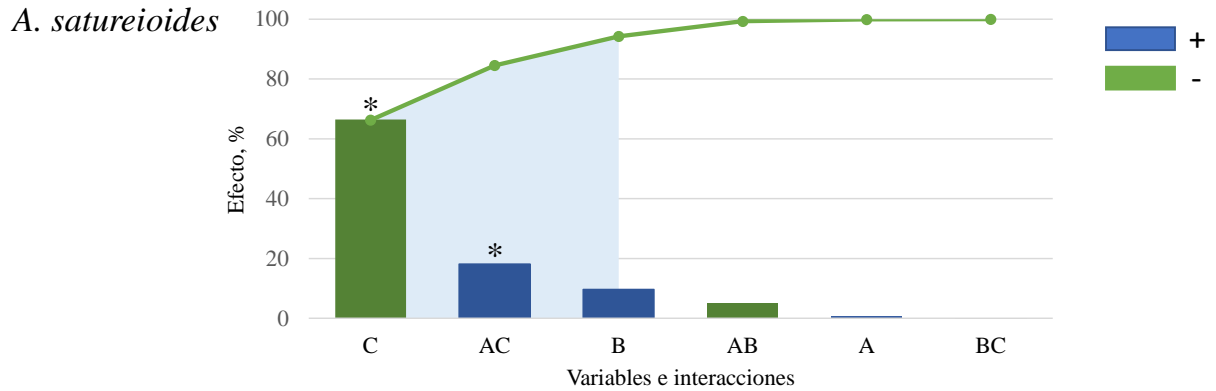
\* Valor calculado con el *software* Microsof Excel.

**Tabla D3.** Análisis de varianza aplicado al diseño factorial 2<sup>3</sup>, para el potencial antioxidante de compuestos fenólicos a partir de material seco de *L. colombiana* con efectos individuales y binarios. **A.** Temperatura; **B.** Tiempo; **C.** Porcentaje de etanol.

<b>Variable</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Valor Fisher</b>	<b>Valor p</b>
A	10731,1	1	10731,1	632,48	0,0000
B	1653,13	1	1653,13	97,43	0,0002
C	741,125	1	741,125	43,68	0,0012
AB	4851,13	1	4851,13	285,92	0,0000
AC	8256,13	1	8256,13	486,61	0,0000
BC	6441,13	1	6441,13	379,63	0,0000
Error puro	84,8333	5	16,9667		
Total (corr.)	42482,9	13			
F crítico*	6,61				

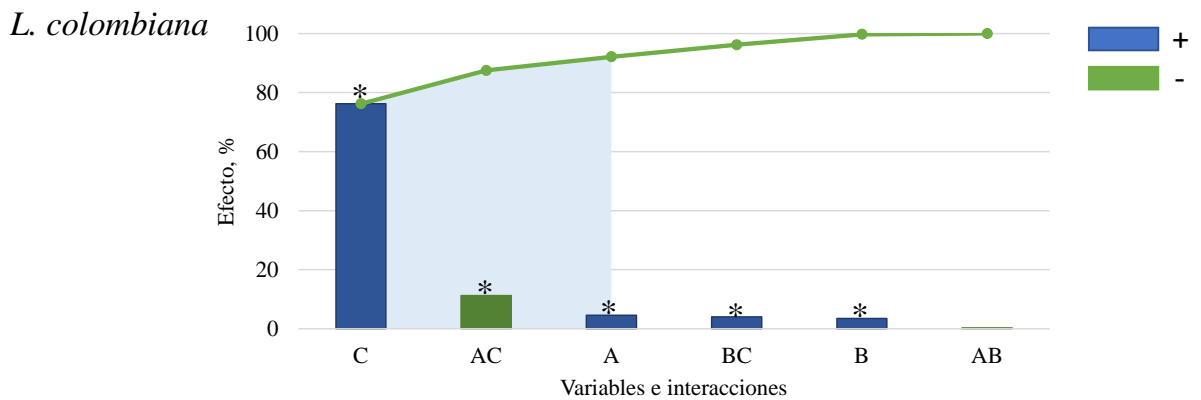
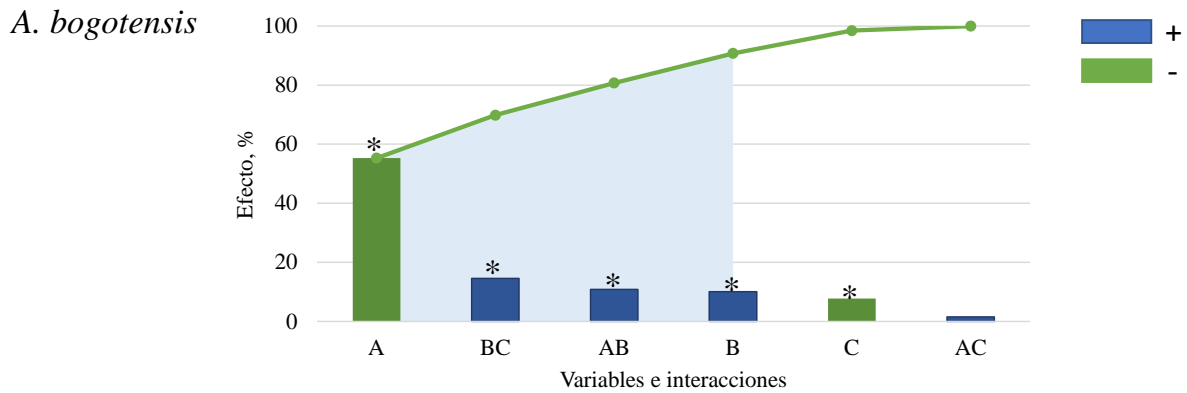
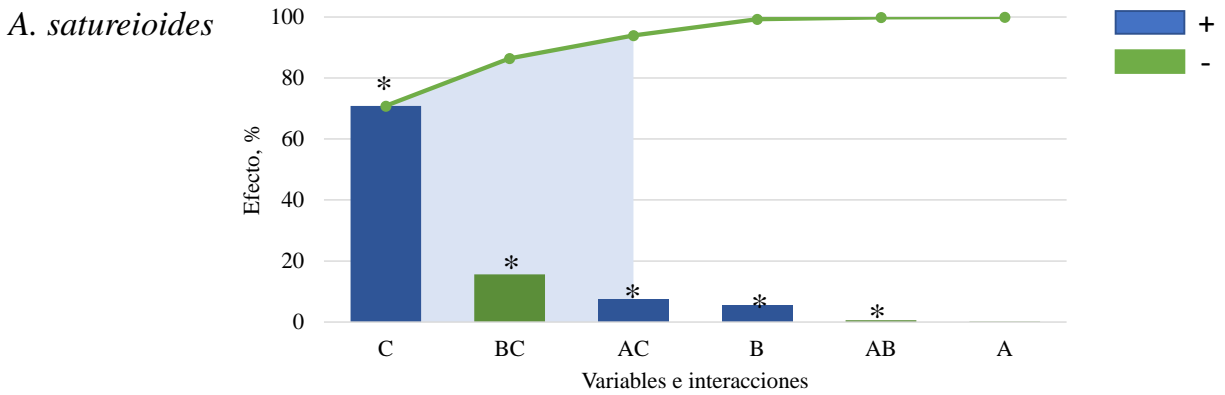
\* Valor calculado con el *software* Microsof Excel.

**Apéndice E.** Gráficos de Pareto para evaluar los efectos de las variables: **A.** Temperatura; **B.** Tiempo de extracción y **C.** Porcentaje de etanol, sobre el rendimiento de extracción de las especies bajo estudio.



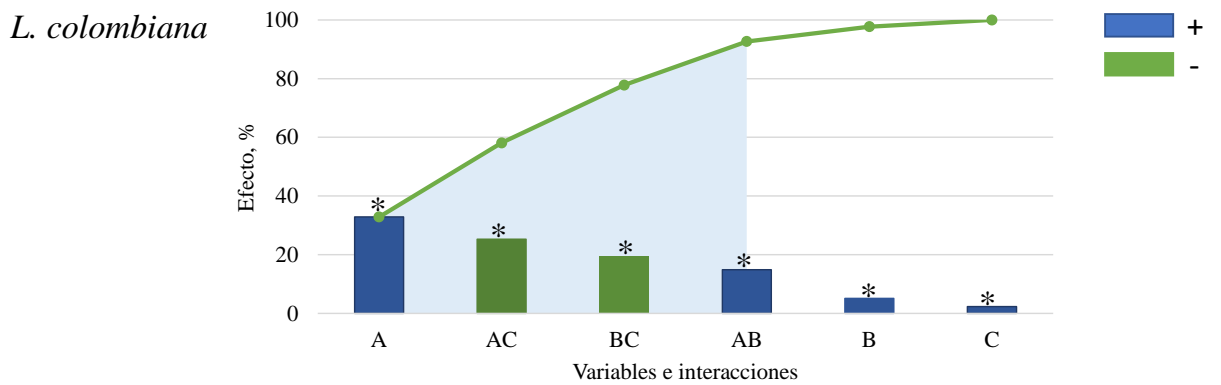
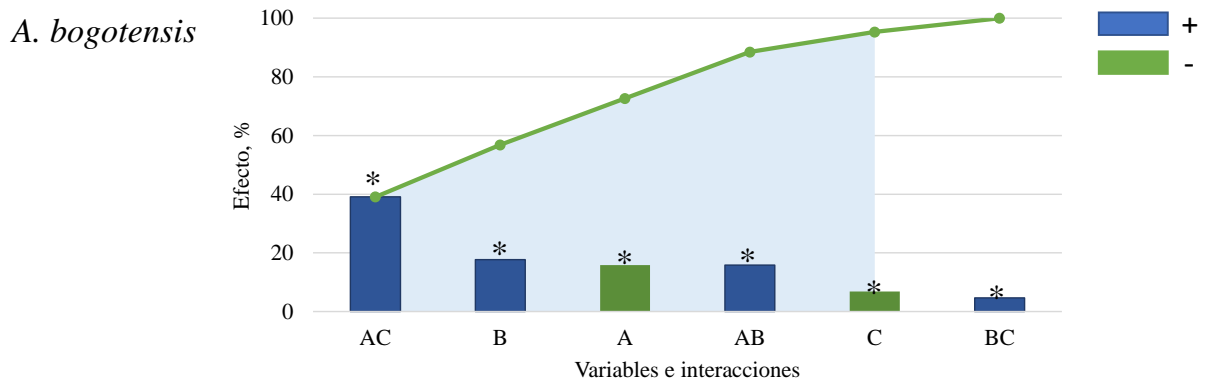
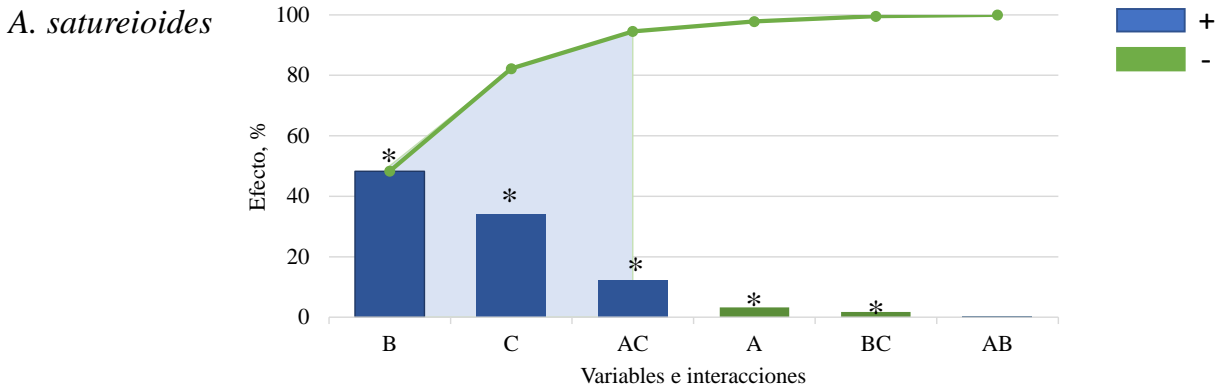
\* Variable significativa ( $p < 0,05$ )

**Apéndice F.** Gráficos de Pareto para evaluar los efectos de las variables: **A.** Temperatura; **B.** Tiempo de extracción y **C.** Porcentaje de etanol, sobre el potencial fotoprotector de las especies bajo estudio.



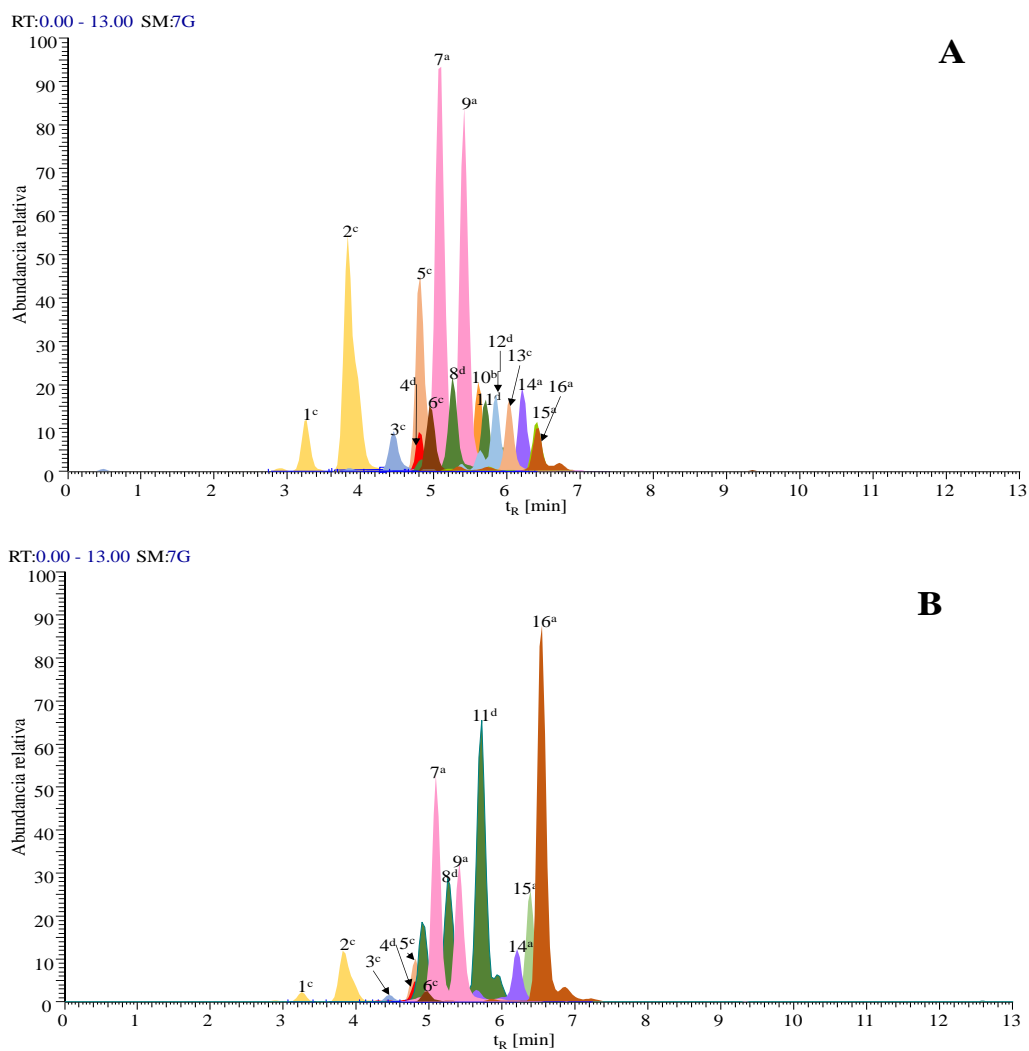
\* Variable significativa ( $p < 0,05$ )

**Apéndice G.** Gráficos de Pareto para evaluar los efectos de las variables: **A.** Temperatura; **B.** Tiempo de extracción y **C.** Porcentaje de etanol, sobre el potencial antioxidante de las especies bajo estudio.



\* Variable significativa ( $p < 0,05$ )

**Apéndice H.** Identificación y cuantificación realizada por UHPLC-ESI-*Orbitrap*-HRMS de los compuestos fenólicos detectados en extractos hidroalcohólicos de las especies de investigación del género *Achyrocline*.



**Figura H1.**

Corrientes iónicas extraídas (EIC) de las moléculas protonadas  $[M+H]^+$  y deprotonadas  $[M-H]^-$  obtenidas por UHPLC-ESI-*Orbitrap*-HRMS de los compuestos fenólicos presentes en los extractos hidroalcohólicos de: **A.** *A. satirejoides* y **B.** *A. bogotensis*. La identificación de los picos se encuentra en la **Tabla H1**.

*Nota:* Las letras que se encuentran como superíndices al lado de los números de los picos indican la escala de la corriente iónica extraída de la respectiva molécula ionizada. Las escalas son: **a.**  $3,5 \times 10^7$ ; **b.**  $2,0 \times 10^7$ ; **c.**  $1,0 \times 10^7$  y **d.**  $3,0 \times 10^6$ .

**Tabla H1.**

Masas exactas de moléculas protonada [M+H]<sup>+</sup> o deprotonadas [M-H]<sup>-</sup>, identificadas por UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS en los extractos de las especies de *Achyrocline* bajo estudio.

N° Fig. H1	Compuesto	Fórmula	Masa experimental, m/z		Error, Δ ppm	HCD, eV	Iones producto			mg/g de extracto ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )		Criterios de identificación	Ref.
			[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>			Fragmentos	Fórmula (ppm)	m/z, I (%)	<i>A. saturejoides</i>	<i>A. bogotensis</i>		
1	Isómero de ácido cafeoilquínico <sup>1</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-	353,08804	0,67	20	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> [M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O [M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O [M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -CO <sub>2</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> (2,74) C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> (3,62) C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> (2,99) C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (6,10) C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> (6,68)	191,05559 (100) 179,03433 (70) 173,04503 (3) 161,02344 (2) 135,04425 (12)	<LOQ	<LOD	a,b	(Broussalis <i>et al.</i> , 1988; Clifford <i>et al.</i> , 2003)
2	Ácido clorogénico	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-	353,08810	0,84	20	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> [M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O [M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -CO <sub>2</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> (2,98) C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> (3,03) C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (4,85) C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> (6,68)	191,05554 (100) 179,03444 (1) 161,02364 (1) 135,04425 (0,2)	2,0 ± 0,1	0,41 ± 0,01	a,b,c	(Broussalis <i>et al.</i> , 1988; Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , 2010)
3	Isómero de ácido feruloilquínico <sup>1</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	-	367,10342	0,08	10	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> [M-H] <sup>-</sup> -C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> [M-H] <sup>-</sup> -C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> (4,28) C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> (3,22) C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> (3,43)	193,04980 (9) 191,05550 (100) 173,04495 (59)	0,19 ± 0,04	<LOD	a,b	(Clifford <i>et al.</i> , 2003; Marques <i>et al.</i> , 2009)
4	Isómero de kaempferol dihexósido <sup>2</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	611,16113	-	0,77	20	[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> -2C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> (1,67) C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> (1,56)	449,10709 (20) 287,05457 (100)	<LOQ	0,26 ± 0,03	a	
5	Ácido tricafeoilaltrátrico <sup>3</sup>	C <sub>33</sub> H <sub>28</sub> O <sub>17</sub>	-	695,12488	0,71	10	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [M-H] <sup>-</sup> -2C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [M-H] <sup>-</sup> -3C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> O <sub>14</sub> (0,36) C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>11</sub> (0,07) C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub> (4,02)	533,09387 (67) 371,06201 (28) 209,02945 (5)	0,61 ± 0,02	0,30 ± 0,02	a,b	(Bouzabata, <i>et al.</i> , 2022)
6	Isómero de quercetina hexurónido <sup>4</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub>	479,08121	-	1,69	50	[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> [M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -H <sub>2</sub> O [M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -H <sub>2</sub> O-CO [M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -H <sub>2</sub> O-2CO [M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -CO	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> (0,91) C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> (0,63) C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> (0,89) C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> (0,89) C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (0,12) C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (0,89) C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (0,37)	303,04965 (100) 285,03918 (4) 257,04422 (6) 229,04933 (8) 165,01817 (5) 153,01819 (5) 137,02327 (5)	2,2 ± 0,1	0,6 ± 0,02	a	(Ma <i>et al.</i> , 1997)

**Tabla H1.** Continuación.

7	Ácido 3,5-dicafeoilquínico *	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	-	515,11963	0,25	20	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub> (0,32)	353,08792 (100)	30 ± 1,8	27 ± 1,2	a,b,c	(Clifford <i>et al.</i> , 2005; Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , 2010; Miketova <i>et al.</i> , 1999)
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> (0,18)	335,0773 (2)				
							[M-H] <sup>-</sup> -2C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> (3,06)	191,05553 (53)				
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> (3,79)	179,0343 (29)				
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (4,94)	161,02362 (4)				
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -CO <sub>2</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> (7,92)	135,04408 (5)				
8	Luteolina 7-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449,14264	-	1,06	50	[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> (1,46)	287,05460 (100)	0,16 ± 0,05	0,19 ± 0,03	a,c	
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (1,20)	153,01805 (2)				
9	Isómero de ácido dicafeoilquínico <sup>3, *</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	-	515,11975	0,49	20	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub> (0,50)	353,08792 (100)	-	-	a,b	(Clifford <i>et al.</i> , 2005; Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , 2010)
							[M-H] <sup>-</sup> -2C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> (2,97)	191,05553 (7)				
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> (3,71)	179,0343 (22)				
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (4,05)	161,02362 (1)				
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -CO <sub>2</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> (7,13)	135,04408 (2)				
10	Isómero de quercetina hexósido <sup>5</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	465,10196	-	1,70	60	[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> (1,72)	303,04941 (100)	3,0 ± 0,6	-	a,b	(Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , 2010)
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> (1,92)	285,03882 (9)				
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O-CO	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> (1,72)	257,04401 (23)				
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O-2CO	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> (1,29)	229,04924 (36)				
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (0,93)	165,01808 (15)				
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (1,10)	153,01807 (32)				
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (0,82)	137,02321 (24)				
11	Kaempferol 3-O-galactósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449,10724	-	0,15	60	[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> (1,14)	287,05469 (100)	0,18 ± 0,02	1,2 ± 0,2	a,c	
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (0,40)	153,01817 (14)				
12	Eriodictiol	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-	287,02014	1,44	40	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (6,09)	151,00276 (47)	<LOQ	-	a,c	
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> (7,24)	135,04417 (100)				
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> (10,53)	107,01273 (18)				

**Tabla H1.** Continuación.

13	Isómero del ácido tricafeoilquínico <sup>3</sup>	C <sub>34</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-	677,15131	0,16	30	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> (0,72)	515,11987 (14)	1,55 ± 0,04	-	a	
							[M-H] <sup>-</sup> -2C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub> (0,50)	353,08810 (89)				
							[M-H] <sup>-</sup> -2C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> (0,63)	335,07745 (24)				
							[M-H] <sup>-</sup> -3C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> (3,05)	191,05553 (37)				
							[M-H] <sup>-</sup> -2C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> (3,79)	179,03430 (82)				
							[M-H] <sup>-</sup> -3C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> (4,05)	173,04485 (100)				
							[M-H] <sup>-</sup> -2C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (5,13)	161,02359 (11)				
							[M-H] <sup>-</sup> -2C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -CO <sub>2</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> (7,02)	135,04420 (13)				
14	Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	303,04993	-	1,82	50	[M+H] <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> (1,59)	285,03891 (10)	1,6 ± 0,3	1,0 ± 0,3	a,b,c	(De Souza <i>et al.</i> , 2002)
							[M+H] <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CO	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> (1,72)	257,04401 (22)				
							[M+H] <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-2CO	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> (1,28)	229,04924 (34)				
							[M+H] <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-2CO	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> (1,10)	201,0544 (13)				
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (0,93)	165,01808 (14)				
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (1,10)	153,01807 (27)				
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -CO	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (0,81)	137,02321 (22)				
							15	Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>				
[M+H] <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CO	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> (1,35)	241,04936 (7)											
[M+H] <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-2CO	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> (1,11)	213,05438 (3)											
[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O-H <sub>2</sub> O	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (0,80)	153,01811 (44)											
[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> (0,36)	135,04401 (20)											
[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O (1,05)	117,03362 (3)											
16	Metilquercetina <sup>6</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	317,06512	-	1,43	50				[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> (1,48)	302,04166 (100)	0,25 ± 0,02
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CO	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> (1,48)	274,04678 (13)				
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -2CO-H <sub>2</sub> O	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> (1,77)	228,04131 (6)				
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (0,26)	137,02328 (3)				

<sup>1</sup> Cantidad expresada como equivalentes de ácido clorogénico.

<sup>2</sup> Cantidad expresada como equivalentes de kaempferol β-soforósido.

<sup>3</sup> Cantidad expresada como equivalentes de ácido 3,5-dicafeoilquínico.

<sup>4</sup> Cantidad expresada como equivalentes de quercetina 3-O-glucurónido.

<sup>5</sup> Cantidad expresada como equivalentes de quercetina 3-O-glucósido.

<sup>6</sup> Cantidad expresada como equivalentes de quercetina.

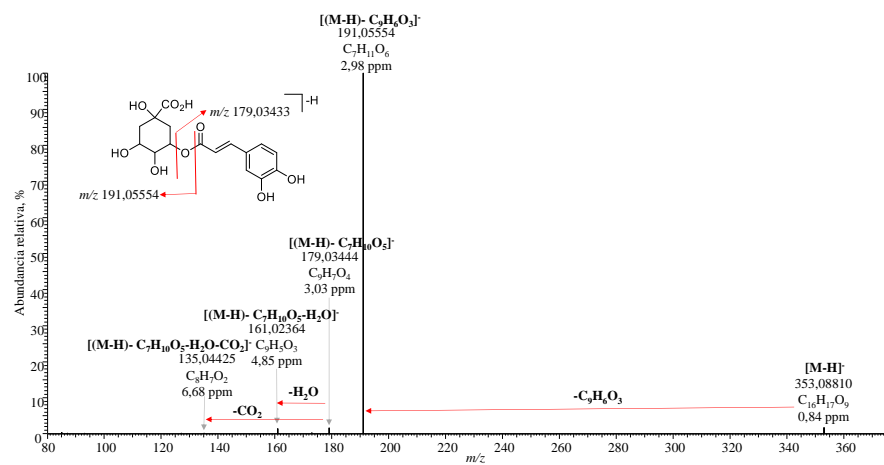
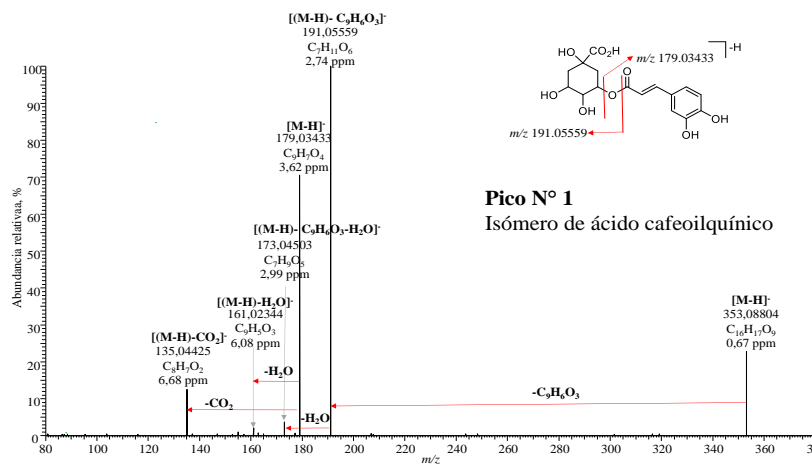
\* La cantidad registrada del pico N° 7 correspondió a la sumatoria del ácido 3,5-dicafeoilquínico + isómero del ácido dicafeoilquínico.

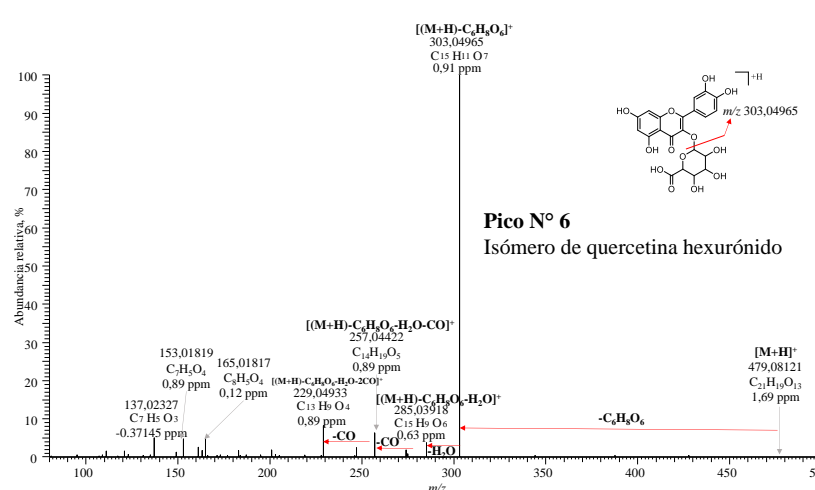
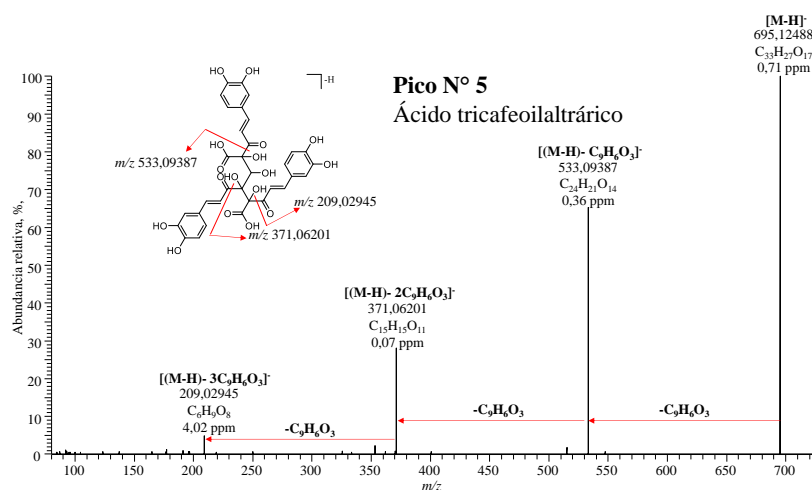
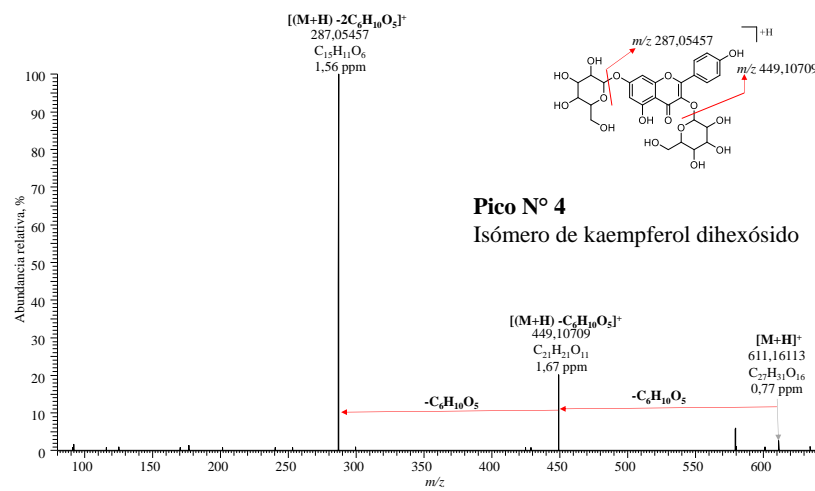
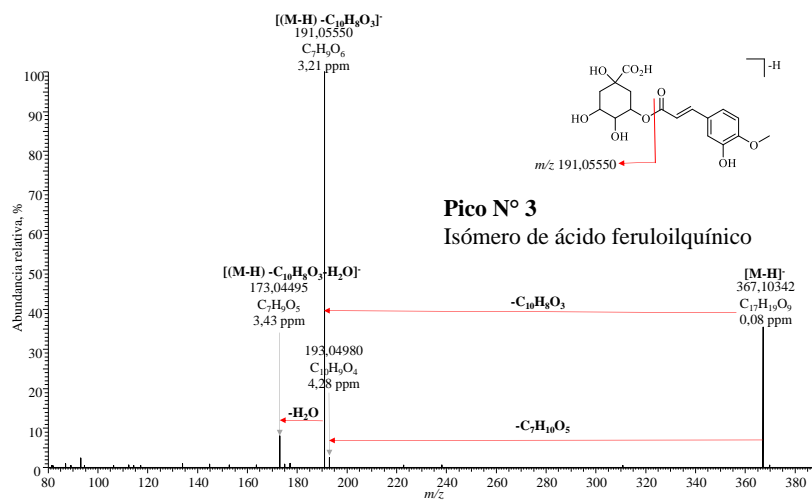
<sup>a</sup> Identificación tentativa basada en el estudio del patrón de fragmentación (ESI<sup>±</sup>-HRMS), la relación isotópica y consulta con lo reportado en base de datos espectrales, (HMDB, <http://hmdb.ca/spectra/ms/search/>) y fitoquímica (PCIDB, <http://www.genome.jp/db/pcoodb>).

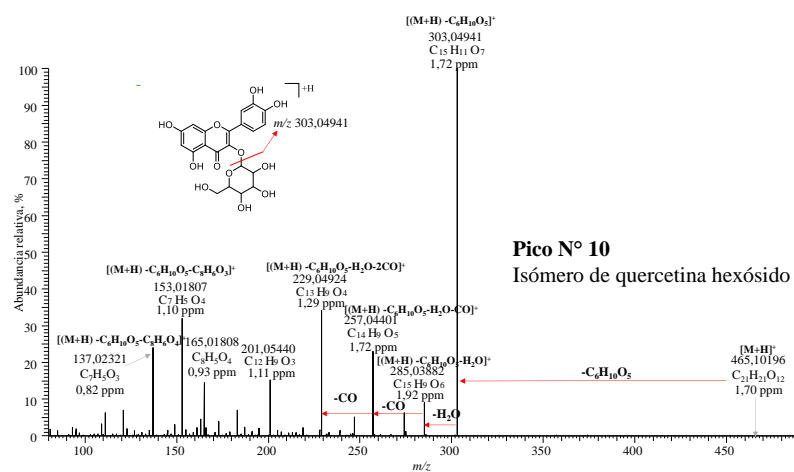
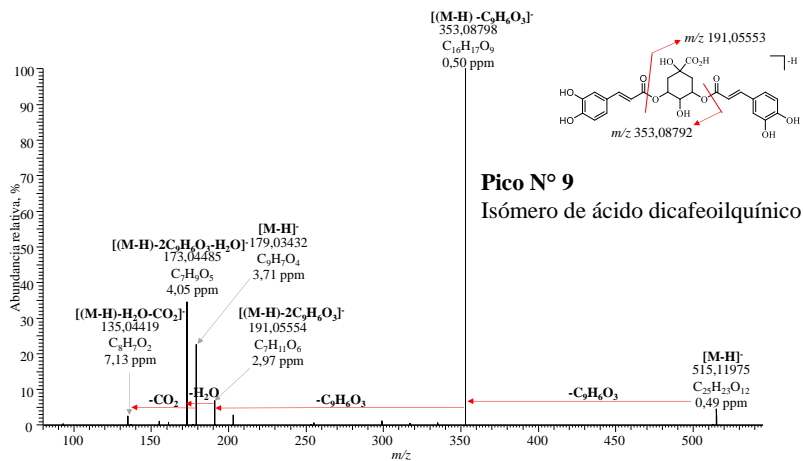
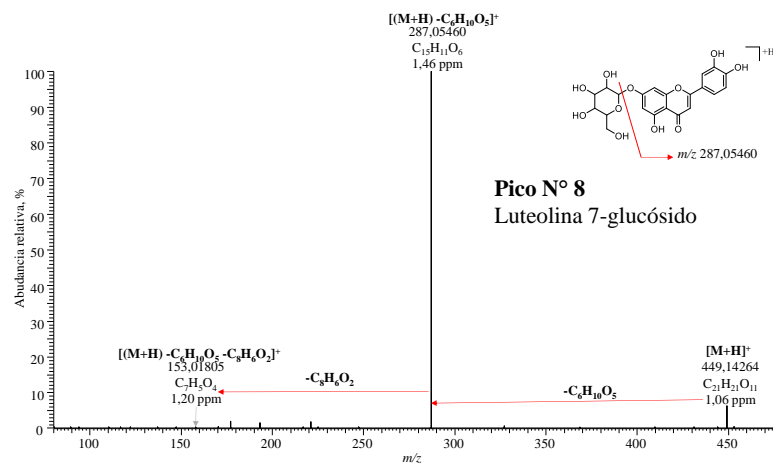
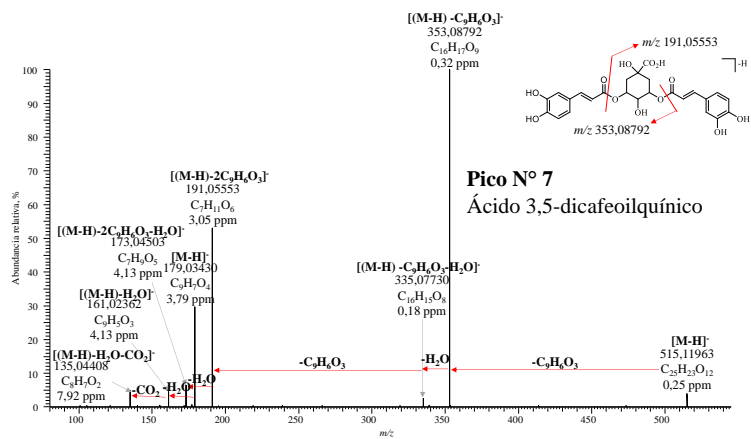
<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en la comparación de las masas exactas de moléculas protonadas o deprotonadas y sus iones-producto con lo reportado en la literatura para especies del género *Achyrocline* spp.

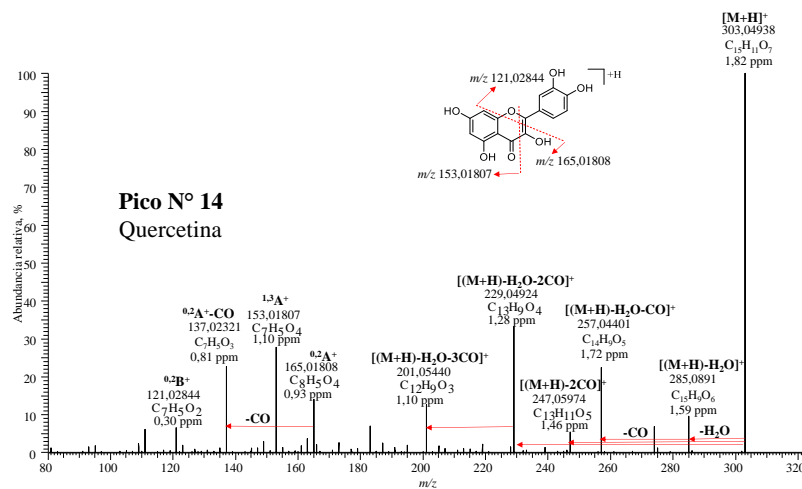
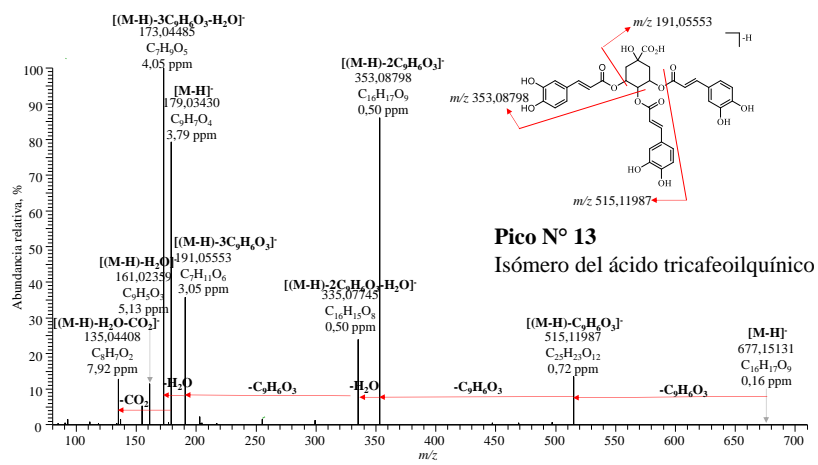
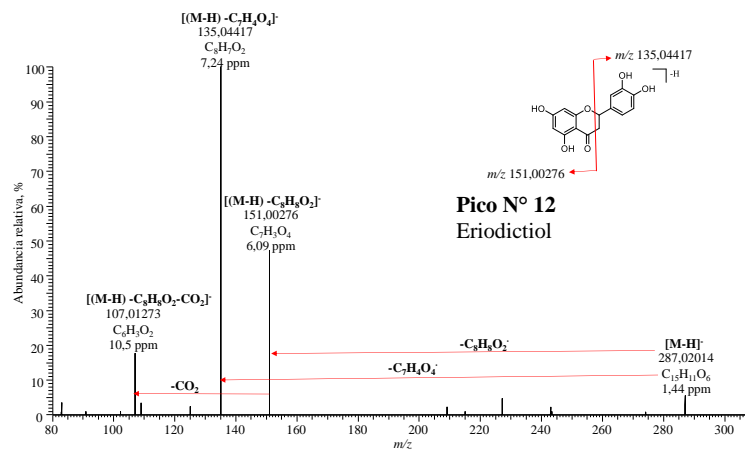
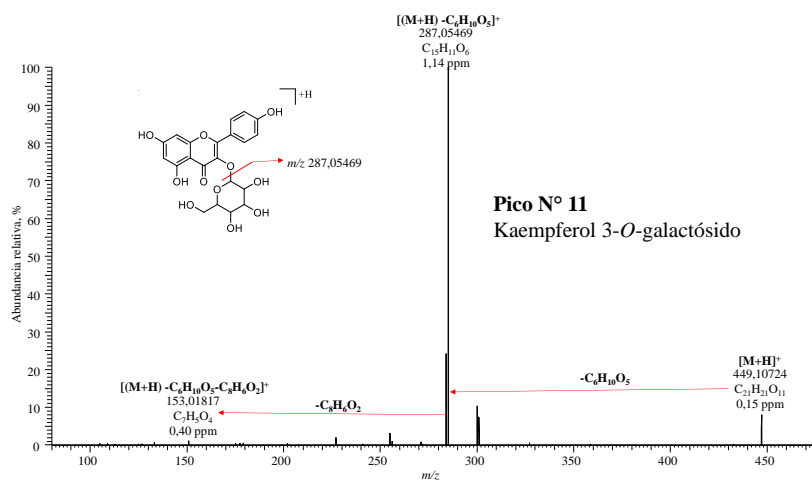
<sup>c</sup> Identificación confirmatoria basada en la comparación de espectros de masa (ESI<sup>+/-</sup>-HRMS) y tiempos de retención con los de sustancias patrón. HCD- high collision dissociation cell.

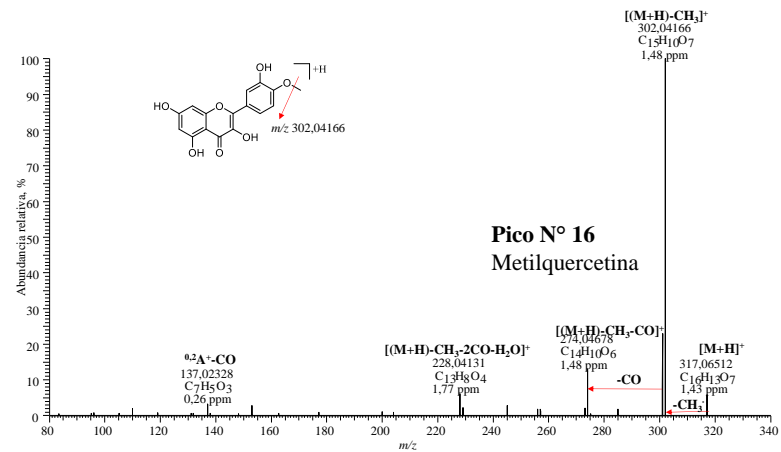
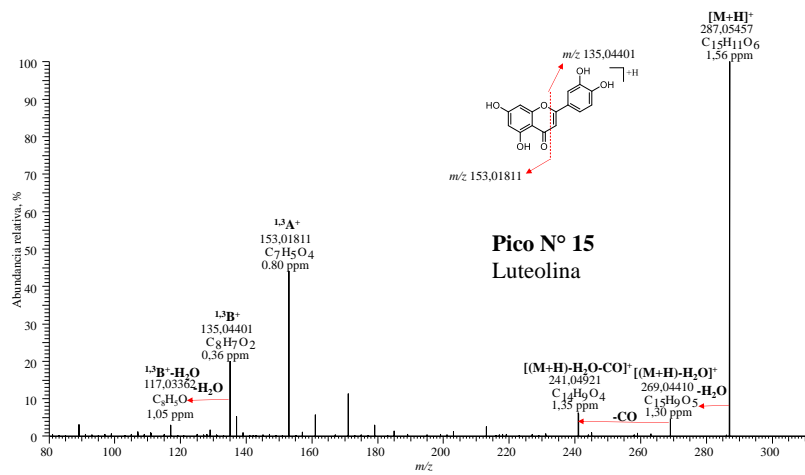
**Apéndice I.** Espectros de masas [ESI<sup>+/-</sup>-HRMS] de los compuestos fenólicos identificados en los extractos hidroalcohólicos de *A. saturojoides* y *A. bogotensis*.



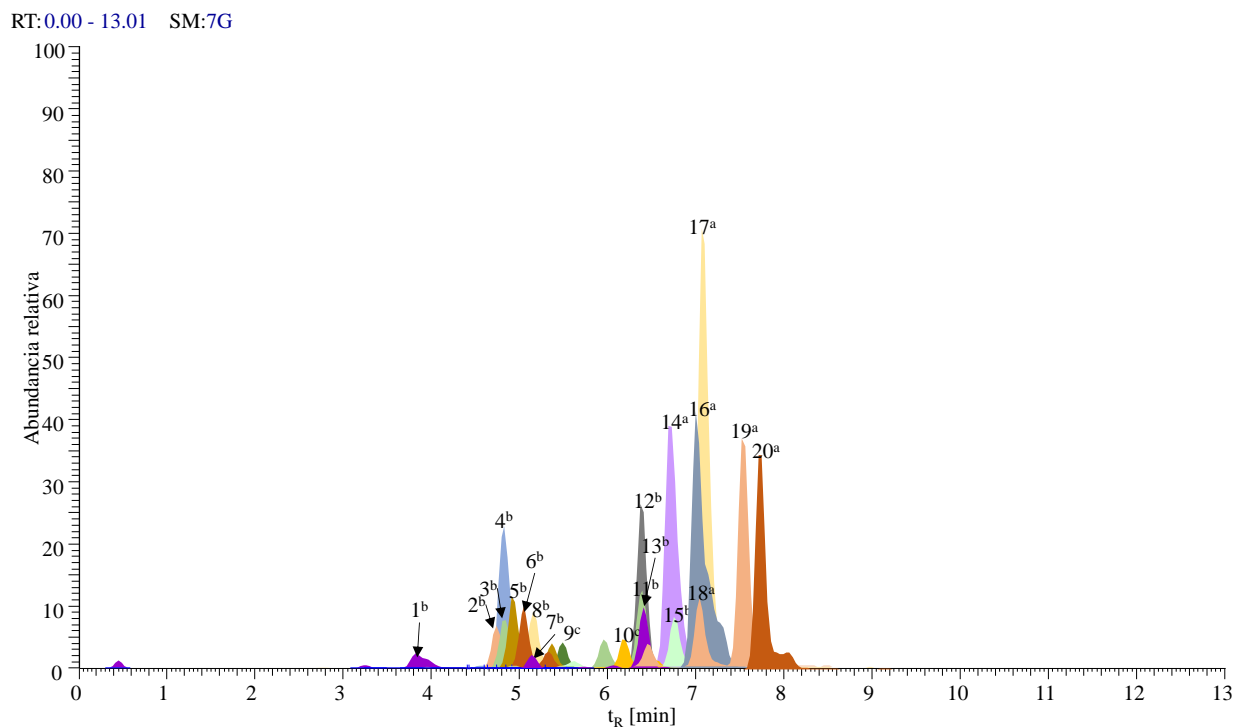








**Apéndice J.** Identificación y cuantificación realizada por UHPLC-ESI-*Orbitrap*-HRMS de los compuestos fenólicos detectados en el extracto hidroalcohólico de *L. colombiana*.



**Figura J1.**

Corrientes iónicas extraídas (EIC) de las moléculas protonadas  $[M+H]^+$  y deprotonadas  $[M-H]^-$  obtenidas por UHPLC-ESI-*Orbitrap*-HRMS de los compuestos fenólicos presentes en el extracto hidroalcohólico de material vegetal seco sin destilar de *L. colombiana*. La identificación de los picos se encuentra en la **Tabla I1**.

*Nota:* Las letras que se encuentran como superíndices al lado de los números de los picos indican la escala de la corriente iónica extraída de la respectiva molécula ionizada. Las escalas son: **a.**  $4,0 \times 10^8$ ; **b.**  $4,0 \times 10^7$  y **c.**  $4,0 \times 10^6$ .

**Tabla J1.**

Masas exactas de moléculas protonada [M+H]<sup>+</sup> o deprotonadas [M-H]<sup>-</sup>, identificadas por UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS em el extracto de *L. colombiana*.

N° Fig. 14	Compuesto	Fórmula	Masa experimental, m/z		Error, Δ ppm	HCD, eV	Iones producto			mg/g de extracto (x̄ ± s, n=3)	Criterios de identificación	Ref.
			[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>			Fragmentos	Fórmula (ppm)	m/z, I (%)			
1	Ácido clorogénico	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-	353,08792	0,32	10	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> (3,05)	191,05553 (100)	0,23 ± 0,02	a, c	
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> (3,46)	179,03436 (1)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (5,23)	161,02357 (1)			
2	Ácido <i>p</i> -cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-	163,03937	4,29	20	[M-H] <sup>-</sup> -CO <sub>2</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O (7,74)	119,04932 (100)	0,83 ± 0,05	a, b, c	Sousa y Costa (2012)
3	Fucatosido B <sup>1</sup>	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>19</sub>	-	741,22522	0,63	30	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> O <sub>16</sub> (0,73)	579,19348 (66)	1,00 ± 0,02	a, b	Julião <i>et al.</i> (2009)
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub> (0,65)	447,15109 (9)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -2C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub> (1,58)	315,10904 (6)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -2C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (4,66)	161,02367 (100)			
4	Isoschaftósido (apigenina C-glucósido C-arabinosido) <sup>2</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	565,15570	-	0,92	20	[M+H] <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub> (0,29)	547,14478 (21)	4,4 ± 0,2	a, b	Li y Claeys, (1994)
							[M+H] <sup>+</sup> -2H <sub>2</sub> O	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> (0,38)	529,13385 (46)			
							[M+H] <sup>+</sup> -3H <sub>2</sub> O	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> (0,86)	511,12305 (75)			
							[M+H] <sup>+</sup> -30-2H <sub>2</sub> O	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> (1,25)	499,12286 (26)			
							[M+H] <sup>+</sup> -30-3H <sub>2</sub> O	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub> (1,54)	481,11218 (30)			
							[M+H] <sup>+</sup> -120-H <sub>2</sub> O	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub> (1,15)	427,10187 (100)			
							[M+H] <sup>+</sup> -120-2H <sub>2</sub> O	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> (1,19)	409,09131 (76)			
							[M+H] <sup>+</sup> -120-3H <sub>2</sub> O	C <sub>22</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub> (0,44)	391,08105 (17)			
							[M+H] <sup>+</sup> -120-30-2H <sub>2</sub> O	C <sub>21</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub> (0,86)	379,08090 (21)			
							[M+H] <sup>+</sup> -120-90	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub> (0,92)	355,08090 (8)			
[M+H] <sup>+</sup> -120-120	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> (0,70)	325,07089 (9)										
5	Conandrosido <sup>1</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	-	609,18280	0,50	20	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub> (0,17)	447,15088 (45)	1,28 ± 0,05	a, b	Keefover-Ring <i>et al.</i> (2014)
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub> (1,87)	315,10913 (1)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (5,04)	161,02361 (58)			
6	Verbascósido <sup>1</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	-	623,19824	0,16	20	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>12</sub> (0,65)	461,16675 (17)	1,19 ± 0,03	a, b	Jimenez y Riguera, (1994)
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub> (1,09)	315,10889 (0,4)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (4,94)	161,02362 (38)			
7	Luteolina 7- <i>O</i> -glucurónido	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	463,08664	-	0,60	10	[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> (1,46)	287,05460 (34)	0,32 ± 0,02	a, b, c	Sousa y Costa (2012)
8	Forsitósido B <sup>1</sup>	C <sub>34</sub> H <sub>44</sub> O <sub>19</sub>	-	755,24213	2,28	30	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> O <sub>16</sub> (0,98)	593,20929 (52)	1,46 ± 0,03	a, b	Guo <i>et al.</i> , (2007)
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>12</sub> (1,77)	461,16727 (7)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub> (1,68)	315,10907 (3)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (4,85)	161,02364 (100)			
9	Apigenina 7-glucurónido	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	447,08994	-	5,04	20	[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> (1,73)	271,05963 (100)	< LOD	a, b, c	Sousa y Costa (2012)

**Tabla J1.** Continuación.

10	Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	273,07538	-	1,36	40	[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (0,50)	153,01816 (100)	< LOQ	a, b, c	Sousa y Costa (2012)
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> (0,54)	147,04398 (57)			
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O (0,76)	119,04923 (8)			
11	Nepetina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	317,06525	-	1,05	40	[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> (0,87)	302,04184 (100)	0,34 ± 0,01	a, c	
							[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> (1,58)	315,08582 (100)			
12	Irisolidona hexurónico <sup>3</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	491,11761	-	1,60	20	[M+H] <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (3,34)	300,06384 (2)	6,0 ± 0,5	a	
							[M-H] <sup>-</sup> -CO <sub>2</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> (2,55)	241,05002			
13	Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	-	285,04050	0,12	50	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> (2,41)	217,05011	< LOD	a, b, c	Fabre <i>et al.</i> , (2001)
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> (3,21)	199,03943 (16)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> (3,91)	175,03938 (19)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (5,99)	151,00278 (39)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> (7,16)	133,02855 (100)			
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub> (1,30)	316,05734 (100)			
14	Flavona metilada <sup>4</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	331,08078	-	1,35	40	[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> (1,16)	298,04684 (50)	5,7 ± 0,3	a, b	Sousa y Costa (2012)
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-CO	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> (1,12)	270,05197 (24)			
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-2CO	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> (0,70)	242,05719 (1)			
							[M-H] <sup>-</sup> -CO	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> (0,43)	241,05074 (1)			
15	Apigenina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-	269,04562	0,29	50	[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> (1,38)	227,03467 (9)	< LOD	a, b, c	Fabre <i>et al.</i> , (2001)
							[M-H] <sup>-</sup> -CO <sub>2</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> (2,07)	225,05525 (12)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> (3,22)	201,05507 (11)			
							[M-H] <sup>-</sup> -2CO <sub>2</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O (1,38)	181,06522 (7)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> (5,09)	159,04434 (11)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (5,79)	151,00281 (41)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (5,96)	149,02353 (41)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O (8,64)	117,03358 (100)			
							[M-H] <sup>-</sup> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O-CO <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> (9,67)	107,01282 (24)			
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> (1,31)	360,08350 (16)			
16	Flavona metilada <sup>4</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	375,10699	-	1,20	30	[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub> (1,09)	342,07303 (17)	9 ± 1,1	a, b	Fabre <i>et al.</i> , (2001); Sousa y Costa (2012)
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-CO	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> (1,35)	314,07806 (5)			
17	Flavona metilada <sup>4</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	345,09659	-	0,84	40	[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub> (0,86)	330,07312 (76)	6 ± 1,5	a, b	Sousa y Costa (2012)
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (0,89)	312,06256 (100)			
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-CO	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> (0,89)	284,06766 (57)			
18	Cirsimaritina	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	315,08597	-	1,10	40	[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (0,83)	300,06259 (46)	< LOQ	a, b, c	Sousa y Costa (2012)
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> (0,86)	282,05203 (27)			
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-CO	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> (0,73)	254,05717 (12)			
19	Flavona metilada <sup>5</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	315,08594	-	1,20	40	[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (1,03)	300,06253 (100)	0,66 ± 0,04	a, b	Sousa y Costa (2012)
							[M+H] <sup>+</sup> -CO	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> (0,73)	272,06760 (3)			
20	Salvigenina	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	329,10156	-	1,22	40	[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> (1,74)	314,07794 (36)	0,44 ± 0,06	a, b, c	Sousa y Costa (2012)
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> (1,21)	296,06757 (100)			
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-CO	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> (1,18)	268,07269 (60)			
							[M+H] <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-2CO	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> (0,83)	240,07805 (2)			

<sup>1</sup> Cantidad expresada como equivalentes de ácido cafeico.

<sup>2</sup> Cantidad expresada como equivalentes de vitexina.

<sup>3</sup> Cantidad expresada como equivalentes de quercetina 3-*O*-glucurónico.

<sup>4</sup> Cantidad expresada como equivalentes de pachipodol.

<sup>5</sup> Cantidad expresada como equivalentes de cirsimaritina.

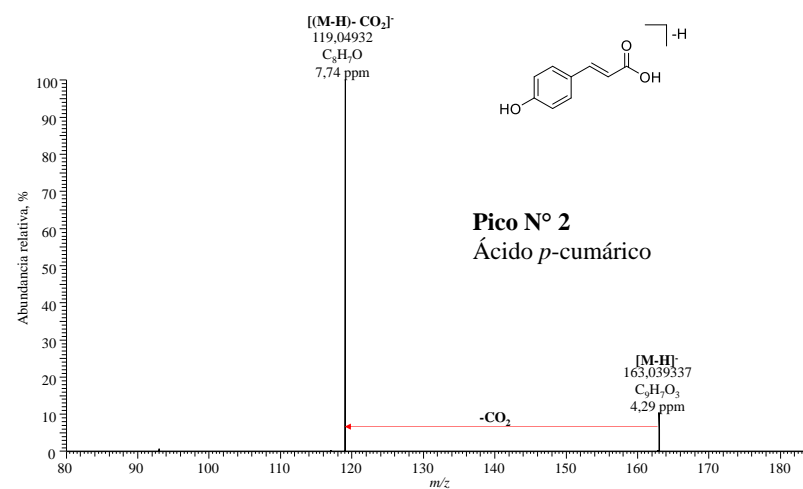
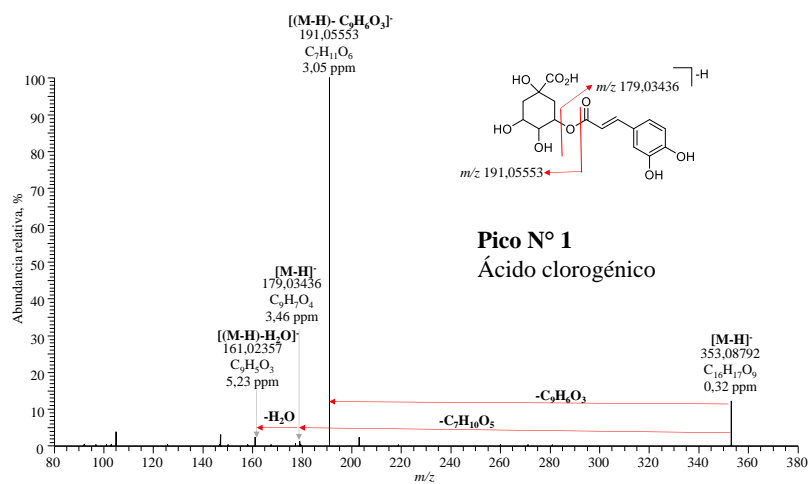
<sup>a</sup> Identificación tentativa basada en el estudio del patrón de fragmentación (ESI<sup>±</sup>-HRMS), la relación isotópica y consulta con lo reportado en base de datos espectrales, (HMDB, <http://hmdb.ca/spectra/ms/search/>) y fitoquímica (PCIDB, <http://www.genome.jp/db/pcodb>).

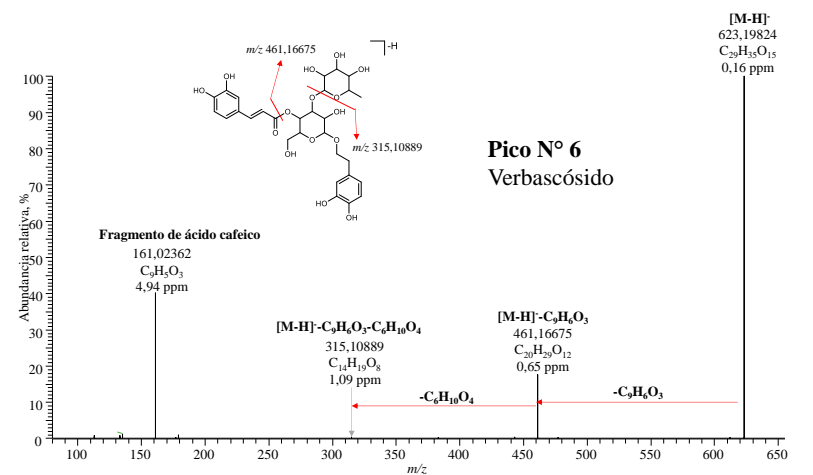
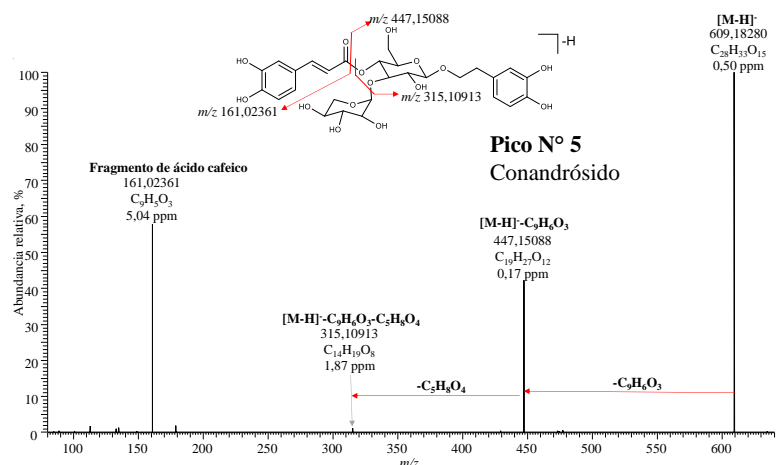
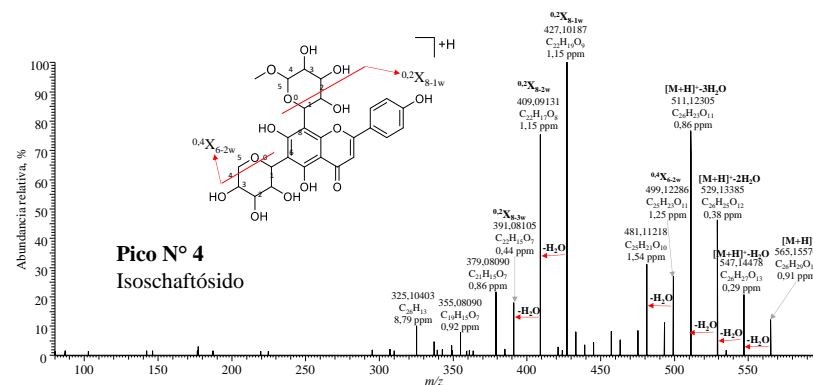
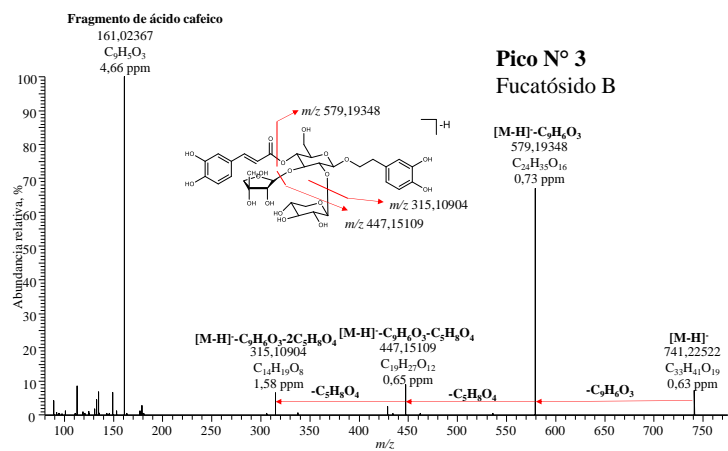
<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en la comparación de las masas exactas de moléculas protonadas o deprotonadas y sus iones-producto con lo reportado en la literatura para especies del género *Lantana* spp.

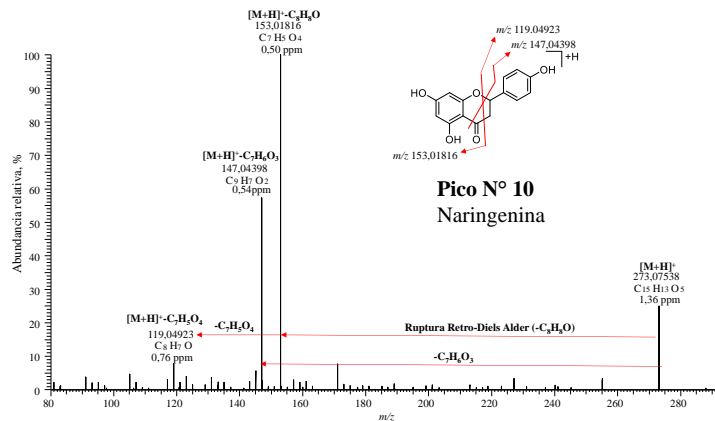
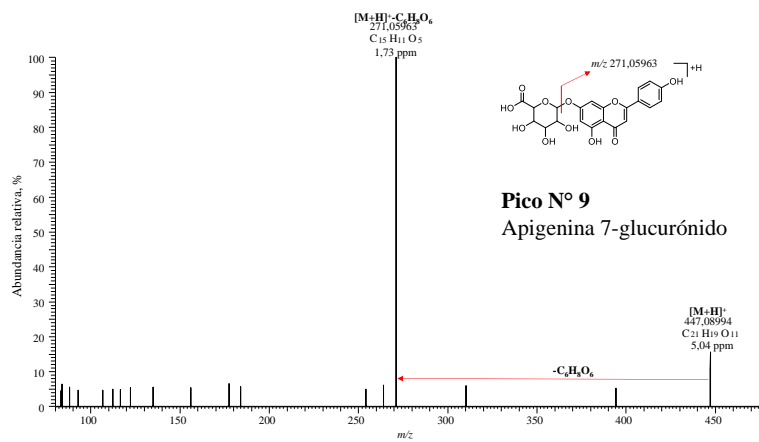
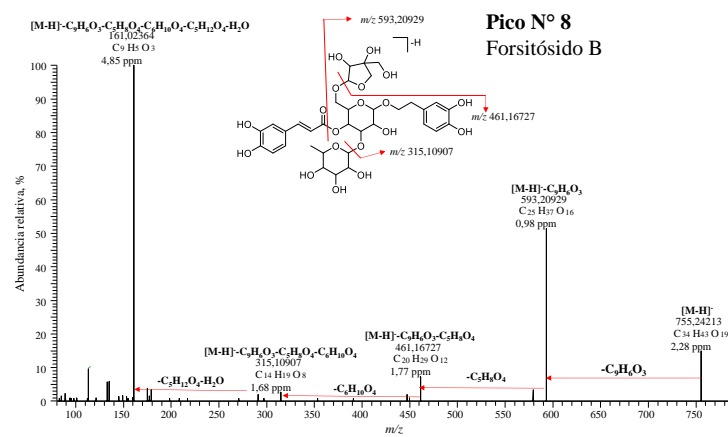
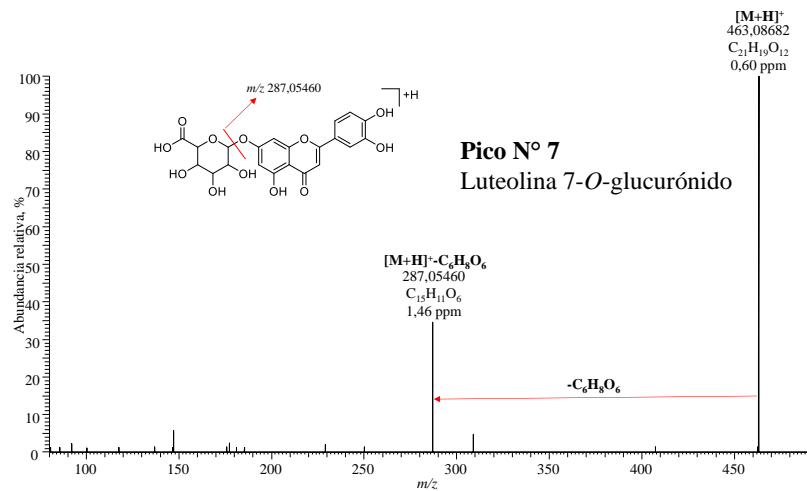
<sup>c</sup> Identificación confirmatoria basada en la comparación de espectros de masa (ESI<sup>±</sup>-HRMS) y tiempos de retención con los de sustancias patrón.

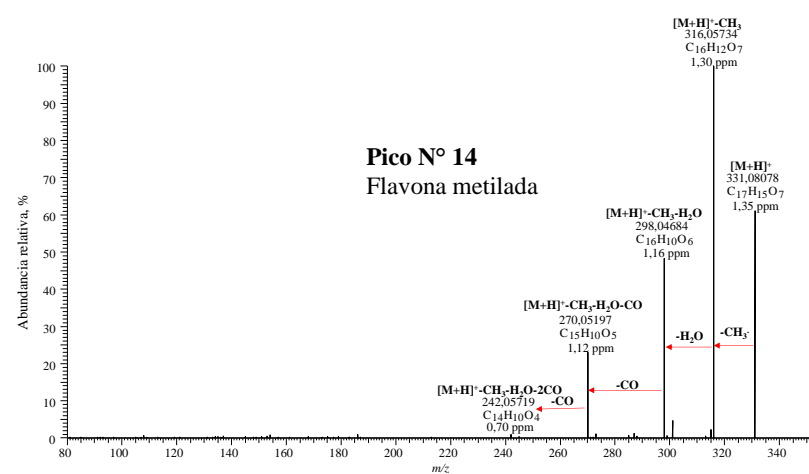
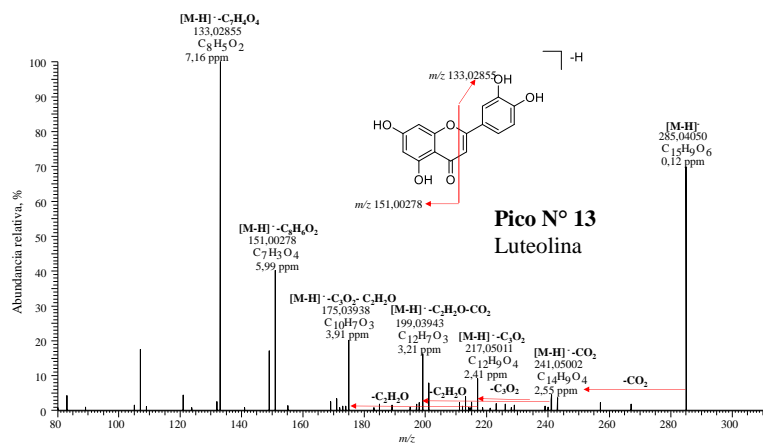
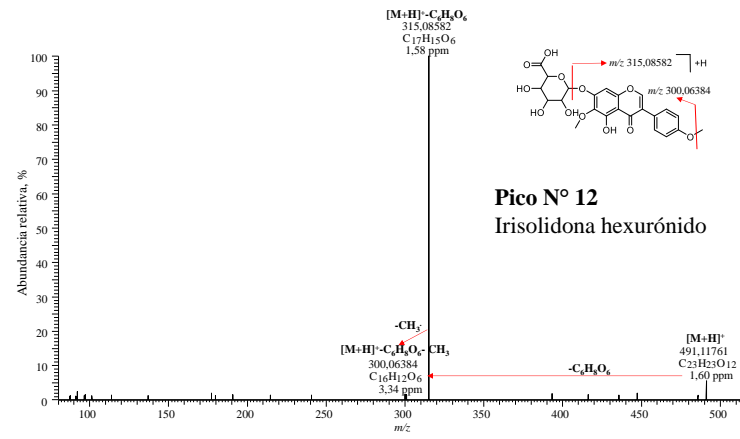
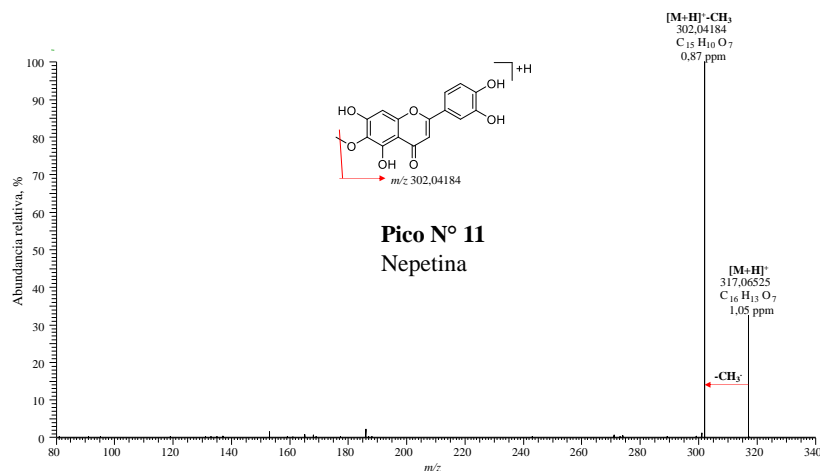
HCD- high collision dissociation cell.

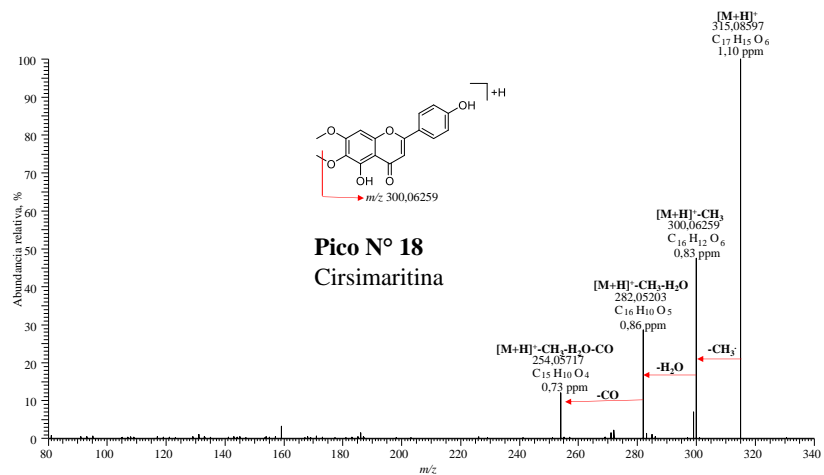
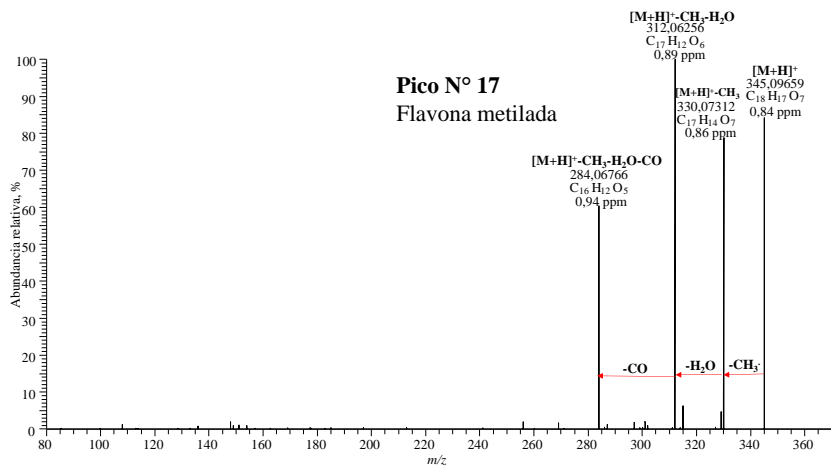
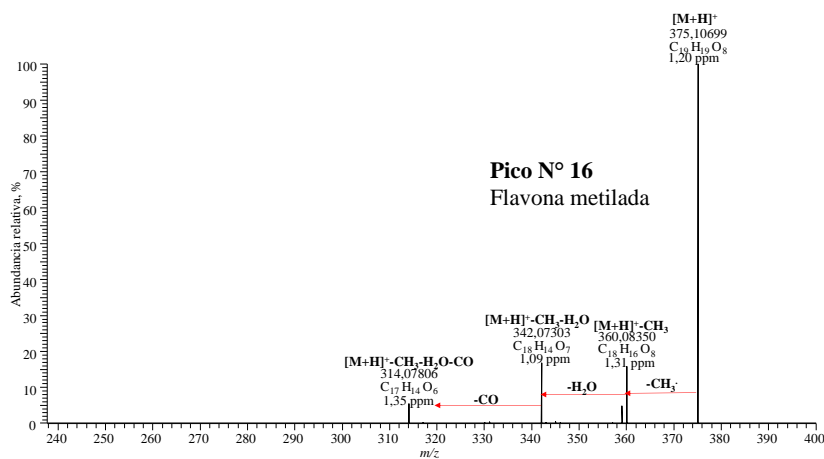
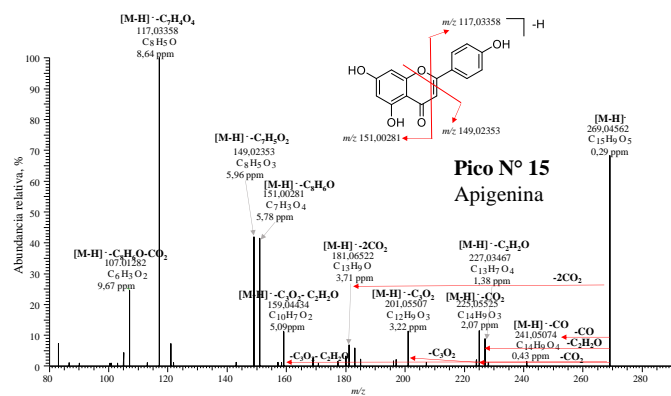
**Apéndice K.** Espectros de masas [ESI<sup>±</sup>-HRMS] de los compuestos fenólicos identificados en el extracto de *L. colombiana*

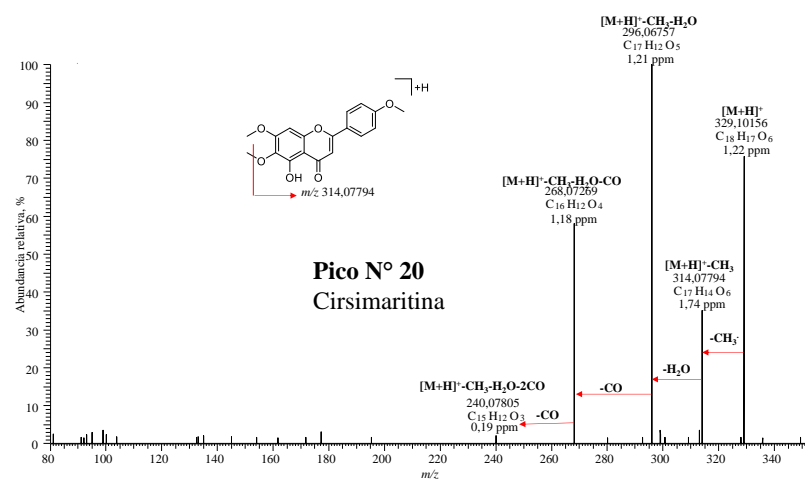
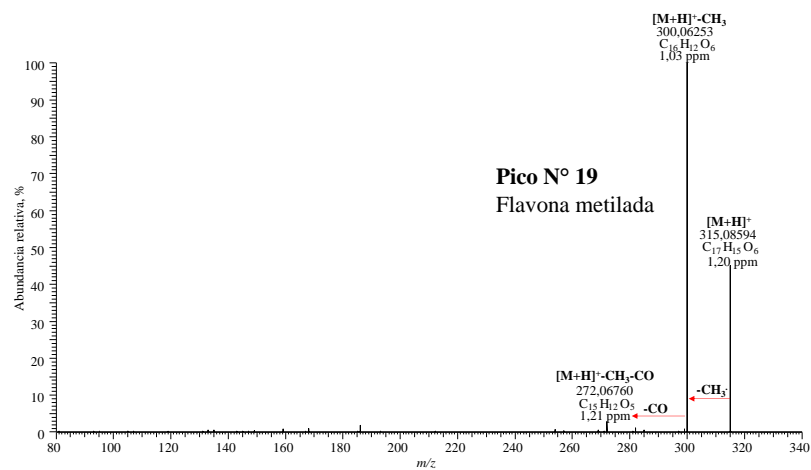












**Apéndice L.** Resultados de los parámetros de fotoprotección de los diseños experimentales (diseño factorial 2<sup>3</sup>) para las plantas bajo estudio.

**Tabla L1.** Parámetro de fotoprotección *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de las plantas estudiadas.

N°	Variables estudiadas			Parámetros de fotoprotección								
				<i>A. saturejoides</i>			<i>A. bogotensis</i>			<i>L. colombiana</i>		
	Temp., °C	Tiempo, min	EtOH:H <sub>2</sub> O, v/v	SPF <sup>a</sup>	λ <sub>c</sub> <sup>c</sup>	Relación UVA1/UV <sup>d</sup>	SPF <sup>a,b</sup>	λ <sub>c</sub> <sup>c</sup>	Relación UVA1/UV <sup>d</sup>	SPF <sup>a</sup>	λ <sub>c</sub> <sup>c</sup>	Relación UVA1/UV <sup>d</sup>
1	60	15	60:40	7,3 ± 0,1	370	0,57	13,7 ± 0,2	366	0,56	11,5 ± 0,2	372	0,64
2	40	15	80:20	13,1 ± 0,2	373	0,60	15,3 ± 0,3	367	0,56	13,0 ± 0,1	376	0,70
3	40	15	60:40	8,7 ± 0,2	366	0,54	17,0 ± 0,3	368	0,59	9,0 ± 0,4	372	0,64
4	60	35	60:40	10,2 ± 0,3	369	0,57	13,4 ± 0,3	366	0,56	11,0 ± 0,4	371	0,65
5	60	35	80:20	13,5 ± 0,4	374	0,62	15,6 ± 0,2	369	0,62	14,0 ± 0,4	378	0,73
6	40	35	80:20	13,0 ± 0,2	371	0,60	15,4 ± 0,3	369	0,58	14,4 ± 0,1	379	0,74
7	40	35	60:40	11,9 ± 0,1	370	0,57	16,8 ± 0,1	370	0,62	9,4 ± 0,1	371	0,63
8	60	15	80:20	15,0 ± 0,2	376	0,65	10,3 ± 0,3	364	0,57	12,5 ± 0,3	374	0,68
9	50	25	70:30	15,3 ± 0,1	372	0,60	13,0 ± 0,2	366	0,58	11,1 ± 0,2	371	0,64

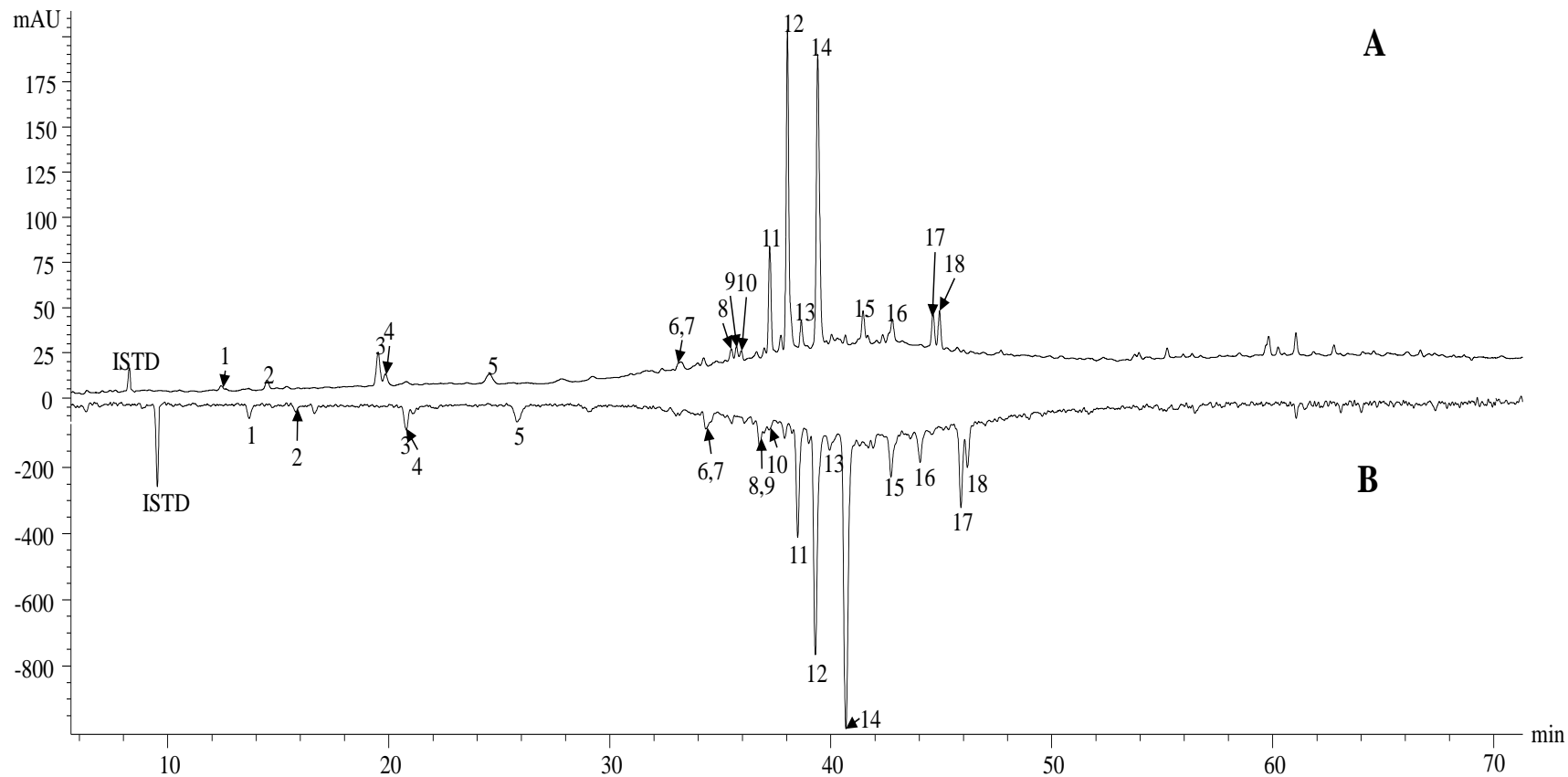
<sup>a</sup> Promedio ± desviación estándar (n=3). Los valores se obtuvieron de extractos diluidos a una concentración de 200 mg/L.

<sup>b</sup> La eficacia fotoprotectora (SPF *in vitro* y λ<sub>c</sub>) se estableció de acuerdo con las categorías establecidas por la *Food and Drugs Administration* (FDA) de los Estados Unidos y por la *European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* (COLIPA): protección baja (6,0 ≤ SPF *in vitro* ≤14,9), protección media (15,0 ≤ SPF *in vitro* ≤29,9), protección alta (30,0 ≤ SPF *in vitro* ≤59,9) y protección muy alta (SPF *in vitro* ≥60,0).

<sup>c</sup> Las pautas de la FDA y COLIPA indican que un producto con una λ<sub>c</sub> ≥ 370 nm puede brindar protección de amplio espectro (radiación UVA y UVB).

<sup>d</sup> Según la relación de absorbancia UVA1/UV, los protectores solares se asignan a cuatro categorías: protección baja (relación UVA1/UV ≥0,20); protección media (relación UVA1/UV ≥ 0,40); protección alta (relación UVA1/UV ≥ 0,70); protección muy alta (relación UVA1/UV ≥ 0,95).

**Apéndice M.** Perfil cromatográfico del extracto de *A. saturejoides* obtenido por HPLC con derivatizador.



**Figura M1.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto de *A. saturejoides*, antes (DAD, **A.**  $\lambda=290$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical  $ABTS^{+\cdot}$ . La identificación de los picos aparece en la **Tabla L1**.

**Tabla M1.** Capacidad antioxidante de compuestos presentes en el extracto hidroalcohólicos de *A. saturejoides*.

N° Fig. M1	t <sub>R</sub> , min λ=290 nm	Compuesto	λ, nm	μmol of Trolox <sup>®</sup> / g extracto	Porcentaje de la capacidad antioxidante, %	Criterio de identificación	Referencia
1	12,5	Derivado de ácido hidroxibenzoico	227, 260 <sup>máx</sup> , 293	3,02 ± 0,02	1	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
2	14,6	Derivado de ácido hidroxicinámico	240, 290 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	1,3 ± 0,3	0,4	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
3	19,6	Ácido clorogénico	240, 290 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	6,52 ± 0,02	2	c	Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , (2009)
4	19,9	Derivado de ácido hidroxicinámico	240, 290 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	1,95 ± 0,04	1	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
5	24,8	Derivado de ácido hidroxicinámico	240, 290 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	6,0444 ± 0,0003	2	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
6	33,2	Derivado de ácido hidroxicinámico	240, 290 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	3,0 ± 0,7	1	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
7	33,4	Derivado de ácido hidroxicinámico	240, 290 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	3,0 ± 0,7	1	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
8	35,6	Derivado de flavonol	255 <sup>máx</sup> , 272 <sup>h</sup> , 370	6,5 ± 0,01	2	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
9	35,8	NI	270, 322 <sup>máx</sup>	5,0 ± 0,2	1		
10	36,0	Derivado de ácido hidroxicinámico	240, 295 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	4,0 ± 0,4	1	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
11	37,3	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	240, 295 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	32,0 ± 0,6	9	a,b,c	Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , (2009)
12	38,1	Ácido 3,5-dicafeoilquínico	240, 295 <sup>h</sup> , 326 <sup>máx</sup>	80 ± 4,3	22	a,b,c	Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , (2009)
13	38,7	Derivado de flavonol	254, 268 <sup>h</sup> , 320 <sup>h</sup> , 375 <sup>máx</sup>	14,05 ± 0,05	4	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
14	39,4	Derivado de ácido hidroxicinámico	245, 298 <sup>h</sup> , 329 <sup>máx</sup>	113 ± 2,2	33	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
15	41,6	Derivado de ácido hidroxicinámico	240, 290 <sup>h</sup> , 300 <sup>máx</sup>	17,43 ± 0,03	5	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
16	42,9	Derivado de ácido hidroxicinámico	245, 290 <sup>h</sup> , 330 <sup>máx</sup>	13,31 ± 0,03	4	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
17	44,7	Quercetina	256, 272 <sup>h</sup> , 370	23 ± 2,7	7	a,b,c	Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , (2009)
18	45,0	Derivado de ácido hidroxicinámico	240, 290 <sup>h</sup> , 330 <sup>máx</sup>	10,90 ± 0,05	3	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
<b>Total HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup></b>				340 ± 12			

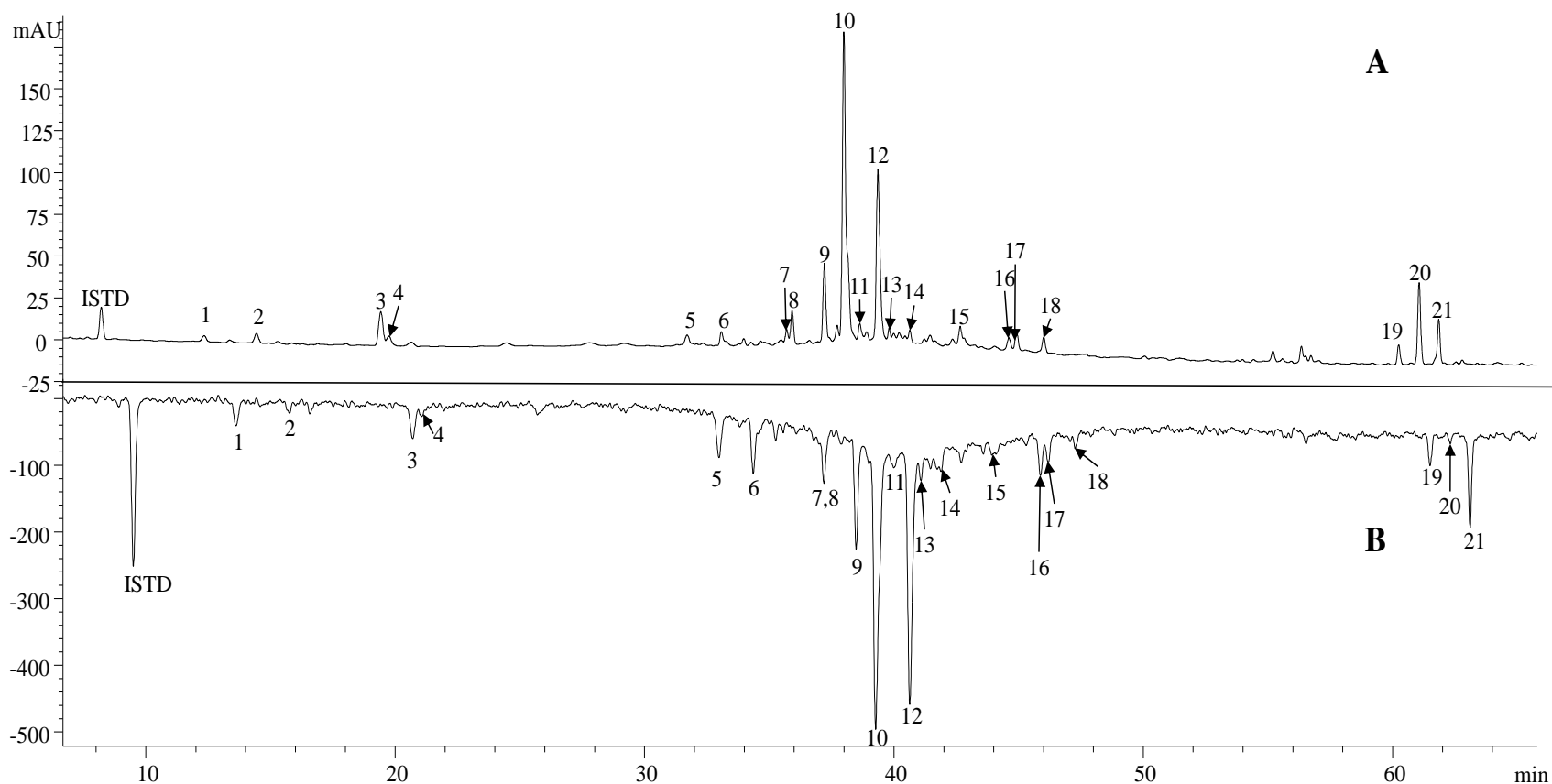
<sup>1</sup>Valor promedio ± desviación estándar, n=2. NI Compuesto no identificado. <sup>máx</sup> Máximo. <sup>h</sup> Hombro.

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

<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y por comparación con espectro UV-Vis reportado en artículos científicos (Grassi-Zampieron *et al.*, 2009; Mabry *et al.*, 1970).

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

**Apéndice N.** Perfil cromatográfico del extracto de *A. bogotensis* obtenido por HPLC con derivatizador.



**Figura N1.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto de *A. bogotensis*, antes (DAD, **A.**  $\lambda=290$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>+</sup>. La identificación de los picos aparece en la **Tabla M1.**

**Tabla N1.** Capacidad antioxidante de compuestos presentes en el extracto hidroalcohólicos de *A. bogotensis*.

N° Fig. M1	tr, min		λ, nm	μmol de Trolox®/ g extracto	Porcentaje de la capacidad antioxidante, %	Criterio de identificación	Referencia
	λ=290 nm	Compuesto					
1	12,3	Derivado de ácido hidroxibenzoico	226, 260 <sup>máx</sup> , 293	5,30 ± 0,01	1	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
2	14,4	Derivado de ácido hidroxicinámico	240, 290 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	1,9 ± 0,1	1	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
3	19,4	Ácido clorogénico	240, 290 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	8,091 ± 0,001	2	a,b,c	Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , (2009)
4	19,7	Derivado de ácido hidroxicinámico	245, 295 <sup>h</sup> , 328 <sup>máx</sup>	3,04 ± 0,03	1	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
5	31,7	Derivado de flavonol	230 <sup>h</sup> , 260, 355 <sup>máx</sup>	10,2 ± 0,1	3	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
6	33,1	Derivado de flavona	230, 255, 282, 345 <sup>máx</sup>	11,80 ± 0,02	3	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
7	35,7	Derivado de flavona	228, 276, 320 <sup>máx</sup>	4,0 ± 0,1	1	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
8	35,9	Quercetina 3-O-glucósido	226, 255 <sup>máx</sup> , 295 <sup>h</sup> , 355	15,1 ± 0,1	4	a,b,c	Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , (2009)
9	37,2	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	240, 295 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	30,2 ± 0,1	8	a,b,c	Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , (2009)
10	38,0	Ácido 3,5-dicafeoilquínico	240, 295 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	96 ± 1,5	26	a,b,c	Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , (2009)
11	38,6	Derivado de flavonol	228 <sup>máx</sup> , 253, 270, 365	21,0 ± 0,9	6	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
12	39,4	Derivado de ácido hidroxicinámico	240, 29 <sup>h</sup> , 325 <sup>máx</sup>	81,90 ± 0,01	23	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
13	39,8	Derivado de flavona	228 <sup>máx</sup> , 282, 340	13,2 ± 0,1	4	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
14	40,6	Derivado de ácido hidroxicinámico	226 <sup>máx</sup> , 290 <sup>h</sup> , 330	10,8 ± 0,1	3	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
15	42,7	NI	227 <sup>máx</sup> , 260, 315, 360	6,4 ± 0,1	2	-	
16	44,6	Derivado de flavonol	227 <sup>máx</sup> , 255, 370	10,8 ± 0,2	3	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
17	44,9	Derivado de flavona	225, 248, 270, 295 <sup>h</sup> , 334 <sup>máx</sup>	6,4 ± 0,3	2	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
18	46,0	Derivado de flavonol	230, 255, 295 <sup>h</sup> , 355 <sup>máx</sup>	3,0 ± 0,2	1	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
19	60,2	Derivado de flavona	225 <sup>máx</sup> , 285, 325 <sup>h</sup> , 375	5,96 ± 0,01	2	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
20	61,1	Derivado de flavona	220, 272 <sup>máx</sup> , 360	1,390 ± 0,004	0,4	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
21	61,9	Derivado de flavanona	230, 293 <sup>máx</sup> , 340 <sup>h</sup>	14,7 ± 0,2	4	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
<b>Total HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup></b>				<b>361,0 ± 0,7</b>			

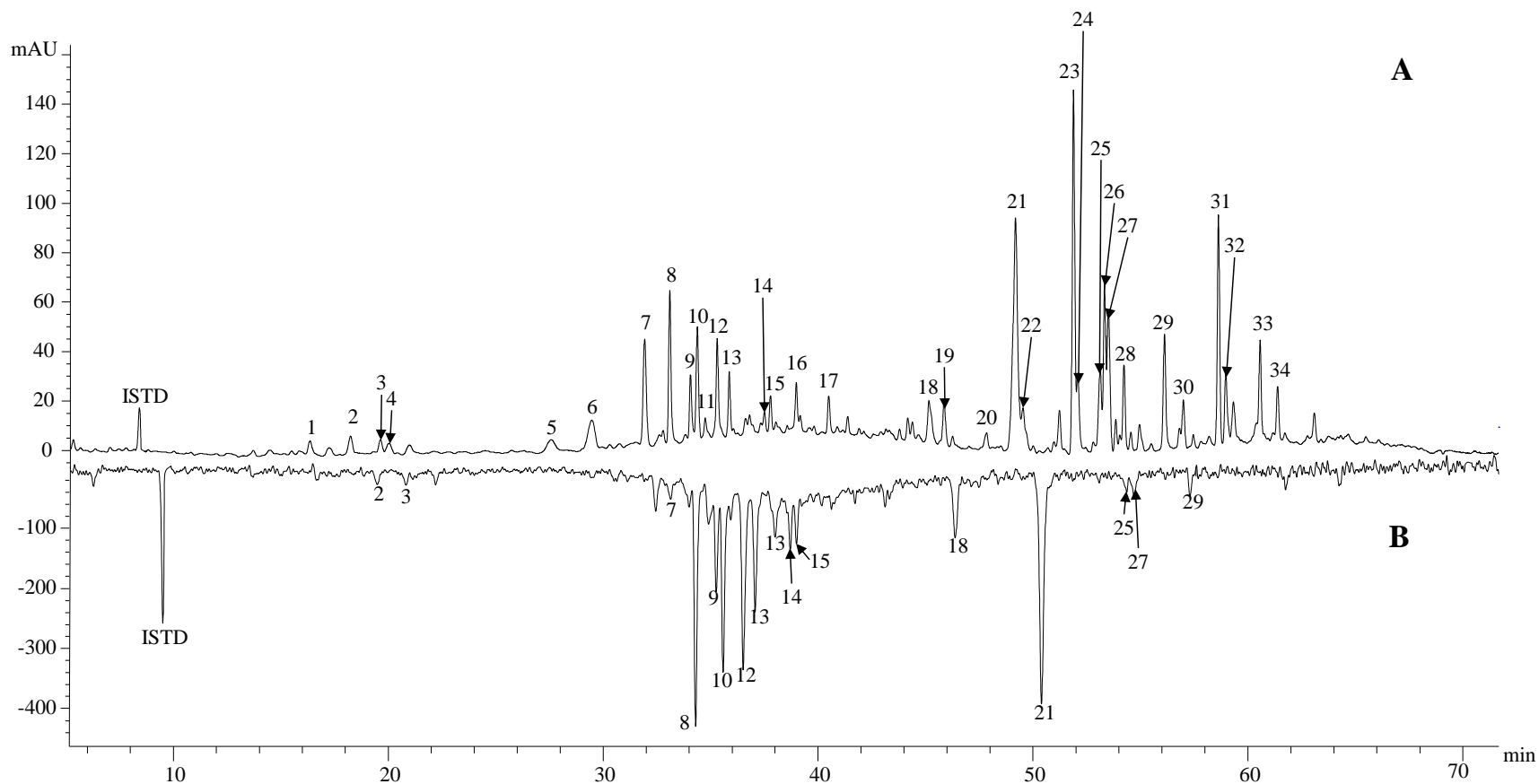
<sup>1</sup>Valor promedio ± desviación estándar, n=2. NI Compuesto no identificado. <sup>máx</sup> Máximo. <sup>h</sup> Hombro.

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

<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y por comparación con espectro UV- Vis reportado en artículos científicos (Grassi-Zampieron *et al.*, 2009; Mabry *et al.*, 1970)..

<sup>c</sup> Identificación confirmatoria basada en espectro UV- Vis y por comparación con espectro UV- Vis y tr de sustancia patrón.

**Apéndice O.** Perfil cromatográfico del extracto de *L. colombiana* obtenido por HPLC con derivatizador.



**Figura O1.** Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC con derivatizador, del extracto de *L. colombiana*, antes (DAD, **A.**  $\lambda=290$  nm) y después (MWD, **B.**  $\lambda=734$  nm) de su reacción con el catión-radical ABTS<sup>•+</sup>. La identificación de los picos aparece en la **Tabla N1**.

**Tabla O1.** Capacidad antioxidante de compuestos presentes en el extracto hidroalcohólicos de *L. colombiana*.

N° Fig. N1	tr, min		λ, nm	μmol of Trolox®/ g extracto	Porcentaje de la capacidad antioxidante, %	Criterio de identificación	Referencia
		λ=290 nm					
1	16,3	Derivado de ácido hidroxicinámico	253, 305 <sup>máx</sup>	-	-	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
2	18,2	Derivado de ácido hidroxicinámico	240 <sup>máx</sup> , 305 <sup>h</sup> , 330	0,62 ± 0,05	1	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
3	19,6	Ácido clorogénico	240, 290 h, 326 <sup>máx</sup>	0,77 ± 0,01	1	a,b,c	Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , (2009)
4	20,0	NI	255 <sup>máx</sup> , 298, 330	-	-	-	
5	27,5	Derivado de flavona	227 <sup>máx</sup> , 270, 335	-	-	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
6	29,4	Ácido <i>p</i> -cumárico	230, 290 <sup>h</sup> , 310 <sup>máx</sup>	-	-	a,c	Grassi-Zampieron <i>et al.</i> , (2009)
7	31,9	Derivado de flavona	228, 272, 335 <sup>máx</sup>	1,6 ± 0,4	2	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
8	33,0	Derivado de ácido hidroxicinámico	229, 250 <sup>h</sup> , 285 <sup>h</sup> , 330 <sup>máx</sup>	14,02 ± 0,01	15	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
9	34,0	Derivado de ácido hidroxicinámico	240, 290 <sup>h</sup> , 330 <sup>máx</sup>	6,0 ± 0,2	7	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
10	34,3	Derivado de ácido hidroxicinámico	230, 245 <sup>h</sup> , 285 <sup>h</sup> , 330 <sup>máx</sup>	11,8 ± 0,1	13	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
11	34,7	Derivado de ácido hidroxicinámico	250, 290 <sup>h</sup> , 330 <sup>máx</sup>	1,7 ± 0,1	2	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
12	35,2	Derivado de ácido hidroxicinámico	230, 250 <sup>h</sup> , 290 <sup>h</sup> , 330 <sup>máx</sup>	13,0 ± 0,3	14	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
13	35,8	Derivado de ácido hidroxicinámico	226, 250 <sup>h</sup> , 288 h, 330 <sup>máx</sup>	7,6 ± 0,4	8	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
14	37,4	Derivado de ácido hidroxicinámico	225 <sup>máx</sup> , 284, 325	2,60 ± 0,05	3	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
15	37,7	Derivado de flavona	225 <sup>máx</sup> , 254, 272, 345	2,2 ± 0,2	2	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
16	38,9	Derivado de flavona	226 <sup>máx</sup> , 275, 335	-	-	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
17	40,4	Derivado de flavona	224 <sup>máx</sup> , 275, 330	-	-	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
18	45,1	Nepetina	225 <sup>máx</sup> , 273, 350	5,00 ± 0,02	5	a,c	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
19	45,8	Derivado de flavona	225 <sup>máx</sup> , 275, 332	-	-	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
20	47,8	Derivado de ácido hidroxicinámico	225 <sup>máx</sup> , 290 <sup>h</sup> , 325	-	-	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
21	49,1	Derivado de flavonol	225 <sup>máx</sup> , 275, 345	19,32 ± 0,05	21	a	Mabry <i>et al.</i> , (1970)
22	49,5	NI	223 <sup>máx</sup> , 272, 345	0,85 ± 0,04	1	-	
23	51,8	NI	230 <sup>máx</sup> , 310	-	-	-	
24	52,0	NI	310	-	-	-	
25	53,1	NI	275, 345	1,0 ± 0,1	1	-	
26	53,3	NI	315	-	-	-	
27	53,4	NI	275, 345	2,0 ± 0,1	2	-	
28	54,2	NI	320	-	-	-	
29	56,1	NI	275, 330	1,4 ± 0,1	2	-	
30	56,9	NI	340	-	-	-	
31	58,6	NI	305	-	-	-	
32	58,9	NI	300	-	-	-	

**Tabla O1.** Continuación.

33	60,5	NI	300	-	-	-
34	61,3	NI	325	-	-	-
<b>Total HPLC-DAD-ABTS<sup>+</sup></b>			90 ± 0,9			

<sup>1</sup>Valor promedio ± desviación estándar, n=2. NI Compuesto no identificado. <sup>máx</sup> Máximo. <sup>h</sup> Hombro.

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

<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y por comparación con espectro UV- Vis reportado en artículos científicos.

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