

Estudio y caracterización de los metabolitos secundarios de aceites esenciales y extractos de

Tagetes caracasana

Michael Steven Santos Delgado

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director

Elena E. Stashenko

Química, Ph.D.

Codirector

Rogelio Alejandro Saavedra Barrera

Químico, M.Sc.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

A mi amada madre, Irene, por su incansable apoyo, su amor incondicional y su confianza en mí a lo largo de todos estos años. Gracias por creer en mí incluso cuando yo mismo dudaba de mis capacidades.

A mi amado padre, Jorge, aunque ya no esté presente en este mundo, sé que estaría orgulloso de la persona en la que me he convertido gracias a su amor y su ejemplo de vida.

A mis abuelas, Ana y Teresa, quienes me brindaron su amor y sabiduría, ayudándome a crecer y convirtiéndome en la persona que soy hoy. Siempre estaré agradecido por su presencia en mi vida.

Agradecimientos

A la Dra. Elena Stashenko por sus conocimientos impartidos a lo largo del desarrollo de este trabajo, por sus palabras de aliento y por incentivar me a seguir adelante a pesar de las dificultades encontradas. Muchas gracias por el apoyo intelectual y moral que me has brindado.

Al Dr. Jairo René Martínez por todo el apoyo brindado durante la ejecución de esta investigación, el cual fue fundamental para alcanzar los resultados obtenidos.

Al laboratorio CROM-MASS por el préstamo de las instalaciones y servicios necesarios para la ejecución de este trabajo.

A mi estimado codirector, Rogerio, quien ha sido un gran amigo y me ha brindado su paciencia, apoyo intelectual y moral durante esta etapa de mi vida. Gracias por estar cuando lo necesité.

A Diana, quien nunca dejó de creer en mí y me apoyó incondicionalmente. Gracias por tu amor y apoyo en todo momento.

A todos mis compañeros de trabajo en el laboratorio, quienes son personas excelentes y me brindaron consejos y capacitaciones muy valiosas durante estos años.

Agradecimientos a Minciencias, Mineducación, Mincomercio e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50. Por la financiación para la ejecución de este trabajo.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	15
1.Marco teórico	16
1.1 El género <i>Tagetes</i>	16
1.1.1 <i>Tagetes caracasana</i>	17
1.2 Aceites esenciales	18
1.2.1 Metabolitos secundarios.....	19
1.3 Métodos para la obtención de metabolitos secundarios.....	19
1.3.1 Hidrodestilación asistida por la radiación microondas	19
1.3.2 Extracción sólido-líquido.....	20
1.4 Análisis cromatográfico	20
1.4.1 Cromatografía de gases.....	20
1.4.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	21
1.5 Actividad antioxidante	23
1.5.1 Estrés oxidativo.....	23
1.5.2 Antioxidantes	24
1.5.2.1 Ensayo de capacidad de absorción del oxígeno radical.....	25
1.5.2.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	26
2. Estado del arte.....	27
3. Objetivos.....	31
3.1 Objetivo General.....	31

3.2 Objetivos Específicos.....	31
4. Metodología	32
4.1 Recolección del material vegetal	33
4.2 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas	34
4.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	34
4.4 Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama.....	36
4.5 Extracción con solvente asistida por ultrasonido.....	37
4.6 Cromatografía líquida de alta eficiencia con un detector de arreglo de diodos.....	38
4.7 Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución <i>Q-Exactive</i>	39
4.8 Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos obtenidos de <i>T. caracasana</i>	41
4.8.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	41
4.8.2 Ensayo de capacidad de absorción del oxígeno radical	42
5. Resultados y discusión	43
5.1 Secado de material vegetal.....	43
5.2 Obtención de aceites esenciales	45
5.3 Caracterización del aceite esencial de <i>T. caracasana</i>	47
5.4 Obtención de extractos hidroalcohólicos de <i>T. caracasana</i>	50
5.5 Caracterización química HPLC/DAD de los extractos de <i>T. caracasana</i>	51
5.6 Caracterización química UHPLC/ESI-Orbitrap/MS de los extractos de <i>T. caracasana</i>	55
5.7 Actividad antioxidante	62
6. Conclusiones	64

Bibliografía	65
Apéndices.....	71

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Identificación taxonómica de <i>Tagetes caracasana</i>	18
Tabla 2. Especies reactivas del oxígeno, radicales y no radicales.	23
Tabla 3. Resultados de la búsqueda de publicaciones sobre <i>T. caracasana</i>	27
Tabla 4. Estudios sobre <i>T. caracasana</i>	28
Tabla 5. Resultados de la pérdida de humedad de <i>T. caracasana</i>	44
Tabla 6. Rendimientos de destilación de AE esencial de <i>T. caracasana</i>	47
Tabla 7. Áreas relativas de los compuestos mayoritarios identificados en los AE destilados de <i>T. caracasana</i>	49
Tabla 8. Rendimientos de extracción de <i>T. caracasana</i>	50
Tabla 9. Composición química HPLC/DAD, de los extractos de <i>T. caracasana</i> obtenidos de material vegetal fresco, seco y destilado-seco, cosechado en Bucaramanga y Barbosa, Santander.	53
Tabla 10. Identificación de compuestos fenólicos, por UHPLC/ESI-Orbitrap/MS, presentes en los extractos hidroetanólicos de <i>T. caracasana</i> , obtenidos de material vegetal, fresco, seco y destilado-seco, cosechado en Bucaramanga y Barbosa, Santander.	57
Tabla 11. Cantidad de compuestos fenólicos detectados en los extractos hidroetanólicos de <i>T. caracasana</i> obtenidos de material vegetal fresco, seco y destilado-seco cosechado en Bucaramanga y Barbosa, Santander.	60
Tabla 12. Actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos y AE obtenidos de material vegetal de <i>T. caracasana</i>	63

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Tagetes erecta</i> (a), <i>T. minuta</i> (b) y <i>T. patula</i> (c).	17
Figura 2. <i>Tagetes caracasana</i>	17
Figura 3. Ecuaciones de la reacción radicalaria y gráfica de la capacidad antioxidante ORAC de una muestra medida con el área bajo la curva.	26
Figura 4. Estructura química del catión-radical ABTS ⁺	27
Figura 5. Procedimiento general desarrollado	33
Figura 6. Cromatógrafo de gases AT 6890 Plus, equipado con un detector selectivo de masas MS 5973 Network.....	35
Figura 7. Cromatógrafo de gases AT 6890N, acoplado a un detector de ionización en llama FID	37
Figura 8. Cromatógrafo líquido AT 1260, equipado con una bomba cuaternaria, y detectores UV-VIS y detectores de arreglo de diodos, DAD.....	39
Figura 9. Cromatógrafo líquido de ultra-alta resolución <i>VanquishTM</i> acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución <i>Q-Exactive</i>	40
Figura 10. Curva de secado del material fresco de <i>Tagetes caracasana</i> recolectado en Bucaramanga y Barbosa (Santander, Colombia).	43
Figura 11. Porcentajes de rendimiento de destilación del AE esencial de <i>T. caracasana</i> . Las barras de error representan la desviación estándar para n = 3.	46
Figura 12. Perfil cromatográfico (DB5-MS, EI 70 eV) del AE destilado de partes aéreas frescas de <i>T. caracasana</i> obtenidas de plantas cultivadas en Bucaramanga.	48

- Figura 13. Porcentajes de rendimiento de extracción de *T. caracasana*. Las barras de error representan la desviación estándar para $n = 3$ 51
- Figura 14. Perfil cromatográfico, por HPLC/DAD ($\lambda=290$ nm, columna *Gemini C₁₈*), de los extractos hidroetanólicos de *T. caracasana*..... 52
- Figura 15. Corrientes iónicas extraídas (EIC), obtenidas por UHPLC/ESI-*Orbitrap*/MS, en modo SIM, de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ de compuestos fenólicos presentes en los extractos hidroalcohólico obtenido de material vegetal fresco de *T. caracasana* cultivado en Bucaramanga..... 56

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Curvas de secado del material vegetal destilado.....	71
Apéndice B. Espectro de masas, obtenido por UHPLC-ESI- <i>Orbitrap</i> -MS (HCD: 10 eV), del cafeoil- <i>O</i> -pentosa (<i>m/z</i> 311,07727) presente en los extractos de <i>T. caracasana</i>	72
Apéndice C. Espectro de masas, obtenido por UHPLC-ESI- <i>Orbitrap</i> -MS (HCD: 10 eV), del ácido <i>O</i> -acetil-cutárico (<i>m/z</i> 337,05673) presente en los extractos de <i>T. caracasana</i>	72
Apéndice D. Espectro de masas, obtenido por UHPLC-ESI- <i>Orbitrap</i> -MS (HCD: 10 eV), del isómero acetilado del ácido fertárico (<i>m/z</i> 367,06708) presente en los extractos de <i>T. caracasana</i>	73

Abreviaturas

ABTS: 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico)

AE: aceite(s) esencial(es).

AF: ácido fórmico.

AT: *Agilent Technologies*.

CENIVAM: Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.

d.i: diámetro interno de la columna cromatográfica.

df: grosor de la fase estacionaria.

ESI: *electrospray ionization* (ionización por electronebulización).

eV: electrón-voltio.

EI: *electronic ionization* (ionización electrónica o impacto de electrones).

FA: formiato de amonio.

GC/FID: *gas chromatography coupled to flame ionization detector* (cromatografía de gases con detector de ionización en llama).

GC/MS: *gas chromatography coupled to mass spectrometry* (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).

HCD: *High collision dissociation cell*, (celda de disociación de alta energía)

HPLC/DAD: *high performance liquid chromatography coupled to diode-array detector* (cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos).

LOD: *limit of detection* (límite de detección).

LOQ: *limit of quantification* (límite de cuantificación).

MSD: *mass selective detector* (detector selectivo de masas).

MWHD: *microwave-assisted hydrodistillation* (hidrodestilación asistida por radiación de microondas).

m/z relación masa-carga.

SE: *solvent extraction* (extracción con solvente).

TIC: *total ion current* (corriente iónica total).

tr: tiempo de retención (min).

UHPLC: *ultra-high performance liquid chromatography* (cromatografía líquida de ultraalta eficiencia)

Resumen

Título: Estudio y caracterización de los metabolitos secundarios de aceites esenciales y extractos de *Tagetes caracasana**

Autor: Michael Steven SANTOS DELGADO**

Palabras Clave: *Tagetes caracasana*, aceite esencial, extractos, GC/MS, LC/MS, actividad antioxidante.

Descripción: *Tagetes caracasana* es una especie de planta herbácea anual perteneciente a la familia *Asteraceae*, originaria de América Central y del Sur. El creciente interés de la comunidad científica en este tipo de plantas se debe a los diversos reportes en la literatura especializada, en donde se constata la actividad antioxidante, antiviral e insecticida del género *Tagetes*. Con miras a la posible utilidad integral del material vegetal de esta especie, en el presente trabajo se emplearon diferentes métodos de extracción como la hidrodestilación asistida por radiación microondas (*MWHD*), para la obtención del aceite esencial, y extracción con solvente (SE) para la obtención de los extractos a partir del material vegetal antes y después de su destilación. La identificación de los compuestos, según la naturaleza del analito, se realizó por medio técnicas como GC/MS y UHPLC-ESI-*Q-Orbitrap*, y se basó en criterios cromatográficos (tiempos de retención, índices de retención y compuestos estándar) y de espectros de masas (patrones de fragmentación, masas exactas, relación isotópica y comparación con bases de datos). Adicionalmente, se efectuó la comparación de los compuestos mayoritarios presentes en los AE y extractos de plantas de la misma especie cultivadas en diferentes zonas del departamento de Santander (Bucaramanga y Barbosa). Finalmente, se evaluó la actividad antioxidante de los aceites esenciales y los extractos utilizando las técnicas de ABTS⁺⁺ y ORAC.

* Proyecto de grado

**Facultad de Ciencias Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko, Química, *Ph.D.*
Codirector: Rogerio Alejandro Sebastián Saavedra Barrera, Químico, *M.Sc.*

Abstract

Title: Study and characterization of secondary metabolites of essential oils and extracts of *Tagetes caracasana**

Author: Michael Steven SANTOS DELGADO**

Key words: *Tagetes caracasana*, essential oil, extracts, GC/MS, LC/MS, antioxidant activity.

Description: *Tagetes caracasana* is recognized as an annual species of herbaceous plant belonging to the Asteraceae family, native to Central and South America. The incoming interest of the scientific community in this type of plant is due to the various reports in the scientific literature, where the antioxidant, antiviral and insecticidal activity of the genus *Tagetes* is confirmed. In order to study the possible integral utility of the plant material of this species, in the present work different extraction methods were used, such as microwave radiation-assisted hydrodistillation (MWHD), to obtain the essential oil, and solvent extraction (SE) for obtaining extracts from plant material before and after distillation. The identification of the compounds, according to the nature of the analyte, was carried out using techniques such as GC/MS and UHPLC-ESI-Q-Orbitrap, and was based on chromatographic criteria (retention times, retention indices and standard compounds) and mass spectra (fragmentation patterns, exact masses, isotopic ratio and comparison with databases). Additionally, the comparison of the main compounds in the EO and extracts of plants of the same species cultivated in different areas of the department of Santander (Bucaramanga and Barbosa) was made.

Finally, the antioxidant activity of essential oils and extracts was evaluated using the ABTS+• and ORAC techniques.

* Degree Work

** Faculty of Sciences. Chemical School. Director: Elena E. Stashenko, Chemist, Ph.D. Codirector: Rogério Alejandro Sebastián Saavedra Barrera, Chemist, M.Sc.

Introducción

La familia Asteraceae cuenta con múltiples especies que poseen propiedades medicinales y aromáticas. Dentro de ella, se encuentra el género *Tagetes*, ampliamente utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades diuréticas, antiespasmódicas, antiinflamatorias, antihemorrágicas, diaforéticas, antihelmínticas y carminativas (Karwani *et al.*, 2015). Además, se ha reportado actividad antioxidante, antiviral e insecticida en algunas especies de este género (Torres *et al.*, 2021).

Entre los componentes de interés en las especies del género *Tagetes*, se encuentran los aceites esenciales (AE), que han demostrado tener propiedades terapéuticas y cosméticas, siendo objeto de estudio en diversas investigaciones científicas (Armas *et al.*, 2012). En particular, el AE de la especie *Tagetes caracasana* ha sido reportado por Zapata *et al.*, (2010) como un potencial inhibidor del crecimiento del hongo *Candida krusei*.

Sin embargo, en la literatura científica no se ha publicado ningún estudio en el cual se compare la composición química de los AE y extractos de la especie *T. caracasana* cultivada en diferentes regiones, y su posible influencia en su actividad antioxidante. Cabe destacar que la ubicación geográfica puede incidir en los metabolitos secundarios que producen las plantas (Gil *et al.*, 2002), estudios preliminares mostraron variaciones en el contenido de compuestos azufrados en las raíces de la especie *Tagetes*, las cuales dependían de la zona de cultivo (Jacobs *et al.*, 1994), se coincide con lo observado en el presente trabajo para los AE y extractos obtenidos de la especie *T. caracasana* recolectada en diferentes zonas de Santander, Colombia, para los cuales se observaron diferencias en la composición química y la actividad antioxidante, relacionadas con la zona de cultivo y el estado del material vegetal.

El presente estudio tuvo como objetivo principal identificar las variaciones en la composición química de los aceites esenciales y extractos de la especie *T. caracasana*, cultivada en dos regiones de Santander, Colombia, y determinar su posible influencia en la actividad antioxidante. Los resultados de este trabajo contribuyen a mejorar la bioprospección de la especie y aportar nuevos conocimientos científicos en el área de los productos naturales.

1. Marco teórico

1.1 El género *Tagetes*

Tagetes es un género de plantas anuales, principalmente herbáceas, que pertenecen a la familia de los girasoles (Asteraceae o Compositae). Fue descrito como género por C. Linnaeus (1753). Este género es conocido por sus especies hortícolas y productoras de aceites esenciales, que se cultivan o se encuentran de forma natural en muchas partes del mundo (Neher, 1968).

El género *Tagetes* es nativo del área que se extiende desde el suroeste de los Estados Unidos (EE. UU.) hasta Argentina, con una variación máxima en México (Singh *et al.*, 2016). Se han descrito alrededor de 60 especies de plantas del género *Tagetes*. Las especies más comunes incluyen *Tagetes erecta* (clavel de muerto), *T. patula* y *T. minuta* (Neher, 1968). (véase **Figura 1**)

Figura 1

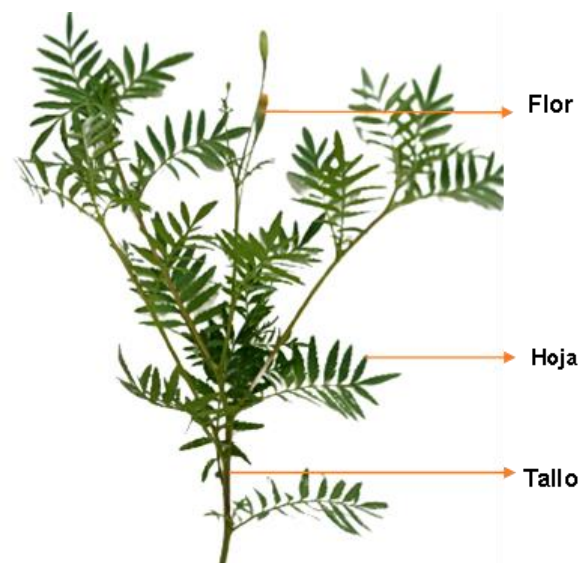
Tagetes erecta (a), *T. minuta* (b) y *T. patula* (c).

**1.1.1 Tagetes caracasana**

Tagetes caracasana, también conocida como "clavelina" o "clavelón", es una planta herbácea anual perteneciente a la familia Asteraceae (véase **Figura 2**). Es originaria de América del Sur, pero se ha extendido alrededor del mundo debido a su uso como planta ornamental y medicinal (Neher, 1968).

Figura 2

Tagetes caracasana.



Nota: Fotografía tomada por Michael Santos en los cultivos experimentales de CENIVAM, Bucaramanga, octubre 2022.

La clavelina se cultiva fácilmente a partir de semillas y crece bien en suelos bien drenados y a pleno sol. Es una planta resistente que puede soportar condiciones de sequía y suelos pobres, lo que la hace popular en jardines secos (González-Salado *et al.*, 2010).

La especie *T. caracasana* ha sido poco estudiada, en comparación con otras especies del mismo género. La identificación taxonómica de *Tagetes caracasana*, se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Identificación taxonómica de Tagetes caracasana.

Familia	Asteraceae
Género	<i>Tagetes</i>
Especie	<i>T. caracasana</i>
Nombre común	Clavelina
Sinonimia	<i>T. verticillata</i>
Lugar de origen	América
Distribución geográfica	Colombia, Ecuador, Venezuela

1.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son una mezcla compleja de metabolitos secundarios que se sintetizan en las plantas para adaptarse a su entorno. (Dudareva *et al.*, 2013). Estos compuestos presentan propiedades biológicas que se aprovechan en la fabricación de fitomedicamentos, insecticidas, herbicidas y otras aplicaciones (García & Carril, 2011).

Los AE se caracterizan por su alta volatilidad y su color incoloro o ligeramente coloreado. Además, tienen un alto índice de refracción y son solubles en alcohol, pero poco solubles en agua (Stashenko & Martínez, 2009a).

1.2.1 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos de bajo y mediano peso molecular producidos por las plantas, tienen funciones no esenciales para el organismo, a diferencia de los metabolitos primarios (Croteau *et al.*, 2000). Algunos metabolitos secundarios se producen bajo escenarios específicos y representan la respuesta de los organismos a diferentes condiciones ambientales; estas moléculas pueden presentar toxicidad ante predadores, actuar como volátiles atractivos o repelentes para otras especies o conferir al organismo que los produce resistencia ante factores de estrés, entre otros. Estas moléculas se bio-sintetizan a través de diferentes rutas metabólicas dentro de las que se destacan las rutas del ácido shikímico y del ácido mevalónico (Dewick, 2009).

1.3 Métodos para la obtención de metabolitos secundarios

1.3.1 Hidrodestilación asistida por la radiación microondas

La hidrodestilación asistida por radiación de microondas (*MWHD*, por sus siglas en inglés) está relacionada con la hidrodestilación, en la que se obtienen los aceites esenciales, destilados de diferentes partes de material vegetal fresco o seco. Al calentarse el material vegetal sumergido en agua, los compuestos de menor peso molecular se volatilizan y se evaporan conjuntamente con el agua, arrastrando los componentes del aceite esencial que luego se condensan y se separan por diferencias de polaridad y densidad (Stashenko *et al.*, 2004). En la *MWHD* se utilizan las microondas como fuente de calor; esta variación de la hidrodestilación permite reducir tiempos de

operación, aumentar los rendimientos de destilación y en algunos casos mejorar la calidad de los aceites esenciales obtenidos (Golmakani & Rezaei, 2008).

1.3.2 Extracción sólido-líquido

En esta técnica de extracción se utiliza un líquido para extraer analitos de una matriz vegetal. Normalmente, este líquido consiste en un solvente o una mezcla de solventes que tienen la capacidad de solvatar las moléculas de interés. La selección del solvente se realiza en función de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas de interés, ya que la fase líquida debe extraer los analitos con facilidad (Pan *et al.*, 2008). Además, el solvente seleccionado no debe afectar la composición química de los analitos de interés.

Algunas de las principales desventajas de esta técnica son el alto consumo de solventes, su toxicidad, los tiempos de extracción prolongados y la formación de emulsiones. La eficiencia de extracción dependerá principalmente de la solubilidad, la transferencia de masa y el efecto de la matriz (Mora & Stashenko, 1997).

1.4 Análisis cromatográfico

1.4.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es una técnica utilizada para separar mezclas. Se basa en el reparto de los analitos de la mezcla entre dos fases: una móvil, que es gaseosa (N_2 , H_2 , He) y otra estacionaria, que puede ser sólida o líquida. La separación de los compuestos se produce con el paso de la fase móvil, que arrastra consigo los analitos por una columna recubierta de polímeros de diferente polaridad, como PDMS (poli(dimetilsiloxano)) o PEG (poli(etilenglicol)), hasta su elución. El tiempo de retención dependerá de las características químicas de los analitos y de su afinidad con la fase estacionaria (Stashenko & Martínez, 2010).

La cromatografía de gases se puede acoplar con detectores de espectrometría de masas (MS), uno de los más utilizados en el análisis químico debido a la información que proporciona sobre la masa molecular, composición elemental y grupos funcionales de los compuestos presentes en la muestra. La MS se basa en la generación de iones moleculares cargados, generalmente positivamente, y sus fragmentos a partir de las moléculas que eluyen de la columna cromatográfica. La separación de los iones se produce según su relación m/z en un analizador, y luego un detector de masas genera una señal eléctrica que se procesa en función del tiempo como cromatograma (corriente iónica reconstruida). (Stashenko & Martínez, 2009b)

Para la separación y cuantificación de los analitos presentes en la mezcla, se emplea la cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (FID). Este método se basa en la detección de los productos ionizados en una llama de hidrógeno (H_2) y aire. Las sustancias eluyen de la columna y se queman en la llama, generando iones que se dirigen hacia un electrodo colector. Estos iones generan una corriente que se amplifica y produce una señal cromatográfica. La magnitud de esta señal es proporcional a la cantidad de analito presente, lo que permite determinar la concentración de cada componente que eluye de la mezcla (Ahuja, 2003).

1.4.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Usando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*) es posible separar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en una matriz que contiene metabolitos poco volátiles, poco termoestables o de alto peso molecular con diversos grupos funcionales (Ahuja, S., 2003). En HPLC, la fase móvil, de polaridad variable, está constituida por un solvente o una mezcla de solventes, que fluye a través de una columna empaquetada con gel de sílice u otro polímero que corresponde a la fase estacionaria. En

el caso de los compuestos fenólicos, se utilizan fases no polares para separar los compuestos con grupos hidrofóbicos (Waksmundzka-Hajnos, & Sherma., 2010).

Al igual que en cromatografía de gases, los analitos se separan en la columna, y son eluidos hacia un sistema de detección, que puede ser un detector ultravioleta visible (UV-Vis), detector con arreglo de diodos (DAD) o espectrómetro de masas (MS), entre otros. El anillo aromático y grupos cromóforos presentes en los compuestos fenólicos les otorgan la capacidad de absorber luz ultravioleta, por lo cual los detectores UV-Vis y DAD son adecuados para su análisis. (Merkenv & Beecher, 2000).

La cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC, por sus siglas en inglés, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) utiliza columnas más delgadas con un empaque de menor tamaño de partícula (inferior a 2 μ m), y permite un mayor incremento en la presión de trabajo. En UHPLC, se utilizan fases estacionarias equivalentes a las de HPLC. (Bhagya, & Chandrashekar., 2020).

El analizador de masas *Orbitrap* es otro de los sistemas de detección en espectrometría de masas acoplados a UHPLC. Está compuesto por dos electrodos concéntricos dispuestos en forma axial, en los cuales los iones son acelerados y discriminados por su relación m/z . Los iones con distinta relación m/z evidencian una amplitud y frecuencia de oscilación diferente sobre el eje de los electrodos, lo que genera señales a las cuales se les aplica la transformada de Fourier para obtener la relación m/z de cada grupo de iones presente en la muestra. De esta manera, es posible reconstruir un espectro de masas completo (Makarov, 2000).

1.5 Actividad antioxidante

1.5.1 Estrés oxidativo

La presencia del oxígeno en la naturaleza está relacionada con la fotosíntesis y con su reducción durante los procesos de biosíntesis del adenosín trifosfato (ATP) en las células aeróbicas. La disminución del oxígeno en estos procesos puede ser descontrolada y acelerar la formación de radicales libres. Ante esta situación, como defensa, actúan los sistemas antioxidantes del organismo. Sin embargo, cuando hay un desequilibrio en la formación de los radicales libres, se genera el estrés oxidativo, que está asociado a enfermedades cardiovasculares y envejecimiento prematuro de las células. Estos oxidantes y prooxidantes se refieren a especies reactivas de oxígeno, que se clasifican, según aparecen en la **Tabla 2**, en especies radicales y no radicales (Kohen & Nyska, 2002).

Tabla 2

Especies reactivas del oxígeno, radicales y no radicales.

Especies	Nombre	Símbolo
	Oxígeno triplete	$^3\text{O}_2$
	Ion superóxido	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Radicales	Hidroxilo	OH^{\cdot}
	Peroxilo	ROO^{\cdot}
	Alcóxido	RO^{\cdot}
	Óxido nítrico	NO^{\cdot}
No radicales	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
	Ácido hipocloroso	HOCl

Ozono	O ₃
Oxígeno singulete	¹ O ₂

Nota. Tomado de Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos y aceites esenciales de seis especies de *Lippia* spp. (Familia Verbenácea), por diferentes métodos (ABTS⁺, ORAC y monitoreo de peroxidación lipídica). (Córdoba *et al.*, 2014).

1.5.2 Antioxidantes

Son sustancias presentes en bajas concentraciones, en comparación con un sustrato oxidable, que inhiben o previenen procesos de oxidación. Estas sustancias son efectivas *in vivo*, si cumplen con los siguientes requerimientos: deben reaccionar efectivamente con los radicales libres, el producto de reacción entre el antioxidante y los radicales libres (RL) no debe ser más tóxico para el organismo, deben estar presentes en el organismo en una concentración suficiente para neutralizar el efecto del radical libre y el tiempo de vida media del antioxidante debe ser suficiente para que ocurra la reacción con el oxidante (Córdoba *et al.*, 2014).

Entre los antioxidantes más comunes figuran los compuestos fenólicos y flavonoides. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que poseen uno o más grupos hidroxilo unidos a uno o varios anillos aromáticos. Las plantas que los contienen han despertado el interés de los científicos, ya que estos compuestos fenólicos pueden retardar la oxidación celular (Wojdylo *et al.*, 2007).

Los flavonoides son polifenoles que poseen anillos aromáticos bencénicos, enlazados por un heterociclo oxigenado. Son sustancias sólidas de color blanco o amarillento, su clasificación se da por las variaciones estructurales, los flavonoides más destacados por su uso farmacológico son las flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas y catequinas (Vermerris & Nicholson, 2008).

Basados en la capacidad de capturar los radicales libres o en la capacidad reductora, se han desarrollado diferentes metodologías para evaluar la capacidad antioxidante, de manera *in vitro*, que se clasifican en métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno, tales como el ensayo de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) en el que el antioxidante y el sustrato compiten por radicales peroxilo; y, por otro lado, en métodos basados en la transferencia de electrones, tal como el ensayo de decoloración de catión-radical ABTS⁺, en el que se mide la capacidad de una sustancia de atrapar el catión-radical ABTS⁺, que cambia de azul a transparente al reducirse (Huang *et al.*, 2005).

1.5.2.1 Ensayo de capacidad de absorción del oxígeno radical. En el ensayo de capacidad de absorción del oxígeno radical (ORAC, por sus siglas en inglés *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), es necesario el uso de un compuesto fluorescente, a pH mayor que 7.0, como la fluoresceína, que permite monitorear la disminución de la fluorescencia con el tiempo, a medida que ocurre la reacción con los radicales peroxilo (ROO•) en presencia de una molécula antioxidante (Huang *et al.*, 2002; Bisby *et al.*, 2008).

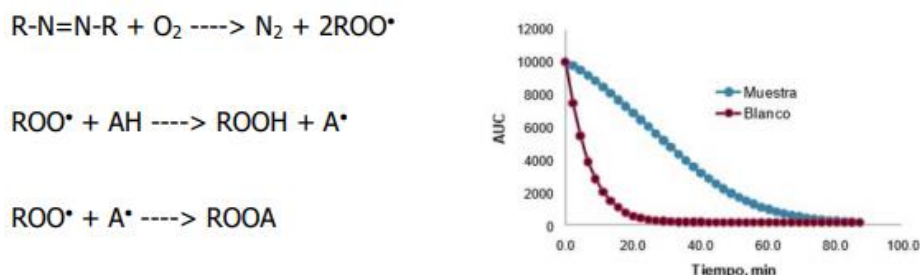
Una fuente controlable de radicales peroxilo, se proporciona en el ensayo durante la reacción con los antioxidantes. El ensayo se realiza en un lector de microplacas de 96 pozos, en medio acuoso y restringiendo la actividad de los antioxidantes lipofílicos. Sin embargo, la metodología se puede adaptar para la detección de ambas clases de antioxidantes, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos (Córdoba, 2014). Para disminuir la variabilidad en las mediciones, el medio de reacción debe ser incubado a 37 °C, con adición previa del AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropano) hidrocloreuro), el cual es la fuente de radicales.

Para que ocurra la reacción, se emplea un iniciador que genere el radical peroxilo (ROO•), que, en presencia de un compuesto antioxidante (AH), se enlaza a un átomo de hidrógeno para

formar un hidroperóxido (ROOH) y el radical estable del antioxidante (A^{*}), según las ecuaciones que aparecen en la **Figura 3**. La capacidad antioxidante se mide a partir del área entre la curva de la muestra y el blanco de reacción. La diferencia entre estos valores se extrapola a la curva de calibración del Trolox[®] (Erkan *et al.*, 2008).

Figura 3

Ecuaciones de la reacción radicalaria y gráfica de la capacidad antioxidante ORAC de una muestra medida con el área bajo la curva.



Nota: Ecuaciones y gráfica obtenidas mediante el ensayo ORAC del Laboratorio JJ. Thompson.

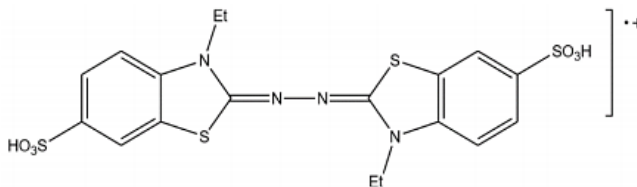
1.5.2.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺. El método de decoloración del catión-radical ABTS⁺, se basa en la inhibición por los compuestos antioxidantes, del catión-radical ABTS⁺ [2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico)] (Figura 4), el cual es de coloración verde-azulada, con máximos de absorción en $\lambda = 415, 645, 734$ y 815 nm (Prior. *et al.*, 2005)

Este método evalúa la capacidad antioxidante mediante la inhibición oxidativa y mide la disminución del catión-radical ABTS⁺ cuando se añade previamente el compuesto antioxidante. Esto se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. Por otro lado, cuando se añade el antioxidante después de la formación del catión-radical ABTS⁺, se produce una

decoloración debido a la reducción del radical, lo que se refleja en la pérdida de la coloración o de la absorbancia. (Miller *et al.*, 1993).

Figura 4

Estructura química del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$



2. Estado del arte

Con el objetivo de analizar el estado actual de las investigaciones sobre *T. caracasana*, los métodos de extracción y el análisis de sus metabolitos secundarios, se realizó un estudio cuantitativo de la producción científica existente en la base de datos *Scopus* (*Elsevier*). Usando la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY ("*Tagetes caracasana*") en el periodo de observación: 1960-2022, fecha de consulta: abril de 2023. Los resultados se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3

Resultados de la búsqueda de publicaciones sobre *T. caracasana*.

Parámetros	<i>Tagetes caracasana</i>
Países	Colombia (2)
	Venezuela (1)
Áreas de publicación	Agricultura (3)
	Bioquímica, genética y biología molecular (1)
	Farmacología (2)
	Ingeniería química (1)
	Inmunología y microbiología (1)
	Medicina (1)
Revistas científicas	Vitae (1)

	Agronomía Colombiana (1)
	<i>Natural Product Communications</i> (1)
Número total de publicaciones	3

Nota. Tomado de la base de datos de Scopus (Elsevier).

El estudio de *T. caracasana* ha sido poco explorado en la literatura científica, lo que representa una oportunidad para la investigación de esta especie en particular. Aunque se sabe que existen ciertas similitudes entre las distintas especies de *Tagetes*, es importante tener en cuenta que cada una tiene características únicas y que el análisis de datos generales podría no ser suficiente para comprender plenamente las particularidades de *T. caracasana*. Es necesario realizar más investigaciones sobre esta especie para poder obtener una comprensión más completa de sus propiedades y características únicas.

Con el fin de ofrecer un panorama general de la investigación realizada hasta el momento sobre *T. caracasana*, en la **Tabla 4** se detallan algunos de los trabajos reportados para esta especie.

Tabla 4

Estudios sobre T. caracasana.

Objetivo del estudio	Metodología	Resultados	Referencia
Evaluar la tendencia a la toxicidad de AE destilados de plantas recolectadas en Colombia usando un ensayo basado cultivos celulares.	Métodos de destilación Hidrodestilación asistida por radiación de microondas o mediante extracción por arrastre con vapor.	Compuestos como <i>cis-</i> y <i>trans</i> -tagenona, <i>cis-</i> y <i>trans</i> -ocimenona, óxido de cadineno, carvacrol y germacreno observados mayoritariamente en los AE de <i>T. caracasana</i> , <i>Ageratina</i> aff. <i>popayanensis</i> , <i>Lantana colombiana</i> y <i>Hyptis brachiata</i> fueron los más citotóxicos.	(Velandia <i>et al.</i> , 2016)

Determinar el comportamiento de la germinación de <i>Tagetes caracasana</i>	Recolección, selección y pruebas de germinación (potrusión radicular) de las semillas en caja Petri dentro de una cámara de germinación y en bandejas de germinación con turba TRM7 dispuestas en invernadero. En ambos casos se mantuvieron las variables constantes de temperatura (25°C), humedad (90%) y oscuridad total durante el tiempo de prueba.	El porcentaje de germinación promedio en el laboratorio fue de 69% para un período de tres semanas después del cual no se observó más germinación. El índice de velocidad de germinación (GSI) fue de 4.14 para las condiciones de laboratorio, que es relativamente alta en comparación con la observada en el invernadero (IGS = 1,45). De manera similar, en condiciones de invernadero, el porcentaje de germinación fue ligeramente inferior (61%).	(Herrera-Moreno <i>et al.</i> , 2013)
---	---	--	---------------------------------------

Objetivo del estudio	Metodología	Resultados	Referencia
Investigar y comparar la composición química de los AE obtenidos a partir cinco especies de <i>Tagetes</i> recolectadas en Venezuela	<p>Pre-tratamiento Las hojas frescas de las especies fueron cortadas en trozos pequeños previo a la extracción.</p> <p>Métodos de destilación. Hidrodestilación durante 4 h, utilizando un aparato tipo <i>Clevenger</i>. Los AE se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se almacenaron a 4 °C para efectuar un análisis más extenso.</p> <p>Técnicas de caracterización GC y GC/MS.</p>	<p><i>T. caracasana</i> (TC) mostró <i>trans</i>-ocimenona (64,3%) y <i>cis</i>-tagetona (13,7%) como componentes principales. Para <i>T. erecta</i> (TE) se observaron piperitona (35,9%) y terpinoleno (22,2%) en proporciones importantes, mientras que <i>T. filifolia</i> (TF) está compuesta, principalmente, por <i>trans</i>-anetol (87,5%) y estragol (10,7%). <i>T. patula</i> (hojas, TPL, e inflorescencias, TPI) y <i>T. subulata</i> (TS) mostraron terpinoleno (20,9 % TPL; 15,6 % TPI; 26,0 % TS) y piperitona</p>	(Armas <i>et al.</i> , 2012)

(14,0% TPL; 13,1% TS)
entre los componentes
mayoritarios, junto con
 β -cariofileno (23,7% TPI),
cis- β -ocimeno (15,5% TPI)
y limoneno (10,8% TS).
Compuestos como la
dihidrotagetona (7,4 %)
y 1,8-menthadien-4-ol (1,4
%) solo se observaron en
TC y TS, respectivamente.

Nota. Tomado de la base de datos de Scopus (Elsevier).

En la literatura científica consultada, no se encontró información sobre los extractos de *T. caracasana*, lo que representa una oportunidad para que este estudio sirva como base para investigaciones futuras sobre los extractos obtenidos de esta especie.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar la composición química por medio de técnicas cromatográficas de AE y extractos de *T. caracasana*, obtenidos de plantas cultivadas en dos zonas del departamento de Santander, para establecer si las diferencias composicionales afectan su actividad antioxidante.

3.2 Objetivos Específicos

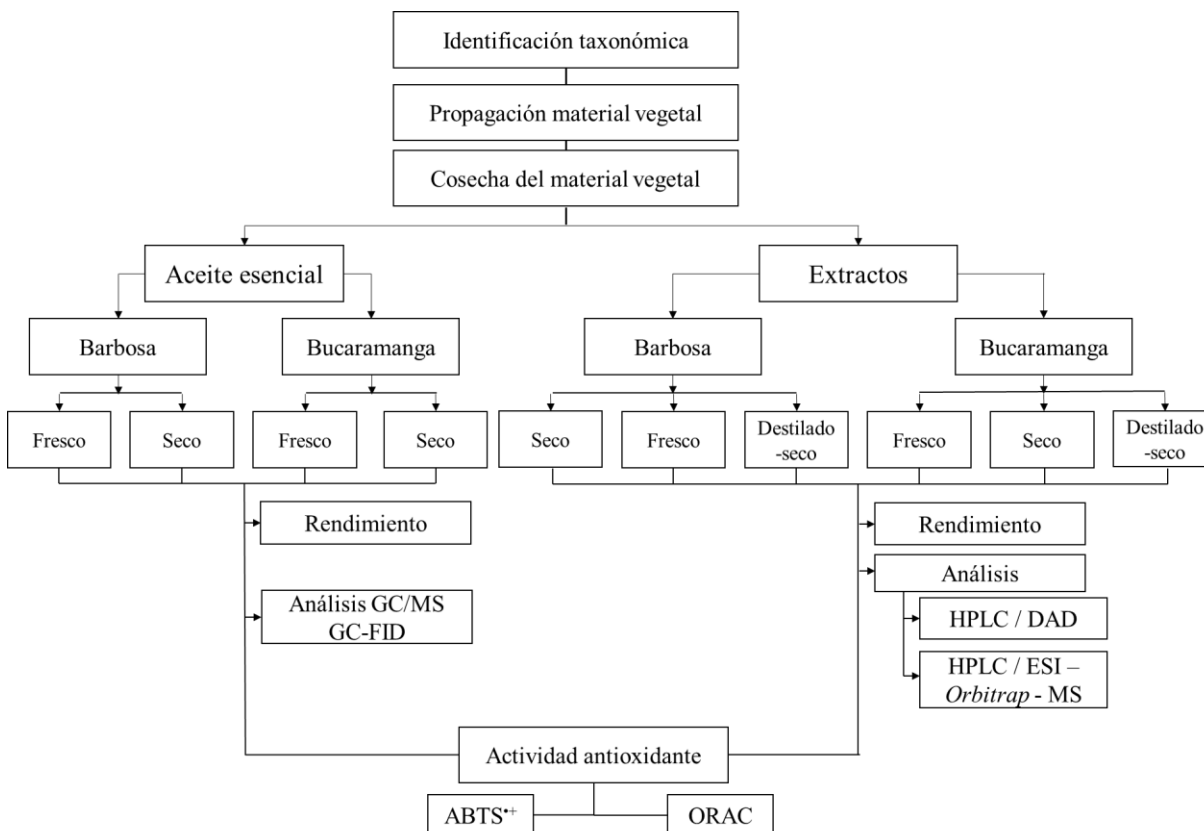
Comparar el rendimiento y la composición química de los AE *T. caracasana* destilados de plantas recolectadas en dos lugares de Santander (Barbosa y Bucaramanga), mediante el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Comparar el rendimiento de extracción y la composición química de *T. caracasana* cultivada en Barbosa y Bucaramanga, por técnicas cromatográficas HPLC/ DAD y UHPLC/ESI-Orbitrap-MS.

Observar posibles cambios en la actividad antioxidante del aceite esencial y de los extractos obtenidos de plantas de la especie *T. caracasana*, cultivadas en los municipios de Barbosa y Bucaramanga, mediante los ensayos de decoloración del catión-radical ABTS⁺ y del método ORAC.

4. Metodología

Este proyecto tiene como objetivo estudiar el aceite esencial y los extractos de *T. caracasana*, obtenidos por diferentes métodos de extracción, mediante el uso de técnicas cromatográficas. Se pretende aprovechar integralmente la planta, incluyendo la biomasa residual (material después de la destilación), para obtener los extractos. Finalmente, se evaluará la actividad antioxidante de los aceites esenciales y extractos obtenidos. El procedimiento general se muestra en la **Figura 5**.

Figura 5*Procedimiento general desarrollado*

4.1 Recolección del material vegetal

El material vegetal utilizado en el estudio fue cultivado en dos zonas del departamento de Santander: Bucaramanga y Barbosa, y fue proveído por el Estado Colombiano a través del Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados N° 270, firmado ente la Universidad Industrial de Santander y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

La cosecha de material vegetal tanto en Barbosa como en Bucaramanga se realizó durante el mes de junio del 2022. En Barbosa, se recolectó el material vegetal de las parcelas experimentales del Centro de Investigación CENIVAM. Debido a la distancia entre el lugar de recolección y el lugar de estudio, se aseguró que las condiciones experimentales fueran las mismas

al momento de recolectar el material vegetal disponible en los cultivos experimentales del CENIVAM ubicados en el *campus* Central de la UIS en Bucaramanga. Para lograr esto, se tomaron como referencia el día de cosecha y el día de llegada del material al centro de investigación.

4.2 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas

La destilación del AE se llevó a cabo de acuerdo con lo indicado por Stashenko *et al.* (2010b). Se utilizó material vegetal fresco de *T. caracasana* (350 g) suspendido en agua (300 mL) que se colocó en un balón de destilación de 2 L. El balón se conectó a un equipo de destilación tipo *Clevenger* que contaba con un reservorio de destilación *Dean-Stark*. Como fuente de calor se utilizó un horno de microondas doméstico con una potencia de salida de 1600 W y una frecuencia de radiación de 2.4 GHz. El horno se operó a un 60% de la potencia total. La muestra vegetal se calentó durante 45 min, en tres sesiones de 15 min cada una. Se retiró el agua residual con Na₂SO₄ anhidro, luego cada muestra de AE se filtró, se pesó y se almacenó hasta su análisis por cromatografía de gases. Para cada muestra de material vegetal se realizaron tres destilaciones, se promediaron los pesos y se calculó el rendimiento del aceite esencial teniendo en cuenta el peso del material vegetal destilado.

4.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

El AE de *T. caracasana* se analizó en un cromatógrafo de gases, modelo GC 6890 *Plus* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector selectivo de masas MSD 5973 *Network* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE. UU.), con ionización por electrones (EI, 70 eV). El modo de inyección fue *split* (30:1) y la temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C. La temperatura del horno cromatográfico se programó desde 50 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min) a una velocidad de 5 °C/min y luego, hasta 230 °C (10 min), a una velocidad de 5 °C/min. Cuando se utilizó la columna DB-5MS, se añadió una rampa de temperatura hasta 275 °C (15

min), a una velocidad de 10°C/min (véase **Figura 6**). Los metabolitos secundarios volátiles se identificaron tentativamente comparando sus índices de retención lineales (IRL) (ver **Ecuación 1**) calculados en dos columnas, polar y apolar teniendo en cuenta una serie homóloga de *n*-alcanos C₆-C₂₅ (Van den Dool y Kratz, 1963), y sus espectros de masas experimentales (IE, 70 eV) con los disponibles diferentes bases de datos (Adams, 2007; Wiley, 2008; NIST, 2017) y literatura científica. Para la identificación confirmatoria se emplearon sustancias de referencia. Cada AE se inyectó en una concentración de 10 mg/L usando *n*-tetradecano como estándar interno (ISTD, 500 mg/L).

Figura 6

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

Network



Nota: Fotografía tomada por Michael Santos, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, julio de 2022.

$$\mathbf{IRL} = 100n + 100 \left[\frac{t_{R(x)} - t_{R(n)}}{t_{R(N)} - t_{R(n)}} \right] \quad \mathbf{Ecuación 1}$$

Donde:

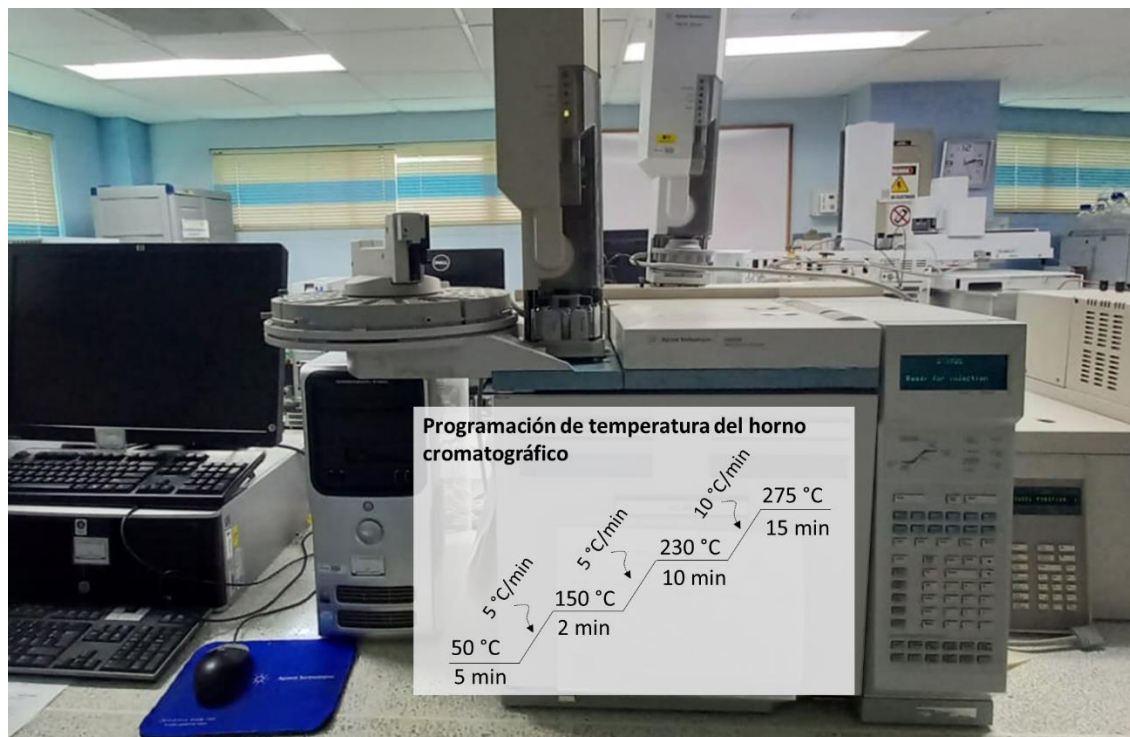
- IRL** = Índice de retención lineal del compuesto de interés (x).
- n** = Número de átomos de carbono de *n*-alcanos, que eluyen antes del compuesto de interés (x).
- t_{R(x)}** = Tiempo de retención del compuesto de interés (x).
- t_{R(N)}** = Tiempo de retención del *n*-alcano que eluye después del compuesto de interés (N).
- t_{R(n)}** = Tiempo de retención del *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés (n).

4.4 Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama

La cuantificación de los compuestos presentes en el AE de *T. caracasana* se realizó en un cromatógrafo de gases AT 6890N (AT, Palo Alto, CA, USA), acoplado a un detector de ionización en llama FID. La separación de componentes se llevó a cabo en columna capilar con una fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), 5%-Ph-PDMS, de características idénticas a la utilizada en el análisis por GC/MS, así como el gas de arrastre, su flujo, y la programación de temperatura del horno (Véase **Figura 7**). El AE se inyectó bajo la misma concentración que GC/MS. La cuantificación se realizó usando el método del estándar externo.

Figura 7

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



Nota. Fotografía tomada por Michael Santos, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, octubre de 2022.

4.5 Extracción con solvente asistida por ultrasonido

La obtención de los extractos (SE) se realizó, según la metodología descrita por Borrás *et al.*, (2015) y Pico-Hernández *et al.*, (2020) con algunas modificaciones. El material vegetal (ca. 100 g) se mezcló con una solución de EtOH (96%): H₂O (2 L, 70:30%, v/v). La mezcla se llevó a un baño de ultrasonido (*Elmasonic S15H*, Singen, Alemania) durante 1 h a 45 °C, con una frecuencia de 37 kHz. Luego se filtró al vacío con un embudo *Büchner* (papel filtro Whatman N° 1), un matraz *Kitasato* y una bomba de vacío (*Vacuubrand*, Wertheim, Alemania). Los extractos obtenidos se rotaevaporaron en el equipo *Heidolph (Hei-VAP, Advantage HL*, Chicago, USA), se secaron en un liofilizador de bandejas *VirTis AdVantage Plus (SP Scientific, Gardiner, New York,*

USA) y se almacenaron a 4 °C, en ausencia de luz, hasta su análisis por cromatografía líquida. Todas las extracciones se realizaron por triplicado, los pesos se promediaron, y el rendimiento de los extractos obtenidos, se calculó con base en el peso inicial del material vegetal utilizado.

4.6 Cromatografía líquida de alta eficiencia con un detector de arreglo de diodos

El análisis se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC 1260 *Infinity* (AT, Palo Alto, CA, USA) con columna cromatográfica *GEMINI C₁₈* (*Phenomenex*, Torrance, CA, USA) de 250 mm de longitud x 4.6 mm d.i. x 5 µm de tamaño de partícula, con detector de arreglo de diodos AT G1315D, bomba cuaternaria AT G1311C e inyector automático AT G1329B (véase **Figura 8**). La inyección se realizó en modo automático, el volumen de inyección fue 10 µL, a un flujo en la columna de 1 mL/min, y temperatura de 35 °C. La fase móvil del método fue la mezcla de una solución acuosa de ácido fórmico al 0.5% v/v (A) y acetonitrilo grado HPLC (B), con un flujo de 1 mL/min y gradiente de elución programado así: 98% A (0 min), 88% A (15 min), 88% A (15-23 min), 60% A (46 min), 10% A (71 min), 10% A (71-75 min), 98% A (80 min), 98% A (80-85 min).

La detección de los compuestos se realizó a $\lambda=245$ nm, 270 nm, 290 nm y 515 nm. La identificación de los compuestos se realizó por la comparación de sus tiempos de retención y espectros ultravioleta-visible, con los de patrones de referencia adquiridos. El procesamiento de los datos se realizó usando el *software AT Chemstation B.04.02 SP1*.

Figura 8

Cromatógrafo líquido AT 1260, equipado con una bomba cuaternaria, y detectores UV-VIS y detectores de arreglo de diodos, DAD.



Nota. Fotografía por Michael Santos, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, mayo de 2022.

4.7 Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución *Q-Exactive*

El análisis de metabolitos secundarios se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de ultra alta resolución *Vanquish*TM (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA), equipado con una unidad de desgasificación, una bomba binaria de gradiente, un automuestreador (10 °C) y un compartimento de columna controlado termostáticamente (40 °C). La separación cromatográfica se realizó en una columna *Zorbax Eclipse XDB C₁₈* (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, USA), 50 mm de longitud x 2.1 mm d.i. 1.8 µm de tamaño de partícula. El caudal de la fase móvil

que contenía agua (0.1% AF + 5 mM FA) (A) y MeOH (0.1% AF + 5 mM FA) (B) fue de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. El volumen de inyección fue de 2 μL (Véase **Figura 9**).

Figura 9

Cromatógrafo líquido de ultra-alta resolución VanquishTM acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive.



Nota. Fotografía por Michael Santos, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, octubre de 2022.

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 HESI-II), intercambiadores de polaridad en tiempos < 500 mseg con fragmentación HCD. El voltaje de pulverización (*V_{spray}*) fue de ± 3.5 kV. La temperatura del nebulizador se fijó en 350 °C; la temperatura del capilar fue de 320 °C; el gas envolvente y el gas auxiliar (N_2) se ajustaron a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. El nitrógeno, se obtuvo de un generador NM32LA (*Peak Scientific*, Escocia, Reino Unido). Durante el barrido completo del MS, la resolución de masas se estableció en 70000 (ancho total a la mitad del máximo, en *m/z* 200) con objetivo de

control automático de ganancia, 3×10^6 , tiempo máximo de inyección del *C-trap* de 200 ms y un rango de exploración de m/z 80–1000. Los iones inyectados a la celda HCD a través del *C-trap* se fragmentaron con energías de colisión normalizadas por pasos de 10 a 70 eV. Los espectros de masas se registraron en modo SIM (monitoreo de iones seleccionados), según la masa exacta de los analitos de interés. 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 (TS, San José, CA, USA)*, respectivamente.

Los datos se procesaron con el *software MSDChemStation G1701DA*. La identificación tentativa de los compuestos se realizó por comparación de los espectros de masas y iones-producto con bases de datos (FoodB, 2020; NIST, 2017), ion molecular, masas exactas, fórmula elemental, relación isotópica del carbono y compuestos reportados en la literatura para especies del género *Tagetes*. Para la identificación confirmatoria se usaron sustancias patrón. La cuantificación de los compuestos se realizó por el método de estandarización externa empleando sustancias patrón.

4.8 Determinación *in vitro* de la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos obtenidos de *T. caracasana*

4.8.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺

El ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺ se determinó según Re *et al.*, 1999 con algunas modificaciones. La prueba se realizó en un lector de microplacas *Modulus® II (Turner Biosystems Inc., Sunnyvale, CA, EE. UU.)*. El ABTS (7 mM en buffer de acetato) y persulfato de potasio (2,45 mM) se mezclaron, sonicaron (30 min) y se almacenaron a 4 °C (24 h), en ausencia de luz, para obtener una solución de ABTS⁺ estable. Después, se tomó el ABTS⁺ (900 µL) y se diluyó en buffer de acetato hasta obtener una absorbancia de $0,72 \pm 0,02$ a $\lambda=750$ nm, y se almacenó a 4 °C (30 min) antes de su uso. Cada muestra, extracto o aceite esencial, (50 mg) se

disolvió en etanol (2 mL) y se diluyó en buffer de acetato (20 mM, pH 4,5). El extracto diluido (10 μ L) y la solución de ABTS⁺ (190 μ L) se depositaron en cada pozo de la placa y la absorbancia se midió durante 60 min. La capacidad antioxidante se determinó a partir de una curva de calibración con Trolox® (50-560 μ M). Para cada concentración de la curva se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la **Ecuación 2**. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar de μ mol Trolox®/g de extracto.

$$\text{Inhibición, \%} = 0.1292(\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}) - 2.399 \quad \text{Ecuación 2}$$

4.8.2 Ensayo de capacidad de absorción del oxígeno radical

Cada muestra, aceite esencial o extracto, (1 mg) se disolvió en metanol (1 mL) y se diluyó en *buffer* de fosfato (75 mM, pH 7.4); en cada pozo de la placa se depositaron la muestra diluida (25 μ L) y la solución de fluoresceína (150 μ L, 0.0838 mM en *buffer* fosfato) luego, la mezcla se incubó a 37 °C (20 min), posterior a esto, una solución de 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (25 μ L, 78 mM, en *buffer* de fosfato) se adicionó a la solución. La fluorescencia se midió (37 °C, 90 min) empleando longitudes de onda de excitación $\lambda=490$ nm y de emisión $\lambda=510$ nm. La protección antioxidante se determinó a partir de la diferencia entre el área bajo la curva (ABC) de fluorescencia, de cada muestra y el blanco (25 μ L de *buffer* de fosfato). La capacidad antioxidante se determinó por una curva de calibración con Trolox® (8-140 μ M). Para cada concentración de la curva se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la **Ecuación 3**. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar de μ mol Trolox®/g de extracto.

$$\text{inhibición, \%} = 0,1682(\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}) + 0,6835 \quad \text{Ecuación 3}$$

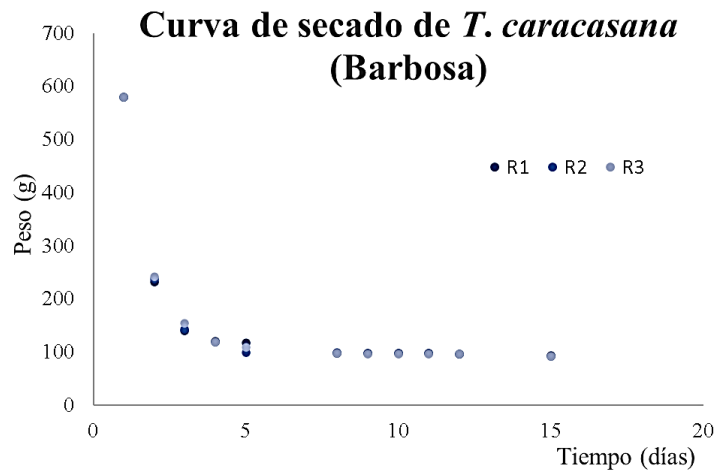
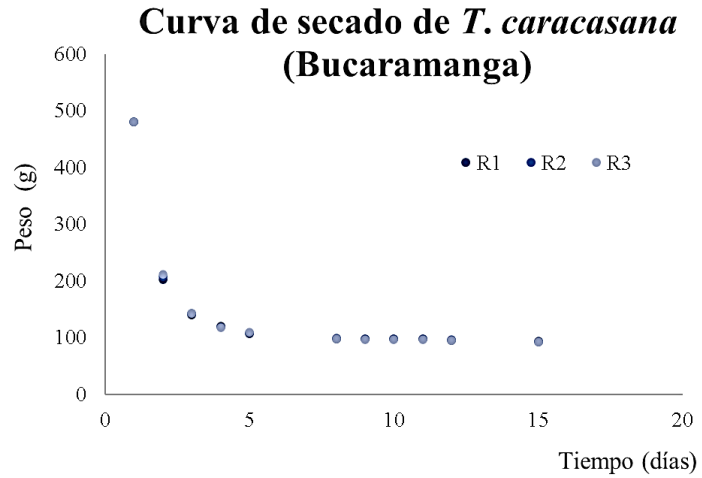
5. Resultados y discusión

5.1 Secado de material vegetal

Se realizó un proceso de secado a partir de muestras de material vegetal fresco de *T. caracasana* procedentes de Bucaramanga y Barbosa para obtener material vegetal en estado seco. El proceso se llevó a cabo por triplicado. Una vez obtenido el material seco se destiló y se obtuvo el extracto, finalmente se comparó el rendimiento del AE y del extracto obtenido con los obtenidos a partir de otros estados del material, (fresco y después de la destilación). La curva de secado del material se muestra en la **Figura 10**.

Figura 10

Curva de secado del material fresco de Tagetes caracasana recolectado en Bucaramanga y Barbosa (Santander, Colombia).



Los valores a partir de los cuales se construyó la curva de secado para el material vegetal cosechado en Bucaramanga se muestran en la **Tabla 5**, la mayor pérdida de humedad (> 60%) se observó durante los tres primeros días de secado.

Tabla 5

*Resultados de la pérdida de humedad de *T. caracasana*.*

Día	Peso material vegetal, g ($\pm s, n = 3$)	Temperatura °C ($\pm s, n = 10$)*	Humedad relativa, % ($\pm s, n = 10$)*
1	480 \pm 1	33 \pm 1	42 \pm 1
2	207 \pm 5	29 \pm 2	52 \pm 2
3	142 \pm 2	28 \pm 2	29 \pm 2
4	119 \pm 1	33 \pm 2	28 \pm 2
5	108 \pm 1	29 \pm 3	22 \pm 3
8	98 \pm 1	33 \pm 4	52 \pm 4
9	97 \pm 1	29 \pm 3	29 \pm 3
10	97 \pm 1	29 \pm 2	28 \pm 2
11	97 \pm 1	28 \pm 1	22 \pm 1
12	95 \pm 1	33 \pm 2	33 \pm 2
15	92 \pm 1	33 \pm 2	52 \pm 2

n: número de réplicas. *La temperatura y la humedad del ambiente se registraron con un termohigrómetro, cada hora.

Después de 15 días de secado del material vegetal fresco de *T. caracasana*, bajo la sombra, alcanzó estabilidad en su peso. Durante el proceso de secado el material vegetal cosechado en Bucaramanga perdió el 81% de su peso inicial y el cosechado en Barbosa el 84%.

El material vegetal destilado, se sometió al mismo proceso de secado, que el material vegetal fresco sin destilar, esto con el fin de aprovechar la biomasa para obtener extracto de material vegetal destilado, extractos que, posteriormente, serían comparados y analizados con los extractos obtenidos de material vegetal seco y fresco. La curva de secado se encuentra adjunta en el **Anexo 1** del presente trabajo de investigación.

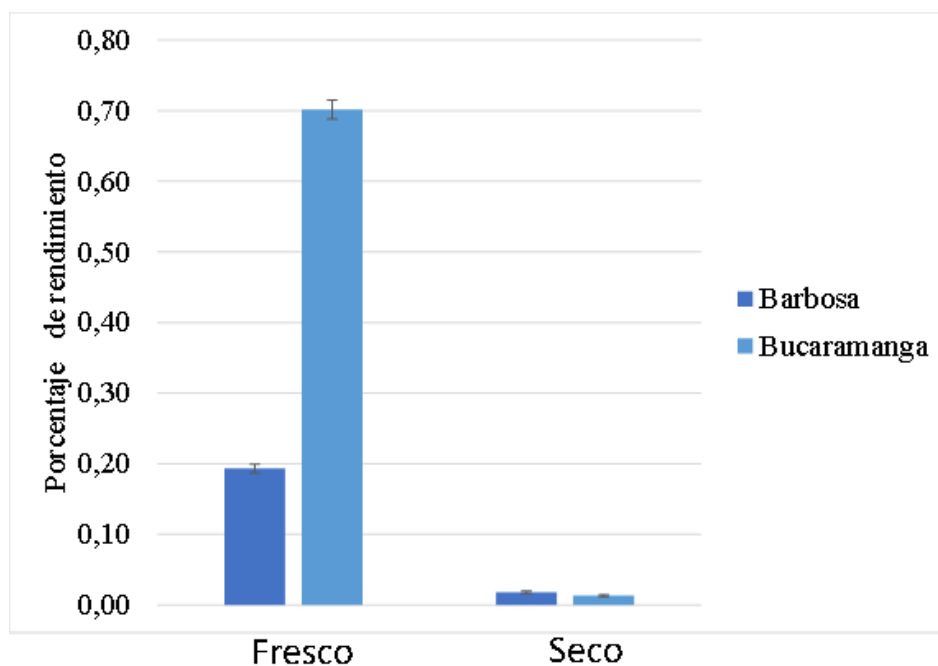
5.2 Obtención de aceites esenciales

El aceite esencial obtenido por MWHD a partir de *T. caracasana* es un líquido viscoso de color verde. Se observó que el rendimiento del aceite esencial a partir de material vegetal fresco fue mayor en comparación con el material vegetal seco, para el material vegetal cosechado en

Barbosa y en Bucaramanga. Se evidenció un porcentaje de rendimiento mayor para el AE destilado de la especie cultivada en Bucaramanga en estado fresco (véase **Figura 11**).

Figura 11

*Porcentajes de rendimiento de destilación del AE esencial de *T. caracasana*. Las barras de error representan la desviación estándar para $n = 3$.*



La mayor cantidad de AE de *T. caracasana* se obtuvo a partir del material vegetal fresco, lo cual evidencia que esta especie pierde una cantidad considerable de volátiles durante el proceso de secado. En la **Tabla 6**, se detallan los rendimientos obtenidos para cada origen del material vegetal.

Tabla 6*Rendimientos de destilación de AE esencial de T. caracasana.*

Lugar	Estado	Rendimiento (%) $n=3$	\pm S	Coefficiente de variación (%)
Barbosa	Fresco	0,19	\pm 0,01	3
Barbosa	Seco	0,018	\pm 0,002	9
Bucaramanga	Fresco	0,70	\pm 0,01	2
Bucaramanga	Seco	0,013	\pm 0,001	10

5.3 Caracterización del aceite esencial de *T. caracasana*

Los metabolitos secundarios presentes en los AE destilados de *T. caracasana* por MWHD, se analizaron por GC/MS. La caracterización se realizó empleando los siguientes parámetros de integración de los picos cromatográficos: área de rechazo del pico igual a 0,2 y umbral de integración, *threshold*: 18. El perfil cromatográfico, obtenido en la columna apolar (DB-5MS), se muestra en la **Figura 12**. En la **Tabla 7**, se registran las áreas relativas (A_i/A_{Istd}) de los compuestos mayoritarios identificados en los AE. En total se identificaron 36 compuestos con áreas relativas superiores al 0,1%.

En los AE analizados se observó que compuestos como la dihidrotagetona y la (*E*)-ocimenona fueron más abundantes (A_i/A_{Istd}) al destilar material vegetal de *T. caracasana* fresco. En el AE destilado de material vegetal seco, cosechado tanto en Bucaramanga como en Barbosa, no se detectaron isómeros *E* o *Z* de la tagetona. Para todos los AE el compuesto mayoritario fue la (*E*)-ocimenona que representó del 24% (material vegetal seco de Bucaramanga) al 38% (material vegetal seco de Barbosa) de los AE.

Figura 12

Perfil cromatográfico (DB5-MS, EI 70 eV) del AE destilado de partes aéreas frescas de T. caracasana obtenidas de plantas cultivadas en Bucaramanga.

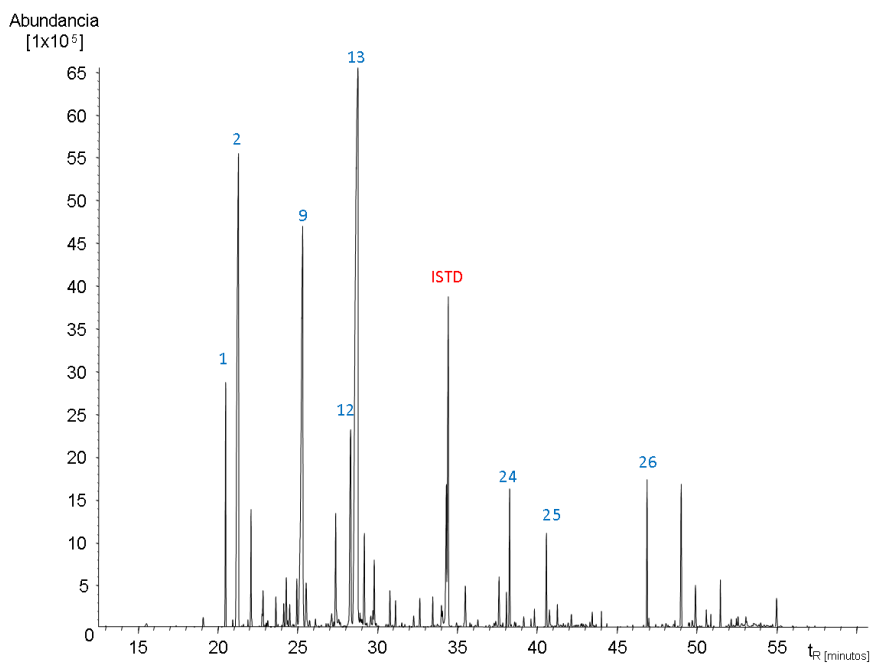


Tabla 7

Áreas relativas de los compuestos mayoritarios identificados en los AE destilados de *T. caracasana*.

N° pico Fig. 12	Compuesto	Índices de retención lineales				Cantidad relativa, A_i/A_{Istd}			
		DB-5MS		DB-WAX		Bucaramanga		Barbosa	
		EXP	LIT ^[1]	EXP	LIT ^[1]	Fresco	Seco	Fresco	Seco
					Prom. ± s	Prom. ± s	Prom. ± s	Prom. ± s	
1	(<i>E</i>)- β -Ocimeno	1041	1047	1253	1250	0,39 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,31 ± 0,02
2	Dihidrotagetona	1062	1059 ^[2]	1263	1268 ^[2]	2,37 ± 0,04	1,71 ± 0,04	2,11 ± 0,02	1,45 ± 0,04
8	(<i>E</i>)-Tagetona	1136	1152	*	*	0,09 ± 0,01	-	0,18 ± 0,02	-
9	(<i>Z</i>)-Tagetona	1139	1149	1502	1517	1,74 ± 0,04	-	2,59 ± 0,01	-
12	(<i>Z</i>)-Ocimenona	1231	1228 ^[2]	1678	*	0,57 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,10 ± 0,02
13	(<i>E</i>)-Ocimenona	1237	1239 ^[2]	1687	1710 ^[2]	3,61 ± 0,03	2,13 ± 0,03	3,75 ± 0,03	1,77 ± 0,02
22	Germacreno D	1476	1480	1695	1708	0,08 ± 0,01	-	0,17 ± 0,01	-
23	Biciclogermacreno	1498	1494	1730	1734	0,06 ± 0,01	-	0,09 ± 0,01	-
24	β -Bisaboleno	1513	1508	1732	1728	0,21 ± 0,01	-	0,22 ± 0,02	0,15 ± 0,02
25	Espatulanol	1585	1576	2124	2127	0,20 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01
26	Ácido linolénico	2137	2129	3278	3290	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,06 ± 0,01	-
30	α -Tertiofeno	2250	2239 ^[2]	*	*	0,07 ± 0,01	-	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01

Nota. EXP. Índices de retención lineales experimentales, LIT. Índices de retención reportados en las bases de datos y literatura especializada [1] Babushok, V.; Linstrom, P.; y Zenkevich, [2] NIST. Cantidades relativas expresadas como promedio ± desviación estándar, n=3.

5.4 Obtención de extractos hidroalcohólicos de *T. caracasana*

Los extractos fueron obtenidos a partir de 100 g de material vegetal en estado (fresco, seco y seco-destilado) divididos en 3 réplicas (ca. 33 g). La mayor cantidad de extracto se obtuvo a partir del material vegetal seco procedente de la especie cultivada en Barbosa (rendimiento del 10%). De manera general, los rendimientos de extracción obtenidos a partir material vegetal seco fueron los más altos, seguidos de los rendimientos para material vegetal destilado. Las extracciones a partir de material vegetal fresco de *T. caracasana* no superaron rendimientos del 3%. En la **Tabla 8** se muestran las cantidades de extractos y los rendimientos de extracción (% p/p) obtenidos para material vegetal de *T. caracasana* en diferentes estados, ver **Figura 12**.

Tabla 8

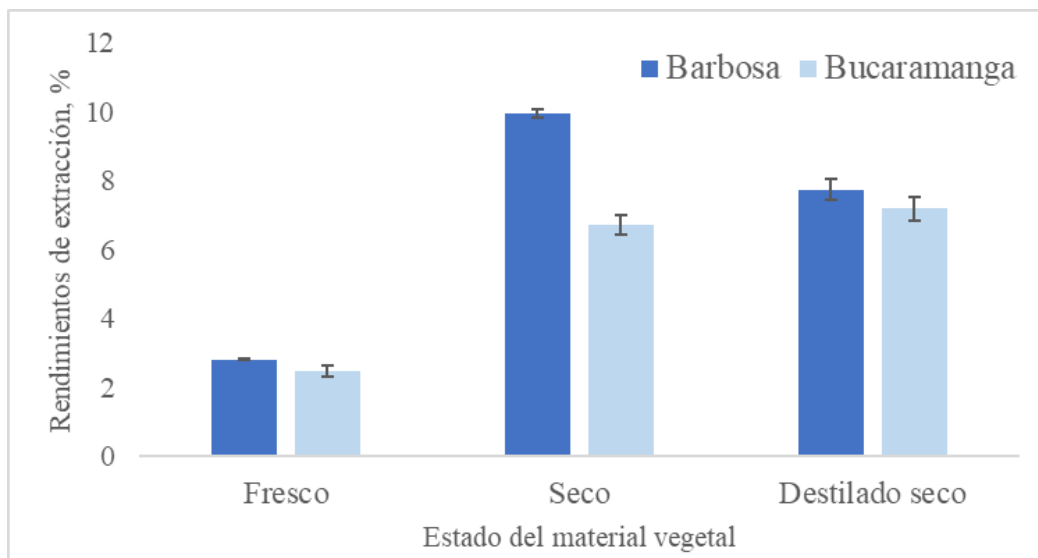
Rendimientos de extracción de T. caracasana

Zona de cultivo	Estado del material	Cantidad de extracto, g	Rendimiento extracción, %
		Promedio \pm s, n=3	Promedio \pm s, n=3
Barbosa	Fresco	0,94 \pm 0,01	2,82 \pm 0,03
Barbosa	Seco	3,32 \pm 0,04	10,0 \pm 0,1
Barbosa	Destilado seco	2,6 \pm 0,1	7,7 \pm 0,3
Bucaramanga	Fresco	0,83 \pm 0,05	2,5 \pm 0,2
Bucaramanga	Seco	2,2 \pm 0,1	6,7 \pm 0,3
Bucaramanga	Destilado seco	2,4 \pm 0,1	7,2 \pm 0,3

El porcentaje de extracción de cada extracto se muestra en la figura (ver **Figura 13**). Se evidencia un porcentaje de extracción mayor al 10% para los extractos del material vegetal seco, por otra parte, el material vegetal fresco no supera el 5% de extracción, sin embargo, el material vegetal después de su destilado aporta un porcentaje de extracción alrededor del 8% por extracto.

Figura 13

Porcentajes de rendimiento de extracción de *T. caracasana*. Las barras de error representan la desviación estándar para $n = 3$.



5.5 Caracterización química HPLC/DAD de los extractos de *T. caracasana*

Los resultados de la caracterización por HPLC/DAD de *T. caracasana* se muestran en la **Tabla 9**. En total, se identificaron tentativamente 34 compuestos, pertenecientes a derivados de flavonoles, flavan-3-oles y ácidos hidroxicinámicos. Con ayuda de sustancias de referencia se identificaron de manera confirmatoria los ácidos ferúlico y clorogénico, el kaempferol, kaempferol-3-*O*-rutinosido, kaempferol-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-arabinósido. Se resalta la presencia de un derivado del flavonol con t_R de 36,7 min. La mayor cantidad de derivados de flavonoles están presentes en los extractos destilados-secos de ambas zonas. Por otra parte, la mayor cantidad de ácidos hidroxicinámicos se detectó en los extractos obtenidos de material vegetal fresco. Se observó una reducción significativa en la cantidad de compuestos detectados en el extracto seco de material vegetal cosechado en Bucaramanga.

Los extractos hidroalcohólicos, presentan composiciones químicas similares, con variaciones en las áreas relativas, lo cual se evidenció en los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD para cada uno de ellos (véase **Figura 14**)

Figura 14

*Perfil cromatográfico, por HPLC/DAD ($\lambda=290$ nm, columna Gemini C₁₈), de los extractos hidroetanólicos de *T. caracasana*.*

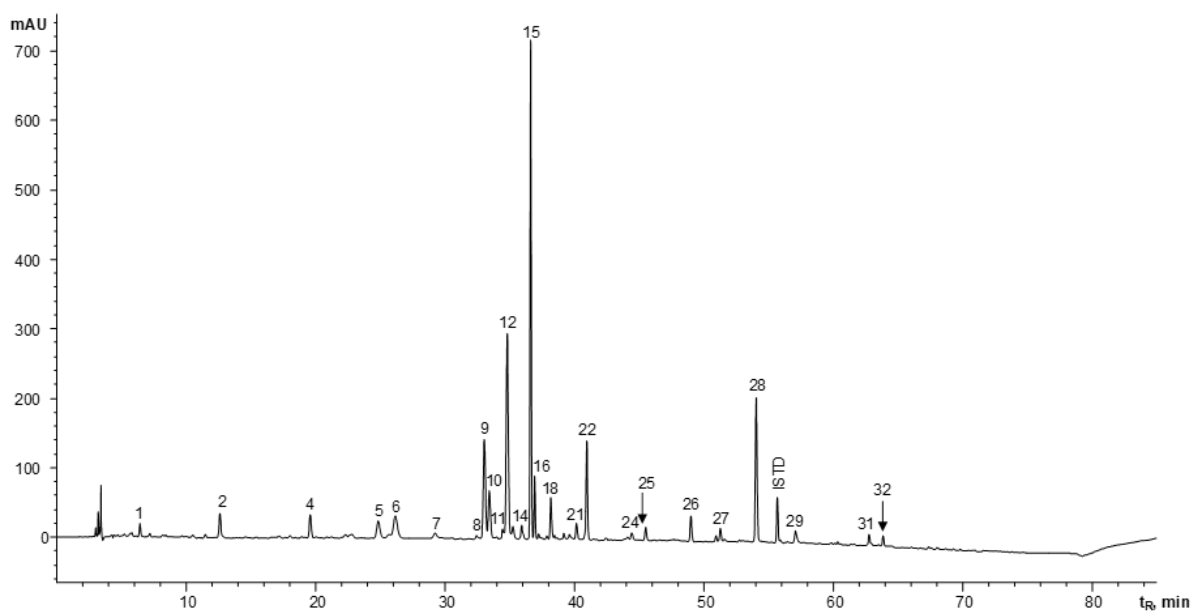


Tabla 9

Composición química HPLC/DAD, de los extractos de T. caracasana obtenidos de material vegetal fresco, seco y destilado-seco, cosechado en Bucaramanga y Barbosa, Santander.

N° Fig. 14	t _R , min		Compuesto	λ, nm	Área/Á _{ISTD} , valor					
	Exp.	STD			Bucaramanga			Barbosa		
					Fresco	Seco	Destilado-seco	Fresco	Seco	Destilado-seco
1	6,4	-	Derivado de flavan-3-ol ^{a, b}	230 ^{max} , 265 ^h	0,18	-	0,21	0,27	-	-
2	12,5	-	Derivado de flavan-3-ol ^{a, b}	228, 278 ^{max}	0,44	-	-	0,70	0,49	0,53
3	17,1	-	Derivado de flavan-3-ol ^{a, b}	228 ^{max} , 257	-	-	-	-	-	0,41
4	19,5	19,5	Ácido clorogénico ^{a, b, c}	241, 305 ^h , 326 ^{max}	0,47	-	0,24	0,69	-	-
5	24,7	-	Derivado de ácido hidroxibezoico ^{a, b}	238, 305 ^h , 325 ^{max}	2,34	-	-	0,84	-	-
6	26,0	-	Derivado de ácido hidroxibezoico ^{a, b}	242, 308 ^h , 329 ^{max}	2,97	-	0,80	1,36	-	-
7	28,7	-	Compuesto no identificado	228 ^{max} , 298 ^h , 312 ^h	-	-	-	-	-	0,92
8	32,2	-	Compuesto no identificado	228 ^{max} , 297 ^h , 324	-	-	1,54	-	0,43	0,53
9	33,0	32,4	Ácido ferúlico ^{a, b, c}	230, 315 ^{max}	1,90	-	0,87	3,31	0,57	1,73
10	33,4	-	Derivado de ácido hidroxibezoico ^{a, b}	231, 311 ^{max}	1,22	-	0,40	1,56	0,30	0,57
11	34,5	-	Derivado de flavonol ^{a, b}	230 ^{max} , 266, 328 ^h , 352	-	-	-	0,25	0,26	0,82
12	34,8	-	Derivado de ácido hidroxibezoico ^{a, b}	242, 305 ^h , 330 ^{max}	1,98	1,58	3,04	6,47	7,56	5,52
13	35,3	-	Derivado de flavonol ^{a, b}	230 ^{max} , 258, 328 ^h , 353	-	-	0,22	0,44	0,32	0,29
14	35,9	-	Compuesto no identificado	230 ^{max} , 246 ^h , 260 ^h , 370	-	-	-	0,44	-	0,25
15	36,7	-	Derivado de flavonol ^{a, b}	235 ^h , 264 ^{max} , 320 ^h , 344	1,81	4,30	6,08	9,27	25,37	29,00
16	37,0	37,3	Kaempferol-3-O-rutinósido ^{a, b, c}	234 ^h , 266 ^{max} , 325 ^h , 348	0,43	1,77	1,66	1,17	6,03	5,13
17	37,3	-	Derivado de flavonol	230 ^{max} , 266, 356	-	-	-	-	0,20	-
18	38,3	38,3	Kaempferol-3-O-glucósido ^{a, b, c}	232 ^h , 265 ^{max} , 300 ^h , 348	0,38	-	-	0,94	-	-

19	38,6	-	Compuesto no identificado	232 ^h , 278 ^h , 316 ^{max} , 365 ^h	0,18	0,31	-	-	-	-
20	39,3	39,3	Kaempferol-3-O-arabinósido ^{a, b, c}	268 ^{max} , 296 ^h , 356	-	-	-	-	0,17	-
21	40,2	-	Compuesto no identificado	252 ^{max} , 363	-	-	0,28	0,42	0,39	0,39
22	41,0	-	Derivado de flavonol ^{a, b}	234 ^h , 266 ^{max} , 320 ^h , 344	0,71	0,82	1,90	2,29	3,64	4,38
23	41,6	-	Compuesto no identificado	260 ^{max} , 295 ^h	-	-	-	-	-	0,65
24	44,5	-	Derivado de flavonol ^{a, b}	230, 258, 370 ^{max}	0,40	-	0,31	0,32	0,60	0,36
25	45,5	-	Derivado de ácido hidroxibezoico ^{a, b, c}	246 ^{max} , 290, 376	0,21	0,41	0,61	0,36	0,47	0,84
26	49,0	49,1	Kaempferol ^{a, b, c}	230, 253, 263, 330 ^h , 366 ^{max}	0,50	-	-	0,67	0,25	-
27	51,4	-	Derivado de ácido hidroxibezoico ^{a, b}	248 ^{max} , 290 ^h , 360 ^h , 373	0,23	0,43	0,65	0,33	0,55	0,95
28	54,1	-	Derivado de flavan-3-ol ^{a, b}	242 ^{max} , 276	5,11	-	0,73	3,77	0,66	0,46
-	56,1	-	ISTD, galangina	267 ^{max} , 312 ^h , 365	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
29	57,6	-	Compuesto no identificado	252 ^h , 296 ^{max}	0,53	-	-	0,41	-	-
30	60,9	-	Compuesto no identificado	254 ^{max} , 270 ^h	-	-	0,23	-	-	0,42
31	62,7	-	Compuesto no identificado	254 ^{max} , 270 ^h	-	0,28	-	-	-	-
32	62,9	-	Derivado de ácido hidroxibezoico ^{a, b}	228, 266 ^{max} , 360	0,72	-	-	0,36	-	0,27
33	64,0	-	Derivado de flavan-3-ol ^{a, b}	248 ^{max} , 290 ^h , 360 ^h , 373	0,22	-	-	-	-	0,30
Derivados de flavonoles					4,2	6,9	10,2	15,4	36,8	40,0
Derivados de flavan-3-ol					6,2	-	0,9	5,0	1,3	1,7
Derivados de ácidos hidroxicinámicos					11,5	2,4	6,6	14,9	9,5	9,9
Compuestos no identificados					1,4	0,6	2,0	1,6	0,8	3,4
Total Σ Área/A_{ISTD}					23,4	9,9	19,8	36,9	48,4	55,6

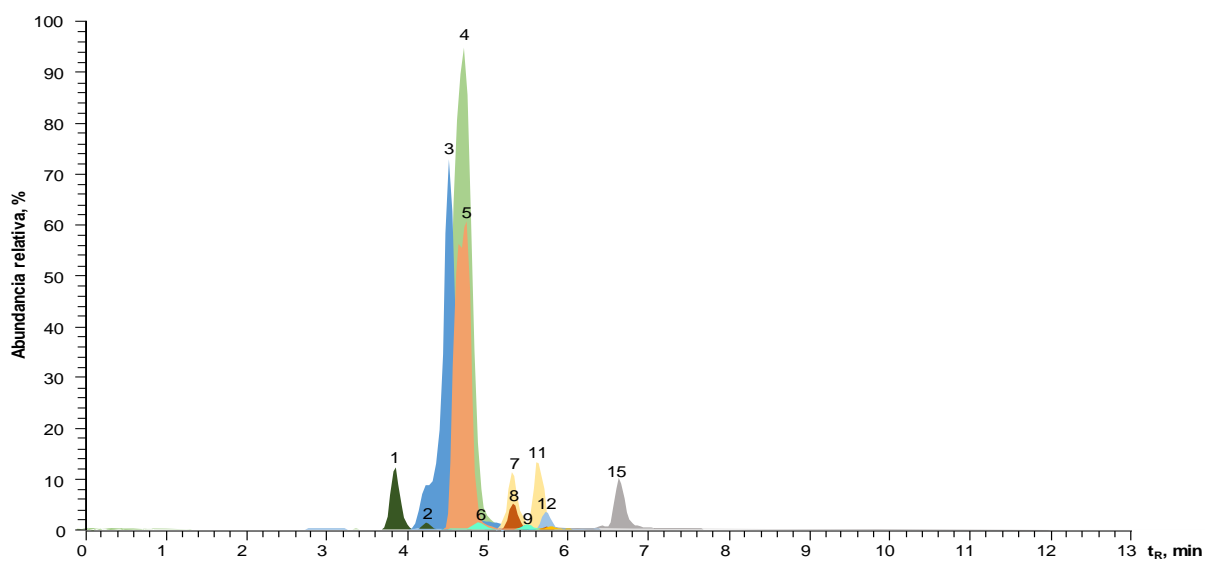
Nota. ^a Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y en la comparación con señales típicas λ (nm) de compuestos fenólicos [12,13]. ^b Identificación confirmatoria basada en espectro UV-Vis y en la comparación de los espectros UV-Vis y los t_R de las sustancias de referencia certificadas de los ácidos clorogénico ($\geq 99\%$) y ferúlico ($\geq 95\%$) y los flavonoles kaempferol-3-O-rutinósido ($\geq 98\%$), kaempferol-3-O-glucósido ($\geq 95\%$), kaempferol-3-O-arabinósido ($\geq 98\%$) y kaempferol ($\geq 90\%$). ^{max} Máximo de absorción. ^h Hombro. Exp: Valor experimental. STD: Tiempo de retención de la sustancia de referencia. ISTD estándar interno galangina (95%, Phytolab) a 10 mg/L.

5.6 Caracterización química UHPLC/ESI-Orbitrap/MS de los extractos de *T. caracasana*

Los extractos hidroalcohólicos obtenidos de partes aéreas frescas, secas y destiladas secas *T. caracasana*, cultivada en Bucaramanga y Barbosa, se analizaron por UHPLC/ESI⁺ Orbitrap/MS. En la **Figura 15** se registra la corriente iónica extraída en modo SIM. Se compararon los tiempos de retención (t_R) los espectros de masas, los patrones de fragmentación y las relaciones isotópicas de C, de las moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$. Mediante el uso de sustancias de referencia se identificaron cinco compuestos de manera confirmatoria: ácido clorogénico, ácido ferúlico, kaempferol-3-*O*-glucósido, kaempferol-3-*O*-rutinósido y kaempferol. Además, de manera presuntiva se identificaron el ácido 2-*O-p*-cumaroilhidroxicítrico, *O*-Cafeoil-pentosa, ácido *O*-acetil-cutárico, kaempferol-pentósido-desoxihexosa, kaempferol-hexósido-hexósido, kaempferol-di-hexósido, kaempferol-3-*O*-arabinósido, un isómero del kaempferol-pentósido-desoxihexosa, un isómero acetilado del ácido fertárico, isómero del ácido ferúlico. La identificación de cada compuesto se muestra en la **Tabla 10**.

Figura 15

Corrientes iónicas extraídas (EIC), obtenidas por UHPLC/ESI-Orbitrap/MS, en modo SIM, de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ de compuestos fenólicos presentes en los extractos hidroalcohólico obtenido de material vegetal fresco de *T. caracasana* cultivado en Bucaramanga.



Nota. Véase identificación de los compuestos en la **Tabla 10**.

Tabla 10

Identificación de compuestos fenólicos, por UHPLC/ESI-Orbitrap/MS, presentes en los extractos hidroetanólicos de T. caracasana, obtenidos de material vegetal, fresco, seco y destilado-seco, cosechado en Bucaramanga y Barbosa, Santander.

N° Fig. 15	t _R , min		Compuesto	Fórmula	Masa experimental (I, %)	Error Δppm	HCD, eV	Iones-producto		
	Extracto	STD						Fragmento	Fórmula	m/z (I, %)
1	3,86	3,83 ± 0,01	Ácido clorogénico ^{a, c}	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻ 353,08774 (16%)	2,91	10	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₇ H ₁₁ O ₆	191,05544(100%)
								[(M-H)-C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁻	C ₉ H ₇ O ₄	179,03424 (3%)
								[(M-H)-C ₁₀ H ₁₂ O ₃] ⁻	C ₆ H ₅ O ₆	173,00836 (3%)
2	4,24	-	Ácido 2- <i>O-p</i> - cumaroilhidroxícitric _o ^a	C ₁₅ H ₁₄ O ₁₀	[M-H] ⁻ 353,05127 (6%)	0,94	10	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₆ H ₇ O ₇	191,01903 (87%)
								[(M-H)-C ₆ H ₆ O ₃] ⁻	C ₉ H ₇ O ₄	179,03423 (5%)
								[(M-H)-C ₉ H ₈ O ₄] ⁻	C ₆ H ₅ O ₆	173,00832(100%)
								[(M-H)-C ₉ H ₈ O ₄ - H ₂ O] ⁻	C ₆ H ₃ O ₅	154,99763 (11%)
								[(M-H)-C ₉ H ₈ O ₄ - CO ₂] ⁻	C ₅ H ₅ O ₄	129,01836 (6%)
3	4,41	-	Cafeoil- <i>O</i> -pentosa	C ₁₄ H ₁₆ O ₈	[M-H] ⁻ 311,07727 (8%)	1,12	10	[(M-H)-C ₉ H ₈ O ₄ - H ₂ O-CO ₂] ⁻	C ₅ H ₃ O ₃	111,00765 (47%)
								[(M-H)-C ₅ H ₈ O ₄] ⁻	C ₉ H ₇ O ₄	179,03421 (22%)
								[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₅ H ₉ O ₅	149,04459 (100%)
4	4,56	-	Ácido <i>O</i> -acetil- cutárico	C ₁₅ H ₁₄ O ₉	[M-H] ⁻ 337,05673 (4%)	1,32	10	[(M-H)-C ₅ H ₈ O ₄ - CO ₂] ⁻	C ₈ H ₇ O ₂	135,04414 (6%)
								[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₂] ⁻	C ₆ H ₇ O ₇	191,01906 (20%)
								[(M-H)-C ₉ H ₈ O ₃] ⁻	C ₆ H ₅ O ₆	173,00835(100%)
								[(M-H)-C ₉ H ₁₀ O ₄] ⁻	C ₆ H ₃ O ₅	154,99770 (12%)

									[(M-H)-C ₉ H ₈ O ₃ -CO ₂] ⁻	C ₅ H ₅ O ₄	129,01836 (5%)
									[(M-H)-C ₉ H ₁₀ O ₄ -CO ₂] ⁻	C ₅ H ₃ O ₃	111,00768 (51%)
									[(M-H)-C ₁₀ H ₁₀ O ₄] ⁻	C ₆ H ₅ O ₆	173,00838(100%)
5	4,75	-	Isómero acetilado del ácido ferúrico	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻ 367,06708 (3%)	1,10	10		[(M-H)-C ₁₀ H ₁₀ O ₄ -H ₂ O] ⁻	C ₆ H ₃ O ₅	154,99768 (12%)
									[(M-H)-C ₁₀ H ₁₀ O ₄ -CO ₂] ⁻	C ₅ H ₅ O ₄	129,01837 (5%)
									[(M-H)-C ₁₀ H ₁₀ O ₄ -H ₂ O-CO ₂] ⁻	C ₅ H ₃ O ₃	111,00769 (51%)
									[(M-H)-CH ₃] ⁻	C ₉ H ₆ O ₄	178,02644 (50%)
6	4,95	4,91 ± 0,01	Ácido ferúlico ^{a, c}	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻ 193,0500 (31%)	0,49	10		[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₉ H ₉ O ₂	149,05986 (21%)
									[(M-H)-C ₃ H ₄ O] ⁻	C ₇ H ₅ O ₃	137,02348 (11%)
									[(M-H)-CH ₃ -CO ₂] ⁻	C ₈ H ₆ O ₂	134,03639 (100%)
7	5,30	-	Kaempferol-pentósido-desoxihexosa	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M+H] ⁺ 565,1538 (18%)	1,37	10		[(M+H)-C ₅ H ₈ O ₄] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,11243(100%)
									[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,05441 (16%)
									[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,11322 (32%)
8	5,32	-	Kaempferol-hexósido-hexósido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺ 595,1652 (19%)	2,70	10		[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,10739(100%)
									[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,05435 (16%)
									[(M-H)-CH ₃] ⁻	C ₉ H ₆ O ₄	178,02643 (43%)
9	5,44	-	Isómero del ácido ferúrico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻ 193,0499 (39%)	0,43	10		[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₉ H ₉ O ₂	149,05992 (26%)
									[(M-H)-C ₃ H ₄ O] ⁻	C ₇ H ₅ O ₃	137,02333 (11%)
									[(M-H)-CH ₃ -CO ₂] ⁻	C ₈ H ₆ O ₂	134,03641(100%)
10	5,47	-		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	0,32	10		[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,10727 (15%)

			Kaempferol-di-hexósido		611,16034 (8%)			[(M+H)-2C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,05460(100%)
11	5,61	-	Isómero de kaempferol-pentósido-desoxihexosa	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M+H] ⁺ 565,1544 (15%)	0,70	10	[(M+H)-C ₅ H ₈ O ₄] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,11249(100%)
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	419,09683 (7%)
								[(M+H)-C ₁₁ H ₁₈ O ₈] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,05453 (23%)
12	5,72	5,75 ± 0,01	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido ^{a, c}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ 449,10699 (7%)	0,84	10	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303,04959 (9%)
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,05469(100%)
13	5,74	5,75 ± 0,01	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinósido ^{a, c}	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺ 595,1655 (19%)	0,21	10	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,10721 (12%)
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,11124 (3%)
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅ - C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,05466(100%)
14	5,81	5,82 ± 0,01	Kaempferol-3- <i>O</i> -arabinósido	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	[M+H] ⁺ 419,1889 (83%)	2,23	10	[(M+H)-C ₅ H ₈ O ₄] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,05475(100%)
15	6,64	6,70 ± 0,01	Kaempferol ^{a, c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺ 287,0549 (100%)	0,43	10	[(M+H)-C ₇ H ₆ O ₂] ⁺	C ₈ H ₅ O ₄	165,01828 (9%)
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₂] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄	153,01830 (18%)
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₄] ⁺	C ₇ H ₅ O ₂	121,02860 (12%)

Nota. ^a Identificación tentativa basada en el estudio de patrones de fragmentación de la molécula protonada o deprotonada y la relación isotópica del átomo de C¹³. ^b Identificación tentativa basada en los datos de la literatura científica sobre especies del género *Tagetes*. ^c Identificación confirmatoria basada en la comparación de los tiempos de retención (t_R) y el espectro de masas de las sustancias patrón del ácido clorogénico (≥98%), ácido ferúlico (≥98%), kaempferol-3-*O*-rutinósido (≥98%), kaempferol-3-*O*-glucósido (≥95%), kaempferol-3-*O*-arabinósido (≥98%) y kaempferol (≥90%). HCD: Celda de disociación por colisión de alta energía.

La cantidad de cada compuesto presente en los extractos de *T. caracasana* se muestran en la tabla, (ver **Tabla 11**), en los cuales resalta la presencia de Ácido *O*-acetil-cutárico, kaempferol-pentósido-desoxihexosa e isómero de kaempferol-pentósido-desoxihexosa ya que estos compuestos se encuentran presentes en una gran proporción en los extractos.

Tabla 11

Cantidad de compuestos fenólicos detectados en los extractos hidroetanólicos de T. caracasana obtenidos de material vegetal fresco, seco y destilado-seco cosechado en Bucaramanga y Barbosa, Santander.

N° Fig. 14	Compuesto	Concentración, mg/g extracto (n = 3)					
		Bucaramanga			Barbosa		
		Fresco	Seco	Destilado-seco	Fresco	Seco	Destilado-seco
1	Ácido clorogénico	1,53 ± 0,09	< LOQ	0,26 ± 0,01	3,5 ± 0,1	< LOQ	0,28 ± 0,04
2	Ácido 2- <i>O-p</i> -cumaroilhidroxycítrico ^a	< LOQ	-	< LOD	< LOQ	< LOD	0,132 ± 0,005
3	<i>O</i> -Cafeoil-pentosa ^a	2,97 ± 0,04	< LOD	< LOD	1,53 ± 0,07	< LOD	0,146 ± 0,004
4	Ácido <i>O</i> -acetil-cutárico ^a	9,2 ± 0,5	0,24 ± 0,1	0,26 ± 0,01	30 ± 3	14 ± 1	42 ± 2
5	Isómero acetilado del ácido ferúlico ^a	20 ± 1	7,8 ± 0,1	13,9 ± 0,9	114 ± 1	80 ± 3	20 ± 1
6	Ácido ferúlico	0,753 ± 0,004	1,85 ± 0,03	6,5 ± 0,2	0,80 ± 0,02	2,48 ± 0,04	2,40 ± 0,02
7	Kaempferol-pentósido-desoxihexosa ^a	9,2 ± 0,2	11,3 ± 0,5	19,8 ± 0,1	26 ± 3	38 ± 1	52 ± 1
8	Kaempferol-hexósido-hexósido ^a	3,65 ± 0,05	2,88 ± 0,07	4,8 ± 0,2	9,7 ± 0,3	13 ± 1	17 ± 1
9	Isómero del ácido ferúlico ^a	0,935 ± 0,006	0,32 ± 0,01	-	1,31 ± 0,02	0,448 ± 0,003	0,317 ± 0,005
10	Kaempferol-di-hexósido ^a	0,65 ± 0,02	< LOD	< LOD	1,32 ± 0,09	1,500 ± 0,001	0,24 ± 0,01
11	Isómero de kaempferol-pentósido-desoxihexosa ^a	8,0 ± 0,1	31 ± 2	28,1 ± 0,7	25 ± 2	80 ± 4	66 ± 7
12	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido	0,65 ± 0,07	0,374 ± 0,007	0,66 ± 0,01	2,43 ± 0,09	1,59 ± 0,03	0,76 ± 0,01

13	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosido	0,36 ± 0,01	0,32 ± 0,03	0,255 ± 0,001	1,0 ± 0,1	1,14 ± 0,01	1,00 ± 0,07
14	Kaempferol-3- <i>O</i> -arabinosido	1,09 ± 0,03	< LOQ	0,41 ± 0,03	1,76 ± 0,02	1,0 ± 0,4	1,76 ± 0,02
15	Kaempferol	0,63 ± 0,01	< LOQ	0,21 ± 0,01	0,92 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Total, mg/g extracto		59 ± 5	56 ± 9	75 ± 9	220 ± 30	233 ± 30	203 ± 23

Nota. ^a Cuantificación en equivalentes de mirisctina. LOD, compuesto detectado a una concentración menor que el límite de detección,

LOQ, compuesto detectado a una concentración menor que el límite de cuantificación.

En los extractos del material cultivado en Barbosa, el isómero acetilado del ácido fertárico fue identificado como el compuesto mayoritario en los extractos frescos y secos, con una concentración de 114 mg/g y 80 mg/g, respectivamente. Sin embargo, la cantidad de este compuesto se redujo significativamente a 20 mg/g al someter el material al proceso de destilación. Es importante destacar que, a pesar de que este isómero está presente en gran cantidad, su concentración disminuye considerablemente con la destilación.

En el extracto fresco de Bucaramanga, se identificaron varios compuestos, incluyendo el ácido *O*-acetil-cutárico (9,2 mg/g), el isómero acetilado del ácido fertárico (20 mg/g), el kaempferol-pentósido-desoxihexosa (9,2 mg/g) y el isómero de kaempferol-pentósido-desoxihexosa (8 mg/g). Sin embargo, en el extracto fresco de Barbosa, las cantidades de estos compuestos aumentaron aproximadamente 3 veces en comparación con los de Bucaramanga. Es importante destacar el aumento significativo del isómero acetilado del ácido fertárico en Barbosa, el cual se encontró a una concentración 5 veces mayor (114 mg/g) que en Bucaramanga.

Los resultados indican que la concentración de compuestos identificados fue mayor en los extractos obtenidos del material vegetal en Barbosa, la mayoría de estos compuestos son de tipo fenólicos, lo cual coincide con estudios anteriores realizados por (Gong *et al.*,2012) en donde se resalta la presencia de ácido gálico, galicina, quercetina, hidroxicanferol, quercetegatina en la especie *T. erecta*.

5.7 Actividad antioxidante

En la **Tabla 12**, se presentan los resultados de la actividad antioxidante, medida por los métodos ABTS⁺ y ORAC de los extractos hidroetanólicos y AE de *T. caracasana* obtenidos a partir del material vegetal en diferente estado (fresco, seco y destilado-seco).

Tabla 12

Actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos y AE obtenidos de material vegetal de T. caracasana.

Zona	Estado	$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto seco}$ ($n = 3$)*			
		ABTS ⁺	\pm S	ORAC	\pm S
<i>Aceites esenciales</i>					
Barbosa	Fresco	124	\pm 8	1120	\pm 53
Barbosa	Seco	83	\pm 5	1060	\pm 46
Bucaramanga	Fresco	140	\pm 11	1451	\pm 140
Bucaramanga	Seco	112	\pm 2	1210	\pm 61
<i>Extractos hidroalcohólicos</i>					
Barbosa	Fresco	106	\pm 3	1600	\pm 2
Barbosa	Seco	113	\pm 4	1190	\pm 99
Barbosa	Destilado-seco	166	\pm 1	2203	\pm 6
Bucaramanga	Fresco	160	\pm 2	1940	\pm 52
Bucaramanga	Seco	120	\pm 3	1300	\pm 180
Bucaramanga	Destilado-seco	206	\pm 2	2530	\pm 4

La actividad antioxidante, en los aceites que provienen del material fresco, presentan una mayor actividad antioxidante, esta diferencia se hace más notoria en el aceite obtenido del material vegetal procedente de Barbosa.

Los extractos obtenidos a partir del material destilado, presentan una mayor actividad antioxidante para ambas técnicas ABTS⁺ y ORAC, lo que permite pensar que el proceso preliminar de destilar el material, contribuye a rupturas en la matriz que extraen los compuestos fenólicos responsables del aumento en la inhibición.

6. Conclusiones

Tanto el proceso de secado como el origen del material vegetal destilado tuvieron un efecto sobre los rendimientos de destilación, siendo mayores para el material vegetal destilado fresco. Por otra parte, sin bien el origen del material vegetal no produjo variaciones significativas en el perfil químico de los aceites, el proceso de secado incidió significativamente en la proporción de los metabolitos que componen los aceites esenciales; durante el proceso de secado la proporción de compuestos como la (*E*) y (*Z*)-tagetona disminuyó.

El material vegetal de la especie *Tagetes caracasana* ofrece un mayor rendimiento al ser utilizado en estado fresco para la obtención de aceites esenciales y extractos, sin embargo, para aprovechar integralmente el material vegetal, se recomienda usar el material vegetal destilado-seco, para la obtención de extractos, ya que el contenido de compuestos fenólicos en la matriz representa, aproximadamente, el 20% del material vegetal residual.

El proceso de destilación en el material vegetal, contribuye a mejorar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos, lo cual indica que destilar el material y luego realizar la extracción favorece la obtención de compuestos químicos responsables de la actividad antioxidante.

El proceso de secar el material vegetal, no representa un beneficio, ya que muchos de los compuestos químicos se volatilizan con gran facilidad, generando así, pérdidas en su rendimiento, cambios en la composición química y variaciones en la actividad antioxidante evaluada por ensayos *in vitro*.

Bibliografía

- Ahuja, S. *Chromatography and separation science*. EE. UU. Academic press, **2003** 4, 142.
- Armas, K.; Rojas, J.; Rojas, L.; y Morales, A. Comparative study of the chemical composition of essential oils of five *Tagetes* species collected in Venezuela. *Natural Products Communications*, **2012**. 7(9), 1225–1226.
- Babushok, V. I., Linstrom, P. J., & Zenkevich, I. G. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference* **2011**. 40(4), 043101.
- Bhagya, N.; y Chandrashekar, K. R. Identification and quantification of cytotoxic phenolic acids and flavonoids in *Ixora brachiata* by UHPLC-DAD and UHPLC-ESI-MS/MS. *International Journal of Mass Spectrometry*. **2020**. 450, 116290.
- Bisby, R. H.; Brooke, R.; y Navaratnam, S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry*. **2008**. 108(3), 1002-1007.
- Borrás I.; Fernández S.; Arráez D.; Palmeros A.; Del Val-Díaz, R., Andrade I.; Segura A. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*. **2015**. 69, 385-394.
- Córdoba, Y.; Stashenko, E. E.; Martínez, J. R. Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos y aceites esenciales de seis especies de *Lippia* spp. (Familia Verbenácea), por diferentes métodos (ABTS⁺, ORAC y monitoreo de peroxidación lipídica). Trabajo de

- investigación maestría de Química. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2014**.
- Croteau, R., Kutchan, T., & Lewis, N. Natural products (secondary metabolites). En Carpita, N., McCann, M., & Buchanan, B (Eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Primera Edición. *American Society of Plant Physiologists*, **2000**, 1250–1319).
- Dewick, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Tercera Edición, John Wiley & Sons, United Kingdom. **2002** 7-11
- Dudareva, N.; Klempien, A.; Muhlemann, J.; y Kaplan, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*. **2013**. 198 16-32.
- Erkan, N.; Ayrançi, G.; y Ayrançi, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food chemistry*, **2008**. 110(1), 76-82.
- García, A.; y Carril, E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*. **2011**. 2(3).
- Gil, A; Ghersa, C.; Perelman, S. Root thiophenes in *Tagetes minuta* L. accessions from Argentina: genetic and environmental contribution to changes in concentration and composition. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2002**. 30, 1, 1-13.
- Golmakani, M.-T.; y Rezaei, K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*. **2008**. 109(4), 925-930.
- Gong, Y.; Liu, X.; He, W.; Xu, H.; Yuan, F.; y Gao Y. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. *Fitoterapia*, **2012**. 83, 481-489.

- Herrera-Moreno, A. M.; Carranza, C. E.; Chacón-Sánchez, M. I. Establishment of propagation methods for growing promising aromatic plant species of the *Lippia* (Verbenaceae) and *Tagetes* (Asteraceae) genera in Colombia *Agronomia Colombiana*, **2013**. 31(1), 27–37.
- Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; y Deemer, E. K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2002**. 50(7), 1815- 821.
- Huang, D.; Ou, B.; y Prior, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2005**. 53(6), 1841-1856.
- Jacobs, J. J.; Engelberts, A.; Croes, A. F.; y Wullems, G. J. Thiophene synthesis and distribution in young developing plants of *Tagetes patula* and *Tagetes erecta*. *Journal of experimental botany*, **1994**. 45(10), 1459-1466.
- Karwani, G; Sisodia, S. *Tagetes erecta* plant: Review with significant pharmacological activities. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2015**, 1180-1183.
- Kohen, R.; y Nyska, A. Oxidation of biological system: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for the quantification. *Toxicology pathology*. **2002**. 30(6),620-650.
- Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry*. **2000**. 72(6), 1156-1162.
- Merken, H. M.; y Beecher, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2000**. 48(3), 577-599.

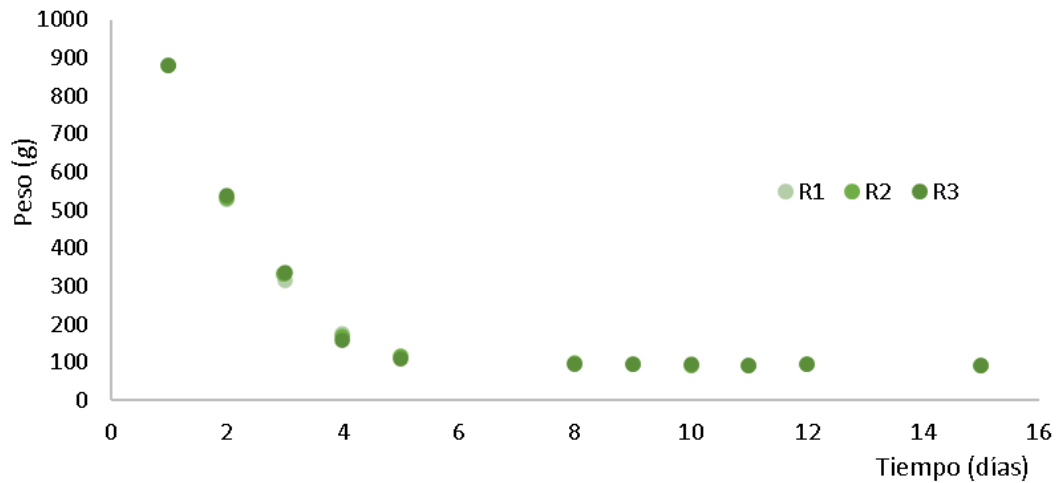
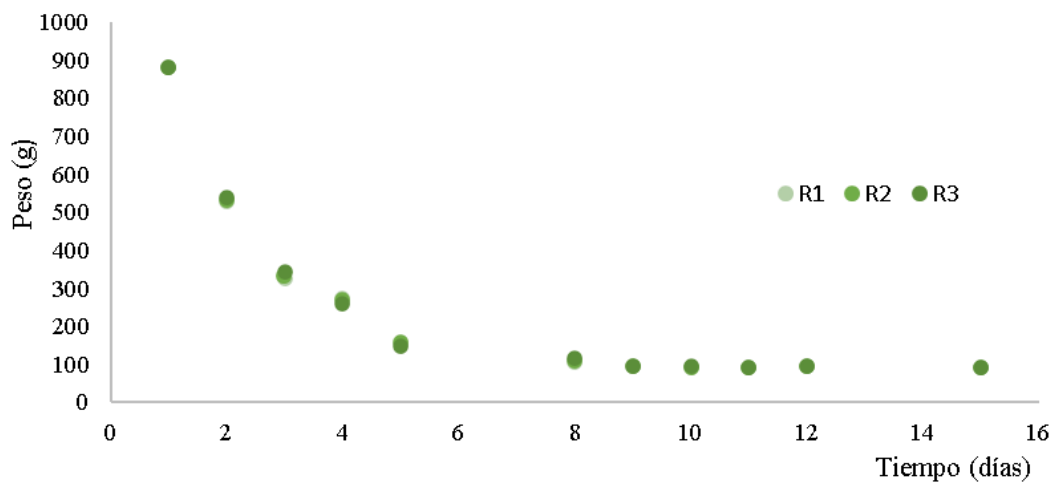
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; y Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, **1993**. 84(4), 407-412.
- Mora Martínez, A.; y Stashenko, E. E. Composición química del aceite de *Cymbopogon citratus* en función del método de extracción, época de cosecha y tiempo de secado de la planta. Trabajo de investigación maestría de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. **1997**. 4-93.
- Neher, R. T. The ethnobotany of *Tagetes*. *Economic Botany*. **1968**. 317-325.
- Pan, J.; Xia, X.-X.; y Liang, J. Analysis of pesticides multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic extraction and liquid chromatography-thandem mass spectroscopy. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2008**. 15(1), 25-32.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. **1999**. 26(9-10), 1231-1237
- Singh, P.; Krishna, A.; Kumar, V.; Krishna, S.; Singh, K.; Gupta, M., y Singh, S. Chemistry and biology of industrial crop *Tagetes* Species: A review. *Journal of Essential Oil Research*. **2016** 28(1), 1-14.
- Stashenko, E. E.; y Martínez, J. R. Aceites esenciales. División de publicaciones Universidad Industrial de Santander. **2009a**
- Stashenko, E. E.; y Martínez, J. R. Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación. *Scientia Chromatographica*, **2009b** 1(4), 19-36.

- Stashenko, E. E.; Jaramillo, B.; y Martínez, J. R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* Mill, N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*. **2004**. 1025 93-103
- Stashenko, E. E.; y Martínez, J. R. GC y GC-MS: Configuración del equipo *versus* aplicaciones. *Scientia Chromatographica*. **2010a**. 2 (3) 25-51.
- Stashenko, E. E.; Martínez, J. R.; Ruíz, C. A.; Arias, G.; Durán, C.; Salgar, W.; y Cala, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of separation science*. **2010b**. 33(1) 93-103.
- Torres, L.; Huanca, B.; y Quispe, L. Actividad insecticida del aceite esencial de Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.) sobre el gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*). *Revista de Investigaciones de la Escuela de Posgrado de la UNA PUNO*. **2021**.10(3), 186-197.
- Velandia, S. A., Flechas, M. C., Stashenko, E. E., & Ocazonez, R. E. Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de Colombia para investigación con base en su citotoxicidad. *Revista Vitae*, **2016**, 23(1), 18–29
- Vermerris, W.; y Nicholson, R. Phenolic compounds biochemistry, EE. UU: *Springer*. **2008**. Chapter 1, 3-24.
- Waksmundzka-Hajnos, M.; y Sherma, J. High performance liquid chromatography in phytochemical analysis. *Chromatographic Science Series. Academic Press*. EE. UU. **2010**. 257-350
- Wojdylo, A., Oszmianski, J.; y Czemerzys, R. Antioxidat activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry* **2007**.105(3), 940- 949.

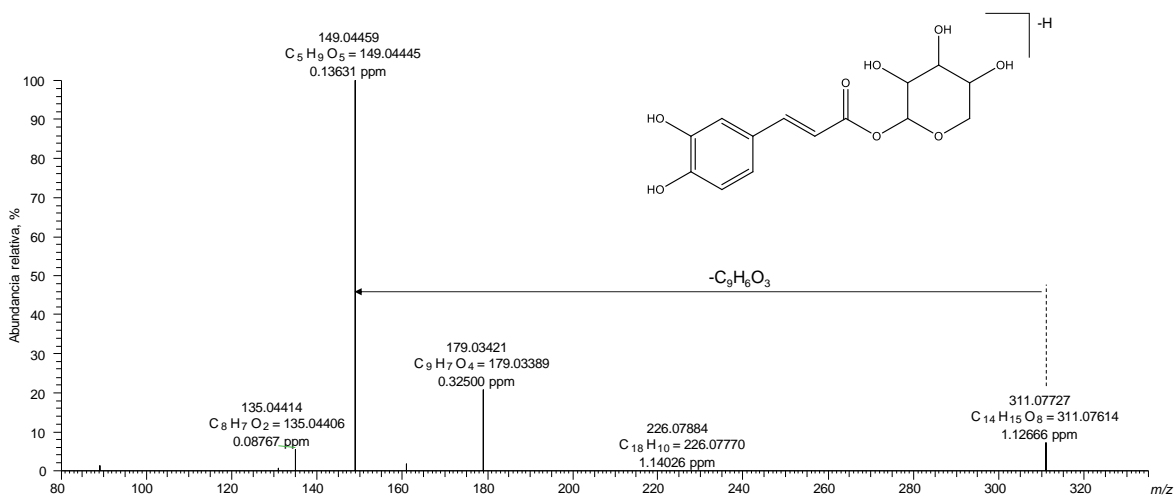
Zapata, B.; Durán, C.; Stashenko, E.; Betancur-Galvis, L.; Mesa-Arango, A. C. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología*, **2010**. 27, 2, 101–103.

Apéndices

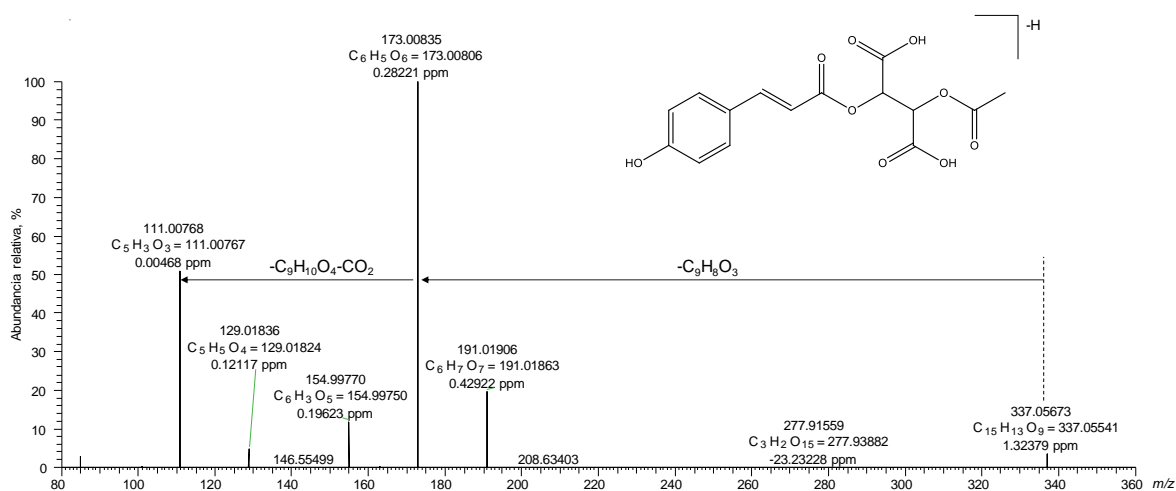
Apéndice A. Curvas de secado del material vegetal destilado

Curva de secado de *T. caracasana* después de su destilación (Barbosa)Curva de secado de *T. caracasana* después de su destilación (Bucaramanga)

Apéndice B. Espectro de masas, obtenido por UHPLC-ESI-*Orbitrap*-MS (HCD: 10 eV), del cafeoil-*O*-pentosa (m/z 311,07727) presente en los extractos de *T. caracasana*.



Apéndice C. Espectro de masas, obtenido por UHPLC-ESI-*Orbitrap*-MS (HCD: 10 eV), del ácido *O*-acetil-cutárico (m/z 337,05673) presente en los extractos de *T. caracasana*.



Apéndice D. Espectro de masas, obtenido por UHPLC-ESI-*Orbitrap*-MS (HCD: 10 eV), del isómero acetilado del ácido fertárico (m/z 367,06708) presente en los extractos de *T. caracasana*.

