

Estudio sobre la composición química de aceites esenciales y extractos de plantas endémicas de América (*Hyptis colombiana*, *Satureja viminea* y *Ambrosia cumanensis*), obtenidos en diferentes estados fenológicos, y evaluación de su actividad antioxidante

Sheila Bridget BELTRÁN PÉREZ
Química

Trabajo de investigación para optar el título de Magíster en Química

Directora:
Elena E. STASHENKO
Química, *PhD*.
Codirectores:
Jairo René MARTÍNEZ MORALES
Químico, *PhD*.
Lady Johanna SIERRA PRADA
Química, *PhD*.

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Bucaramanga
2023

Agradecimientos

A mi familia por apoyarme, alentarme y acompañarme en cada etapa de mi vida, en especial a mis padres, por ser mi motor e impulso.

A los profesores Elena STASHENKO y Jairo René MARTÍNEZ por sus enseñanzas y acompañamiento, durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A Lady SIERRA por sus sugerencias, comentarios y el apoyo brindado, al igual que, a mis compañeros y amigos del CENIVAM, entre ellas, Katherine Romero, Silvia Porras y Darlyng Poveda, por los momentos compartidos.

Al Fondo para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación - FCTel del Sistema General de Regalías – SGR [BPIN-2018000100044], al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico-Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. También, a la VIE por financiar el proyecto “La constelación biodiversa: confluencia de saberes en el Jardín Botánico Experimental” Consentido (N° 3736, VIE-UIS),

Tabla de contenido

	pág
RESUMEN	25
INTRODUCCIÓN.....	27
2. ESTADO DEL ARTE	31
2.1 <i>Hyptis colombiana</i>	31
2.2 <i>Satureja viminea</i>	34
2.3 <i>Ambrosia cumanensis</i>	39
2.4 Antioxidantes.....	41
2.5 Antioxidantes en plantas	43
2.6 Métodos para evaluar la actividad antioxidante	45
2.7 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	46
2.8 Evaluación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (método ORAC).....	48
2.9 Estado fenológico de las plantas.....	49
3. OBJETIVOS	53
4. METODOLOGÍA.....	54
4.1 Reactivos	55
4.2 Identificación taxonómica.....	55
4.3 Permiso de colecta.....	56

4.4 Recolección del material vegetal.....	56
4.5 Muestreo de las plantas.....	56
4.6 Destilación de aceites esenciales por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.....	57
4.7 Secado del material vegetal.....	57
4.8 Obtención de extractos vegetales.....	58
4.9 Análisis cromatográfico.....	58
4.9.1 Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases.....	58
4.9.2 Análisis de extractos vegetales por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	63
4.10 Evaluación de la actividad antioxidante.....	65
4.10.1 Evaluación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno ORAC.....	65
4.10.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	66
4.10.3 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺ , por <i>on-line</i> HPLC/ABTS ⁺	67
4.11 Análisis de datos.....	69
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
5.1 Identificación taxonómica.....	70
5.2 Cultivos experimentales de las plantas.....	70
5.3 Rendimientos de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos.....	74
5.4 Composiciones químicas de los aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos.....	77

5.4.1 Estudio de <i>Satureja viminea</i>	77
5.4.2 Estudio de <i>Hyptis colombiana</i>	98
5.4.3 Estudio de <i>Ambrosia cumanensis</i>	117
5.5 Actividad antioxidante de los aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos estudiados ...	137
6. CONCLUSIONES.....	158
7. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	161
REFERENCIAS	164

ANEXOS: “Los anexos están adjuntos y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS”.

Lista de tablas

Tabla 1. Propiedades biológicas de los aceites esenciales y extractos del género <i>Satureja</i> spp..	38
Tabla 2. Identificaciones taxonómicas de las plantas de <i>S. viminea</i> , <i>H. colombiana</i> y <i>A. cumanensis</i>	70
Tabla 3. Fechas de colecta de las plantas de <i>S. viminea</i> , <i>H. colombiana</i> y <i>A. cumanensis</i> , recolectados en los estados vegetativo, floración y post-floración.	73
Tabla 4. Rendimientos (%) de los aceites esenciales, de plantas de <i>S. viminea</i> , <i>H. colombiana</i> y <i>A. cumanensis</i> , recolectadas en sus diferentes estados fenológicos.....	74
Tabla 5. Rendimientos (%) de los extractos hidroetanólicos de <i>S. viminea</i> , <i>H. colombiana</i> y <i>A. cumanensis</i> , obtenidos antes y después de su destilación.	75
Tabla 6. Composición química, determinada por GC/MS/FID, de los aceites esenciales destilados por MWHD de plantas de <i>S. viminea</i> , cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico.	79
Tabla 7. Cuantificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales, destilados por MWHD, de plantas de <i>S. viminea</i> cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico.	81
Tabla 8. Masas exactas de moléculas deprotonadas $[M-H]^-$ y protonadas $[M+H]^+$, identificadas por UHPLC-ESI [±] -Orbitrap-MS de sustancias presentes, en los extractos hidroetanólicos, obtenidos a partir de material vegetal de <i>S. viminea</i> cosechado en los diferentes estados fenológicos.....	89
Tabla 9. Cuantificación de algunos compuestos presentes en los extractos de plantas de <i>S. viminea</i> , obtenidos antes y después de la destilación, de las plantas cosechadas, hasta cuatro veces, en cada estado fenológico.....	92

- Tabla 10.** Composición química, determinada por GC/MS/FID, de los aceites esenciales destilados por MWHD de plantas de *H. colombiana*, cosechadas, hasta tres veces, en diferentes estados fenológicos..... 100
- Tabla 11.** Cuantificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales, destilados por MWHD, de plantas de *H. colombiana* cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico. 102
- Tabla 12.** Masas exactas de moléculas deprotonadas $[M-H]^-$ y protonadas $[M+H]^+$, identificadas por UHPLC-ESI^{+/-}-Orbitrap-MS de las sustancias presentes, en los extractos hidroetanólicos, obtenidos a partir de *H. colombiana* cosechadas en los diferentes estados fenológicos. 109
- Tabla 13.** Cuantificación de algunos compuestos presentes en los extractos de *H. colombiana*, obtenidos antes y después de la destilación de plantas, cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico..... 112
- Tabla 14.** Composición química, determinada por GC/MS/FID, de los AE destilados por MWHD de plantas de *A. cumanensis* cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico..... 119
- Tabla 15.** Cuantificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales, destilados por MWHD, de plantas de *A. cumanensis* cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico. 121
- Tabla 16.** Masas exactas de moléculas deprotonadas $[M-H]^-$ y protonadas $[M+H]^+$, identificadas por UHPLC-ESI^{+/-}-Orbitrap-MS de sustancias presentes, en los extractos hidroetanólicos, obtenidos a partir de plantas de *A. cumanensis*, cosechadas en los diferentes estados fenológicos. 127
- Tabla 17.** Cuantificación de algunos compuestos presentes en los extractos de *A. cumanensis*, antes y después de la destilación, cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico. 133

Tabla 18. Actividad antioxidante, evaluada por los ensayos ORAC, ABTS⁺ y *on-line* HPLC-ABTS⁺ de los aceites esenciales y extractos hidroetanólicos de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis*, antes y después de su destilación. 138

Lista de figuras

Figura 1. Plantas de <i>Hyptis colombiana</i> en sus diferentes estados fenológicos. A. Vegetativo (28-06-2022). B. Floración (24-11-2022). C. Post-floración (12-01-2023). Fotografías tomadas por Sheila Bridget BELTRÁN PÉREZ. Lugar: jardín experimental CENIVAM-UIS, Bucaramanga.	31
Figura 2. Plantas de <i>Satureja viminea</i> en sus diferentes estados fenológicos. A. Vegetativo (27-07-2022). B. Floración (24-10-2022). C. Post-floración (25-1-2023). Fotografías tomadas por Sheila Bridget BELTRÁN PÉREZ. Lugar: jardín experimental de CENIVAM-UIS, Bucaramanga.	35
Figura 3. Plantas de <i>Ambrosia cumanensis</i> en sus diferentes estados fenológicos. A. Vegetativo (18-01-2022). B. Floración (16-05-2022). C. Post-floración (26-08-2022). Fotografías tomadas por Sheila Bridget BELTRÁN PÉREZ. Lugar: jardín experimental del CENIVAM-UIS, Bucaramanga.	39
Figura 4. Clasificación de algunos compuestos fenólicos y ejemplos de su estructura química. Información tomada de Beconcini <i>et al.</i> (85).	44
Figura 5. Formación del catión-radical ABTS ^{•+} . Información tomada, con modificaciones, de Ilyasov <i>et al.</i> (92).	46
Figura 6. Curva de disminución de la fluorescencia obtenida en el ensayo ORAC.	49
Figura 7. Esquema general del desarrollo experimental, del presente estudio.	54
Figura 8. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los aceites esenciales de <i>S. viminea</i> , destilados de plantas recolectadas en los tres estados fenológicos: A. Vegetativo; B. Floración; C. Post-floración. Columna DB-5MS (60 m), <i>split</i> 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos cromatográficos en la Tabla 6	78

- Figura 9.** Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los aceites esenciales de *S. viminea* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*). 84
- Figura 10.** Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ o deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-MS (escala 1.03×10^8), de compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos de *S. viminea*, aislados del material vegetal antes de su destilación, de plantas recolectadas en diferentes estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Véase la identificación de compuestos en la **Tabla 8**. 88
- Figura 11.** Espectros de masas del ácido rosmarínico. **A.** En el extracto hidroalcohólico de *S. viminea*. **B.** De la sustancia-patrón adquirida de *Sigma-Aldrich* (St. Louise, MO, EE. UU.). Espectro de masas de la molécula deprotonada $[M-H]^-$ en *m/z* 359.07629, registrado por LC/MS operado en modo de iones seleccionados (SIM) y HCD 10 eV..... 91
- Figura 12.** Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los extractos hidroalcohólicos de *S. viminea* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*). 96
- Figura 13.** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los aceites esenciales de *H. colombiana*, destilados de plantas recolectadas en los tres estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos cromatográficos en la **Tabla 10**. 99
- Figura 14.** Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los aceites esenciales de *H. colombiana* colectados en los estados fenológicos,

vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*). 104

Figura 15. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ o deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-MS (escala 6.2×10^7) de compuestos en los extractos hidroalcohólicos de *H. colombiana*, aislados antes de su destilación, de plantas recolectadas en diferentes estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Véase la identificación de compuestos en la **Tabla 12**. 108

Figura 16. Espectro de masas de la molécula protonada $[M+H]^+$, en m/z 427.16000, de la piranona, registrada por LC/MS, obtenido en el modo SIM y HCD 10 eV. 111

Figura 17. Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los extractos hidroalcohólicos de *H. colombiana* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*). 115

Figura 18. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los aceites esenciales de *A. cumanensis*, destilados de plantas recolectadas en los tres estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos cromatográficos en la **Tabla 14**. 118

Figura 19. Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los aceites esenciales de *A. cumanensis* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*). 123

Figura 20. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ o deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-MS (escala 1.8×10^8) de compuestos en los

extractos hidroalcohólicos de *A. cumanensis*, aislados antes de su destilación, de plantas recolectadas en diferentes estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración.

Véase la identificación de compuestos en la **Tabla 16**. 126

Figura 21. Espectros de masas de los compuestos con m/z 246 obtenidos por GC/MS. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30. **A.** Compuesto detectado en el extracto hidroetanólico de obtenido de plantas de *A. cumanensis*. **B.** Ambrosina reportada en la base de datos NIST (2017). 131

Figura 22. Espectro de masas del isómero de ambrosina (pico N° 23, **Figura 20**) en el extracto hidroetanólico de *A. cumanensis*. Modo de adquisición-SIM, HCD 30 eV. 132

Figura 23. Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los extractos hidroalcohólicos de *A. cumanensis* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*). 136

Figura 24. Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los aceites esenciales de *S. viminea* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*). 140

Figura 25. Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *S. viminea* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*)..... 142

Figura 26. Perfiles cromatográficos obtenidos por *on-line* HPLC-ABTS⁺⁺ de los extractos hidroetanólicos de plantas de *S. viminea* cosechadas en el estado vegetativo. **A.** A partir del material vegetal sin destilar; **B.** A partir del material vegetal destilado, antes (DAD, $\lambda=290$ nm, línea azul) y después (MWD, $\lambda=734$ nm, línea roja) de la reacción con el catión-radical ABTS⁺⁺. La identificación de los picos se presenta en la **Tabla A3 (Anexo)**. 144

Figura 27. Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los aceites esenciales de *H. colombiana* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*)..... 146

Figura 28. Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *H. colombiana* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*)..... 149

Figura 29. Perfiles cromatográficos obtenidos por *on-line* HPLC-ABTS⁺⁺ de los extractos hidroetanólicos de plantas de *H. colombiana*, recolectadas en el estado de floración. **A.** A partir del material vegetal sin destilar; **B.** A partir del material vegetal destilado, antes (DAD, $\lambda=290$ nm, línea azul) y después (MWD, $\lambda=734$ nm, línea roja) de la reacción con el catión-radical ABTS⁺⁺. La identificación de los picos se presenta en la **Tabla A4 (Anexo)**. 150

Figura 30. Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los aceites esenciales de *A. cumanensis* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en

cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*)..... 152

Figura 31. Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *A. cumanensis* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (*loading plot*), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (*score plot*)..... 154

Figura 32. Perfiles cromatográficos obtenidos por *on-line* HPLC-ABTS⁺⁺ de los extractos hidroetanólicos de plantas de *A. cumanensis*, recolectadas en el estado de floración. **A.** A partir del material vegetal sin destilar; **B.** A partir del material vegetal destilado, antes (DAD, $\lambda=290$ nm, línea azul) y después (MWD, $\lambda=734$ nm, línea roja) de la reacción con el catión-radical ABTS⁺. La identificación de los picos se presenta en la **Tabla A5 (Anexo)**..... 155

Lista de anexos

“Los anexos están adjuntos y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS”.

Figura A1. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de las sustancias-patrón, usadas para la cuantificación de los aceites esenciales. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

Véase **Tabla A1**.

Figura A2. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ o deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-MS (escala 1.2×10^7), de sustancias-patrón usadas para la cuantificación de los extractos hidroalcohólicos, aislados del material vegetal antes y después de la destilación. Véase **Tabla A1**.

Figura A3. Espectro de masas del monoterpeneo oxigenado $C_{10}H_{18}O$, pico N° 10 (**Figura 8**), LRI_{apolar}: 1176 LRI_{polar}: 1576 (**Tabla 6**) $[M^{++}] m/z$ 154 (18%); $[M-CH_3]^+ m/z$ 139 (40%); $[M-H_2O]^+ m/z$ 136 (36%); $[M-H_2O-CH_3]^+ m/z$ 121 (100%); $[M-H_2O-C_3H_5]^+ m/z$ 95 (80%); $[M-CH_3-C_2H_4]^+ m/z$ 111 (58%).

Figura A4. Espectro de masas del sesquiterpeneo $C_{15}H_{24}$ pico N° 19 (**Figura 8**), LRI_{apolar}: 1472 LRI_{polar}: 1536 (**Tabla 6**) $[M^+] m/z$ 204 (55%); $[M-CH_3]^+ m/z$ 189 (38%); $[M-C_2H_5]^+ m/z$ 175 (9%); $[M-C_3H_7]^+ m/z$ 161 (100%); $[M-C_3H_7-C_2H_4]^+ m/z$ 133 (70%).

Figura A5. Espectro de masas del sesquiterpeneo oxigenado $C_{15}H_{24}O$, pico N° 24 (**Figura 8**), LRI_{apolar}: 1588 LRI_{polar}: 2125 (**Tabla 6**) $[M^{++}] m/z$ 220 (6%); $[M-CH_3]^+ m/z$ 205 (100%); $[M-H_2O]^+ m/z$ 202 (23%); $[M-CH_3-H_2O]^+ m/z$ 187 (35%); $[M-CH_3-H_2O-C_2H_4]^+ m/z$ 159 (56%).

Figura A6. Espectro de masas del compuesto no identificado, pico N° 26 (**Figura 8**), LRI_{apolar}: 1812 LRI_{polar}: 1935 (**Tabla 6**) [M⁺] *m/z* 232 (3%); [M-CH₃]⁺ *m/z* 217 (3%).

Figura A7. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas [M+H]⁺ o deprotonadas [M-H]⁻, obtenidas por UHPLC-ESI^{+/-}-Orbitrap-MS (escala 1.03 x 10⁸), de compuestos en los extractos hidroalcohólicos de *S. viminea*, aislados del material vegetal después de la destilación, de plantas, recolectadas en diferentes estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Véase la identificación de compuestos en la **Tabla 8**.

Figura A8. Espectro de masas del compuesto no identificado (pico N° 11, **Figuras 10 y A5, Tabla 8**) en el extracto hidroetanólico de *S. viminea*, la molécula protonada [M+H]⁺ *m/z* 333.09662; modo de adquisición-SIM, HCD 10 eV.

Figura A9. Espectro de masas del compuesto no identificado (pico N° 13, **Figuras 10 y A5, Tabla 8**) en el extracto hidroetanólico de *S. viminea*, la molécula protonada [M+H]⁺ *m/z* 333.09650; modo de adquisición-SIM, HCD 10 eV.

Figura A10. Espectro de masas del sesquiterpeno C₁₅H₂₄, pico N° 19 (**Figura 13**), LRI_{apolar}: 1416 LRI_{polar}: 1536 (**Tabla 10**), [M⁺] *m/z* 204 (100%); [M-CH₃]⁺ *m/z* 189 (68%); [M-C₂H₅]⁺ *m/z* 175 (12%); [M-C₃H₇]⁺ *m/z* 161 (28%).

Figura A11. Espectro de masas del sesquiterpeno C₁₅H₂₄, pico N° 23 (**Figura 13**), LRI_{apolar}: 1459 LRI_{polar}: 1630 (**Tabla 10**) [M⁺] *m/z* 204 (60%); [M-CH₃]⁺ *m/z* 189 (35%); [M-C₂H₅]⁺ *m/z* 175 (5%); [M-C₃H₇]⁺ *m/z* 161 (100%), C₃H₅⁺ *m/z* 41 (23%).

Figura A12. Espectro de masas del sesquiterpeno oxigenado C₁₅H₂₄O, pico N° 31 (**Figura 13**), LRI_{apolar}: 1566 LRI_{polar}: 1979 (**Tabla 10**) [M⁺] *m/z* 220 (2%); [M-CH₃]⁺ *m/z* 205 (12%); [M-

$\text{H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ m/z 202 (7%); $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$ m/z 191 (10%), CH_3CO^+ o C_3H_7^+ m/z 43 (53%); C_3H_5^+ m/z 41 (55%).

Figura A13. Espectro de masas del sesquiterpeno oxigenado $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$, pico N° 35 (**Figura 13**), $\text{LRI}_{\text{apolar}}$: 1640 $\text{LRI}_{\text{polar}}$: 2255 (**Tabla 10**) $[\text{M}^{+\bullet}]$ m/z 220 (10%); $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ m/z 205 (25%), $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ m/z 202 (25%), $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$ m/z 187 (28%).

Figura A14. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[\text{M}+\text{H}]^+$ o deprotonadas $[\text{M}-\text{H}]^-$, obtenidas por UHPLC-ESI^{+/+}-Orbitrap-MS (escala 6.2×10^7), de compuestos en los extractos hidroalcohólicos de *H. colombiana*, aislados del material vegetal después de la destilación de plantas, recolectadas en diferentes estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Véase la identificación de compuestos en la **Tabla 12**.

Figura A15. Espectros de masas del monoterpeno oxigenado $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$, pico N° 6 (**Figura 18**), $\text{LRI}_{\text{apolar}}$: 992 $\text{LRI}_{\text{polar}}$: 1253 (**Tabla 14**), $[\text{M}^{+\bullet}]$ m/z 152 (1%); $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ m/z 137 (4%); $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{C}_2\text{H}_4]^+$ m/z 109 (3%).

Figura A16. Espectro de masas del monoterpeno oxigenado $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ pico N° 9 (**Figura 18**), $\text{LRI}_{\text{apolar}}$: 1110 $\text{LRI}_{\text{polar}}$: 1489 (**Tabla 14**), $[\text{M}^{+\bullet}]$ m/z 150 (4%); $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ m/z 135 (2%); $[\text{M}-\text{CO}]^+$ m/z 122 (24%); $[\text{M}-\text{CO}-\text{CH}_3]^+$ m/z 107 (100%); $[\text{M}-\text{CO}-\text{CH}_3\text{CO}]^+$ m/z 79 (19%).

Figura A17. Espectro de masas del monoterpeno oxigenado $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$, pico N° 10 (**Figura 18**), $\text{LRI}_{\text{apolar}}$: 1112 $\text{LRI}_{\text{polar}}$: 1503 (**Tabla 14**), $[\text{M}^{+\bullet}]$ m/z 150 (10%); $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ m/z 135 (18%); $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{C}_2\text{H}_4]^+$ m/z 107 (16%); $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}_2\text{H}_4]^+$ m/z 79 (38%).

Figura A18. Espectro de masas del monoterpeno oxigenado $C_{10}H_{16}O$, pico N° 13 (**Figura 18**), LRI_{apolar}: 1350 LRI_{polar}: 1645 (**Tabla 14**), $[M^{+}]$ m/z 152 (2%); $[M-CH_3]^+$ m/z 137 (6%), $[M-H_2O]^+$ m/z 134 (28%), $[M-CH_3-H_2O]^+$ m/z 119 (68%).

Figura A19. Espectro de masas de la co-elución de compuestos pico N° 24 (**Figura 18**), LRI_{apolar}: 1541 LRI_{polar}: 1821 (**Tabla 14**), $[M_1^{+}]$ m/z 236 (2%); $[M_2^{+}]$ m/z 220 (1%); $[M_2-CH_3]^+$ m/z 205 (5%).

Figura A20. Espectro de masas del sesquiterpeno oxigenado $C_{15}H_{26}O$, pico N° 27 (**Figura 18**), LRI_{apolar}: 1614 LRI_{polar}: 2019 (**Tabla 14**), $[M^{+}]$ m/z 222 (4%); $[M-H_2O]^+$ m/z 204 (17%); $[M-H_2O-CH_3]^+$ m/z 189 (7%); $[M-CH_3CO]^+$ m/z 179 (52%); $[M-H_2O-C_3H_7]^+$ m/z 161 (100%).

Figura A21. Espectro de masas de la co-elución entre varias sustancias, pico N° 29 (**Figura 18**), LRI_{apolar}: 1641 LRI_{polar}: 1921 (**Tabla 14**), entre ellas, $[M^{+}]$ m/z 220 (2%), $[M-H_2O]^+$ m/z 202 (2%).

Figura A22. Espectro de masas del sesquiterpeno $C_{15}H_{24}$, pico N° 30 (**Figura 18**), LRI_{apolar}: 1686 LRI_{polar}: 2233 (**Tabla 14**), $[M^{+}]$ m/z 204 (40%); $[M-CH_3]^+$ m/z 189 (15%); $[M-C_2H_4]^+$ m/z 176 (2%).

Figura A23. Espectro de masas del sesquiterpeno oxigenado $C_{15}H_{26}O$ pico N° 31 (**Figura 18**), LRI_{apolar}: 1690 LRI_{polar}: 2213 (**Tabla 14**), $[M^{+}]$ m/z 222 (4%); $[M-H_2O]^+$ m/z 204 (32%); $[M-CH_3-H_2O]^+$ m/z 189 (7%); $[M-C_3H_7-H_2O]^+$ m/z 161 (17%).

Figura A24. Espectro de masas del sesquiterpeno oxigenado $C_{15}H_{22}O$ pico N° 32 (**Figura 18**), LRI_{apolar}: 1790 LRI_{polar}: 2425 (**Tabla 14**), $[M^{+}]$ m/z 218 (1%); $[M-CH_3]^+$ m/z 203 (1%); $[M-CH_3-C_2H_4]^+$ m/z 175 (2%).

Figura A25. Espectro de masas del sesquiterpeno oxigenado $C_{15}H_{22}O$, pico N° 33 (**Figura 18**), LRI_{apolar}: 1797 LRI_{polar}: 2434 (**Tabla 14**), $[M^{+}]$ m/z 218 (1%); $[M-CH_3]^{+}$ m/z 203 (1%).

Figura A26. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^{+}$ o deprotonadas $[M-H]^{-}$, obtenidas por UHPLC-ESI^{+/−}-Orbitrap-MS (escala 1.8×10^8), de compuestos en los extractos hidroalcohólicos de *A. cumanensis*, aislados del material vegetal después de la destilación de plantas, recolectadas en diferentes estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Véase la identificación de compuestos en la **Tabla 16**.

Figura A27. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química de los aceites esenciales de *S. viminea*.

Figura A28. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química de los extractos de *S. viminea*, obtenidos antes y después de la destilación.

Figura A29. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química de los aceites esenciales de *H. colombiana*.

Figura A30. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química de los extractos de *H. colombiana*, obtenidos antes y después de la destilación.

Figura A31. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química de los aceites esenciales de *A. cumanensis*.

Figura A32. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química de los extractos de *A. cumanensis*, obtenidos antes y después de la destilación.

Figura A33. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química y actividad antioxidante de los aceites esenciales de *S. viminea*.

Figura A34. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química y actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *S. viminea*, obtenidos antes y después de la destilación.

Figura A35. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química y actividad antioxidante de los aceites esenciales de *H. colombiana*.

Figura A36. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química y actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *H. colombiana*, obtenidos antes y después de la destilación.

Figura A37. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química de los aceites esenciales y actividad antioxidante de *A. cumanensis*.

Figura A38. Análisis de conglomerados por el método de Ward sobre la composición química y actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *A. cumanensis*, obtenidos antes y después de la destilación.

Tabla A1. Repetibilidad de los tiempos de retención (t_R) y de las áreas cromatográficas de sustancias-patrón, analizadas por GC/FID y LC/MS.

Tabla A2. Linealidad y sensibilidad determinadas por GC/FID y LC/MS, para las sustancias-patrón cuantificados en los AE y extractos bajo estudio.

Tabla A3. Actividad antioxidante determinada por el método on-line HPLC-ABTS⁺ de extractos hidroetanólicos de plantas de *S. viminea*, recolectados en el estado vegetativo, antes y después de su destilación.

Tabla A4. Actividad antioxidante determinada por el método on-line HPLC-ABTS⁺ de extractos hidroetanólicos de plantas de *H. colombiana*, recolectados en el estado vegetativo, antes y después de su destilación.

Tabla A5. Actividad antioxidante determinada por el método on-line HPLC-ABTS⁺ de extractos hidroetanólicos de plantas de *A. cumanensis*, recolectados en el estado vegetativo, antes y después de su destilación.

Tabla A6. Resultados del análisis de varianza, que se realizó para evaluar cómo las diferentes etapas fenológicas de las plantas de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis* afectaron los rendimientos de los AE y extractos de material vegetal, antes y después de la destilación.

Tabla A7. Análisis estadístico mediante la prueba de Tukey, para los rendimientos de los extractos, obtenidos de plantas de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis*, recolectadas en los tres estados fenológicos, antes y después de su destilación

Tabla A8. Análisis estadístico mediante la prueba de *Tukey*, para los principales compuestos identificados de los AE de *S. viminea*.

Tabla A9. Análisis estadístico mediante la prueba de Tukey, para los principales compuestos identificados en los extractos de *S. viminea*.

Tabla A10. Análisis estadístico mediante la prueba de Tukey, para los principales compuestos identificados de los AE de *H. colombiana*.

Tabla A11. Análisis estadístico mediante la prueba de Tukey, para los principales compuestos identificados en los extractos de *H. colombiana*.

Tabla A12. Análisis estadístico mediante la prueba de Tukey, para los principales compuestos identificados de los AE de *A. cumanensis*.

Tabla A13. Análisis estadístico mediante la prueba de Tukey, para los principales compuestos identificados en los extractos de *A. cumanensis*.

Tabla A14. Resultados del análisis de varianza, que se realizó para evaluar cómo de las diferentes etapas fenológicas de las plantas de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis* depende la actividad antioxidante de AE y extractos del material vegetal, antes y después de la destilación.

Abreviaturas, siglas y acrónimos

AAPH	Azocompuesto dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
ABTS ⁺⁺	Catión-radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AD	Antes de destilación
AE	Aceite esencial o aceites esenciales
AH	Antioxidante
AUC	<i>Area under the curve</i> (Área bajo la curva)
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
DD	Después de destilación
DPPH [·]	1,1-Difenil-2-picrilhidracilo
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (Poder antioxidante de reducción férrica)
GC/FID	<i>Gas Chromatography Coupled to Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama)
GC/MS	<i>Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
LC/MS	<i>Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas)
LOD	<i>Limit of detection</i> (límite de detección)
LOQ	<i>Limit of quantification</i> (límite de cuantificación)
LRI	<i>Linear Retention Indices(s)</i> [índices de retención lineales]

ORAC	<i>Oxygen-Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)
PI	Potencial de ionización
RL	Radical(es) libre(s)
Trolox [®]	Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico

RESUMEN

Título: Estudio sobre la composición química de aceites esenciales y extractos de plantas endémicas de América (*Hyptis colombiana*, *Satureja viminea* y *Ambrosia cumanensis*), obtenidos en diferentes estados fenológicos, y evaluación de su actividad antioxidante¹

Autora: Sheila Bridget BELTRÁN PÉREZ²

Palabras clave: *S. viminea*, *H. colombiana*, *A. cumanensis*, metabolitos secundarios, estados fenológicos

Descripción: En este estudio, se recolectaron durante 2021-2023 las plantas promisorias nativas de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis*, en tres estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. El objetivo del estudio fue determinar la composición química y la actividad antioxidante de los AE y extractos vegetales y encontrar el estado vegetativo que proporcione las menores variaciones en su composición química y en la actividad antioxidante. Los AE se obtuvieron por hidrodestilación asistida por radiación de microondas y los extractos, a partir de material vegetal, antes y después de su destilación, por extracción con solvente asistida con ultrasonido. La caracterización química de los AE se realizó por GC/MS y GC/FID. Los extractos obtenidos con solvente se analizaron por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS. La actividad antioxidante se determinó por los ensayos de ORAC, ABTS^{••} y *on-line* HPLC-ABTS^{••}.

En los AE de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis*, se encontraron principalmente *p*-menta-3-en-8-ol, pulegona, (*E*)- β -cariofileno y su óxido, γ -curcumeno y α -curcumeno. En los extractos hidroalcohólicos se identificaron ácidos hidroxicinámicos, flavonas glicosiladas, flavonoles, lactonas sesquiterpénicas y una piranona. Los AE y los extractos de las plantas de *S. viminea* e *H. colombiana* (fam Lamiaceae) por su rendimiento alto, composiciones químicas (contienen ácido rosmarínico) y valores de actividad antioxidante relativamente alta, podrían incorporarse a la cadena productiva de ingredientes naturales de los sectores cosmético y farmacéutico. Los extractos obtenidos del material vegetal destilado (biomasa residual) tienen compuestos fenólicos de interés, por tanto, la biomasa residual podría usarse para obtener un compuesto de interés biológico que puedan ser usados en distintos productos finales. Se recomienda cosechar *S. viminea* e *H. colombiana* en los estados vegetativo y floración, porque sus AE y extractos vegetales tienen las variaciones más bajas en composición química y actividad antioxidante.

De una hectárea de cultivo de *S. viminea* o *H. colombiana* se podría obtener 20-40 kg/(ha año) del ácido rosmarínico.

¹ Trabajo de investigación. ² Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko, Química, *Ph.D.* Codirectores: Jairo René Martínez Morales, Químico, *Ph.D.*; Lady Johanna Sierra Prada, Química, *Ph.D.*

ABSTRACT

Title: Study on the chemical composition of essential oils and extracts from endemic plants of America (*Hyptis colombiana*, *Satureja viminea* and *Ambrosia cumanensis*), obtained in different phenological stages, and evaluation of their antioxidant activity¹.

Author: Sheila Bridget BELTRÁN PÉREZ²

Keywords: *S. viminea*, *H. colombiana*, *A. cumanensis*, secondary metabolites, phenological stages.

Description: In the study, we collected promising native plants of *S. viminea*, *H. colombiana* and *A. cumanensis* during the years 2021 to 2023. These plants were collected at three different phenological stages: vegetative, flowering and post-flowering. The main objective of this study was to determine the chemical composition and antioxidant activity of EOs (essential oils) and plant extracts. Additionally, we aimed to identify the vegetative state that provides the least variations in their chemical composition and antioxidant activity. For this study, the EOs (essential oils) were obtained through hydrodistillation assisted by microwave radiation. On the other hand, the extracts were obtained from plant material both before and after distillation, through solvent extraction assisted with ultrasound. The chemical characterization of the EOs was carried out using two different methods: GC/MS and GC/FID. The extracts that were obtained with solvent were analyzed using UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS. Antioxidant activity was determined using ORAC, ABTS+• and online HPLC-ABTS+• assays.

In the EOs of *S. viminea*, *H. colombiana* and *A. cumanensis*, *p*-menth-3-en-8-ol, pulegone, (*E*)- β -caryophyllene and its oxide, γ -curcumene and *ar*-curcumene were mainly found. The hydroalcoholic extracts were found to contain hydroxycinnamic acids, glycosylated flavones, flavonols, sesquiterpene lactones and a pyranone. The EOs and plant extracts of *S. viminea* and *H. colombiana* (fam Lamiaceae) have shown high yield, chemical compositions (they contain rosmarinic acid) and relatively high antioxidant activity values. Based on these findings, these extracts could be incorporated into the production chain of natural ingredients used in the cosmetic and pharmaceutical sectors. The extracts obtained from distilled plant material (residual biomass) have phenolic compounds of interest, therefore, the residual biomass could be used to obtain a compound of biological interest that can be used in different final products. Harvesting *S. viminea* and *H. colombiana* in the vegetative and flowering stages is recommended, as their essential oils and plant extracts exhibit the lowest variations in chemical composition and antioxidant activity during these stages.

It is possible to obtain 20-40 kg/(ha year) of rosmarinic acid from one hectare of *S. viminea* or *H. colombiana* cultivation.

¹ Research Work. ²Science Faculty. School of Chemistry. Director: Elena E. Stashenko, Chemist, *Ph.D.* Co-directors: Jairo René Martínez Morales, Chemist, *Ph.D.*; Lady Johanna Sierra Prada, Chemist, *Ph.D.*

INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas se han estudiado gracias a sus propiedades curativas. Durante los últimos años se ha incrementado el consumo de productos naturales, lo que ha generado un aumento en la demanda de aceites esenciales (AE) y extractos vegetales (1-3). La destilación de plantas aromáticas y medicinales produce el AE, hidrolato y biomasa residual. Por cada kg de AE se producen *ca.* 100 kg de residuos vegetales (4). El material vegetal, después de su destilación, se usa para alimentación animal (5), compostaje (6,7) o biocombustible (8), sin embargo, aún este material vegetal puede contener compuestos fenólicos útiles por sus propiedades antioxidantes (9) y antimicrobianas (10).

En el 2022, el mercado de los AE se valoró en 8.8 billones de dólares con las participaciones más altas en los sectores de alimentos, medicina, limpieza del hogar y en aromaterapia (11). En Colombia la importación de AE (15.11 millones USD, 2022) como insumos para las industrias es mucho más alta que la producción nacional de AE (0.61 millones de USD, 2022) (12). Colombia podría fortalecer la agroindustria de AE mediante el desarrollo de proyectos de investigación cuyos resultados permitan ampliar las bases de conocimiento para la cadena productiva de AE de especies comerciales, así como las plantas promisorias, *e.g.*, *H. colombiana*, *S. viminea* y *A. cumanensis*, que se encuentran bajo estudio en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM.

Las plantas comerciales más cultivadas en el mundo, debido a las aplicaciones industriales de sus AE y extractos vegetales, son *Cymbopogon martinii* (13), *Pelargonium graveolens* (14), *Salvia rosmarinus* (15), *Citrus sinensis* (16), *Lavandula x intermedia* (17) y

Cananga odorata (18), entre otras. En Indonesia, Malasia y Filipinas se encuentran los cultivos organizados del árbol de *Cananga odorata* (ylang-ylang), cuyo AE de mayor calidad y rendimiento se obtiene a partir de las flores maduras, cuando éstas tienen color amarillo. Las flores de ylang-ylang se cosechan al final de la etapa de floración y el AE destilado de flores maduras se usa mucho en la industria de la perfumería, productos de aseo y la aromaterapia (19,20). En la agroindustria de AE y sus derivados naturales es importante determinar las variables agronómicas que permitan maximizar la producción de biomasa vegetal, la cual debe ser cosechada y estudiada en diferentes estados fenológicos con el propósito de garantizar la menor variación en la composición química, propiedades fisicoquímicas y biológicas de los AE comerciales (21).

Las plantas promisorias de los géneros *Hyptis* (familia Lamiaceae), *Satureja* (familia Lamiaceae) y *Ambrosia* (familia Asteraceae), son endémicas de América y se encuentran distribuidas principalmente en áreas tropicales (22-24). En Colombia, el género *Hyptis* es el segundo más diverso del país, seguido del de la *Salvia*; cuenta con 42 taxones, ubicados en la Orinoquía (25). En la medicina tradicional las plantas del género *Hyptis* se usan para el tratamiento de la influenza, el estreñimiento, enfermedades respiratorias, trastornos estomacales e intestinales y como bactericida, también, presentan actividades antimicrobiana y antioxidante (26). Los metabolitos secundarios detectados con frecuencia en los AE y extractos de plantas de *Hyptis* spp., *Satureja* spp., y *Ambrosia* spp. son germacreno D, (*E*)- β -cariofileno, *p*-menta-3-en-8-ol, pulegona, γ -curcumeno, ácido rosmarínico, apigenina-7-*O*-glucurónido y ácido clorogénico, entre otros (27-36).

El objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar la relación entre el estado fenológico de las plantas (vegetativo, floración y post-floración), la composición química y la

actividad antioxidante de los AE y extractos, obtenidos a partir de material vegetal, antes y después de la destilación de plantas promisorias *H. colombiana*, *S. viminea* y *A. cumanensis*. Ello, con el propósito de encontrar un estado fenológico propicio para cosechar el material vegetal del cual se destilan AE y se aíslan extractos vegetales con las menores variaciones en sus composiciones químicas y actividades antioxidantes. También, fue importante determinar si el material vegetal destilado aún tenía compuestos fenólicos de interés biológico.

Los AE y extractos se obtuvieron de plantas cosechadas en los tres estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración, para cada una de las especies bajo estudio, durante los años 2021-2023. Las composiciones químicas de los AE se determinaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) y cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (GC/FID). La cromatografía de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas *Orbitrap* (UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS) se usó para establecer las composiciones químicas de los extractos. La actividad antioxidante se evaluó por varios métodos. Se emplearon el ensayo de decoloración de catión-radical ABTS⁺, la cromatografía líquida en línea con la determinación de actividad antioxidante (HPLC-ABTS⁺) y la técnica de medición de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno, ORAC. La relación entre las composiciones químicas de los AE y extractos y sus actividades antioxidantes *in vitro*, medidas por diferentes métodos, se realizó mediante el análisis de conglomerados y de componentes principales.

Entre los hallazgos más importantes, figuran por primera vez las composiciones químicas de los extractos hidroalcohólicos de las plantas de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis*. Los AE y extractos hidroalcohólicos de las plantas de *S. viminea* e *H. colombiana* fueron los que presentaron los valores de actividad antioxidante más altos, mientras que sus composiciones químicas no variaron mucho con el estado fenológico, vegetativo y floración. El ácido

rosmarínico fue uno de los principales compuestos en los extractos que aportó a la actividad antioxidante. En la biomasa residual se encontraron compuestos bioactivos que podrían ser usados como ingredientes naturales, de esta manera, aprovechando también los residuos de destilación.

Los resultados obtenidos podrían ser de mucho interés para diferentes áreas de investigación, *e.g.*, química analítica, productos naturales, estudio de actividades biológicas, y permitirán establecer las bases para determinar los estados fenológicos y el tiempo de cosecha favorable para los cultivos de las plantas estudiadas. Los resultados parciales de esta investigación se presentaron en eventos científicos nacionales e internacionales, a saber: el Simposio Panamericano de Aceites Esenciales, SPAE 2021; *International Symposium on Advances in Extraction Technologies*; ExTech XXIII 2021; *International Symposium on Essential Oils*, ISEO 2021; 12th *International Mass Spectrometry Conference on Petrochemistry, Environmental and Food Chemistry*, PETROMASS 2022; III *Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry*, IBERO 2022.

Este trabajo de investigación formó parte del proyecto de estudio de plantas aromáticas en Santander, financiado por el Sistema General de Regalías SGR [BPIN-2018000100044] y del Programa “Bio-Reto XXI 15:50”, financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, el Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. El permiso de colecta suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Industrial de Santander fue otorgado a través del contrato N° 270 y permitió el acceso a recursos genéticos y productos derivados con fines de bioprospección.

2. ESTADO DEL ARTE

Sobre las plantas de *H. colombiana*, *S. viminea* y *A. cumanensis*, estudiadas en este proyecto de investigación, se realizaron las búsquedas sistemáticas de las publicaciones enfocadas en el estudio de estados fenológicos de plantas, aceites esenciales, extractos y actividad antioxidante.

2.1 *Hyptis colombiana*

Hyptis spp. (familia Lamiaceae) son plantas aromáticas que crecen principalmente en áreas tropicales de América. En el mundo, hay alrededor de 755 especies del género *Hyptis*; en Colombia, se han identificado 43. Las plantas de *Hyptis* spp. presentan variabilidad en su forma vegetativa y en el hábitat, sin embargo, son similares en su estructura floral (22).

Hyptis colombiana o también conocida por algunos autores como *Cantinoa colombiana* (Epling Harley & J. Pastore) (37), es un arbusto originario de los Andes y que crece en gran parte de Colombia, los tallos florales son rectos, de ca. 40 cm de largo y presentan una gran cantidad de flores **Figura 1** (27).

La búsqueda sistemática de las investigaciones realizadas sobre *H. colombiana* y el estudio de los AE, extractos, actividad antioxidante y su relación con el estado fenológico de la planta se llevó a cabo, en la base de datos de *Scopus* (*Elsevier*).

Figura 1.

Plantas de Hyptis colombiana en sus diferentes estados fenológicos. A. Vegetativo (28-06-2022). B. Floración (24-11-2022). C. Post-floración (12-01-2023). Fotografías tomadas por Sheila Bridget BELTRÁN PÉREZ. Lugar: jardín experimental CENIVAM-UIS, Bucaramanga.



Se encontró un documento publicado en *Scopus* sobre *H. colombiana* en Venezuela en el 2015 (*TITLE-ABS-KEY “Essential oil” AND “Hyptis colombiana”*), afiliado a la Universidad de los Andes, Mérida. Flores *et al.* (27), investigaron la composición química del AE de las partes aéreas de las plantas de *H. colombiana* y determinaron su actividad antimicrobiana. Entre los compuestos mayoritarios del AE figuraron germacreno-D (22.2%), (*E*)- β -cariofileno (29.5%), biciclogermacreno (10.9%), germacreno B (5.6%) y óxido de cariofileno (3.5%) (27).

Asekun *et al.* (38) estudiaron la composición química del AE de *H. suaveolens* y encontraron que (*E*)- β -cariofileno y germacreno D tenían actividad antibacteriana. Estos terpenos también se detectaron en el AE de *H. colombiana*.

En Colombia, hasta la fecha, se han registrado 12 publicaciones sobre extractos del género *Hyptis* y sus propiedades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y sus posibles usos como repelente de insectos. En *H. suaveolens* e *H. pectinata* se detectó el ácido rosmarínico, típico para plantas de la familia Lamiaceae (39). El ácido rosmarínico tiene propiedades

antimicrobianas (40), antioxidante (41), antiinflamatoria (42), antimutagénica y antiviral (43). Hasta la fecha, no se encontraron reportes científicos sobre la composición química de los extractos de *H. colombiana*.

Las investigaciones sobre *H. colombiana* se han enfocado principalmente en determinar la composición química del AE y su actividad antibacteriana (27). Según la búsqueda sistemática realizada en *Scopus*, las publicaciones sobre *Hyptis* sp., aumentan con el tiempo, por eso es oportuno impulsar en Colombia las investigaciones sobre las composiciones químicas de los AE y extractos de *H. colombiana*, acompañadas de la evaluación de su actividad antioxidante y otras propiedades biológicas.

Las actividades antioxidantes y las composiciones químicas de AE y extractos de plantas presentan variaciones, según el estado fenológico de la planta (vegetativo, floración, post-floración, fructificación). Es interesante determinar en qué estado fenológico se recomendaría cosechar material vegetal para destilar los AE y aislar los extractos con actividad antioxidante alta y reproducible. Por ello, en la base de datos de *Scopus* se realizó la búsqueda de los estudios realizados sobre el género *Hyptis*, en función de su estado fenológico y las actividades antioxidantes de sus AE y extractos.

La ecuación de búsqueda utilizada fue *TITLE-ABS-KEY* (“*Phenological stage*” OR “*Phenological*” OR “*Flowering*” AND “*Hyptis*” OR “*Hyptis* sp.” OR “*Hyptis* spp.” OR “*Hyptis colombiana*” AND “*Essential oils*” OR “*Extracts*” AND “*Antioxidants*” OR “*Activity antioxidants*”). Se encontraron 19 documentos. Oliveira *et al.* (44) reportaron las composiciones químicas de los AE de *H. suaveolens* obtenidos de plantas en tres estados fenológicos (vegetativo, floración y fructificación), cultivadas en condiciones geográficas diferentes. De las

plantas de *H. suaveolens* en sus estados vegetativo y floración, cultivadas en zonas de altitud y latitud más altas, se obtuvieron AE cuyas composiciones químicas estaban enriquecidas en hidrocarburos monoterpénicos. En cambio, en los AE destilados de plantas de *H. suaveolens*, en la etapa de fructificación y cultivadas en zonas de latitud y altitud bajas, se detectaron cantidades relativas mayores de hidrocarburos sesquiterpénicos. De la especie *H. colombiana* no se encontraron artículos relacionados con los AE y extractos, obtenidos de plantas en diferentes estados fenológicos, su caracterización química y su relación con la actividad antioxidante.

Existen algunos reportes sobre las actividades antioxidantes de AE y extractos (78 documentos publicados) de *Hyptis* spp., de los cuales dos son de Colombia (45,46). En Colombia, Tafurt-García *et al.* (46), correlacionaron la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales de los extractos etanólicos de material vegetal seco y sin destilar de *H. conferta*, *H. dilatata*, *H. mutabilis* e *H. suaveolens*. La actividad antioxidante se evaluó por los métodos colorimétricos de ABTS⁺⁺ y DPPH[•]. Los valores de mmol Trolox[®]/kg extracto obtenidos, por los métodos ABTS⁺⁺ y DPPH, para extractos de *H. dilatata* (903 ± 64 y $4.60 \times 10^{-7} \pm 3 \times 10^{-8}$) e *H. conferta* (721 ± 27 y $4.50 \times 10^{-7} \pm 4 \times 10^{-8}$) fueron mayores que para los extractos de *H. mutabilis* (227 ± 11 y $5.70 \times 10^{-7} \pm 2 \times 10^{-8}$) e *H. suaveolens* (76 ± 2 y $1.70 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-7}$).

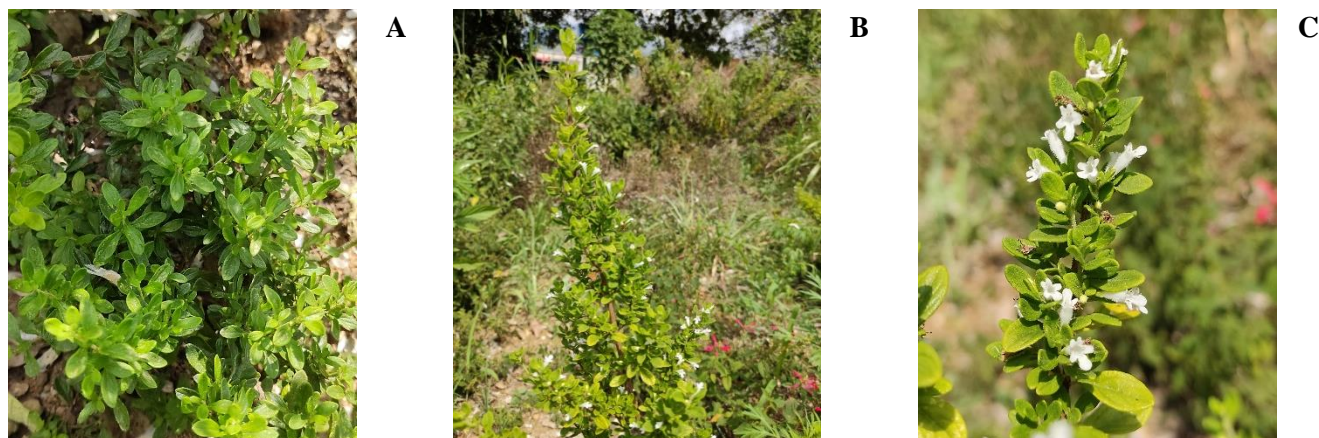
2.2 *Satureja viminea*

Satureja viminea (familia Lamiaceae) es una planta aromática de origen americano que crece en Jamaica, Costa Rica y Colombia (24). La “menta de palo”, según su nombre vernáculo, es un arbusto de ca. 180 cm de alto con flores blancas o rosadas (**Figura 2**) (24).

La infusión de *S. viminea* se usa en la medicina tradicional para calmar el dolor abdominal, por sus propiedades antiséptica, astringente y antibacteriana (47).

Figura 2.

Plantas de Satureja viminea en sus diferentes estados fenológicos. A. Vegetativo (27-07-2022). B. Floración (24-10-2022). C. Post-floración (25-1-2023). Fotografías tomadas por Sheila Bridget BELTRÁN PÉREZ. Lugar: jardín experimental de CENIVAM-UIS, Bucaramanga.



Desde el 2000 hasta la fecha, en *Scopus* (TITLE-ABS-KEY “Essential oil” AND “*Satureja viminea*”) se han encontrado cinco documentos publicados, los cuales se refieren principalmente sobre la composición química del AE de *S. viminea* en Costa Rica (2), Colombia (2) y Estados Unidos (1) (30-32,48). En los AE de *S. viminea* estudiados, en Costa Rica, Colombia y los adquiridos en un mercado de los Estados Unidos o los de procedencia de Costa Rica, se encontraron monoterpénos oxigenados *p*-menta-3-en-8-ol y pulegona como compuestos mayoritarios, y los hidrocarburos sesquiterpénicos (*E*)- β -cariofileno y aromadendreno (30-32,48).

Es importante destacar que la pulegona, compuesto mayoritario del AE de *S. viminea* (14-35%), es tóxica en concentraciones altas (150-400 mg/kg) (49). Estudios realizados en ratones mostraron un aumento en la incidencia de tumores en el hígado, después de suministrar durante

siete días la pulegona (de 150 a 400 mg/kg) vía intraperitoneal. En cambio, a una concentración baja (20 mg/kg), la pulegona no produjo efectos negativos en el hígado de los ratones (49).

Las personas consumen ciertos alimentos (bebidas alcohólicas, postres congelados, dulces, productos horneados, gelatinas y bebidas con menta) que contienen pulegona sintética o natural. Esto, eventualmente, podría tener un efecto negativo sobre la salud (49), debido a la intoxicación crónica. En Francia, se estima que el consumo de pulegona es de 0.6 mg/kg por día y un niño que pesa 30 kg y consume una bebida de 500 mL con sabor a menta, puede ingerir alrededor de 1.2 mg/kg de pulegona (49).

En la **Tabla 1**, aparecen reportados algunos estudios sobre actividades biológicas de AE y extractos de *Satureja* spp. En varios estudios, en los extractos de *Satureja* spp. (*S. boissieri*, *S. hortensis* y *S. cuneifolia*), los autores reportaron apigenina, rutina y el ácido rosmarínico (50-52).

Los estudios sobre las plantas del género *Satureja* relacionados con el estado fenológico de la especie vegetal, composiciones químicas de AE y extractos, y sus actividades antioxidantes se comenzaron a documentar en el 2008 (53) (*Scopus: TITLE-ABS-KEY "Phenological stage" OR "Phenological" OR "Flowering" AND "Satureja" OR "Satureja sp." OR "Satureja spp." OR "Satureja viminea" AND "Essential oils" OR "Extracts" AND "Antioxidants" OR "Activity antioxidants"*, Fecha de consulta: mayo 2023). Koşar *et al.* (53), estudiaron la composición química del AE de *S. cuneifolia* colectada en tres etapas (vegetativo, floración y post-floración), midiendo, las actividades antioxidante y antimicrobiana. En la composición química del AE de *S. cuneifolia* se encontró que los compuestos mayoritarios, en las tres etapas fenológicas, fueron los mismos, *i.e.*, el timol, *p*-cimeno y carvacrol. Según el método DPPH•, la actividad antioxidante

del AE obtenido de *S. cuneifolia*, después de la floración (94.65% IC₅₀), fue más alta que la de los AE destilados de plantas recolectadas en las etapas vegetativa (93.54% IC₅₀) y de floración (93.56% IC₅₀). Los valores de la actividad antioxidante del AE fueron cercanos a los obtenidos para el BHT (98.74% IC₅₀).

En el 2020, Aghbash *et al.* (54), investigaron la composición química y las actividades antibacteriana y antioxidante del AE obtenido de *S. macrantha* colectada en las diferentes etapas de crecimiento. En los AE destilados de plantas colectadas en los estados fenológicos (vegetativo, floración y fructificación) encontraron que los compuestos mayoritarios fueron carvacrol, timol, *p*-cimeno y γ -terpineno. La actividad antibacteriana del AE destilado de plantas en floración presentó valores altos contra *Staphylococcus aureus* (CMI = 5 μ g/mL) y *Enterococcus faecalis* (CMI = 20 μ g/mL). Los autores (54) propusieron que la actividad antibacteriana del AE se debía a los fenoles terpenicos, timol y carvacrol. Según el método ABTS⁺, la actividad antioxidante del AE de *S. macrantha*, destilado de plantas recolectadas en el estado vegetativo (142.33 ± 6.47 μ g/mL EC₅₀) fue más alta que la de los AE destilados de plantas en estados de floración (135.25 ± 5.63 μ g/mL EC₅₀) y fructificación (134.78 ± 4.83 μ g/mL EC₅₀).

No se encontraron resultados durante la búsqueda sistemática de publicaciones sobre la destilación del AE y extractos de plantas de *S. viminea*, cosechadas en los diferentes estados fenológicos y su relación con la actividad antioxidante. Por eso, es el interés para investigar las diferencias en las composiciones químicas de los AE y extractos de plantas colectadas en los diferentes estados fenológicos.

Tabla 1.*Propiedades biológicas de los aceites esenciales y extractos del género Satureja spp.*

Autores	Aceite esencial/ extracto	Actividad	Ensayo	Resultados
Stashenko <i>et al.</i> (31)	<i>S. viminea</i> (AE)	Antioxidante	Evaluación de la actividad antioxidante por los métodos ORAC y ABTS ⁺⁺ .	ORAC (1060 ± 16 mmol Trolox [®] /g aceite) y ABTS ⁺⁺ (52 ± 1 mmol Trolox [®] /g AE).
Suárez <i>et al.</i> (55)	<i>S. viminea</i> (AE)	Analgesica	Ensayo de <i>Tail flick</i> (movimiento rápido de la cola en respuesta al dolor por radiación) en ratas <i>Sprague-Dawley</i> (200-240 g) durante 30, 60 y 120 min, después de la administración oral del AE de <i>S. viminea</i> (1g/kg).	La actividad analgésica más alta se encontró después de 30 min de la administración oral del AE de <i>S. viminea</i> con un periodo de latencia de 34 s.
Yegen <i>et al.</i> (56)	<i>S. thymbra</i> (AE)	Antifúngica	Inhibición del crecimiento micelial de hongos de <i>Phytophthora capsici</i> .	La concentración inhibitoria mínima del AE fue MIC 800 mg/L.
Badilla <i>et al.</i> (57)	<i>S. viminea</i> (Extracto acuoso)	Edematógena	Medición del edema inducido, por el veneno de la serpiente <i>Bothrops asper</i> , en la pata trasera de la rata.	El edema se redujo después de 2 h de aplicar el extracto (250 mg/kg).

2.3 *Ambrosia cumanensis*

Ambrosia cumanensis, también conocida como *A. peruviana* (familia Asteraceae) (58,59), es una planta perenne de origen centroamericano y crece principalmente en Costa Rica, Ecuador, Panamá y Colombia (23). La altamisa o artemisa, según su nombre vernáculo, es un arbusto de ca. 2 m de alto con hojas alternas u opuestas, cubiertas en el fondo de vellosidades largas (**Figura 3**).

Tradicionalmente, la infusión de las hojas de *A. cumanensis*, se ha usado como antimicrobiana y espasmolítica, y para el tratamiento del dolor crónico (23).

Figura 3.

Plantas de Ambrosia cumanensis en sus diferentes estados fenológicos. A. Vegetativo (18-01-2022). B. Floración (16-05-2022). C. Post-floración (26-08-2022). Fotografías tomadas por Sheila Bridget BELTRÁN PÉREZ. Lugar: jardín experimental del CENIVAM-UIS, Bucaramanga.



La búsqueda de estudios sobre AE de *Ambrosia* spp. en la base de datos de *Scopus* en mayo de 2023 con la ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY "Essential oil" and "Ambrosia*

spp”, arrojaron 52 documentos. En 1996, se reportó la primera publicación sobre la caracterización química del AE, destilado de hojas de *A. tenuifolia*, su componente mayoritario fue α -tujona (79.3%) (60).

En Colombia, se han publicado dos artículos sobre *A. peruviana* (33,61), en los cuales se determinaron la composición química del AE y evaluaron la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* (33,61). γ -Curcumeno (23.99%), *ar*-curcumeno (14.08%), acetato de bornilo (10.35%) y alcanfor (5.03%) fueron los compuestos mayoritarios del AE:

Los estudios y publicaciones sobre extractos de *Ambrosia* spp., según la base de datos de *Scopus* (*TITLE-ABS-KEY “Extracts” AND “Ambrosia spp”*. Fecha: mayo 2023), van en aumento desde el 2008. En 2022 y lo transcurrido del 2023, se han publicado 47 artículos. Algunas publicaciones, tratan principalmente sobre los efectos fitotóxico, antiinflamatorio, antioxidante y citoprotector de los extractos (62-64).

En Colombia, se encontraron publicados diez artículos, sobre extractos de *Ambrosia* spp. entre ellos, los que estudiaron las actividades citotóxicas y antiinflamatoria (23,65,66). Castro *et al.* (65), evaluaron el potencial antiinflamatorio de 37 extractos de plantas, entre las cuales se destacó el de *A. cumanensis*, su extracto produjo una disminución significativa de citocinas proinflamatorias (65).

En los extractos de plantas de la familia Asteraceae (36,67-69) se han encontrado el ácido clorogénico, que se considera uno de los polifenoles más importantes y comunes en las plantas de las familias Asteraceae y Lamiaceae (70), ya que posee efectos antiinflamatorio (71), antioxidante (72) y antidiabético (73).

En la familia Asteraceae se encuentran varias plantas aromáticas que presentan potencial antioxidante, por ello, sobre el género *Ambrosia* se realizó la búsqueda sistemática de publicaciones. Se encontraron en *Scopus* 26 artículos sobre las actividades antioxidantes de AE y extractos de *Ambrosia* spp. (TITLE-ABS-KEY “Antioxidant” AND “Essential oil” OR “Extract”. Fecha: septiembre de 2023), sin embargo, ninguno menciona cuál fue el estado fenológico de la planta.

Maksimović (74) en 2008, reportó la actividad antioxidante del extracto acetónico de *A. artemisiifolia* L, determinada por los ensayos FRAP (2.37 mmol Fe²⁺/g) y DPPH• (27.60 IC₅₀ µg/mL). Estos valores, se compararon con los de estándares de referencia, quercetina (7.69 mmol Fe²⁺/g y 7 2.75 IC₅₀ µg/mL), ácido ascórbico (10.4 mmol Fe²⁺/g y 4.10 IC₅₀ µg/mL) y BHT (8.0 mmol Fe²⁺/g y 19.49 IC₅₀ µg/mL). El autor consideró que la reducción del hierro férrico (Fe⁺³) a su forma ferrosa (Fe⁺²) en el ensayo de FRAP podía ser atribuida a los flavonoides (74).

2.4 Antioxidantes

Halliwell (75) definió un antioxidante (AH) como una sustancia que, a bajas concentraciones comparado con un sustrato oxidable, previene o retrasa significativamente la oxidación de moléculas. La función de los AH es proteger las células contra los efectos adversos de los radicales libres para prevenir el desarrollo de enfermedades neurológicas, degenerativas y cardiovasculares en humanos, entre otras.

En las células, los antioxidantes hacen parte del mecanismo de defensa ya que tienen la capacidad de prevenir la formación de radicales y neutralizar los existentes, también, repararan el daño oxidativo, identifican y promueven la reparación o eliminación de moléculas dañadas para

evitar mutaciones (76). Los AH “neutralizan” las especies reactivas a través de la donación de átomos de hidrógeno o por transferencia de electrones o la combinación de ambos mecanismos.

El mecanismo de reacción de donación de átomos de hidrógeno (**Ecuación 1**) sucede por la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante (AH) al radical ROO• (hidroxi, alcoxi, peróxidos de lípidos), formando radicales (A•) y moléculas neutras ya sea, agua, alcohol o hidroperóxidos de lípidos (ROOH) (77).

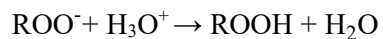


El radical formado (A•) puede participar en reacciones con otros radicales o antioxidantes para terminar la cadena (**Ecuación 2**). La especie A•, debe ser menos reactiva que los radicales iniciales (ROO•) (78).

El mecanismo de donación de átomos de hidrógeno depende de la energía de disociación del enlace del grupo que dona el átomo de hidrógeno. La reacción es termodinámicamente favorable, una energía de disociación del enlace baja favorece la transferencia del átomo de hidrógeno por parte de la molécula (78,79).

El mecanismo de transferencia de electrones comprende un proceso de oxidación-reducción. El AH al donar un electrón al radical (ROO•) produce un catión-radical y un anión intermedio (ROO⁻). La reacción en cadena termina con la adición de un protón (proveniente del agua) al anión (**Ecuaciones 3-5**) (78,79).



**Ecuación 5**

El mecanismo de transferencia de electrón depende el potencial de ionización (PI), por lo tanto, entre más bajo sea el PI más fácil será para el antioxidante ceder un electrón. Ambos mecanismos, de donación de protón y de transferencia de electrón pueden suceder en paralelo (80).

2.5 Antioxidantes en plantas

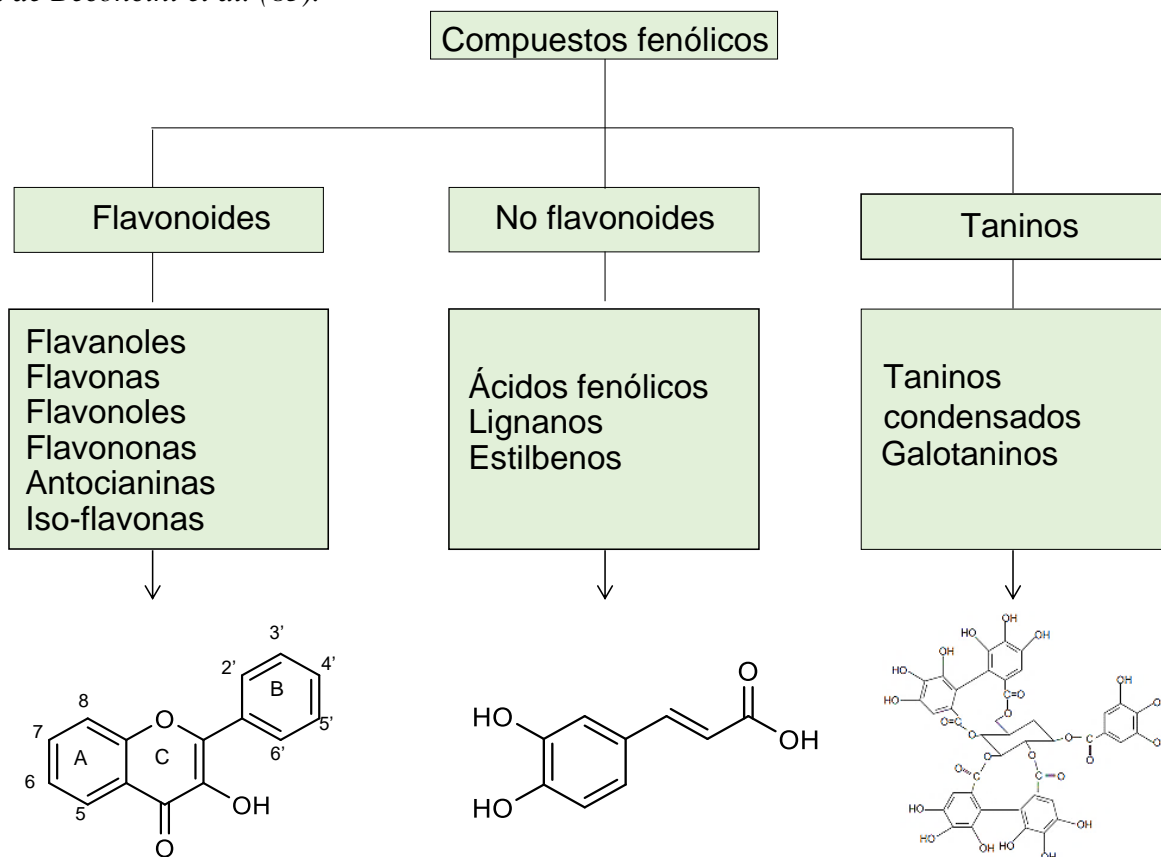
Los metabolitos secundarios de las plantas son esenciales para su crecimiento, desarrollo, defensa y adaptación; son compuestos de distinta naturaleza química, se encuentran alcaloides, terpenoides, compuestos fenólicos, ácidos grasos, entre otros (81,82). Algunos metabolitos secundarios de plantas presentan propiedades antioxidantes, tales como (81,82):

Terpenos: son hidrocarburos insaturados, productos de unión de varias unidades de isopreno y son los componentes principales de los AE. La familia de terpenos está conformada por 40.000 compuestos, que incluyen monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, entre otros. Algunos de los terpenos muy estudiados por sus propiedades biológicas son carveol, carvacrol, limoneno, timol, eugenol y geraniol (81).

Fenólicos: constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios y se dividen en flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos y taninos (**Figura 4**). Los flavonoides y los ácidos fenólicos se biosintetizan a partir de los ácidos acético y shikímico (83,84).

Figura 4.

Clasificación de algunos compuestos fenólicos y ejemplos de su estructura química. Información tomada de Beconcini et al. (85).



Los compuestos con propiedades antioxidantes generalmente tienen en su estructura química anillos aromáticos, sustituyentes hidroxilo en la conformación *o*-dihidroxi y enlaces dobles conjugados que permiten deslocalización electrónica por resonancia; también, hay grupos funcionales con enlaces dobles carbono-carbono y grupos carbonilo (82-84).

Los compuestos fenólicos en las plantas están involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta, protección contra patógenos, parásitos y depredadores, además, otorgan color a los tejidos vegetales (83).

Vitaminas: se destacan la vitamina E (tocoferoles) y el ácido ascórbico (vitamina C) por su notoria actividad antioxidante. Su función es neutralizar radicales peroxi y mantener el balance entre las especies radicales de oxígeno (ROS) (86,87).

Carotenoides: interactúan con las especies reactivas de oxígeno (ROS), desactivan los radicales peroxilo, al reaccionar con ellos, formando radicales estabilizados por resonancia. Los carotenoides más comunes son β -caroteno, luteína, licopeno y zeaxantina (88).

2.6 Métodos para evaluar la actividad antioxidante

Existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante, porque no hay un método universal (89). Los métodos para medir la actividad antioxidante se clasifican, según su mecanismo de acción, en los siguientes: (1) donadores de átomos de hidrógeno y (2) de transferencia de electrones (86,90).

Las reacciones de donación de átomos de hidrógeno son rápidas y no dependen de la naturaleza del disolvente y pH. Es posible que en presencia de metales o agentes reductores se genere una reactividad del antioxidante mayor (86).

Las reacciones de transferencia de electrón son más lentas que las de donación de átomos de hidrógeno y ocurren mediante reacciones de oxidación-reducción. En presencia de metales pueden generar interferencias causando algunas inconsistencias en los resultados (86).

Las reacciones de donación de átomos de hidrógeno y transferencia de electrones se diferencian en su cinética y en las reacciones secundarias que ocurren. A continuación, aparecen resumidos algunos métodos de evaluación de actividad antioxidante (89).

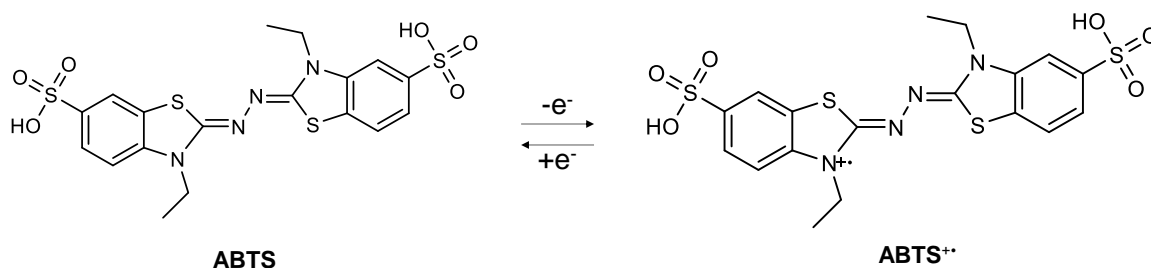
2.7 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺

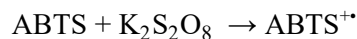
El ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺, conocido como equivalente de Trolox[®] (TEAC), fue reportado por primera vez por Miller *et al.* (91) y su mecanismo se basa en la transferencia de electrones (86).

En primer lugar, el ABTS [2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico ácido)] se oxida con persulfato de potasio, peroxidasa de rábano o peróxido de hidrógeno, produciendo el catión-radical del ABTS (ABTS⁺) que tiene una coloración azul verdosa (**Figura 5**) (86). El cromóforo obtenido presenta tres bandas de absorción con longitudes de onda de $\lambda = 645, 734$ y 815 nm. Los antioxidantes, en presencia de la solución del catión-radical ABTS⁺, donan electrones y reducen la solución de ABTS⁺ produciendo la disminución de absorbancia y del color azul-verdoso (86,92) (**Ecuaciones 6 y 7**).

Figura 5.

Formación del catión-radical ABTS⁺. Información tomada, con modificaciones, de Ilyasov et al. (92).



**Ecuación 6****Ecuación 7**

$$\text{Inhibición, \%} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}} - \text{Absorbancia}_{\text{final}}}{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}}} * 100$$

Ecuación 8

La disminución de la absorbancia se puede medir por espectrofotometría y se expresa numéricamente como porcentaje de inhibición (**Ecuación 8**) (93).

El ensayo ABTS^{++} es un método rápido, el catión-radical ABTS^{++} es soluble en disolventes orgánicos y acuosos, y no depende de la fuerza iónica de la solución, lo que permite medir la actividad antioxidante de compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos. La desventaja del método es que el catión-radical no se encuentra de forma natural en el cuerpo humano, por lo que se considera que el ensayo es un modelo preliminar, no puede extrapolarse directamente para las funciones biológicas (93).

Para los extractos de plantas, que son una mezcla compleja de metabolitos secundarios, se han implementado métodos en línea (*on-line*-HPLC/ ABTS^{++}) para separar e identificar los componentes individuales con una posible actividad antioxidante. Lo primero que sucede es la separación de los compuestos en una columna cromatográfica, luego los componentes que eluyen de la columna reaccionan con el catión-radical ABTS^{++} , que se encuentra en un reservorio en una bomba auxiliar, y posteriormente se transfieren al detector. La respuesta se observa como una señal negativa debido a que el catión-radical reacciona y se neutraliza capturando los electrones donados por los compuestos con propiedades antioxidantes (94,95).

2.8 Evaluación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (método ORAC)

El ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno (método ORAC) fue descrito en trabajos de Wayner *et al.* (96) y Glazer (97), con modificaciones hechas por Cao *et al.* (98). El ensayo de ORAC se basa en la donación de átomos de hidrógeno y se realiza mediante la medición de la inhibición por la oxidación de la fluoresceína inducida por radicales peroxilo.

Los radicales peroxilo predominan en el proceso de la oxidación de lípidos tanto en alimentos como en los sistemas biológicos. Los valores obtenidos por el método de ORAC, podrían ser considerados como punto de referencia para predecir la actividad antioxidante de una sustancia en un sistema biológico (99).

El radical peroxilo se genera mediante la descomposición térmica del AAPH (R-N=N-R) [2,2'-azobis-(2-amidino-propano)] para producir nitrógeno molecular y radicales alquilo que, en presencia de oxígeno atmosférico, producen los radicales peroxilo (**Ecuación 9**). Los radicales peroxilo reaccionan con una sustancia fluorescente (fluoresceína) formando un producto no fluorescente. Sin embargo, en presencia de un antioxidante la fluoresceína se protege, disminuyendo la velocidad de su degradación mediante la reacción entre los radicales peroxilo y el antioxidante (**Ecuaciones 10 y 11**) (99).

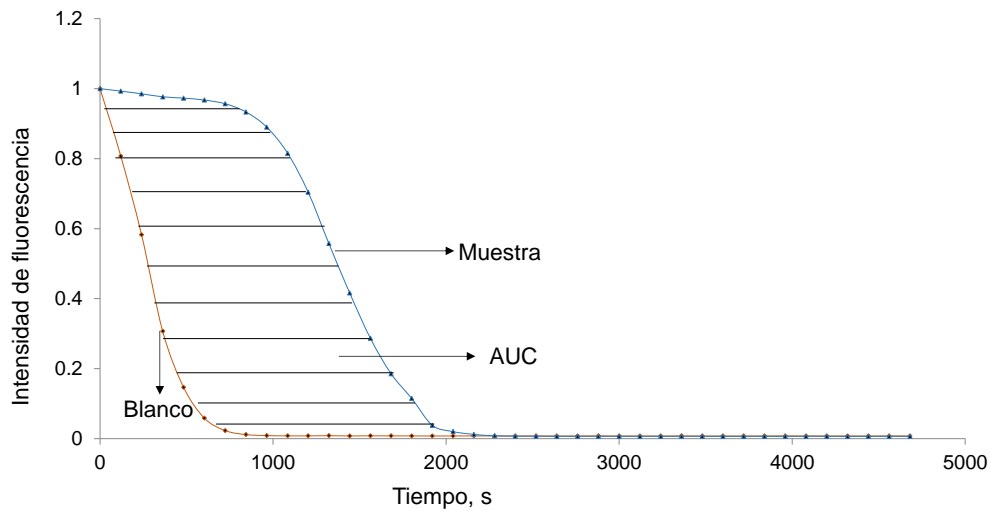


Los valores de la actividad antioxidante se obtienen a partir del área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) del decaimiento de la fluoresceína (**Figura 6**). La actividad antioxidante

de una muestra se obtiene mediante la diferencia de las áreas bajo la curva del antioxidante y del blanco (sin antioxidante) ($AUC_{neta} = AUC_{AH} - AUC_{blanco}$) (86).

Figura 6.

Curva de disminución de la fluorescencia obtenida en el ensayo ORAC.



Los inconvenientes que presenta la prueba de ORAC, se deben a que la reacción necesita ser monitoreada durante más de 30 min (100).

2.9 Estado fenológico de las plantas

La fenología se refiere al estudio de eventos biológicos que ocurren en la vegetación de una especie, tales como, germinación, desarrollo de hojas, formación y crecimiento, desarrollo de flores y frutos, maduración de frutas y semillas, entre otros (101).

Los estados fenológicos se observan de forma convencional mediante la evaluación visual, directa e *in situ*. Por lo general, se implementan protocolos estandarizados para reducir el sesgo de los observadores y garantizar la comparabilidad de los datos. Por ejemplo, el BBCH

(*Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie*) es una escala desarrollada para codificar sistemáticamente el crecimiento de las plantas mono y dicotiledóneas, usando números del cero al nueve en forma ascendente para describir la germinación, el desarrollo de las hojas, formación de los brotes, crecimiento de los tallos, floración, maduración de frutos y semillas, entre otros (102).

Algunas de las principales fases del ciclo de las plantas (escala BBCH) se describen a continuación (102):

Vegetativo: es la etapa desde la germinación hasta el crecimiento de las plántulas y las hojas, que se encuentran con una coloración verde.

Floración: se considera floración plena cuando el 50% de las plantas presentan las flores abiertas.

Post-floración: los pétalos de las flores o las inflorescencias se caen o se marchitan.

Existen otros métodos para la medición *in situ* de los estados fenológicos en los que se utilizan instrumentos adicionales para la medición de la fotosíntesis, imágenes satelitales y fotografías digitales. Estos métodos pueden reducir los errores que se generan, eventualmente, usando el método tradicional con el observador.

Según el periodo de vegetación de la planta, se producen variaciones en la biosíntesis de metabolitos secundarios y su biodisponibilidad, que depende de las condiciones ambientales y factores como la edad (101). Los metabolitos secundarios se sintetizan en todas las partes de la planta (raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas) y se relacionan, principalmente, con la disminución o el aumento en la expresión de los genes que codifican la actividad de las enzimas implicadas en la biosíntesis de los compuestos terpenicos, fenólicos, alcaloides, entre otros (103).

Por ejemplo, en las raíces de *Scutellaria baicalensis*, antes de la floración se sintetiza la mayor cantidad flavonoides (103). En *S. baicalensis*, la biosíntesis de la baicalina varía, según las etapas de crecimiento y desarrollo de la planta.

Determinar y reconocer los estados fenológicos de las plantas cultivadas es importante, porque esto permite programar las acciones relacionadas con las fertilizaciones específicas, el control fitosanitario a través del uso de productos hormonales y para determinar los impactos ecológicos generados por el cambio climático (104). El tiempo de cosecha de un cultivo, es muy importante y se establece, según las características establecidas de la calidad agrícola del producto final. Por ejemplo, en los cultivos de plantas aromáticas hay que cosechar bajo las condiciones que permitan obtener los AE y extractos con rendimientos altos y propiedades biológicas.

Según los resultados obtenidos en la búsqueda sistemática en *Scopus (ElSevier)* de las plantas sobre los géneros *Hyptis*, *Satureja* y *Ambrosia*, los países con la mayor contribución a los estudios de sus AE y extractos fueron Brasil, Irán y Estados Unidos. Desde el 2003, se observa un aumento gradual en las publicaciones, el número más alto de artículos se reporta para los géneros *Satureja* (119), *Ambrosia* (36) e *Hyptis* (34), durante los años 2021, 2022 y 2012, respectivamente.

Sobre las especies de interés, *H. colombiana*, *S. viminea* y *A. cumanensis*, en los pocos artículos encontrados, el énfasis se hace en el estudio de los AE. Hay muchas oportunidades en Colombia para continuar estudiando la relación entre el estado fenológico, la composición química y la actividad antioxidante de los AE y extractos. La investigación en fenología es muy importante porque permite comprender los efectos del clima sobre las etapas vegetativa,

floración, post-floración y fructificación, y puede utilizarse en campos de investigación como la botánica, la agronomía y la biología vegetal (105).

Los estudios que relacionen el estado fenológico de las plantas con sus metabolitos secundarios serán útiles para identificar la etapa de crecimiento en la cual se genera la más alta actividad antioxidante de AE y extractos vegetales. Las investigaciones extensas en esta área podrán beneficiar al sector agrícola, ya que se lograría estandarizar las operaciones de fertilización y mejorar el cultivo para aumentar el rendimiento de biomasa y producir AE y extractos con propiedades antioxidantes que podrían ser usados como ingredientes naturales en productos cosméticos, de aseo o farmacéuticos.

Los resultados de este trabajo de investigación fortalecerán las áreas de conocimiento en química analítica, productos naturales y el estudio de sus actividades biológicas, en especial, en los campos de caracterización química y estudio de capacidad antioxidante, medida por varios métodos, de los metabolitos secundarios de las especies de *H. colombiana*, *S. viminea* y *A. cumanensis*.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el estado fenológico, para la cosecha de plantas aromáticas de *H. colombiana*, *S. viminea* y *A. cumanensis*, que genere las menores variaciones en la composición química y la actividad antioxidante de sus aceites esenciales y extractos, obtenidos del material vegetal antes y después de su destilación.

Objetivos específicos

Realizar el estudio comparativo de los rendimientos de aceites esenciales y de los extractos hidroalcohólicos de material vegetal antes y después de la destilación, obtenidos de plantas bajo estudio recolectadas en los diferentes estados fenológicos (vegetativo, floración, post-floración).

Estudiar la composición química, usando diferentes métodos analíticos instrumentales; de los AE y de los extractos obtenidos de las plantas bajo estudio recolectadas en los tres estados fenológicos.

Comparar los valores obtenidos por diferentes ensayos, de la actividad antioxidante de los AE y extractos obtenidos de las plantas bajo estudio, que se recolectaron en los tres estados fenológicos de su desarrollo.

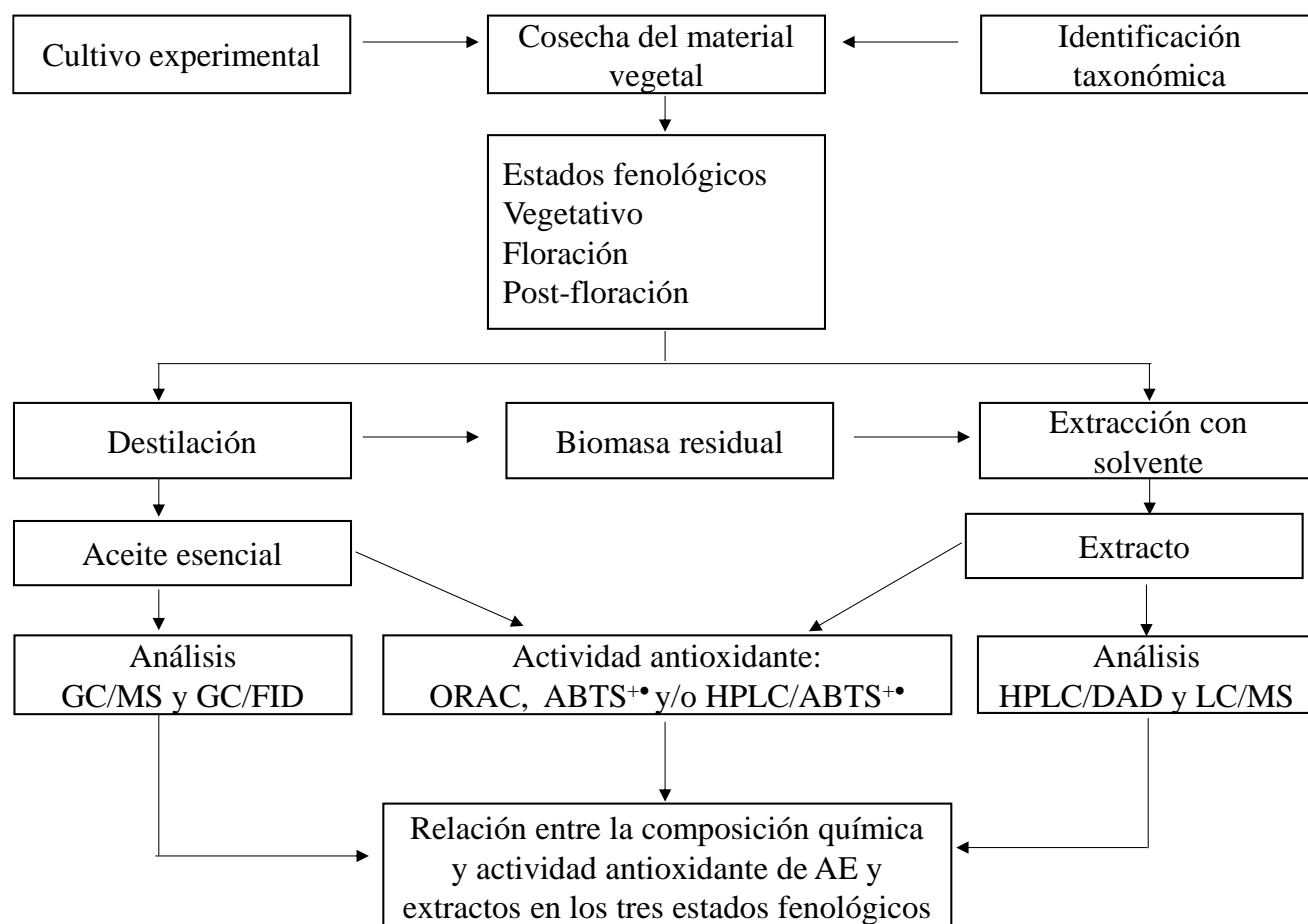
Establecer la relación entre el estado fenológico de las plantas bajo estudio y los valores obtenidos de la actividad antioxidante de los aceites esenciales y extractos y sus composiciones químicas.

4. METODOLOGÍA

En la **Figura 7**, se muestra el esquema general que se llevó a cabo para el desarrollo experimental, en este trabajo de investigación.

Figura 7.

Esquema general del desarrollo experimental, del presente estudio.



4.1 Reactivos

Para el desarrollo de este trabajo de investigación, α -pineno (98%), sabineno (95%), *p*-cimeno (99%), limoneno (97%), linalol (97%), γ -terpineno (96%), timol (99.5%), carvacrol (98%), (*E*)- β -cariofileno (98.5%), germacreno D (90%), α -humuleno (96%), óxido de cariofileno (95%), AAPH (97%), fluoresceína (99%), ácido rosmarínico (97%), ácido cafeico (98%), ácido-*o*-hidroxibenzoico (99%), pinocembrina (≥ 95), rutina (≥ 94 %) ácido-3-*O*-cafeoilquínico (≥ 98 %) y Trolox[®] (97%), fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich* (St. Louise, MO, EE. UU.). Kaempferol-3-*O*-rutinosido (98%), salvigenina (98%), apigenina-7-glucurónido (≥ 98) y luteolina-7-*O*-glucurónido (≥ 98) se compraron a *ChemFaces* (Wuhan, Ubei, China). La vitexina (≥ 95 %), nepetina (≥ 95 %), ácido-4-*O*-cafeoilquínico (≥ 98 %) y ácido-1,3-*O*-dicafeoilquínico (≥ 94 %) se adquirieron en *PhytoLab GmbH* (Vestenbergsgreuth, Baviera, Alemania). Los disolventes y otros reactivos utilizados para extracción, diclorometano grado GC/FID, sulfato de sodio anhidro, ácido fórmico grado HPLC, formiato de amonio (≥ 99 %), ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)], persulfato de potasio (99%), metanol grado LC/MS, etanol absoluto (96%) y agua tipo I (sistema de purificación Millipore Direct-QTM) provinieron de *Merck* (Darmstadt, Alemania). Nitrógeno y dióxido de carbono (99.995 %) fueron adquiridos en la empresa Messer (Bucaramanga, Colombia). El etanol comercial (96%) se compró a SUQUIN (Bucaramanga, Colombia).

4.2 Identificación taxonómica

La identificación taxonómica de las especies bajo estudio se realizó en el Herbario Nacional Colombiano, por el doctor José Luis FERNÁNDEZ ALONSO adscrito al Instituto de Ciencias

Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (actualmente, el curador del Real Jardín Botánico de Madrid, España).

4.3 Permiso de colecta

La recolección de las especies de plantas aromáticas promisorias se realizó, según lo establecido en el contrato N° 270 de acceso a recursos genéticos y productos derivados con fines de bioprospección, suscrito entre el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Industrial de Santander. La normatividad se contempló durante la ejecución del Programa Colombia Científica Bio-Reto XXI 15:50 y el proyecto de investigación sobre plantas aromáticas en Santander SGR [BPIN-2018000100044].

4.4 Recolección del material vegetal

Las partes aéreas de las plantas de *H. colombiana*, *S. viminea* y *A. cumanensis* se recolectaron en las etapas fenológicas (vegetativo, floración y post-floración) en los cultivos experimentales el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM, en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Santander, Colombia, N 07°08,422' W 073°06,960').

4.5 Muestreo de las plantas

De cada especie vegetal bajo estudio, se monitorearon 12 plantas, dos veces por semana, para determinar el momento de cosecha, según su estado fenológico (vegetativo, floración, post-floración). La temperatura y la humedad del ambiente, al momento de ser cosechadas las plantas se registraron, usando un termohigrómetro portátil HTC-1 (BOECO, Hamburgo, Alemania)

4.6 Destilación de aceites esenciales por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

La hidrodestilación de las plantas se realizó en un equipo tipo *Clevenger*, con reservorio de destilación *Dean-Stark*, adaptado a un horno de microondas doméstico Samsung, modelo MS32J5133AG, con una potencia de salida de 1.6 kW y una frecuencia de radiación de 2450 MHz. Al balón de destilación (2 L), se adicionaron el material vegetal homogeneizado de hojas, tallos e inflorescencias (100-350 g) y agua destilada (200-350 mL). El tiempo total de extracción fue de 45 o 60 min, dividido en tres o cuatro turnos, cada uno de 15 min, con un tiempo de reposo de cinco minutos. La potencia del horno (600 W) se fijó en 60% de su valor máximo.

Los AE destilados de las plantas bajo estudio, se filtraron y se secaron con Na_2SO_4 anhidro, para evitar su daño por humedad y para preparar las muestras para el análisis cromatográfico.

4.7 Secado del material vegetal

El secado del material vegetal de *H. colombiana*, *S. viminea* y *A. cumanensis*, antes y después de su hidrodestilación, se realizó en el vivero número 2 de CENIVAM (Bucaramanga, Santander, Colombia, N 07°08,422' W 073°06,960'). El procedimiento consistió en registrar el peso inicial de material vegetal y documentar los cambios de su peso, durante varios días consecutivos, hasta llegar a un peso constante del material vegetal. La temperatura y la humedad se registraron usando un termohigrómetro.

4.8 Obtención de extractos vegetales

La extracción del material vegetal con solvente se realizó, según Mejía *et al.* (106), con algunas modificaciones. Con el fin de comparar los rendimientos y la composición química de los extractos, se realizaron dos extracciones utilizando material vegetal seco (a temperatura ambiente), antes y después de su hidrodestilación. El material vegetal seco, molido y homogeneizado (*H. colombiana*, *S. viminea* o *A. cumanensis*) se mezcló con una solución de EtOH: H₂O (70:30, v/v) y se depositó en un baño de ultrasonido (Elmasonic S15H, Singen, Alemania) a 50 °C, durante 1 h. La mezcla se filtró al vacío usando un embudo Büchner (papel filtro Whatman N° 1), un matraz Kitasato y una bomba de vacío (Vacuubrand, Wertheim, Alemania). Los extractos se rotoevaporaron en un equipo Heidolph (Hei-VAP, Advantage HL, Chicago), se secaron en un liofilizador de bandejas VirTis AdVantage Plus (SP Scientific, Gardiner, NY, EE. UU.) y se almacenaron a 4 °C, protegidos de la luz.

4.9 Análisis cromatográfico

4.9.1 Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases

4.9.1.1 Preparación de muestras

El AE se pesó (10 mg) y se disolvió en diclorometano (1 mL) con 500 ppm de *n*-tetradecano (patrón interno), y se inyectó a un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas.

4.9.1.2 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Los AE se analizaron en un cromatógrafo de gases GC 6890 *Plus* (Agilent Technologies, AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector selectivo de masas MS 5973 *Network*

(AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), usando ionización con electrones (EI, 70 eV). Se utilizó helio (99.995%, gas AP, Messer, Bogotá, Colombia) como gas de arrastre, con presión inicial de entrada en la cabeza de la columna de 113.5 kPa, y una velocidad volumétrica de flujo constante de 1 mL/min. El modo de inyección fue *split* (30:1) y la temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C.

La separación de componentes del AE se llevó a cabo en dos columnas capilares, una con fase estacionaria (f.e.) polar de poli(etilenglicol), PEG, (DB-WAX, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.) de 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (d_f) y, otra, con fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), 5%-Ph-PDMS, (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.), con las mismas dimensiones que las de la columna polar. En la columna polar (DB-WAX), el horno se programó desde 50 °C (5 min) hasta 150 °C (7 min), a 4 °C/min y, luego, hasta 230 °C (50 min), a 4 °C/min. En la columna apolar (DB-5MS), la temperatura del horno cromatográfico se programó de 45 °C (5 min) a 150 °C (2 min) a 4 °C/min, luego, hasta 300 °C (10 min), a 5 °C/min. Las temperaturas de la cámara de ionización y del cuadrupolo fueron de 230 y 150 °C, respectivamente. El rango de masas fue *m/z* 45-450 u, con velocidad de adquisición de 3.58 *scan/s*. Los datos se procesaron en el *software MSDChemStation G1701DA* (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.).

La identificación tentativa de los compuestos se basó en la comparación de los tiempos de retención (*t_R*) y los índices de retención lineales, medidos en columnas apolar (DB-5MS) y polar (DB-WAX) con los de las sustancias-patrón o de las bases de datos.

Los índices de retención lineales (LRI, por sus siglas en inglés) se calcularon a partir del tiempo de retención del compuesto de interés y de las sustancias de referencia certificadas de *n*-parafinas C₆-C₂₅ (*Sigma-Aldrich*, St. Louise, MO, EE.UU.).

$$LRI = (100 \times n) + 100 \times \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right]$$

Ecuación 12

Donde:

- LRI** - Índice de retención lineal del compuesto de interés;
n y N - Números de átomos de carbono del *n*-alcano, que eluye antes (n) o después (N) del compuesto de interés;
t_{Rx} - Tiempo de retención del compuesto de interés (min);
t_{RN} y t_{Rn} - Tiempo de retención de *n*-alcano que eluye antes (n) o después (N) del compuesto de interés (min).

Los espectros de masas experimentales de cada compuesto se compararon con los de bases de datos espectrales Adams (2007), NIST (2017) y Wiley (2008). La identificación confirmatoria se realizó con la comparación de sustancias de referencias de limoneno (97%), linalol (97%), (*E*)-β-cariofileno (98.5%), óxido de cariofileno, entre otras, adquiridas de *Sigma-Aldrich* (St. Louise, MO, EE. UU.).

4.9.1.3 Análisis por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama

La cuantificación de compuestos se realizó en un cromatógrafo de gases *AT 6890N* (*Agilent Technologies*, AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un detector de ionización en llama, FID (*Flame Ionization Detector*, por sus siglas en inglés). La separación de componentes del aceite se llevó a cabo en una columna capilar con fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), 5%-Ph-PDMS, (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.) de 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 μm (d_f), usando modo de inyección *split* (1:30); temperatura del inyector

fue 250 °C y el volumen de inyección 1 µL. Temperatura del detector se mantuvo a 280 °C. La temperatura del horno cromatográfico se programó de 50 °C (5 min) a 150 °C (2 min), a 5 °C/min, luego, hasta 230 °C (10 min), a 5 °C/min y, luego, hasta 300 °C (16.5 min), a 10°C/min.

La cuantificación se basó en curvas de calibración usando el método de estándar externo, se utilizaron sustancias-patrón de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, tales como, α -pineno, sabineno, *p*-cimeno, limoneno, linalol, γ -terpineno, (*E*)- β -cariofileno, germacreno D, α -humuleno y óxido de cariofileno. Cada compuesto se pesó (300 mg) y se disolvió en diclorometano (10 mL, grado GC/FID), se realizaron diluciones en un rango de concentración de 3 a 22.260 mg/kg. Los datos se procesaron con el *software Instrument 1: Data Analysis* versión B.04.03-SP1 (2001-2012).

4.9.1.4 Determinación de las figuras analíticas de mérito

Las figuras analíticas de mérito, *i.e.*, repetibilidad, linealidad, sensibilidad y los niveles mínimos de detección (LOD, por sus siglas en inglés) y cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés), se determinaron a partir de los tiempos de retención y áreas cromatográficas de las sustancias de referencia descritos en la **Sección 4.9.1.3**.

Evaluación de repetibilidad del método, para tiempo de retención y área cromatográfica

La repetibilidad y la reproducibilidad del método se calcularon empleando las **Ecuaciones 13-15**, tomando como referencia los coeficientes de variación (CV, %) de los tiempos de retención (t_R) y las áreas de cada sustancia referencia.

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

Ecuación 13

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

Ecuación 14

$$CV, \% = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Ecuación 15

Donde:

- \bar{X} = Promedio de datos;
- X_i = Datos;
- n = Número de datos;
- S = Desviación estándar;
- CV = Coeficiente de variación.

Determinación de la linealidad y la sensibilidad del método

La linealidad y la sensibilidad se determinaron a partir de las curvas de calibración de las sustancias de referencia. El coeficiente de determinación (R^2) de la curva de calibración se utilizó como indicador de linealidad. La sensibilidad se calculó con la pendiente de la recta con un nivel de confianza de 95%. La **Ecuación 16**, representa una recta ajustada, donde A es la pendiente y B es la ordenada de origen. Los valores de A y B se determinaron, según Miller y Miller (107) (**Ecuaciones 16-18**).

$$y = Ax + B$$

Ecuación 16

$$A = \bar{y} + B\bar{x}$$

Ecuación 17

$$B = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^m (X_i - \bar{X})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^m (X_i - \bar{X})^2}$$

Ecuación 18

Donde:

- x_i = Concentración de cada patrón;
- \bar{x} = Promedio de concentraciones;
- y_i = Respuesta en cada punto;

\bar{y} = Promedio de respuesta de patrones.

Determinación de límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se determinaron según Shrivastava y Gupta (108), usando las **Ecuaciones 19-21**, respectivamente.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - y_b)^2}{m-2}}$$

Ecuación 19

$$\text{LOD} = 3 \frac{S_{y/x}}{B}$$

Ecuación 20

$$\text{LOQ} = 10 \frac{S_{y/x}}{B}$$

Ecuación 21

Donde:

- $S_{y/x}$ = Desviación estándar de los residuos de la regresión lineal;
- y_i = Respuesta en cada punto;
- \bar{y} = Promedio de respuesta de patrones;
- m = Número total de puntos en la curva de calibración;
- B = Pendiente de la curva.

4.9.2 *Análisis de extractos vegetales por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas*

4.9.2.1 Preparación de muestras

Los extractos hidroetanólicos se pesaron (1 mg) y se disolvieron en fase móvil (1 mL) MeOH: H₂O (50:50 v/v con 0.1% de ácido fórmico y 5 mM de formiato de amonio) y se filtraron con filtros PVDF (0.22 μm), antes de ser inyectados a un UHPLC-ESI-Orbitrap-MS. Las sustancias-patrón de compuestos fenólicos mencionados en la **Sección 4.1**, se pesaron (1 mg), se disolvieron en fase móvil (1 mL) y se tomaron alícuotas para una concentración final de 2 mg/L.

4.9.2.2 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Los extractos hidroetanólicos se analizaron en un equipo de cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia, UHPLC *Vanquish*TM (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE. UU.), acoplado a un espectrómetro de masas *Q-Exactive Plus Orbitrap* (*Thermo Scientific*, Bremen, Germany), una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II), operada en modo de adquisición de iones positivos y negativos, la temperatura del nebulizador se operó a 350 °C, y el voltaje del capilar 3.5 kV, su temperatura se mantuvo a 320 °C.

La separación de los compuestos fenólicos se realizó en una columna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.), de 50 mm, L x 2.1 mm, I.D. x 1.8 µm de tamaño de partícula, a 40 °C. La fase móvil fue: A - agua (0.1% de ácido fórmico, AF, y 5 mM de formiato de amonio, FA) y B - metanol (AF 0.1% y FA 5 mM). El gradiente de la fase móvil inició con A (100%) y cambió linealmente hasta B (100%), en ocho minutos, se mantuvo constante por cuatro minutos, después regresó a A (100%) en un minuto y se mantuvo en equilibrio por siete minutos. El flujo fue de 0.3 mL/min y el volumen de inyección de 2 µL. El nitrógeno (>99%), producido por un generador NM32LA (*Peak Scientific*, Scotland, Reino Unido), se usó como gas secante y gas nebulizador.

Para el modo *full scan*, se utilizó una resolución del *Orbitrap-MS* de 70.000 *full-width-at-half-maximum* (R_{FWHM} , m/z 200), un control de ganancia automática (AGC) de 1×10^6 , y un tiempo de inyección a la cámara *C-Trap* de 200 ms. Para el modo *step-scan*, se utilizó la celda HCD, el rango de energía de colisión fue 10-70 eV, con la resolución $R_{FWHM} = 35.000$ (m/z 200), AGC= 2×10^5 y un tiempo de inyección de 100 ms a la cámara *C-Trap*. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de masas m/z 80–1000.

Los datos se procesaron con el *software Thermo Xcalibur™ Roadmap*, Versión 3.1.66.10. La identificación de compuestos se realizó comparando los tiempos de retención, espectros de masas, fórmulas moleculares exactas con los de las sustancias-patrón o los de las bases de datos de metabolómica (HMDB) (109) y MassBank (110). La cuantificación de sustancias se realizó usando el método de estándar externo, en modo de adquisición de iones seleccionados (SIM), *i.e.* moléculas protonadas o deprotonadas. Las sustancias-patrón disponibles como ácidos rosmarínico, cafeico y *o*-hidroxibenzoico, pinocembrina, rutina, ácido 3-*O*-cafeoilquínico, kaempferol-3-*O*-rutinosido, salvigenina, apigenina-7-glucurónido, luteolina-7-*O*-glucurónido, ácido 4-*O*-cafeoilquínico y ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico. Cada compuesto se pesó (1 mg), se aforó con metanol (1 mL, grado LC/MS), y se realizaron diluciones en un rango de concentración de 0.01 a 10 µg/mL. Las figuras analíticas de mérito de las sustancias fenólicas se determinaron, según lo descrito en la **Sección 4.9.1.4**.

4.10 Evaluación de la actividad antioxidante

4.10.1 Evaluación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno ORAC

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno se determinó, según Ou *et al.* (111), con algunas modificaciones (112). Las mediciones se realizaron en un lector de microplacas *Varioskan LUX VL0000D0 (Thermo Scientific, Woodlands, República de Singapur)*, usando microplacas negras de 96 pozos. El extracto (1 mg) se pesó y se disolvió en metanol (1 mL), luego, se realizaron diluciones en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7.4); en cada pozo de la placa, se depositaron el extracto diluido (25 µL) y la solución de fluoresceína (150 µL, 0.0838 mM en *buffer* fosfato); la mezcla se incubó a 37 °C (20 min) y se adicionó una solución de AAPH (25 µL, 153 mM, en *buffer* de fosfato). La fluorescencia se midió (37 °C, 90 min) con longitudes de onda de excitación $\lambda = 490$ nm y de emisión $\lambda = 510$ nm. El grado de protección antioxidante se

midió como la diferencia entre el área bajo la curva (AUC) de fluorescencia, obtenida para cada muestra y para el blanco (25 μL de *buffer* fosfato). El Trolox[®] se utilizó como sustancia de referencia, realizando una curva de calibración (7-160 μM) y la quercetina (1 ppm) como sustancia control. Se realizaron tres experimentos ($n = 3$) y los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar de $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de extracto seco.

4.10.2 *Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺*

El ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺ se determinó, según Re *et al.* (113), con algunas modificaciones (112). La prueba se realizó en un lector de microplacas *Varioskan LUX VL0000D0* (*Thermo Scientific*, Woodlands, República de Singapur) usando microplacas transparentes de 96 pozos. El ABTS [7 mM en *buffer* de acetato de sodio (CH_3COONa), pH 4.5] y persulfato de potasio (2.45 mM) se mezclaron y se sonicaron durante 30 min y se almacenaron a 4 °C (24 h) en ausencia de luz, para obtener una solución de ABTS⁺ estable. Después se tomó ABTS⁺ (1000 μL) y se diluyó en *buffer* acetato (50 mL) hasta obtener una absorbancia de 0.71 ± 0.02 , a $\lambda = 750$ nm. La mezcla se almacenó a 4 °C (30 min) antes de su uso.

Los extractos (10-20 mg) o AE (20 mg) se pesaron y se disolvieron en metanol (1 mL, grado HPLC). El extracto diluido o AE (10 μL) y la solución de ABTS⁺ (190 μL) se depositaron en cada pozo de la placa y la absorbancia se midió durante 60 min. En cada placa se realizó un blanco (10 μL de *buffer* de acetato y solución de ABTS⁺ 190 μL), cuyo valor de absorbancia estuvo siempre en 0.71 ± 0.02 . El porcentaje de inhibición para cada muestra se calculó con la

Ecuación 22.

$$\text{Inhibición, \%} = \frac{(\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco}})}{\text{Absorbancia}_{\text{blanco}}} \times 100$$

Ecuación 22

El Trolox[®] se utilizó como sustancia de referencia, realizando previamente una curva de calibración (50 μ M-550 μ M), y la quercetina (20 ppm), como sustancia control. Para cada concentración de la curva se calculó el porcentaje de inhibición. La capacidad antioxidante de los extractos y los AE se midió por triplicado ($n = 3$) y los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar de μ mol Trolox[®]/g de extracto seco o de AE.

4.10.3 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺, por on-line HPLC/ABTS⁺

El ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺ se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Sierra (114). La prueba se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC 1200 Infinity (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un derivatizador post-columna *Pinnacle PCX* (Pickering Laboratories, Mountain View, CA, EE. UU.).

El análisis cromatográfico se realizó con una columna *GEMINI C₁₈* de 100 mm de longitud x 4.6 mm D.I. x 5 μ m de tamaño de partícula (*Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.*). El cromatógrafo estaba equipado con una unidad integrada de desgasificación de solventes, una bomba cuaternaria (G1311C), un inyector automático (G1329B), una unidad termostataada para columna (G1316A), un detector de arreglo de diodos (DAD, G1315D) y un detector de longitud de onda múltiple MWD G1365D (MWD, por sus siglas en inglés), todos suministrados por *Agilent Technologies*. Se inyectaron a la columna 10 μ L de cada extracto. La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C. La fase móvil que se empleo fue solución acuosa (A, agua tipo I con 0.5 % (v/v) de AF) y fase orgánica (B, acetonitrilo grado HPLC), con un flujo de 1 mL/min y gradiente de elución programado de A, 98% (0 min); A, 88% (15 min); A, 88% (15-23 min); A, 60% (46 min); A, 10% A (71 min); A, 10% (71-75 min); A, 98% (80-85 min). El detector DAD midió las señales se ajustó a las longitudes de onda $\lambda = 245, 270, 290, 425$ y 515 nm.

El derivatizador estaba conformado por dos bombas para flujos continuos, con capacidad para almacenar 70 mL, dos mezcladores, un reactor térmico (1.4 mL), a una temperatura de 130 °C, un reactor operado a temperatura ambiente, un sistema de suministro de nitrógeno y un compartimiento para columna cuya temperatura se mantuvo a 30°C.

El catión-radical se generó durante la oxidación de ABTS con persulfato de potasio (PDS), en una relación molar 2.9:1. La solución *stock* de ABTS^{•+} se preparó por contacto directo de ABTS (110 mL, 2 mM, en agua tipo I) y PDS (0.7 mM; en agua tipo I); la mezcla se almacenó en la oscuridad (27 °C), durante 17 h, hasta obtener un catión-radical estable. Los tiempos de corrida en el HPLC y el derivatizador fueron iguales (90 min), se estableció un tiempo de equilibrio (2 min), después de cada corrida, para cargar la bomba con el volumen necesario de ABTS^{•+}. El flujo de la bomba fue de 0.5 mL/min, con un tiempo de reacción entre el ABTS^{•+} y el eluato de 56 s.

La solución de ABTS^{•+} (79 µM) se depositó en el reservorio del equipo para lograr una absorbancia (0.71 ± 0.02), igual a la establecida en el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}, que se realizó en el lector de microplacas (**Sección 4.10.2**). Los extractos se pesaron (5-15 mg) y se disolvieron en una solución de MeOH grado HPLC (0.5% del AF). La galangina (30 ppm) se utilizó como estándar interno.

Los datos se procesaron en el *software* AT *ChemStation*, versión B.0.03-SR1. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los tiempos de retención y de sus espectros UV-Vis con los de las sustancias de referencia (rutina, nepetina, apigenina-7-glucurónido, ácidos rosmarínico y cafeico). La capacidad antioxidante se determinó usando una curva de calibración con Trolox[®] (12-400 µM). Las mediciones se realizaron por duplicado y los

resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar de $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de extracto.

4.11 Análisis de datos

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). El análisis de varianza ANOVA se usó para determinar las diferencias significativas entre los datos sobre rendimiento de extracción, composición química y actividad antioxidante. Se realizaron pruebas de *Tukey* para determinar diferencias significativas entre los AE o extractos, obtenidos de plantas cosechadas en los estados vegetativo, floración y post-floración. Un valor de probabilidad de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. También, se realizó el análisis de componentes principales y de conglomerados utilizando el método de Ward. Los datos se procesaron en *Microsoft Excel* 2015 y en los *softwares* estadísticos *InfoStat* 2018 y *Statgraphics* Centurion XVI 2009.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación taxonómica

Las identificaciones taxonómicas de las plantas de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis* fueron realizadas en el Herbario Nacional Colombiano, por el botánico, Dr José Luis FERNÁNDEZ ALONSO, del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (**Tabla 2**), quien actualmente trabaja como investigador en el Real Jardín Botánico de Madrid, España.

Tabla 2.

Identificaciones taxonómicas de las plantas de S. viminea, H. colombiana y A. cumanensis.

Especie	Familia	Voucher, N°
<i>Satureja viminea</i>	Lamiaceae	COL 566449
<i>Hyptis colombiana</i>		COL 578972
<i>Ambrosia cumanensis</i>	Asteraceae	COL 579246

5.2 Cultivos experimentales de las plantas

Los cultivos experimentales de las plantas de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis* se establecieron desde el 2021 en las parcelas experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM, y en la zona de cultivos experimentales de la sede UIS-Barbosa en el marco del proyecto del SGR.

Las plantas de *S. viminea* se propagaron por cogollos que requirieron de dos semanas para la etapa de enraizamiento y ocho semanas más para su trasplante a tierra. Las plántulas se adaptaron bien a las condiciones ambientales y no fueron atacadas por plagas o enfermedades; sin

embargo, su crecimiento fue muy lento, ya que después de tres meses de su siembra, alcanzaron una altura de solo 15 cm. Las plantas requieren de periodos de sequía y abundante sol para alcanzar el estado fenológico de floración, por tanto, en época de lluvia se demoran más tiempo para florecer o no alcanzan este estado fenológico. En CENIVAM se sembraron 21 plantas y en la sede UIS-Barbosa se sembraron 750 plantas (400 m²). Según la información suministrada por el equipo agronómico en la sede UIS-Barbosa es posible cultivar hasta 30.000 plantas por hectárea de *S. viminea*, las cuales se podrían cosechar dos veces al año.

Las plantas de *H. colombiana* se propagaron por semillas, alrededor de 1000 unidades, en bandejas de germinación que contenían una mezcla de abono orgánico (50%), tierra (40%) y arena (10%). Las semillas germinaron dos semanas, después de su siembra, en condiciones de humedad entre 70 y 80%, con una baja exposición al sol. Pasados dos meses, ca. 650 plántulas se trasladaron al suelo, con una profundidad de 10 cm. El cultivo de *H. colombiana* mostró resistencia a plagas y enfermedades y presentó una buena adaptación al hábitat. Las plantas de *H. colombiana* florecieron, después de tres meses de su paso a tierra. Sus flores, de color lila, desprenden una fragancia que atrae abejas y mariposas. Estas plantas tienen tallos grandes y no se ven afectadas por los periodos largos de sequía. En las condiciones agronómicas ensayadas se podrían cultivar 33.000 plantas de *H. colombiana* por hectárea; en el año, las plantas se cosechan hasta cuatro veces en periodo vegetativo o tres veces en floración o post-floración.

Las plantas de *A. cumanensis* se propagaron por semillas, cogollos y esquejes; la propagación por cogollos generó la tasa de enraizamiento más alta (81.8%). Las plántulas permanecieron diez semanas en el vivero del CENIVAM, antes de su siembra en tierra, con una profundidad de 10-15 cm. Las plantas de *A. cumanensis* son de rápido crecimiento y propagación, resisten a plagas y enfermedades y no se ven afectadas por la humedad alta del suelo. En cuatro

meses, la planta de *Ambrosia cumanensis* alcanza una altura de 1.5 m. Las plantas producen semillas maduras, se forman nuevos rebrotes florales permitiendo que la planta mantenga la producción de semillas por un largo periodo de tiempo. En la sede UIS-Barbosa se sembraron 250 plantas en 100 m², en una hectárea es posible sembrar hasta 25.000 plantas, que se podrían cosechar en el periodo vegetativo cuatro veces por año, o tres veces en los periodos de floración o post-floración.

De cada cultivo experimental de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis* establecido en CENIVAM, se seleccionaron de diez a catorce plantas sanas y vigorosas para su seguimiento, observación y corte en cada estado fenológico bajo estudio. Cada semana, los cultivos se monitorearon y la escala BBCH se usó para determinar e identificar en cada especie los estados vegetativos, floración y post-floración.

En la **Tabla 3**, aparece la información sobre el número de cosechas realizadas para cada especie vegetal. En general, el corte de las plantas se realizó cuando el 80% de los individuos se encontraba en vegetativo, floración o post-floración. Para determinar el efecto de las condiciones ambientales sobre las composiciones químicas de los AE y extractos de plantas en cada estado fenológico, la cosecha se realizó en un mismo día de plantas en los estados vegetativo, floración y post-floración. Véase en la **Tabla 3** la última cosecha descrita para cada especie.

Tabla 3.

Fechas de colecta de las plantas de S. viminea, H. colombiana y A. cumanensis, recolectados en los estados vegetativo, floración y post-floración.

Especie	N° Cosecha	Vegetativo			Floración			Post-floración		
		Fecha	Temperatura, °C	Humedad, %	Fecha	Temperatura, °C	Humedad, %	Fecha	Temperatura, °C	Humedad, %
<i>S. viminea</i>	1	27-07-2022	39.9	54	11-04-2022	40.0	67	21-06-2022	26.1	85
	2	24-10-2022	31.1	71	24-10-2022	31.1	71	24-10-2022	31.1	71
	3	23-11-2022	41.6	48	-	-	-	25-01-2023	36.2	46
	4	18-04-2023	27.8	84	18-04-2023	27.8	84	18-04-2023	27.8	84
<i>H. colombiana</i>	1	1-10-2021	28.3	45	30-03-2022	28.3	73	21-01-2022	28.8	44
	2	28-06-2022	24.6	92	24-11-2022	25.0	64	-	-	-
	3	12-01-2023	31.8	69	12-01-2023	31.8	69	12-01-2023	31.8	69
<i>A. cumanensis</i>	1	18-01-2022	24.8	69	16-05-2022	27.2	84	19-11-2021	26.8	53
	2	-	-	-	17-08-2022	38.9	34	26-08-2022	29.7	71
	3	1-09-2022	26.7	82	1-09-2022	26.7	82	1-09-2022	26.7	82

La temperatura del ambiente y la humedad relativa se midieron con un termohigrómetro portátil a las 10:00 am y 5:00 pm.

5.3 Rendimientos de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos

En la **Tabla 4** se muestran los rendimientos (%) de los AE obtenidos por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD, por sus siglas en inglés) del material vegetal de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis*, cosechado en los tres estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración.

Tabla 4.

Rendimientos (%) de los aceites esenciales, de plantas de S. viminea, H. colombiana y A. cumanensis, recolectadas en sus diferentes estados fenológicos.

Especie	Estado del MV	Estado fenológico	Fechas de colecta	Número total de réplicas, <i>n</i>	Aceite esencial		
					Rendimiento, % p/p ± s		
<i>S. viminea</i>	Fresco	Vegetativo	27-07-2022 24-10-2022 23-11-2022	9	0.9	±	0.2
		Floración	11-04-2022 24-10-2022	6	0.95	±	0.02
		Post-floración	21-06-2022 24-10-2022 25-01-2023	9	0.8	±	0.1
<i>H. colombiana</i>	Seco	Vegetativo	1-10-2021 28-06-2022	6	0.1	±	0.1
		Floración	30-03-2022 24-11-2022 12-01-2023	9	0.14	±	0.05
		Post-floración	21-01-2022 12-01-2023	6	0.05	±	0.03
<i>A. cumanensis</i>	Fresco	Vegetativo	18-01-2022 1-09-2022	6	0.03	±	0.01
		Floración	16-05-2022 17-08-2022 1-09-2022	9	0.02	±	0.01
		Post-floración	19-11-2021 26-08-2022 1-09-2022	6	0.03	±	0.01

MV: Material vegetal. El material vegetal de cada cosecha se procesó por triplicado para obtener el número total de réplicas, *n*.

Los rendimientos de los AE de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis*, para los tres estados fenológicos no presentaron variaciones apreciables, según la prueba de *Tukey* ($p > 0.05$), (**Tabla A6, Anexo**).

Los AE destilados de *S. viminea* tuvieron los rendimientos más altos (0.8-0.9%, p/p), similares a los reportados por Stashenko *et al.* (31) para el AE destilado de plantas de *S. viminea* ($0.90 \pm 0.09\%$, p/p) en 2017. Los rendimientos de los AE destilados de *H. colombiana* (0.05-0.14%, p/p) y *A. cumanensis* (0.02-0.03%, p/p) fueron más bajos que los reportados por Flores *et al.* (27) para plantas de *H. colombiana* (0.4%, v/p) cultivadas en Venezuela y, por Yáñez *et al.* (33), para plantas de *A. peruviana* (*A. cumanensis*) (0.09 %, p/p).

Las plantas frescas, antes de destilar, y el material vegetal, después de la destilación (biomasa residual) se secaron a temperatura ambiente, durante diez días, teniendo pérdidas de alrededor del 70-80% de humedad. El material vegetal seco, antes o después de su destilación, se utilizó para obtener extractos hidroalcohólicos, y cuyos rendimientos se reportan en la **Tabla 5**.

Tabla 5.

Rendimientos (%) de los extractos hidroetanólicos de S. viminea, H. colombiana y A. cumanensis, obtenidos antes y después de su destilación.

Especie	Rendimiento, % p/p \pm s											
	Vegetativo				Floración				Post-floración			
	n	AD	n	DD	n	AD	n	DD	n	AD	n	DD
<i>S. viminea</i>	12	9 \pm 2	9	9 \pm 1	9	11 \pm 1	6	13.0 \pm 0.5	12	10 \pm 2	9	12 \pm 1
<i>H. colombiana</i>	9	10 \pm 3	6	6 \pm 3	9	10 \pm 3	9	10 \pm 3	6	10 \pm 2	6	10 \pm 1
<i>A. cumanensis</i>	6	8 \pm 6	6	7 \pm 3	9	7 \pm 1	9	6.0 \pm 0.9	9	7 \pm 1	6	7 \pm 1

AD: Antes de su destilación. DD: Después de su destilación.

n: Número de réplicas totales

Los rendimientos de extracción con solvente hidroetanólico de plantas de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis*, antes y después de su destilación, de las plantas recolectadas en los tres estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración, no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) (**Tabla A6, Anexo**). Los rendimientos de los extractos de *S. viminea* e *H. colombiana* fueron más altos que los de *A. cumanensis*.

El rendimiento promedio ($10 \pm 1\%$ p/p) de los extractos hidroalcohólicos del material vegetal de *S. viminea* sin destilar fue similar al reportado por Melaku *et al.* (115), para el extracto de las plantas frescas de otra especie, *i.e.*, *S. punctata* (12.56%). Los rendimientos de extractos etanólicos de material vegetal fresco (sin destilar) de partes aéreas de *H. suaveolens*, reportados por Mandal *et al.* (116) (2.64%, p/p) y por Medoatinsa (117) (8%, p/p), fueron menores que los obtenidos de material vegetal de *H. colombiana* (10%, p/p) estudiada aquí. Hasta el momento, no se encontraron reportes sobre extractos hidroalcohólicos de plantas de *H. colombiana*. En cuanto, a la extracción hidroalcohólica de *A. cumanensis* de material vegetal antes y después de su destilación, se registró un rendimiento promedio de $7.0 \pm 0.6\%$ (p/p). Castro *et al.* (65), realizaron la extracción etanólica de las hojas de plantas sin destilar de *A. cumanensis* y obtuvo un rendimiento (5.8%) similar al obtenido en este estudio. Es importante destacar, que los valores de los rendimientos de extracción de la biomasa residual, que queda después de la destilación de las tres plantas estudiadas, no presentaron una disminución apreciable al ser comparados con los obtenidos del material vegetal sin destilar (**Tabla A7, Anexo**).

5.4 Composiciones químicas de los aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos

5.4.1 Estudio de *Satureja viminea*

En los AE de *S. viminea* se detectaron 26 compuestos en cantidades relativas $>0.1\%$, de los cuales, se identificaron positivamente 22 compuestos (92% del GC área relativa total). Los AE de *S. viminea* están compuestos principalmente por monoterpenos oxigenados (70%) e hidrocarburos sesquiterpénicos (20%), (Véase **Tabla 6**). En la **Figura 8**, se muestran los perfiles cromatográficos de los AE, destilados por MWHD, de las plantas de *S. viminea*, cosechadas en tres etapas fenológicas.

En la **Tabla 7**, se muestra la cuantificación de los compuestos mayoritarios (áreas relativas $\geq 0.5\%$) presentes en los AE de *S. viminea*. En las **Tablas A1 y A2 (Anexo)**, se muestran las figuras analíticas de mérito encontradas para las sustancias-patrón utilizadas para la cuantificación de los compuestos mayoritarios en los AE de *S. viminea*.

Figura 8.

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los aceites esenciales de *S. viminea*, destilados de plantas recolectadas en los tres estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Columna DB-5MS (60 m), split 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos cromatográficos en la **Tabla 6.**

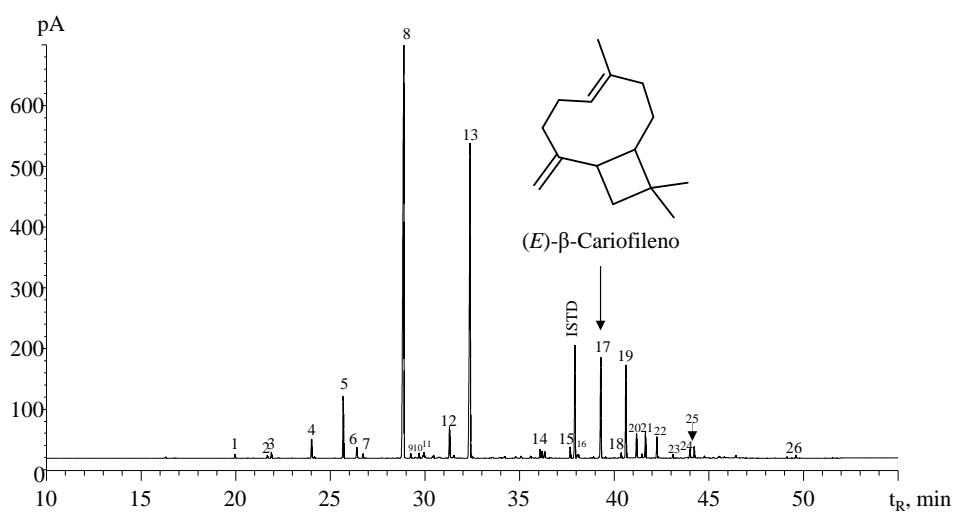
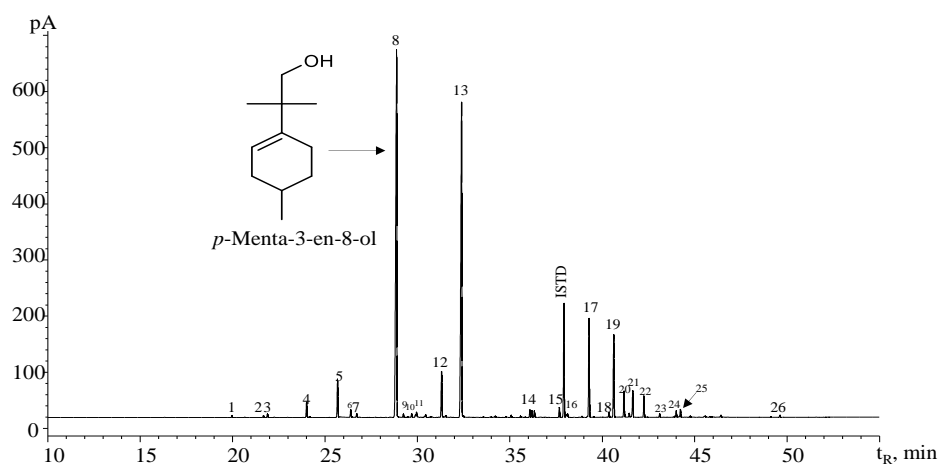
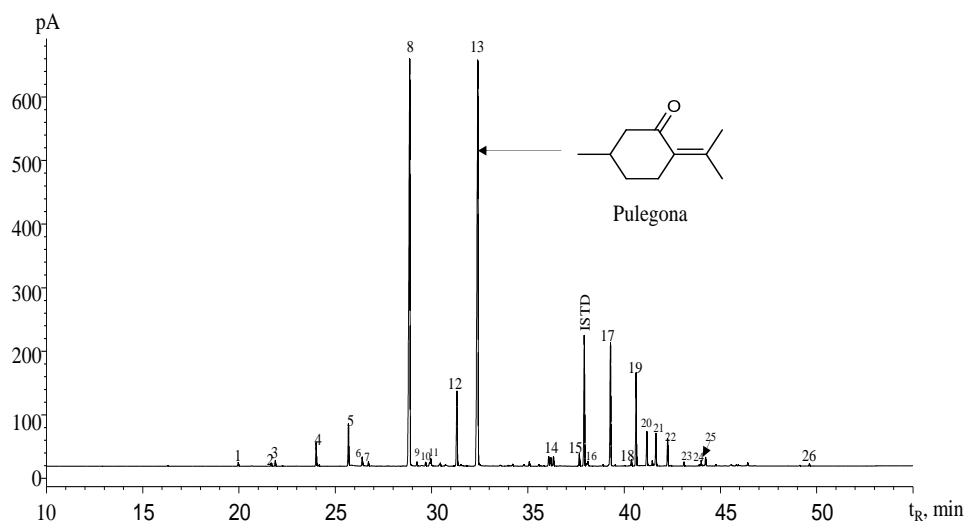


Tabla 6.

Composición química, determinada por GC/MS/FID, de los aceites esenciales destilados por MWHD de plantas de *S. viminea*, cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico.

N° Fig. 8	Compuesto	GC/ MS (DB-5MS)			GC/MS (DB-WAX)			Cantidad relativa GC/FID (%; valor \pm s)			Criterios de identificación
		LRI _{exp}	LRI _{STD}	LRI _{lit}	LRI _{exp}	LRI _{STD}	LRI _{lit}	Vegetativo (n=9) *	Floración (n=6) **	Post-floración (n=9) ***	
1	α -Pinoeno	936	937	936 (118)	1023	1024	1025 (118)	0.20 \pm 0.02	0.20 \pm 0.05	0.20 \pm 0.07	a, b, c
2	Sabineno	975	976	975 (119)	1123	1124	1122 (118)	0.16 \pm 0.01	0.17 \pm 0.02	0.10 \pm 0.06	a, b, c
3	β -Pinoeno	981	-	981 (120)	1111	-	1110 (118)	0.30 \pm 0.02	0.32 \pm 0.01	0.30 \pm 0.09	a, b
4	Limoneno	1032	1033	1030 (120)	1202	1202	1198 (118)	1.0 \pm 0.2	1.4 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	a, b, c
5	<i>p</i> -Menta-3,8-dieno	1074	-	1072 (119)	1270	-	1271 (121)	2.0 \pm 0.2	2.0 \pm 0.6	2 \pm 1	a, b
6	Terpinoleno	1089	-	1087 (118)	1286	-	1282 (118)	0.50 \pm 0.09	0.4 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2	a, b
7	Linalol	1100	1102	1099 (118)	1550	1551	1549 (122)	0.23 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	a, b, c
8	<i>p</i> -Menta-3-en-8-ol	1159	-	1148 (31)	1620	-	1621 (123)	36 \pm 3	35 \pm 2	40 \pm 3	a, b
9	<i>iso</i> -Pulegol (<i>neiso</i>)	1165	-	1167 (119)	1570	-	-	0.23 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02	0.27 \pm 0.01	a, b, c
10	C ₁₀ H ₁₈ O (Figura A3, Anexo)	1176	-	-	1576	-	-	0.20 \pm 0.04	0.30 \pm 0.06	0.3 \pm 0.1	b
11	(<i>E</i>)- <i>iso</i> -Pulegona	1181	-	1176 (118)	1585	-	1596 (118)	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.3	0.3 \pm 0.1	a, b
12	(<i>Z</i>)-Pulegol	1218	-	1226 (119)	1732	-	-	5.0 \pm 0.8	3.0 \pm 0.7	3 \pm 1	a, b
13	Pulegona	1247	-	1243 (124)	1662	-	1665 (125)	30 \pm 3	30 \pm 1	27 \pm 1	a, b
14	Piperitenona	1344	-	1341 (118)	1932	-	1909 (118)	0.55 \pm 0.02	0.50 \pm 0.06	0.50 \pm 0.03	a, b
15	α -Copaeno	1385	-	1380 (126)	1502	-	1496 (127)	0.80 \pm 0.08	0.8 \pm 0.1	0.80 \pm 0.07	a, b
16	β -Bourboneno	1392	-	1392 (128)	1530	-	1526 (120)	0.20 \pm 0.03	0.20 \pm 0.06	0.22 \pm 0.01	a, b
17	(<i>E</i>)- β -Cariofileno	1434	1434	1428 (120)	1611	1611	1617 (120)	8.0 \pm 0.5	8 \pm 1	8.0 \pm 0.9	a, b, c
18	α -Humuleno	1469	1465	1465 (120)	1682	1683	1681 (129)	1 \pm 1	0.40 \pm 0.06	0.40 \pm 0.05	a, b, c
19	C ₁₅ H ₂₄ (Figura A4, Anexo)	1472	-	-	1536	-	-	5 \pm 1	7 \pm 1	7.0 \pm 0.7	b
20	Germacreno D	1493	1490	1489 (128)	1719	1716	1708 (118)	2.0 \pm 0.2	2.0 \pm 0.4	2.0 \pm 0.5	a, b
21	Biciclogermacreno	1508	-	1502 (130)	1743	-	1738 (131)	1.90 \pm 0.09	2.5 \pm 0.8	2.0 \pm 0.7	a, b
22	δ -Cadineno	1527	-	1524 (120)	1763	-	1761 (120)	1.0 \pm 0.3	1.6 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	a, b

Tabla 6. Continuación

23	(E)-Nerolidol	1563	-	1561 (118)	2042	-	2036 (118)	0.23 ± 0.02	0.30 ± 0.07	0.30 ± 0.04	a, b
24	C ₁₅ H ₂₄ O (Figura A5, Anexo)	1588	-	-	2125	-	-	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.60 ± 0.03	b
25	Óxido de cariofileno	1597	1598	1595 (130)	1993	1996	1993 (132)	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.70 ± 0.04	a, b, c
26	N.I. (Figura A6, Anexo)	1812	-	-	1935	-	-	0.14 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.05	b
Hidrocarburos monoterpénicos, %								4.80 ± 0.04	5.0 ± 0.1	4.7 ± 0.1	
Monoterpenos oxigenados, %								73.0 ± 0.6	70.0 ± 0.3	71.0 ± 0.5	
Hidrocarburos sesquiterpénicos, %								20.3 ± 0.1	23.0 ± 0.2	22.0 ± 0.1	
Sesquiterpenos oxigenados, %								1.40 ± 0.04	1.90 ± 0.09	1.87 ± 0.02	

* Valores promedio determinados en los AE de plantas de *S. viminea* cosechada tres veces en estado vegetativo y analizadas por triplicado. Fechas: 27-07-2022; 24-10-2022; 23-11-2022.

** Valores promedio determinados en los AE de plantas de *S. viminea* cosechada dos veces en estado floración y analizadas por triplicado. Fechas: 11-04-2022; 24-10-2022.

*** Valores promedio determinados en los AE de plantas de *S. viminea* cosechada tres veces en estado post-floración y analizadas por triplicado. Fechas: 21-06-2022; 24-10-2022; 25-01-2023.

^a Identificación tentativa basada en tiempos de retención (t_R) e índices de retención lineales (LRI, por sus siglas en inglés) en las columnas DB-5MS (apolar) y DB-WAX (polar) (31, 118-132).

^b Identificación tentativa basada en el espectro de masas (MS; ionización electrónica, 70 eV, coincidencia > 95%), estudio del patrón de fragmentación, y por comparación de los MS en bases de datos espectrales Adams (2007), NIST (2017) y Wiley (2008).

^c Identificación confirmatoria basada en sustancias-patrón α-pineno (98%), sabineno (95%), limoneno (97%), linalol (97%), (E)-β-cariofileno (99%), α-humuleno (96%), germacreno D (90%), óxido de cariofileno (95%), adquiridas en *Sigma-Aldrich* y sus espectros de masas y tiempos de retención (t_R).

STD: Sustancia-patrn.

Tabla 7.

Cuantificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales, destilados por MWHD, de plantas de *S. viminea* cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico.

Compuesto	Tipo	mg compuesto/g AE \pm s		
		Estados fenológicos		
		Vegetativo (n=9) *	Floración (n=6) **	Post-floración (n=9) ***
Limoneno	HM	20 \pm 3	20 \pm 2	10 \pm 4
<i>p</i> -Menta-3,8-dieno ¹	HM	30 \pm 4	30 \pm 9	30 \pm 20
Terpinoleno ¹	HM	7 \pm 1	5 \pm 3	6 \pm 3
<i>p</i> -Menta-3-en-8-ol ²	MO	380 \pm 37	340 \pm 46	300 \pm 71
(<i>Z</i>)-Pulegol ²	MO	60 \pm 11	30 \pm 9	40 \pm 12
Pulegona ²	MO	330 \pm 58	280 \pm 42	260 \pm 36
Piperitenona ²	MO	6.0 \pm 0.6	5.0 \pm 0.9	5.0 \pm 0.3
α -Copaeno ³	HS	9.6 \pm 0.2	9.0 \pm 0.6	9.0 \pm 0.5
(<i>E</i>)- β -Cariofileno	HS	80 \pm 1	77 \pm 2	73 \pm 2
α -Humuleno	HS	3.90 \pm 0.08	3.6 \pm 0.1	3.4 \pm 0.2
Germacreno D ³	HS	20 \pm 2	20 \pm 2	20 \pm 2
Biciclogermacreno ³	HS	20 \pm 1	20 \pm 5	20 \pm 3
δ -Cadineno ³	HS	18.0 \pm 0.5	16 \pm 1	16 \pm 1
Óxido de cariofileno	SO	7.0 \pm 0.8	20 \pm 1	8.3 \pm 0.6

* Valores promedio determinados para los AE de plantas de *S. viminea* cosechadas tres veces en estado vegetativo y analizadas por triplicado. Fechas: 27-07-2022; 24-10-2022; 23-11-2022.

** Valores promedio determinados para los AE de plantas de *S. viminea* cosechadas dos veces en estado floración y analizadas por triplicado. Fechas: 11-04-2022; 24-10-2022.

*** Valores promedio determinados para los AE de plantas de *S. viminea* cosechadas tres veces en estado post-floración y analizadas por triplicado. Fechas: 21-06-2022; 24-10-2022; 25-01-2023.

HM: Hidrocarburos monoterpénico; MO: Monoterpenos oxigenados; HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos; SO: Sesquiterpenos oxigenados.

¹ Cantidad expresada en equivalente de limoneno.

² Cantidad expresada en equivalente de carvacrol.

³ Cantidad expresada en equivalente de (*E*)- β -cariofileno.

El *p*-menta-3-en-8-ol (380 mg sustancia/g de AE) y la pulegona (330 mg sustancia/g de AE) fueron los compuestos más abundantes en los AE de *S. viminea*, destilados de plantas recolectadas en las tres etapas vegetativas (**Tabla 7**). Las cantidades promedio (mg/g) de limoneno, *p*-menta-3-en-8-ol, pulegona, *p*-menta-3,8-dieno y (*Z*)-pulegol, no presentaron diferencias significativas (**Tabla A8, Anexo**) en los AE destilados de plantas en los tres estados, vegetativo, floración y post-floración. Sin embargo, el (*E*)- β -cariofileno y óxido de cariofileno si presentaron cambios cuantitativos apreciables en los AE destilados de las plantas recolectadas en los tres estados fenológicos.

En la **Figura 9**, se realizó el análisis de componentes principales usando los resultados de la cuantificación de compuestos mayoritarios en los AE de *S. viminea*. El análisis estadístico permitió la construcción de una gráfica en 3D, con tres componentes que explican *ca.* el 90% de los datos. Los AE de *S. viminea* se ubicaron espacialmente cerca a los vectores que describen los compuestos que son más abundantes o representativos de cada muestra, por ejemplo, el AE obtenido de plantas cosechadas en estado vegetativo (**Figura 9, V-C2**) se posicionó muy cerca al vector asociado a la pulegona porque es la muestra con el contenido más alto de este compuesto. Además, se realizó un análisis de conglomerados (zonas azul, rosado y amarillo, **Figura A27 Anexo**), que permitió agrupar las muestras con composiciones químicas muy similares, lo anterior, con el propósito de seleccionar el estado fenológico propicio para colectar las plantas que al destilarse no presenten variaciones altas en la composición química de su AE, también, para determinar si los AE de las plantas colectadas en un mismo día tienen cambios en las abundancias de sus componentes debido a los estados fenológicos y/o las condiciones ambientales.

En la **Figura 9**, la componente 1 (41%) explicó la mayor variabilidad de los datos; las sustancias que más aportaron fueron: pulegona, *p*-menta-3-en-8-ol y *p*-menta-3,8-dieno. Los AE en el estado vegetativo se agruparon porque contienen los contenidos más altos de pulegona y (*E*)- β -cariofileno, y las cantidades más bajas de óxido de cariofileno.

En cambio, los AE de *S. viminea* destilados durante la floración (F-C1 y F-C2) se aglomeraron sobre la componente 2 (30%) porque tienen contenidos altos de óxido de cariofileno. Los AE destilados de plantas en post-floración durante la primera y tercera cosechas (PF-C1 y PF-C3) tuvieron menores contenidos de limoneno en comparación con el obtenido durante la segunda cosecha (PF-C2); es decir, que hay dispersión en las cantidades encontradas de este monoterpeno.

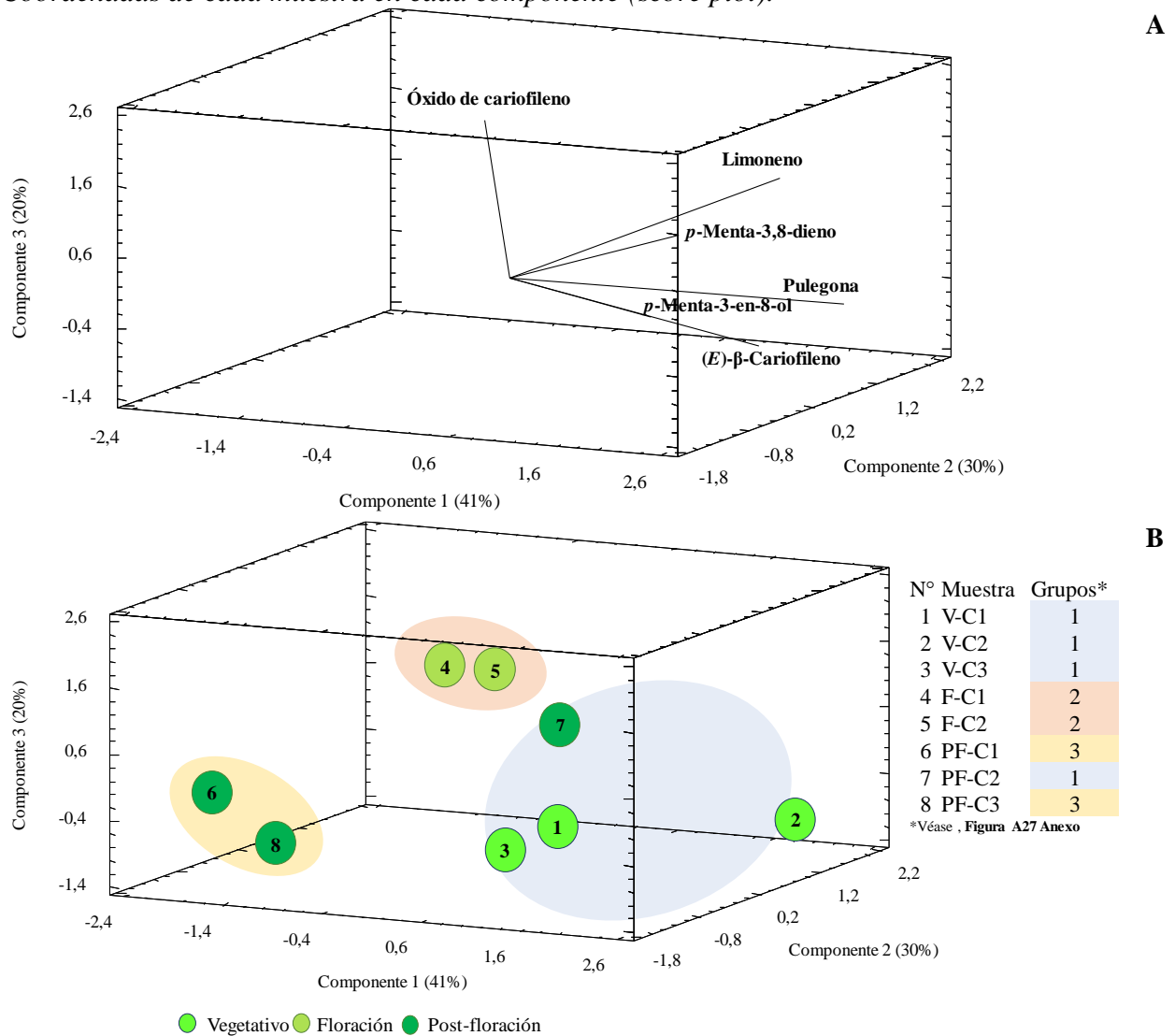
Las composiciones químicas de los AE obtenidos de plantas en floración, cortadas en diferentes meses, presentaron las variaciones más bajas entre las diferentes cosechas realizadas; por tanto, estas muestras se agruparon en la región rosada (**Figura 9**). Esta tendencia también se observó para los AE destilados de plantas en vegetativo, los cuales se aglomeraron en la región azul (**Grupo 1 en Figura 9 y Figura A27 Anexo**). Los pequeños cambios detectados en las composiciones químicas de los AE de plantas en floración y en vegetativo podrían atribuirse a los factores abióticos (temperatura, humedad, luz, precipitaciones, entre otros) de cada época de cosecha.

Los AE de las plantas colectadas en vegetativo (V-C2), floración (F-C2) y post-floración (PF-C2), **durante el mismo día**, presentaron diferencias grandes en las cantidades de sus metabolitos secundarios, ya que, en el gráfico 3D, cada muestra se ubicó en una región diferente. Por tanto, el estado fenológico incidió directamente sobre las variaciones altas que se

evidenciaron en las composiciones químicas de los AE de plantas cosechadas bajo las mismas condiciones ambientales.

Figura 9.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los aceites esenciales de S. viminea colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. A. Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y B. Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).



El limoneno en los AE destilados de *S. viminea* en post-floración presentaron las menores cantidades (**Figura 9**). En las plantas, el limoneno actúa en las plantas como un atrayente de los polinizadores y en defensa de los herbívoros. En un estudio (133) se reportó que mientras la planta pasa de tener brotes a la plena floración, hay un incremento del 5% del contenido limoneno, que podría atraer polinizadores. También, se encontró que, a medida que las hojas de la planta maduraban, disminuía la emisión de limoneno, ya que las hojas jóvenes son más vulnerables al ataque por herbívoros y en ellas la producción de limoneno incrementa (133). En los AE de *S. viminea*, en estado de floración, la cantidad de limoneno fue más alta, pero se redujo en las plantas en el estado de post-floración, debido, posiblemente, porque durante la floración necesita atraer más insectos para polinizar las flores.

En los AE de *S. viminea*, la pulegona aporta un olor característico a menta. La pulegona es el compuesto mayoritario en el AE de *Mentha pulegium* (poleo) (70%) (134), también, en bajas cantidades se ha detectado en los AE de *Mentha spicata* (0.3%) (135) y *Mentha piperita* (1.84%) (136). Los AE que contienen pulegona se usan para otorgar olor a detergentes, cosméticos, productos de higiene oral; también, se incorporan a la formulación de repelentes de insectos, gaseosas y chocolates. Sin embargo, la pulegona es tóxica en concentraciones altas (150-400 mg/kg) (49), debido a que en el organismo se metaboliza mentofurano, que puede causar daño hepático. La India es el principal productor de AE de menta (sin incluir *Mentha piperita*), en 2021 exportaron 10.000 tons de aceite esencial de menta que fueron valoradas en 176 millones de USD (137).

En los AE de *S. viminea*, de Costa Rica (30), Colombia (31), y los adquiridos en un mercado de los Estados Unidos y los de procedencia de Costa Rica (32), los compuestos

mayoritarios eran *p*-menta-3-en-8-ol (51.7%, 40.0% y 48.1%), pulegona (17.8%, 35.3% y 14.4%) y (*E*)- β -cariofileno (4.7%, 3.6% y 4.7%), respectivamente. En los AE destilados de plantas de *S. viminea*, recolectadas durante los tres estados fenológicos, en este estudio, también, se encontraron, mayoritariamente, estos compuestos. En la literatura, se encontró un reporte (138) sobre la actividad analgésica del AE de *S. viminea*.

El AE de *S. viminea* posee una fragancia agradable y rendimiento relativamente alto (0.9 % p/p), su composición química lo convierte en un candidato bueno para incorporarse como fragancias en detergentes y cosméticos (cremas corporales), teniendo en cuenta los valores aceptables de pulegona en los productos finales. Por ejemplo, para productos de aseo del hogar, que estén en contacto con las manos, se recomienda hasta un 2.7 % de pulegona (139). En esta investigación, se determinó que las plantas de *S. viminea* se podrían cosechar dos veces por año, con posibilidad de destilar hasta 290 kg del AE, con una siembra de *ca.* 30.000 plantas por hectárea.

Los extractos hidroalcohólicos de *S. viminea*, obtenidos de plantas antes y después de su destilación, se caracterizaron por cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas, UHPLC-ESI^{+/-}-Orbitrap-MS. En los extractos hidroalcohólicos de plantas de *S. viminea*, obtenidos antes y después de su destilación, se detectaron 21 compuestos (**Tabla 8**). En las **Figura 10 y Figura A7 (Anexo)**, se muestran las corrientes iónicas extraídas de moléculas protonadas [M+H]⁺ o deprotonadas [M-H]⁻, obtenidas por UHPLC-ESI^{+/-}-Orbitrap-MS, operado en el modo de monitoreo de iones selectivos, de compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos de plantas de *S. viminea*, que pueden ser detectados, usando la interfaz con electronebulización.

La identificación confirmatoria de siete compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos se realizó usando las sustancias-patrón y por comparación de los espectros de masas y tiempos de retención. Estudiando los patrones de fragmentación de sustancias y en lo reportado en la literatura (109,110) se identificaron, de manera tentativa, cinco flavanonas, cuatro flavonas, un flavonol, dos ácidos hidroxibenzoicos y un ácido hidroxicinámico. Se detectaron dos compuestos, que no se identificaron positivamente (**Tabla 8**).

En la **Tabla 9**, se muestra la cuantificación de los compuestos detectados en los extractos hidroalcohólicos (siete compuestos de manera confirmatoria y 12 de manera tentativa). Los parámetros de cuantificación usados se encuentran en el **Anexo (Tablas A1 y A2)**.

Figura 10.

Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ o deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-MS (escala 1.03×10^8), de compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos de *S. viminea*, aislados del material vegetal antes de su destilación, de plantas recolectadas en diferentes estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Véase la identificación de compuestos en la **Tabla 8.**

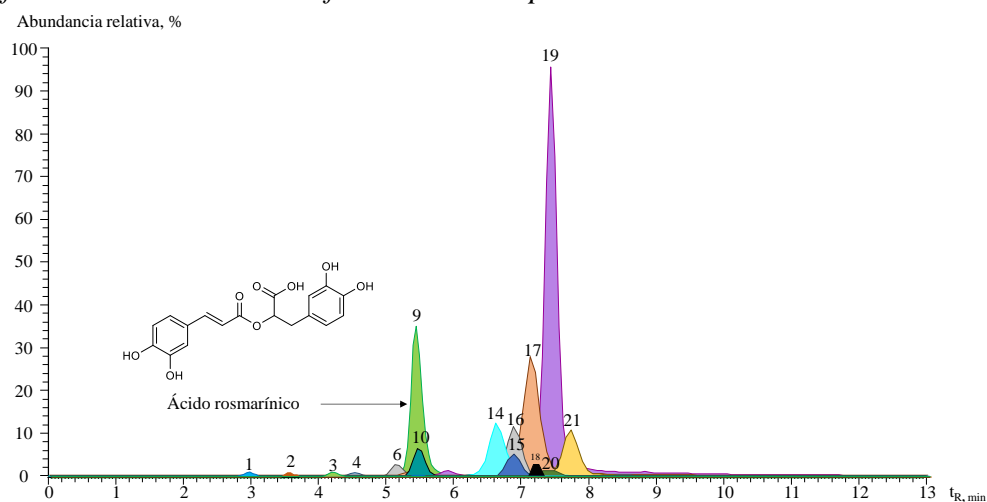
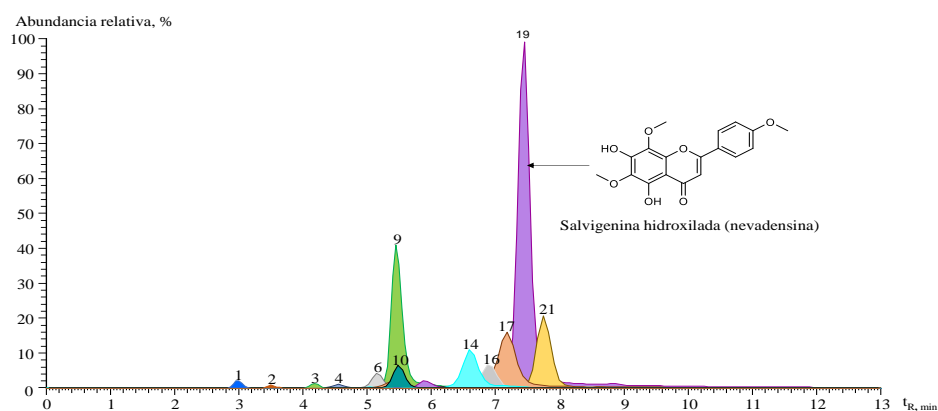
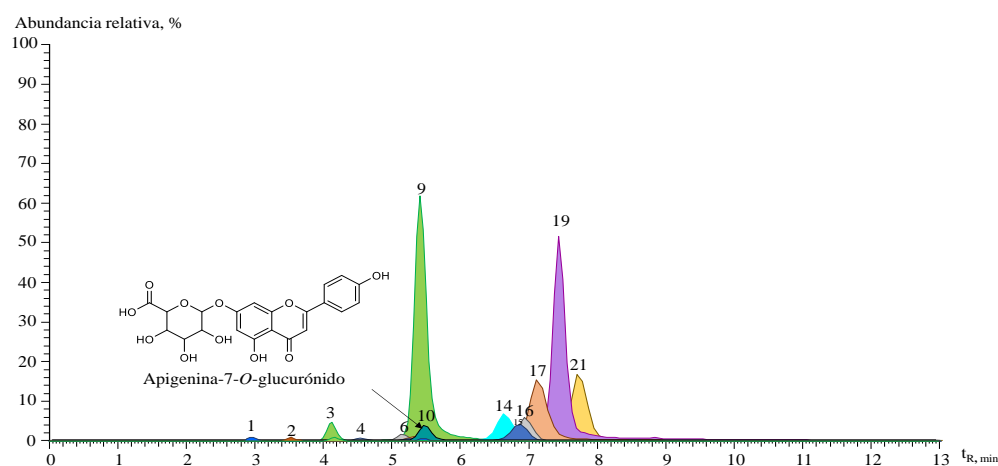
**A****B****C**

Tabla 8.

Masas exactas de moléculas deprotonadas [M-H]⁻ y protonadas [M+H]⁺, identificadas por UHPLC-ESI^{+/-}-Orbitrap-MS de sustancias presentes, en los extractos hidroetanólicos, obtenidos a partir de material vegetal de S. viminea cosechado en los diferentes estados fenológicos.

N° Pico Fig. 10 y Fig A7	tr, min		Compuesto	Fórmula	Masas experimentales, m/z (I, %)	Δ ppm	HCD, eV	Iones-producto	Fórmula	m/z, I (%)	Criterios de identificación	Referencia
	Extracto	STD										
1	2.86	-	Ácido-dihidroxifenil- láctico	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻ 197.04495 (61)	0.49	10	[(M-H)-H ₂ O]	C ₉ H ₇ O ₄	179.03426 (54)	a	
								[(M-H)-H ₂ O-CO ₂] ⁻	C ₈ H ₇ O ₂	135.04420 (100)		
2	3.46	-	Isómero del ácido p-hidroxibenzoico.	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻ 137.02347 (100)	0.15	20	[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₆ H ₅ O	93.03355 (15)	a	
3	4.16	4.22 ± 0.06	Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻ 179.03426 (23)	1.09	10	[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₈ H ₇ O ₂	135.04419 (100)	a, b, c	(50,140)
4	4.51	-	Apigenina-C,C-diglucoído	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺ 595.16504 (100)	0.70	10	[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₃	559.14447 (7)	a, b	(35)
								[(M+H)-2H ₂ O-C ₄ H ₆ O ₃] ⁺	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₀	457.11249 (10)		
								[(M+H)-2H ₂ O-C ₆ H ₁₂ O ₆] ⁺	C ₂₁ H ₁₅ O ₇	379.08096 (1)		
								[(M+H)-2C ₄ H ₈ O ₄] ⁺	C ₁₉ H ₁₅ O ₇	355.07983 (1)		
5	5.02	5.04 ± 0.02	Ácido-o-hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻ 137.02348 (28)	0.16	20	[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₆ H ₅ O	93.03353 (100)	a, b, c	(50)
6	5.13	5.16 ± 0.03	Luteolina-7-O-glucurónido	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	[M+H] ⁺ 463.08609 (3.5)	2.18	20	[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.05453 (100)	a, b, c	(35)
7	5.22	-	Luteolina-O- rutinósido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺ 595.16486 (100)	0.89	10	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.10724 (76)	a, b	(141)
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.05435 (14)		
8	5.39	-	Trihidroxi dimetoxiflavanona	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	[M+H] ⁺ 333.09659 (14)	0.29	10	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315.08603 (100)	a	
								[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₆ H ₁₅ O ₅	287.09116 (26)		
								[(M+H)-C ₉ H ₁₀ O] ⁺	C ₈ H ₇ O ₆	199.02370 (30)		
9	5.42	5.46 ± 0.04	Ácido rosmarínico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M-H] ⁻ 359.07629 (38)	0.42	10	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₉ H ₆ O ₅	197.04439 (36)	a, b, c	(35)
								[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃ -2H ₂ O] ⁻	C ₉ H ₇ O ₆	161.02310 (100)		
10	5.45	5.46 ± 0.01	Apigenina-7-O-glucurónido	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ 447.09155 (0.5)	1.42	20	[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.05963 (100)	a, c	
11	5.77	-	N.I., Figura A8 (Anexo)	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	[M+H] ⁺ 333.09662 (25)	0.29	10	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315.08597 (17)	a	
								[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₆ H ₁₅ O ₅	287.09113 (100)		
								[(M+H)-C ₈ H ₁₀ O] ⁺	C ₉ H ₇ O ₆	211.02631 (7)		
12	5.91	-	Dihidroxi-metoxiflavanona-acetato	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	[M+H] ⁺ 345.09637 (63)	1.46	10	[(M+H)-C ₂ H ₂ O] ⁺	C ₁₆ H ₁₅ O ₆	303.08597 (1)	a	
								[(M+H)-C ₉ H ₁₀ O] ⁺	C ₉ H ₇ O ₆	211.02350 (100)		
								[(M+H)-C ₉ H ₆ O ₆] ⁺	C ₉ H ₁₁ O	135.08937 (5)		

Tabla 8 Continuación.

13	6.22		N.I., Figura A9 (Anexo)	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	[M+H] ⁺ 333.09650 (100)	1.14	10	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315.08594 (6)	a	
								[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₆ H ₁₅ O ₅	287.09106 (21)		
								[(M+H)-CO ₂] ⁺	C ₁₆ H ₁₇ O ₅	289.10762 (23)		
14	6.63	-	Trihidroxi-dimetoxiflavona	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M+H] ⁺ 331.08078 (73)	0.45	40	[(M+H)-CH ₃] ⁺⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.05734 (27)	a	
								[(M+H)-2CH ₃] ⁺	C ₁₅ H ₉ O ₇	301.03387 (79)		
								[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O] ⁺⁺	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	298.04688 (100)		
								[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O-CO] ⁺⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.05197 (4)		
								[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O-2CO] ⁺⁺	C ₁₄ H ₁₀ O ₄	242.05717 (1)		
15	6.86	-	Dihidroxi-dimetoxiflavanona	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	[M+H] ⁺ 317.10153 (75)	0.49	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	299.09146 (1)	a	
								[(M+H)-C ₉ H ₁₀ O] ⁺	C ₈ H ₇ O ₅	183.02867 (100)		
16	6.90	-	Dihidroxi-trimetoxiflavanona	C ₁₈ H ₁₈ O ₇	[M+H] ⁺ 347.11349 (8)	0.96	30	[(M+H)-C ₉ H ₁₀ O] ⁺	C ₉ H ₉ O ₆	213.03928 (100)	a	
								[(M+H)-CH ₃] ⁺⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.06229 (58)		
17	7.12	-	Dihidroxi-dimetoxiflavanol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺ 315.08575 (100)	0.59	40	[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O] ⁺⁺	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	282.05194 (58)	a	
								[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O-CO] ⁺⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.05705 (2)		
								[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O-2CO] ⁺⁺	C ₁₄ H ₁₀ O ₃	226.06221 (1)		
								[(M+H)-C ₈ H ₈] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄	153.01817 (37)		
18	7.18	7.19	± 0.01	Pinocembrina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺ 257.08057 (2)	1.04	30	[(M+H)-C ₆ H ₆ O ₃] ⁺	C ₉ H ₇ O	131.04916 (24)	a, c
									[(M+H)-CH ₃] ⁺⁺	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.07278 (26)	
19	7.43	-	Salvigenina hidroxilada	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	[M+H] ⁺ 345.09628 (69)	0.47	40	[(M+H)-2CH ₃] ⁺	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.04932 (94)	a	
								[(M+H)-2CH ₃ -CO] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.05493 (1)		
								[(M+H)-CH ₃] ⁺⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286.08304 (4)		
20	7.47	-	Hidroxi-dimetoxiflavanona	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	[M+H] ⁺ 301.10648 (47)	0.75	30	[(M+H)-C ₈ H ₈] ⁺	C ₉ H ₉ O ₅	197.04425 (100)	a	
								[(M+H)-CH ₃] ⁺⁺	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.07794 (33)		
								[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O] ⁺⁺	C ₁₇ H ₁₂ O ₅	296.06750 (100)		
								[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O-CO] ⁺⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.072 (53)		
21	7.72	7.73	± 0.01	Salvigenina	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	[M+H] ⁺ 329.10144 (67)	0.52	40	[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O-2CO] ⁺⁺	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	240.07788 (2)	a, c
									[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O-CO] ⁺⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.072 (53)	

^a Identificación basada en el estudio del patrón de fragmentación y en la comparación con espectros de masas con los de las bases de datos *HMDB* 4.0 (109) y *Massbank* (110).

^b Identificación basada en los datos de la literatura científica sobre especies del género *Satureja* spp. (35, 50, 140, 141).

^c Identificación confirmatoria basada en la comparación de los espectros de masas y los tiempos de retención (*t_R*) de las sustancias-patrón de ácido cafeico (98%), ácido-*o*-hidroxibenzoico (99%), luteolina-7-*O*-glucurónido (≥98), ácido rosmarínico (97%), apigenina-7-glucurónido (≥98%), pinocembrina (≥95%), y salvigenina (98%), adquiridas de *Sigma Aldrich*, *ChemFaces* y *Phytolab*.

Figura 11.

Espectros de masas del ácido rosmarínico. A. En el extracto hidroalcohólico de S. viminea. B. De la sustancia-patrón adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louise, MO, EE. UU.). Espectro de masas de la molécula deprotonada [M-H]⁻ en m/z 359.07629, registrado por LC/MS operado en modo de iones seleccionados (SIM) y HCD 10 eV.

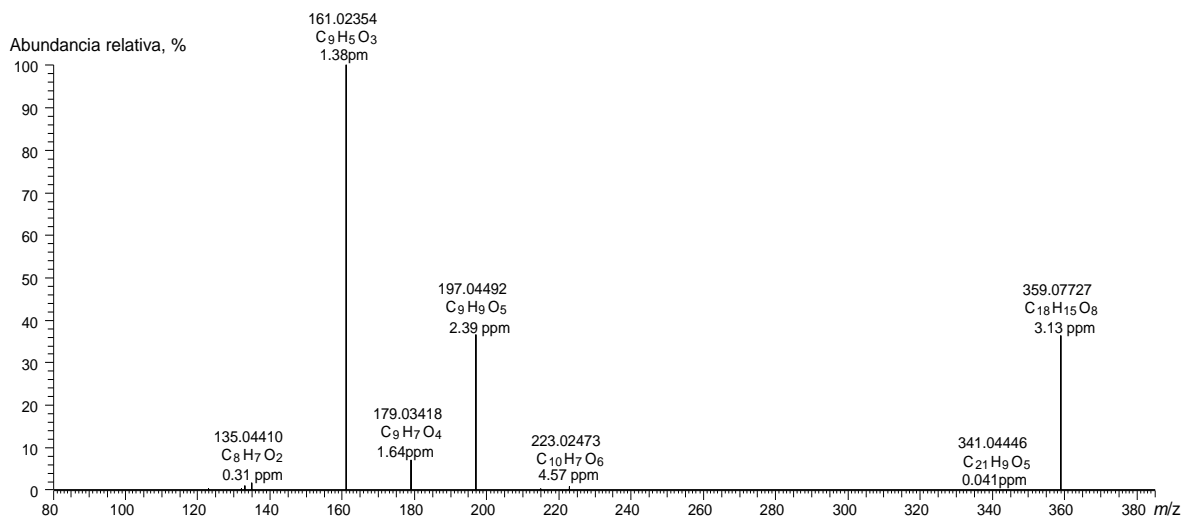
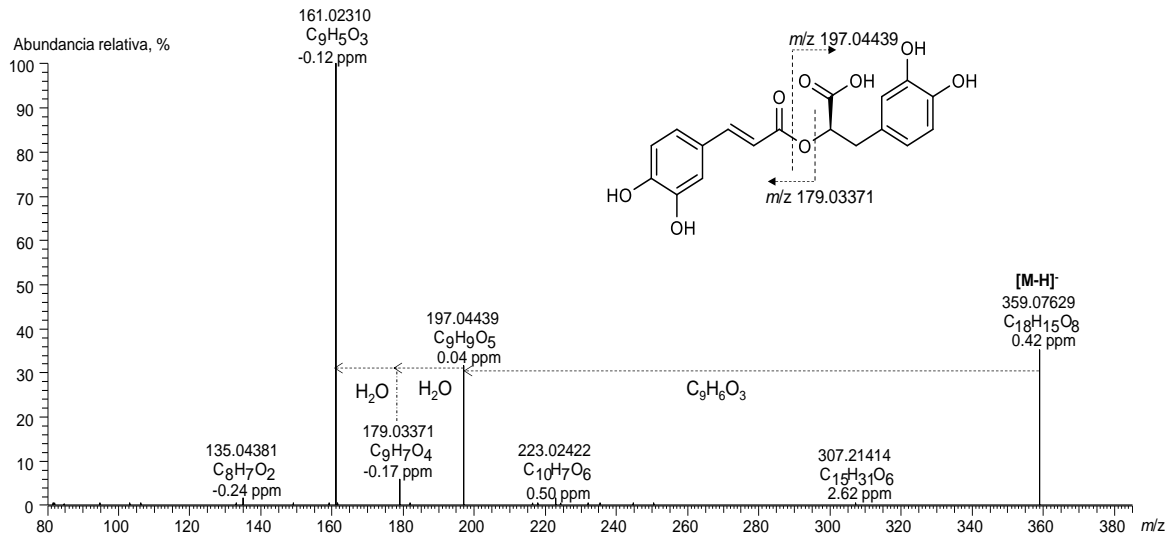


Tabla 9.

Cuantificación de algunos compuestos presentes en los extractos de plantas de S. viminea, obtenidos antes y después de la destilación, de las plantas cosechadas, hasta cuatro veces, en cada estado fenológico.

N° pico Tabla	Compuesto	Familia de compuestos	Cantidad de sustancia, mg/g extracto ± s					
			Estados fenológicos					
			Vegetativo*		Floración**		Post-floración***	
8			AD (n=12)	DD (n=9)	AD (n=9)	DD (n=6)	AD (n=12)	DD (n=9)
1	Ácido-dihidroxifenil-láctico ¹	Ácido hidroxicinámico	1 ± 1	5.0 ± 0.5	1 ± 1	2.860 ± 0.009	4 ± 4	3.0 ± 0.8
2	Isómero del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ²	Ácido hidroxibenzoico	2.0 ± 0.4	4 ± 1	1.5 ± 0.2	2 ± 1	1 ± 1	2.0 ± 0.4
3	Ácido cafeico	Ácido hidroxicinámico	2.0 ± 0.7	1.2 ± 0.1	1 ± 1	0.80 ± 0.02	1 ± 1	1.10 ± 0.05
4	Apigenina- <i>C,C</i> -diglucósido ³	Flavona glicosilada	1.0 ± 0.4	0.90 ± 0.04	1.0 ± 0.4	0.78 ± 0.01	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.1
5	Ácido- <i>o</i> -hidroxibenzoico ²	Ácido hidroxibenzoico	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD
6	Luteolina-7- <i>O</i> -glucurónido	Flavona glicosilada	10 ± 5	10 ± 2	10 ± 4	10 ± 1	10 ± 6	10 ± 5
7	Luteolina- <i>O</i> -rutinósido ⁴	Flavona glicosilada	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.4
8	Trihidroxi-dimetoxiflavanona ⁵	Flavanona metilada	0.30 ± 0.09	0.40 ± 0.06	0.42 ± 0.01	0.270 ± 0.004	0.40 ± 0.03	0.3 ± 0.1
9	Ácido rosmarínico	Ácido hidroxicinámico	15 ± 5	40 ± 11	20 ± 5	40 ± 6	20 ± 17	40 ± 17
10	Apigenina-7- <i>O</i> -glucurónido	Flavona glicosilada	6 ± 1	6.0 ± 0.1	7.0 ± 0.5	5.0 ± 0.6	6.0 ± 0.8	7 ± 1
12	Dihidroxi-metoxiflavanona-acetato ⁵	Flavanona metilada	1 ± 1	LOD	1 ± 1	LOD	1 ± 1	LOD
14	Trihidroxi-dimetoxiflavona ⁶	Flavona metilada	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.1
15	Dihidroxi-dimetoxiflavanona ⁵	Flavanona metilada	4 ± 1	2.5 ± 0.7	3.0 ± 0.7	1.7 ± 0.5	2 ± 1	2.0 ± 0.3
16	Dihidroxi-trimetoxiflavanona ⁵	Flavanona metilada	5.0 ± 0.9	4.0 ± 0.4	4.0 ± 0.6	2.0 ± 0.6	4 ± 2	3.0 ± 0.7
17	Dihidroxi-dimetoxiflavanol ⁷	Flavonol metilado	2.0 ± 0.7	1.8 ± 0.1	1.0 ± 0.9	1.0 ± 0.8	1.5 ± 0.4	1.0 ± 0.6
18	Pinoembrina	Flavanona	0.20 ± 0.06	0.16 ± 0.03	0.20 ± 0.07	0.180 ± 0.003	0.20 ± 0.09	0.16 ± 0.03
19	Salvigenina hidroxilada ⁶	Flavona metilada	3 ± 1	5 ± 1	3 ± 1	3.0 ± 0.6	2 ± 1	2 ± 1
20	Hidroxi-dimetoxiflavanona ⁵	Flavanona metilada	1.0 ± 0.5	0.30 ± 0.05	1.0 ± 0.7	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.6	0.30 ± 0.05
21	Salvigenina	Flavona metilada	1.0 ± 0.8	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.0 ± 0.5	2.0 ± 0.4

Tabla 9. Continuación

Familias de compuestos

Ácidos hidroxicinámicos	18±1	46±3	22±1	43±2	20±5	40±5
Ácidos hidroxibenzoicos	2.0±0.2	4±1	1.5±0.2	2±1	1±1	2.0±0.4
Flavonas glicosiladas	18±1	18.0±0.5	19±1	17.0±0.2	18±1	19±1
Flavonas metiladas	5.0±0.3	7.5±0.1	4.8±0.1	5.3±0.1	4.0±0.2	4.8±0.1
Flavanonas	0.2±0.2	0.20±0.03	0.20±0.03	0.20±0.03	0.2±0.1	0.1±0.1
Flavanonas metiladas	11.0±0.3	7.2±0.1	9.4±0.3	4.5±0.1	8.0±0.5	5.6±0.1
Flavonoles metilados	2.0±0.7	1.8±0.1	1.0±0.9	1.0±0.8	1.0±0.4	1.0±0.6

* Valores promedio determinados en los extractos hidroalcohólicos de plantas de *S. viminea* en estado vegetativo cosechadas cuatro veces. Fechas: 27-07-2022; 24-10-2022; 23-11-2022; 18-04-2023.

** Valores promedio determinados en los extractos hidroalcohólicos de plantas *S. viminea* en estado de floración cosechadas tres veces. Fechas: 11-04-2022; 24-10-2022; 18-04-2023.

*** Valores promedio determinados en los extractos hidroalcohólicos de plantas *S. viminea* en estado de post-floración cosechadas cuatro veces. Fechas: 21-06-2022; 24-10-2022; 25-01-2023; 18-04-2023.

AD: Antes de su destilación. DD: Después de su destilación.

LOQ: Límite de cuantificación. LOD: Límite de detección.

¹ Cantidad expresada en equivalente de ácido cafeico. ² Cantidad expresada en equivalente de ácido *p*-hidroxibenzoico. ³ Cantidad expresada en equivalente de vitexina. ⁴ Cantidad expresada en equivalente de kaempferol-3-*O*-rutinosido. ⁵ Cantidad expresada en equivalente de pinocembrina. ⁶ Cantidad expresada en equivalente de salvigenina. ⁷ Cantidad expresada en equivalente de pachipodol.

Las principales familias de compuestos encontrados en los extractos de *S. viminea*, eran los ácidos hidroxicinámicos y las flavonas glicosiladas. El ácido rosmarínico (20-40 mg/g), la luteolina-7-*O*-glucurónido (10 mg/g) y la apigenina-7-*O*-glucurónido (6 mg/g) fueron los compuestos mayoritarios en los extractos hidroalcohólicos de plantas de *S. viminea*, que se aislaron de plantas, antes y después de su destilación.

El ácido rosmarínico, compuesto mayoritario de los extractos de *S. viminea* se identificó de manera confirmatoria, mediante la comparación de su espectro de masas con el de la sustancia-patrón, usando el modo SIM (**Figura 11**). Los principales fragmentos que se observaron en su espectro de masas se generan por la ruptura del grupo éster, con formación del ion-producto del ácido-dihidroxifenil-láctico, $[M-H]^-$, m/z 197.04439, y del ácido cafeico, $[M-H]^-$, m/z 179.03371. El fragmento con masa exacta en m/z 197.04439 posteriormente, pierde sucesivamente moléculas de agua y genera iones-producto en m/z 179.03371 y m/z 161.02310.

El ácido rosmarínico se encuentra en las plantas de la familia Lamiaceae (39) y posee importantes propiedades antimicrobiana (40), antioxidante (41), antiinflamatoria (42), antimutagénica y antiviral (43), es uno de los principales componentes en los extractos de *Salvia rosmarinus* (romero), con un contenido alto, 24 mg/g (142). La Unión Europea aprobó el uso de extractos de romero como conservante de alimentos (143,144). Los extractos de hojas de la planta de *Melissa officinalis* (fam. Lamiaceae), también se usan como aditivos en alimentos para animales (145,146).

Hasta el momento, no encontramos reportes sobre la composición química de extractos hidroalcohólicos de plantas de *S. viminea*. En extractos, obtenidos con solvente de plantas de *S. montana* (35), *S. bossieri* (50), *S. hortensis* (140) y *S. thymbra* (147) se identificaron apigenina-*C,C*-diglucósido, luteolina-7-*O*-glucurónido, luteolina-*O*-rutinósido,

apigenina-7-glucurónido, ácidos rosmarínico, *o*-hidroxibenzoico y cafeico, los mismos compuestos encontrados en esta investigación. En los extractos obtenidos en este estudio, se encontraron varias flavonas y flavanonas metiladas.

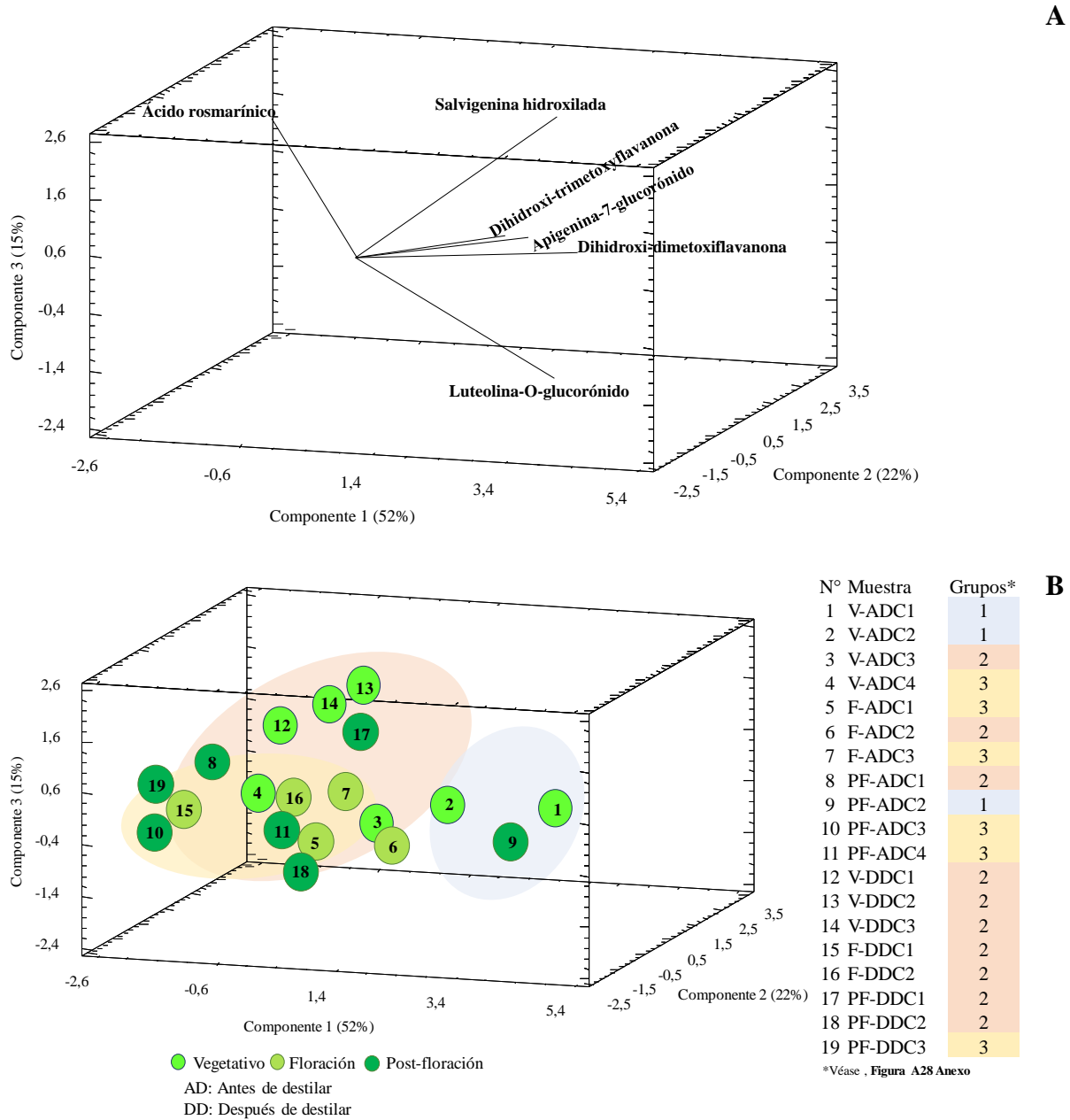
Las plantas de la familia Lamiaceae, contienen nevadensina y pedunculina, sustancias que tienen la misma estructura y fórmula molecular ($C_{18}H_{16}O_7$) que la del compuesto encontrado en este estudio (salvigenina hidroxilada, pico N° 19, **Figura 10**) (148,149). El nevadensina tiene actividades antiinflamatoria (150), antibacteriana (151) y citotóxica (152).

En el análisis de componentes principales (**Figura 12**), se puede observar un aumento en el contenido de ácido rosmarínico en los extractos de *S. viminea* obtenidos a partir de material vegetal destilado, al igual que, se observó en los resultados de la **Tabla 9**. Por ejemplo, en el estado vegetativo los extractos de material vegetal sin destilar (V-ADC1, V-ADC2, V-ADC3) se encuentran en la región negativa del vector de ácido rosmarínico en comparación con los del material destilado (V-DDC1, V-DDC2, V-DDC3), lo que indica menor contenido del ácido hidroxicinámico en los extractos sin destilar.

En la **Figura 12** en la componente 1 (52%), los compuestos que más aportaron fueron la dihidroxy-trimetoxyflavanona, dihidroxy-dimetoxyflavanona y la luteolina-7-O-glucurónido; las muestras V-ADC1 (N°1) y PF-ADC2 (N° 9) tienen los contenidos más altos de estos tres compuestos fenólicos. Los extractos de *S. viminea* obtenidos a partir de material vegetal destilado, tanto en vegetativo como en floración, y recolectados en diferentes meses, mostraron las menores variaciones, agrupándose en una misma región (identificada por el color rosado, **Figura A28 Anexo**).

Figura 12.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los extractos hidroalcohólicos de *S. viminea* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).



Christaki *et al.* (153), compararon las cantidades (mg/g) de compuestos fenólicos presentes en extractos de romero, hierbabuena y salvia, obtenidos a partir del material vegetal, sin destilar, y de biomasa residual de la destilación por arrastre con vapor, hidrodestilación e hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD). Las cantidades de ácido rosmarínico en los extractos de romero y menta sin destilar (40.7 mg/g; 36.09 mg/g), fueron más altas que en los extractos aislados de biomasa residual, después de la destilación por arrastre con vapor (32 mg/g, 24 mg/g) e hidrodestilación (14 mg/g; 12 mg/g), pero más bajas que las encontradas en los extractos de la biomasa residual, después de MWHD (51.34 mg/g; 44.06 mg/g). Las ondas electromagnéticas en MWHD permiten el calentamiento heterogéneo (local) del agua diferente al calentamiento por convección que ocurre en hidrodestilación y arrastre con vapor. Las moléculas de agua, gracias a su momento dipolar alto, rotan orientándose en el campo electromagnético generando un aumento en la energía y, a su vez, facilitando el rompimiento de las paredes celulares del tejido vegetal y así permitiendo la liberación de compuestos fenólicos. Las composiciones químicas de los extractos de plantas sin destilar y de la biomasa residual, después de MWHD de plantas de *Salvia* no presentaron variaciones significativas.

Otros autores (154), reportaron que en los extractos de material vegetal de orégano, destilado por MWHD, usando 600 W de potencia, se encontró la cantidad más alta del ácido rosmarínico.

El mayor contenido de ácido rosmarínico se determinó para los extractos del material vegetal residual después de la destilación, probablemente, porque la irradiación de las ondas microondas aumentaron la energía de las moléculas de agua y permitieron la ruptura más eficiente del tejido vegetal (155). Durante la ruptura de membranas celulares ocurre la liberación de los compuestos fenólicos del tejido vegetal a la fase acuosa, en la cual las plantas de romero se encuentran cuando se destilan (156).

Según las condiciones agronómicas para el cultivo de *S. viminea*, esta planta se podría cosechar hasta dos veces por año. Si en una hectárea de cultivo de *S. viminea* se tienen ca. 30.000 plantas, de los extractos, obtenidos con solvente del material vegetal, antes [645 kg/(ha año)] o después de su destilación (biomasa residual) [561 kg/(ha año)], se podría aislar 14.2 kg/(ha año) y 22.44 kg/(ha año), del ácido rosmarínico, respectivamente.

5.4.2 Estudio de *Hyptis colombiana*

El AE de *H. colombiana* se detectaron 32 compuestos en cantidades relativas > 0.1% (**Tabla 10**). En la **Figura 13**, se muestran los perfiles cromatográficos (GC/FID) de los AE destilados de plantas de *H. colombiana* colectadas en los tres estados fenológicos.

En los AE se identificaron positivamente el 90% de los compuestos (28 terpenoides). El estudio del patrón de fragmentación, reflejado en sus espectros de masas, permitió sugerir que los compuestos, sin identificar positivamente, son dos hidrocarburos sesquiterpénicos (**Figuras A10 y A11, Anexo**) y dos sesquiterpenos oxigenados (**Figuras A12 y A13, Anexo**).

El método de calibración por estandarización externa se utilizó para cuantificar los compuestos identificados de manera confirmatoria, con las GC áreas relativas $\geq 2\%$, en los cromatogramas de los AE de *H. colombiana* (**Tabla 11**). En las **Tablas A1 y A2 (Anexo)**, se muestran las figuras analíticas de mérito para las sustancias-patrón utilizadas para la cuantificación de compuestos en los AE de *H. colombiana*.

Figura 13.

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los aceites esenciales de *H. colombiana*, destilados de plantas recolectadas en los tres estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Columna DB-5MS (60 m), split 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos cromatográficos en la **Tabla 10**.

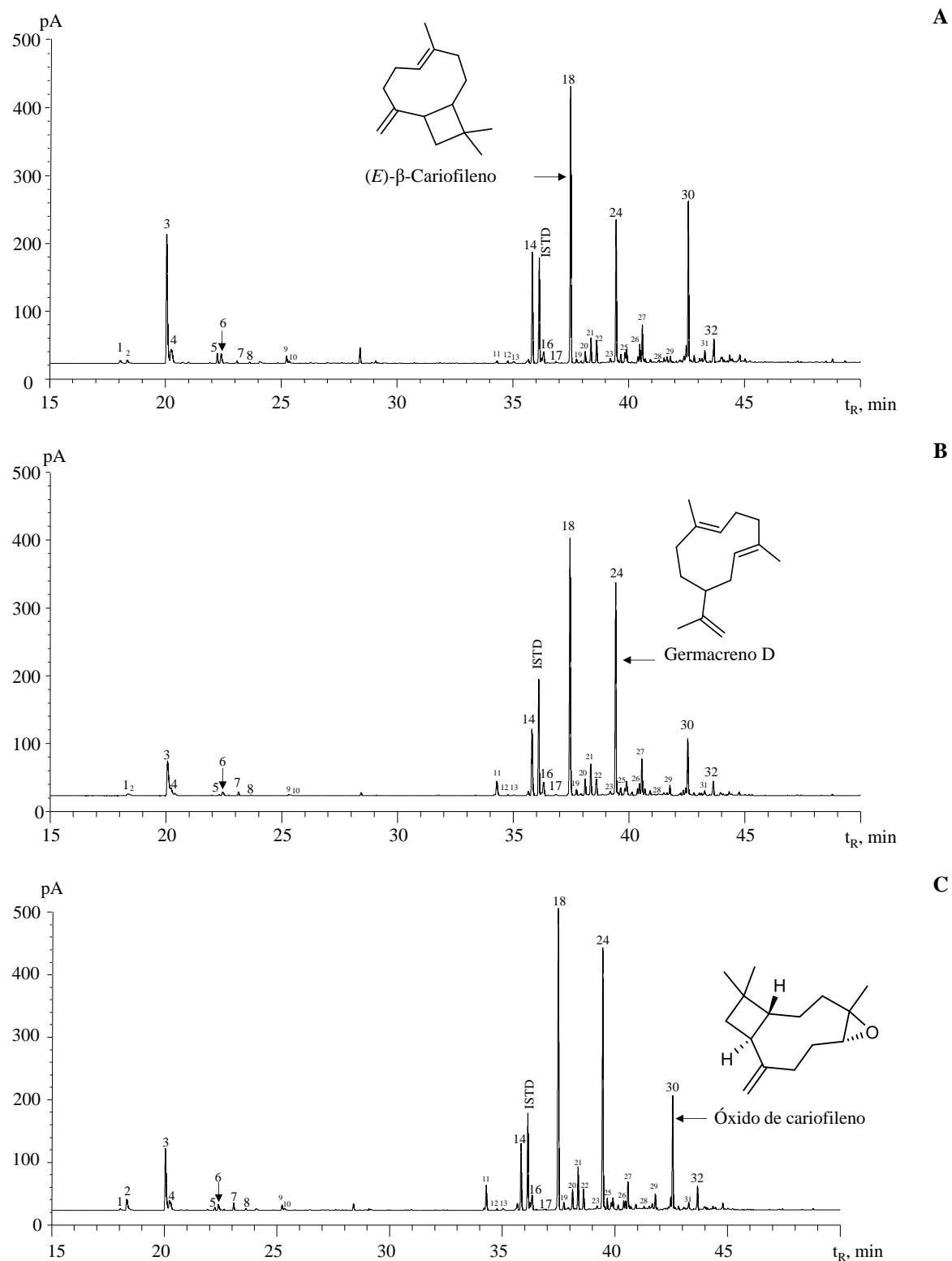


Tabla 10.

Composición química, determinada por GC/MS/FID, de los aceites esenciales destilados por MWHD de plantas de H. colombiana, cosechadas, hasta tres veces, en diferentes estados fenológicos.

N° Fig. 13	Compuesto	GC/MS (DB-5MS)			GC/MS (DB-WAX)			Cantidad relativa GC/FID (%; ± s)			Criterios de identificación
		LRI _{exp}	LRI _{STD}	LRI _{lit}	LRI _{exp}	LRI _{STD}	LRI _{lit}	Estados fenológicos			
								Vegetativo, n=6*	Floración, n=9**	Post-floración, n=6***	
1	α-Tujeno	928	-	928 (118)	1027	-	1027 (118)	0.3 ± 0.1	0.30 ± 0.07	0.20 ± 0.09	a, b
2	α-Pineno	936	937	936 (118)	1023	1024	1025 (118)	0.4 ± 0.1	2 ± 1	0.9 ± 0.8	a, b, c
3	Sabineno	976	976	973 (118)	1124	1124	1122 (118)	10 ± 2	10 ± 3	4 ± 3	a, b, c
4	β-Pineno	981	-	981 (120)	1111	-	1110 (118)	2 ± 1	2.0 ± 0.9	1.0 ± 0.9	a, b
5	p-Cimeno	1028	1028	1024 (118)	1274	1274	1274 (118)	0.5 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	a, b, c
6	Limoneno	1032	1033	1030 (120)	1202	1202	1198 (118)	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.3	a, b, c
7	(E)-β-Ocimeno	1047	-	1044 (119)	1253	-	1250 (118)	0.30 ± 0.07	1.0 ± 0.7	0.4 ± 0.1	a, b
8	γ-Terpineno	1061	1066	1059 (118)	1249	1259	1245 (118)	0.10 ± 0.05	0.16 ± 0.07	0.10 ± 0.04	a, b, c
9	Linalol	1100	1102	1099 (118)	1550	1551	1549 (122)	0.4 ± 0.3	0.40 ± 0.04	0.4 ± 0.1	a, b, c
10	(E)-Hidrato de sabineno	1105	-	1098 (118)	1558	-	1549 (118)	0.10 ± 0.05	0.20 ± 0.04	0.2 ± 0.1	a, b
11	δ-Elemeno	1341	-	1337 (118)	1473	-	1469 (120)	1 ± 1	3 ± 3	4 ± 1	a, b
12	α-Cubebeno	1351	-	1448 (119)	1465	-	1460 (118)	0.20 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.03	a, b
13	α-Ylangeno	1378	-	1376 (119)	1493	-	1492 (129)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.03	a, b
14	α-Copaeno	1385	-	1378 (120)	1503	-	1496 (127)	8 ± 1	6 ± 1	5.0 ± 0.9	a, b
15	β-Bourboneno	1394	-	1390 (120)	1530	-	1526 (120)	0.3 ± 0.1	0.40 ± 0.01	1.0 ± 0.3	a, b
16	β-Elemeno	1397	-	1390 (118)	1600	-	1595 (129)	2 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	a, b
17	C ₁₅ H ₂₄ , (Figura A10, Anexo).	1416	-	-	1536	-	-	0.25 ± 0.02	0.20 ± 0.04	0.2 ± 0.1	b
18	(E)-β-Cariofileno	1435	1434	1428 (120)	1613	1611	1617 (120)	30 ± 4	24 ± 4	30 ± 5	a, b, c
19	γ-Elemeno	1438	-	1436 (118)	1645	-	1639 (118)	1 ± 1	3 ± 2	2 ± 2	a, b
20	6,9-Guaiadieno	1452	-	1442 (119)	1617	-	-	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1	a, b
21	C ₁₅ H ₂₄ , (Figura A11, Anexo).	1459	-	-	1630	-	-	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 2	b
22	α-Humuleno	1469	1465	1465 (120)	1682	1683	1681 (129)	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.00 ± 0.01	a, b, c
23	γ-Muuroleno	1484	-	1478 (119)	1696	-	1690 (118)	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	a, b
24	Germacreno D	1495	1490	1493 (157)	1722	1716	1708 (118)	20 ± 6	20 ± 6	22 ± 1	a, b, c
25	β-Selineno	1499	-	1490 (119)	1726	-	1717 (118)	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	a, b
26	γ-Cadineno	1523	-	1529 (158)	1767	-	1766 (120)	2.0 ± 0.6	1.0 ± 0.3	0.80 ± 0.03	a, b

Tabla 10. Continuación

27	δ -Cadineno	1527	-	1524 (120)	1763	-	1761 (120)	3.0 \pm 0.4	3.0 \pm 0.4	2.0 \pm 0.5	a, b
28	C ₁₅ H ₂₄ O, (Figura A12, Anexo).	1566	-	-	1979	-	-	0.5 \pm 0.3	0.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	b
29	Germacreno B	1574	-	1572 (159)	1719	-	1708 (118)	0.5 \pm 0.2	0.7 \pm 0.4	1.0 \pm 0.6	a, b
30	Óxido de cariofileno	1599	1598	1595 (128)	1996	1996	1993 (132)	9 \pm 7	6 \pm 2	10 \pm 2	a, b, c
31	Viridiflorol	1609	-	1600 (160)	2093	-	2089 (118)	0.3 \pm 0.2	0.20 \pm 0.08	0.3 \pm 0.1	a, b
32	C ₁₅ H ₂₄ O, (Figura A13, Anexo).	1640	-	-	2255	-	-	2.0 \pm 0.3	1 \pm 1	2.0 \pm 0.2	
Hidrocarburos monoterpénicos, %								17.0 \pm 0.3	17.0 \pm 0.2	6.0 \pm 0.4	
Monoterpenos oxigenados, %								0.6 \pm 0.1	0.60 \pm 0.03	0.60 \pm 0.08	
Hidrocarburos sesquiterpénicos, %								70.0 \pm 0.5	74.0 \pm 0.5	75.4 \pm 0.2	
Sesquiterpenos oxigenados, %								12 \pm 1	9.0 \pm 0.5	17.0 \pm 0.6	

* Valores promedio determinados en los AE de plantas de *H. colombiana* cosechadas dos veces en estado vegetativo y analizadas por triplicado. Fechas: 1-10-2021; 28-06-2022.

** Valores promedio determinados en los AE de plantas de *H. colombiana* cosechadas tres veces en estado floración y analizadas por triplicado. Fechas: 30-03-2022; 24-11-2022; 12-01-2023.

*** Valores promedio determinados en los AE de plantas de *H. colombiana* cosechadas dos veces en estado post-floración y analizadas por triplicado. Fechas: 21-01-2022; 12-01-2023.

^a Identificación tentativa basada en tiempos de retención (t_R) e índices de retención lineales (LRI, por sus siglas en inglés) en las columnas DB-5MS (apolar) y DB-WAX (polar) (118-120, 158-160).

^b Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS; ionización electrónica, 70 eV, coincidencia > 95%), estudio de patrones de fragmentación, y por comparación de los MS con los de las bases de datos espectrales Adams (2007), NIST (2017) y Wiley (2008).

^c Identificación confirmatoria basada en sustancias-patrón adquiridas en *Sigma-Aldrich* (St. Louise, MO, EE.UU.) de α -pineno (98%), sabineno (95%), *p*-cimeno (99%), limoneno (97%), γ -terpineno (96%), linalol (97%), (*E*)- β -cariofileno (98.5%), α -humuleno (96%), germacreno D (90%) y óxido de cariofileno (95%), sus espectros de masas y tiempos de retención (t_R).

STD: Sustancia estándar.

Tabla 11.

Cuantificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales, destilados por MWHD, de plantas de H. colombiana cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico.

Compuesto	Tipo	mg compuesto/g AE ± s		
		Estados fenológicos		
		Vegetativo, n=6*	Floración, n=9**	Post-floración, n=6***
α-Pineno	HM	5 ± 1	30 ± 18	10 ± 10
Sabineno	HM	150 ± 9	140 ± 19	40 ± 40
β-Pineno ¹	HM	30 ± 13	30 ± 7	10 ± 10
p-Cimeno	HM	<LOD	<LOD	<LOD
Limoneno	HM	10 ± 2	10 ± 2	4 ± 4
γ-Terpineno	HM	<LOQ	2.0 ± 0.7	<LOQ
Linalol	MO	5 ± 3	4 ± 1	4 ± 1
δ-Elemeno ²	HS	<LOQ	40 ± 32	30 ± 18
α-Copaeno ²	HS	75.0 ± 0.9	60 ± 6	50 ± 8
β-Elemeno ²	HS	30 ± 16	30 ± 14	30 ± 11
(E)-β-Cariofileno	HS	230 ± 74	230 ± 37	250 ± 11
γ-Elemeno ²	HS	20 ± 15	30 ± 24	30 ± 22
6,9-Guaiadieno ²	HS	10 ± 4	15 ± 2	20.5 ± 0.1
α-Humuleno	HS	20 ± 6	20 ± 5	17.70 ± 0.06
Germacreno D ²	HS	150 ± 77	210 ± 89	210 ± 16
δ-Cadineno ²	HS	30 ± 7	25 ± 1	20 ± 4
Óxido de cariofileno	SO	80 ± 46	60 ± 10	130 ± 31

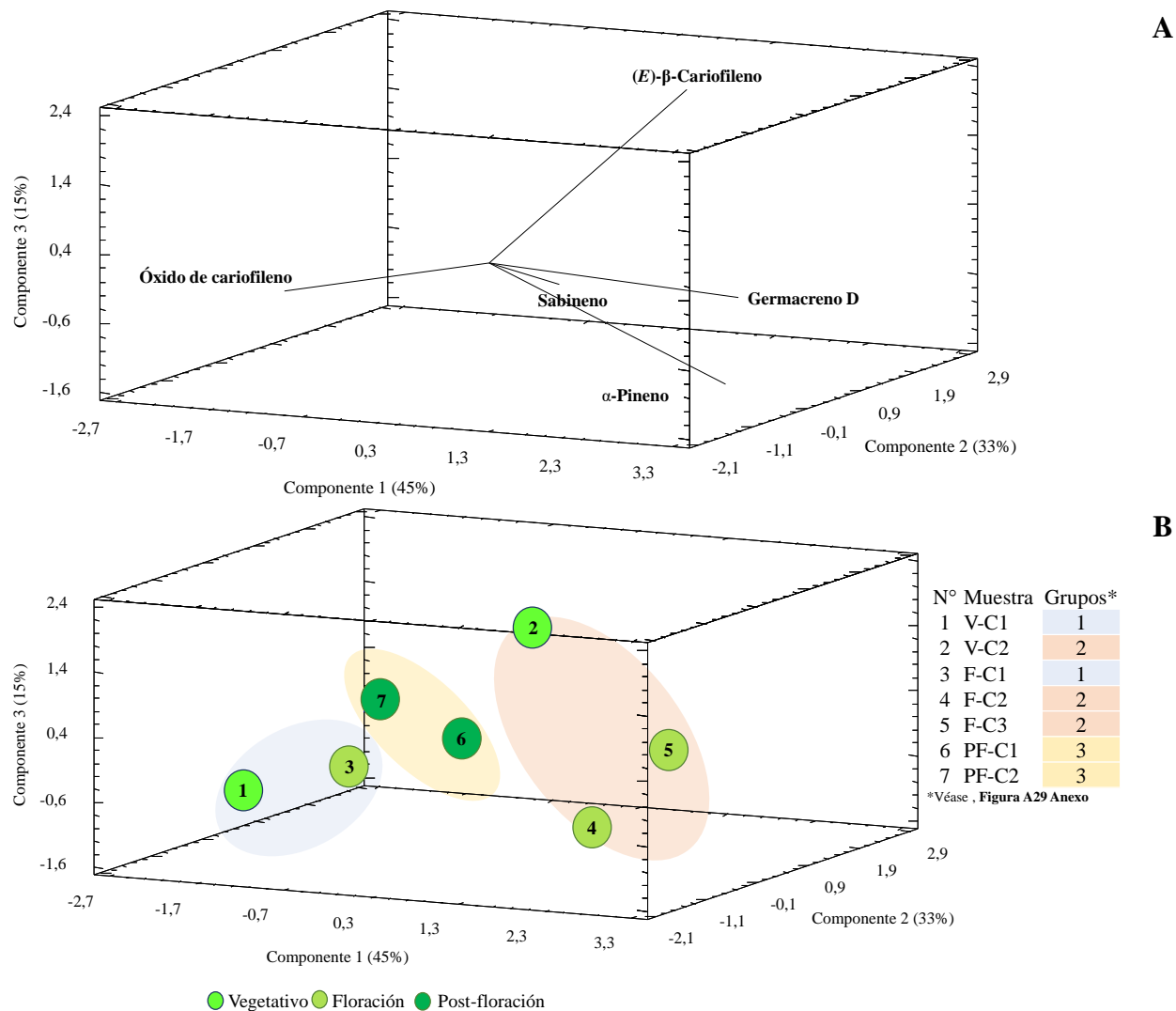
* Valores promedio determinados para los AE de *H. colombiana*, destilados de plantas en estado vegetativo cosechadas dos veces y analizadas por triplicado. Fechas: 1-10-2021; 28-06-2022. ** Valores promedio determinados para los AE de *H. colombiana*, destilados de plantas en estado floración cosechadas tres veces y analizadas por triplicado. Fechas: 30-03-2022; 24-11-2022; 12-01-2023. *** Valores promedio determinados para los AE de *H. colombiana*, destilados de plantas en post-floración cosechadas dos veces y analizadas por triplicado. Fechas: 21-01-2022; 12-01-2023.
 HM: Hidrocarburos monoterpenicos, MO: Monoterpenos oxigenados, HS: Hidrocarburos sesquiterpenicos, SO: Sesquiterpenos oxigenados. LOQ: Límite de cuantificación. LOD: Límite de detección.
 1: Cantidad expresada en equivalente de α-pineno. 2: Cantidad expresada en equivalente de (E)-β-cariofileno.

Los AE de *H. colombiana* contienen principalmente hidrocarburos sesquiterpénicos y monoterpénicos. Los compuestos mayoritarios de los AE de las plantas colectadas en los estados fenológicos: vegetativo, floración y post-floración fueron sabineno, (*E*)- β -cariofileno, germacreno D y óxido de cariofileno. Las concentraciones de (*E*)- β -cariofileno (230 mg sustancia/g de AE) y germacreno D (210 mg sustancia/g de AE), en los AE destilados de plantas cosechadas en cada uno de los estados fenológicos: vegetativo, floración y post-floración, no tuvieron diferencias estadísticamente significativas $p > 0.05$ (**Tabla A10**).

En el análisis de componentes principales (**Figura 14**), se observa que el α -pineno y el sabineno en los AE de *H. colombiana*, contribuyeron en mayor medida a la componente 1 (45%). Los AE obtenidos de plantas en post-floración durante las dos cosechas (PF-C1 y PF-C2) presentaron el menor contenido de α -pineno y sabineno. No obstante, fue el único estado fenológico en el que las muestras se agruparon en una misma región (zona amarilla, **Figura A29 Anexo**), es decir, que indica una menor variabilidad en las cantidades de estos compuestos en comparación con los AE destilados en los otros estados fenológicos. Por otro lado, los AE de plantas de *H. colombiana* colectadas en floración (F-C2 y F-C3) tienen altos contenidos de α -pineno y sabineno. Posiblemente, también por eso, en *H. colombiana* en la etapa de floración se detectaron cantidades de α -pineno y sabineno más altas que en las de plantas, después de su floración.

Figura 14.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los aceites esenciales de *H. colombiana* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).



Se ha reportado (161), que en *Salvia verbenaca* se generan α -pineno y sabineno, principalmente, antes de la floración, y en plena floración de la planta. Durante la floración, los pétalos y sépalos de las flores de *S. verbenaca* emiten principalmente estos dos compuestos (161), que participan en la defensa contra herbívoros y para promover la polinización (162).

En las células vegetales los sesquiterpenos, (*E*)- β -cariofileno y germacreno D siguen la misma ruta biosintética, es decir, se sintetizan en el citosol a partir de la transformación del farnesil difosfato para formar el carbocatión farnesilo y, luego, mediante reacciones enzimáticas, se forman estos hidrocarburos sesquiterpénicos (163). El óxido de cariofileno se produce por la oxidación de su precursor, (*E*)- β -cariofileno.

El (*E*)- β -cariofileno, compuesto mayoritario en los AE de *H. colombiana*, es un sesquiterpeno biosintetizado en muchas plantas, con función ecológica para defenderse de herbívoros, a menudo mediante la atracción de sus enemigos naturales (164). El uso del (*E*)- β -cariofileno, que es clasificado como fitocannabinoides por interactuar con receptores CB1 y CB2, está aprobado como aditivo alimentario por la FDA (*United States Food and Drug Administration*) (1); también, el (*E*)- β -cariofileno se usa en la industria de perfumes porque aporta una nota amaderada (165).

Dahham *et al.* (166), aislaron el (*E*)- β -cariofileno del AE de *Aquilaria crassna* y determinaron su actividad antibacteriana alta contra *S. aureus* (MIC 3 μ M), comparándola con la del antibiótico de referencia, kanamicina (MIC 8 μ M). La actividad antifúngica del (*E*)- β -cariofileno contra diversos hongos (*Trichoderma reesei*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger*) también, fue ampliamente demostrada (166). El AE de *H. colombiana* podría ser una fuente importante de (*E*)- β -cariofileno. De 33.000 plantas de *H. colombiana*, que se pueden plantar en una hectárea con tres cosechas por año, se podrían obtener *ca.* 21 kg del aceite esencial y *ca.* 5 kg del (*E*)- β -cariofileno

Flores *et al.* (27), estudiaron la composición química del AE de *H. colombiana*, en Venezuela y reportaron como compuestos mayoritarios el (*E*)- β -cariofileno (29.5%), germacreno

D (22.2%) y óxido de cariofileno (3.5%). Los autores (27), encontraron que los AE de *H. colombiana*, cultivada en Venezuela, tienen propiedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. En nuestro estudio, se evaluó la actividad antioxidante del AE de plantas de *H. colombiana*, cosechadas en tres estados fenológicos.

En la **Tabla 12**, aparecen las masas exactas de iones experimentales, el error de medición (Δ ppm) y las fórmulas elementales de los iones-producto, observados en los espectros de masas de los compuestos identificados en los extractos de *H. colombiana*. En la **Figura 15** y **Figura A14 (Anexo)**, se muestran las corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ o deprotonadas $[M-H]^-$, según las propiedades del analito, analizadas por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-MS, operado en el modo SIM para estos iones, de compuestos en los extractos de *H. colombiana*, estudiados en este trabajo.

En los extractos hidroalcohólicos de *H. colombiana*, obtenidos de plantas, antes y después de su destilación, se identificaron 14 compuestos. Entre estos, seis flavonas (apigenina-C,C-diglucósido, luteolina-C-hexósido-O-desoxihexosil, luteolina-7-O-glucósido, salvigenina hidroxilada, trihidroxi-trimetoxiflavona y salvigenina), cuatro ácidos hidroxicinámicos (isómero del ácido *p*-hidroxibenzoico, ácidos cafeicos, *o*-hidroxibenzoico y rosmarínico), dos flavonoles (rutina, kaempferol-3-O-rutinósido), una lactona sesquiterpénica y una piranona (**Tabla 12**).

En el espectro de masas de la piranona (compuesto N° 10 **Figura 16**, **Tabla 12**), aparecen iones-producto $[(M+H)-C_2H_4O_2]^+$, en m/z 367.13846, y $[(M+H)-C_2H_4O_2-C_2H_2O]^+$, en m/z 325.12781. Algunos autores (167,168) reportaron la detección de diferentes furanonas y piranonas (pectinolides) en los extractos obtenidos de *H. pectinata* e *H. monticola*. Boalino *et al.* (167), caracterizaron por RMN y GC/MS la pectinolide E $[C_{20}H_{26}O_{10}, M^+ \bullet m/z$ 426], en cuyo

espectro aparecieron los iones-producto en m/z 366, 306, 237 y 204. Basados en estos datos, en los extractos de *H. colombiana* bajo estudio se identificó tentativamente una piranona, $C_{20}H_{26}O_{10}$ $[M+H]^+$ en m/z 427.16000, en cuyo espectro de masas aparecen los fragmentos generados por la pérdida sucesiva de especies $C_2H_4O_2$, C_2H_2O y H_2O del ion $[M+H]^+$, con las masas exactas 367.13846, 325.12781, 265.10681 y 205.08585, respectivamente.

La **Tabla 13** contiene información sobre la cuantificación de los 14 compuestos identificados en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de plantas de *H. colombiana*, antes y después de su destilación. Los parámetros de cuantificación usados se encuentran reportados en las **Tablas A1 y A2 (Anexo)**.

Figura 15.

Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ o deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-MS (escala 6.2×10^7) de compuestos en los extractos hidroalcohólicos de *H. colombiana*, aislados antes de su destilación, de plantas recolectadas en diferentes estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Véase la identificación de compuestos en la **Tabla 12**.

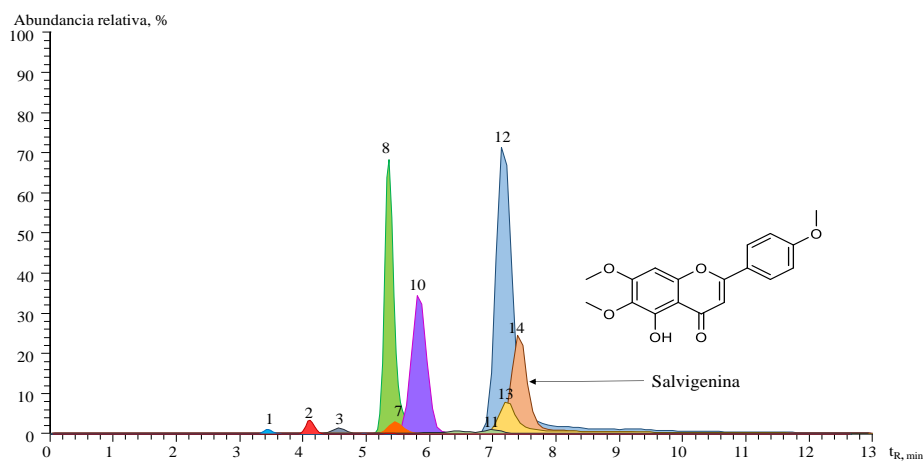
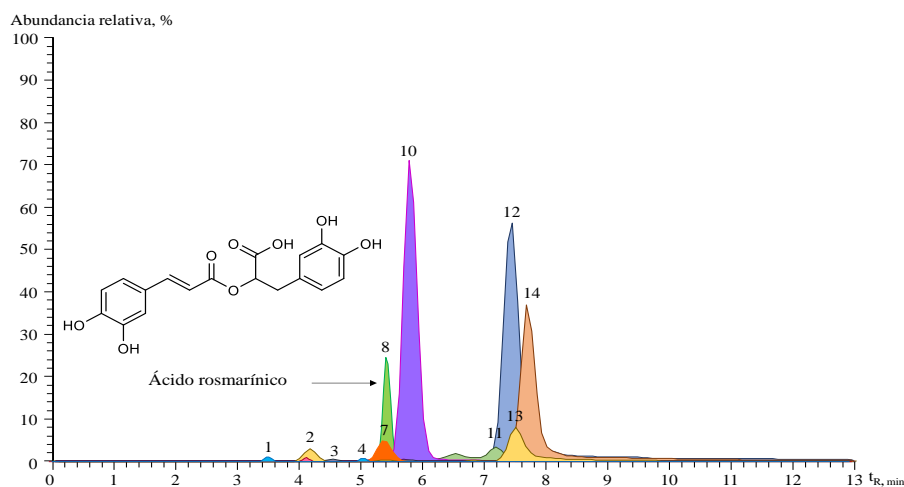
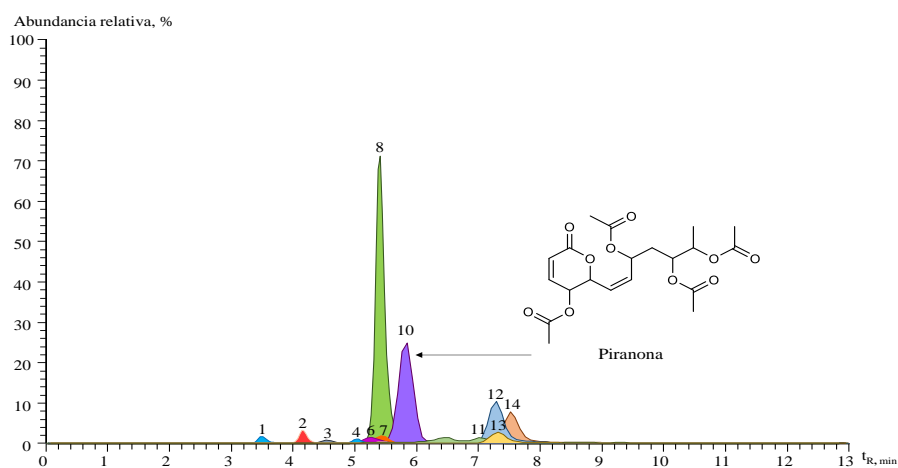
**A****B****C**

Tabla 12.

Masas exactas de moléculas deprotonadas $[M-H]^-$ y protonadas $[M+H]^+$, identificadas por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-MS de las sustancias presentes, en los extractos hidroetanólicos, obtenidos a partir de H. colombiana cosechadas en los diferentes estados fenológicos.

N° Pico Fig. 15 y Fig. A14	tr, min		Compuesto	Fórmula	Masas experimentales, m/z (I, %)	Δ ppm	HCD, eV	Iones-producto	Fórmula	m/z, I (%)	Criterios de identificación	Referencia
	Extracto	STD										
1	3.52	-	Isómero del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻ 137.02330 (100)	0.01	20	[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₆ H ₆ O	93.03345 (15)	a	
2	4.16	4.22 ± 0.06	Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻ 179.03401 (22)	3.02	10	[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₈ H ₇ O ₂	135.04446 (100)	a, b, c	(169)
3	4.69	-	Apigenina-C, C-diglucósido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺ 595.16498 (100)	1.29	10	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	577.14665 (39)	a	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₃	559.14392 (7)		
								[(M+H)-3H ₂ O] ⁺	C ₂₇ H ₂₅ O ₁₂	541.13464 (2)		
								[(M+H)-2H ₂ O-C ₆ H ₆ O ₃] ⁺	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₀	457.12061 (10)		
								[(M+H)-3H ₂ O-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁺	C ₂₁ H ₁₇ O ₇	379.08102 (1)		
4	5.03	5.04 ± 0.02	Ácido- <i>o</i> -hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻ 137.02335 (36)	0.02	20	[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₆ H ₆ O	93.03345 (100)	a, c	
5	5.12	-	Luteolina-C-hexosido- <i>O</i> -desoxihexosil	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺ 595.16473 (100)	1.7	10	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	577.15497 (14)	a	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₃	559.14545 (5)		
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.11267 (11)		
6	5.30	5.30 ± 0.01	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ 449.10681 (0.5)	1.13	20	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.05472 (100)	a, c	
7	5.40	5.42 ± 0.02	Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺ 611.15903 (1)	1.63	10	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465.09952 (1)	a, b, c	(169)
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303.04858 (100)		
8	5.42	5.46 ± 0.04	Ácido rosmarínico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M-H] ⁻ 359.07642 (37)	0.27	10	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₉ H ₆ O ₅	197.04992 (32)	a, b, c	(34,169,170)
								[(M-H)-C ₉ H ₁₀ O ₅] ⁻	C ₉ H ₆ O ₃	161.02354 (100)		
9	5.73	5.72 ± 0.01	Kaempferol-3-rutinósido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺ 595.16486 (11)	1.49	10	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.10736 (36)	a, c	
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.05469 (100)		
								[(M+H)-C ₂ H ₄ O ₂] ⁺	C ₁₈ H ₂₃ O ₈	367.13846 (100)		
								[(M+H)-C ₂ H ₄ O ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁺	C ₁₆ H ₂₁ O ₇	325.12781 (30)		
10	5.80	-	Piranona, Figura 16	C ₂₀ H ₂₆ O ₁₀	[M+H] ⁺ 427.16000 (0.1)	0.30	10	[(M+H)-C ₂ H ₄ O ₂ -C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₄ O ₂] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ O ₅	265.10681(41)	a, b	(167)
								[(M+H)-C ₂ H ₄ O ₂ -C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₄ O ₂ -H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₅ O ₄	247.09605 (7)		
								[(M+H)-C ₂ H ₄ O ₂ -C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₄ O ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁺	C ₁₂ H ₁₃ O ₄	223.09624 (3)		

Tabla 12. Continuación.

11	7.19	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	[M+H] ⁺ 251.16396 (52)	0.85	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₂₁ O ₂	233.15338 (4)		
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₉ O	215.14297 (1)		
								[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₂₁ O	205.15865 (43)		
								[(M+H)-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₉	187.14807 (8)		
12	7.43	-	Salvigenina hidroxilada	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	[M+H] ⁺ 345.09641 (22)	0.47	40	[(M+H)-CH ₃] ⁺ *	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.02791 (22)	a, b	(171)
								[(M+H)-2CH ₃] ⁺	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.04947 (100)		
								[(M+H)-2CH ₃ -CO] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.05432 (3)		
13	7.47	-	Trihidroxi-trimetoxiflavona	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M+H] ⁺ 361.09131 (27)	1.34	40	[(M+H)-CH ₃] ⁺ *	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346.06790 (28)	a	
								[(M+H)-2CH ₃] ⁺	C ₁₆ H ₁₁ O ₈	331.04444 (100)		
								[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O] ⁺ *	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.05746 (30)		
								[(M+H)-2CH ₃ -CO] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303.04956 (56)		
14	7.72	7.73 ± 0.01	Salvigenina	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	[M+H] ⁺ 329.10156 (63)	0.40	40	[(M+H)-CH ₃] ⁺ *	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.07813 (33)	a, c	
								[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O] ⁺ *	C ₁₇ H ₁₂ O ₅	296.06760 (100)		
								[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O-CO] ⁺ *	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.07272 (56)		
								[(M+H)-CH ₃ -H ₂ O-2CO] ⁺ *	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	240.07790 (2)		

^a Identificación basada en el estudio del patrón de fragmentación y su comparación con los espectros de masas de las bases de datos *HMDB* 4.0 (109) y *Massbank* (110).

^b Identificación basada en los datos de la literatura científica sobre especies del género *Hyptis* spp. (34, 167, 169-171).

^c Identificación confirmatoria basada en la comparación de los espectros de masas y tiempos de retención (t_R) de las sustancias patrón, ácido cafeico (98%), ácido-*o*-hidroxibenzoico (99%), luteolina-7-*O*-glucósido (98%), rutina (94%), ácido rosmarínico (97%), kaempferol-3-rutinósido (97%) y salvigenina (98%), adquiridos de *Sigma-Aldrich* (St. Louise, MO, EE. UU.)

Figura 16.

Espectro de masas de la molécula protonada $[M+H]^+$, en m/z 427.16000, de la piranona, registrada por LC/MS, obtenido en el modo SIM y HCD 10 eV.

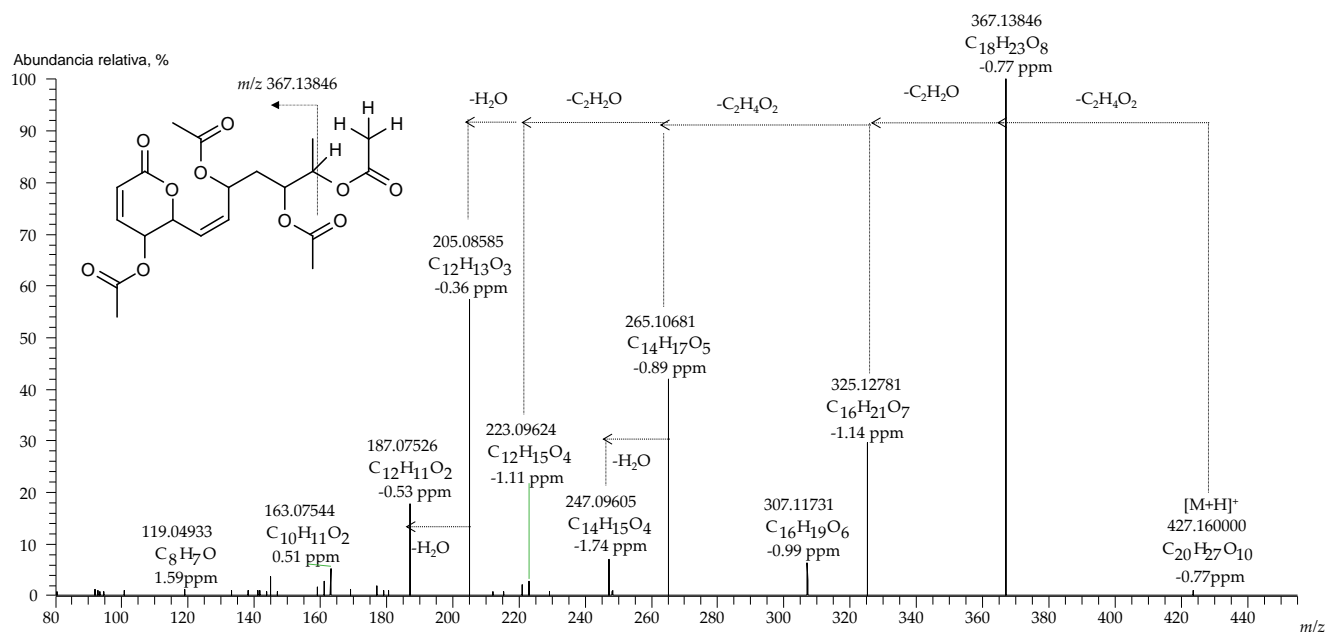


Tabla 13.

Cuantificación de algunos compuestos presentes en los extractos de H. colombiana, obtenidos antes y después de la destilación de plantas, cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico.

N° pico, Tabla Compuesto 12	Familia de compuestos	Cantidad de sustancia, mg/g extracto ± s						
		Estado fenológico						
		Vegetativo*		Floración**		Post-floración***		
		AD (n=9)	DD (n=6)	AD (n=9)	DD (n=6)	AD (n=6)	DD (n=9)	
1	Isómero del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ¹	Ácido hidroxibenzoico	8 ± 6	16 ± 2	4.0 ± 0.8	10 ± 2	4.0 ± 0.7	12.0 ± 0.4
2	Ácido cafeico	Ácido hidroxicinámico	1.0 ± 0.3	1.40 ± 0.06	0.60 ± 0.06	1.0 ± 0.3	0.80 ± 0.09	1.100 ± 0.003
3	Apigenina-C,C-diglucósido ²	Flavona glicosilada	0.40 ± 0.04	0.250 ± 0.001	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.20 ± 0.04	0.20 ± 0.03
4	Ácido- <i>o</i> -hidroxibenzoico	Ácido hidroxibenzoico	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	0.430 ± 0.009
5	Luteolina-C-hexosido-O-desoxihexosil ²	Flavona glicosilada	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
6	Luteolina-7-O-glucósido	Flavona glicosilada	1.60 ± 0.07	<LOQ	2 ± 1	2 ± 1	1.70 ± 0.05	1.5 ± 0.2
7	Rutina	Flavonol glicosilado	10 ± 4	8 ± 1	10 ± 2	6 ± 2	10 ± 5	8.0 ± 0.6
8	Ácido rosmarínico	Ácido hidroxicinámico	20 ± 4	20 ± 8	14 ± 3	20 ± 8	20 ± 8	18 ± 1
9	Kaempferol-3-rutinósido	Flavonol glicosilado	0.6 ± 0.3	0.345 ± 0.002	0.5 ± 0.1	0.30 ± 0.09	0.7 ± 0.5	0.50 ± 0.06
10	Piranona ³	Piranona	70 ± 44	40 ± 1	60 ± 33	40 ± 12	80 ± 17	70 ± 5
11	Lactona sesquiterpénica ⁴	Lactona	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
12	Salvigenina hidroxilada ⁴	Flavona metilada	0.6 ± 0.2	0.86 ± 0.03	0.40 ± 0.06	0.2 ± 0.1	0.20 ± 0.02	0.140 ± 0.005
13	Trihidroxi-trimetoxiflavona	Flavona metilada	0.13 ± 0.01	0.136 ± 0.001	<LOQ	0.14 ± 0.01	<LOQ	<LOQ
14	Salvigenina	Flavona metilada	0.25 ± 0.04	0.5 ± 0.1	0.20 ± 0.08	0.20 ± 0.07	<LOQ	<LOQ

Tabla 13. Continuación

Familias de compuestos						
Piranona	70 ± 44	40 ± 1	60 ± 33	40 ± 12	80 ± 17	70 ± 5
Ácidos hidroxicinámicos	20 ± 2	20 ± 4	15 ± 1	20 ± 4	20 ± 4	19.0 ± 0.5
Ácidos hidroxibenzoicos	10 ± 6	16 ± 2	4.0 ± 0.8	10 ± 2	4.0 ± 0.7	12.0 ± 0.4
Flavonoles glicosilados	10 ± 2	8.0 ± 0.5	10 ± 1	6 ± 1	10 ± 2	8.5 ± 0.3
Flavonas glicosiladas	2.00 ± 0.01	0.20 ± 0.01	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.00 ± 0.01	1.70 ± 0.01
Flavonas metiladas	0.97 ± 0.04	1.50 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Lactona sesquiterpénica	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

* Valores promedio determinados para los extractos de *H. colombiana* de plantas cosechadas en estado vegetativo tres veces. Fechas: 1-10-2021; 28-06-2022, 12-01-2023.

** Valores promedio determinados para los extractos de *H. colombiana* de plantas cosechadas en estado de floración tres veces. Fechas: 30-03-2022; 24-11-2022; 12-01-2023.

*** Valores promedio determinados para los extractos de *H. colombiana* de plantas cosechadas en estado de post-floración dos veces. Fechas: 21-01-2022; 12-01-2023.

AD: Antes de su destilación. DD: Después de su destilación.

LOQ: Límite de cuantificación. LOD: Límite de detección.

¹ Cantidad expresada en equivalente del ácido *p*-hidroxibenzoico. ² Cantidad expresada en equivalente de vitexina. ³ Cantidad expresada en equivalente de rutina. ⁴ Cantidad expresada en equivalente de salvigenina.

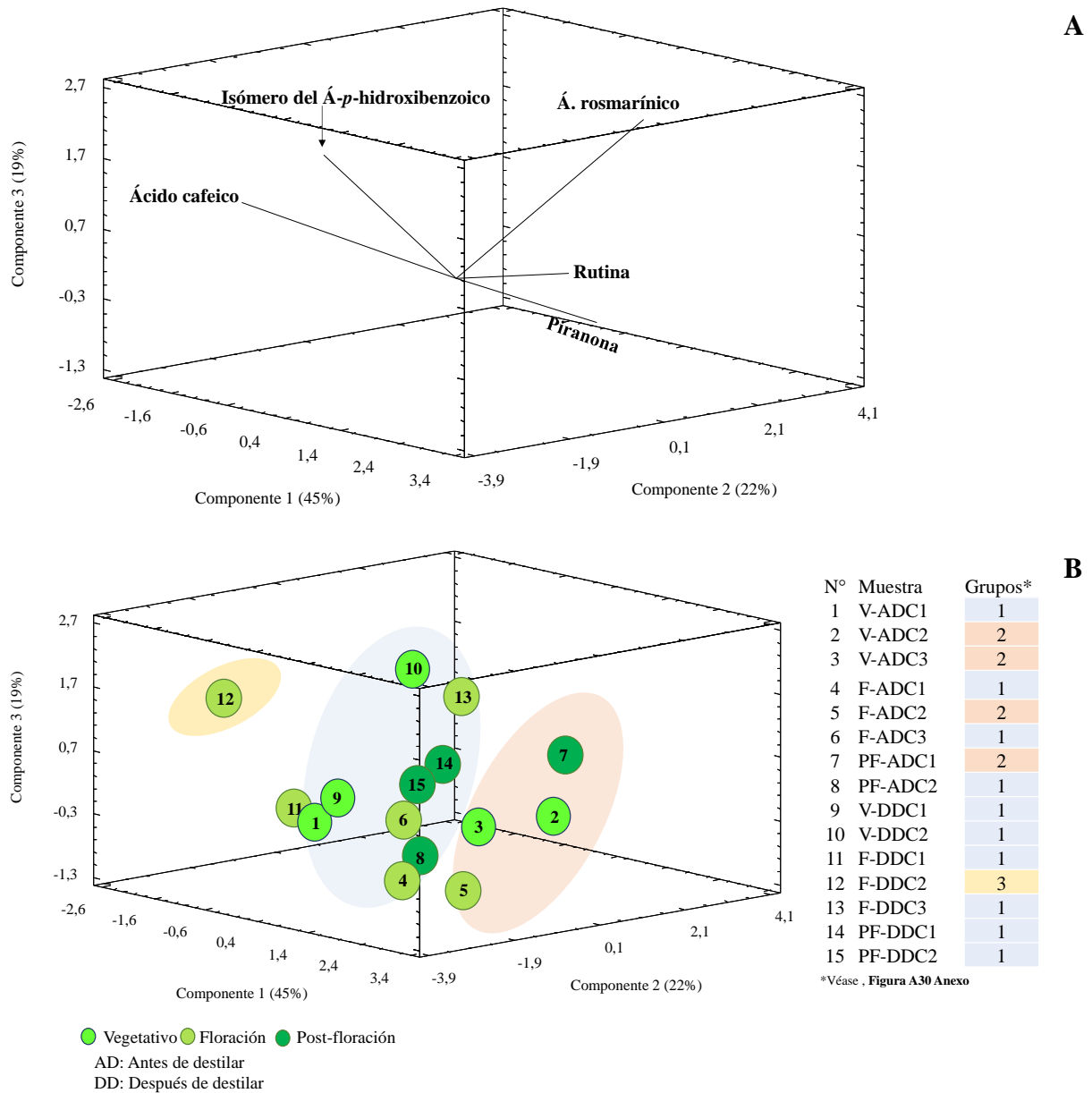
La piranona, el ácido rosmarínico, la rutina y el isómero del ácido *p*-hidroxibenzoico fueron los compuestos mayoritarios detectados en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de plantas de *H. colombiana*, tanto antes como después de su destilación (**Tabla 13**). Hasta el momento, no se han encontrado estudios sobre la composición química de extractos hidroalcohólicos de *H. colombiana*. En los extractos de *H. pectinata* (34) e *H. suaveolens* (169,170) se hallaron rutina y ácidos rosmarínico y cafeico, los mismos que se encontraron en los extractos de *H. colombiana*. Luteolina-*O*-glucósido, salvigenina y kaempferol-3-*O*-rutinosido, se detectaron también, en los extractos de *H. colombiana* bajo estudio.

El compuesto principal en los extractos hidroalcohólicos de plantas de *H. colombiana* fue la piranona [70 mg/g extracto], presente en cantidades similares en los extractos aislados de plantas, cosechadas en los tres estados fenológicos. Santana *et al.* (172), evaluaron la citotoxicidad frente a líneas celulares de tumor de mama MDA-MB-231 de extractos etanólicos de *H. pectinata* y de tres compuestos aislados (pectinolide E, pectinolide J e hyptolide). Los extractos de plantas de *H. pectinata* inhibieron la proliferación de células cancerígenas con una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 45.91± 0.02 µg/mL. Los compuestos individuales, *e.g.*, pectinolide E (85.2 µg/mL), pectinolide J (76.8 µg/mL) e hyptolide (73.6 µg/mL) tuvieron menor inhibición en dichas células, sin embargo, su mezcla incrementó la inhibición de las líneas celulares con IC₅₀ de 36.8 µg/mL, lo que indica un posible efecto sinérgico.

Las cantidades de ácido rosmarínico [17 mg/g extracto seco] y rutina [8 mg/g extracto seco] en extractos hidroetanólicos de plantas de *H. colombiana*, obtenidos antes y después de la destilación de plantas colectadas en los tres estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración, no presentaron diferencias estadísticamente significativas $p > 0.05$ (**Tabla A11**).

Figura 17.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los extractos hidroalcohólicos de *H. colombiana* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).



En el análisis de componentes principales (**Figura 17**), para examinar la composición química de los extractos de material vegetal antes y después de su destilación de plantas de *H. colombiana*; en los tres estados fenológicos. Los compuestos que más contribuyeron a la

componente 1 (45%) fueron la piranona y la rutina. En la región rosada, se agruparon las muestras en cuya combinación presentaron las más altas cantidades tanto de piranona como de rutina. Los extractos que presentaron altos contenidos del isómero del ácido-*p*-hidroxibenzoico y menores contenidos de rutina fueron las muestras V-ADC1, V-DDC1 y F-DDC1 (N° 1, 9 y 11).

En general, el contenido de ácido de rosmarínico no varió en función del proceso destilativo, como sí ocurrió en el caso de los extractos de biomasa residual de *S. viminea*, después de su destilación, el ácido rosmarínico aumentó su contenido, probablemente, porque la radiación de microondas facilitó el rompimiento del tejido celular. Los tallos de las plantas de *H. colombiana* son más gruesos, que los de *S. viminea*, por ello, resulta tal vez más difícil reducir el tamaño de partícula para facilitar el rompimiento de las membranas celulares para liberar metabolitos secundarios. El tiempo de destilación en plantas de *H. colombiana* por MWHD (45 min) fue más corto, que el de las plantas de *S. viminea* (60 min).

El ácido rosmarínico presente en los extractos de *S. viminea*, se encuentra en muchas plantas de la familia Lamiaceae, principalmente, en las de la subfamilia Nepetoideae (39). El ácido rosmarínico se biosintetiza en las plantas a partir de dos aminoácidos, L-tirosina y L-fenilalanina, mediante una reacción catalizada por ocho enzimas (43). En las plantas, la función del ácido rosmarínico es otorgar resistencia al estrés ambiental y proporcionar defensa contra patógenos y herbívoros (173), es una sustancia con una actividad antioxidante alta.

De 33.000 plantas de *H. colombiana*, cultivadas en una hectárea y cosechadas tres veces por año, se podrían obtener 2000 kg/(ha año) de extracto hidroalcohólicos de material vegetal, obtenidos antes o después de su destilación y *ca.* 40 kg/(ha año) del ácido rosmarínico. Esto,

agregará valor al material vegetal, después de su destilación (biomasa residual), ya que puede ser aprovechado como fuente del ácido rosmarínico y como posible conservante de alimentos para animales.

5.4.3 Estudio de *Ambrosia cumanensis*

En los AE destilados por MWHD, con el rendimiento *ca.* 0.03 % p/p de *A. cumanensis* se encontraron 34 compuestos en cantidades relativas > 0.1 %, de los cuales, se identificaron positivamente 23 compuestos (80%) (Véase **Tabla 14**). Los compuestos presentes en el AE de *A. cumanensis* fueron principalmente hidrocarburos sesquiterpénicos y monoterpenos oxigenados. En la **Figura 18**, se muestran los perfiles cromatográficos de los AE, destilados por MWHD, de plantas de *A. cumanensis*, colectadas en sus tres estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. La cuantificación de los compuestos principales (\geq 2%), identificados positivamente en estos AE, se realizó usando el método de calibración externa (**Tablas A1 y A2, Anexo**)

Figura 18.

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los aceites esenciales de *A. cumanensis*, destilados de plantas recolectadas en los tres estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Columna DB-5MS (60 m), split 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos cromatográficos en la **Tabla 14**.

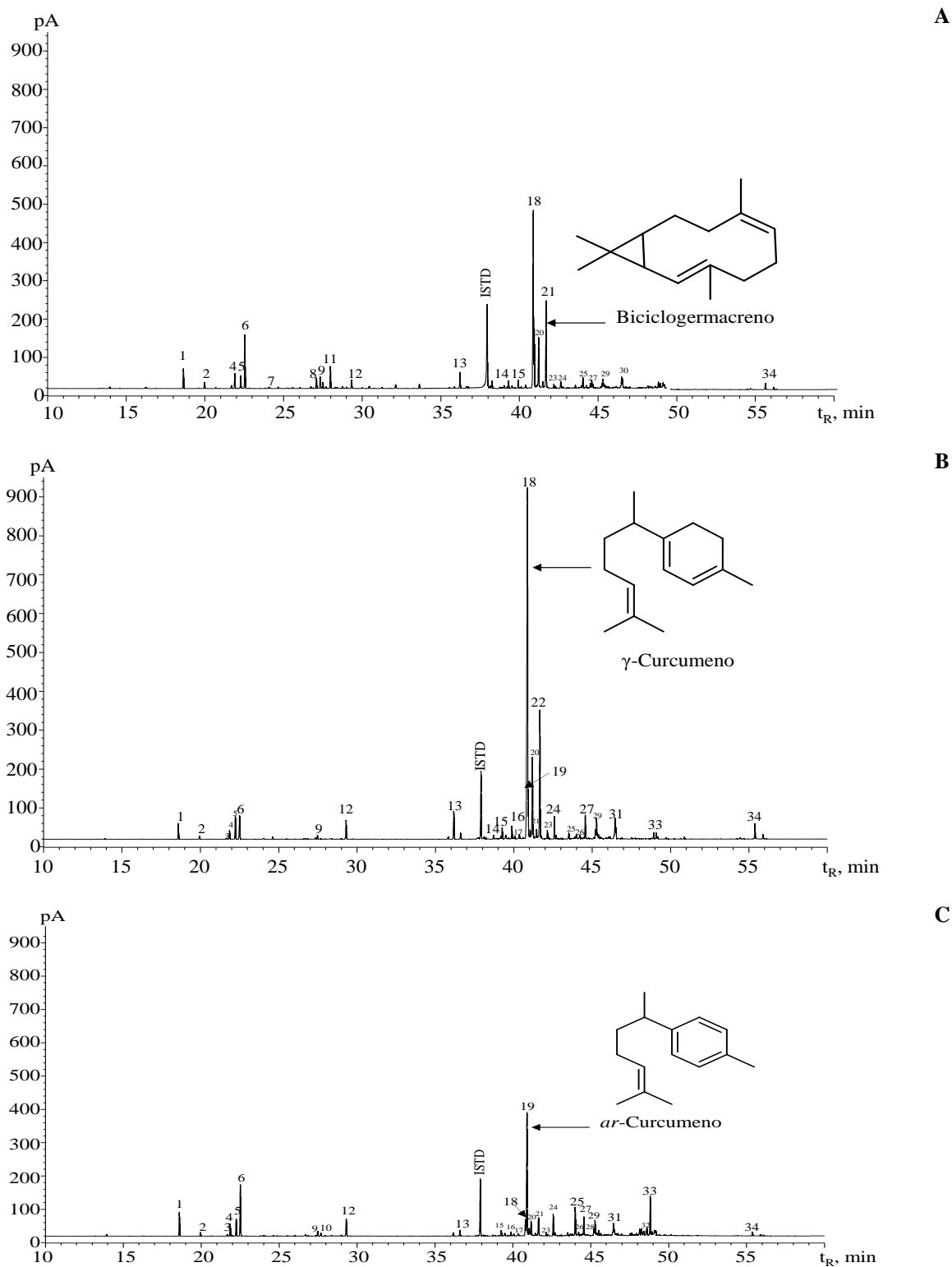


Tabla 14.

Composición química, determinada por GC/MS/FID, de los AE destilados por MWHF de plantas de A. cumanensis cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico.

N° Fig. 18	Compuesto	GC/MS (DB-5MS)			GC/MS (DB-WAX)			Cantidad relativa GC/FID (%; ± s)			Criterios de identificación
		LRI _{exp}	LRI _{STD}	LRI _{lit}	LRI _{exp}	LRI _{STD}	LRI _{lit}	Estados fenológicas			
								Vegetativo, n=6*	Floración, n=9**	Post-floración, n=6***	
1	Santolina trieno	901	-	907 (118)	1029	-	1036 (118)	2 ± 1	1.6 ± 0.2	4 ± 1	a, b
2	α-Pineno	934	937	936 (118)	1021	1024	1025 (118)	1.0 ± 0.5	0.30 ± 0.05	0.6 ± 0.2	a, b, c
3	Sabineno	973	976	973 (118)	1121	1124	1122 (118)	0.4 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	a, b, c
4	β-Pineno	979	-	981 (120)	1108	-	1110 (118)	1 ± 1	1.0 ± 0.3	2 ± 1	a, b
5	β-Mirceno	989	989	989 (118)	1162	1165	1161 (118)	1.7 ± 0.1	2.5 ± 0.4	3.0 ± 0.6	a, b, c
6	C ₁₀ H ₁₆ O (Figura A15, Anexo)	992	-	-	1253	-	-	10 ± 3	4 ± 1	10 ± 2	b
7	Limoneno	1031	1033	1030 (120)	1199	1202	1198 (118)	0.10 ± 0.03	-	0.10 ± 0.04	a, b, c
8	Filifolona	1103	-	1109 (174)	1443	-	1445 (175)	1 ± 1	-	0.29 ± 0.01	a, b
9	C ₁₀ H ₁₄ O (Figura A16, Anexo)	1110	-	-	1489	-	-	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.4	b
10	C ₁₀ H ₁₄ O (Figura A17, Anexo)	1112	-	-	1503	-	-	0.80 ± 0.08	0.30 ± 0.02	0.7 ± 0.1	b
11	Crisantenona	1125	-	1125 (118)	1512	-	1508 (118)	5 ± 2	-	4 ± 4	a, b
12	(Z)-Crisantenol	1167	-	1163 (118)	1747	-	1751 (176)	2.0 ± 0.9	1 ± 1	4 ± 4	a, b
13	C ₁₀ H ₁₆ O (Figura A18, Anexo)	1350	-	-	1645	-	-	0.50 ± 0.09	0.70 ± 0.04	1.0 ± 0.4	b
14	Italiceno	1413	-	1405 (119)	1552	-	1543 (118)	0.30 ± 0.08	0.4 ± 0.1	0.30 ± 0.01	a, b
15	(E)-β-Cariofileno	1429	1434	1428 (120)	1606	1611	1617 (120)	1.40 ± 0.05	1.20 ± 0.08	1.30 ± 0.02	a, b, c
16	(E)-β-Farneseno	1453	-	1455 (118)	1664	-	1664 (118)	1.00 ± 0.04	1.2 ± 0.1	0.90 ± 0.04	a, b
17	α-Humuleno	1465	1465	1465 (120)	1682	1683	1681 (129)	0.6 ± 0.1	0.70 ± 0.04	0.50 ± 0.07	a, b, c
18	γ-Curcumeno	1483	-	1480 (118)	1696	-	1692 (118)	18 ± 16	40 ± 12	15 ± 15	a, b
19	ar-Curcumeno	1486	-	1482 (118)	1771	-	1774 (118)	13 ± 14	10 ± 6	16 ± 16	a, b
20	Germacreno D	1490	1490	1489 (128)	1716	1716	1708 (118)	8 ± 4	9.0 ± 0.7	7 ± 5	a, b, c
21	Biciclogermacreno	1504	-	1502 (130)	1739	-	1738 (131)	7 ± 7	10 ± 6	9 ± 6	a, b
22	β-Bisaboleno	1510	-	1508 (118)	1727	-	1727 (118)	6 ± 6	4 ± 4	1 ± 1	a, b
23	β-Sesquifelandreno	1528	-	1524 (118)	1770	-	1771 (118)	0.3 ± 0.2	0.20 ± 0.02	0.2 ± 0.2	a, b
24	N.I. (Figura A19, Anexo)	1541	-	-	1821	-	-	1.6 ± 0.3	2.5 ± 0.3	1 ± 1	b
25	Germacreno-D-4-ol	1585	-	1576 (177)	2051	-	2057 (118)	4 ± 4	2 ± 2	3 ± 3	a, b
26	Óxido de cariofileno	1593	1598	1595 (130)	1988	1996	1993 (132)	0.40 ± 0.08	0.70 ± 0.09	0.6 ± 0.2	a, b, c

Tabla 14. Continuación.

27	C ₁₅ H ₂₆ O (Figura A20, Anexo)	1614	-	-	2019	-	-	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.6	b
28	Junenol	1636	-	1629 (178)	2062	-	2052 (179)	0.78 ± 0.01	1.10 ± 0.01	1.0 ± 0.4	a, b
29	N.I. (Figura A21, Anexo)	1641	-	-	1921	-	-	1.4 ± 0.8	2.5 ± 0.1	3.0 ± 0.9	b
30	C ₁₅ H ₂₄ , (Figura A22, Anexo)	1686	-	-	2233	-	-	0.30 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.30 ± 0.01	b
31	C ₁₅ H ₂₆ O (Figura A23, Anexo)	1690	-	-	2213	-	-	1.10 ± 0.03	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.7	b
32	C ₁₅ H ₂₂ O (Figura A24, Anexo)	1790	-	-	2425	-	-	1 ± 1	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.7	b
33	C ₁₅ H ₂₂ O (Figura A25, Anexo)	1797	-	-	2434	-	-	3 ± 3	0.7 ± 0.1	4 ± 4	b
34	Fitol	2108	-	2116 (118)	2609	-	2613 (118)	1.0 ± 0.6	0.40 ± 0.09	1.0 ± 0.8	a, b
Hidrocarburos monoterpénicos, %								7.0 ± 0.4	5.8 ± 0.1	10.0 ± 0.4	
Monoterpenos oxigenados, %								21.0 ± 0.8	3.0 ± 0.4	21.0 ± 0.5	
Hidrocarburos sesquiterpénicos, %								57 ± 2	74 ± 1	53 ± 2	
Sesquiterpenos oxigenados, %								15.0 ± 0.6	14.0 ± 0.2	19.0 ± 0.7	
Diterpenos oxigenados, %								1.0 ± 0.6	0.40 ± 0.09	1.0 ± 0.8	

* Valores promedio determinados para los AE de *A. cumanensis* cosechadas en estado vegetativo, dos veces y analizadas por triplicado. Fechas: 18-01-2022; 01-09-2022.

** Valores promedio determinados para los AE de *A. cumanensis* cosechadas en estado de floración, tres veces y analizadas por triplicado. Fechas: 16-05-2022; 17-08-2022; 01-09-2022

*** Valores promedio determinados para los AE de *A. cumanensis* cosechadas en estado de post-floración, dos veces y analizadas por triplicado. Fechas: 19-11-2021; 26-08-2022.

^a Identificación tentativa basada en tiempos de retención (t_R) e índices de retención lineales (LRI, por sus siglas en inglés) en las columnas DB-5MS (apolar) y DB-WAX (polar) (118-120, 128-132 174-179).

^b Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS; ionización electrónica, 70 eV, coincidencia > 95%), estudio de los patrones de fragmentación, y por comparación de los espectros de masas con los de las bases de datos espectrales Adams (2007), NIST (2017) y Wiley (2008).

^c Identificación confirmatoria basada en el uso de las siguientes sustancias-patrón: α -pineno (98%), sabineno (95%), β -mirceno (94%), limoneno (97%), (*E*)- β -cariofileno (98.5%), α -humuleno (96%), germacreno D (90%) y óxido de cariofileno (95%) y la comparación de sus espectros de masas y tiempos de retención (t_R) con los de los compuestos presentes en las muestras.

STD: Sustancia-patrón.

Tabla 15.

Cuantificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales, destilados por MWHD, de plantas de A. cumanensis cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico.

Compuesto	Tipo	mg compuesto/g AE ± s		
		Estados fenológicos		
		Vegetativo, n=6*	Floración, n=9**	Post-floración, n=6***
Santolina trieno ¹	HM	30 ± 8	20 ± 5	40 ± 7
β-Pineno ²	HM	10 ± 13	10 ± 6	20 ± 11
β-Mirceno	HM	16 ± 3	30 ± 8	37 ± 1
Crisantenona ³	MO	40 ± 19	-	30 ± 32
(Z)-Crisantenol ³	MO	10 ± 4	10 ± 11	30 ± 28
γ-Curcumeno ⁴	HS	100 ± 99	300 ± 213	100 ± 110
ar-Curcumeno ⁴	HS	70 ± 73	70 ± 37	100 ± 87
Germacreno D ⁴	HS	40 ± 36	70 ± 23	50 ± 45
Biciclogermacreno ⁴	HS	50 ± 54	60 ± 40	70 ± 54
β-Bisaboleno ⁴	HS	40 ± 33	50 ± 50	10 ± 12
Germacreno-D-4-ol ⁵	SO	30 ± 30	20 ± 9	5 ± 5

* Valores promedio determinados para los AE de *A. cumanensis* cosechadas en estado vegetativo, dos veces y analizadas por triplicado. Fechas: 18-01-2022; 01-09-2022.

** Valores promedio determinados para los AE de *A. cumanensis* cosechadas en estado de floración, tres veces y analizadas por triplicado. Fechas: 16-05-2022; 17-08-2022; 01-09-2022

*** Valores promedio determinados para los AE de *A. cumanensis* cosechadas en estado de post-floración, dos veces y analizadas por triplicado. Fechas: 19-11-2021; 26-08-2022.

HM: Hidrocarburos monoterpénicos, MO: Monoterpenos oxigenados, HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos, SO: Sesquiterpenos oxigenados.

1: Cantidad expresada en equivalente de β-mirceno. 2: Cantidad expresada en equivalente de α-pineno 3: Cantidad expresada en equivalente de timol. 4: Cantidad expresada en equivalente de (E)-β-cariofileno. 5: Cantidad expresada en equivalente de óxido de cariofileno.

LOQ: Límite de cuantificación.

LOD: Límite de detección.

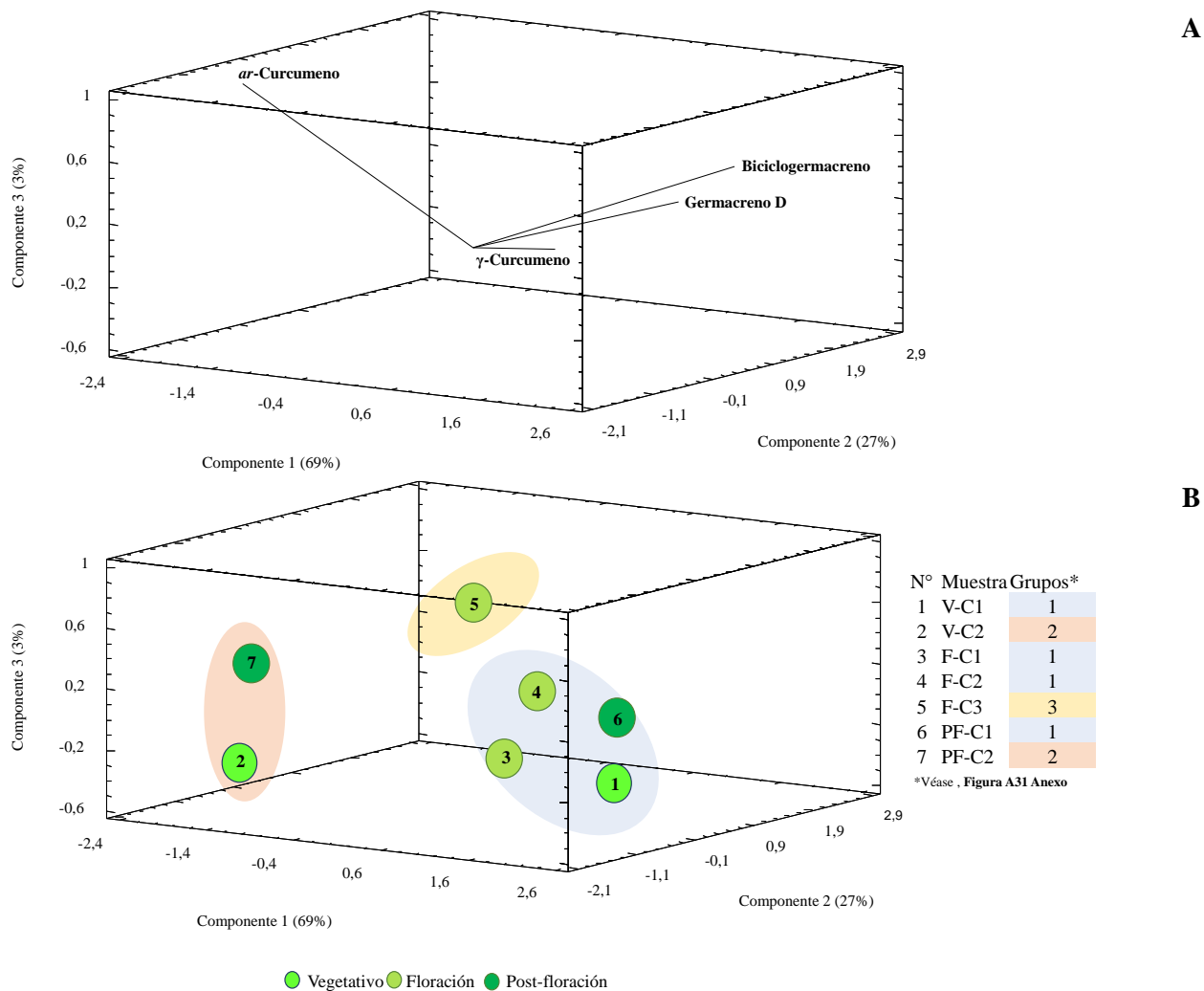
El γ -curcumeno (100-300 mg sustancia/g de AE), *ar*-curcumeno (70-100 mg sustancia/g de AE) y el biciclogermacreno (54-66 mg sustancia/g de AE) fueron los compuestos mayoritarios (**Tabla 15**), en los AE de plantas, cosechadas en los tres estados fenológicos. Para los AE de plantas recolectadas en el mismo estado fenológico, las cantidades de los componentes mayoritarios variaron, presentando desviaciones altas.

En el análisis de componentes principales (**Figura 19**) se puede verificar que los AE de *A. cumanensis*, de plantas colectadas en cada estado fenológico no lograron agruparse en una misma región (**Figura A31 Anexo**), lo que indica altas variaciones en las cantidades de sus compuestos mayoritarios. En la componente 1 (que representa el 69% de la variabilidad total), los compuestos que más aportaron fueron el germacreno D y el γ -curcumeno. Los AE que se agruparon en la región azul son los que tienen la combinación entre las más altas cantidades tanto de γ -curcumeno como de germacreno D, y los menores contenidos de *ar*-curcumeno. Por otro lado, en los AE destilados de plantas colectadas en la segunda cosecha en vegetativo (V-C2) y post-floración (PF-C2) mostraron los más altos contenidos de *ar*-curcumeno.

Por lo tanto, la variación en las cantidades para cada compuesto se debió, posiblemente, a que las plantas de artemisa fueron muy sensibles a las condiciones ambientales variables presentadas durante los años 2021-2022. Para los AE, destilados de plantas recolectadas en floración, durante las tres cosechas, no se detectaron filifolona ni crisantenona.

Figura 19.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los aceites esenciales de A. cumanensis colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. A. Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y B. Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).



Aćimović *et al.* (180), han estudiado los AE de la planta *Helichrysum italicum* (familia Asteraceae); y describieron el impacto que tienen las variaciones estacionales (temperatura, precipitación e insolación) sobre diferentes cosechas realizadas en plena floración de las plantas, durante los tres años consecutivos. Para ello, los autores monitorearon los principales componentes del AE, γ -curcumeno y *ar*-curcumeno y detectaron que las cantidades más altas de

estas sustancias fueron los AE de plantas, cosechadas cuando había más precipitaciones en la primavera o verano. Otros autores (181), documentaron que en los AE de plantas de *H. italicum* cosechadas en plena floración la cantidad de γ -curcumeno (12%) fue más alta que la del AE destilado de plantas en estados de pre-floración (3.3%), post-floración (3.2%) o vegetativo (1.4%). Los factores genéticos, ambientales y la edad del cultivo también pueden afectar el contenido de los metabolitos secundarios de las plantas (182).

En Venezuela, Yáñez *et al.* (33), reportaron los compuestos mayoritarios γ -curcumeno (21%), *ar*-curcumeno (14%) y bornil acetato (10%) en el AE de plantas destiladas de *A. peruviana*. En costa Rica, Ciccio *et al.* (183), obtuvieron AE de las partes florales de plantas de *A. cumanensis*, y encontraron, principalmente, biclogermacreno (14.7-23.4%) y germacreno D (10.1-16.9%). Los compuestos mayoritarios, reportados por Yáñez *et al.* (33) y Ciccio *et al.* (183) en los AE de altamisa, también, se encontraron en los AE de *A. cumanensis* bajo estudio. El *ar*-curcumeno tiene actividad antiinflamatoria en células epiteliales bronquiales, porque reduce una quimiocina proinflamatoria (IL-8), cuyo contenido se incrementa en pacientes asmáticos (184).

Los AE de *A. cumanensis* o *A. peruviana* se conocen por sus actividades antimicrobiana (61), antilarvicida (61) y como acaricida contra larvas y hembras adultas de garrapatas comunes (*Rhipicephalus microplus*) (185). En este estudio se evaluó la actividad antioxidante del aceite esencial y extractos de *A. cumanensis*. De acuerdo con las condiciones agronómicas en una hectárea pueden crecer *ca.* 25.000 plantas de *A. cumanensis*, que se podrían cosechar tres veces al año, para obtener *ca.* 45 kg de AE.

En los extractos hidroalcohólicos de plantas de *A. cumanensis* obtenidos del material vegetal, antes y después de su destilación, se detectaron 34 compuestos. Se identificaron 22 lactonas sesquiterpénicas, ocho ácidos hidroxicinámicos, dos ácidos hidroxibenzoicos y dos flavonas metiladas (**Tabla 16**). En la **Figura 20** y **Figura A26 (Anexo)**, se muestran las corrientes iónicas extraídas de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-MS, operado en modo SIM, de los compuestos presentes en los extractos de *A. cumanensis* obtenidos.

En los espectros de masas de las 22 lactonas, identificadas tentativamente, se observan los patrones de fragmentación similares, basados en las pérdidas sucesivas de moléculas de H₂O y CO (186). Los extractos de *A. cumanensis*, se analizaron, también, por GC/MS. En la corriente iónica total (cromatograma) se detectó una lactona sesquiterpénica (**Figura 21**). El espectro de masas de esta lactona se comparó con el de la ambrosina reportada en la base de datos NIST (2017), se encontraron las mismas señales y el mismo patrón de fragmentación.

Por lo tanto, al monitorear por LC/MS la molécula protonada $[M+H]^+$ en m/z 247.13245 (**Figura 22**), en los extractos de plantas de *A. cumanensis*, se detectaron tres señales con la misma m/z del compuesto ambrosina, todas con la misma fórmula molecular y sus pérdidas características, por lo que se deduce presuntivamente que se identificaron tres isómeros de ambrosina.

En las corrientes iónicas obtenidas por LC/MS de los extractos de *A. cumanensis*, aparecen tres picos con t_R 5.47, 5.81 y 6.46 min. Los espectros de masas de estos compuestos (ESI, modo positivo, HCD 30 eV) poseen los mismos iones-producto (**Figura 22**) y el mismo patrón de fragmentación, por eso, se puede sugerir que estas sustancias son isómeros.

Figura 20.

Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ o deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-MS (escala 1.8×10^8) de compuestos en los extractos hidroalcohólicos de *A. cumanensis*, aislados antes de su destilación, de plantas recolectadas en diferentes estados fenológicos: **A.** Vegetativo; **B.** Floración; **C.** Post-floración. Véase la identificación de compuestos en la **Tabla 16.**

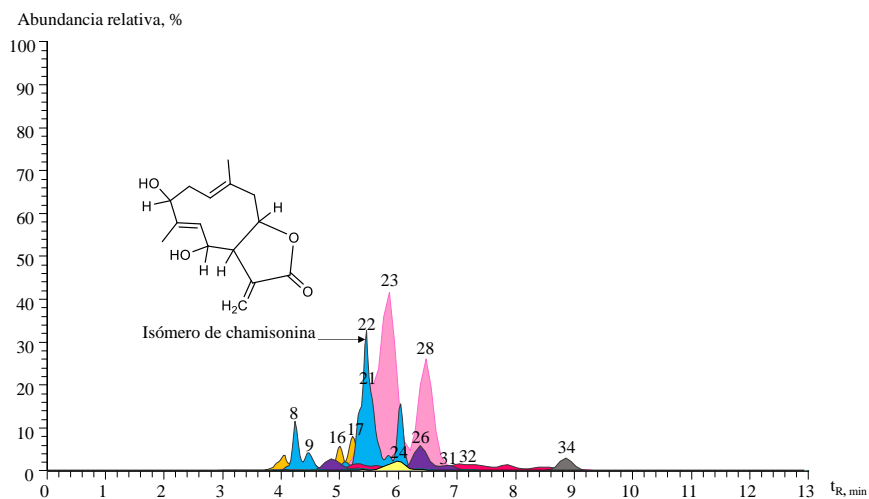
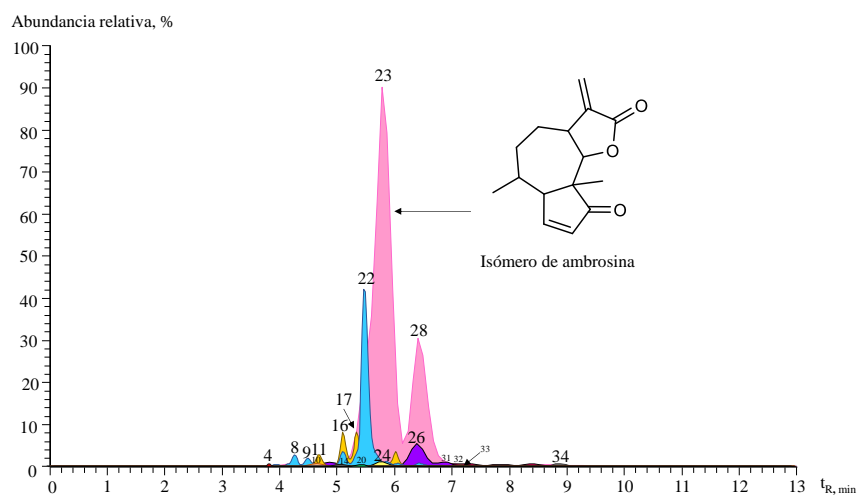
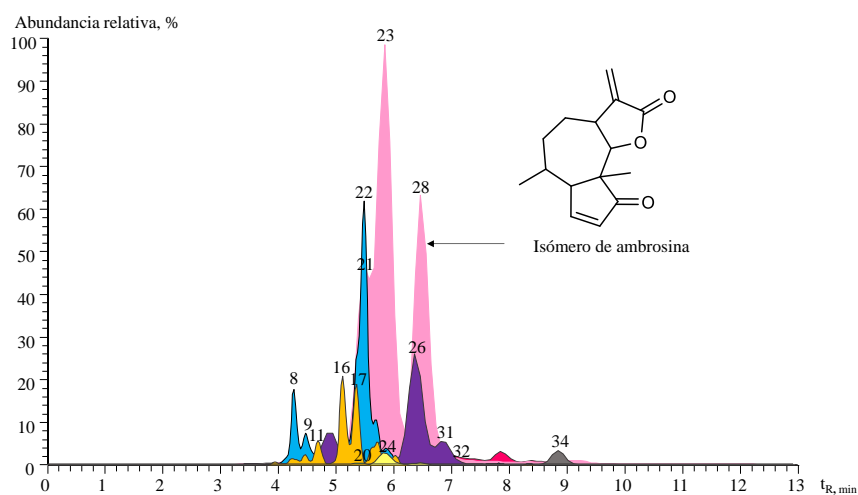
**A****B****C**

Tabla 16.

Masas exactas de moléculas deprotonadas [M-H]⁻ y protonadas [M+H]⁺, identificadas por UHPLC-ESI^{+/-}-Orbitrap-MS de sustancias presentes, en los extractos hidroetanólicos, obtenidos a partir de plantas de A. cumanensis, cosechadas en los diferentes estados fenológicos.

N° Fig. 20 y Fig. A26	tr, min		Compuesto	Fórmula	Masas experimentales, m/z (I, %)	Δ ppm	HCD, eV	Iones-producto	Fórmula	m/z, I (%)	Criterios de identificación	Referencia
	Extracto	STD										
1	3.27	-	Isómero del ácido cafeoilquinico	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	[M-H] ⁻ 353.08636 (17)	0.34	20	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.05501 (100)	a	
								[(M-H)-C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁻	C ₉ H ₇ O ₄	179.03430 (63)		
								[(M-H)-C ₈ H ₁₀ O ₇] ⁻	C ₈ H ₇ O ₂	135.04430 (9)		
2	3.52	-	Isómero del ácido p-hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻ 137.02310(100)	1.59	20	[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₆ H ₅ O	93.03330 (42)	a	
3	3.82	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	[M+H] ⁺ 279.12213 (25)	0.56	20	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₄	261.11188 (82)	a	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₃ H ₁₅ O ₃	243.10135 (47)		
								[(M+H)-3H ₂ O] ⁺	C ₁₃ H ₁₃ O ₂	225.09036 (52)		
								[(M+H)-2H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₅ O ₂	215.10664 (16)		
								[(M+H)-2H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₃ O	197.09581 (100)		
4	3.84	3.86 ± 0.05	Ácido-3-cafeoilquinico	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	[M-H] ⁻ 353.08691 (16)	1.21	10	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.05501 (100)	a, b, c	(36)
5	3.96	3.96 ± 0.02	Ácido-4-cafeoilquinico	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	[M-H] ⁻ 353.08636 (0.2)	0.34	10	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.05499 (51)	a, b, c	(36)
								[(M-H)-C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁻	C ₉ H ₇ O ₄	179.03381 (66)		
								[(M-H)-C ₉ H ₈ O ₄] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	173.04434 (100)		
								[(M-H)-C ₈ H ₁₀ O ₇] ⁻	C ₈ H ₇ O ₂	135.04375 (8)		
6	4.11	-	Isómero del ácido feruloilquinico	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻ 367.10211 (81)	0.33	10	[(M-H)-C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁻	C ₁₀ H ₉ O ₄	193.04933 (100)	a	
7	4.12	-	Isómero del ácido dicafeoilquinico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻ 515.11731(100)	1.09	10	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.08640 (32)	a	
8	4.27	-	Isómero de chamisonina	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M+H] ⁺ 265.14319 (27)	0.24	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₉ O ₃	247.13269 (37)	a	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₃ H ₁₇ O ₂	229.12210 (25)		
								[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ O ₂	219.13783 (100)		
								[(M+H)-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ O	201.12732 (72)		
9	4.49	-	Isómero de chamisonina	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M+H] ⁺ 265.14325 (10)	0.18	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₉ O ₃	247.13257 (13)	a	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₃ H ₁₇ O ₂	229.12216 (100)		
								[(M+H)-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ O ₂	219.13785 (42)		
								[(M+H)-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ O	201.12732 (55)		
10	4.63	-	Isómero del ácido feruloilquinico	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻ 367.10211 (81)	0.67	10	[(M-H)-C ₁₀ H ₁₀ O ₄] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	173.04417 (100)	a	

Tabla 16. Continuación

11	4.67	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₁₈ O ₄	[M+H] ⁺ 263.12756 (78)	0.22	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₃	245.11707 (46)	a
								[(M+H)-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ O ₃	235.13277 (27)	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₅ O ₂	227.10661 (23)	
								[(M+H)-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ O ₂	217.12224 (100)	
12	4.77	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	[M+H] ⁺ 279.12231 (100)	0.38	20	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₄	261.11185 (36)	a
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₅ O ₃	243.10143 (14)	
								[(M+H)-3H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₃ O ₂	225.09082 (12)	
								[(M+H)-2H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₅ O ₂	215.10654 (24)	
13	5.02	5.04 ± 0.02	Ácido- <i>o</i> -hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻ 137.02312 (33)	0.20	20	[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₆ H ₅ O	93.03332 (100)	a, c
14	5.07	-	Isómero del ácido dicafeoilquinico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻ 515.11804 (100)	0.36	10	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.08685 (0.4)	a
15	5.11	-	Isómero de chamisonina	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M+H] ⁺ 265.14325 (45)	0.18	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₉ O ₃	247.13269 (54)	a
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₂	229.12204 (43)	
								[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ O ₂	219.13780 (100)	
								[(M+H)-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ O	201.12724 (77)	
16	5.12	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₁₈ O ₄	[M+H] ⁺ 263.12750 (46)	0.28	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₃	245.11696 (51)	a
								[(M+H)-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ O ₃	235.13269 (13)	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₅ O ₂	227.10645 (31)	
								[(M+H)-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ O ₂	217.12213 (100)	
								[(M+H)-CO-H ₂ O-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₅ O	199.11166 (63)	
17	5.33	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₁₈ O ₄	[M+H] ⁺ 263.12741 (30)	0.37	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₃	245.11693 (71)	a
								[(M+H)-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ O ₃	235.13258 (9)	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₅ O ₂	227.10643 (35)	
								[(M+H)-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ O ₂	217.12209 (100)	
								[(M+H)-CO-H ₂ O-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₅ O	199.11160 (64)	
18	5.39	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₂₂ O ₆	[M-H] ⁻ 297.13324 (100)	0.02	30	[(M-H)-H ₂ O] ⁻	C ₁₅ H ₁₉ O ₅	279.12289 (11)	a
								[(M-H)-CO ₂] ⁻	C ₁₄ H ₂₁ O ₄	253.14348 (23)	
								[(M-H)-CO ₂ -H ₂ O] ⁻	C ₁₄ H ₁₉ O ₃	235.13274 (51)	
19	5.41	-	Isómero del ácido dicafeoilquinico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻ 515.11823 (100)	0.17	10	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.08701 (38)	a
20	5.41	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₂₄ O ₇	[M-H] ⁻ 315.14383 (100)	0.01	20	[(M-H)-H ₂ O] ⁻	C ₁₅ H ₂₁ O ₆	297.13342 (32)	a
								[(M-H)-H ₂ O-CO ₂] ⁻	C ₁₄ H ₂₁ O ₄	253.14366 (41)	
								[(M-H)-H ₂ O-CO ₂ -CO ₂] ⁻	C ₁₃ H ₂₁ O ₂	209.15344 (74)	

Tabla 16. Continuación

21	5.47	-	Isómero de ambrosina	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	[M+H] ⁺ 247.13251 (79)	0.36	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₂	229.12199 (100)	a
								[(M+H)-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ O ₂	219.13773 (13)	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₅ O	211.11145 (13)	
								[(M+H)-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ O	201.12718 (90)	
22	5.49	-	Isómero de chamisonina	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M+H] ⁺ 265.14343 (6)	0.01	30	[(M+H)-CO-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₃ H ₁₇	173.13235 (17)	a
								[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₉ O ₃	247.13278 (20)	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₂	229.12228 (69)	
								[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ O ₂	219.13792 (23)	
23	5.81	-	Isómero de ambrosina	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	[M+H] ⁺ 247.13245 (45)	0.42	30	[(M+H)-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ O	201.12741 (100)	a
								[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₂	229.12195 (89)	
								[(M+H)-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ O ₂	219.13773 (6)	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₅ O	211.11145 (30)	
24	5.85	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	[M-H] ⁻ 281.13852 (100)	0.17	30	[(M+H)-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ O	201.12712 (100)	a
								[(M+H)-CO-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₃ H ₁₇	173.13235 (40)	
								[(M-H)-H ₂ O] ⁻	C ₁₅ H ₁₉ O ₄	263.12799 (6)	
								[(M+H)-CO ₂] ⁺	C ₁₄ H ₂₁ O ₄	237.14859 (46)	
25	5.96	-	Isomero de nepetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺ 317.06528 (100)	0.95	40	[(M+H)-CO ₂ -H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ O ₂	219.17392 (39)	a
								[(M+H)-CH ₃] ^{**}	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.04163 (39)	
								[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₂₁ O ₂	233.15352 (54)	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₉ O	215.14299 (16)	
26	6.37	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	[M+H] ⁺ 251.16408 (10)	0.09	30	[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₂₁ O	205.15866 (56)	a
								[(M+H)-3H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇	197.13240 (6)	
								[(M+H)-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₉	187.14810 (71)	
								[(M+H)-H ₂ O-CO-H ₂ O-C ₂ H ₄] ⁺	C ₁₂ H ₁₅	159.11862 (100)	
								[(M+H)-CH ₃] ^{**}	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.04178 (100)	
27	6.40	6.40 ± 0.01	Nepetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺ 317.06528 (31)	0.30	40	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₂	229.12202 (46)	a, c
								[(M+H)-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ O ₂	219.13777 (7)	
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₅ O	211.11153 (19)	
28	6.46	-	Isómero de ambrosina	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	[M+H] ⁺ 247.13252 (100)	0.35	30	[(M+H)-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ O	201.12720 (75)	a
								[(M+H)-CO-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₃ H ₁₇	173.13235 (9)	
								[(M-H)-H ₂ O] ⁻	C ₁₅ H ₂₁ O ₄	265.14355 (6)	
29	6.51	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₂₄ O ₅	[M-H] ⁻ 283.15402 (100)	0.02	30	[(M+H)-CO ₂] ⁺	C ₁₄ H ₂₃ O ₅	239.16415 (46)	a
								[(M+H)-CO ₂ -H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₂₁ O ₂	221.15349(39)	
								[(M+H)-CO ₂ -H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₂₁ O ₂	221.15349(39)	

Tabla 16. Continuación

30	6.52	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	[M+H] ⁺ 253.18045 (63)	0.63	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	235.16936 (100)	a
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₂₁ O	217.15863 (73)	
								[(M+H)-3H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₉	199.14815 (38)	
								[(M+H)-2H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₂₁	189.16393 (39)	
31	6.85	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	[M+H] ⁺ 251.16396 (25)	0.21	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₂₁ O ₂	233.1537 (82)	a
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₉ O	215.14287 (47)	
								[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₂₁ O	205.15854 (52)	
								[(M+H)-3H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₇	197.13237 (16)	
								[(M+H)-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺	C ₁₄ H ₁₉	187.14799 (100)	
								[(M+H)-H ₂ O-CO-H ₂ O-C ₂ H ₄] ⁺	C ₁₂ H ₁₅	159.11674 (80)	
32	7.06	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₂₂ O	[M+H] ⁺ 219.17421 (100)	0.19	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₂₁	201.16370 (18)	a
								[(M+H)-H ₂ O-C ₂ H ₄] ⁺	C ₁₃ H ₁₇	173.13243 (3)	
33	7.18	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	[M+H] ⁺ 253.17972 (32)	0.02	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	235.16924 (100)	a
								[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₂₁ O	217.15871 (19)	
								[(M+H)-3H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₉	199.14798 (12)	
								[(M+H)-2H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₂₁	189.16383 (19)	
34	8.85	-	Lactona sesquiterpénica	C ₁₅ H ₂₄ O	[M+H] ⁺ 221.18994 (100)	0.05	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₂₃	203.17946 (87)	a
								[(M+H)-H ₂ O-C ₂ H ₄] ⁺	C ₁₃ H ₁₉	175.14812 (20)	
								[(M+H)-H ₂ O-2C ₂ H ₄] ⁺	C ₁₁ H ₁₅	147.11685 (25)	

^a Identificación basada en el estudio de patrones de fragmentación y la comparación de espectros con las de las bases de datos *HMDB* 4.0 (109) y *Massbank* (110).

^b Identificación basada en los datos de la literatura científica sobre especies del género *Ambrosia* spp. (36).

^c Identificación confirmatoria basada en la comparación de los espectros de masas y los tiempos de retención (t_R) de las sustancias-patrón de ácidos 3-cafeoilquínico (99%) 4-cafeoilquínico (98%), *o*-hidroxibenzoico (99%) y nepetina (98%) adquiridas de *Sigma-Aldrich*, *ChemFaces* y *Phytolab*.

Figura 21.

Espectros de masas de los compuestos con m/z 246 obtenidos por GC/MS. Columna DB-5MS (60 m), split 1:30. **A.** Compuesto detectado en el extracto hidroetanólico de obtenido de plantas de *A. cumanensis*. **B.** Ambrosina reportada en la base de datos NIST (2017).

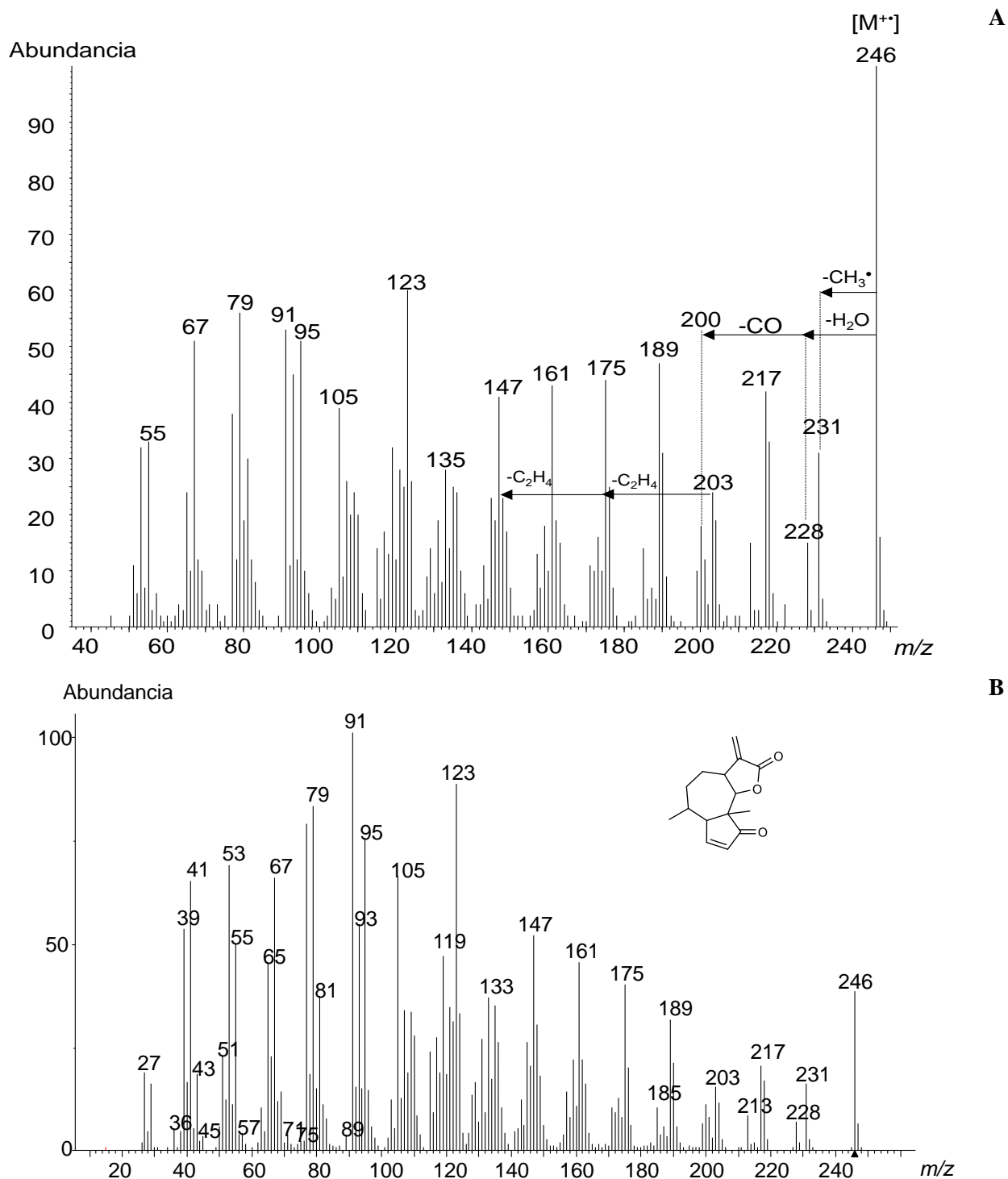


Figura 22.

Espectro de masas del isómero de ambrosina (pico N° 23, Figura 20) en el extracto hidroetanólico de A. cumanensis. Modo de adquisición-SIM, HCD 30 eV.

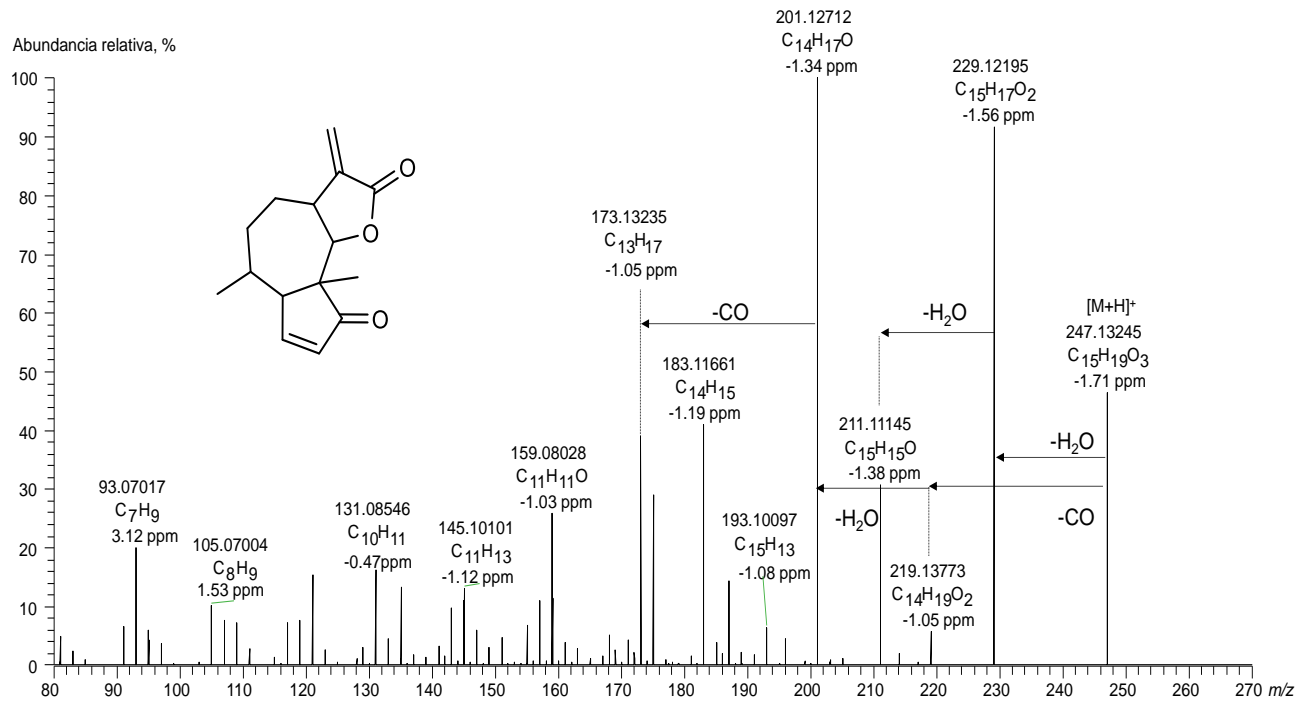


Tabla 17.

Cuantificación de algunos compuestos presentes en los extractos de A. cumanensis, antes y después de la destilación, cosechadas, hasta tres veces, en cada estado fenológico.

N°	Pico	Compuesto	Familia de compuestos	Cantidad de sustancia, mg/g extracto ± s					
				Estados fenológicos					
				Vegetativo *		Floración **		Post-floración ***	
				AD (n=6)	DD (n=6)	AD (n=9)	DD (n=9)	AD (n=9)	DD (n=9)
1		Isómero del ácido cafeoilquínico ¹	Ácido hidroxicinámico	LOQ	1.0±0.6	0.070±0.004	0.3±0.1	0.07±0.01	1.0±0.1
2		Isómero del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ²	Ácido hidroxibenzoico	0.8±0.1	3±1	1.4±0.2	2±1	1.5±0.4	3±1
3		Lactona sesquiterpénica ³	Lactona sesquiterpénica	LOD	LOD	LOD	0.015±0.001	LOD	LOD
4		Ácido-3-cafeoilquínico	Ácido hidroxicinámico	0.09±0.01	1.0±0.7	0.6±0.4	0.5±0.1	0.07±0.05	1.4±0.3
5		Ácido-4-cafeoilquínico ¹	Ácido hidroxicinámico	0.090±0.004	2±1	0.10±0.07	0.7±0.2	0.120±0.006	2.5±0.4
6		Isómero del ácido feruloilquínico ¹	Ácido hidroxicinámico	0.30±0.05	1.0±0.2	0.10±0.07	0.8±0.1	0.09±0.02	1.0±0.2
7		Isómero del ácido dicafeoilquínico ⁴	Ácido hidroxicinámico	LOD	0.40±0.08	LOD	0.10±0.06	LOD	0.6±0.5
8		Isómero de chamisonina ³	Lactona sesquiterpénica	0.20±0.06	0.113±0.001	0.20±0.08	0.20±0.02	0.20±0.05	0.146±0.009
9		Isómero de chamisonina ³	Lactona sesquiterpénica	LOQ	LOQ	0.134±0.001	0.20±0.09	0.140±0.006	0.120±0.004
10		Isómero del ácido feruloilquínico ¹	Ácido hidroxicinámico	3±3	5.0±0.9	2±1	0.8±0.1	1.0±0.8	5.0±0.7
11		Lactona sesquiterpénica ³	Lactona sesquiterpénica	LOQ	LOQ	LOQ	0.027±0.001	0.094±0.002	LOQ
12		Lactona sesquiterpénica ³	Lactona sesquiterpénica	LOD	LOQ	LOD	0.019±0.001	LOD	LOD
13		Ácido <i>o</i> -hidroxibenzoico ²	Ácido hidroxibenzoico	0.075±0.002	0.07±0.01	0.10±0.01	0.10±0.04	0.07±0.01	0.10±0.03
14		Isómero del ácido dicafeoilquínico ⁴	Ácido hidroxicinámico	LOQ	0.8±0.1	1.10±0.07	1.0±0.5	0.6±0.6	1.0±0.2
15		Isómero de chamisonina ³	Lactona sesquiterpénica	LOQ	LOQ	LOQ	0.14±0.01	0.16±0.03	0.140±0.002
16		Lactona sesquiterpénica ³	Lactona sesquiterpénica	0.130±0.002	0.3±0.1	0.20±0.05	0.3±0.1	0.30±0.07	0.40±0.06
17		Lactona sesquiterpénica ³	Lactona sesquiterpénica	0.2±0.1	0.20±0.02	0.20±0.07	0.10±0.05	0.30±0.06	0.120±0.008
19		Isómero del ácido dicafeoilquínico ⁴	Ácido hidroxicinámico	0.09±0.01	0.5±0.2	0.37±0.02	1.0±0.4	0.3±0.1	0.90±0.08
21		Isómero de ambrosina ³	Lactona sesquiterpénica	0.9±0.1	0.90±0.04	1.0±0.4	1.0±0.3	2.0±0.5	0.6±0.4
22		Isómero de chamisonina ³	Lactona sesquiterpénica	0.790±0.004	0.60±0.05	0.8±0.1	0.50±0.04	1.0±0.2	0.60±0.09
23		Isómero de ambrosina ³	Lactona sesquiterpénica	2±1	2.0±0.5	5±2	1±1	5.0±0.7	2.0±0.1

Tabla 17. Continuación

25	Isómero de nepetina ⁵	Flavona metilada	1 ± 1	0.2 ± 0.1	1.0 ± 0.4	0.30 ± 0.07	2.0 ± 0.6	0.40 ± 0.01
26	Lactona sesquiterpénica ³	Lactona sesquiterpénica	0.20 ± 0.01	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1
27	Nepetina	Flavona metilada	3 ± 2	0.3 ± 0.2	2.0 ± 0.8	1.0 ± 0.5	3.0 ± 0.6	1.0 ± 0.3
28	Isómero de ambrosina ³	Lactona sesquiterpénica	3 ± 2	1.3 ± 0.9	2.0 ± 0.7	0.5 ± 0.4	4 ± 2	1.0 ± 0.6
30	Lactona sesquiterpénica ³	Lactona sesquiterpénica	LOQ	LOD	LOD	0.020 ± 0.006	LOD	LOD
31	Lactona sesquiterpénica ³	Lactona sesquiterpénica	LOQ	LOQ	0.18 ± 0.01	0.3 ± 0.2	0.30 ± 0.05	0.210 ± 0.004
32	Lactona sesquiterpénica ³	Lactona sesquiterpénica	0.120 ± 0.009	0.23 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.3 ± 0.1	0.140 ± 0.004	0.30 ± 0.02
33	Lactona sesquiterpénica ³	Lactona sesquiterpénica	LOD	LOQ	0.091 ± 0.007	0.140 ± 0.004	LOQ	0.110 ± 0.006
34	Lactona sesquiterpénica ³	Lactona sesquiterpénica	0.130 ± 0.007	LOQ	0.164 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.115 ± 0.001	LOQ
Familias de compuestos								
Lactonas sesquiterpénica			7.6 ± 0.1	6.00 ± 0.07	10.7 ± 0.1	5.70 ± 0.07	14.2 ± 0.1	6.20 ± 0.05
Ácidos hidroxicinámicos			4.0 ± 0.3	12.0 ± 0.2	4.3 ± 0.1	5.20 ± 0.08	2.2 ± 0.1	13.0 ± 0.1
Flavonas metiladas			3.5 ± 0.3	0.5 ± 0.1	3.0 ± 0.4	1.3 ± 0.2	5.0 ± 0.4	1.4 ± 0.1
Ácidos hidroxibenzoicos			0.90 ± 0.05	3.0 ± 0.5	1.5 ± 0.1	2.1 ± 0.5	1.5 ± 0.2	3.0 ± 0.5

* Valores promedio determinados para los extractos de *A. cumanensis* obtenidos de plantas cosechadas en estado vegetativo, dos veces. Fechas: 18-01-2022; 01-09-2022.

** Valores promedio determinados para los extractos de *A. cumanensis* obtenidos de plantas cosechadas en estado de floración, tres veces. Fechas: 16-05-2022; 17-08-2022; 01-09-2022.

*** Valores promedio determinados para los extractos de *A. cumanensis* obtenidos de plantas cosechadas en estado de post-floración, tres veces. Fechas: 19-11-2021; 26-08-2022; 01-09-2022.

AD: Antes de su destilación. DD: Después de su destilación.

LOQ: Límite de cuantificación. LOD: Límite de detección.

1 Cantidad expresada en equivalente del ácido-3-cafeoilquinico. 2 Cantidad expresada en equivalente del ácido *p*-hidroxibenzoico. 3 Cantidad expresada en equivalente de salvigenina. 4 Cantidad expresada en equivalente del ácido-1,3-dicafeoilquinico. 5 Cantidad expresada en equivalente de nepetina.

Las lactonas sesquiterpénicas se encuentran abundantemente en plantas de la familia Asteraceae, entre ellos, germacranólidos, guaianólidos y elemanólidos (187). Las lactonas sesquiterpénicas poseen diversas actividades biológicas, entre las estudiadas figuran antiinflamatoria (187), citotóxica (188), anticancerígena (189); estas sustancias tienen uso potencial como herbicidas naturales (190).

En la **Tabla 17** se reportan las cantidades de los compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos, obtenidos a partir de material vegetal de *A. cumanensis*, antes y después de su destilación, de plantas recolectados en las etapas vegetativas. El isómero de ambrosina, pico N° 23 [**Figura 20** y **Figura A26**, t_R 5.81 min, 2.83 mg/g extracto), el isómero del ácido feruloilquínico, pico N° 10 [**Figura 20** y **Figura A26**, t_R 4.63 min, 2.8 mg/g extracto], el isomero de ambrosina, pico N° 28 [**Figura 20** y **Figura A26**, t_R 6.46 min, 1.7 mg/g extracto] y la nepetina [**Figura 20** y **Figura A26**, t_R 6.40 min, 1.9 mg/g extracto], fueron los compuestos mayoritarios detectados en los extractos hidroalcohólicos de *A. cumanensis* estudiados (**Tabla 17**).

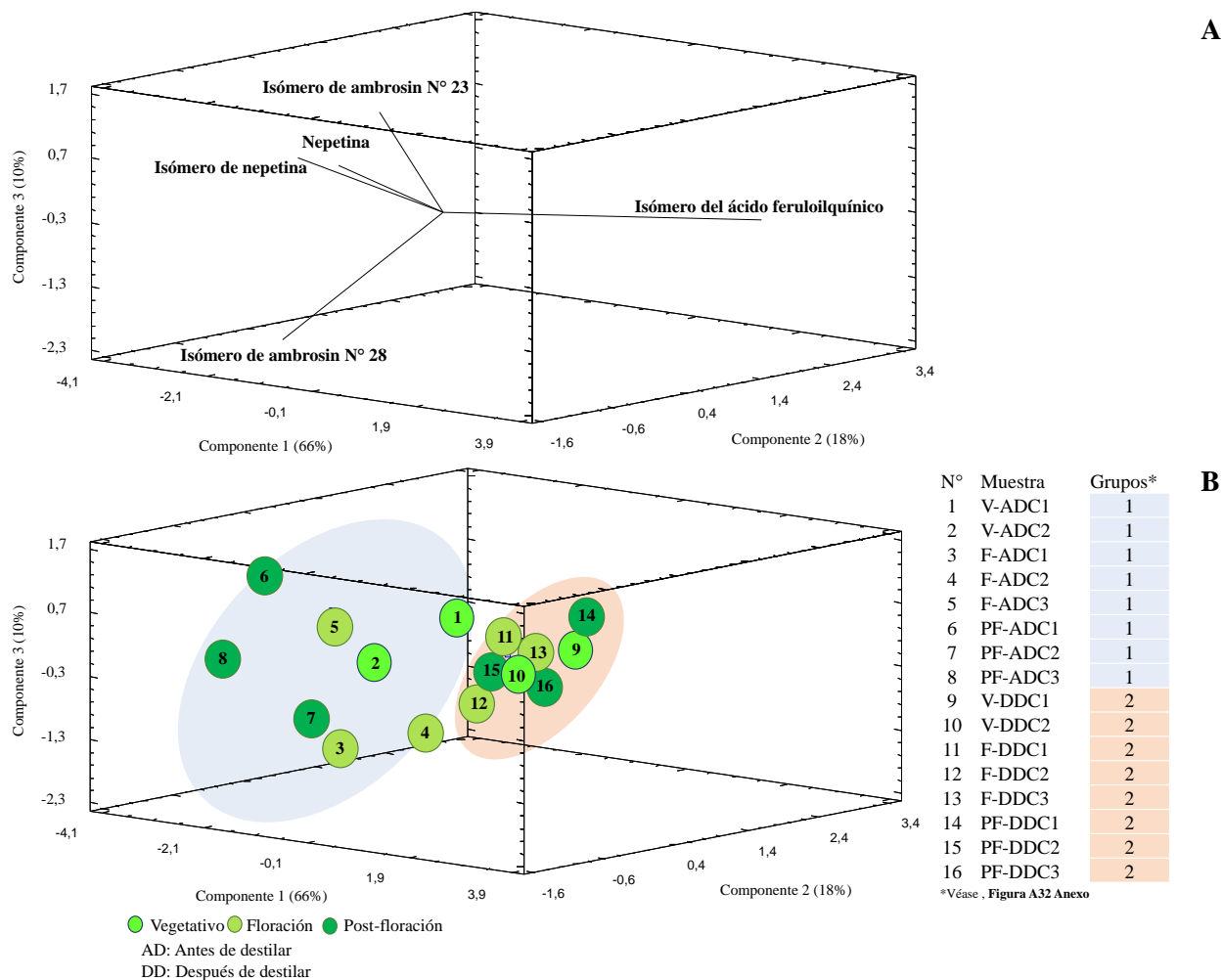
En el análisis de componentes principales (**Figura 23**), los extractos de material vegetal sin destilar se agruparon en la región azul conteniendo los más altos valores de las sustancias, nepetina y de los isómeros de ambrosina (**Figura 23**); en cambio, los extractos realizados con la biomasa residual se agruparon en la región rosada, ya que presentaron los más altos contenidos del isómero del ácido feruloilquínico (**Figura 23**) y en menor cantidad ambrosina y nepetina.

Hasta el momento, no encontramos ninguna investigación sobre la composición química de extractos hidroalcohólicos de *A. cumanensis*. Poljuha *et al.* (36), han estudiado la composición química de extractos metanólicos, obtenidos de plantas de *A. artemisiifolia*, y encontraron, principalmente, ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, entre ellos, ácidos cafeoilquínicos,

dicafeoilquínicos, feruloilquínicos y cumaroilquínicos. Los extractos de plantas del género *Ambrosia* spp., tienen efectos alelopático y antiinflamatorio (65). También, se encontró una patente para usar extractos acuosos de plantas del género *Ambrosia* spp., para aliviar úlceras intestinales (191).

Figura 23.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química de los extractos hidroalcohólicos de A. cumanensis colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. A. Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y B. Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).



Los extractos de *A. cumanensis*, por su alto contenido, de lactonas sesquiterpénicas, posiblemente, podrían ser usados como antiinflamatorios o como herbicidas naturales. Durante un año, se podrían obtener extractos hidroalcohólicos del material vegetal fresco sin destilar, *ca.* 2000 kg, y de la biomasa residual, *ca.* 400 kg, por hectarea.

5.5 Actividad antioxidante de los aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos estudiados

En la **Tabla 18** se muestran los valores de la actividad antioxidante de los AE y los extractos hidroalcohólicos de las plantas de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis* medidas, obtenidos por los ensayos de ORAC, ABTS⁺ y *on-line* HPLC-ABTS⁺. Los valores de actividad antioxidante de los AE de *H. colombiana* [200-904 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g AE), medidos en el ensayo de ABTS⁺, fueron más altos que los determinados para los AE de *S. viminea* [50-60 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g AE] y *A. cumanensis* [10-50 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g AE]. La actividad antioxidante de los AE de las tres plantas fue más alta que los valores obtenidos para las sustancias-patrón de terpenos como el sabineno y el (*E*)- β -cariofileno (**Tabla 18**).

Tabla 18.

Actividad antioxidante, evaluada por los ensayos ORAC, ABTS⁺⁺ y on-line HPLC-ABTS⁺⁺ de los aceites esenciales y extractos hidroetanólicos de *S. viminea*, *H. colombiana* y *A. cumanensis*, antes y después de su destilación.

Especies/ sustancias de referencia	Estados fenológicos/ N° cosechas	μmol Trolox [®] /g AE o extracto seco, ± s*							
		ORAC			ABTS ⁺⁺			on-line HPLC-ABTS ⁺⁺	
		Extractos de material vegetal*		Aceite esencial*	Extractos de material vegetal*		Extractos de material vegetal*		
		AD	DD		AD	DD	AD	DD	
<i>S. viminea</i>	Vegetativo	4	6000 ± 1471	7000 ± 1013	60 ± 1	1700 ± 140	2400 ± 271		
	Floración	3	6000 ± 1163	5600 ± 239	50 ± 10	1900 ± 77	2666 ± 1	730 ± 41	1190 ± 13
	Post-floración	4	5000 ± 1736	8500 ± 653	60 ± 8	1500 ± 393	2500 ± 207		
<i>H. colombiana</i>	Vegetativo	3	5000 ± 1142	5000 ± 1992	200 ± 106	1900 ± 144	2200 ± 440		
	Floración	3	4600 ± 514	4000 ± 1247	390 ± 114	1800 ± 191	1900 ± 97	660 ± 24	750 ± 42
	Post-floración	2	7000 ± 4000	5000 ± 1260	904 ± 2	2200 ± 83	2100 ± 255		
<i>A. cumanensis</i>	Vegetativo	2	780 ± 46	980 ± 89	10 ± 7	250 ± 69	300 ± 14		
	Floración	3	900 ± 134	1400 ± 341	50 ± 40	340 ± 64	350 ± 34	30 ± 3	150 ± 3
	Post-floración	3	800 ± 202	700 ± 166	30 ± 20	340 ± 35	380 ± 36		
Quercetina			29000 ± 1595			11000 ± 170		9800 ± 225	
Ácido rosmarínico			32000 ± 327			3260 ± 116		6966	
Ácido cafeico			23400 ± 80			4500 ± 92		7050 ± 17	
Kaempferol-3-O-rutinósido			11000 ± 230			890 ± 46		***	
Rutina			8210 ± 11			1190 ± 37		1982	
Salvigenina			4690 ± 54			180 ± 3		***	
Sabineno			N.E.			25.0 ± 0.5		N.E	
(E)-β-Cariofileno			N.E.			**		N.E	
Óxido de cariofileno			N.E.			**		N.E	

*Promedio ± desviación estándar de ensayos independientes realizados para cada cosecha.

** No presentó actividad antioxidante a una concentración de 2.00 mg/L.

*** No presentó actividad antioxidante a una concentración de 20 mg/L.

AD: Antes de destilación. DD: Después de destilación.

N.E.: No evaluado.

En los ensayos de ORAC y ABTS⁺, los valores de actividad antioxidante más altos fueron para los extractos hidroalcohólicos de plantas de *S. viminea* e *H. colombiana*. Los valores medidos en el ensayo de ORAC fueron más altos que los obtenidos por ABTS⁺. En el ensayo ORAC la capacidad antioxidante de una sustancia se expresa a través del mecanismo de transferencia de hidrógeno, mientras que en el ensayo ABTS⁺, existe también la ruta de transferencia electrones (192). Las diferencias de la capacidad antioxidante de los extractos evaluados por ambos métodos, ORAC y ABTS⁺, pueden deberse a que la capacidad de los compuestos en los extractos para donar átomos de hidrógeno predomina sobre su habilidad de ceder electrones y neutralizar el catión-radical ABTS⁺.

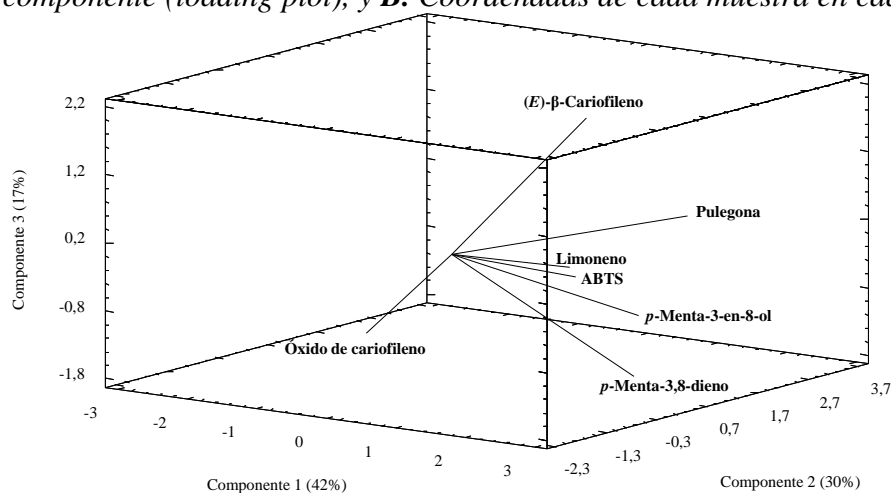
Las actividades antioxidantes de los AE de plantas de *S. viminea* medida por el ensayo de ABTS⁺ fueron bajas [50-60 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g AE}$]. Los valores de la actividad antioxidante de los AE destilados de plantas recolectadas en los tres estados fenológicos no presentaron diferencias significativas $p > 0.05$ (**Tabla A14, Anexo**), al igual que, lo reportado los compuestos mayoritarios, *p*-menta-3-en-8-ol y pulegona.

En la **Figura 25**, al relacionar los resultados de los compuestos principales de los AE de *S. viminea* y los valores de actividad antioxidante; se puede observar que en las tres cosechas colectadas en el estado vegetativo (V-C1, V-C2, V-C-3) se agruparon en una misma región (zona azul, **Figura A33 Anexo**), teniendo altos contenidos de pulegona y valores de actividad antioxidante. Además, se puede inferir que las condiciones climáticas afectaron las cantidades de los metabolitos secundarios de los AE de las plantas de *S. viminea* colectadas durante varios meses (condiciones climáticas diferentes), principalmente, durante la floración y post-floración;

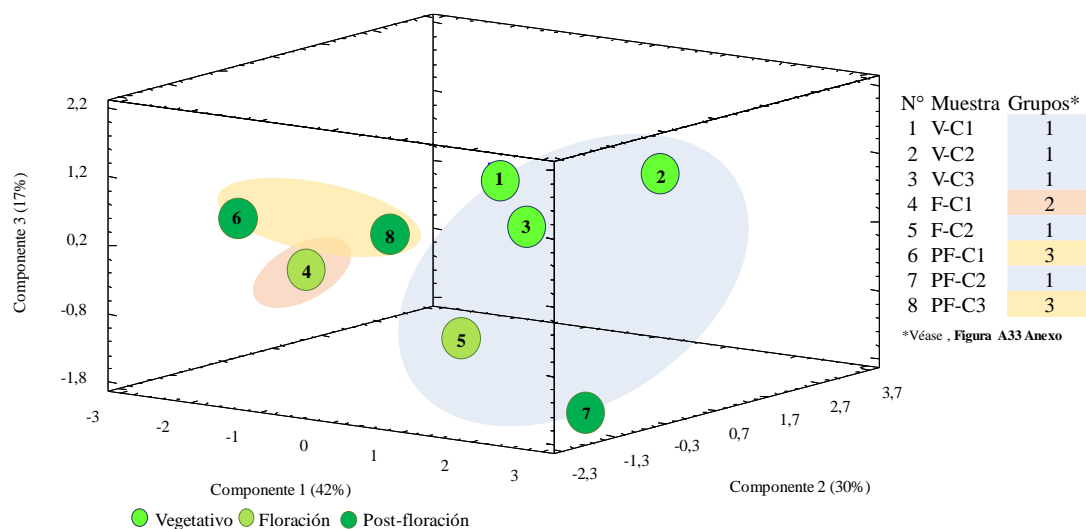
ya que no se agruparon en las mismas regiones en la gráfica (**Figura 25**). La relación entre la composición química de los AE y la actividad antioxidante de *S. viminea* colectados en vegetativo (V-C2), floración (F-C2) y post-floración (PF-C2), **durante el mismo día**, no presentaron grandes variaciones en sus cantidades, es decir, que el estado fenológico no afectó drásticamente cuando se relacionaron la composición química y la actividad antioxidante. Finalmente, es propicio concluir que es posible obtener AE destilados de *S. viminea* en el estado vegetativo con las menores variaciones en sus composiciones químicas y actividad antioxidante.

Figura 24.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los aceites esenciales de S. viminea colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. A. Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y B. Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).



B

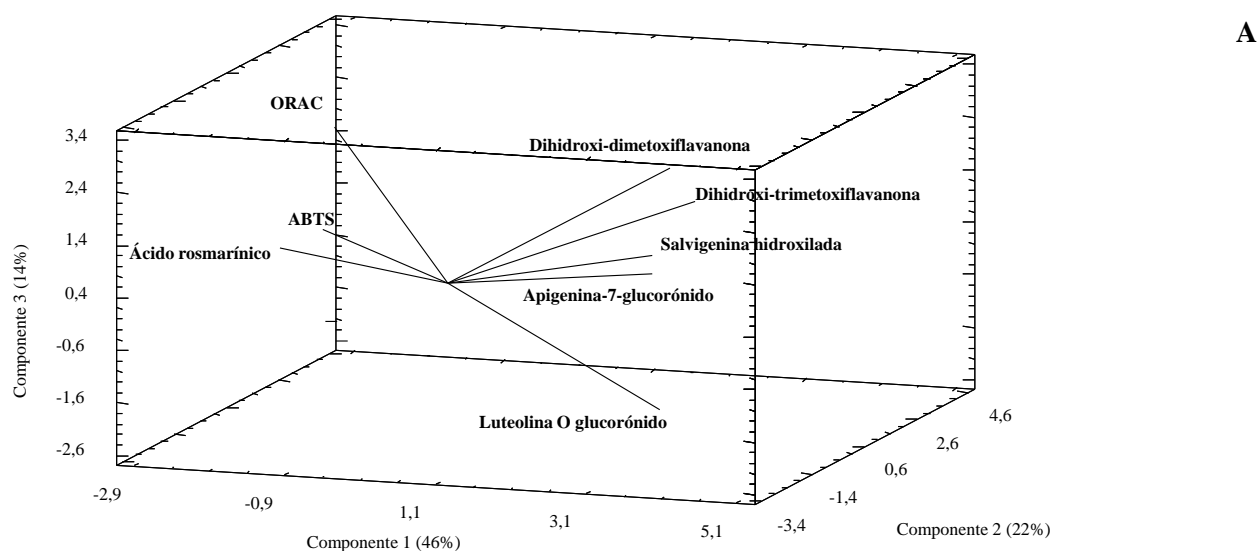


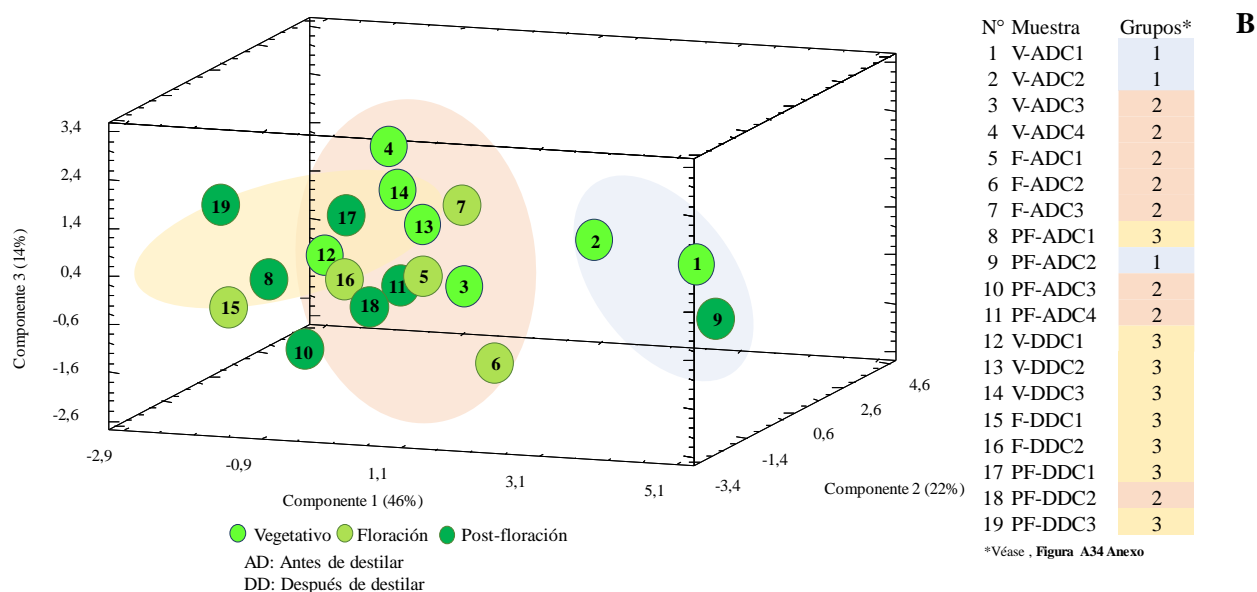
La actividad antioxidante, medida por los métodos ORAC y ABTS⁺⁺, de los extractos hidroalcohólicos de *S. viminea*, obtenidos antes o después de su destilación de plantas recolectadas los tres estados fenológicos, fueron muy similares; con excepción de la actividad antioxidante, medida por ORAC, de los extractos obtenidos de la biomasa residual (**Tabla A14, Anexo**). Los extractos obtenidos de plantas de *S. viminea*, colectadas cuatro y tres veces, en los estados fenológicos vegetativo y floración, respectivamente, presentaron las variaciones más pequeñas, según sus desviaciones estándar. Los valores más altos de $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto obtenidos por el ensayo de ABTS⁺⁺, se determinaron para los extractos obtenidos de biomasa residual de *S. viminea*; ya que estos extractos contenían las cantidades más altas de ácido rosmarínico (**Tabla 9**), un reconocido compuesto antioxidante. La biomasa residual de *S. viminea* tiene compuestos fenólicos de interés que le da un valor agregado, para ser aprovechada para aislamiento de compuestos bioactivos que pueden ser utilizados en diferentes productos finales.

Los compuestos mayoritarios en los extractos hidroalcohólicos de *S. viminea* fueron el ácido rosmarínico, la luteolina-7-*O*-glucurónido y la apigenina-7-*O*-glucurónido. Al correlacionar los principales compuestos de los extractos de *S. viminea* y sus valores de actividad antioxidante por los ensayos de ORAC y ABTS⁺ (Figura 25), se puede evidenciar que los extractos obtenidos en el estado fenológico de floración con material vegetal sin destilar (zona de color rosada) y destilados (zona de color amarillo) son los que mejor se agrupan; al igual que, los extractos obtenidos en vegetativo a partir de la biomasa residual (zona de color amarillo). Por lo tanto, estos son los extractos que presentaron las menores afectaciones por las diferentes condiciones climáticas obtenidas durante 2022-2023.

Figura 25.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de S. viminea colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. A. Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y B. Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).





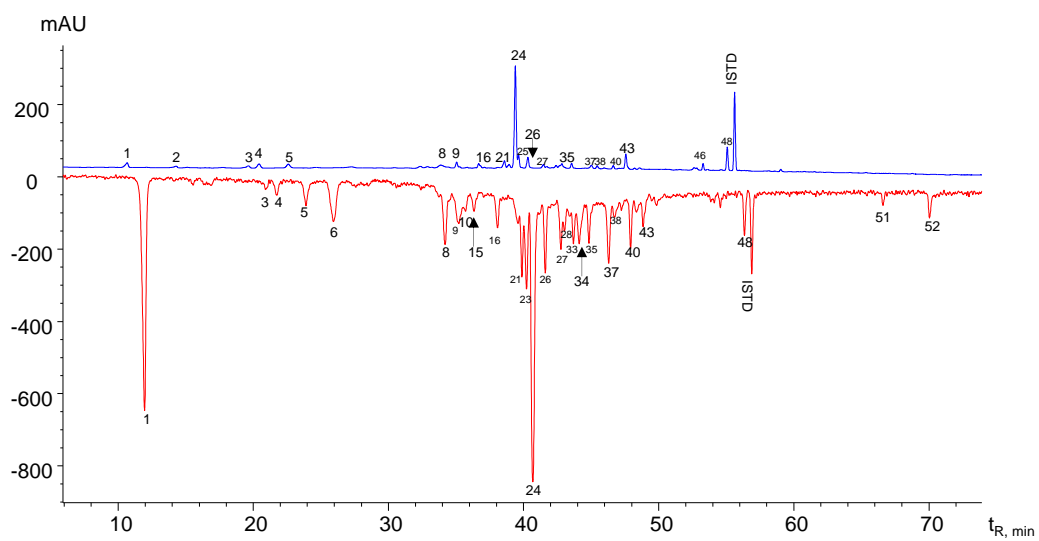
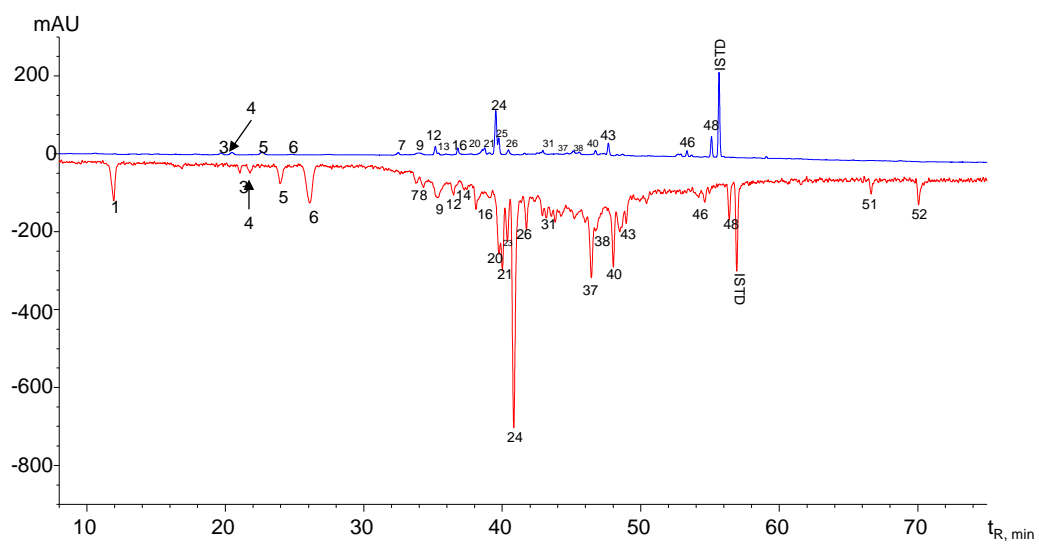
Manrique *et al.* (193), estudiaron la actividad antioxidante del AE y extractos metanólicos de *S. viminea*, sin destilar, recolectadas en CENIVAM, mediante los ensayos de ABTS⁺ (52 ± 1 µmol Trolox[®]/g de AE y 1603 ± 5 µmol Trolox[®]/g de extracto) y ORAC (6400 ± 241 µmol Trolox[®]/g de extracto) y obtuvieron los resultados similares a los de este estudio.

Mediante el ensayo de *on-line* HPLC-ABTS⁺, se observó que, para los extractos de material vegetal sin destilar, obtenidos de plantas en el estado vegetativo, la actividad antioxidante principalmente se debió al ácido rosmarínico (**Figura 26**, pico N° 24) aportando el 26%, y a dos derivados de flavonas (**Figura 26**, pico N° 21 y 37) que aportan 7 y 6.6%, respectivamente. Para el extracto de material vegetal destilado, el mayor aporte a la actividad

antioxidante lo proporcionaron un derivado de flavanol (22%, pico N° 1 **Figura 26**) y el ácido rosmarínico (20%, pico N° 24, **Figura 26**). En ambos casos, según la prueba realizada *on-line* el aporte a la actividad antioxidante de la luteolina-7-*O*-glucurónido fue bajo (2%) mientras que, la apigenina-7-*O*-glucurónido no mostró actividad antioxidante.

Figura 26.

*Perfiles cromatográficos obtenidos por on-line HPLC-ABTS^{•+} de los extractos hidroetanólicos de plantas de S. viminea cosechadas en el estado vegetativo. A. A partir del material vegetal sin destilar; B. A partir del material vegetal destilado, antes (DAD, $\lambda=290$ nm, línea azul) y después (MWD, $\lambda=734$ nm, línea roja) de la reacción con el catión-radical ABTS^{•+}. La identificación de los picos se presenta en la **Tabla A3 (Anexo)**.*



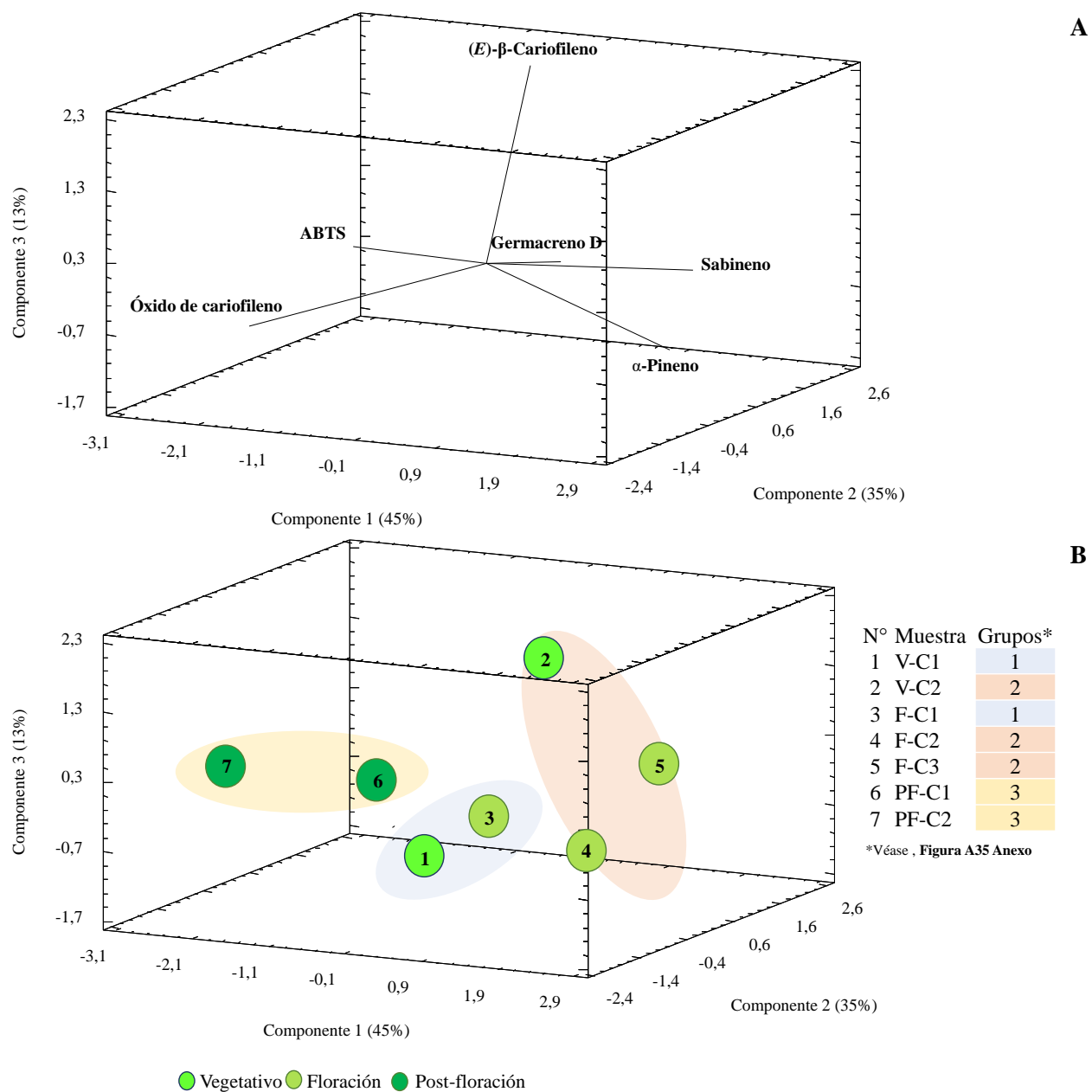
Los valores de actividad antioxidante ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ muestra) de los AE y extractos hidroalcohólicos de plantas sin destilar de *H. colombiana*, determinados por el ensayo de

ABTS⁺, presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) para el material vegetal cosechado en los tres estados fenológicos (**Tabla A14**). En el análisis de los componentes principales, se observaron los valores más altos de actividad antioxidante, medidos por el ensayo de ABTS⁺, para los AE ($904 \pm 2 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g muestra}$) de plantas destiladas en post-floración (**Figura 27**). Los AE de *H. colombiana* colectados en post-floración se agruparon en una misma región (zona amarilla), teniendo las menores variaciones entre ellos. Además, es necesario mencionar que los AE de plantas de *H. colombiana* destiladas en post-floración presentaron las menores cantidades de sabineno en comparación con los AE de plantas colectadas en vegetativo y floración. Al analizar la actividad antioxidante por el ensayo de ABTS⁺ se reportaron valores bajos, para los compuestos individuales [sabineno, (*E*)- β -cariofileno y óxido de cariofileno] (**Tabla 18**). Por lo tanto, es posible considerar que la actividad antioxidante de los AE se debe a un efecto aditivo entre germacreno D, sabineno, (*E*)- β -cariofileno y óxido de cariofileno, compuestos mayoritarios que hacen parte de su composición.

Figura 27.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los aceites esenciales de H. colombiana colectados en los estados

fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).



Los valores de actividad antioxidante, medidos por el ensayo de ORAC, de los extractos obtenidos del material vegetal, antes y después de su destilación, de las plantas cosechadas de *H. colombiana*, en los tres estados fenológicos, no mostraron diferencias significativas (**Tabla A14, Anexo**). En la **Figura 28** se muestra el análisis de los componentes principales de los resultados entre la combinación de la composición química de los extractos de *H. colombiana* y la actividad antioxidante medida por los ensayos de ABTS⁺⁺ y ORAC. En los extractos hidroalcohólicos de material vegetal sin destilar colectados en post-floración durante la primera cosecha (**Figura 28**, PFAD-C1) y aquellos obtenidos de la biomasa residual de plantas en el estado vegetativo en la segunda cosecha (VDD-C2), presentaron valores altos de actividad antioxidante y del ácido rosmarínico.

En los extractos de material vegetal antes y después de la destilación de *H. colombiana* obtenidos en floración durante las cosechas realizadas en 2021-2023 se agruparon en una misma región, rosada y azul respectivamente, generando las menores variaciones e influencia de las condiciones climáticas de estos años. Los extractos sin destilar de plantas de *H. colombiana* colectadas en post-floración son los que presentaron la mayor dispersión (N° 7 y 8).

Al correlacionar la composición química y la actividad antioxidante, de los extractos realizados con material vegetal sin destilar colectados el mismo día en vegetativo (VAD-C3), floración (FAD-C3) y post-floración (PFAD-C2), fueron agrupados en una misma región (zona de color rosada), es decir, que en los tres estados fenológicos las cantidades de sus principales compuestos y su actividad antioxidante son similares por lo que, es posible deducir que en los extractos de plantas de *H. colombiana* afectan más las condiciones climáticas que el estado fenológico de la planta en su perfil fitoquímico. Por lo tanto, es recomendable colectar las plantas

de *H. colombiana* en el estado floración ya que se obtuvieron extractos cuyas composiciones químicas y actividades antioxidantes no presentaron grandes variaciones entre las cosechas realizadas.

Figura 28.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de H. colombiana colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. A. Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y B. Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).

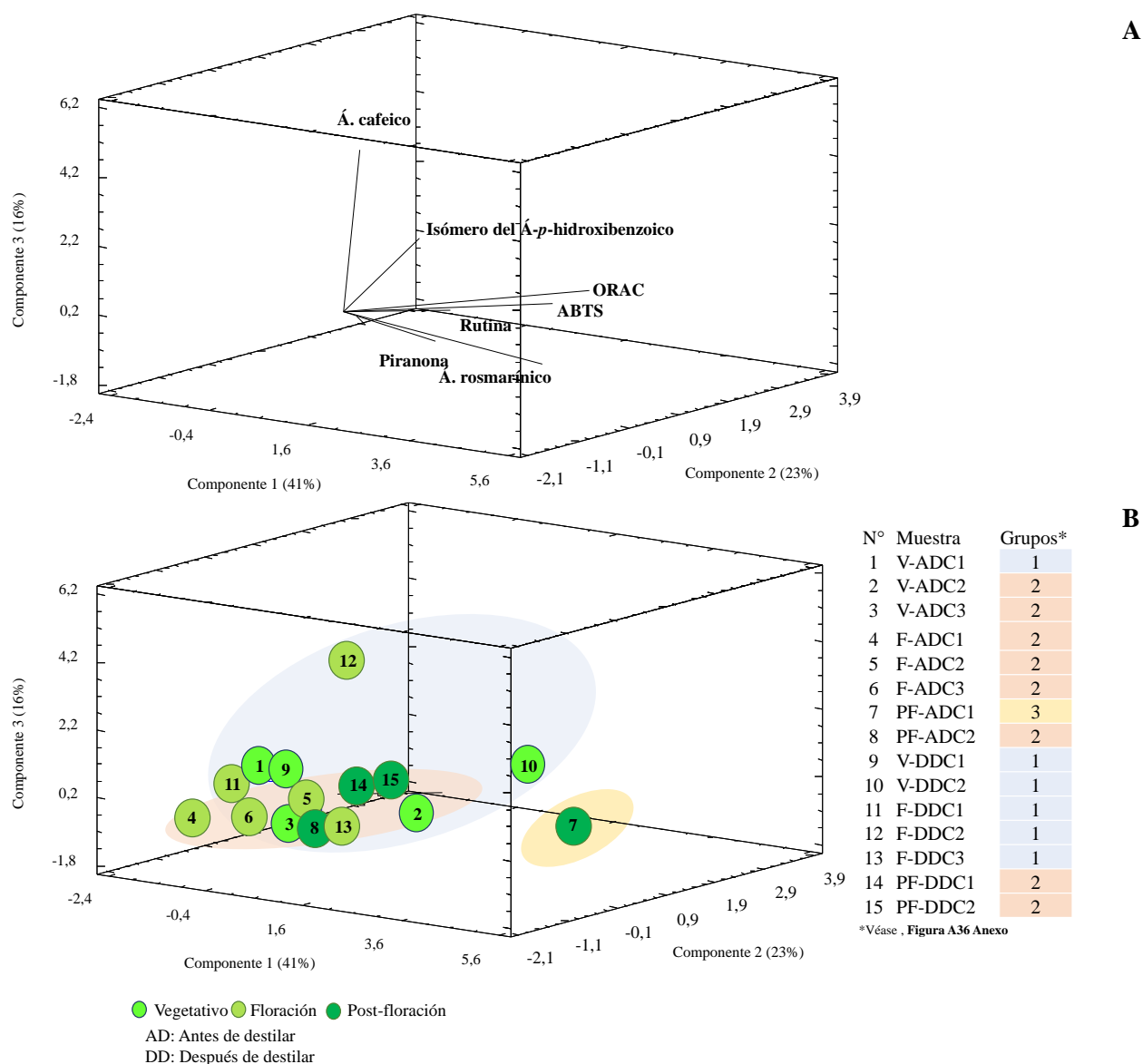
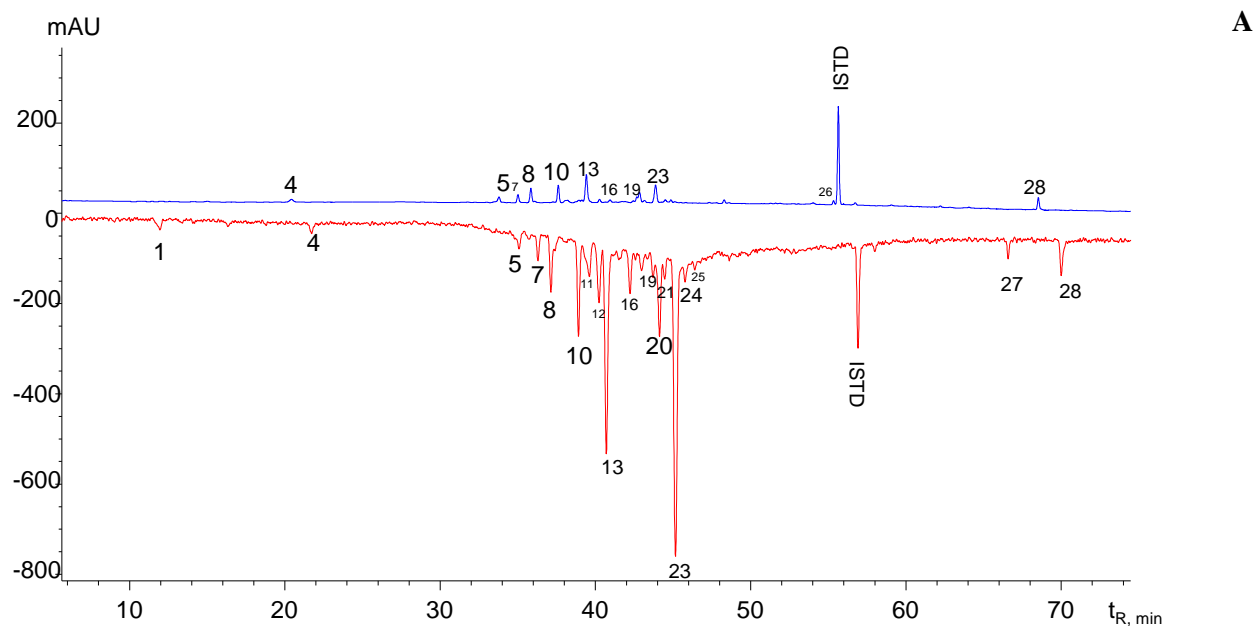
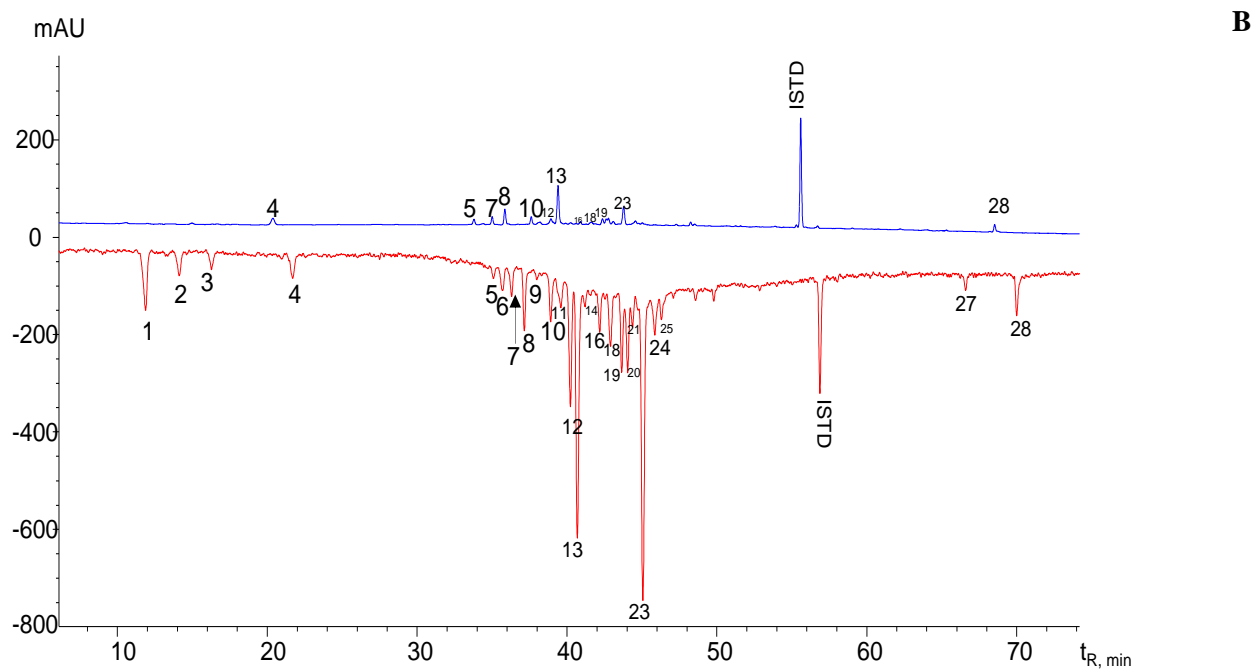


Figura 29.

*Perfiles cromatográficos obtenidos por on-line HPLC-ABTS^{•+} de los extractos hidroetanólicos de plantas de H. colombiana, recolectadas en el estado de floración. A. A partir del material vegetal sin destilar; B. A partir del material vegetal destilado, antes (DAD, $\lambda=290$ nm, línea azul) y después (MWD, $\lambda=734$ nm, línea roja) de la reacción con el catión-radical ABTS^{•+}. La identificación de los picos se presenta en la **Tabla A4 (Anexo)**.*





El ensayo de *on-line* HPLC-ABTS⁺ mostró un derivado de flavona (23-30% pico N° 23, **Figura 29**) y el ácido rosmarínico (17-20% pico N° 13, **Figura 29**) fueron los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante de los extractos de *H. colombiana*. La rutina, siendo uno de los compuestos mayoritarios en los extractos, tuvo aporte solo de *ca.* 2% (**Figura 29**).

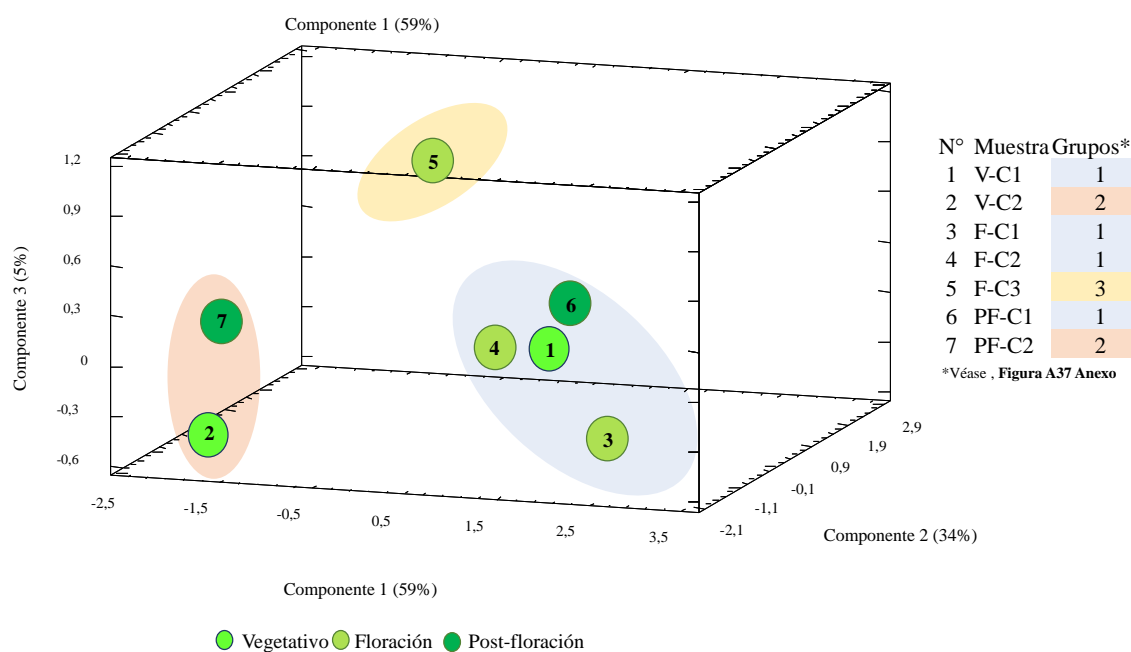
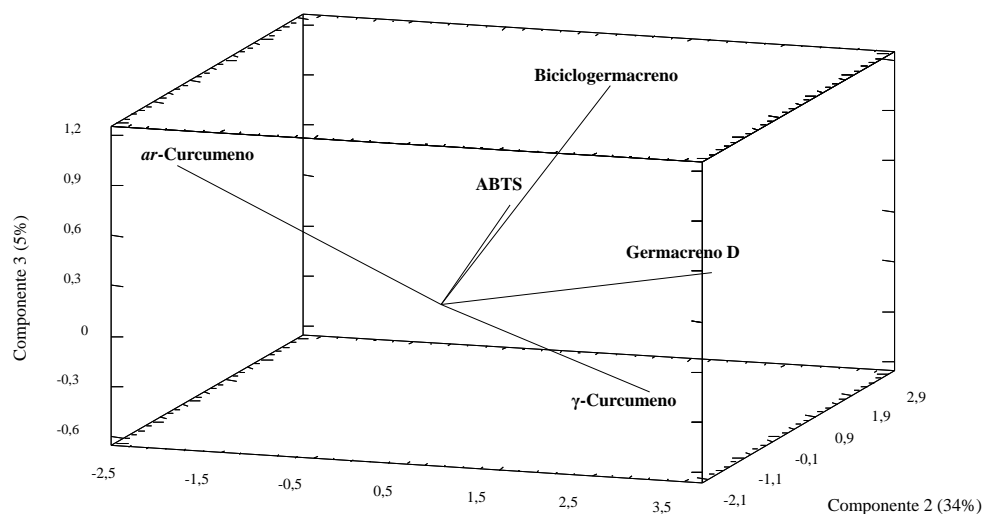
No encontramos reportes previos sobre la actividad antioxidante de extractos de *H. colombiana*, pero existen estudios sobre otras especies del género *Hyptis* spp. (46,194). Tafurt-García *et al.* (46), evaluaron la actividad antioxidante, por el ensayo de ABTS⁺, de extractos etanólicos de *H. dilatata* (903 ± 64 mmol Trolox/kg extracto) y de *H. conferta* (721 ± 27 mmol Trolox/kg extracto). Dos Santos *et al.* (194), determinaron la actividad antioxidante de extractos etanólicos de diversas plantas del género *Hyptis* spp., entre ellas, *H. campestris*, usando los ensayos de ABTS⁺ (290 mg Trolox[®]/g muestra equivalentes a 1158 μmol Trolox[®]/g muestra) y

ORAC (4516 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g muestra). Los valores de actividad antioxidante medidos en este trabajo fueron similares a los reportados por los autores mencionados (46,196).

Los valores de actividad antioxidante de los AE de *A. cumanensis*, medida por el ensayo de ABTS^{•+} [10-30 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g AE], no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$, **Tabla A14**), sin embargo, las desviaciones estándar son altas. Al llevar a cabo la correlación entre los principales compuestos y los valores de actividad antioxidante medidos por el ensayo de ABTS^{•+} en los AE de *A. cumanensis* (**Figura 30**), se observa una dispersión en las muestras recolectadas en un mismo estado fenológico, ya que sus cosechas no se agruparon en una misma región. Esto se asimila a la variabilidad del γ -curcumeno (100-310 mg sustancia/g de AE) y *ar*-curcumeno (70-100 mg sustancia/g AE), compuestos mayoritarios en estos AE (**Figura 19**).

Figura 30.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los aceites esenciales de A. cumanensis colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. A. Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y B. Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).



Los valores, obtenidos en ensayos de ABTS⁺ y ORAC, para los extractos hidroalcohólicos de plantas de *A. cumanensis*, antes y después de su destilación, en los tres estados fenológicos no presentaron diferencias significativas (**Tabla A14, Anexo**). En la **Figura 30**, en el análisis de los componentes principales, de la combinación entre la composición química de los extractos de *A. cumanensis* y la actividad antioxidante; se muestra que en la componente 1 (48%) los factores que más contribuyen son el ácido feruloilquínico y los valores

de actividad antioxidante medidos por el ensayo de ORAC. Los extractos con material vegetal después de su destilación de *A. cumanensis* son los que tienen los valores más altos actividad antioxidante por el ensayo de ORAC, así como las cantidades más altas del isómero ácido feruolquínico, por lo tanto, se agrupan en la región amarillo. En la **Figura 30**, los extractos a partir de la biomasa residual de las plantas destiladas en floración se agruparon en la misma región (zona de color amarillo), debido a que presentaron las menores variaciones en su composición química y actividad antioxidante.

En cuanto, a los extractos de material vegetal antes de su destilación de *A. cumanensis* colectados el mismo día en los tres estados fenológicos, vegetativo (VAD-C2), floración (FAD-C3) y post-floración (PFAD-C3) se agruparon en una misma región en la gráfica, marcada en color rosada. Esto sugiere que el estado fenológico en los extractos de *A. cumanensis* no afecta la composición química y la actividad antioxidante; pero las condiciones climáticas si pueden generar variaciones principalmente en los estados vegetativo y post-floración. Por lo tanto, podría ser propicio considerar la recolección de las plantas en floración.

Figura 31.

Análisis de componentes principales aplicados a los resultados de composición química y actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *A. cumanensis* colectados en los estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración. **A.** Importancia de cada variable en cada componente (loading plot), y **B.** Coordenadas de cada muestra en cada componente (score plot).

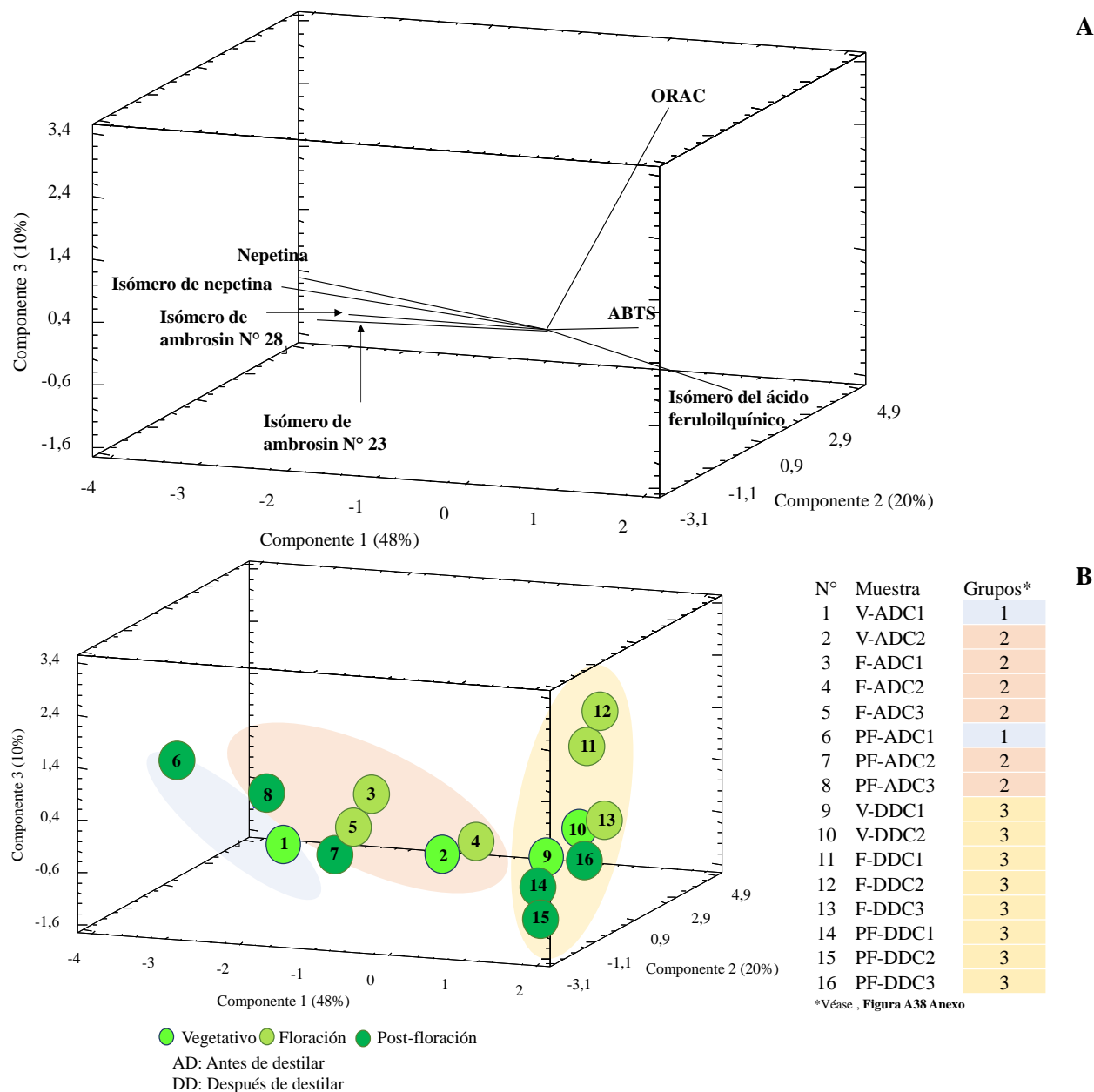
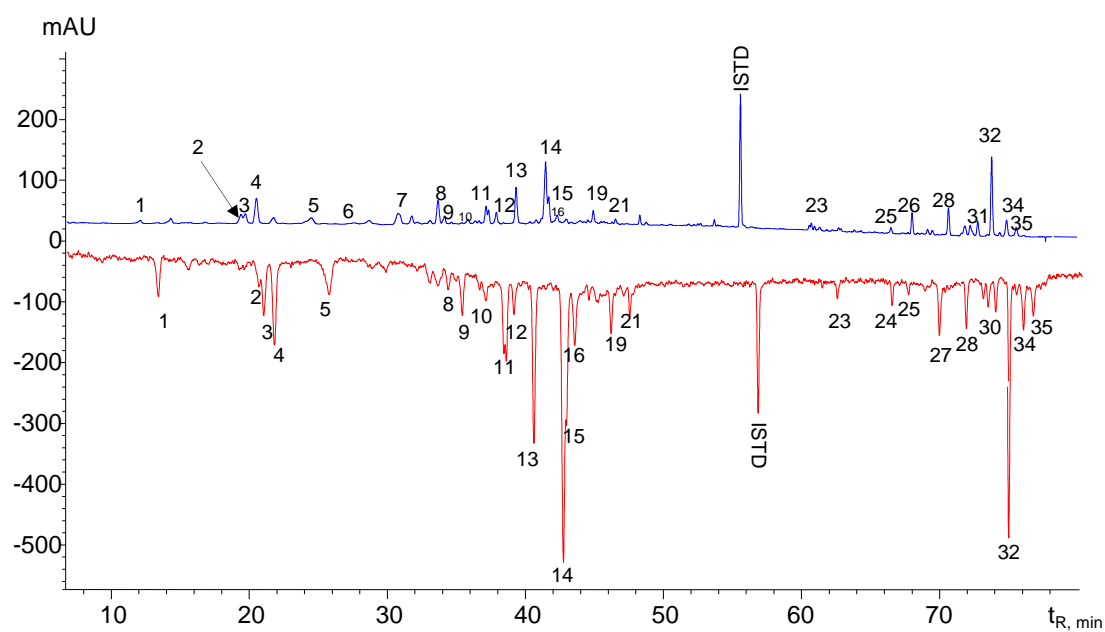
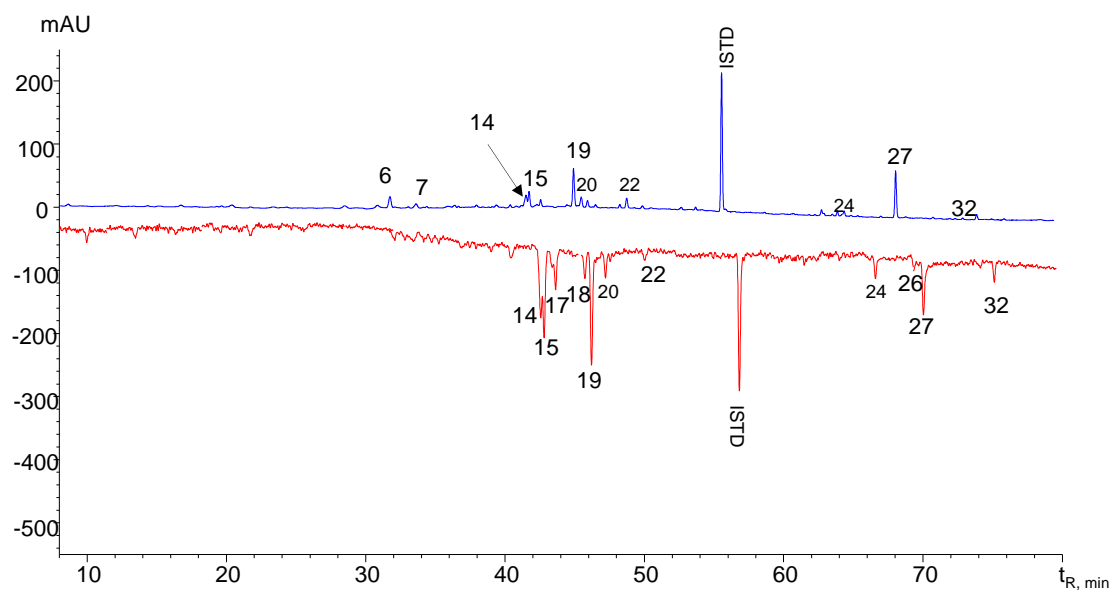


Figura 32.

Perfiles cromatográficos obtenidos por on-line HPLC-ABTS^{•+} de los extractos hidroetanólicos de plantas de *A. cumanensis*, recolectadas en el estado de floración. **A.** A partir del material vegetal sin destilar; **B.** A partir del material vegetal destilado, antes (DAD, $\lambda=290$ nm, línea azul) y después (MWD, $\lambda=734$ nm, línea roja) de la reacción con el catión-radical ABTS^{•+}. La identificación de los picos se presenta en la **Tabla A5 (Anexo)**.



El ensayo de *on-line* HPLC-ABTS⁺⁺ (**Tabla A5, Anexo**), mostró que los derivados del ácido hidroxicinámico y la nepetina aportaron en mayor grado a la actividad antioxidante de los extractos. La flavona metilada, nepetina, es uno de los compuestos principales en los extractos de *A. cumanensis*, su actividad antiinflamatoria se ha reportado en varios trabajos (195,196). Las flavonas metiladas se encuentran principalmente en las glándulas secretoras externas de las plantas (197).

Thitilertdecha *et al.* (198), formularon cremas y lociones tópicas a partir de extractos etanólicos de plantas de *Clerodendrum petasites*. Se midieron la absorción y penetración en la piel en modelos *in vitro* (piel abdominal porcina) y en seis voluntarios, entre cuatro de sus compuestos activos, figura la nepetina. Los resultados mostraron que la nepetina se absorbió, por la capa más externa de la epidermis, después de 6 h de la aplicación. Por sus propiedades biológicas la nepetina o el extracto que la contiene podría ser un potencial candidato para el desarrollo de formulaciones para el tratamiento de algunas enfermedades de la piel.

6. CONCLUSIONES

En los AE de *S. viminea* [rendimiento 0.8-0.9% (p/p)], se encontraron principalmente monoterpenos oxigenados. *p*-Menta-3-en-8-ol (340 mg sustancia/g de AE) y la pulegona (290 mg sustancia/g de AE) compuestos mayoritarios con olor a menta. La actividad antioxidante en promedio fue de 56 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g AE. Los extractos hidroalcohólicos de *S. viminea*, obtenidos del material vegetal antes o después de su destilación, tuvieron un rendimiento promedio de 10% p/p. El ácido rosmarínico (20-40 mg/g), la luteolina-7-*O*-glucurónido (10 mg/g) y la apigenina-7-*O*-glucurónido (6 mg/g) fueron los compuestos mayoritarios. Los valores de actividad antioxidante de los extractos, medidos por los ensayos de ABTS⁺⁺ [1500-2600 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto seco], ORAC ⁺⁺ [5000-8500 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto seco] y por *on-line* HPLC-ABTS⁺⁺ fueron altos gracias a la contribución del ácido rosmarínico. Los AE y extractos de *S. viminea* colectados en el estado vegetativo y floración, respectivamente; fueron los que presentaron las variaciones más bajas en sus composiciones químicas y actividad antioxidante. Teniendo en cuenta que las plantas de *S. viminea*, crecen lentamente y requiere periodos de sequía para iniciar con sus brotes florales se recomienda que se colecten en el estado vegetativo. La biomasa residual que queda después de la destilación de plantas de *S. viminea*, sirve para obtener extractos, fuente del ácido rosmarínico, importante antioxidante e ingrediente en alimentos y otros productos importantes. De *ca.* 30.000 plantas de *S. viminea* cultivadas en una hectárea y cosechadas dos veces al año; se podrían obtener *ca.* 290 kg de AE, un ingrediente aromático. De los extractos obtenidos con solvente, del material vegetal, antes [645 kg/(ha año)] o después de su destilación (biomasa residual) [561 kg/(ha año)] se podría aislar el ácido rosmarínico en cantidades de *ca.* de 14 kg/(ha año) y *ca.* 22.kg/(ha año), respectivamente.

En los AE destilados de plantas de *H. colombiana* [rendimiento 0.1% (p/p)], recolectados en los tres estados fenológicos, vegetativo, floración y post-floración, se encontraron 32 compuestos (> 0.1 %), siendo (*E*)- β -cariofileno, germacreno D, sabineno y óxido de cariofileno, los mayoritarios. En los extractos hidroalcohólicos, obtenidos del material vegetal, antes o después de su destilación, se identificaron 14 compuestos. La piranona (70 mg/g), el ácido rosmarínico (17 mg/g) y la rutina (8 mg/g) fueron los compuestos mayoritarios. Las cantidades de los principales metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de los extractos de plantas de *H. colombiana* cosechadas en floración durante 2021-2023, bajo diferentes condiciones climáticas, fueron las que presentaron las menores variaciones. Podría considerarse el estado fenológico de floración como el propicio para la cosecha del material vegetal. Los extractos obtenidos a partir del material vegetal, antes o después de la destilación no presentaron mayores diferencias en las cantidades de los compuestos encontrados ni en los valores de actividad antioxidante, por tanto, el proceso destilativo no generó cambios en los metabolitos secundarios de *H. colombiana*. De ca. 33.000 plantas cultivadas en una hectárea y cosechadas tres veces en el año en el estado de floración, se podrían destilar ca. 21 kg/(ha año) de AE y obtener del extracto hidroalcohólico, rico en el ácido rosmarínico (41 kg/(ha año)). Los extractos podrían ser buenos candidatos para su uso como conservantes en alimentos u otros productos finales.

Los rendimientos de los AE de *A. cumanensis* no son altos (0.02-0.03%, p/p) y sus componentes mayoritarios fueron el γ -curcumeno (100-310 mg sustancia/g de AE) y *ar*-curcumeno (70-100 mg sustancia/g de AE). En los extractos hidroalcohólicos se detectaron principalmente 22 lactonas sesquiterpénicas (isómeros de ambrosina). Los AE de *A. cumanensis*

colectados en los tres estados fenológicos presentaron altas variaciones en su composición química y actividad antioxidante, por lo tanto, se considera que las condiciones climáticas y el estado fenológico afectan drásticamente su perfil fitoquímico. Los extractos de *A. cumanensis* colectados en floración presentaron las menores variaciones en su composición química y actividad antioxidante. Por lo tanto, se recomienda coleccionar las plantas de *A. cumanensis* durante el estado de floración, porque esta planta está produciendo constantemente brotes florales. Los AE y extractos de *A. cumanensis*, posiblemente, se podrían usar como herbicida natural o como un ingrediente antiinflamatorio en alguna formulación fitoterapéutica.

Los AE y extractos hidroalcohólicos de plantas de *S. viminea* e *H. colombiana* tuvieron los rendimientos y valores de actividad antioxidante más altos. Los AE de *S. viminea* e *H. colombiana* se podrían usar como ingredientes aromáticos en productos cosméticos y de aseo. El ácido rosmarínico, está presente en los extractos de ambas plantas y se usa ampliamente como conservante de alimentos. La biomasa residual de estas plantas contiene compuestos fenólicos de interés, que le dan un importante valor agregado. Las plantas promisorias de *H. colombiana* y *S. viminea*, por sus compuestos bioactivos, podrían ser cultivadas en Santander, Colombia, para formar parte de la cadena productiva y de valor de ingredientes naturales, importantes en los productos finales de varios sectores industriales.

7. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados parciales del trabajo de investigación se divulgaron en un artículo científico publicado en la revista “*molecules*”, y en las modalidades de póster y ponencia oral en eventos nacionales e internacionales

2023

Artículo publicado en *molecules* “Antioxidant properties and secondary metabolites profile of *Hyptis colombiana* at various phenological stages” (199).

2022

III *Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry*, IBERO-2022. Río de Janeiro, Brasil.

Fecha: 10-12-2022 a 15-12-2022. Modalidad presencial.

Póster: “GC/MS and LC/MS study of the chemical composition of essentials oils and extracts isolated from *Hyptis colombiana* (Lamiaceae)”.

Autores: Sheila B. Beltrán, Angie K. Romero, Lady J. Sierra, Jairo R. Martínez, Elena E. Stashenko.

12th *International Mass Spectrometry Conference on Petrochemistry, Environmental and Food Chemistry*, PETROMASS-2022. Heraclión, Grecia. Fecha: 16-10-2022 a 23-10-2022. Modalidad virtual.

Ponencia oral: “Chemical composition of essential oil and extract isolated from *Hyptis colombiana* (Lamiaceae)”.

Autores: Sheila B. Beltrán, Angie K. Romero, Lady J. Sierra, Jairo R. Martínez, Elena E. Stashenko.

2021

International Symposium on Essential Oils, ISEO. Turquía. Fecha: 12-11-2021 a 14-11-2021.

Modalidad virtual

Póster: “Chemical composition of the essential oil of *Hyptis colombiana* (Lamiaceae)”.

Autores: Sheila B. Beltrán, Angie K. Romero, Lady J. Sierra, Jairo R. Martínez, Elena E. Stashenko.

Simposio Panamericano de Aceites Esenciales, SPAE. Cartagena, Colombia. Fecha: 12-11-2021 a 14-11-2021. Modalidad presencial.

Póster: “Extracción y composición química del aceite esencial y del extracto de *Satureja viminea* (Lamiaceae)”.

Autores: Sheila B. Beltrán, Diana L. Manrique, Lady J. Sierra, Jairo R. Martínez, Elena E. Stashenko.

Póster: “Composición química del aceite esencial de *Hyptis colombiana* (Lamiaceae) por GC/MS”.

Autores: Sheila B. Beltrán, Angie K. Romero, Lady J. Sierra, Jairo R. Martínez, Elena E. Stashenko.

International Symposium on Advances in Extraction Technologies, ExTech XXIII. Alicante, España. Fecha: 30-6-2021 a 2-7-2021. Modalidad virtual.

Póster: “Extraction and chemical composition of secondary metabolites from *Satureja viminea* (Lamiaceae)”.

Autores: Sheila B. Beltrán, Diana L. Manrique, Lady J. Sierra, Jairo R. Martínez, Elena E. Stashenko.

Póster: “Extraction of *Hyptis colombiana* (Lamiaceae) essential oil and its GC/MS analysis”.

Autores: Sheila B. Beltrán, Angie K. Romero, Lady J. Sierra, Jairo R. Martínez, Elena E. Stashenko.

REFERENCIAS

1. Services U.S. Department of Health & Human. U.S. Food & Drug [internet]. [Consultado el 18 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/Scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/FR Search.cfm? CFRPart=172>.
2. Commission European. European Federation of Essential Oils (E.F.E.O.) [internet]. [Consultado el 13 de abril de 2023]. Disponible en: https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-yoursay/initiatives/12975-Revision-of-EU-legislation-on-hazard-classification-labelling-and-packaging-of-chemicals/F23_33084_en.
3. Pateiro M, Barba F.J, Domínguez R, Sant'ana A.S, Mousavi A, Gavahian M, Gómez B, Lorenzo, J.M. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: a review. *Food Res Int.* 2018; 113: 156-166.
4. Santana-Méridas O, González-Coloma A, Sánchez-Vioque R. Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochem Rev.* 2012; 11: 447-466.
5. Ventura-Canseco L.M, Mendoza J, Abud M, Oliva M, Dendooven L, Gutiérrez-Miceli F.A. Sugarcane molasse and whey as additives in the silage of lemongrass (*Cymbopogon citratus* [DC.] Stapf) leaves. *Chilean J. Agric. Res.* 2012; 72: 87-91.
6. Deka H, Deka S, Baruah C, Das J, Hoque S, Sarma H, Sarma N. Vermicomposting potentiality of perionyx excavatus for recycling of waste biomass of java citronella - an aromatic oil yielding plant. *Bioresour. Technol.* 2011; 102: 11212-11217.
7. Singh A, Singh K, Singh, D. Suitability of organic mulch (distillation waste) and herbicides for weed management in perennial aromatic grasses. *Trop. Pest. Manag.* 1991; 37: 162-165.

8. Alfa M, Adie D, Iorhemen O, Okafor C, Ajayi S, Danhunsu S, Akali D. Assessment of mesophilic co-digestion of cow dung with lemon grass for biogas production. *NIJOTECH*. 2013; 32: 478-484.
9. Gavarić N, Kladar N, Mišan A, Nikolić A, Samojlik I, Mimica-Dukić N, Božin, B. Postdistillation waste material of thyme (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae) as a potential source of biologically active compounds. *Ind Crops Prod*. 2015; 74: 457-464.
10. Cid-Pérez T, Ávila-Sosa R, Ochoa-Velasco C, Rivera-Chavira B, Nevárez-Moorillón G. Antioxidant and antimicrobial activity of Mexican oregano (*Poliomintha longiflora*) essential oil, hydrosol and extracts from waste solid residues. *Plants*. 2019; 8: 22-35.
11. Newswire Globe. Essential oils market size to worth around US\$ 34.6 billion by 2030 [internet]. [Consultado el 29 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2022/06/08/2458521/0/en/Essential-Oils-Market-Size-to-Worth-Around-US-34-6-Bn-by-2030.Html>.
12. Observatory of Economic Complexity (OEC). Colombia, essential oils [internet]. [Consultado el 18 de abril de 2023]. Disponible en: <https://oec.world/en/profile/bilateral-product/essential-oils/reporter/col>.
13. Singh A, Singh M, Singh K. Productivity and economic viability of a palmarosa–pigeonpea intercropping system in the subtropical climate of north India. *J. Agric. Sci*. 1998; 130: 149-154.
14. Fleisher A, Fleisher Z. Yield and quality of essential oil from *Pelargonium graveolens* cultivated in Israel. *J. Sci. Food Agric*. 1985; 36: 1047-1050.

15. Sonmez C, Bayram, E. The influence of different water and nitrogen applications on some yield parameters and antioxidant activity in sage (*Salvia officinalis* L.). *Turkish J. Field Crop.* 2017; 22: 96-103.
16. Department Statista Research. Essential oils market worldwide-statistics & facts [internet]. [Consultado el 30 de marzo de 2023]. Disponible en: https://www.statista.com/topics/5174/essential-oils/#topicHeader__wrapper.
17. Giray F. An analysis of world lavender oil markets and lessons for Turkey. *J. Essent. Oil. Bear. Pl.* 2018; 21: 1612-1623.
18. Unión Europea. Reglamento de ejecución (UE) de la comisión del 19 de agosto de 2022 relativo a la autorización del aceite esencial de Ylang Ylang procedente de *Cananga odorata* (Lam) Hook f. & Thomson como aditivo para todas las especies animales [internet]. [Consultado el 14 de abril de 2023]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:32022R1412>.
19. Tan L, Lee L, Yin W, Chan C, Abdul H, Chan K, Goh B. Traditional uses, phytochemistry, and bioactivities of *Cananga odorata* (Ylang-Ylang). *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2015; 2015: 1-30
20. Le Sourceur. Ylang-Ylang [internet]. [Consultado el 14 de abril de 2023]. Disponible en: https://www.lesourceur.com/en/matiere_sourcee/ylang-ylang/.
21. Llauradó G, Méndez D, Rodríguez S, Hendrix J, Escalona Y, Fung B, Morris-Quevedo, H. Antioxidants in plants: a valorization potential emphasizing the need for the conservation of plant biodiversity in Cuba. *Antioxidants.* 2020; 9: 1048-1084.
22. Epling, C. Revisión del género *Hyptis* (Labiatae). *Botánica.* 1949; 7: 193-394.

23. Jimenez-usuga N, Malafronte N, Cotugno R, De Leo M, Osorio E, De Tommasi N. New sesquiterpene lactones from *Ambrosia cumanensis* Kunth. *Fitoterapia*. 2016; 113: 170–174.
24. Global Biodiversity Information Facility, *Satureja viminea* [internet]. [Consultado el 13 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.gbif.org/es/species/2926883>.
25. Fernández J, Rivera O. El libro rojo de las plantas de Colombia, de las labiadas (familia Labiatae). 1^{ra} Ed., vol. 3. Bogotá, Cundinamarca, Colombia: Editorial Santillana; 2006. p. 387-684.
26. McNeil M, Facey P, Porter R. Essential oils from the *Hyptis* genus. A review (1909-2009). *NPC*. 2011; 11: 1775-1796.
27. Flores M, Rojas L, Aparicio R, Lucena M, Usubillaga A. Essential oil composition and antibacterial activity of *Hyptis colombiana* from the Venezuelan Andes. *NPC*. 2015; 10: 1751-1752.
28. Thoppil J, Joseph J. Chemical composition of essential oil in two ethnomedicinal species of *Hyptis*. *Acta Pharm*. 1995; 45: 551-553.
29. Peerzada N. Chemical composition of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Molecules*. 1997; 2: 165-168.
30. Tucker A, Maciarelo M, Libbey L. Essential oil of *Satureja viminea* L. (Lamiaceae). *J. Essent. Oil Res*. 2000; 12: 283-284.
31. Stashenko E, Gutiérrez D, Martínez J, Manrique D. Análisis por GC/FID y GC/MS de la composición química y estudio de la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios volátiles, aislados por diferentes técnicas de *Satureja viminea* L. cultivada en Colombia. *Scientia Chromatographica*. 2017; 9: 25-39.

32. Vila R, Iglesias J, Cañigüeral S. Essential oil of *Satureja viminea* L. from Costa Rica. *J. Essent. Oil Res.* 2000; 12: 279-282.
33. Yáñez C, Rios N, Mora F, Rojas L, Díaz, T. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd. De los Llanos venezolanos. *Rev. Peru. Biol.* 2011; 18: 149-151.
34. Falcao R, Nascimento P, Souza S, Da Silva V. Antileishmanial phenylpropanoids from the leaves of *Hyptis pectinata* (L.) poit. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 1-8.
35. Gomes F, Dias M, Lima Â, Barros L, Rodrigues M, Ferreira I, Henriques M. *Satureja montana* L. and *Origanum majorana* L. decoctions: antimicrobial activity, mode of action and phenolic characterization. *Antibiotics.* 2020; 9: 294-306.
36. Poljuha D, Sladonja B, Šola I, Šenica M, Uzelac M, Veberič R, Hudina M, Famuyide I, Eloff J, Mikulic-Petkovsek M. LC-DAD-MS phenolic characterisation of six invasive plant species in Croatia and determination of their antimicrobial and cytotoxic activity. *Plants.* 2022; 11: 596-611.
37. Harley R, Pastore J. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa.* 2012; 58: 1-55.
38. Asekun O, Ekundayo O, Adeniyi, B. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. *Fitoterapia.* 1999; 70: 440-442.
39. Litvinenko, V. "Tannins" and derivatives of hydroxycinnamic acid in Labiatae. *Planta Med.* 1975; 27: 372-380.
40. Ekambaram S, Perumal S, Balakrishnan A, Marappan N, Gajendran S, Viswanathan V. Antibacterial synergy between rosmarinic acid and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Intercult Ethnopharmacol.* 2016; 5: 358-363.

41. Adomako-Bonsu A, Chan S, Pratten M, Fry, J. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: importance of physico-chemical characteristics. *Toxicol In Vitro*. 2017; 40: 248-255.
42. Gamaro G, Suyenaga E, Borsoi M, Lermen J, Pereira P, Ardenghi, P. Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *ISRN Pharmacol*. 2011; 2011: 1-6.
43. Petersena M, Simmonds M. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 2003; 62: 121-125.
44. Oliveira M, Campos I, Oliveira C, Santos M, Souza P, Santos S. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochem. Syst. Ecol*. 2005; 33: 275-285.
45. Fuentes J, García A, Quintero N, Prada C, Castellanos N, Franco D, Stashenko E.E. The SOS chromotest applied for screening plant antigenotoxic agents against ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol. Sci*. 2017; 16: 1424-1434.
46. Tafurt-García G, Jiménez L, Calvo A. Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales de *Hyptis* spp., *P. heptaphyllum*, *T. panamensis*, *T. rhoifolia*, y *Ocotea* sp. *Rev. Colomb. Quim*. 2015; 44: 28-33.
47. PYME, C. R. El mundo forestal [internet]. [Consultado el 5 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.elmundoforestal.com/ portfolio/menta-de-palo/>.
48. Cáceres M, Hidalgo W, Stashenko E, Torres C, Ortiz, C. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*. 2020; 9: 147-162.
49. U.S. Department of Health and Human Services. Toxicology and carcinogenesis studies of pulegone. *NTP*. 2011; 563: 1-212.

50. Aras A, Bursal E, Alan Y, Türkan F, Alkan H, Kiliç Ö. Polyphenolic content, antioxidant potential and antimicrobial activity of *Satureja boissieri*. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* 2018; 37: 209-219.
51. Chkhikvishvili I, Sanikidze T, Gogia N, Mchedlishvili T, Enukidze M. Rosmarinic acid-rich extracts of summer savory (*Satureja hortensis* L.) protect jurkat T cells against oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013; 1: 1-9.
52. Taslimi P, Köksal E, Gören A, Bursal E, Aras A, Ömer K. Anti-Alzheimer, antidiabetic and antioxidant potential of *Satureja cuneifolia*. *Arab. J. Chem.* 2020; 13: 4528-4537.
53. Koşar M, Demirci B, Demirci F, Başer K. Effect of maturation on the composition and biological activity of the essential oil of a commercially important *Satureja* species from Turkey: *Satureja cuneifolia* Ten. (Lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 2260-2265.
54. Aghbash B, Pouresmaeil M, Dehghan G, Nojadedh M, Mobaiyen H, Maggi F. Chemical composition, antibacterial and radical scavenging activity of essential oils from *Satureja macrantha* C.A.Mey. at different growth stages. *Foods.* 2020; 9: 494-507.
55. Suárez A, Echandi M, Ulate G, Cicció J. Pharmacological activity of the essential oil of *Satureja viminea* (Lamiaceae). *Rev. Biol. Trop.* 2003; 51: 247-252.
56. Yegen O, Berger B, Heitefuss, R. Investigations on the fungitoxicity of extracts of six selected plants from turkey against phytopathogenic fungi. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenpathol. Pflanzenschutz, Sonderh.* 1992; 99: 349-359.
57. Badilla B, Chaves F, Mora G, Poveda, L. Edema induced by *Bothrops asper* (squamata: Viperidae) snake venom and its inhibition by Costa Rica plant extracts. *Rev. Biol. Trop.* 2006; 54: 245-252.

58. Luebert F, García N. Notas sobre el género *Ambrosia* (Asteraceae: Ambrosiinae) en Chile. *Chloris Chilensis*. 2020; 23: 1, 77-83.
59. Missouri botanical garden. *Ambrosia cumanensis* [internet]. [Consultado el 28 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.tropicos.org/name/13900169>.
60. Gurib A. Volatile constituents of the leaf oil of *Artemisia verlotiorum* Lamotte and *Ambrosia tenuifolia* Sprengel. *J. Essent. Oil. Res.* 1996; 8: 559-561.
61. Mesa A, Naranjo J, Diez A, Ocampo O, Monsalve Z. Actividad antibacterial y larvicida sobre *Aedes aegypti* L. de extractos de *Ambrosia peruviana* Willd (Altamisa). *Rev. Cubana Plant. Med.* 2017; 22: 1-11.
62. Umiljendić J, Sarić M, Đorđević T, Šćepanović M, Šantrić L, Šoštarčić V, Radivojević L. Phytotoxicity of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medik.), common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) and common cocklebur (*Xanthium strumarium* L.) to lettuce and tomato. *Allelopathy. J.* 2022; 56: 159-172.
63. Ramli I, Posadino A, Zerizer S, Spissu Y, Barberis A, Djeghim H, Pintus G. Low concentrations of *Ambrosia maritima* L. phenolic extract protect endothelial cells from oxidative cell death induced by H₂O₂ and sera from Crohn's disease patients. *J. Ethnopharmacol.* 2023; 300: 115722.
64. Ramli I, Zerizer S, Gali L, Sakhri F, Kabouche Z, Usai D, Sechi L. *In vitro* and *in vivo* bioactivities of *Ambrosia maritima* and *Bituminaria bituminosa* organic extracts from Algeria. *JIDC.* 2022; 16: 1064-1074.
65. Castro J, Franco L, Díaz F. Anti-inflammatory screening of plant species from the colombian caribbean coast. *J. App. Pharm. Sci.* 2021; 11: 106-117.

66. Molano C, Lara D, Cely A, Ferro O. Effect of extracts *Ambrosia cumanenses* and *Nicotiana tabacum*, on teleogines of *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. *Rev. Cubana de Plantas Medicinales*. 2015; 20: 323-334.
67. Bakar F, Özlem B, Burçin E, Serpil N, Gülçin S. Antioxidant activity and phytochemical screening of some Asteraceae plants. *Turk. J. Pharm. Sci.* 2015; 12: 123-132.
68. Olennikov D, Chirikova N, Kashchenko N, Nikolaev V, Kim S, Vennos C. Bioactive phenolics of the genus *Artemisia* (Asteraceae): HPLC-DAD-ESI-TQ-MS/MS profile of the Siberian species and their inhibitory potential against α -amylase and α -glucosidase. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 756-783.
69. Echiburu-Chau C, Pastén L, Parra C, Bórquez J, Mocan A, Simirgiotis M. High-resolution UHPLC-MS characterization and isolation of main compounds from the antioxidant medicinal plant *Parastrephia lucida* (Meyen). *Saudi. Pharm. J.* 2017; 25: 1032-1039.
70. Caprioli G, Iannarelli R, Sagratini G, Vittori S, Zorzetto C, Sánchez M. Phenolic acids, antioxidant and antiproliferative activities of Naviglio extracts from *Schizogyne sericea* (Asteraceae). *Nat. Prod. Res.* 2017; 31: 515-522.
71. Hwang S, Kim Y, Park Y, Lee H, Kim K. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflamm. Res.* 2014; 63: 81-90.
72. Xu J, Hu Q, Liu Y. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *J. Agric. Food. Chem.* 2012; 60: 11625-11630.
73. Shengxi M, Jianmei C, Qin F, Jinghua P, Yiyang H. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2013; 2013: 1-11.

74. Maksimović Z. *In vitro* antioxidant activity of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L., Asteraceae) herb. *Ind. Crops. Prod.* 2008, 28, 356-360.
75. Halliwell B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 49: 1341-1348.
76. Gutteridge J. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biol. Interact.* 1994; 91: 133-140.
77. Akoh C, Min D. Chemistry, nutrition, and biotechnology. 3^{ra} Ed. Boca Ratón Florida, EE. UU: *Taylor y Francis Group*; 2008. p. 409-420.
78. Dorsey B, Jones M. Healthy components of coffee processing by-products. Handbook of coffee processing by-products. Oxford, Oxfordshire, United Kingdom: *Academic Press*; 2017. p. 27-62.
79. Fukuzumi K, Shimoosako K, Suenobu T, Watanabe T. Mechanisms of hydrogen-, oxygen-, and electron-transfer reactions of cumylperoxyl radical. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 9074-9082.
80. Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free. Radic. Res.* 2015; 49: 633-649.
81. Kasote D, Katyare S, Hegde M, Bae, H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *Int. J. Biol. Sci.* 2015; 11: 982-991.
82. Pratt D. Phenolic compounds in food and their effects on health II. *Antioxidants and cancer prevention.* 1992; 254-61.
83. Peñarrieta M, Tejeda L, Mollinedo P, Vila J, Bravo A. Phenolic compounds in food. *Rev. Boliv. Quim.* 2014; 61: 68-81.

- 84.** Rice E, Miller C, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997; 2:152–159.
- 85.** Beconcini D, Felice F, Fabiano A, Sarmiento B, Zambito Y. Antioxidant and antiinflammatory properties improve endothelial function and intestinal absorption. *Foods.* 2020; 9: 207-229.
- 86.** Londoño J. Capítulo 9, antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Caldas, Antioquia, Colombia: Corporación Universitaria Lasallista; 2012. p. 129-134.
- 87.** Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am. J. Med.* 1994; 97: 13, 5-13.
- 88.** Nimse S, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances.* 2015; 5: 27986-28006.
- 89.** Santos F, Salas R, Villanueva C, Hernández C. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants.* 2019, 1: 1-28.
- 90.** Wright J, Johnson E, Dilabio G. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 1173-1183.
- 91.** Miller N, Rice-Evans C, Davies M, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci (Lond).* 1993; 84: 407-419.
- 92.** Ilyasov I, Beloborodov V, Selivanova I, Terekhov R. ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 1-27.
- 93.** Rodríguez O, Andrade W, Díaz F. Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). *J. Technol.* 2015; 14: 21-36.

94. Koleva I, Niederländer H, Van Beek T. Application of ABTS radical cation for selective *on-line* detection of radical scavengers in HPLC eluates. *Anal. Chem.* 2001; 73: 3373-3381.
95. Bartoszek A, Kusznierevicz B, Namieśnik J. HPLC-coupled post-column derivatization aims at characterization and monitoring of plant phytocomplexes, not at assessing their biological properties. *J. Food. Compos. Anal.* 2014; 33: 220-223.
96. Wayner D, Burton G, Ingold K, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radicaltrapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS.* 1985; 1: 33-37.
97. Glazer, A. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine. *FASEB.* 1988; 2: 2487-2491.
98. Cao G, Sofic E, Prior R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22: 749-809.
99. Zhong Y, Shahidi F. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. Handbook of antioxidants for food preservation. *Woodhead Publishing.* Kidlington, Oxfordshire, United Kingdom. 2015; 276: 287-333.
100. Opitz S, Smrke S, Bernard A, Chahan Y. Methodology for the measurement of antioxidant capacity of coffee a validated platform composed of three complementary antioxidant assays. Processing and impact on antioxidants in beverages. Kidlington, Oxfordshire, United Kingdom: *Academic Press*; 2014. p. 253-264.
101. Koch E, Bruns E, Chmielewski F. Guidelines for plant phenological observations, 1^{ra} Ed., Geneva, Canton of Geneva, Switzerland: *World Meteorological Organization*; 2009: 1-16.

- 102.** Hack. Compendio para la identificación de los estadios fenológicos de especies monno y dicotiledóneas cultivadas. 1^{ra} Ed. Aktiengesellschaft, Limburgerhof, Germany: *BASF*; 1992. p. 1-123.
- 103.** Chepel V, Lisun V, Skrypnik L. Changes in the content of some groups of phenolic compounds and biological activity of extracts of various parts of heather [*Calluna vulgaris* (L.) Hull] at different growth stages. *Plants*. 2020; 9: 926-942.
- 104.** Willis C, Ellwood E, Primack R. Old plants, new tricks: phenological research using herbarium specimens. *Trends Ecol. Evol.* 2017; 32: 1-16.
- 105.** Javadzadeh S. Study of phenology process of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in South-east Iran. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2018; 5: 145-156.
- 106.** Mejía J, Martínez J, Stashenko E.E. Estudio de la composición química y evaluación del potencial antioxidante, citotóxico y sensibilizante de extractos de *Hibiscus rosa sinensis* (Malváceas) y de la biomasa residual de *Lippia origanoides* (Verbenáceas) como posibles ingredientes en productos cosméticos [Tesis de Doctorado en Química]. Bucaramanga, Colombia: Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander; 2022.
- 107.** Miller J, Miller J. Estadística y quimiometría para química analítica. 4^a Ed. Madrid, Comunidad de Madrid, España: *Pearson Prentice Hall*; 2002. p. 111-152.
- 108.** Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods. *Chron. Young. Sci.* 2015; 2: 21-25.
- 109.** Wishart D, Guo A, Oler E, Wang F. HMDB 5.0: The Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022 [internet]. [Consultado en enero de 2022 a octubre de 2022]. Disponible en: www.hmdb.ca.

- 110.** MassBank [internet]. [Consultado en julio de 2022 a octubre de 2022]. Disponible en: www.massbank.eu/MassBank/.
- 111.** Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food. Chem.* 2001; 49: 4619-4626.
- 112.** Arias G, Martínez J, Stashenko E. Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citriodora*, cultivadas en el municipio de Sucre (Santander) [Tesis de Maestría en Química]. Bucaramanga, Colombia: Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander; 2012.
- 113.** Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical-cation decoloration assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26: 1231-1237.
- 114.** Sierra L, Martínez J, Stashenko E. Estudio de la composición y evaluación de las actividades antioxidante y fotoprotectora de extractos de flores de plantas tropicales cultivadas en Colombia [Tesis de Doctorado en Química]. Bucaramanga, Colombia: Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander; 2020.
- 115.** Melaku M, Mekonnen Y, Tefera M. Antibacterial and antioxidant activities of crude aerial part extracts of *Satureja punctata* (Benth) Briq. *Afr. J. Bact. Res.* 2018; 10: 44-49.
- 116.** Mandal S, Mondal K, Dey S, Pati B. Antimicrobial activity of the leaf extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) poit. *Indian J. Pharm. Sci.* 2007; 69: 568-569.

- 117.** Medoatinsa S, Agbangnan C, Viwami F, Noudogbessi J, Lagnika H, Ahissou H, Sohounhloue D. *In vitro* antiplasmodial and antioxidant activities of ethanolic and hydroethanolic extracts of *Hyptis suaveolens*. *World. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015; 4: 101-112.
- 118.** Babushok V, Linstrom P, Zenkevich I. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 2011; 40: 043101.
- 119.** Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Ed. Carol Stream, Illinois, EE. UU: *Allured Publishing Corporation*; 2007. p.1-809.
- 120.** Davies N. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. Amsterdam, Netherlands: *Elsevier Science Publishers B.V.*; 1990. p. 1-24.
- 121.** Miyakazi T, Plotto A, Goodner K, Gmitter F. Distribution of aroma volatile compounds in tangerine hybrids and proposed inheritance. *J. Sci. Food Agric.* 2011; 91: 449-460
- 122.** Pala-Paul J, Copeland L, Brophy J, Goldsack R. Essential oil composition of two variants of *Prostanthera lasianthos* Labill. *Biochem. Syst. Ecol.* 2006; 34: 48-55.
- 123.** Salehi P, Sonboli A, Eftekhari F, Nejad-E. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. rigida (boiss) rech. f. from Iran. *Biol. Pharm. Bull.* 2005; 29: 1982-1986.
- 124.** Sardashti A, Valizadeh J, Adhami Y. Variations in the essential oil composition of *Pereskia abrotonolides* of different growth stage in Baluchestan. *Middle-East J. Sci. Res.* 2013; 13: 781-784

- 125.** Demirci B, Temel H.E, Portakai T, Kirmizibekmez H, Demirci F, Baser K. Inhibitory effect of *Calamintha neleta* subsp. *glandulosa* essential oil on lipoxygenase. *Turk. J. Biochem.* 2011; 36: 290-295.
- 126.** Padrayuttawat A, Tamura H, Yamao M. A split injection system for the analysis of purge and trap headspace of the volatile components in *Citrus sudachi*. *J. High. Resolut. Chromatogr.* 1996; 6: 365-369.
- 127.** Paolini J, Muselli A, Bernardini A, Bighelli A, Casanova J, Costa J. Thymol derivatives from essential oil of *Doronicum corsicum* L. *Flavour Fragr. J.* 2007; 6: 479-487.
- 128.** Sonboli A, Azizian D, Yousefzadi M, Kanani M, Mehrabian A. Volatile constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Tetrataenium lasiopetalum* (Apiaceae) from Iran. *Flavour Fragr. J.* 2007; 1: 119-122.
- 129.** Choi H. Characteristic odor components of kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) peel oil. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 1642-1647.
- 130.** Meccia G, Rosquete C, Rojas L. New labdane derivative from the essential oil of *Acalypha plicata* Mull. *Flavour Fragr. J.* 2006; 21: 559-561.
- 131.** Choi H. Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov × *C. sinensis* Osbeck) × *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 2687-2692
- 132.** Chen C, Ho C. Gas chromatographic analysis of volatile components of ginger oil (*Zingiber officinale* Roscoe) extracted with liquid carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* 1988; 36: 322-328.

- 133.** Flamini G, Tebano M, Cioni P.L. Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of *Citrus limon*. *Anal. Chim. Acta*. 2007; 589: 120-124.
- 134.** Abdelli M, Moghrani H, Aboun A, Maachi R. Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. *Ind. Crops. Prod*. 2016; 94: 197-205.
- 135.** Snoussi M, Noumi E, Trabelsi N, Flamini G, Papetti A, De Feo, V. *Mentha spicata* essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp. strains. *Molecules*. 2015; 20: 14402-14424.
- 136.** Lin S, Wang Y, Wu K, Yu G, Liu C, Su C, Yi F. Study on the effect of *Mentha* × *piperita* L. essential oil on electroencephalography upon stimulation with different visual effects. *Molecules*. 2022; 27: 4059-4071.
- 137.** World integrated trade solution [internet]. [Consultado el 27 de julio de 2023]. Disponible en: <https://wits.Worldbank.org/trade/comtrade/en/country/ALL/year/2021/tradeflow/Exports/partner/WLD/product/330125>.
- 138.** Suárez A, Echandi M, Ulaté G, Ciccio J. Pharmacological activity of the essential oil of *Satureja viminea* (Lamiaceae). *Rev. Biol. Trop*. 2003; 51: 247-252.
- 139.** Api A, Belsito D, Biserta S, Botelho D, Bruze M, Burton J, Tokura Y. RIFM fragrance ingredient safety assessment, pulegone, CAS registry number 89-82-7. *FCT*. 2021; 149: 112092.
- 140.** Popovici R, Vaduva D, Pinzaru I, Dehelean C, Farcas C, Coricovac D, Stanca H. A comparative study on the biological activity of essential oil and total hydro-alcoholic extract of *Satureja hortensis* L. *Exp. Ther. Med*. 2019; 18: 932-942.

- 141.** López A, Gómez A, Švarc J, Segura A, Fernández, A. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of a mediterranean plant: the case of *Satureja montana* subsp. kitaibelii. *J. Funct. Foods*. 2015; 18: 1167-1178.
- 142.** Irakli M, Skendi A, Bouloumpasi E, Chatzopoulou P, Biliaderis C. LC-MS identification and quantification of phenolic compounds in solid residues from the essential oil industry. *Antioxidants*. 2021; 10: 2016-2035.
- 143.** Aditivos alimentarios [internet]. [Consultado 11 de julio 2022]. Disponible en: <https://www.aditivos-alimentarios.com/2016/01/E392.html>.
- 144.** Raadt P, Wirtz S, Vos E, Verhagen, H. Short review of extracts of rosemary as a food additive. *European J. Nutr. Food Saf.* 2015; 5: 126-137.
- 145.** European Commission. Concerning the authorisation of a preparation of the leaves extract of *Melissa officinalis* L. as a feed additive for all animal species. Commission implementing regulation (EU) 2022/653; 2022. p. 29-34.
- 146.** Bampidis V, Azimonti G, Bastos M, Christensen H, Kouba M, Dusemund B. EFSA panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP). Safety and efficacy of a dried aqueous ethanol extract of *Melissa officinalis* L. leaves when used as a sensory additive for all animal species. *EFSA J.* 2020; 18: e06016.
- 147.** Tsimogiannis D, Choulitoudi E, Bimpilas A, Mitropoulou G, Kourkoutas Y, Oreopoulou, V. Exploitation of the biological potential of *Satureja thymbra* essential oil and distillation by-products. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*. 2017; 4: 12-20.

- 148.** Kharazian N. Flavonoid constituents in some species of *Salvia* L. (Lamiaceae) in Iran. *J. Sci. Islam. Repub Iran.* 2014; 25: 219-227.
- 149.** Grayer R, Veitch N, Kite G, Price A, Kokubun T. Distribution of 8-oxygenated leaf-surface flavones in the genus *Ocimum*. *Phytochemistry.* 2001; 56: 559-567.
- 150.** Wang Y, Weng Z, Dou T, Hou J, Wang D, Ding L, Ge G. Nevadensin is a naturally occurring selective inhibitor of human carboxylesterase 1. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 120: 1944-1954.
- 151.** Suksamrarn A, Poomsing P, Aroonrerk N, Punjanon T, Suksamrarn S, Kongkun S. Antimycobacterial and antioxidant flavones from *Limnophila geoffrayi*. *Arch. Pharm. Res.* 2003; 26: 816-820.
- 152.** Reddy G, Melkhani A, Kalyani G, Rao J, Shirwaikar A, Kotian M, Srinivasan K. Chemical and pharmacological investigations of *Limnophila conferta* and *Limnophila heterophylla*. *Int. J. Pharm.* 1991; 29: 145-153.
- 153.** Christaki S, Bouloumpasi E, Lalidou E, Chatzopoulou P, Irakli M. Bioactive profile of distilled solid by-products of rosemary, Greek sage and spearmint as affected by distillation methods. *Molecules.* 2022; 27: 9058.
- 154.** Drinić Z, Pljevljakušić D, Živković J, Bigović D, Šavikin K. Microwave-assisted extraction of *O. vulgare* L. spp. hirtum essential oil: comparison with conventional hydro-distillation. *FBP.* 2020; 120: 158-165.
- 155.** Zhang B, Yang R, Liu C. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Sep. Purif. Technol.* 2008; 62: 480-483.
- 156.** González-Rivera J, Campanella B, Pulidori E, Bramanti E, Tiné M, Bernazzani L, Ferrari C. From volatiles to solid wastes: towards the full valorization of lavender and rosemary by

simultaneous *in situ* microwave and ultrasound irradiation extraction. *Ind. Crops. Prod.* 2023; 194: 116362.

157. Perraudin F, Popovici J, Bertrand C. Analysis of headspace-solid microextracts from flowers of *Maxillaria tenuifolia* Lindl, by GC-MS. *Electronic J. Nat.Subst.* 2006; 1: 1-5.

158. Bell W-M. Examination of aroma volatiles formed from thermal processing of Florida reconstituted grapefruit juice [Master of Science]. Florida, EE.UU: Department of Food Science and Human Nutrition, University of Florida; 2004.

159. Delort E, Jaquier A. Novel terpenyl esters from Australian finger lime (*Citrus australasica*) peel extract. *Flav. Fragr. J.* 2009; 24: 123-132.

160. Baranauskiene R, Venskutonis R, Demyttenaere J. Sensory and instrumental evaluation of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) aroma. *Flavour Fragr. J.* 2005; 20: 492-500.

161. Al-Jaber H, Obeidat S, Afifi F, Abu Zarga M. Aroma profile of two populations of *Salvia verbenaca* collected from two bio-geographical zones from Jordan. *Chem. Biodivers.* 2020; 17: e1900553.

162. Langenheim, J. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* 1994; 20: 1223-1280.

163. Degenhardt J, Köllner T, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry.* 2009; 70: 1621-1637.

164. Kollner T, Held M, Lenk C, Hiltbold I, Turlings T, Gershenzon J, Degenhardt J. A maize (*E*)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *Plant Cell.* 2008, 20, 482-494.

- 165.** Rastogi S, Lepoittevin J, Johansen J, Frosch P, Menné T, Bruze M, White I. Fragrances and other materials in deodorants: search for potentially sensitizing molecules using combined GC-MS and structure activity relationship (SAR) analysis. *Contact. Derm.* 1998; 39: 293-303.
- 166.** Dahham S, Tabana Y, Iqbal M, Ahamed M, Ezzat M, Majid A. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules.* 2015; 20: 11808-11829.
- 167.** Boalino D, Connolly J, Mclean S, Reynolds W, Tinto W. α -Pyrone and a 2 (5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry.* 2003; 64: 1303-1307.
- 168.** Martínez L, Pereda R, Rosas D, Frago M, Cerda C, Da Silva A, Leitão S. Structure elucidation, conformation, and configuration of cytotoxic 6-heptyl-5, 6-dihydro-2 H-pyran-2-ones from *Hyptis* species and their molecular docking to α -tubulin. *J. Nat. Prod.* 2019; 82: 520-531.
- 169.** Bezerra J, Costa A, Da Silva M, Rocha M. Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (Lamiaceae) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina*. *S. Afr. J. Bot.* 2017; 113: 442-447.
- 170.** Tang G, Liu X, Gong X, Lin X, Lai X, Wang, D. Studies on the chemical compositions of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *J. Serb. Chem. Soc.* 2019; 84: 245-252.
- 171.** Pereda-Miranda R, Delgado G. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. *J. Nat. Prod.* 1990; 53: 182-185.

172. Santana F, Luna L, Antunes V, Tormena C, Cominetti M, Duarte M, Da Silva J. Evaluation of the cytotoxicity on breast cancer cell of extracts and compounds isolated from *Hyptis pectinata* (L.) poit. *Nat. Prod. Research*. 2020; 34: 102-109.
173. Dostálek T, Rokaya M, Maršík P, Rezek J, Skuhrovec J, Pavela R, Münzbergová Z. Trade-off among different anti-herbivore defence strategies along an altitudinal gradient. *AoB Plants*. 2016; 8: 1-18.
174. Vazquez A, Demmel G, Criado S, Aimar M, Cantero J, Rossi L, Velasco M. Phytochemistry of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) from Cordoba, Argentina: comparative study between essential oil and HS-SPME analyses. *BLACPMA*. 2011; 10: 351-362.
175. Polatoglu K, Demirci F, Goren N, Baser, K. Antimicrobial activity and essential oil composition of a new *Tanacetum argyrophyllum* (C. Koch) Tvetzel var. *argyrophyllum* chemotype. *J. Oleo Sci*. 2010; 59: 307-313.
176. Umamo K, Hagi Y, Nakahara K, Shoji A, Shibamoto T. Volatile chemicals identified in extracts from leaves of Japanese mugwort (*Artemisia princeps* Pamp.). *J. Agric. Food Chem*. 2000; 48: 3463-3469.
177. Nogueira P, Marsaioli A, Amaral M, Bittrich V. The fragrant floral oils of *Tovomita* species. *Phytochemistry*. 1998; 49: 1009-1012.
178. Radulovic N, Dordevic N, Palic, R. Volatiles of *Pleurospermum austriacum* (L.) Hoffm. (Apiaceae). *J. Serbian Chem. Soc*. 2010; 75: 1-11.
179. Wong, K, Lim T, Ali D. Essential oil of *Homalomena sagittifolia* Jungh. *Flavour Fragr. J*. 2006; 21: 786-788.

- 180.** Aćimović M, Zeremski T, Šovljanski O, Lončar B, Pezo L, Zheljaskov V, Kurunci Z. Seasonal variations in essential oil composition of immortelle cultivated in Serbia. *Horticulturae*. 2022; 8: 1-13.
- 181.** Talić S, Odak I, Martinović A, Crnjac N, Paštar M. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* from Herzegovina: volatile composition, variations during seasons, total polyphenols, acetylcho-linesterase inhibition and antioxidant activity. *Croat. Chem. Acta*. 2019; 92: 69-77.
- 182.** Kunc N, Frlan A, Baričević D, Kočevar Glavač N, Kokalj Ladan M. Essential oil and hydrosol composition of immortelle (*Helichrysum italicum*). *Plants*. 2022; 11: 2573-2585.
- 183.** Ciccío J, Chaverri C. Essential oil composition of *Ambrosia cumanensis* (Asteraceae) from Costa Rica. *Am. J. Essent. Oil. Nat. Prod.* 2015; 3: 15-21.
- 184.** Podlogar J, Verspohl E.J. Antiinflammatory effects of ginger and some of its components in human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Phytother. Res.* 2012; 26: 333-336.
- 185.** Guzmán L, Malla J, Ramírez J, Gilardoni G, Calva J, Hidalgo D, Rey-Valeirón, C. Acaricidal efficacy of plants from Ecuador, *Ambrosia peruviana* (Asteraceae) and *Lepechinia mutica* (Lamiaceae) against larvae and engorged adult females of the common cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Sci.* 2022; 9: 23-36.
- 186.** Sülsen V, Donadel O, Catalán C. Spectroscopic methods for the identification of sesquiterpene lactones. *Sesquiterpene lactones: advances in their chemistry and biological aspects*. Cham, Canton Zug, Switzerland: Springer; 2018. p. 137-172.

- 187.** Chaturvedi D. Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities. *Res. Signpost. Trivandrum*. 2011; 313-334.
- 188.** Saavedra E, Estévez F, Said M, Eiroa J, Rubio S, Quintana J, Estévez F. Cytotoxicity of the sesquiterpene lactone spiciformin and its acetyl derivative against the human leukemia cell lines U-937 and HL-60. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 2782-2796.
- 189.** Zhang S, Won Y, Ong C, Shen H. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*. 2005; 5: 239-249.
- 190.** Macías F, Galindo J, Castellano D, Velasco R. Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models (I): *trans, trans*-germacranolides. *J. Agric. Food. Chem.* 1999; 47: 4407-4414.
- 191.** Humphrey, S. Medical compound produced from ragweed. *United States Patent* US4261981A. 1980, enero 28.
- 192.** Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu, E. Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *J. Agric. Food Chem.* 2016; 5: 1028-1045.
- 193.** Manrique D, Martínez J, Stashenko E.E. Estudio de la composición química de los metabolitos secundarios de *Satureja viminea* L., obtenidos por diferentes métodos de extracción y determinación de su capacidad antioxidante [Trabajo de grado en Química]. Bucaramanga, Santander: Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander; 2014.

- 194.** Dos Santos K, Sedano M, Sala W, Loureiro B, Da Silva L, Furlan C. Biological activity of *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) is determined by the environment. *Ind. Crops. Prod.* 2018; 112: 705-715.
- 195.** Clavin M, Gorzalczany S, Macho A, Muñoz E, Ferraro G, Acevedo C, Martino V. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 112: 585-589.
- 196.** Gong G, Zheng Y, Xiao J, Dong T, Tsim K. Nepetin, a flavonoid derived from *Saussureae involucratae*, suppresses the LPS-induced inflammatory response in cultured human keratinocytes. *Research Square.* 2021; 1-18.
- 197.** Voirin B, Bayet C, Colson M. Demonstration that flavone aglycones accumulate in the peltate glands of *Mentha x piperita* leaves. *Phytochemistry.* 1993; 34: 85-87.
- 198.** Thitilertdecha P, Rowan M, Guy R. Topical formulation and dermal delivery of active phenolic compounds in the Thai medicinal plant—*Clerodendrum petasites* S. Moore. *Int. J. Pharm.* 2015; 478: 39-45.
- 199.** Beltrán S, Sierra L, Fernández-Alonso J, Romero A, Martínez J.R., Stashenko E.E. Antioxidant properties and secondary metabolites profile of *Hyptis colombiana* at various phenological stages. *Molecules.* 2023; 28: 6767-6785.