

Caracterización química y fraccionamiento de aceites esenciales y extractos
hidroalcohólicos obtenidos de *Lippa alba* y *Turnera diffusa*.

Cesar Alberto GARCIA QUINTERO

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director:

Elena E. STASHENKO

Químico, Ph. D.

Codirector:

Rogelio SAAVEDRA

Químico, M.Sc.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2022

Tabla de contenido

Lista de Tablas.....	5
Lista de figuras.....	14
Lista de anexos.....	15
Glosario.....	17
Introducción	18
1. Marco referencial	24
1.1 Marco de antecedentes.....	24
1.2 Marco teórico	25
1.2.1 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson.	25
1.2.2 <i>Turnera diffusa</i> Willdenow.....	27
1.3 Aceites esenciales	29
1.3.1 Terpenos.....	29
1.3.2 Destilación con arrastre con vapor.....	30
1.3.3 Destilación fraccionada.....	31
1.4 Extractos vegetales.....	37
1.4.1 Flavonoides	37
1.4.2 Extracción con solvente	37
1.4.3 Fraccionamiento de extractos	37
1.5 Técnicas analíticas.	34
1.5.1 Cromatografía de gases.....	37
1.5.2 Cromatografía líquida	37

1.6.1	Detector selectivo de masas	37
1.6.2	Detector de ionización en llama.....	37
1.6.3	Detector con arreglo de diodos	38
1.6.4	Detector de espectrometría de masas <i>Orbitrap</i>	38
1.7	Antioxidantes.....	39
1.7	Ensayo de decoloración del carion-radical ABTS ⁺	44
2.	Metodología	46
2.1.	Material vegetal	41
2.2	Destilación de los aceites esenciales.....	41
2.2.1	Fraccionamiento de los aceites esenciales.....	42
2.2.2	Caracterización de aceites esenciales y sus fracciones.....	44
2.3	Extractos hidroalcohólicos.....	45
2.3.1	Fraccionamiento de los extractos.....	46
2.3.2	Caracterización de extractos hidroalcohólicos y sus fracciones.....	48
2.4	Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	55
2.4.1	Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	55
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
3.1	Caracterización química de los metabolitos volátiles y semi-volátiles obtenidos de partes aéreas de la especie <i>L. alba</i> quimiotipo citral... ..	56
3.1.1	Caracterización química por GC/MS de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral.....	57
3.1.2	Fraccionamiento del aceite esencial de <i>L. alba</i> quimiotipo citral.....	59

3.1.3 Análisis HPLC/DAD de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico y fracciones de <i>L. alba</i>	60
3.1.4 Caracterización química por UHPLC/ESI [±] -Orbitrap/MS del extracto hidroalcohólico de partes aéreas de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral a partir de material vegetal fresco.	68
3.1.5 Caracterización por UHPLC/ESI [±] -Orbitrap-MS, en modo de adquisición dual del extracto hidroalcohólico de <i>L. alba</i>	69
3.2 Análisis de los metabolitos secundarios obtenidos de la especie <i>T. diffusa</i>	78
3.2.1 Caracterización por GC/MS de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de <i>T. diffusa</i>	78
3.2.2 Fraccionamiento del aceite esencial de <i>Turnera diffusa</i>	81
3.2.3 Análisis HPLC/DAD de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico y fracciones de <i>T. diffusa</i> y sus fracciones.....	85
3.2.4 Caracterización química por UHPLC/ESI [±] -Orbitrap-MS del extracto hidroalcohólico de <i>Turnera diffusa</i> . y sus fracciones	99
4. Ensayo de actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los aceites esenciales, extractos vegetales y sus fracciones de <i>L. alba</i> y <i>T. diffusa</i> mediante ensayo de decoloración del catión radical ABTS ⁺	110
5 Conclusiones	115
Divulgación de resultados.....	117
Referencias bibliográficas.....	118
Anexos	131

Lista de Tablas.

Tabla 1. Publicaciones referentes la especie <i>L. alba</i> , agrupadas en periodos de tres años.	25
Tabla 2. Países y áreas de estudio con mayor número de publicaciones sobre AE y extractos vegetales de <i>L. alba</i> , durante los años 2002-2021.	22
Tabla 3. Publicaciones referentes la especie <i>T. diffusa</i> , agrupadas en periodos de tres años.	28
Tabla 4. Países y áreas de estudio con mayor número de publicaciones sobre AE y extractos vegetales de <i>T. diffusa</i> durante los años 2002-2021.....	24
Tabla 5. Condiciones de presión y temperatura para el fraccionamiento de los aceites esenciales de <i>L. alba</i> y <i>T. diffusa</i>	49
Tabla 6. Condiciones de extracción hidroalcohólica en marmita.	52
Tabla 7. Parámetros operacionales para medir la actividad antioxidante por el método de decoloración del catión-radical ABTS ⁺ . En lector de microplacas.....	56
Tabla 8. Caracterización por GC/MS del AE, destilado por arrastre con vapor, de partes aéreas de <i>L. alba</i> , quimiotipo citral.	57
Tabla 9. Resultados del fraccionamiento del AE de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral, en el equipo <i>B/R-instrument 800-High Efficiency Micro Destillation</i>	60
Tabla 10. Comparación de áreas relativas obtenidas por GC/FID de los compuestos identificados en el AE de <i>L. alba</i> y sus fracciones, obtenidas por destilación fraccionada al vacío	63

Tabla 11. Rendimientos de fraccionamiento del extracto hidroalcohólico obtenido de partes aéreas de la especie vegetal <i>L. alba</i> .	68
Tabla 12. Identificación mediante HPLC/DAD de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de la especie vegetal <i>L. alba</i> .	68
Tabla 13. Masas exactas de iones o moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, identificadas por UHPLC/ESI [±] -Orbitrap/MS de compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>L. alba</i> quimiotipo citral, obtenido de material vegetal fresco.	74
Tabla 14. Variación de los compuestos identificados por UHPLC/ESI [±] -Q-Orbitrap-MS en las fracciones del extracto hidroalcohólico de <i>L. alba</i> , obtenido de material vegetal fresco.	81
Tabla 16. Caracterización por GC/MS del aceite esencial, obtenido de partes aéreas frescas de <i>Turnera diffusa</i> .	84
Tabla 17. Resultados del fraccionamiento del AE de <i>T. diffusa</i> en el destilador fraccionado a presión reducida (<i>B/R-instrument 800-High Efficiency Micro Distillation</i>).	86
F: fracción, *resultados expresados como promedio ± desviación estándar, <i>n</i> =4.	86
Tabla 18. Comparación de áreas relativas A_i/A_{istd} por GC/FID del AE de <i>T. diffusa</i> y sus respectivas fracciones obtenidas por destilación fraccionada al vacío.	88
Tabla 19. Rendimientos de fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de partes aéreas de <i>T. diffusa</i> .	88
Tabla 20. Compuestos fenólicos presentes en el extracto hidroalcohólico obtenido a partir de material vegetal fresco de <i>T. diffusa</i> .	92

Tabla 21. Masas exactas de iones o moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, identificadas por UHPLC/ESI [±] -Orbitrap-MS de compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>T. diffusa</i> quimiotipo citral, obtenido de material vegetal fresco.....	91
Tabla 23. Activiades biologicas reportadas para los compuestos identificados, presentes en los extractos hidroalcohólicos de <i>T. diffusa</i>	98
Tabla 24. Actividad antioxidante media por ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ^{•+} para los AE y extractos vegetales de <i>L. alba</i> y <i>T. diffusa</i>	111

Lista de figuras.

Figura 1.	Flores de <i>Lippia alba</i> (Mill.). Foto tomada por César alberto GARCIA QUINTERO. en el jardín botánico Con-Sentido. CIBIMOL-CENIVAM; UIS, Bucaramanga, 5-01-2022.	32
Figura 2.	Flor de la planta de <i>Turnera diffusa</i> Willdenow. Foto tomada por César alberto GARCIA QUINTERO en el jardín botánico Con-Sentido. CIBIMOL, CENIVAM; UIS, Bucaramanga, 12-10-2021.....	34
Figura 3.	Estructura del isopreno.	35
Figura 4.	Estructura base de los flavonoides.....	38
Figura 5.	Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Prominence (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).....	40
Figura 6.	Formación del catión-radical ABTS ⁺⁺ usando el persulfato de potasio.	45
Figura 7.	Montaje experimental para la obtención de los AE (alambique, condensador). Foto tomada por el autor Cesar Alberto Garcia Q. Fecha: septiembre 18 de 2021. Lugar: CENIVAM, UIS, Bucaramanga.	47
Figura 8.	Equipo de destilación fraccionada <i>BR-instrument 800-High Efficiency Micro Destillation</i>	49
Figura 9.	Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies (AT) 7890A</i>	51
Figura 10.	Montaje usado para realizar cromatografía en columna abierta.	54
Figura 12.	Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (<i>full scan</i>) del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral. Columna DB-5MS (60 m), inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación en la Tabla 8.	57

Figura 13.	Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción 1 del AE de <i>L. alba</i> . Columna DB-5MS (60 m), inyección <i>split</i> 1:30.....	61
Figura 14.	Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción 2 del AE de <i>L. alba</i> . Columna DB-5MS (60 m), inyección <i>split</i> 1:30.....	61
Figura 15.	Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción 3 del AE de <i>L. alba</i> . Columna DB-5MS (60 m), inyección <i>split</i> 1:30.....	62
Figura 16.	Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción de fondo del AE de <i>L. alba</i> . Columna DB-5MS (60 m), inyección <i>split</i> 1:30.....	62
Figura 17.	Clasificación por las familias de los metabolitos secundarios presentes en el AE de <i>L. alba</i> al someterse a fraccionamiento.....	66
Figura 18.	Variación en la composición química y las fracciones del extracto hidroalcohólico de la especie vegetal <i>L. alba</i>	69
Figura 19.	Perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD del extracto HA de material vegetal bajo estudio de <i>L. alba</i> . Columna GEMINI C ₁₈ . ISTD: norwogonina, 40 mg/L. La identificación se muestra en la Tabla 12.....	69
Figura 20.	Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos bajo estudio de <i>L. alba</i> . A. Fracción 1; B. Fracción 2; C. Fracción 3; D. Fracción 4. Columna GEMINI C ₁₈ . ISTD: norwogonina 40 mg/L. La identificación se muestra en el Anexo 11.	70
Figura 21.	Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos bajo estudio de <i>L. alba</i> . E. Fracción 5; F. Fracción 6; G. Fracción 7; H. Fracción 8. Columna GEMINI C ₁₈ . ISTD: norwogonina, 40 mg/L. La identificación se muestra en el Anexo 11.	71

- Figura 22. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD de la fracción 9 del extracto HA de material vegetal bajo estudio de *L. alba*. Columna GEMINI C₁₈. ISTD: norwogonina, 40 mg/L. La identificación se muestra en el Anexo 11. 72
- Figura 23. Corrientes iónicas extraídas por UHPLC/ESI^{+/-}-Q-Orbitrap/MS, obtenidas en modo SIM, de moléculas protonadas [M+H]⁺, y deprotonadas [M-H]⁻, presentes en el extracto hidroalcohólico de *L. alba* (cital), obtenido a partir de material vegetal fresco. Véase la identificación en la Tabla 13..... 73
- Figura 24. Espectro de masas obtenidos por UHPLC/ESI^{+/-}-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)]⁺ de mahalebósido [SIM, m/z 325, HCD; 50 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco. Véase Tabla 13. 76
- Figura 25. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI^{+/-}-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)]⁺ de tricina-glucurónido [SIM, m/z 507, HCD; 20 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco. Véase Tabla 12. 77
- Figura 26. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI^{+/-}-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)]⁺ de 3,7-dimetilquercetina [SIM, m/z 331, HCD; 50 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco. Véase Tabla 13. 78
- Figura 27. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (*full scan*) del aceite esencial de *Turnera diffusa*. Columna DB-5MS (60 m), inyección *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los compuestos en la Tabla 10. 83
- Figura 28. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción uno (volátil) del AE de *T. diffusa* Columna DB-5MS (60 m), inyección *split* 1:30. Véase la identificación de los picos en la Tabla 11.....87

Figura 29. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción dos (pesada) del AE de *T. diffusa*. Columna DB-5MS (60 m), inyección *split* 1:30. Véase la identificación de los picos en la Tabla

11.....87

Figura 30. Variación en la composición química y las fracciones del extracto hidroalcohólico de la especie vegetal *L. alba* 89

Figura 31. Espectros UV obtenidos a $\lambda = 290$ nm. **A.** Espectro UV del extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*. **B.** Comparación de los espectros UV del extracto hidroalcohólico de *T. diffusa* y de la sustancia de referencia apigenina. max: Máximo h: Hombro. 94

Figura 32. Variación en la composición química y las fracciones del extracto hidroalcohólico de la especie vegetal *T. diffusa*. 95

Figura 33. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD del extracto HA de material vegetal bajo estudio de *T. diffusa*. Columna GEMINI C₁₈. ISTD: salvigenina, 30 mg..... 96

Figura 34. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos bajo estudio de *T. diffusa*. **A.** Fracción 1; **B.** Fracción 2; **C.** Fracción 3; **D.** Fracción 4. Columna GEMINI C₁₈. ISTD: salvigenina 30 mg/L. La identificación se muestra en el Anexo 47. 97

Figura 35. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos bajo estudio de *T. diffusa*. **E.** Fracción 5; **F.** Fracción 6; **G.** Fracción 7; **H.** Fracción 8. Columna GEMINI C₁₈. ISTD: salvigenina 30 mg/L. La identificación se muestra en el Anexo 47. 98

Figura 36. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD del extracto HA de material vegetal bajo estudio de *T. diffusa*. Columna GEMINI C₁₈. ISTD: salvigenina, 30 ppm..... 99

- Figura 37. Corrientes iónicas extraídas por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*^{+/-}/HRSM, obtenidas en modo *SIM*, de moléculas protonadas $[M+H]^+$, presentes en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenidos a partir de material vegetal fresco. Véase la identificación de los compuestos en la Tabla 18..... 100
- Figura 38. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI^{+/-}-*Orbitrap*-MS de las moléculas protonadas $[(M+H)]^+$ de un isómero de apigenina-O-glucósido, [SIM, *m/z*: 433, HCD; 10 eV]. **A.** Presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. Véase Tabla 21.....103
- Figura 39. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI^{+/-}-*Orbitrap*-MS de las moléculas protonadas $[(M+H)]^+$ de sakuranetina [SIM, *m/z*: 287, HCD; 70 eV]. **A.** Presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. Véase Tabla 21. 104
- Figura 40. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI^{+/-}-*Orbitrap*-MS de las moléculas protonadas $[(M+H)]^+$ de crisoeriol [SIM, *m/z*: 301, HCD; 50 eV]. **A.** Presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. Véase Tabla 21. 105
- Figura 41. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI+/-*Orbitrap*-MS de las moléculas protonadas $[(M+H)]^+$ de acetina metilada [SIM, *m/z*: 299, HCD; 50 eV]. **A.** Presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. Véase Tabla 21.... 106
- Figura 42. Curva de calibración usando Trolox® para cuantificar la actividad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺..... 110

Lista de anexos

Anexos A. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (<i>full scan</i>) del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral. Columna DB-WAX (60 m), inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación en la Tabla 8	131
Anexos B Identificación mediante HPLC-DAD de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico y las fracciones de la especie vegetal <i>L. alba</i>	132
Anexos C Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} - <i>Orbitrap</i> -MS de las moléculas deprotonadas [(M-H)] ⁻ de luteolina-7-glucósido [SIM, <i>m/z</i> 447, HCD; 20 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>L. alba</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, luteolina-7-glucósido. Véase Tabla 13.	135
Anexos D Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} - <i>Orbitrap</i> -MS de las moléculas protonadas [(M+H)] ⁺ de apigenina-7-glucurónido [SIM, <i>m/z</i> 447, HCD; 20 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>L. alba</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, apigenina-7-glucurónido. Véase Tabla 13.	136
Anexos E. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} - <i>Orbitrap</i> -MS de las moléculas deprotonadas [(M-H)] ⁻ de naringenina [SIM, <i>m/z</i> 271, HCD; 50 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>L. alba</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, naringenina. Véase Tabla 13.....	137
Anexos F. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} - <i>Orbitrap</i> -MS de las moléculas protonadas [(M+H)] ⁺ de luteolina [SIM, <i>m/z</i> : 287, HCD; 70 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>L. alba</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, luteolina. Véase Tabla 13.....	138

Anexos G. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ⁺ -Orbitrap-MS de las moléculas deprotonadas [(M-H)] ⁻ de pinocembrina [SIM, <i>m/z</i> : 255, HCD; 40 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>L. alba</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, pinocembrina. Véase Tabla 13.....	139
Anexos H. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} -Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)] ⁺ de acetina [SIM, <i>m/z</i> : 285, HCD; 50 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>L. alba</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, acetina. Véase Tabla 13.....	140
Anexos I. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} -Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)] ⁺ de apigenina [SIM, <i>m/z</i> 271, HCD; 60 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>L. alba</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, apigenina. Véase Tabla 13.....	141
Anexos J. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (<i>full scan</i>) del aceite esencial de <i>Turnera diffusa</i> . Columna DB-WAX (60 m), inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los compuestos en la Tabla 16.	142
Anexos K. Identificación mediante HPLC-DAD de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico y las fracciones de la especie vegetal <i>L. alba</i>	143
Anexos L. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} -Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)] ⁺ de eriodictiol [SIM, <i>m/z</i> : 289, HCD; 20 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>T. diffusa</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, eriodictiol. Véase Tabla 21.	147

Anexos M. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} -Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)] ⁺ de vitexina [SIM, <i>m/z</i> : 433, HCD; 30 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>T. diffusa</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, vitexina. Véase Tabla 21.....	148
Anexos N. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} -Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)] ⁺ de luteolina-7- <i>O</i> -glucósido [SIM, <i>m/z</i> : 449, HCD; 30 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>T. diffusa</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, luteolina-7- <i>O</i> -glucósido. Véase Tabla 21.	149
Anexos O. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} -Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)] ⁺ de apigenina-7- <i>O</i> -glucósido [SIM, <i>m/z</i> : 433, HCD; 20 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>T. diffusa</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, apigenina-7- <i>O</i> -glucósido. Véase Tabla 21.....	150
Anexos P. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} -Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)] ⁺ de naringenina [SIM, <i>m/z</i> : 273, HCD; 50 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>T. diffusa</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, naringenina. Véase Tabla 21.....	151
Anexos Q. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} -Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)] ⁺ de apigenina [SIM, <i>m/z</i> : 271, HCD; 70 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de <i>T. diffusa</i> , obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, apigenina. Véase Tabla 21.	152
Anexos R. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI ^{+/-} -Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)] ⁺ de acetina [SIM, <i>m/z</i> : 285, HCD; 50 eV]. A. Presente en el extracto	

hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, acacetina. Véase Tabla 21..... 153

Glosario

ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) [ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)].

AE: aceite esencial

BHT: butilhidroxitolueno.

CENIVAM: Centro Nacional de Investigaciones para la Agro-industrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales

CIBIMOL: Centro de Investigación en Biomoléculas.

d.i.: diámetro interno.

DAD: diode array detector (detector de arreglos de diodos).

df: espesor de la fase estacionaria.

ESI: electrospray ionitation (ionización por electronebulización).

EE. UU: Estados Unidos

eV: electrón-vóltio.

FID: flame ionization detector (detector de ionización de llama).

GC: gas chromatography (Cromatografía de gases).

HCD: higher-energy collision dissociation cell (celda de disociación de alta energía).

HPLC: high-performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficiencia).

HRMS: high-resolution mass spectrometry (espectrometría de masas de alta resolución).

IRL: Índice(s) de retención lineal(es).

LC: liquid chromatography (cromatografía líquida).

ISTD: internal standard (estándar interno).

***m/z*:** relación masa/carga.

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

***t_R*:** tiempo de retención.

UHPLC: ultra-high performance liquid chromatography (cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia).

UV: ultravioleta.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Elena Stashenko y Jairo Martínez por la asesoría y acompañamiento durante la formulación, desarrollo y conclusión del trabajo de Investigación. Al laboratorio Crom-mass por el soporte instrumental y el acompañamiento técnico. Al personal de Grupo de investigación CIBIMOL por el acompañamiento técnico.

A Minciencias, Mineducación, Mincomercio e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018.

Programa Bio-Reto XXI-15:50.

RESUMEN

TITULO: Caracterización química y fraccionamiento de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos obtenidos de *Lippia alba* y *Turnera diffusa*.

Palabras clave: Aceite esencial, Extracto vegetal

AUTOR: Cesar Alberto GARCIA QUINTERO

En este trabajo de investigación se destiló el aceite esencial y se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos de *Lippia alba* y *Turnera diffusa*, especies aromáticas y medicinales nativas de centro y sur América (Szewczyk, K y col. 2014), con el fin de determinar la variación de la actividad antioxidante por el método de cation-radical ABTS⁺ al enriquecerse los AE y extractos hidroalcohólicos en compuestos de interés por medio destilación en columna rotatoria, UHPLC- preparativo y fraccionamiento en columna abierta (técnicas de fraccionamiento).

La caracterización de los AE, extractos vegetales y las fracciones se realizó usando las técnicas cromatográficas GC-MS, GC-FID, HPLC-DAD y UHPL-ESI-Orbitrap/MS. Se observó que en el AE de *L. alba* las fracciones obtenidas a temperaturas (T_1) mayores que 77 °C, enriquecidas en monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos presentan un aumento en la actividad antioxidante, en el AE destilado la especie vegetal *T. diffusa* se observó que la fracción volátil obtenida a T_1 menores de 49°C presentaba un aumento en la actividad antioxidante respecto al AE previo al fraccionamiento, Las fracciones del extracto de *T. diffusa* de mayor polaridad, presentaron la mayor actividad antioxidante. Las fracciones del extracto de *L. alba* de menor polaridad, obtenidas los solventes diclorometano/metanol presentaron la mayor actividad antioxidante, se demostró que, al enriquecer, mediante técnicas de fraccionamiento, los AE y extractos hidroalcohólicos de las especies bajo estudio, se genera una variación en la actividad antioxidante. Estos resultados muestran que las especies *L. alba* y *T. diffusa* son fuente importante de moléculas bioactivas, que podrían ser aprovechadas por las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos; lo que podría beneficiar al sector agropecuario colombiano, promoviendo el cultivo de plantas aromáticas.

Abstract

TITLE: Chemical characterization and fractionation of essential oils and hydroalcoholic extracts obtained from *Lippia alba* and *Turnera diffusa*.

Keywords: Essential oil, Plant extract

AUTHOR: César Alberto GARCÍA QUINTERO

In this research work, the essential oil was distilled and the hydroalcoholic extracts of *Lippia alba* and *Turnera diffusa*, aromatic and medicinal species native to Central and South America, were found (Szewczyk, k et al. 2014), in order to determine the variation of antioxidant activity by the ABTS+ cation-radical method. when the EO and hydroalcoholic extracts are enriched in compounds of interest by rotary column distillation, UHLPLC-preparative and open column fractionation (fractionation techniques).

The characterization of the EOs, plant extracts and fractions was carried out using the chromatographic techniques GC-MS, GC-FID, HPLC-DAD and UHPL-ESI-Orbitrap/MS. It is observed that in the AE of *L. alba* the fractions obtained at temperatures (T1) higher than 77 °C, enriched in oxygenated monoterpenes and sesquiterpenes present an increase in antioxidant activity, in the distilled AE the plant species *T. diffusa* is used that the volatile fraction obtained at T1 less than 49°C presented an increase in antioxidant activity with respect to the AE prior to fractionation. The fractions of the *T. diffusa* extract with the highest polarity presented the highest antioxidant activity. The fractions of the *L. alba* extract of less polarity, obtained the dichloromethane/methanol solvents, appeared the highest antioxidant activity, it is highlighted that, by enriching, by means of fractionation techniques, the EOs and hydroalcoholic extracts of the species under study, a variation in antioxidant activity. These results show that the species *L. alba* and *T. diffusa* are important sources of bioactive molecules, which could be used by the pharmaceutical, cosmetic and food industries; which could benefit the Colombian agricultural sector, promoting the cultivation of aromatic plants.

Introducción

Uno de los métodos más antiguos y comunes que el ser humano ha usado para aprovechar los recursos naturales, es a través del material vegetal empleado para el tratamiento de algunos problemas de salud. El uso de las plantas en la medicina tradicional ha pasado de generación en generación, hasta ocupar un lugar importante en la actualidad (Sierra M y col., 2018). La razón por la que las plantas tienen efectos biológicos sobre otros organismos es la presencia de metabolitos primarios y secundarios que actúan para garantizar tanto funciones básicas para su supervivencia, e.g., respiración y reproducción, como las interacciones con el medio que las rodea (Demain, A y Colmillo, A y col., 2000).

El interés en comprender el mecanismo por el que las plantas tienen propiedades biológicas ha impulsado el desarrollo de estudios enfocados en analizar sus metabolitos secundarios (Demain, A y Colmillo, A y col., 2000), para esto, es necesario someter la planta a procesos destilativos y de extractivos, que permiten la obtención de aceites esenciales (AE) y extractos vegetales, respectivamente (Sierra M y col., 2018). Sin embargo, la composición química compleja de algunos AE y extractos dificulta su análisis y la obtención de resultados concluyentes; para solucionar este problema se usan técnicas de fraccionamiento, en las que una mezcla compleja de metabolitos secundarios se separa en dos o más fracciones sencillas (Iribarren A y col., 2005).

El fraccionamiento permite separar los compuestos presentes en la muestra, diferenciados por las propiedades que estos poseen; esta diferenciación química se refleja en la actividad biológica expresada (Iribarren A y col., 2005). Una de las propiedades más interesantes de los metabolitos secundarios presentes en las plantas, es su actividad antioxidante, relacionada con la

disminución de probabilidad de padecer arteroesclerosis, cáncer, hipertensión arterial, entre otras enfermedades inducidas por el exceso de radicales libres en el organismo (Priscilla M y col., 2000). *Lippia alba* y *Turnera diffusa*, son especies aromáticas y promisorias de la flora colombiana, con estudios reportados sobre la actividad antioxidante de sus aceites y extractos vegetales (Stashenko, E., y col., 2014, Pérez, M., y col., 2008).

Con este trabajo de investigación se demostró que, al enriquecer en compuestos de interés, mediante técnicas de fraccionamiento, los AE y extractos hidroalcohólicos de las especies bajo estudio, se producen variaciones en la actividad antioxidante. Estos resultados demuestran que las especies *L. alba* y *T. diffusa* son fuente importante de moléculas bioactivas, que podrían ser aprovechadas por las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos; lo que podría beneficiar al sector agropecuario colombiano, promoviendo el cultivo de plantas aromáticas.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar los cambios en la actividad antioxidante de las especies aromáticas y promisorias *L. alba* y *T. diffusa*, al enriquecer sus aceites esenciales y extractos con metabolitos secundarios de interés, mediante técnicas de fraccionamiento, y generar alternativas que fortalezcan la bioeconomía colombiana.

Objetivos Específicos

Implementar el proceso de enriquecimiento de los extractos vegetales y aceites esenciales, usando el fraccionamiento, para obtener mezclas con alto contenido en componentes con actividad antioxidante.

Evaluar la composición química de los aceites esenciales, extractos y fracciones, de *Lippia alba* y *Turnera diffusa*, por técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas.

Observar y estudiar los cambios en la actividad antioxidante de los extractos vegetales y aceites esenciales de *Lippia alba*, *Turnera diffusa* y sus respectivas fracciones, mediante el ensayo del catión-radical ABTS⁺

1. Marco referencial

1.1 Marco de antecedentes.

En una revisión sobre las investigaciones realizadas sobre los aceites esenciales y extractos vegetales de las plantas, *Lippia alba* y *Turnera diffusa*, se observó un interés creciente en los estudios sobre estas especies, especialmente, en las áreas farmacéutica, biológica y agropecuaria.

Para la revisión de los antecedentes bibliográficos sobre *Lippia alba* se empleó la base de datos *Scopus* (*Elsevier*), usando las ecuaciones de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY* ("*Lippia alba*") *AND* (**extract**) y *TITLE-ABS-KEY* ("*Lippia alba*") *AND* ("**essential oil**"), como resultado se observó que en los años 2002-2021, el número de publicaciones sobre extractos vegetales y aceites esenciales es 78 y 372 respectivamente (la cantidad de publicaciones, en periodos de tres años, pueden verse en la **Tabla 1**). Países con alto número de publicaciones, como Brasil (239), Colombia (60) e India (20), enfocaron sus estudios, en gran medida, en las áreas de farmacología-toxicología, fabricación de medicamentos y ciencias agrícolas-biológicas, con artículos enfocados en el sector salud, como se aprecia en estudios contra el cáncer (Sulaiman, K., y col. 2020), extractos con actividad antiviral y antibacteriana (Rao, S. 2018, Coronado, A. y col. 2016), efecto contra infecciones respiratorias (Lemos, I., y col. 2016) y los AE como anestésicos y antihelmínticos (Morales, G., y col. 2021 Días, M., y col. 2021), Véase **Tabla2**.

Para complementar esta revisión bibliográfica, se realizó una búsqueda enfocada en la actividad antioxidante, con la ecuación *TITLE-ABS-KEY* ("*Lippia alba extract*") *AND* (**antioxidant**) y *TITLE-ABS-KEY* ("*Lippia alba essential oil*") *AND* (**antioxidant**), se observa que el número de publicaciones sobre extractos vegetales y aceites esenciales con actividad

antioxidante durante los años 2002-2021 ha sido de 23 y 30, respectivamente. Finalmente, al indagar sobre investigaciones relacionadas con el fraccionamiento de *L. alba*, con actividad antioxidante, se encontró solo una publicación (Beatriz, E., y col. 2019) para aceite esencial y ninguna para el extracto vegetal. Se puede concluir que el estudio sobre las actividades biológicas de las fracciones de aceites esenciales y extractos vegetales, hasta la fecha ha sido escaso.

Tabla 1. Publicaciones sobre la especie *L. alba*, agrupadas en periodos de tres años.

Ecuación de búsqueda	N° de registros, periodo					Total
	2002-2005	2006-2009	2010-2013	2014-2017	2018-2021	2002-2021
<i>Extract</i>	16	16	14	14	18	78
<i>Extract AND antioxidant</i>	5	3	4	2	8	23
<i>L. alba Essential oil</i>	60	90	69	68	85	372
<i>Essential oil AND antioxidant</i>	2	2	7	5	14	30

Fuente: Scopus (*Elsevier*). Periodo de observación 2002-2021. Fecha de consulta 14-02-2022.

Ecuaciones de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (“Lippia alba”) AND (extract)*, *TITLE-ABS-KEY (“Lippia alba extract”) AND (antioxidant)*, *TITLE-ABS-KEY (“Lippia alba”) AND (“essential oil”)*, *TITLE-ABS-KEY (“Lippia alba essential oil”) AND (antioxidant)*.

Tabla 2. países y áreas de estudio con mayor número de publicaciones sobre AE y extractos vegetales de *L. alba*, durante los años 2002-2021.

Ecuación de búsqueda	N° total de registros (2002-2021)	Países	Áreas de estudio
<i>Extract</i>	78	Brasil (51) India (10) Argentina (8)	Farmacología y toxicología (45%) Fabricación de medicamentos (23%) Ciencias agrícolas-biológicas (18%)
<i>Extract AND Antioxidant</i>	22	Brasil (13) Colombia (5) Francia (3)	Farmacología y toxicología (21%) Fabricación de medicamentos (21%) Ciencias agrícolas-biológicas (14%)
<i>L. alba Essential oil</i>	327	Brasil (188) Colombia (50) India (20)	Ciencias agrícolas y biológicas (34%) Farmacología y toxicología (19%) Toxicología (13%)
<i>Essential oil AND antioxidant</i>	20	Brasil (19) Colombia (8) Alemania (3)	Ciencias agrícolas y biológicas (40%) Farmacología y toxicología (20%) Química (18%)

Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Fecha de consulta 14-02-2022. Ecuaciones de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY ("Lippia alba") AND (extract)*, *TITLE-ABS-KEY ("Lippia alba extract") AND (antioxidant)*, *TITLE-ABS-KEY ("Lippia alba") AND ("essential oil")*, *TITLE-ABS-KEY ("Lippia alba essential oil") AND (antioxidant)*.

Con el objetivo de conocer el marco de antecedentes de las investigaciones realizadas sobre la especie aromática y promisorio *Turnera diffusa*, se empleó la base de datos *Scopus* (*Elsevier*), usando las siguientes ecuaciones de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY* ("*Turnera diffusa*") *AND* (**extract**) y *TITLE-ABS-KEY* ("*Turnera diffusa*") *AND* ("*essential oil*"), en el periodo entre los años 2002-2021, el número de publicaciones sobre extractos vegetales y aceites esenciales fue 93 y 20 respectivamente (la cantidad de publicaciones, en periodos de tres años, pueden verse en la **Tabla 3**). Los países con mayor número de publicaciones fueron México (21), Brasil (15) y Estados Unidos (14), las investigaciones se desarrollaron en las áreas de estudio, farmacología-farmacina, fabricación de medicamentos, bioquímica y química, con estudios enfocados en la prevención de enfermedades y patologías, así como en el uso del extracto de *T. diffusa* para tratar enfermedades neurodegenerativas (Echeverría V y col. 2021), disfunción eréctil (Leisegang K y col. 2021), hepatitis (Montemayor, D y col. 2017) y el uso del AE como antioxidante (Urbizu G y col. 2017), antibacteriano (Barrios S y col. 2021), anti-inflamatorio (Lega A y col. 2020) y antibacteriano *in vitro*, contra cepas de micobacterias tuberculosas (Bueno J y col. 2011), Véase **Tabla 4**.

Al consultar sobre los estudios realizados sobre *T. diffusa*, en la base de datos *Scopus* (*Elsevier*), con la ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY* ("*Turnera diffusa extract*") *AND* (*antioxidant*) y *TITLE-ABS-KEY* ("*Turnera diffusa essential oil*") *AND* (*antioxidant*), se encontraron tres artículos referentes a la actividad antioxidante de extractos y aceites esenciales (véase **Tabla 3**). Finalmente, al enfocar la búsqueda en estudios sobre la actividad antioxidante en fracciones del AE y extractos vegetales de *T. diffusa*, no se encontraron artículos publicados.

Tabla 3. Publicaciones referentes la especie *T. diffusa*, agrupadas en periodos de tres años.

Ecuación de búsqueda	N° de registros, periodo					Total
	2002-2005	2006-2009	2010-2013	2014-2017	2018-2021	
<i>T. diffusa</i> <i>Extract</i>	19	16	23	12	23	93
<i>T. diffusa</i> <i>Extract</i> <i>AND</i> <i>antioxidant</i>	0	0	0	1	2	3
<i>T. diffusa</i> <i>Essential oil</i>	4	3	3	6	4	20
<i>T. diffusa</i> <i>Essential oil</i> <i>AND</i> <i>antioxidant</i>	0	0	0	2	1	3

Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación 2002-2021. Fecha de consulta 19-02-2022.

Ecuaciones de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY ("Turnera diffusa") AND (extract)*, *TITLE-ABS-KEY ("Turnera diffusa extract") AND (antioxidant)*, *TITLE-ABS-KEY ("Turnera diffusa") AND ("essential oil")*, *TITLE-ABS-KEY ("Turnera diffusa essential oil") AND (antioxidant)*

Tabla 4. países y áreas de estudio con mayor número de publicaciones sobre AE y extractos vegetales de *T. diffusa*, durante los años 2002-2021.

Ecuación de búsqueda	N° de publicaciones (2002-2021)	Países	Área de estudio
<i>Extract</i>	93	México (33) EE. UU. (14) Brasil (12)	Farmacología y toxicología (29%) Fabricación de medicamentos (23%) Bioquímica (16%)
<i>Extract AND Antioxidant</i>	3	México (1) Brasil (2)	Farmacología y toxicología (23%), Fabricación de medicamentos (33%) Ciencias agrícolas-biológicas (14%)
<i>T. diffusa</i>			
<i>Essential oil</i>	20	México (6) Colombia (5) Brasil (3)	Farmacología y toxicología (26%) Ciencias agrícolas-biológicas (23%) Fabricación de medicamentos (11%)
<i>Essential oil AND antioxidant</i>	3	México (1) Australia (1) Colombia (1)	Ciencias agrícolas y biológicas (33%) Química (33%) Inmunología y microbiología (33%)

Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación 2002-2021. Fecha de consulta 19-02-2022.

Ecuaciones de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY ("Turnera diffusa") AND (extract)*, *TITLE-ABS-KEY ("Turnera diffusa extract") AND (antioxidant)*, *TITLE-ABS-KEY ("Turnera diffusa") AND ("essential oil")*, *TITLE-ABS-KEY ("Turnera diffusa extract") AND (antioxidant)*.

1.2 Marco teórico

1.2.1 *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson.

Esta planta se conoce con el nombre común "pronto alivio" (**Figura 1**), huele a limón, lima o menta. Se distribuye desde el sur de Texas en los Estados Unidos, México, América Central hasta América del Sur (Ocampo S y col. 2000), crece como arbusto con tallos leñosos y ramas largas, alcanza una altura de hasta 2 m. Sus hojas ovaladas y aromáticas miden de 1 a 3 cm de largo y de 0,9 a 2 cm de ancho. Sus flores suelen poseer tonos blancos, rosas o una coloración azul-purpúrea, en forma de inflorescencia de 2 cm de longitud. Sus frutos miden cerca de 3 mm de largo, en drupa o cápsula seca y tienen un exocarpo membranáceo de color violeta oscuro, que se separa al final en dos nuececillas (Sánchez O y col. 2004). Esta especie se caracteriza por presentar cambios en la composición química de sus aceites esenciales dependiendo del estado de su desarrollo, la parte empleada para la destilación, la ubicación geográfica, las características fisicoquímicas del suelo y del clima (humedad, concentración de oxígeno e intensidad lumínica) donde se desarrolla la planta (Linde G y col. 2016). Esta característica se ve reflejada en diversos estudios sobre la variación en la composición química, así: en el AE de *L. alba*, recolectado en Santander, Colombia, los componentes mayoritarios fueron carvona y limoneno (Agudelo G y col. 2010); linalol fue el compuesto principal en el AE de *L. alba*, destilado en India (Pascual M y col. 2001); β -cariofileno, timol y geranial, en Brasil

(Sobrinho y col. 2021, Trevisan M y col. 2016), linalol, en Uruguay (Lorenzo D y col. 2001), eucaliptol y mircenona, en Ecuador (Rreyes R. y col. 2017).

Los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas están compuestos, principalmente, por monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$) y otros terpenoides (derivados oxigenados: alcoholes, aldehídos y cetonas) (Bagher S y col. 2018), algunos compuestos de esta familia poseen actividad antiviral y antioxidante, como se refleja en los siguientes estudios: *L. alba*, quimiotipo carvona, demostró actividad virucida *in vitro* contra el herpes tipo 1, dengue y fiebre amarilla (Meneses R y col. 2009); además de actividad antioxidante mayor que la de antioxidantes comerciales (BHT y α -tocoferol), medida por el método ORAC (Stashenko, E., y col. 2014), quimiotipos recolectados en Ecuador de *L. alba*, ricos en β -cariofileno y citral, inhibieron la replicación del virus *DENV-2* (Antonio N y col. 2021) y presentaron actividad antioxidante medida por los métodos ABTS⁺⁺ y FRAP (Tubay C. 2018).

Los extractos de *L. alba* varían en su composición, dependiendo del quimiotipo y de la técnica de extracción. Los compuestos mayoritarios y la actividad biológica, según estudios reportados, son los siguientes: extracto etanólico de *L. alba*, quimiotipos citral, carvona y linalol recolectados en Brasil, tienen como componentes mayoritarios, monoterpenos, sesquiterpenos y flavonoides: apigenina-7-*O*-diglucurónido, tricín-7-*O*-diglucurónido y luteolina-7-*O*-glucurónido e iridoides: 8-*epi*-loganina y ácido geniposídico (Timóteo P y col., 2014); en Brasil, se reportaron como componentes mayoritarios en extractos etanólicos ácidos fenólicos y

flavonoides: apigenina, luteonina, naringenina, etc., con actividad antioxidante medida por ensayo DPPH^{*} (Oliveira G y col., 2018). En Ceará, Brasil, en extractos etanólicos de *L. alba* se encontraron actéosido, isoactósido, luteolina, espinacetina y naringenina como componentes mayoritarios con actividad antioxidante, medida usando ensayo ORAC (Pérez M y col., 2008). En extractos etanólicos de *L. alba*, recolectada en Rio Grande, Brasil, se encontraron como componentes mayoritarios apigenina, luteolina, naringenina y rutina, con actividad antioxidante, determinada por el método ORAC (Chies C y col., 2013). En Colombia, los extractos acuosos demostraron actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori* (Henao R y col. 2011) y plaguicida contra *Spodoptera frugiperda* (Figuroa A y col., 2019). Los extractos etanólicos, ricos en luteolina-7-diglucorónido, verbascósido y calceolariósido E, mostraron actividad antioxidante por el ensayo DPPH^{*} (Hennebelle T y col., 2008).



Taxonomía	
Reino	Plantae
Familia	Verbenaceae
Género	<i>Lippia</i>
Especie	<i>alba</i>

Figura 1. Flores de *Lippia alba* (Mill.). Foto tomada por César alberto GARCIA QUINTERO, en el jardín botánico. Un mundo en un Jardín. CIBIMOL-CENIVAM; UIS, Bucaramanga, 5-01-2022.

1.2.2 *Turnera diffusa* Willdenow.

Comúnmente llamada "Damiana" (**Figura 2**), la planta es nativa de México y Centro América (Martinez A y col., 1999), tiene una altura comprendida entre 1 y 2 m, su tallo es ligeramente rojizo, sus hojas son pequeñas, arrugadas, de forma ovalada, generalmente, con 1 o 2 cm de largo y despiden un fuerte olor cuando son apretadas. Sus flores son bisexuales, solitarias, de 2 a 12 mm de largo y cuentan con pétalos amarillo-anaranjados, la planta se usa en la medicina tradicional como expectorante, para tratar el resfriado común, dispepsia, desbalance hormonal, depresión, desórdenes nerviosos, sexuales y menstruales (Szewczyk, k y col., 2014).

En estudios realizados sobre la composición del aceite esencial de *T. diffusa* se encontraron, como componentes principales, drima-7,9-(11)-dieno(22,9%), β -viridifloreno (6,6%) y *trans*- β -cariofileno (5,2%) en Colombia (Ríos N y col. 2017) y óxido de cariofileno (12,6%), cariofileno (5%) y β -elemeno (4%) en México (Alcaraz M y col., 2004). Estos metabolitos secundarios proporcionan actividades biológicas contra el mosquito *Aedes aegypti*, como se aprecia en los estudios de actividades insecticida (Ríos N y col. 2017) y antiviral (Castro N y col., 2015 y Mora L y col., 2016). También, se ha evaluado su actividad antioxidante por el ensayo de decoloración del catión radical ABTS⁺ (Urbizu G A y col., 2017).

Debido a las diferencias edafoclimáticas entre regiones, la composición química de los extractos de *T. diffusa* varía dependiendo de su ubicación, en el extracto de *T. diffusa* obtenido de plantas cosechadas en Ciudad de México y Nuevo León se reportaron los componentes mayoritarios pinocembrina, *cis*-echinacina, apigenina y arbutina (Avelino F y col. 2015) y 8-C [6-deoxi-2-O-(α -L-ramnopiranosil)-xilo-hexopiranos-3-ulósido] y luteolina, respectivamente (Pérez M y col. 2008).

Se han evaluado diferentes actividades biológicas en estos extractos, como se observa en los estudios sobre la actividad estrogénica (Zhao J y col. 2008), citotóxica en algunas líneas celulares de cáncer (Belmares C y col., 2013); antioxidante en tallos, raíces, frutos y flores, medida por el ensayo de decoloración de radical ABTS⁺ (Chai T y col. 2012) y en la planta entera, por el método de captura del radical DPPH[•] en trabajos realizados por Wong, J. E., y col en 2014 y 2015, Salazar R y col, 2008 y Soriano L, 2013



Taxonomía

Reino	Plantae
Familia	Turneraceae
Género	<i>Turnera</i>
Especie	<i>diffusa</i>

Figura 2. Flor de la planta de *Turnera diffusa* Willdenow. Foto tomada por César alberto GARCIA QUINTERO, en el jardín botánico. Un mundo en un Jardín. CIBIMOL, CENIVAM; UIS, Bucaramanga, 12-10-2021.

1.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas, líquidas y volátiles que contienen una gran variedad de componentes, en su mayoría, compuestos de bajo peso molecular, de tipo monoterpeno, sesquiterpeno y fenilpropanoide. Suelen tener propiedades aromáticas agradables al olfato y olores característicos de la especie vegetal de la cual fueron destilados. Una gran variedad de especies, en su mayoría pertenecientes a las familias labiadas, lauráceas, mirtáceas, rosáceas, rutáceas, umbelíferas y pináceas, contienen aceites esenciales (Bakkali, F y col., 2008). Los AE son ampliamente estudiados debido a sus variados usos en las industrias, cosmética

(perfumes y aromatizantes), alimentaria (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (Stashenko, E., 2009).

1.3.1 *Terpenos.*

Son una clase de compuestos orgánicos originados por la unión de dos o más unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (**Figura 3**). Estos compuestos, que pueden sufrir variaciones gracias a las diferentes rutas biosintéticas de su origen, al agregar átomos o modificar su estructura, reciben el nombre de terpenoides. Los terpenoides se clasifican en hemiterpenoides, monoterpénoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, triterpenoides, tetraterpenoides y meroterpenoides dependiendo del número de carbonos en su estructura (Croteau R y col., 2000). Cada grupo de terpenos exhibe diferentes actividades biológicas en animales, macroorganismos, plantas y humanos entre las que encontramos actividades antiviral y antimicrobiana. Estas características se generan por una compleja organización en la biosíntesis de los terpenoides a nivel celular, subcelular, en tejido y genético (Judd W y col., 1999).

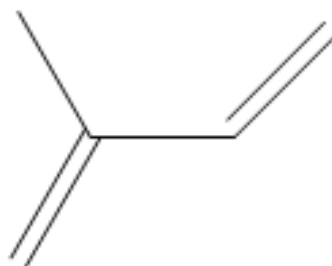


Figura 3. Estructura del isopreno.

1.3.2 Destilación con arrastre con vapor.

Este proceso se utiliza para la obtención de aceites esenciales. Consiste en pasar vapor de agua a través del material vegetal encerrado en un alambique. El vapor penetra el material vegetal, rompiendo las células y arrastrando los metabolitos secundarios volátiles que posteriormente se condensan al entrar en contacto con un refrigerante. Debido a que los compuestos volátiles son más ligeros y tienen densidades diferentes al agua, es posible hacer una separación por decantación (Sánchez M y col., 2006). Otras técnicas ampliamente utilizadas para la obtención de aceites esenciales son: la destilación con agua-vapor, en esta, el vapor de agua penetra el material vegetal suspendido sobre una malla para extraer los metabolitos secundarios y la hidrodestilación, cuando el material vegetal se sumerge en agua que se lleva al punto de ebullición; esta última técnica, es útil para destilar material vegetal delicado como hojas y flores (Sánchez M y col., 2006).

1.3.3 Destilación fraccionada.

La destilación fraccionada es una técnica de separación en la que se ponen en contacto una fase líquida y una fase vapor que fluyen en contra-corriente para separar mezclas de dos o más sustancias volátiles con puntos de ebullición diferentes. En la columna de destilación ocurren una serie de destilaciones simples que dependen de la presión y de la relación vapor-líquido (Reyes A y col. 1998). Esta técnica se basa en adicionar calor para vaporizar la mezcla. Los vapores, cuando se condensan, forman fracciones con intervalos de ebullición diferentes; posteriormente, el vapor asciende a través de la torre de fraccionamiento, con mayor temperatura que la del líquido que desciende condensado, el contacto entre estos dos hace que el vapor pierda

sus componentes menos volátiles, pero se enriquezca en los más volátiles, esto sucede hasta que se alcanza el equilibrio de fases. En esta técnica, una parte del líquido se obtiene como destilado y otra se devuelve como reflujo formando la fracción con los metabolitos más pesados (Otiniano C y col., 2004). La destilación fraccionada de aceites esenciales debe realizarse a presión reducida, para evitar la degradación química de los compuestos termolábiles, es de alta pureza y tiene baja retención en columna rotatoria. Esta técnica es muy utilizada en la industria de los perfumes, ingredientes naturales y farmacéuticas (Reyes A y col., 1998).

A esta técnica se le acopla una columna rotatoria, que se utiliza para realizar destilaciones al vacío, consiste en el movimiento giratorio realizado por un eje en la parte superior de la columna, este eje genera una mayor interacción entre los líquidos y vapores presentes en la columna por acción de la fuerza centrífuga, generando un gran número de platos teóricos, aislamiento de los analitos de interés, baja caída de presión y automatización del proceso (Zacaria B y col., 2006).

1.4 Extractos vegetales

Son mezclas complejas extraídas directamente de los frutos, hojas, tallos, semillas o raíces de una planta. Los extractos poseen una gran cantidad de componentes que pueden obtenerse mediante procesos físicos, químicos o microbiológicos (Croteau R y col., 2000). Contienen metabolitos, normalmente de baja volatilidad y de mediano o alto peso molecular (>400 Da); entre ellos, figuran los pigmentos, grasas, flavonoides y los alcaloides (Oliveros C y col., 2015). Los extractos se suelen obtener por extracción con disolventes de diferente polaridad, escogidos según la naturaleza química de los metabolitos secundarios que se requieran (*e.g.*, flavonoides, alcaloides, ácidos grasos) (Bandoni A y col., 2000).

1.4.1 Flavonoides.

Son un grupo amplio de compuestos polifenólicos que generalmente se encuentran en forma de glucósidos en el reino vegetal, especialmente, en las plantas vasculares; son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas ya que son los responsables de la resistencia a la fotooxidación y defensa de las plantas contra algunos depredadores (Winkel-Shirley B y col., 2001), estas sustancias se sintetizan mediante la ruta bioquímica del ácido shikímico y la ruta de los policétidos. Son compuestos fenólicos diaril-propánicos que se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C6-C3-C6, los cuales pueden formar o no un tercer anillo (**Figura 4**) (Winkel-Shirley B y col., 2001). Dentro del grupo de los flavonoides se encuentran las chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianinas, taninos y auronas; diferenciados por los grupos funcionales que posean y por la posición en la que se sitúen (Luengo M y col., 2002); los flavonoides tienen múltiples actividades biológicas que los hacen objeto de estudio. Entre las propiedades que se les atribuyen se encuentran capacidades antioxidante, antiviral, anticancerosa, antiinflamatoria y analgésica (Bahor A. y Siddequi, A. 1999).

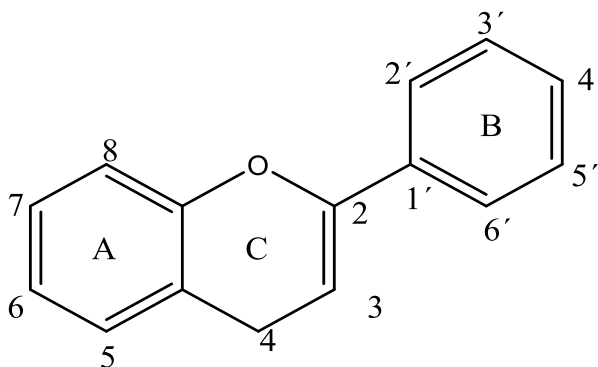


Figura 4. Estructura base de los flavonoides.

1.4.2 Extracción con solvente.

Esta técnica de extracción emplea una fase líquida (alcohol, cloroformo, grasas, aceites o fluidos super críticos) para aislar los metabolitos de la matriz. Posteriormente, estos compuestos de interés se recuperan de la mezcla al remover el disolvente sin afectar la composición (Velasco R y col., 2007). La eficiencia de extracción depende de tres factores, a saber: solubilidad, transferencia de masa y efecto de la matriz. Las principales desventajas de esta técnica son el alto consumo de solventes, prolongado tiempo de extracción y la co-extracción de interferencias (Pan J y col., 2008).

1.4.3 Fraccionamiento de extractos

Cromatografía en columna abierta

Entre las técnicas cromatográficas usadas para el fraccionamiento de extractos se encuentra la cromatografía en columna abierta, este tipo de cromatografía está constituida por la fase estacionaria, generalmente, un sólido poroso que se ubica en el interior de la columna y la fase móvil, que corresponde al solvente que pasa lentamente a través de la columna debido a la acción de la gravedad y la capilaridad sin interactuar con la fase estacionaria. El fraccionamiento se da debido a la diferencia en las interacciones moleculares entre el analito, la fase estacionaria y la fase móvil (es aconsejable también tener en cuenta una lista eluotrópica). Los compuestos que eluyen se recogen en fracciones de pequeños volúmenes para un posterior análisis (Valcárcel C y col., 1994), entre las ventajas de esta técnica de fraccionamiento se destacan el bajo costo y la diferenciación de las fracciones dependiendo de su polaridad (Valcárcer Cases & Gómez Hens, 1998).

Cromatografía líquida de alta eficiencia preparativa (*Prep-HPLC*):

Esta técnica cromatográfica tiene como objetivo el aislamiento de compuestos de interés a partir de muestras complejas (Syukri D y col., 2013) para lograr este objetivo, la muestra atraviesa la columna cromatográfica (en fase normal o reversa), por acción de la fase móvil (Shimadzu, 2020). El volumen de fase móvil usado para esta técnica es alto (5-20 mL/min) y la carga de muestra inyectada en la columna suele ser de hasta 2 g, ya que el objetivo es la recuperación de la mayor cantidad de los componentes purificados, las fracciones recuperadas pueden ser recolectadas individualmente para su posterior análisis. Esta técnica es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica para la separación de compuestos quirales, la purificación de compuestos básicos y la extracción de proteínas recombinantes (Guiochon G y col., 2002).

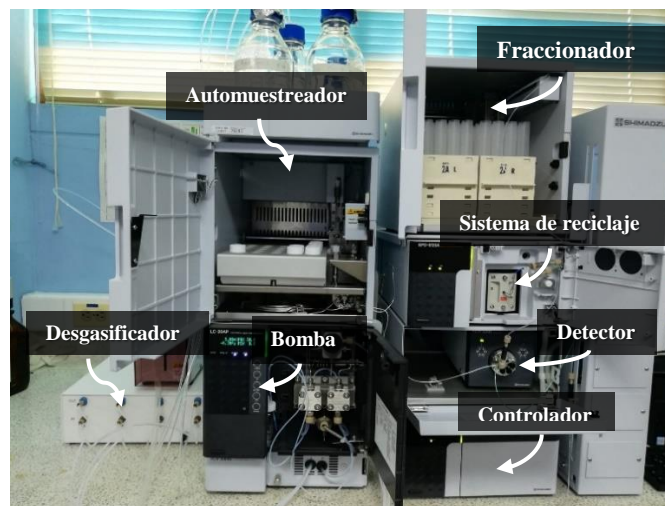


Figura 5. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Prominence (Shimadzu Corporation Kyoto, Japón). Foto tomada por Cesar GARCIA. En el Centro de Investigación CENIVAM, UIS, Bucaramanga, 12-10-22

1.5 Técnicas analíticas.

1.5.1 Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases (GC) tiene su mayor fortaleza en la determinación de cuántos componentes hay en una mezcla y en qué proporción se encuentran; en esta técnica, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de un gas inerte que constituye la fase móvil y la separación ocurre por la diferencia en las interacciones del analito con la fase estacionaria dependiendo de la temperatura. En GC la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, sino que transporta la muestra a través de la columna cromatográfica. Un compuesto puede analizarse por cromatografía de gases si posee la volatilidad, alta termo-estabilidad y peso molecular adecuado (menor de 500 Da). Existen dos tipos generales de cromatografía de gases: cromatografía gas-sólido y cromatografía gas-líquido (Stashenko, E. y Martínez, J. 2009).

1.5.2 Cromatografía líquida.

Esta técnica se basa en el paso de la muestra mediante el flujo de una fase móvil, a través de una fase estacionaria (no miscibles entre si) fijada dentro de una columna cromatográfica (Skoog, 2015). La separación se fundamenta en la diferencia de velocidades de migración que existe entre los analitos que depende de su naturaleza y su interacción con la fase estacionaria. La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es uno de los métodos más utilizados en la industria farmacéutica, bioquímica, alimentos y en los laboratorios forenses, debido a su amplio rango de aplicaciones, alta precisión en los resultados y a que no es una técnica destructiva (Snyder, L y col., 2010). Entre los detectores más comunes para este tipo de cromatografía, se

encuentran UV-Vis, de dispersión de luz (LSD) y acoplamientos con espectrometría de masas (Ospina D y Hernández, Y. col., 2018).

1.6.1 *Detector selectivo de masas*

La espectrometría de masas se basa en la obtención de iones, a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; estos iones se analizan y separan según su relación m/z , para posteriormente ser detectados. Con la técnica cromatográfica acoplada a este detector se puede obtener información sobre las áreas, tiempos de retención y espectros de masas de cada componente en la mezcla que se ioniza con electrones, para la ionización electrónica la energía estándar es de 70 eV y se usa debido a que a esta energía la mayoría de las moléculas orgánicas, no solo se ionizan, sino que también se fragmentan. Una de las principales ventajas de un detector de espectrometría de masas (MS), es la capacidad de operarse usando diferentes modos de adquisición, entre ellos, figuran: universal (*full scan*) y selectivo-específico (*SIM*) (Stashenko, E. y Martínez, J. 2009). Entre las áreas de aplicación típicas de este analizador se encuentran análisis forense, de productos naturales, alimentos y ambiental (Hubschmann H y col., 2009).

1.6.2 *Detector de ionización en llama.*

El detector de ionización en llama (FID) puede considerarse el detector casi universal, ya que solo el agua y los gases permanentes no se detectan, tiene alta sensibilidad (aproximadamente 10^{-13} g/mL), amplio intervalo de respuesta lineal y genera poco ruido (Polo M y col., 2015). Este detector no permite identificar inequívocamente una sustancia problema, ya que no proporciona la "huella digital" dada por un espectro de masas, pero es útil para realizar la cuantificación de los analitos volátiles y termoestables que eluyen de la columna y se descomponen en una llama, formada por una mezcla de hidrógeno-aire. Los intermediarios

iónicos y electrones generados facilitan el paso de corriente eléctrica a través de la llama, las especies cargadas son atraídas por un colector que mide y amplifica la corriente iónica mediante un electrómetro, siendo esta corriente proporcional a la cantidad de grupos hidrocarbonados presentes en la molécula (JOVE, 2022).

1.6.3 Detector con arreglo de diodos

El detector con arreglo de diodos (DAD), para medición de la señal, se basa en un haz de radiación UV-Vis que pasa a través de la celda que contiene una muestra, esta última absorbe radiación dependiendo de los grupos funcionales que posea. Posteriormente, el haz de radiación es dispersado por una rejilla y se enfoca hacia el arreglo de diodos, el cual absorbe la radiación fraccionada mediante una matriz de fotodiodos para su posterior procesamiento (Salvatore F y col., 2017). Las principales ventajas de este detector son su rápida obtención de espectros y la determinación de pureza. El DAD es muy utilizado en las industrias farmacéutica, agropecuaria y en laboratorios forenses, para el análisis en muestras con compuestos orgánicos, cromóforos, polares, semi-volátiles y no volátiles (Skoog, 2015).

1.6.4 Detector de espectrometría de masas Orbitrap.

El analizador de masas *Orbitrap* consta de dos electrodos externos y un electrodo central que tiene la función de analizador y detector, los analitos, previamente separados en la columna cromatográfica, se ionizan y entran tangencialmente al analizador adquiriendo un movimiento radial alrededor del electrodo, combinado con un movimiento axial periódico, cuya frecuencia es una función de su valor m/z , este movimiento se puede imaginar como un hilo cuando es enrollado. Debido a que el electrodo externo está dividido en su centro y perpendicularmente en dos mitades, el movimiento periódico de los paquetes de iones de un lado a otro de la cavidad

induce entre estas dos mitades una señal imagen cuya frecuencia puede medirse para determinar el valor m/z del ion correspondiente (Hu Q y col., 2005). El aplicar a esta señal una transformada de Fourier (FT), permite determinar la frecuencia derivada de cada uno de los iones y reconstruir el espectro de masas (Scigelova, M, y Makarov, A. 2006). Este analizador de masas es muy utilizado en proteómica y la metabolómica ya que ofrece espectros de masas medidos con muy alta resolución.

1.7 Antioxidantes.

Los antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos, son moléculas capaces de captar el electrón desapareado del orbital externo de los radicales libres, permiten disminuir el estrés oxidativo, evitando oxidación de las proteínas, lípidos y el ADN (Sánchez V y col., 2013).

Según el mecanismo de acción los antioxidantes se clasifican en:

Antioxidantes de prevención: Impiden la formación de los radicales libres mediante la descomposición del H_2O_2 (ej. catalasas, peroxidasa, superóxido dismutasa, glutatión, transferrina).

Antioxidantes de eliminación de radicales libres (*scavenger*): Inhiben el inicio de la cadena radicalaria e interrumpen su propagación (vitaminas A, C y E, flavonoides, polifenoles y la coenzima Q_{10}).

Antioxidantes de reparación: Reparar los daños y actúan en la reconstrucción de la membrana, como es el caso de los enzimas de reparación del ADN, proteasas y transferasas (Huet B y col., 2017).

1.7.1 Ensayo de decoloración del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$

Es una técnica espectrofotométrica para la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* que se basa en la medida de la disminución de la absorbancia del cromóforo catión-radical $ABTS^{+\bullet}$, a razón de la reducción producida por la donación de un hidrógeno o electrón de los antioxidantes presentes en la muestra. El catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ es de color verde, estable y absorbe radiación a longitud de onda larga (734 nm), para el ensayo de medición, se produce de la mezcla de $ABTS^{+\bullet}$ [2,2'- azino-bis (3-etil benzotiazolin)-6-sulfonato de amonio] y persulfato de potasio (**Figura 6**) (Shahidi, F y Zhong Y y co., 2015). Para el cálculo de la actividad antioxidante se utiliza la **Ecuación 1** (Re R. y col. 1999).

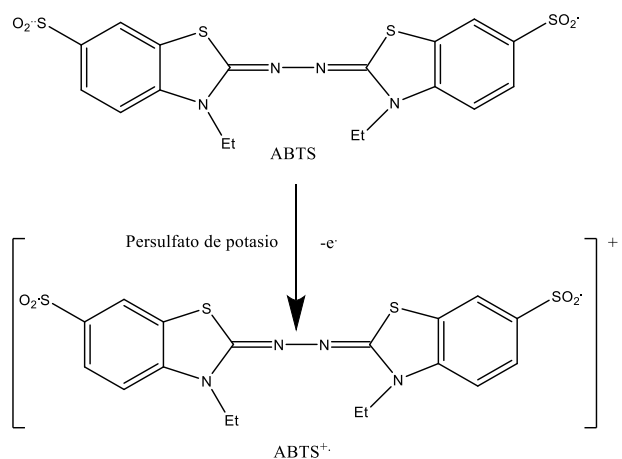


Figura 6. Formación del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ usando el persulfato de potasio (Re, R y col., 1999).

Ecuación 1.

Donde:

A. muestra = Es la absorbancia de la muestra (con el catión-radical presente).

A. blanco = Es la absorbancia del blanco (con metanol adicionado).

A.R = Absorbancia de referencia (que contiene el catión-radical y el solvente de la muestra).

2. Metodología

La metodología desarrollada para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo comprendió la realización de diferentes etapas, a saber: destilación y extracción del material vegetal, fraccionamiento, caracterización y evaluación de la capacidad antioxidante de los AE y extractos obtenidos de *L. alba* y *T. diffusa*.

2.1. Recolección de material vegetal

El material vegetal (MV) de las especies vegetales *L. alba* y *T. diffusa*, fue cultivado en las parcelas experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM-UIS sede Barbosa y recolectado en celebración del contrato de acceso de recursos genéticos 270. El MV se encontraba en estado de floración y para la realización del proyecto, se usaron las partes aéreas del MV fresco. El material vegetal utilizado fue proveído por el Estado Colombiano a través del Contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados N° 270" firmado entre la Universidad Industrial de Santander y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

2.2 Destilación de los aceites esenciales.

Siguiendo la metodología planteada por Cuadros A y col. en 2007, el material vegetal se cosechó, se picó e introdujo en un alambique de 2 m³, a una presión de 10,7 kPa y flujo de 800mL/min. La duración del proceso de destilación por arrastre con vapor fue de dos horas. El AE se recogió por decantación en un vaso florentino de acero inoxidable y la humedad se eliminó agregando sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄). La destilación se realizó para la obtención del AE de las especies vegetales *L. alba* y *T. diffusa* en fresco a partir de las partes aéreas de la planta. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en frascos ámbar, protegidos de la luz, a una temperatura de 4 °C.



Figura 7. Montaje experimental para la obtención de los AE (alambique, condensador). Foto tomada por el autor Cesar Alberto Garcia Q. Fecha: septiembre 18 de 2021. Lugar: CENIVAM, UIS, Bucaramanga.

2.2.1 Fraccionamiento de los aceites esenciales.

Para el fraccionamiento del AE se usó un equipo de micro destilación fraccionada a presión reducida con columna rotatoria (*BR-instrument 800-High Efficiency Micro Destillation*). (véase **Figura 8**).

Se depositaron 20 g del AE de *L. alba* y 10 g *T. diffusa* en un balón de 15 mL. Una vez el montaje estuvo asegurado, se encendió la bomba de vacío, la plancha de calentamiento y se verificaron las condiciones experimentales expuestas en la **Tabla 5**, se midieron las temperaturas de tope (T_1) y de fondo (T_2), cada cuatro segundos con el fin de identificar la formación del equilibrio térmico en la columna. Posteriormente, al observarse la primera gota de destilado, se encendió la banda rotatoria para mejorar el contacto entre las fases líquida y vapor del AE, el equilibrio líquido-vapor se reconoció cuando T_1 y T_2 fueron constantes durante 30 s, en ese punto se recolectaron las fracciones en viales de 2 mL, hasta que T_2 tuvo una variación mayor que 10 °C, luego de esto, se cerró la válvula y se esperó un nuevo equilibrio líquido-vapor (Rueda S y col., 2012). Las fracciones recolectadas se almacenaron en viales de 2 mL y se prepararon para su análisis por GC/MS y GC/FID.

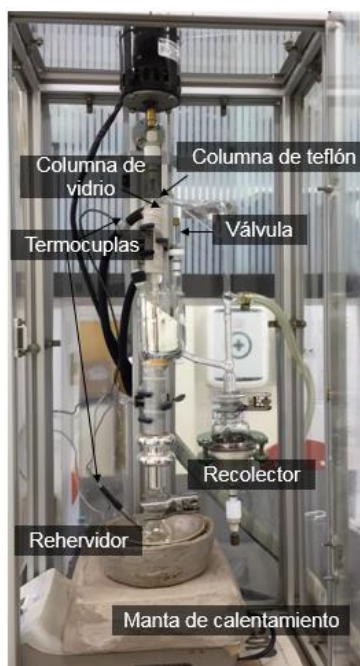


Figura 8. Equipo de destilación fraccionada *BR-instrument 800-High Efficiency Micro Distillation*. Foto tomada por el autor Cesar Alberto Garcia Q. Fecha: septiembre 20 de 2021. Lugar: CENIVAM, UIS, Bucaramanga.

Tabla 5. Condiciones de presión y temperatura para el fraccionamiento de los aceites esenciales de *L. alba* y *T. diffusa*.

Aceite esencial	Fracción	T ₁ (°C)	T ₂ (°C)	Presión (Torr)	Temperatura del baño de enfriamiento (°C)
<i>L. alba</i>	F ₁	49-61	110-115	6	-2
	F ₂	62-70	117-118		
	F ₃	77-89	119-121		
	F _F	-	-		
<i>T. diffusa</i>	F ₁	49-55	129-140	7	
	F ₂	-	-		

F: fracción, **T₁:** Temperatura de tope, **T₂:** Temperatura de fondo.

2.2.2 Caracterización de aceites esenciales y sus fracciones.

La caracterización de los aceites esenciales y sus fracciones, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* (AT) 7890A (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (AT) *MSD 5975C Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación *split* 1:30) y un inyector automático *Agilent Technologies 7893*. Se emplearon dos columnas; una columna apolar DB-5MS (*J&W, Scientific, Folsom, CA, EE. UU.*) con fase estacionaria 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25, m, d_f; y una columna polar DB-WAX (*J&W, Scientific, Folsom, CA, EE. UU.*), con fase estacionaria polietilenlicol de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25, m, d_f. Como criterios de identificación se usaron los índices de retención lineales (IRL), calculados a partir de una mezcla de *n*-parafinas, C₆-C₂₅, comparación de los espectros de masas obtenidos por ionización con electrones de 70 eV con los de las bases de datos Wiley, Adams y NIST, y comparación con sustancias de referencia disponibles.

Para la determinar la variación de los componentes en las fracciones destiladas, se aforo una solución de 10 mg de *n*-tetradecano (estándar interno) con 10 mL de diclorometano (1000 mg/mL), con esta solución se prepararon alícuotas de 10 mg de AE en 1 mL de solución *stock* y se agito durante 5 min en un vórtice *CLAY ADAMS*. Las muestras se inyectaron a un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890A* (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.) con una columna apolar DB-5MS (*J&W, Scientific, Folsom, CA, EE. UU.*) con fase estacionaria 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 m, d_f, equipado con un puerto de inyección

split/splitless (250 °C, relación *split* 1:30) con inyector automático AT 7893, acoplado a un detector con ionización en llama (FID). Los datos fueron adquiridos y procesados con el sistema de datos. *HPChemstation (Rev. B.03.02)* (Molina M y col., 2011)



Figura 9. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies (AT) 7890A*. Foto tomada por el autor.

Fecha: octubre 12 de 2022. Lugar: CENIVAM, UIS, Bucaramanga

2.3 Extractos hidroalcohólicos.

Para la obtención de los extractos se agregaron 1.5 Kg de material vegetal fresco y picado (*L. alba* y *T. diffusa*) en una marmita de acero inoxidable con chaqueta de calentamiento con control de temperatura y capacidad de 20L, usando las condiciones reportadas en la **Tabla 6**. Posteriormente, se recogió el extracto hidroalcohólico, se filtró y almaceno en frascos de 3L; el exceso de disolvente se removió a presión reducida a 30 °C en un rotoevaporador *Heidolph (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania)*. El extracto resultante libre de solvente orgánico se liofilizó en un equipo *Virtis Advance Plus (SP Scientific, New York, EE. UU.)* para eliminar el agua residual.

Tabla 6. Condiciones para la obtención de extractos hidroalcohólicos de *L.alba* y *T. diffusa* en marmita.

Cantidad de MV	1,5 kg	Volumen de solvente	15 L
Agente extractor	Etanol / agua (70:30)	Concentración de etanol (%)	96
MV/Solvente	1 kg /10 L	Tiempo de extracción	4 h

MV: material vegetal.

2.3.1 Fraccionamiento de los extractos.

Para el fraccionamiento del extracto hidroalcohólico obtenido de partes aéreas de *L. alba*, se agregaron 1,04 g de extracto en un falcón de 50 mL y se adicionaron 26 mL de solución metanol grado HPLC/agua tipo I (50/50), se empleó un cromatógrafo líquido preparativo Prominence (Shimadzu Corporation Kyoto, Japón) con detector de arreglo de fotodiodos SPD-M20A, bomba cuaternaria LC-20AP, inyector automático SIL-10AP, válvula de reciclaje FCV-12AH y fraccionador FRC-10A, con columna cromatográfica fase reversa Shim-Pack GIST C₁₈ (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) de 250 mm L x 20 mm D.I. x 5 µm de tamaño de partícula, con gradiente de elución binario (A) agua tipo I y (B) metanol grado HPLC, programado así: 30% B (0 min), 30%-100% B (0-30 min), 100% B (30-40 min). Como criterio de fraccionamiento se realizó un análisis de prueba HPLC/DAD y se eligieron los intervalos de t_R de mayor absorbancia a $\lambda=290\text{nm}$, $\lambda=240\text{ nm}$, 270 nm, 290 nm, 310 nm, 330 nm y 350 nm. Este procedimiento se realizó tres veces y el procesamiento de los datos se realizó en el *software LabSolutionsTM* versión 5.97. Esta técnica es una forma eficaz de eliminar impurezas y

concentrar extractos, mediante la separación por afinidad con solventes que varían en su polaridad.

El fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de *T. diffusa* se realizó en un principio por prep-HPLC, sin embargo los metabolitos presentes en este extracto, no se separaron bien en la columna de fase reversa; este resultado se respalda con lo reportado por Felix Muñoz y col 2023, en donde el análisis HPLC/DAD al extracto de *T. diffusa* mostró co-eluciones que dificultaron el análisis, por esta razón, el fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de partes aéreas de *T. diffusa* se realizó en columna abierta, para esto fue necesario desengrasar el extracto. En un embudo de decantación, se introdujeron 5 g de extracto hidroalcohólico, junto con 15 mL de *n*-hexano, la mezcla se agitó vigorosamente, posteriormente se recolectó el *n*-hexano resultante para volver a realizar este procedimiento siete veces, luego el extracto hidroalcohólico de partes aéreas de *T. diffusa* se fracciona mediante cromatografía en columna abierta; para esto, se tomaron 2 g de extracto hidroalcohólico, se depositaron en la parte superior de una columna de vidrio ocupada en $\frac{3}{4}$ partes por gel de sílice humedecida con 800 mL de *n*-hexano. Utilizando un gradiente de concentración a volumen constante (240 mL) de los disolventes, diclorometano y metanol como fase móvil, iniciando con 100% diclorometano y finalizando con 100% metanol (polaridad creciente), separando los compuestos por diferencia de elución. [Valcárcel C y col.,1994]. Las fracciones obtenidas se concentraron y almacenaron para su análisis HPLC/DAD y UHPLC/ESI[±]-Orbitrap/MS.

Columna cromatográfica		
A	B	C

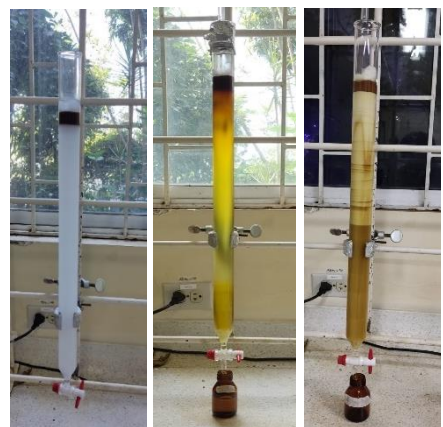


Figura 10. Montaje usado para realizar el fraccionamiento en columna abierta del extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*. A. Previo al fraccionamiento. B. En proceso de fraccionamiento. C. Fraccionamiento finalizado.

2.3.2 Caracterización de los extractos hidroalcohólicos y sus fracciones.

Para el análisis mediante HPLC/DAD de los extractos hidroalcohólicos y sus fracciones, se pesaron 10 mg para cada muestra y se disolvieron en 1 mL de solución Agua/metanol (50/50), acidulada al 0,5% con ácido fórmico. Las soluciones se colocaron en un baño de ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente y se inyectaron en un cromatógrafo líquido *Agilent Technologies* AT 1200 Series (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), que consta de un desgasificador AT G1322A, una bomba cuaternaria AT G1354A, un inyector manual AT *Series* 1200 G1328B y un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) G1523B a 270, 290, 245 y 515 nm, con una columna AT apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18, (150 mm x 4,6 mm, D.I. x 5 m, d_f), el análisis de los datos se realizó en el *software* AT ChemStation LC, como criterio de identificación se usaron los espectros UV-Vis y los tiempos de retención (Salazar R y col., 2008).

Para el análisis por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS, se pesaron 1,0 mg de cada muestra y se disolvieron en 1 mL de mezcla agua/metanol (70:30, v/v) para obtener una concentración de 1 µg/mL. Las soluciones se colocaron en un baño de ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente, luego se almacenaron a -20 ° C en un refrigerador antes del análisis por un cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia (UHPLC), *Dionex Ultimate 3000* (*Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.*), equipado con una bomba binaria de gradiente HPG3400RS, un inyector automático de muestras WPS300TRS y una unidad termostataada para la columna TCC3000. para la obtención de los espectros de masas se empleó un analizador de masas *Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.)*. modo de adquisición dual, con temperatura de la interfaz de electro nebulización de 350 °C; presión del gas nebulizador de 40 psi, voltaje capilar de 3.5 kV y rango de masas m/z 100–1100 uma. Para el análisis de los datos se usó el *software Xcalibur* (versión 3.0) y como criterios de identificación: se compararon los tiempos de retención, espectros de masas, la relación isotópica y los iones-fragmento obtenidos de espectros de masas de sustancias presentes en la muestra, con sustancias de referencia, analizadas bajo las mismas condiciones (Zubarev R y Makarov A. 2013).

2.4 Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*.

2.4.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} *in vitro*

El catión-radical ABTS^{•+} se obtuvo tras la reacción de una solución 7 mM ABTS con 2,45 mM de persulfato potásico (K₂S₂O₈). Esta mezcla se preparó en relación 1:1 v/v y se dejó en reposo durante 16 h en oscuridad, posteriormente, se diluyó con metanol grado analítico a temperatura ambiente (± 25 °C) hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 (± 0,1) a $\lambda = 754$

nm (longitud de onda de máxima absorción). Se tomó una alícuota de 1 mL de cada solución muestra/metanol, preparada previamente y se le agregó 1 mL de la solución de catión-radical ABTS⁺, se mezclaron durante 1 min y luego de 30 min de reacción en oscuridad, se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 290$ nm. Se realizó este procedimiento para el blanco, donde la muestra fue remplazada por metanol grado analítico (Re R. y col., 1999).

Tabla 7. Parámetros operacionales para medir la actividad antioxidante por el método de decoloración del catión-radical ABTS⁺. En lector de microplacas.

Parámetro	Especificación
Tiempo de corrida (min)	45
Temperatura (°C)	25
Longitudes de onda (λ)	270, 290, 515
Blanco	Metanol

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización química de los metabolitos volátiles y semi-volátiles obtenidos de partes aéreas de la especie *L. alba* quimiotipo citral.

Para la obtención del AE se llevó a cabo el procedimiento planteado en la **Sección 2.1** el rendimiento de obtención fue de 0,57%, calculado usando la **Ecuación 2**.

Ecuación 2.

3.1.1 Caracterización química por GC/MS de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *L. alba*, quimiotipo citral.

La identificación de los metabolitos secundarios presentes en el AE de las partes aéreas de *L. alba* quimiotipo citral, se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como se describe en la **Sección 2.1.3**. En la **Figura 12** se muestra el perfil cromatográfico obtenido usando la columna DB-5MS, el obtenido por la columna DB-WAX se encuentra en el Anexo 1.

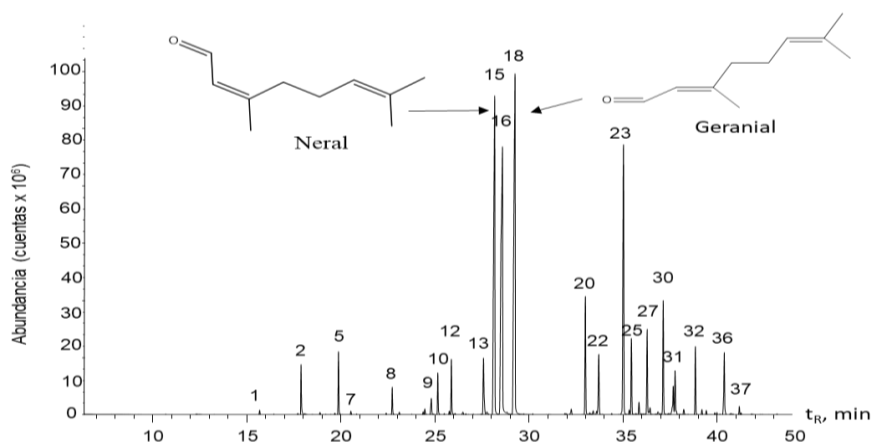


Figura 12. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (*full scan*) del aceite esencial de *Lippia alba*, quimiotipo citral. Columna DB-5MS (60 m), inyección *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Caracterización por GC/MS del AE, destilado por arrastre con vapor, de partes aéreas de *L. alba*, quimiotipo citral.

N° Pico Fig. 12	t_R , min	Compuesto	Índices de retención lineales (IRL)				Área relativa, % DB-5MS	Criterios de identificación
			DB-5MS		DB-WAX			
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
1	15,6	α -Pinoeno	934	936[2]	1028	1025[2]	0,13	a, b, c
2	17,8	Sulcatona	985	986[2]	1337	1337[2]	1,38	a, b, c

3	18,0	β -Mirceno	990	989[2]	1163	1161[1]	0,11	a, b, c
4	18,8	α -Felandreno	1008	1004[2]	1165	1168[2]	0,07	a, b
5	19,8	Limoneno	1032	1030[2]	1199	1198[2]	1,77	a, b, c
6	20,5	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1048	1048[2]	1251	1250[1]	0,11	a, b
7	22,7	Linalol	1100	1099[2]	1546	1143[2]	0,77	a, b, c
8	24,3	<i>cis</i> -Fotocitral	1142	1125[2]	-	-	0,1	a, b
9	24,8	Citronelal	1154	1154[2]	1480	1475[2]	0,61	a, b, c
10	25,1	Isoneral	1162	1164[2]	154	-	1,19	a, b
11	25,7	Borneol	1178	1169[2]	1716	1708[2]	0,1	a, b, c
12	25,8	Isogeranial	1181	1180[2]	1571	-	1,57	a, b
13	27,5	Nerol	1227	1228[2]	1798	1797[2]	2,21	a, b, c
14	27,7	iso-geraniol	1231	1232[2]	1790	1780[2]	0,15	a, b
15	28,1	Neral	1243	1242[2]	1684	1678[2]	16,29	a, b, c
16	28,8	Geraniol	1254	1254[2]	1846	1839[2]	17,95	a, b, c
17	28,8	Piperitona	1260	1253[2]	-	1729[2]	0,15	a, b
18	29,2	Geranial	1272	1270[2]	1732	1726[2]	19,77	a, b, c
19	32,2	Acetato de nerilo	1353	1359[1]	1718	1718[2]	0,23	a, b, c
20	32,9	Acetato de geranilo	1374	1380[2]	1752	1751[2]	3,83	a, b, c
21	33,2	α -Copaeno	1381	1376[2]	1500	1492[2]	0,09	a, b
22	33,7	β -Elemeno	1393	1390[2]	1598	1590[1]	2,22	a, b
23	35,0	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1413	1420[2]	1607	1599[2]	10,58	a, b, c
24	35,3	β -Copaeno	1438	1433[2]	1499	1491[2]	0,16	a, b
25	35,4	α -Bisaboleno	1442	1439[2]	1772	1775[2]	2,48	a, b
26	35,8	<i>cis</i> - β -Farneseno	1453	1456[2]	1664	1664[2]	0,41	a, b
27	36,2	α -Humuleno	1466	1468[2]	1590	1585[2]	2,82	a, b, c

Tabla 8. Continuación.

N° Pico Fig. 8	t _R , min	Compuesto	Índices de retención lineales (IRL)				Área relativa, % DB-5MS	Criterios de identificación
			DB-5MS		DB-WAX			
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
28	36,4	9- <i>epi-trans</i> -Cariofileno	1469	1564[2]	1607	1598[2]	0,27	a, b
29	36,8	δ -Muroleno	1481	1476[2]	-	1723[3]	0,15	a, b

30	37,1	Germacreno D	1490	1481[2]	1716	1708[2]	3,64	a, b, c
31	37,6	Isobutanoato de geranilo	1505	1514[3]	1810	1800[2]	1,15	a, b, c
32	37,7	α -Bulneseno	1508	1504[2]	1720	1629[2]	1,45	a, b
33	38,2	δ -Cadineno	1523	1523[2]	-	1750[2]	0,21	a, b, c
34	39,1	Geranil butanoato	1554	1562[3]	1892	1879[2]	0,15	a, b
35	39,4	<i>trans</i> -Nerolidol	1562	1560[2]	2037	2036[2]	0,14	a, b
36	40,3	Óxido de cariofileno	1593	1584[2]	1988	1986[2]	2,19	a, b, c
37	41,1	Epóxido de humuleno II	1605	1609[2]	2044	2047[2]	0,23	a, b

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia >90%), ^b Identificación tentativa basada en los IRL, medidos en columnas DB-WAX y DB-5MS. ([1]Adams, 2007; [2]Babushok y col., 2011; [3]NIST 2003/2005/2017), ^c Identificación confirmatoria por comparación de los MS e IRL usando sustancias de referencia.

En el AE de *L. alba*, quimiotipo citral, se identificaron 37 compuestos con áreas cromatograficas relativas mayores que 0,1%, clasificados en monoterpenos (3,6 %), monoterpenos oxigenados (65,1%), sesquiterpenos (25,6%) y sesquiterpenos oxigenados (2,5%), siendo: neral (16,3%), geraniol (17,9%) y geranial (19,8%) los compuestos mayoritarios. Para el AE de *L. alba* se ha reportado actividad antiviral contra algunos fenotipos de dengue (Stashenko E y col., 2014) y antioxidante medida por el método ORAC (Pérez M y Jonathan C., 2008).

3.1.2 Fraccionamiento del aceite esencial de *L. alba* quimiotipo citral.

Para la obtención de las fracciones, se depositaron 20 g de AE en un balón de 25 mL ubicado en un baño de arena acoplado a un equipo de destilación fraccionada a presión reducida, *B/R-instrument 800-High Efficiency Micro Destillation*, se midieron las temperaturas de tope T₁ y de fondo T₂, cada cuatro segundos con el fin de identificar la formación del equilibrio térmico

en la columna, en este punto se recolectaron las fracciones en viales de 2 mL. Véase sección **2.1.2.**

Se llevaron a cabo cuatro fraccionamientos ($n=4$), por micro destilación a presión reducida, en la **Tabla 9** se muestra el rendimiento, los gramos obtenidos de cada fracción y sus respectivos porcentajes de peso. La fracción de fondo (FF) representó el mayor porcentaje en peso del AE ($82,5 \pm 10,6\%$), seguido de la fracción 3 (F3) ($6,2 \pm 0,2\%$). Durante el proceso de fraccionamiento se observaron pérdidas de AE, generadas por la adhesión al colector, a la columna o al rehervidor ($7,3 \pm 0,4\%$).

Tabla 9. Resultados del fraccionamiento del AE de *Lippia alba*, quimiotipo citral, en el equipo *B/R-instrument*.

Aceite esencial	Fracción	W, (g)	Rendimiento, (%)	Pérdidas de AE, (%)
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral	F ₁	$0,37 \pm 0,09$	$1,8 \pm 0,09$	$7,3 \pm 0,4$
	F ₂	$0,42 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	
	F ₃	$1,24 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,2$	
	F _F	$16,5 \pm 0,4$	$82,5 \pm 10,6$	

F: fracción; **W:** peso; **FF:** fracción de fondo.

Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar, $n=4$

El análisis para el AE de *L. alba*, quimiotipo citral, y cada una de sus fracciones se realizó por GC/FID, utilizando *n*-tetradecano a 1000 mg/mL como estándar interno para comparación de áreas relativas (A_i/A_{isdt}).

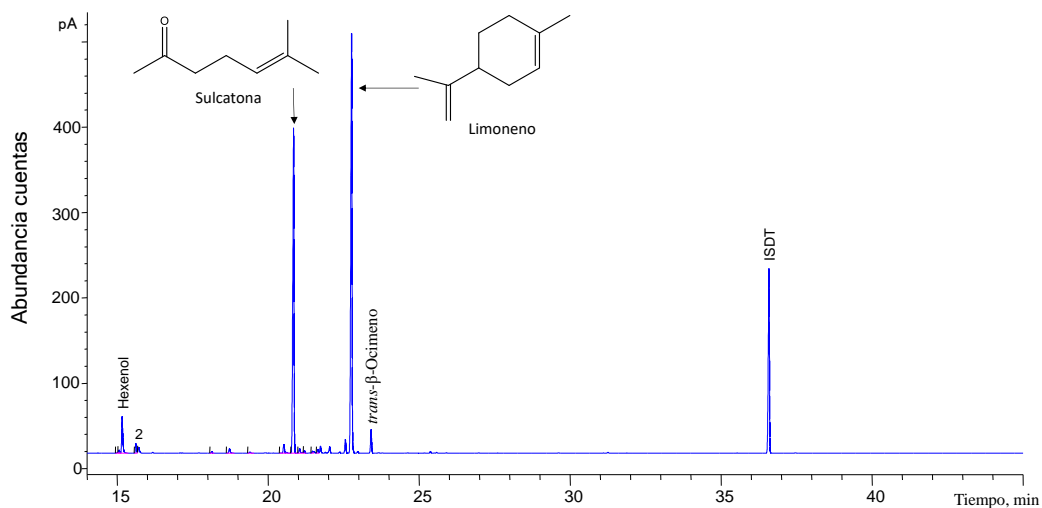


Figura 13. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción 1 del AE de *L. alba*.

Columna DB-5MS (60 m), inyección *split* 1:30. ISTD: *n*-tetradecano 1000mg/mL

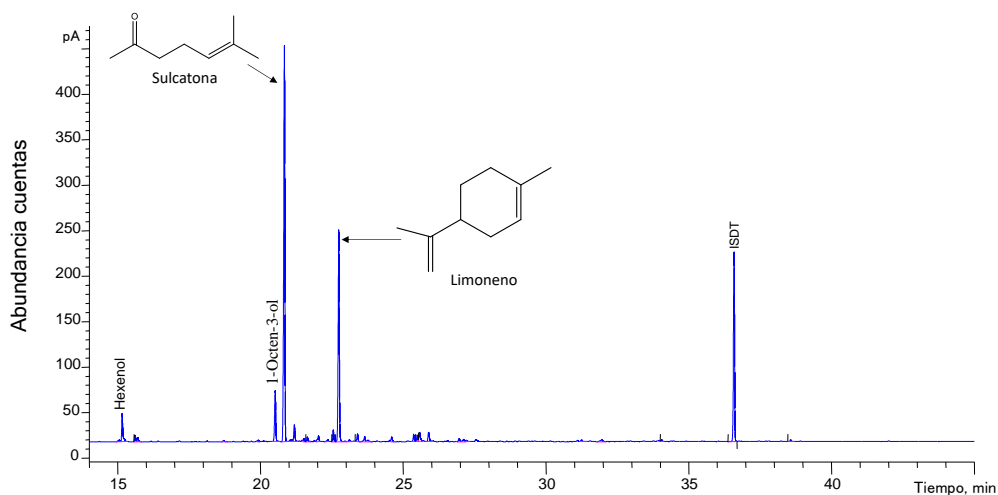


Figura 14. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción 2 del AE de *L. alba*.

Columna DB-5MS (60 m), inyección *split* 1:30. ISTD: *n*-tetradecano 1000mg/mL.

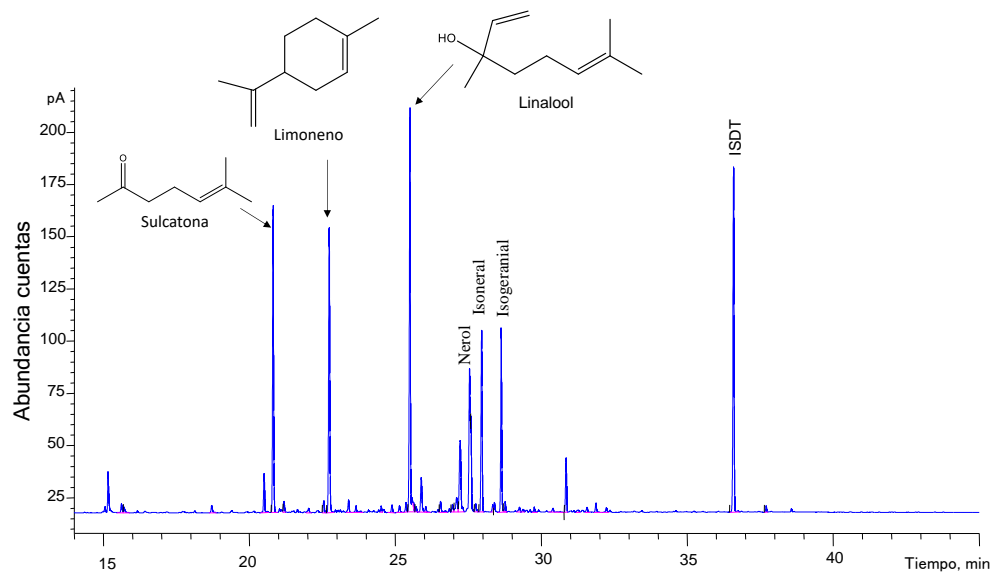


Figura 15. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción 3 del AE de *L. alba*. Columna DB-5MS (60 m), inyección split 1:30. ISTD: n-tetradecano 1000mg/mL.

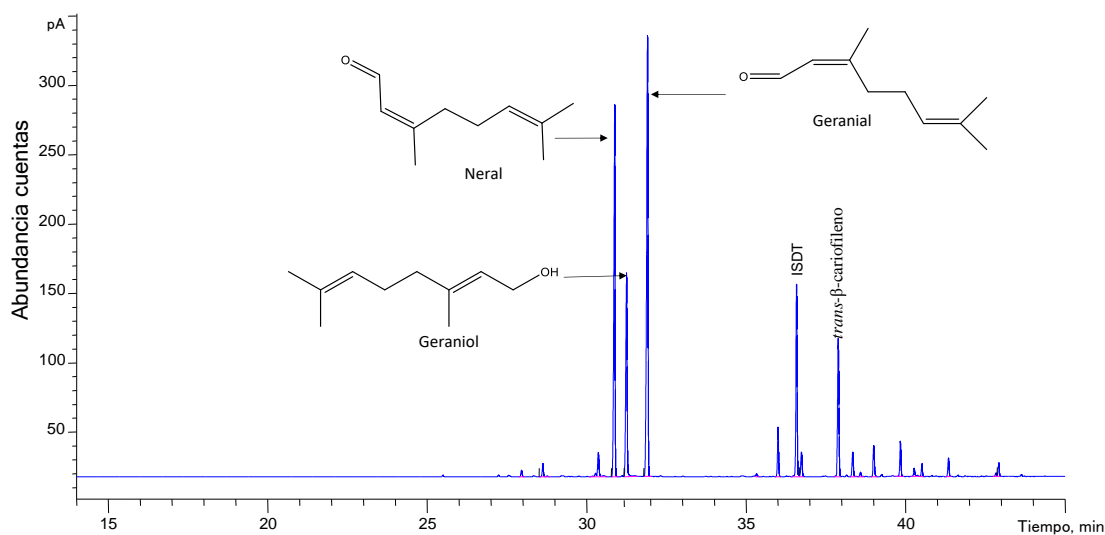


Figura 16. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción de fondo del AE de *L. alba*. Columna DB-5MS (60 m), inyección *split* 1:30. ISTD: n-tetradecano 1000 mg/mL.

Tabla 10. Comparación de áreas relativas obtenidas por GC/FID de los compuestos identificados en el AE de *L. alba* y sus fracciones, obtenidas por destilación fraccionada al vacío.

N° de pico.	Compuesto	Índices de retención lineales (IRL)			Áreas relativas, A_i/A_{istd}				
		DB-5MS			Promedio \pm desviación estándar, $n=4$				
		Exp.	Lit.	AE	F ₁	F ₂	F ₃	F _F	
1	α -Pino	934	936[2]	0,01	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	-	
2	Sulcatona	985	986[2]	0,07	1,97 \pm 0,09	1,8 \pm 0,3	0,58 \pm 0,01	-	
3	β -Mirreno	990	989[2]	-	0,02 \pm 0,06	0,09 \pm 0,06	0,02 \pm 0,01	-	
4	α -Felandreno	1008	1004[2]	-	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	-	
5	Hexeno	1028	1025[2]	0,01	0,19 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	-	
6	<i>p</i> -Cimeno	1028	1024[3]	-	0,08 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	-	
7	Limoneno	1032	1030[2]	0,06	2,1 \pm 0,2	1,20 \pm 0,08	0,58 \pm 0,08	-	
8	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1048	1048[2]	-	0,05 \pm 0,05	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	-	
9	Timol	1092	1290[1]	-	0,02 \pm 0,01	0,11 \pm 0,05	0,02 \pm 0,01	-	
10	Linalol	1100	1099[2]	0,03	0,01 \pm 0,01	0,09 \pm 0,04	0,88 \pm 0,04	-	
11	<i>cis</i> -Fotocitral	1142	1125[3]	0,02	0,02 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02	-	
12	Citronelal	1154	1154[3]	0,04	-	0,03 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	-	
13	Octen-1-en-3-ol	1162	1161[1]	0,02	0,08 \pm 0,02	0,27 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	-	
14	Isoneral	1163	1164[1]	0,12	-	0,02 \pm 0,01	0,17 \pm 0,08	0,02 \pm 0,01	
15	Borneol	1178	1169[2]	-	-	-	0,18 \pm 0,01	-	
16	Isogeranial	1181	1180[3]	0,17	-	-	0,19 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	
17	Nerol	1227	1228[2]	0,15	-	-	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	
18	Isogeraniol	1231	1232[2]	-	-	-	0,04 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01	
19	Neral	1243	1242[2]	1,58	-	-	0,15 \pm 0,02	2,3 \pm 0,2	
20	Geraniol	1254	1254[2]	1,81	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,05	1,19 \pm 0,05	
21	Piperitona	1260	1253[2]	-	-	-	0,01 \pm 0,04	0,01 \pm 0,01	
22	Geranial	1272	1270[2]	2,16	-	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	3,0 \pm 0,2	
23	Formiato de geranilo	1607	1599[2]	-	-	-	0,02 \pm 0,01	-	
24	Canfeno	1499	1491[2]	0,03	-	-	0,01 \pm 0,01	-	

Tabla 10. Continuación.

N° de pico.	Compuesto	Índices de retención lineales (IRL)			Áreas relativas, A_i/A_{Istd}				
		DB-5MS			Promedio \pm desviación estándar, $n=4$				
		Exp.	Lit.	AE	F ₁	F ₂	F ₃	F _F	
25	Acetato de nerilo	1353	1359[1]	0,01	-	-	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	
26	Acetato de geranilo	1374	1380[1]	0,26	-	-	0,24 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01	
27	α -Copaeno	1381	1376[2]	-	-	-	0,02 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	
28	β -Elemeno	1393	1390[3]	0,14	-	-	0,02 \pm 0,01	-	
20	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1439	1420[2]	0,84	-	-	0,13 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	
30	α -Guaieno	1442	1439[2]	0,01	-	-	-	0,70 \pm 0,03	
31	Isobutanoato de geranilo	1505	1514[3]	0,29	-	-	-	0,02 \pm 0,03	
32	<i>cis</i> - β -Farneseno	1453	1456[2]	0,15	-	-	-	0,12 \pm 0,07	
33	δ -Cadineno	1523	1514[2]	0,09	-	-	-	0,06 \pm 0,01	
34	Óxido de cariofileno	1593	1584[2]	0,2	-	-	-	0,03 \pm 0,03	
35	Epóxido de humuleno II	1605	1609[2]	0,03	-	-	-	0,12 \pm 0,03	

F: fracción. Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia >90%),^b Identificación tentativa basada en los IRL, medidos en la columna DB-5MS. ([1]Adams, 2007; [2]Babushok y col., 2011; [3]NIST 2003/2005/2017),

En las **Figuras 12-15** se presentan los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de las fracciones (F₁), (F₂), (F₃) y (F_F) del AE de *L. alba* quimiotipo citral, las muestras se inyectaron utilizando una solución *n*-tetradecano (1000 mg/mL) como estándar interno.

En la **Tabla 10** se muestra la comparación de áreas relativas (A_i/A_{Istd}) de los 35 compuestos presentes en el AE de *L. alba* y sus fracciones obtenidos por GC/FID. Se observó enriquecimiento del compuesto sulcatona con respecto al aceite esencial sin fraccionar (0,07), en las fracciones F₁ (1,97) y F₂ (1,8). La mayor cantidad del monoterpeno limoneno se observó en las fracciones F₁ (2,1) y F₂ (1,2). Los compuestos neral, geranial y guaieno se concentraron pasando de tener 1,58, 2,16 y 0,01 en el AE sin fraccionar a 2,30, 3,0 y 0,70, respectivamente, en la fracción de fondo.

Debido a la metodología de fraccionamiento, la composición química de las fracciones depende del punto de ebullición de los metabolitos presentes en las muestras, las fracciones 1 y 2 están enriquecidas en un 99% y 93% de monoterpenos y cetonas, compuestos volátiles de bajo peso molecular responsables del olor característico del AE de la especie *L. alba* (Senatore y col., 2001), por otro lado, los compuestos mayoritarios en las fracciones obtenidas con mayor temperatura fueron monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados, siendo 64% para la fracción 3 y 99% para la fracción de fondo. Véase **Figura 17**.

El fraccionamiento del AE de *L. alba* permitió la separación de los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial fresco, así como el enriquecimiento en algunos compuestos. En la fracción tres se observó enriquecimiento en limoneno y linalol, estos compuestos presentan actividad anticancerígena *in vitro* e insecticida reportada por Sol J y col. 2007. En la fracción de fondo se encuentran como mayoritarios neral y geranial, estos cuentan con reportes de actividad anti-inflamatoria y antioxidante reportada por Liao P. y col. en 2015. En las fracciones volátiles, se observó sulcatona como compuesto mayoritario, este compuesto, es una cetona metilada volátil, emitida por los humanos, plantas y numerosos animales, (Amir D. y col., 2019), sin embargo, es poca la información reportada sobre las actividades biológicas que este compuesto posee, en la **Sección 4** se indagará sobre la actividad antioxidante por el método de catión-radical ABTS⁺ de las fracciones obtenidas del AE de *L. alba*.

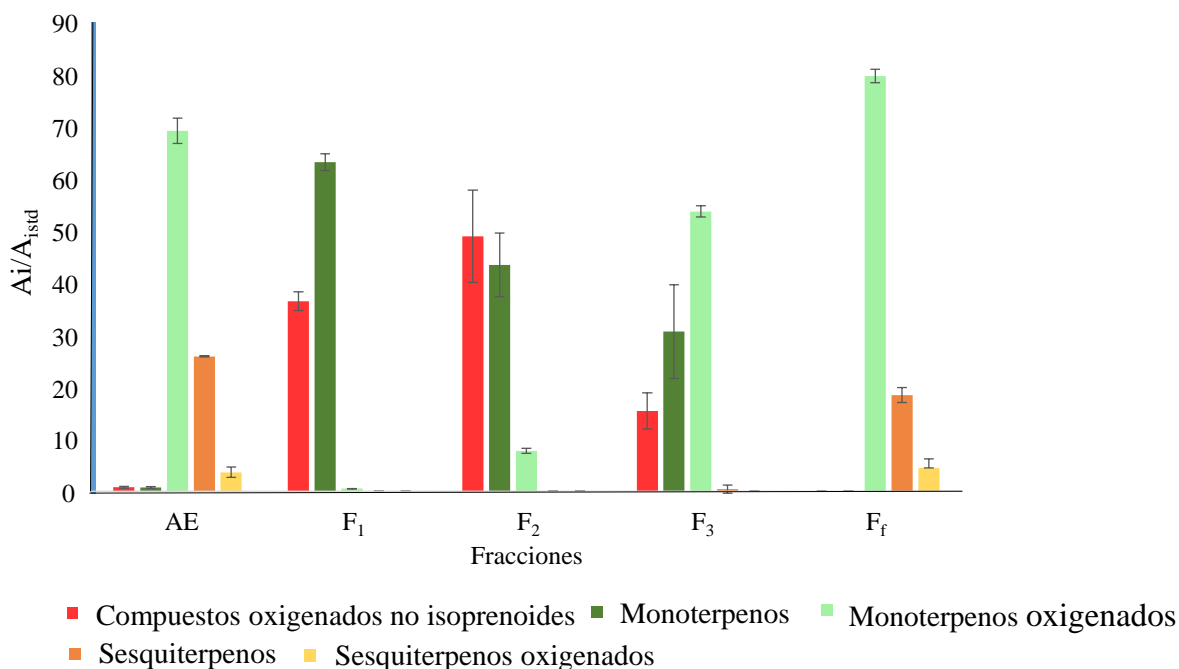


Figura 17. Clasificación por familias de los metabolitos secundarios presentes en el AE de *L. alba* y sus fracciones.

3.1.3 Análisis HPLC/DAD de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *L. alba* y sus fracciones.

Para la obtención de los extractos hidroalcohólicos de *L. alba* se llevó a cabo el procedimiento expuesto en la **Sección 2.3.1**, en este, se mencionan las condiciones experimentales, usadas para la extracción hidroalcohólica en marmita, el porcentaje de rendimiento fue de 4,2%, se calculó haciendo uso de la **Ecuación 3**.

Ecuación 3.

En la **sección 2.2.2**, se exponen las condiciones experimentales usadas para realizar el fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de *L. alba*, haciendo uso de un cromatógrafo

liquido preparativo de alta eficiencia *Prominence* (Shimadzu, Kyoto, Japón) los rendimientos obtenidos para cada fracción se encuentran en la **Tabla 11**.

Tabla11. Rendimientos de fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de partes aéreas de *L. alba*.

Fracciones	t _R , (min)	Cantidad recolectada	Rendimiento de fraccionamiento, (%)
Fr ₁	3:00-4:20	9,1	1,51
Fr ₂	4:30-7:00	61,3	10,21
Fr ₃	7:20-9:00	35	5,83
Fr ₄	9:20-11:60	19,6	3,26
Fr ₅	11:70-13:50	3,9	0,65
Fr ₆	13:60-16:90	14,4	2,4
Fr ₇	18:00-19:50	8,5	1,41
Fr ₈	20:00-21:60	5,5	0,91
Fr ₉	22:50-24:10	5,7	0,95
Total	3:00-24:10	163	27,2

Fr: fracción, *Intervalo de tiempo de retención para la recolección de fracciones.

Las **Figuras 19, 20, 21 y 22** muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de las fracciones de extractos de *L. alba*. Se identificaron de manera tentativa por comparación de t_R y espectros UV-Vis, ocho compuestos derivados de ácidos orgánicos, dos derivados de flavonas, un derivado de flavonol y tres compuestos confirmatorios. Con el fin de identificar la variación de la composición química en las fracciones del extracto al someterse a fraccionamiento, se comparó el área ocupada por cada familia de compuestos, teniendo como referencia un estándar interno (norwogonina 40 mg/mL). En el extracto de material vegetal antes del fraccionamiento se observó que más del 80% de los compuestos presentes correspondían a la familia de ácidos orgánicos, 17% fueron flavonas y el porcentaje restante flavonoles y flavanonas, Vease **Tabla 12**

Tabla 12. Identificación mediante HPLC/DAD de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico y las fracciones de la especie vegetal *L. alba*.

N° de pico Fig 19-22	Compuesto	t _R (min)	λ, nm	Extracto	A/AIstd						
					F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	f ₇	f ₉
8	Ácido clorogénico	19.62	250,300 ^h , 330 ^{max}	-	-	0,34	-	-	-	-	-
18	Derivado de ácido orgánico	30.42	230, 290 ^h , 330 ^{max}	0,16	-	0,89	0,92	-	-	-	-
19	ácido ferúlico	32.69	232, 290 ^h , 330 ^{max}	0,12	0,43	-	3,39	-	-	-	-
21	Derivado de ácido orgánico	33.63	230,290 ^h , 330 ^{max}	0,17	-	-	3,89	-	-	-	-
25	Derivado de ácido orgánico	35.08	230, 290 ^h , 330 ^{max}	0,17	-	-	1,48	23,96	0,51	-	-
26	Luteolina-7-O-glucósido	35.83	248,265 ^h , 352 ^{max}	1,17	8,24	-	-	-	-	-	-
29	Derivado de ácido orgánico	36.59	230, 290 ^h , 330 ^{max}	0,51	-	-	-	-	5,15	-	-
33	Derivado de ácido orgánico	38.11	240, 320 ^{max}	0,38	-	-	-	-	-	-	-
39	Ácido rosmarínico	38.91	230,290 ^h , 330 ^{max}	0,15	-	-	-	-	1,14	-	-
51	Derivado de flavona	48,24	238, 290h, 330max	-	-	-	-	-	-	10,28	-
52	Apigenina	48.69	230,270,330 ^{max}	-	-	-	-	-	-	-	9,72

ISTD: norwogonina 40 mg/L; **A/A_{istd}:** Área de compuesto/Área de ISTD

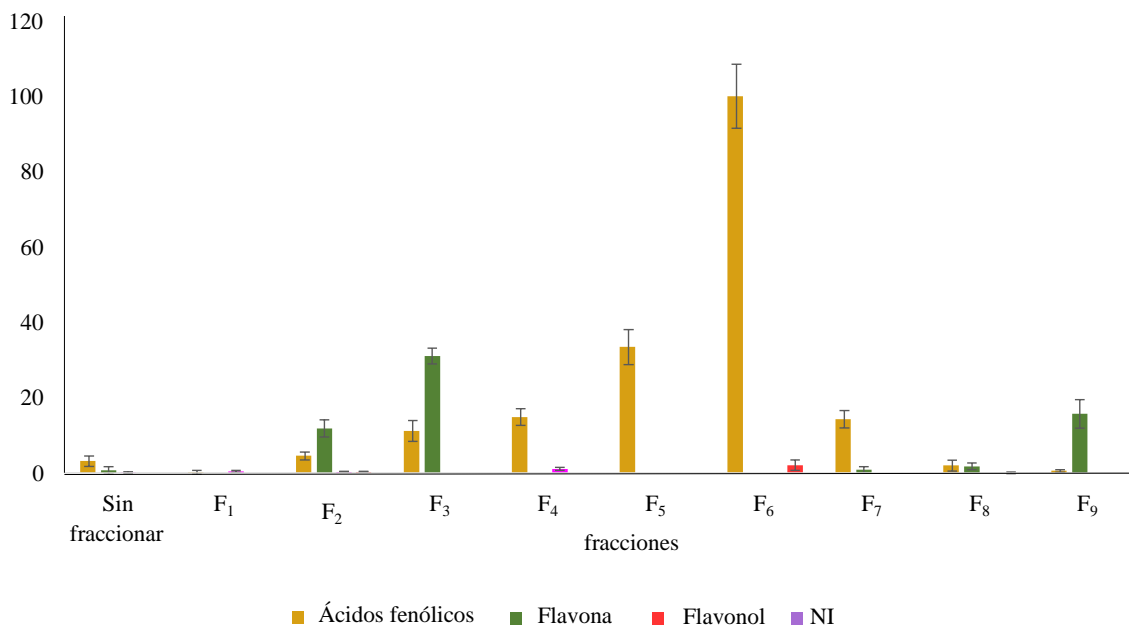


Figura 18. Variación en la composición química y las fracciones del extracto hidroalcohólico de la especie vegetal *L. alba*

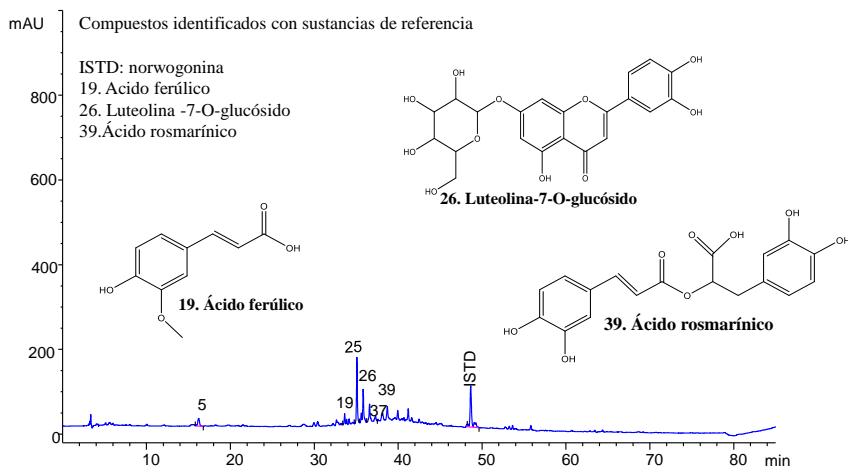


Figura 19. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD del extracto HA de material vegetal bajo estudio de *L. alba*. Columna GEMINI C₁₈. ISTD: norwogonina, 40 mg/L. La identificación se muestra en la Tabla 12.

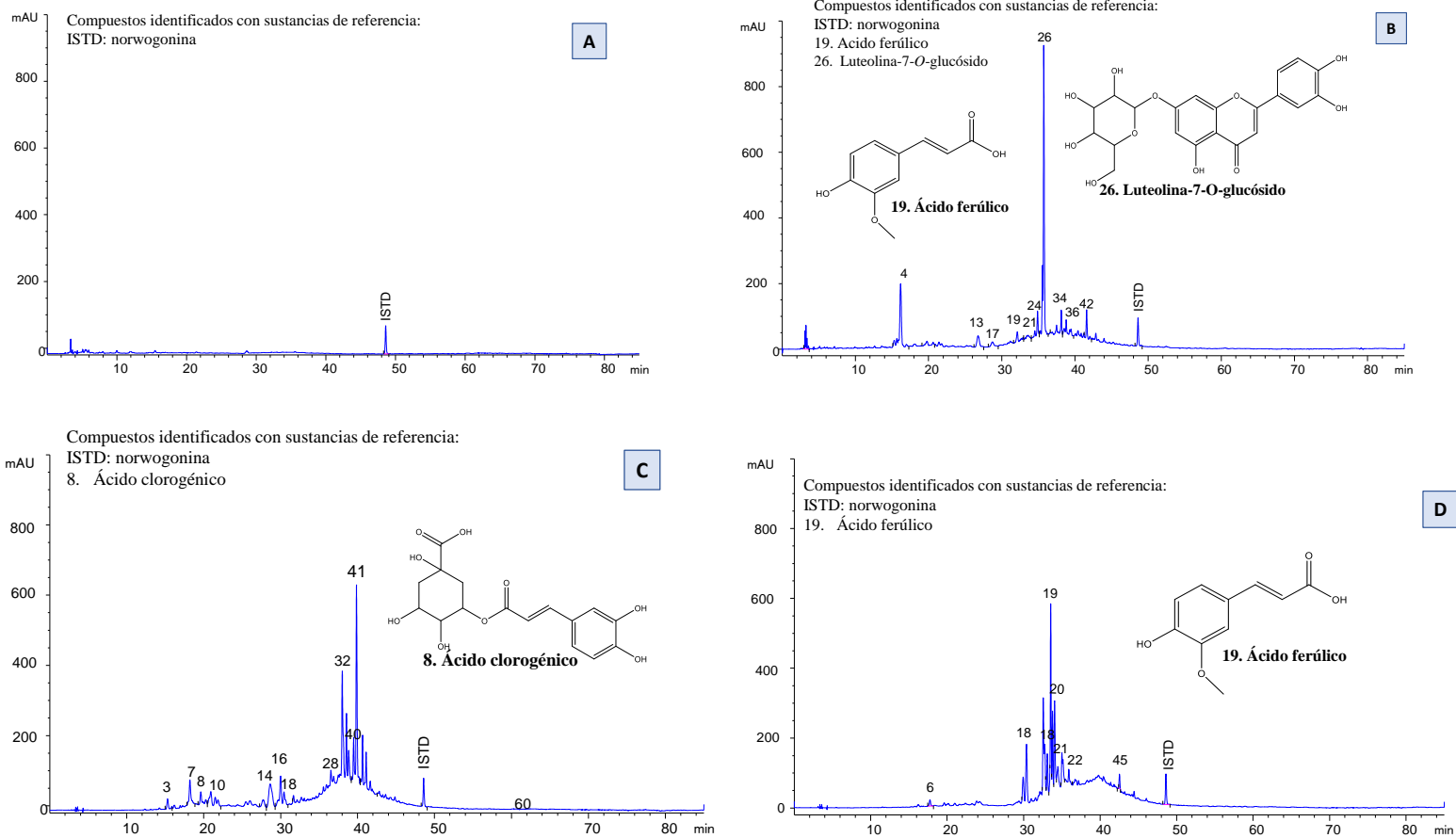


Figura 20. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos bajo estudio de *L. alba*. A. Fracción 1; B. Fracción 2; C. Fracción 3; D. Fracción 4. Columna GEMINI C₁₈. ISTD: norwogonina 40 mg/L. La identificación se muestra en el Anexo 11

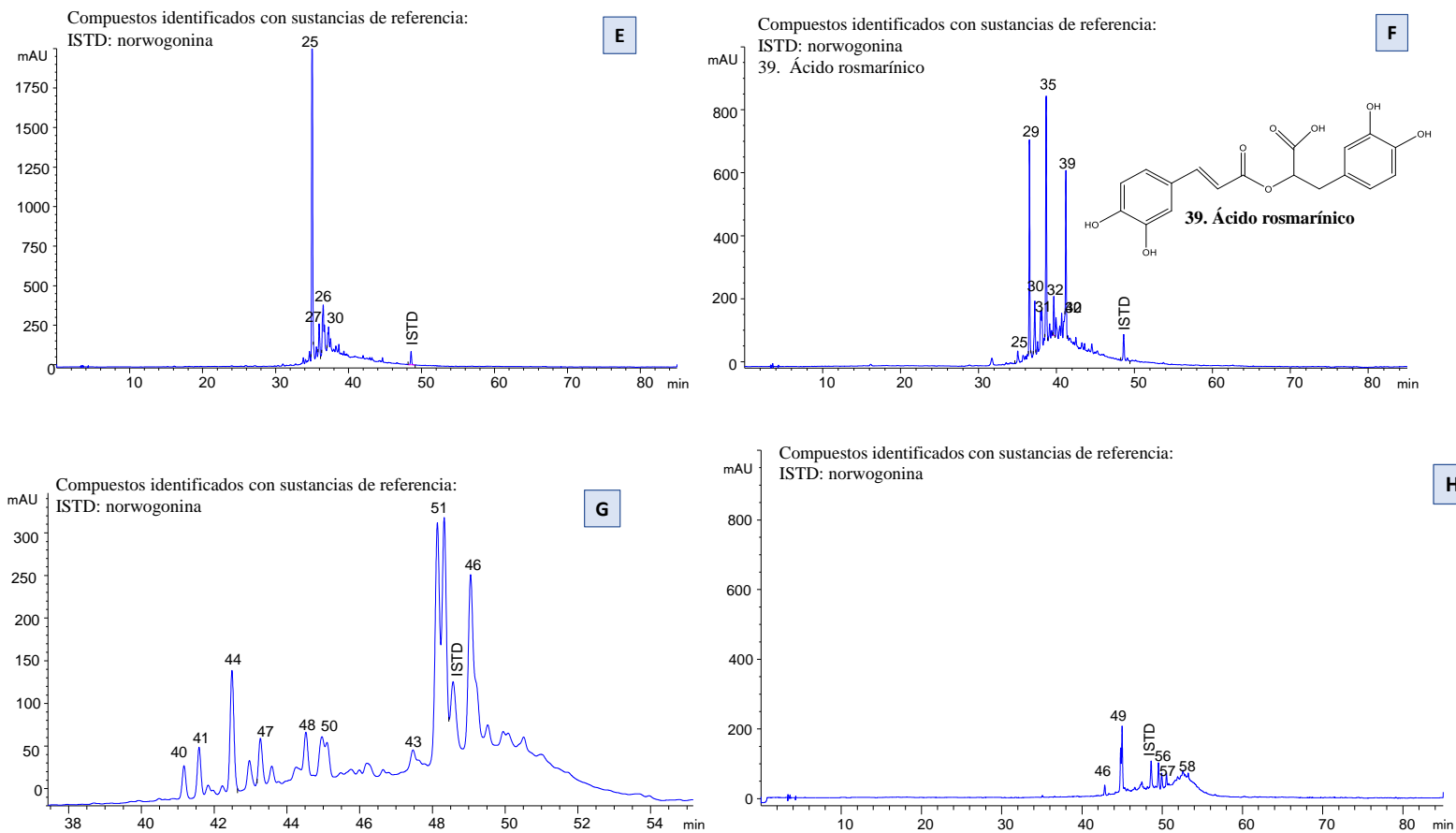


Figura 21. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos bajo estudio de *L. alba*. E. Fracción 5; F. Fracción 6; G. Fracción 7; H. Fracción 8. Columna GEMINI C₁₈. ISTD: norwogonina, 40 mg/L. La identificación se muestra en el Anexo 11.

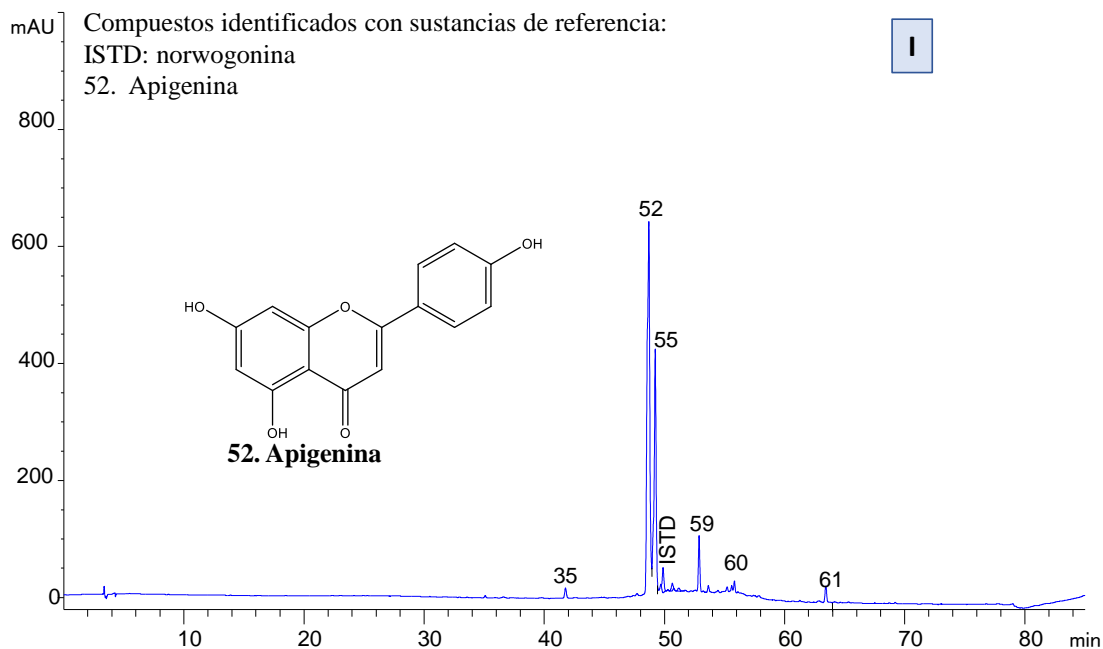


Figura 22. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD de la fracción 9 del extracto HA de material vegetal bajo estudio de *L. alba*. Columna GEMINI C₁₈. ISTD: norwogonina, 40 mg/L. La identificación se muestra en el Anexo 11.

Se evidenciaron variaciones significativas en la composición química de cada una de las fracciones. En la fracción 1 no se detectaron metabolitos de interés, en las fracciones 2 y 3, la familia más abundante fue la de las flavonas con áreas (A_i/A_{istd}) de 11,79 y 30,97 respectivamente, se identificó a luteolina-7-*O*-glucósido confirmatoriamente como compuesto mayoritario en la fracción 2 (8,23 A_i/A_{istd}). En las fracciones 4,5,6,7 permanecieron los ácidos orgánicos como familia mayoritaria, siendo ácido rosmariánico, ácido clorogénico y ácido ferúlico los ácidos orgánicos identificados confirmatoriamente. En la fracción 8, la familia mayoritaria fue la de las flavonas ocupando A/A_{istd} :1,71, siendo 1.51 de esta área ocupada por un pico cromatográfico correspondiente a un derivado de luteolina y finalmente en la fracción 9 el

96% del área pertenece a la familia de las flavonas siendo el compuesto mayoritario apigenina con un pico cromatográfico de área igual al 57% del área total de la fracción. véase **figura 22**.

3.1.4 Caracterización química por UHPLC/ESI^{+/-}-Orbitrap/MS del extracto hidroalcohólico de *L. alba*, quimiotipo citral.

Las corrientes iónicas extraídas (EIC) de las moléculas protonadas [M+H]⁺ y deprotonadas [M-H]⁻, de los 13 compuestos identificados en el extracto hidroalcohólico de partes aéreas de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco, fueron obtenidas mediante análisis por UHPLC/ESI^{+/-}-Orbitrap-MS en modo SIM y se muestran en la Figura 23 y Tabla 13.

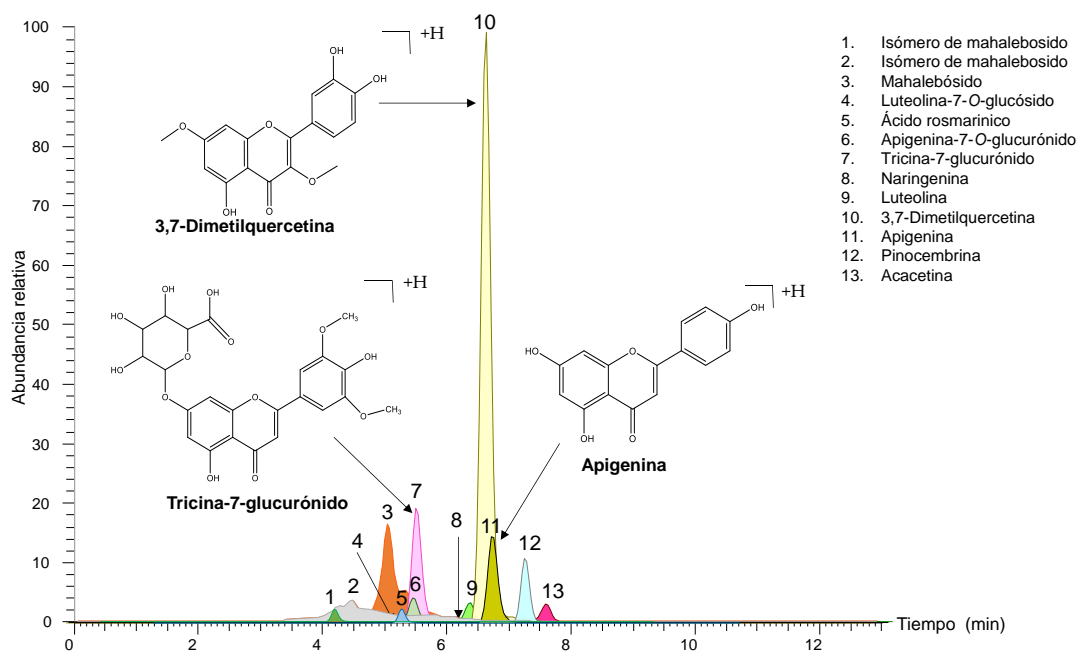


Figura 23. Corrientes iónicas extraídas obtenidas por UHPLC/ESI^{+/-}-Q-Orbitrap/MS, en modo SIM, de moléculas protonadas [M+H]⁺, y deprotonadas [M-H]⁻, presentes en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, quimiotipo citral, obtenido a partir de material vegetal fresco. Véase la identificación en la Tabla

3.1.5 Caracterización por UHPLC/ESI^{+/−}-Orbitrap-MS, en modo de adquisición dual del extracto hidroalcohólico de *L. alba***Tabla 13.** Masas exactas de iones o moléculas protonadas [M+H]⁺ y deprotonadas [M-H][−] identificadas por UHPLC/ESI^{+/−}-*Orbitrap*/MS de compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, quimiotipo citral, obtenido de material vegetal fresco.

N° Fig. 23	Compuesto	t _R , min	Fórmula	Masa molecular		Δ ppm	HCD, eV ^d	Iones producto		
				[M+H] ⁺	[M-H] [−]			Fragmento	Fórmula (Δ ppm)	m/z
1	Isómero de mahalebósido ^{a, b}	3,59	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	325,09143(89,83)	323,07721	149,286	10	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₅ O ₇	307,09137(11,51)
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₉ H ₇ O ₃	163,03897(100)
								[(M+H)-H ₂ O-C ₉ H ₆ O ₃] ⁺	C ₆ H ₉ O ₄	145,02841(0,76)
2	Isómero de mahalebósido ^{a, b}	4,42	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	325,09143(24,20)	323,07721	149,286	20	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₅ O ₇	307,08081(6)
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₉ H ₇ O ₃	163,03882(100)
								[(M+H)-H ₂ O-C ₉ H ₆ O ₃] ⁺	C ₆ H ₉ O ₄	145,02823(0,93)
3	Mahalebósido ^{a, b}	5,06	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	325,09143(58,13)	323,07721	1,11737	40	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₅ O ₇	307,08081(7,69)
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₉ H ₇ O ₃	163,03882(100)
								[(M+H)-H ₂ O-C ₉ H ₆ O ₃] ⁺	C ₆ H ₉ O ₄	145,04950(0,41)
4	Luteolina-7-O-glucósido ^{a, b, c}	5,24	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449,10783	447,09219(100)	0,96866	20	[(M-H)-C ₄ H ₈ O ₄] [−]	C ₁₇ H ₁₁ O ₇	327,05042(1,62)
								[(M-H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] [−]	C ₁₅ H ₉ O ₆	285,04010(40,71)
5	Ácido rosmarinico ^{a, b, c}	5,49	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	361,09179(88,43)	359,07724(89,83)	149,286	10	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] [−]	C ₉ H ₉ O ₅	197,04469(11,51)
								[(M-H)-C ₉ H ₈ O ₄] [−]	C ₉ H ₇ O ₄	179,03397(100)
								[(M-H)-C ₉ H ₈ O ₄ -H ₂ O] [−]	C ₉ H ₅ O ₃	161,02335(0,76)
								[(M-H)-C ₉ H ₈ O ₄ -C ₂ O] [−]	C ₈ H ₇ O ₂	135,04398(0,66)
6	Apigenina-7-O-glucurónido ^{a, b, c}	5,5	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	447,09149(13,04)	445,07769	1,55689	20	[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271,05969(100)
								[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆ -C ₆ H ₄ O ₃] ⁺	C ₉ H ₇ O ₂	147,04407(3,82)
7	Tricina-glucurónido ^{a, b}	5,51	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	507,11331(13,52)	505,10658	1,03354	20	[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	331,08063(100)
								[(M+H)-C ₁₃ H ₁₄ O ₁₀] ⁺	C ₁₀ H ₉ O ₃	177,05446(3,67)

Tabla 13. Continuación.

N° Fig. 23	Compuesto	t _R , min	Fórmula	Masa molecular		Δ ppm	HCD, eV ^d	Iones producto		
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻			Fragmento	Fórmula (Δ ppm)	m/z (%I)
8	Naringenina ^{a, b, c}	6,28	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273,07575	271,06010(100)	2,09922	50	[(M-H)-C ₆ H ₆ O] ⁻	C ₉ H ₅ O ₄	177,01855(4,87)
								[(M-H)-C ₈ H ₈ O] ⁻	C ₇ H ₃ O ₄	151,00259(28,56)
								[(M-H)-C ₇ H ₄ O ₄] ⁻	C ₈ H ₇ O	119,04909(7,96)
9	Luteolina ^{a, b, c}	6,43	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287,05453(62,29)	285,04046	1,67082	70	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₉ O ₅	269,04401(5,72)
								[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₉ O ₄	241,04922(16,34)
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₂] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄	153,01813(100)
								(M+H)-C ₇ H ₄ O ₄ ⁺	C ₈ H ₇ O ₂	135,04401(45,82)
10	3,7-Dimetilquercetina ^{a, b}	6,77	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	331,08075(65,57)	329,06667	1,44901	50	[(M+H)-CH ₃] ⁺⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,05734(100)
								[(M+H)-CH ₃ -CH ₃] ⁺	C ₁₅ H ₉ O ₇	301,03421(5,60)
								[(M+H)-C ₁₁ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₆ H ₅ O ₂	109,02077(2,50)
11	Apigenina ^{a, b, c}	6,72	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271,05975(100)	269,04554	1,95388	60	[(M+H)-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₁ O ₄	243,06487(3,63)
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄	153,01807(42,40)
								[(M+H)-C ₇ H ₄ O ₄] ⁺	C ₈ H ₇ O	119,04919(21,30)
12	Pinocembrina ^{a, b, c}	7,2	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257,08083	255,06519(100)	2,33395	40	[(M-H)-C ₂ H ₂ O] ⁻	C ₁₃ H ₉ O ₃	213,05479(29,69)
								[(M-H)-C ₈ H ₉] ⁻	C ₇ H ₃ O ₄	151,00232(28,82)
								[(M-H)-C ₅ H ₂ O ₃] ⁻	C ₁₀ H ₉ O	145,06454(11,62)
13	Acacetina ^{a, b, c}	7,62	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285,07541(100)	283,06119	1,19637	50	[(M+H)-CH ₃] ⁺⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,05273(30,39)
								[(M+H)-CH ₃ -CO] ⁺⁺	C ₁₄ H ₁₀ O ₄	242,05754(3,59)
								[(M+H)-C ₉ H ₈ O] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄	153,01842(2,54)
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₄] ⁺	C ₈ H ₇ O	119,049228(1,34)

^a Identificación tentativa basada en la medición de masas exactas y las relaciones isotópicas del átomo C.

^b Identificación tentativa basada en [M+H]⁺ o [M-H]⁻, reportado en la literatura científica para *L. alba*

^c Identificación confirmatoria basada en la comparación de t_R y espectros de masas con los de una sustancia patrón.

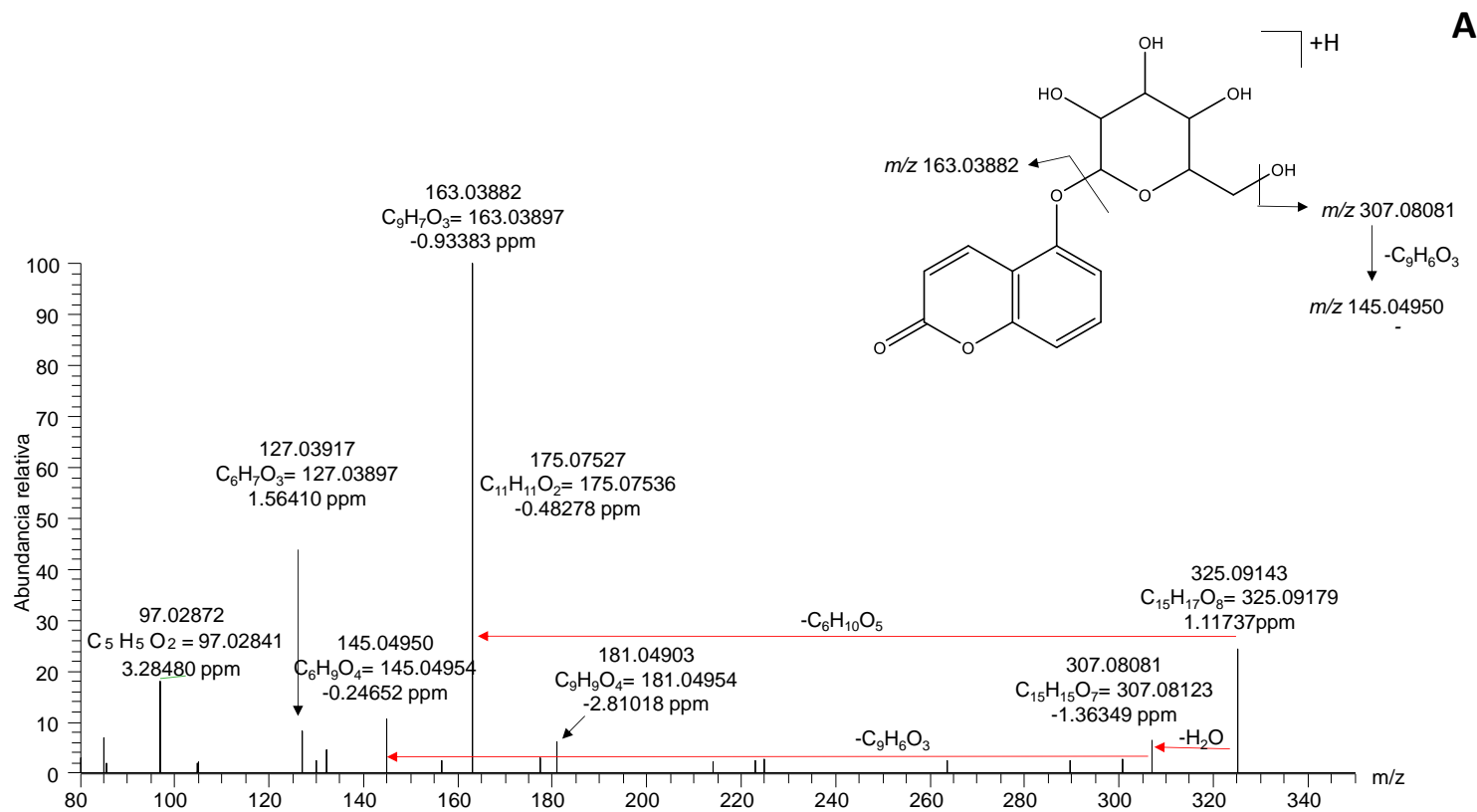


Figura 24. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI⁺⁻-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)]⁺ de mahalebósido [SIM, m/z 325, HCD; 50 eV]. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*. Véase Tabla 13.

A

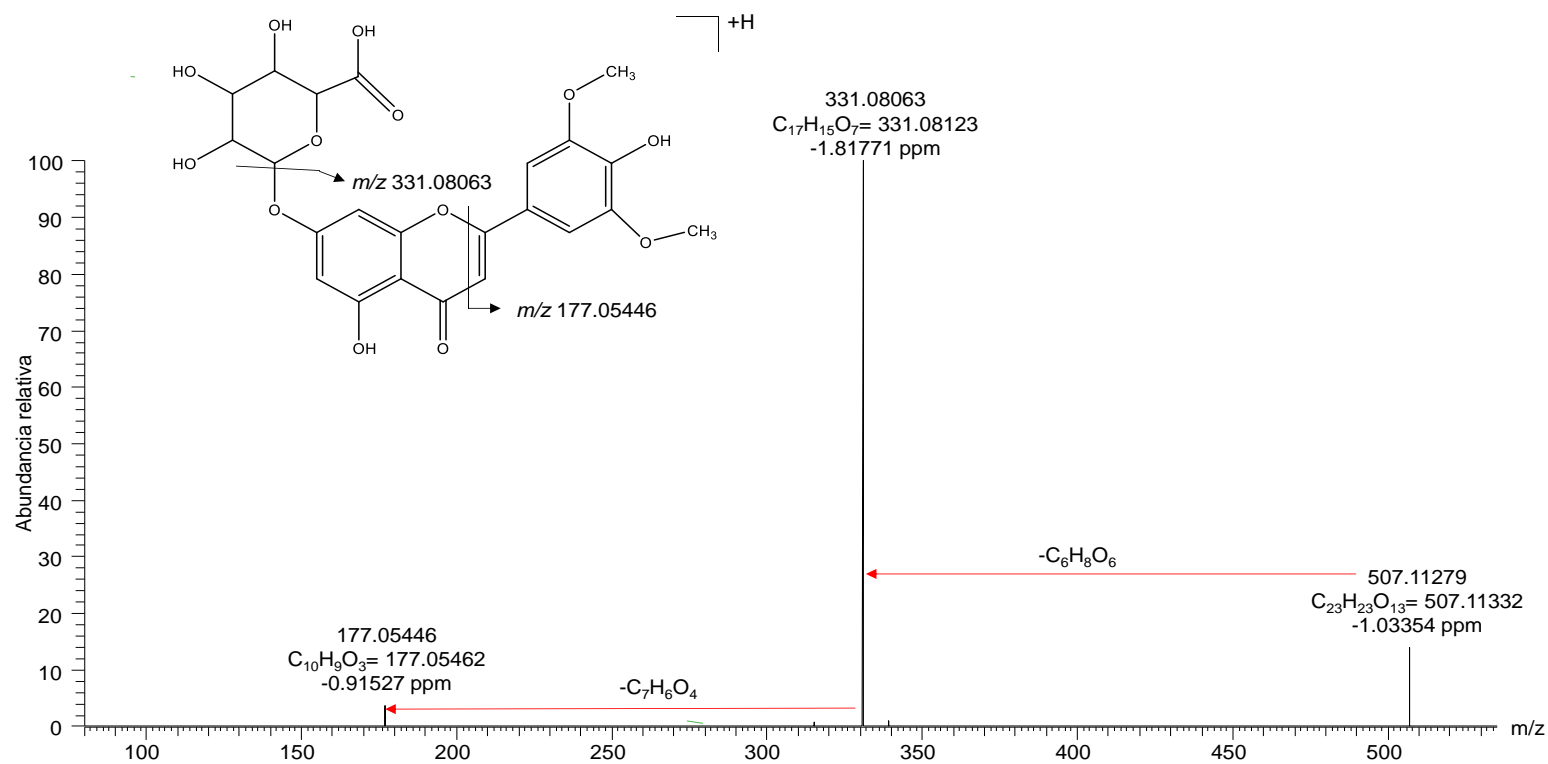


Figura 25. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI^{+/−}-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)]⁺ de tricicina-glucurónico [SIM, m/z 507, HCD; 20 eV]. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba* Véase Tabla 13.

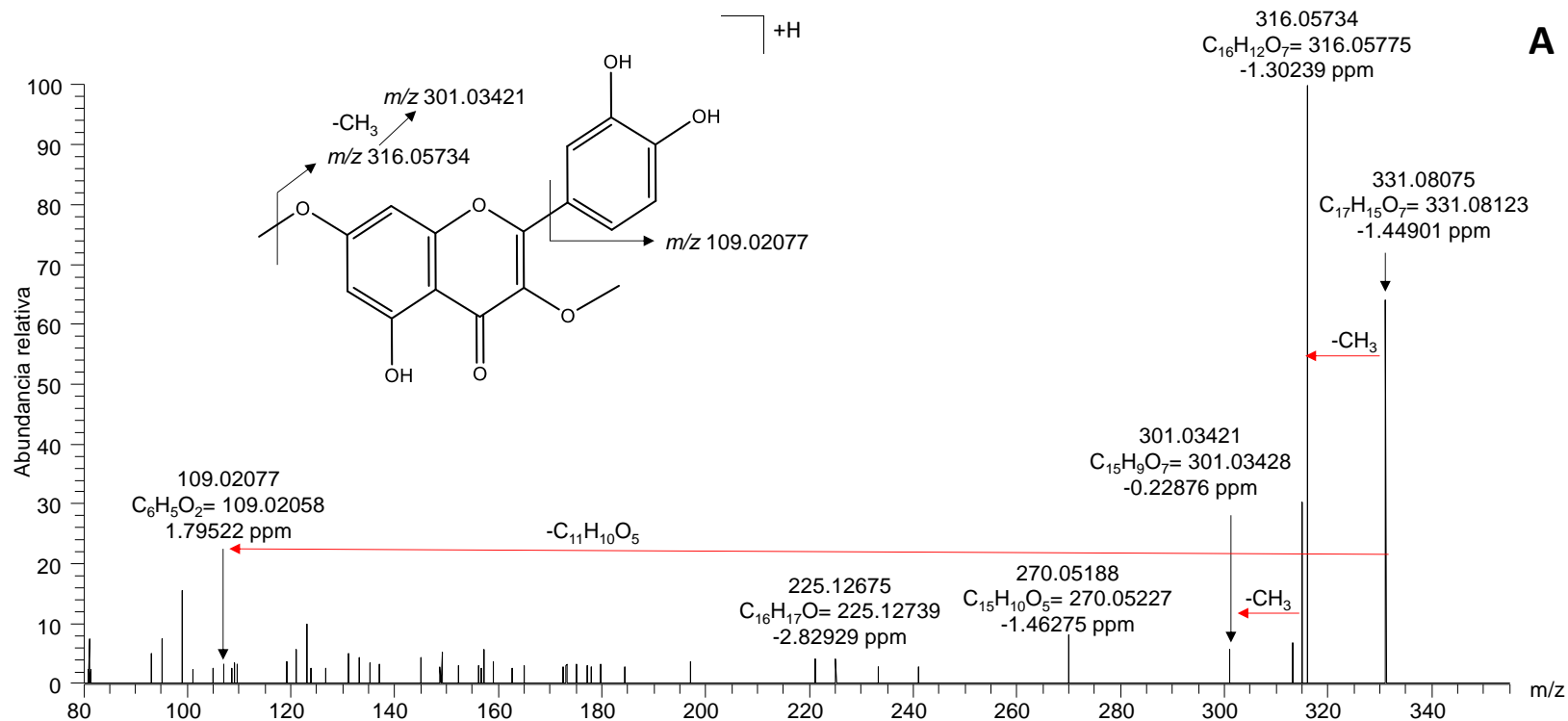


Figura 26. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI^{+/−}-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)]⁺ de 3,7-dimetilquercetina [SIM, m/z 331, HCD; 50 eV]. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*. Véase Tabla 13.

En la **Figura 23** se muestran las corrientes iónicas extraídas (EIC) de las moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, quimiotipo citral obtenido de material vegetal fresco. La identificación de las masas exactas (calculadas y experimentales), fórmulas moleculares, error de medición de masas de cada compuesto (Δ ppm) y los iones-fragmento usados para la identificación los compuestos, se presentan en la **Tabla 13**. Los espectros de masas de las moléculas identificadas tentativamente se muestran en las **Figuras 24-26** y los espectros de masas de moléculas identificadas de forma confirmatoria en los **Anexos 3-9**.

En los resultados del análisis por UHPLC/ESI⁺-Orbitrap-MS en modo de adquisición *full scan*, se seleccionaron las señales de trece moléculas, estos metabolitos fueron detectados al analizar la muestra por el modo de adquisición de monitoreo de iones seleccionados (SIM). Usando el modo *step scan* se observó la variación del espectro de masas al variar la energía de la celda de colisiones activadas (HCD), con energías de 10, 20, 30, 40, 50, 60, y 70 eV. Las señales observadas se compararon con las de sustancias de referencia, confirmando la presencia de luteolina-7-*O*-glucósido, apigenina-7-*O*-glucurónido, naringenina, luteolina, apigenina, pinocembrina y acacetina; también, se identificaron los compuestos: mahalebósido, tricina-7-glucuronósido y dimetilquercetina de forma tentativa por comparación de los espectros de masas con las bases de datos disponibles (*Human Metabolome Database (HMDB) 2019* y *MassBank of North América. 2018*).

En el extracto hidroalcohólico de *L. alba* están presentes una gran variedad de compuestos con diferentes polaridades, el fraccionamiento líquido-líquido es una forma eficaz de eliminar impurezas y concentrar los extractos mediante la separación por afinidad con solventes que varían en su polaridad.

En las fracciones 1, 2 y 3 se observó aumento en la señal producida por mahalebósido y sus isómeros, estos compuestos aromáticos pertenecen a la familia de las cumarinas y esta es la primera vez que se reportan en *L. alba*, no se encontraron reportes referentes a sus propiedades biológicas. En la fracción 4, apigenina-7-*O*-glucurónido y tricina-glucurónido fueron los flavonoides reportados como predominantes con actividad antioxidante y antiinflamatoria informada, según lo documentado por Duarte J, y col., (2007) y Liang Y y col. (1999), en la Fracción 5, se observó un comportamiento similar con aumento en la señal producida por tricina-glucurónido. La fracción 6, enriquecida en la familia de los ácidos orgánicos (véase Figura 18), presento a ácido rosmarínico como compuesto con mayor presencia. La fracción 7 se enriqueció en 3,7-dimetilquercetina, un compuesto con actividad antioxidante *in vitro* informada según lo documentado por Doğan, Z, y col., (2015) y Wang L, y col., (2006). Finalmente, en la fracción 9 se observó enriquecimiento en apigenina, lo que está respaldado por el análisis HPLC/DAD realizado en la sección 3.1.3.

La actividad biológica de los metabolitos identificados en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, quimiotipo citral, se presentan en la Tabla 15.

Tabla 14. Variación de los compuestos identificados por UHPLC/ESI[±]-Q-Orbitrap-MS en las fracciones del extracto hidroalcohólico de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco.

Compuesto	Formula	Área cromatográfica, cuentas x 10 ⁵									
		Extracto	Fraccion 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	Fracción 5	Fracción 6	Fracción 7	Fracción 8	Fraccion 9
Isómero mahalebósido	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	378	695	9,04	450	9,79	1,26	12,3	1,02	0,19	0,08
Isómero mahalebósido	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	649	1560	342	103	85,6	427	31,5	4,92	1,83	0,74
Mahalebósido	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	190	534x10 ²	162x10 ²	37	29,8	842	725	474	13,2	2,82
Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	26,5	0,48	3340	0,52	0,04	0,05	0,08	480	13,2	ND
Ácido rosmarínico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	342	3,81	1,24	1,12	0,10	2,28	3670	4,61	0,24	ND
Apigenina-7- <i>O</i> -glucurónido	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	111	0,91	1,01	2,76	159	403	1310	ND	ND	ND
Tricina-glucurónido	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃	738	944	115	74	53,2	5270	20,9	2.13	0,83	0,02
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	43,0	0,42	0,86	0,23	0,46	1.07	0,31	0,74	0,58	0,45
Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	128	3,08	2,26	6.73	1.27	2.16	1.52	1.52	1.23	1.02
3,7-Dimetilquercetina	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	3680	0,52	3.80	3.13	3.81	11,3	1470	254x10 ²	345	1.65
Apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	731	ND	ND	0,27	0,35	1.19	6.32	5.98	3.33	867x10 ²
Pinocembrina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	14,3	ND	0,75	1.73	0,36	0,21	0,71	2.52	3.67	ND
Acacetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	3.29	0,81	0,78	9.77	9.07	3.34	2.64	331	0,16	ND

Tabla 15. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados en el extracto y las fracciones hidroalcohólicas obtenidos de la especie vegetal *L. alba*, quimiotipo citral.

Compuesto	Grupo	Actividad biológica	Metodo de evaluación	Referencia
Luteolina	Flavona	Antioxidante	<i>In vitro</i> : ABTS, FRAP	Rice C, y col., (2022)
		Antialérgica	<i>In vitro</i> : células T autorreactivas de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) humana (esclerosis múltiple) y murina.	Verbeek R, y col., (2004)
		Antiinflamatorias	<i>In vivo</i> : células epiteliales intestinales murinas.	Ruiz P, y col., (2006)
Naringenina	Flavanona	Expectorante	<i>In vivo</i> : ratones Kunming machos y hembras	Lin, B, y col (2008)
		Antioxidante	<i>In vitro</i> : ABTS, FRAP	Cavia M, y col., (2010)
Quercetina	Flavonol	Antioxidante	<i>In vivo</i> : método de <i>Aebi</i> en ratas Wistar hembra	Doğan, Z, y col., (2015)
		Antiinflamatoria	<i>In vitro</i> : inhibición de la expresión del gen COX-2	Wang L, y col., (2006)
		Antioxidante	<i>In vitro</i> : DPPH	
Apigenina	Flavona	Anticancerígena	<i>In vivo</i> : <i>Rattus norvegicus</i>	Wei H, y col., (1990)
		Antiinflamatorias	<i>In vivo</i> : ratones BALB/C inmunizados con ovoalbúmina	Liang Y, y col., (1999)
		Antitumoral	<i>In vivo</i> : células endoteliales humanas	Lindenmeyer F, y col., (2001)
Tricina-7-glucurónido		Antioxidante	<i>In vitro</i> , DPPH	Duarte J, y col., (2007)
		Antiproliferativa	<i>In vitro</i> : células de la línea NIC/ADR (Humano)	
Pinocembrina	Flavanona	Antibacterial	<i>In vitro</i> : ingeniería metabólica (<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> ,)	Miyahisa N, y col., (2006)
		Antiinflamatoria	<i>In vitro</i> : macrófagos de ratón RAW	Soromou, X, y col., (2012)
		Antifúngica	<i>In vitro</i> : <i>C. albicans</i>	López A, y col., (2002)
Acacetina	Flavona	Neuroprotectora	<i>In vivo</i> : ratones C57BL/6	Kim M, y col., (2012)
		Antiinflamatoria	<i>In vitro</i> : tejido pulmonar de ratones C57BL/6 asmáticos sensibilizados con ovoalbúmina	Huang W, y col., (2012)
		Hepatoprotectora	<i>In vivo</i> : ratones	Liu X, y col., (2018)
		Antihistamínica,	<i>In vitro</i> : en mastocitos intestinales de ratas cultivadas infectadas con <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> .	

3.2 Análisis de los metabolitos secundarios obtenidos de la especie *T. diffusa*

Para la obtención del AE se llevó a cabo el procedimiento planteado en la sección 2.1, el rendimiento de obtención fue de 0,22%, calculado usando la **Ecuación 2** (rendimiento de destilación).

3.2.1 Caracterización química por GC/MS de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *T. diffusa*.

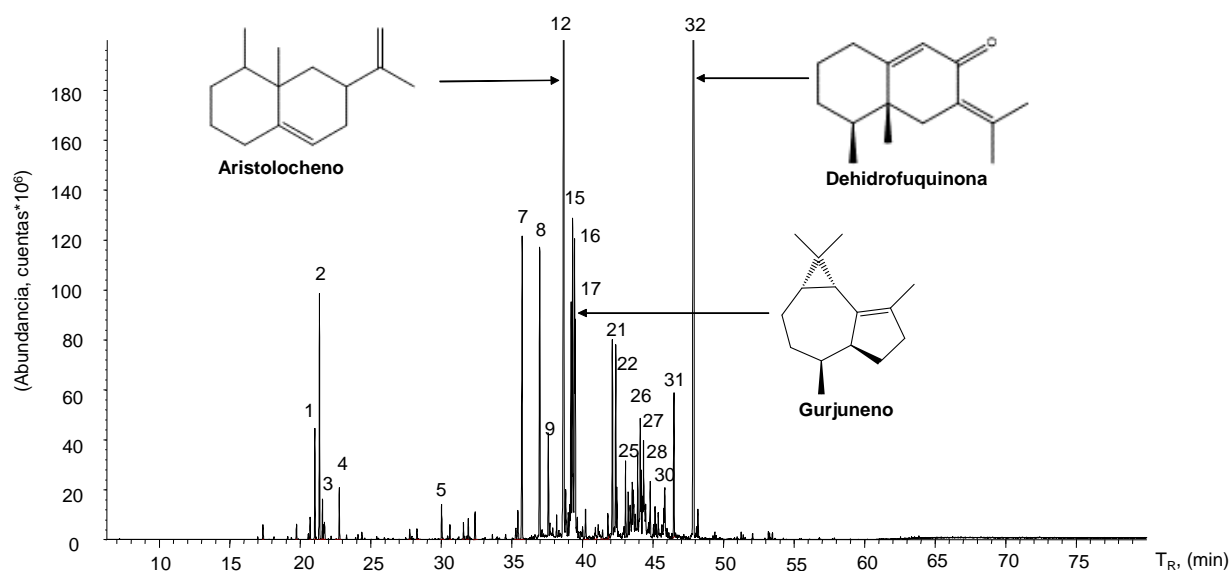


Figura 27. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (*full scan*) del aceite esencial de *Turnera diffusa*. Columna DB-5MS (60 m), inyección *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los compuestos en la Tabla 16.

La identificación del AE de las partes aéreas de *T. diffusa* se realizó con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En la **Figura 27** se muestra el perfil cromatográfico obtenido de la columna DB-5MS, el obtenido por la columna DB-WAX se encuentra en el Anexo 10. Se identificaron 32 compuestos con áreas cromatografiadas relativas mayores del 0,2%, clasificados en monoterpenos (7,5%), monoterpenos oxigenados (0,8%), sesquiterpenos (48,5%) y sesquiterpenos oxigenados (42,6%), siendo los compuestos mayoritarios, el aristolocheno (18,3%) y la dehidrofuquinona (16,9%), véase **Tabla 16**.

Tabla 16. Caracterización por GC/MS del aceite esencial, obtenido de partes aéreas frescas de *Turnera diffusa*.

N° Pico Fig. 27	Compuesto	Índices de retención lineales (IRL)				Área relativa, % DB-5MS	Identificación
		DB-5MS		DB-WAX			
		Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
1	Δ^3 -Careno	1019	1003[1]	1147	1147[1]	1.4	a, b
2	<i>p</i> -Cimeno	1027	1022[2]	1266	1270[2]	3.1	a, b, c
3	Limoneno	1032	1024[1]	1196	1198[1]	0.5	a, b
4	γ -Terpineno	1061	1054[2]	1243	1245[2]	0.6	a, b, c
5	Timol	1288	1289[2]	2164	2164[2]	0.4	a, b, c
6	α -Copaeno	1385	1374[2]	1496	1491[2]	0.2	a, b, c
7	β -Elemeno	1397	1390[2]	1592	1591[2]	4.4	a, b, c
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1433	1420[2]	1602	1598[2]	4.2	a, b, c
9	6,9-Guaiadieno	1451	1442[2]	1610	1617[2]	1.3	a, b
10	<i>cis</i> - β -Farneseno	1455	1454[2]	1664	1663[1]	0.2	a, b
11	α -Humuleno	1469	1468[2]	1673	1678[2]	0.2	a, b

N° Pico Fig. 27	Compuesto	Índices de retención lineales (IRL)				Área relativa, % DB-5MS	Identificación
		DB-5MS		DB-WAX			
		Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
12	Aristolocheno	1484	1487[3]	1686	1697[3]	18.3	a, b
13	α -Gurjuneno	1486	1475[3]	2143	-	0.9	a, b
14	Germacreno D	1493	1484[2]	1827	1823[2]	0.3	a, b, c
15	Premnaspirodieno	1499	1505[3]	1726	-	4.0	a, b
16	β-Selineno	1502	1490[2]	1722	1725[2]	5.1	a, b
17	γ-Gurjuneno	1504	1493[3]	2143	-	7.1	a, b
18	7- <i>epi</i> - α -selineno	1530	1520[2]	1722	1725[2]	0.2	a, b
19	Elemol	1556	1548[2]	2073	2078[2]	0.2	a, b
20	γ -Vetiveneno	1563	1554[3]	1743	-	0.2	a, b
21	Óxido de cariofileno	1597	1596[2]	1981	1986[3]	2.8	a, b
22	Guaiol	1606	1611[2]	2106	2096[2]	2.9	a, b
23	Epóxido de <i>iso</i> -aromadendreno	1609	-	2195	-	0.8	a, b
24	<i>neo</i> -Intermedeol	1632	1631[3]	2129	2135[3]	1.0	a, b
25	α -Cariofiladienol	1652	1644[2]	2286	-	1.0	a, b
26	Pogostol	1664	1660[2]	2246	2240[1]	1.1	a, b
27	Bulnesol	1671	1670[2]	2219	2205[2]	2.9	a, b
28	α -Funebreno	1680	1687[2]	1525	1238[2]	3.1	a, b
29	Valerenal	1721	1727[2]	2370	-	0.1	a, b
30	α -Costol	1740	1750[2]	1600	2604[1]	1.4	a, b
31	N.I.	1767	-	2430	-	1.8	a, b
32	Dehidrofuquinona	1828	1820[3]	2448	2444[3]	16.9	a, b

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia >90%),^b Identificación tentativa basada en los IRL, medidos en columnas DB-WAX y DB-5MS. ([1]Adams, 2007; [2]Babushok *et al.*, 2011; [3]NIST 2003/2005/2006), ^c Identificación confirmatoria por comparación de los MS e IRL usando sustancias de referencia.

3.2.2 Fraccionamiento del aceite esencial de *T. diffusa*

Para fraccionar el AE de la especie vegetal *T. diffusa*, se depositaron 10 g de AE en un balón de 25 mL ubicado en un baño de arena acoplado a un equipo de destilación fraccionada a presión reducida, *B/R-instrument 800-High Efficiency Micro Destillation*, y se siguió el procedimiento expuesto en la **Sección 2.1.2**.

El análisis de las fracciones del AE de *T. diffusa*, por GC/FID se realizó preparando 10 mg de AE de *T. diffusa*, disuelto en 1 mL de diclorometano con *n*-tetradecano a 1000 mg/mL como estándar interno para la comparación de áreas relativas (A_i/A_{isdt}). Los gramos obtenidos en cada fracción y sus respectivos rendimientos se muestran en la **Tabla 17**. La fracción dos representó el mayor porcentaje del AE fraccionado (90%), seguido de la fracción uno (3.5%). El porcentaje de pérdidas representa el peso de AE adherido al colector, columna y rehervidor.

Tabla 17. Resultados del fraccionamiento del AE de *T. diffusa* en el destilador fraccionado a presión reducida, *B/R-instrument 800-High Efficiency Micro Destillation*.

Aceite esencial	Fracción	W, (g)	Rendimiento, (%)	Pérdidas de AE, (%)
<i>T. diffusa</i>	F ₁	0,35 ± 0,01	3,5 ± 0,5	6,5 ± 0,4
	F ₂	9,0 ± 0,4	90,1 ± 0,4	

F: fracción, *resultados expresados como promedio ± desviación estándar, *n*=4.

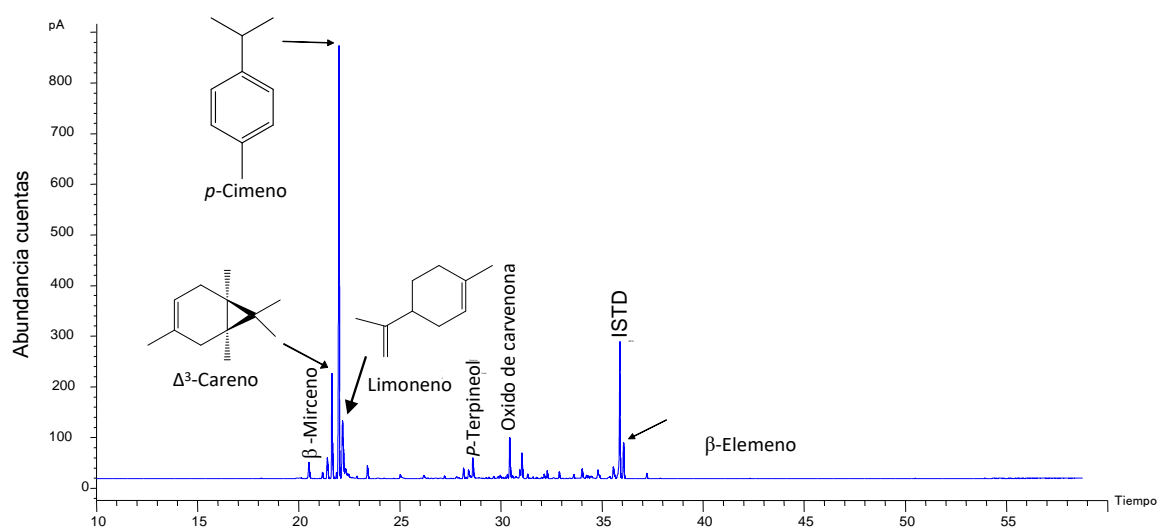


Figura 28. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción uno (volátil) del AE de *T. diffusa* Columna DB-5MS (60 m), inyección *split* 1:30. Véase la identificación de los picos en la Tabla 16.

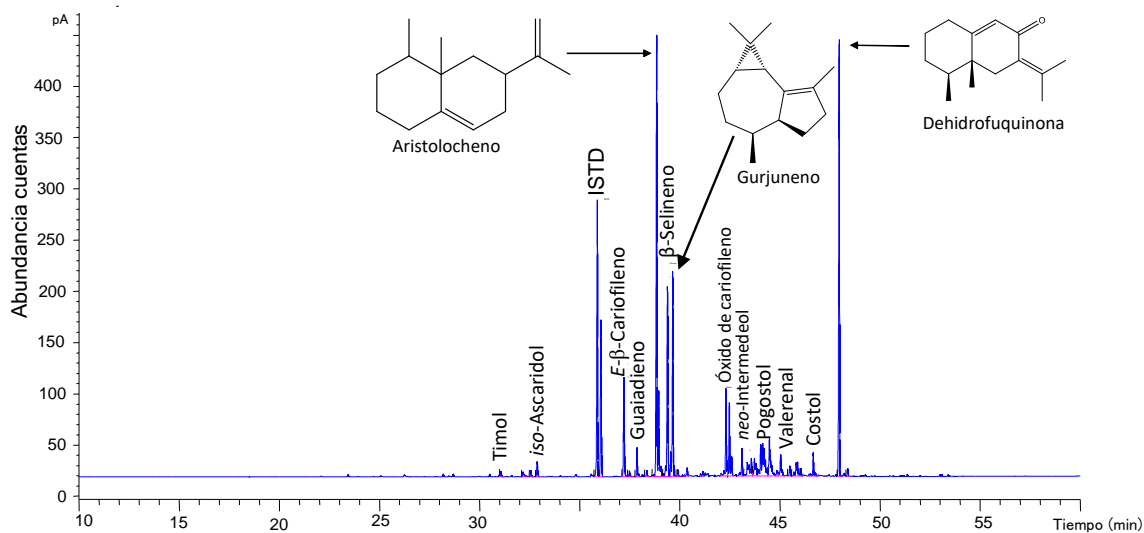


Figura 29. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de la fracción dos (pesada) del AE de *T. diffusa*. Columna DB-5MS (60 m), inyección *split* 1:30. Véase la identificación de los picos en la Tabla 16.

Tabla 18. Comparación de áreas relativas A_i/A_{istd} por GC/FID del AE de *T. diffusa* y sus fracciones, obtenidas por destilación fraccionada al vacío.

N° de pico Fig 27	Compuesto	índices de retención lineales		Áreas relativas, A_i/A_{istd} promedio \pm desviación estándar, $n=4$		
		DB-5MS		AE	Fracción 1	Fracción 2
		Exp.	Lit.			
1	Δ^3 -Careno ^{a, b}	1019	1003[1]	0,06	0,8 \pm 0,1	-
2	<i>p</i> -Cimeno ^{a, b, c}	1027	1022[2]	0,23	3 \pm 1,0	-
3	Limoneno ^{a, b,}	1032	1024[1]	0,01	0,6 \pm 0,2	-
4	γ -Terpineno ^{a, b, c}	1061	1054[2]	0,05	0,2 \pm 0,1	-
5	Timol ^{a, b, c}	1288	1289[2]	0,02	0,02 \pm 0,001	0,03 \pm 0,01
6	α -Copaeno	1385	1374[2]	0,01	0,02 \pm 0,01	-
7	β -Elemeno ^{a, b}	1397	1390[2]	0,47	0,3 \pm 0,1	1,00 \pm 0,05
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a, b, c}	1433	1420[2]	0,55	0,04 \pm 0,01	0,38 \pm 0,01
9	6,9-Guaiadieno ^{a, b}	1451	1442[2]	0,15	-	0,11 \pm 0,01
10	<i>cis</i> - β -Farneseno	1455	1454[2]	0,01	-	-
11	α -Humuleno	1469	1468[2]	0,03	-	0,05 \pm 0,01
12	Aristolocheno ^{a, b}	1484	1487[3]	2,2	-	1,54 \pm 0,03
13	α -Gurjuneno	1486	1475[3]	0,97	-	-
14	Germacreno D	1493	1484[2]	0,02	-	0,03 \pm 0,01
15	Premnaspirodieno ^{a, b}	1499	1505[3]	0,46	-	-
16	β -Selineno ^{a, b}	1502	1490[2]	1,05	-	0,80 \pm 0,01
17	γ -Gurjuneno ^{a, b}	1507	1493[3]	0,97	-	0,77 \pm 0,001
18	7- <i>epi</i> - α -Selineno ^{a, b}	1530	1520[2]	0,05	-	0,04 \pm 0,01
19	Elemol ^{a, b}	1556	1548[2]	0,04	-	0,02 \pm 0,01
20	γ -Vetiveneno ^{a, b}	1563	1554[3]	0,05	-	-
21	Óxido de cariofileno ^{a, b}	1597	1596[2]	0,04	-	0,34 \pm 0,001
22	Guaiol ^{a, b}	1606	1611[2]	0,05	-	0,32 \pm 0,06
23	Epóxido de <i>iso</i> -aromadendreno ^{a, b}	1609	1611[2]	0,05	-	-
24	<i>neo</i> -Intermedeol ^{a, b}	1632	1631[3]	0,15	-	0,11 \pm 0,01
25	α -Cariofiladienol ^{a, b}	1652	1644[2]	0,11	-	0,15 \pm 0,02
26	Pogostol ^{a, b}	1664	1660[2]	0,15	-	0,3 \pm 0,2
27	Bulnesol ^{a, b}	1671	1670[2]	0,19	-	0,27 \pm 0,01
28	α -Funebreno ^{a, b}	1680	1687[2]	0,04	-	0,11 \pm 0,01
20	Valerenal	1721	1727[2]	0,05	-	0,12 \pm 0,02
30	α -Costol ^{a, b}	1740	1750[2]	0,07	-	0,14 \pm 0,02
31	N.I.	1767	-	0,02	-	-
32	Dehidrofuquinona ^{a, b}	1828	1820[3]	2,1	-	1,56 \pm 0,02

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia >90%) ^b Identificación tentativa basada en los IRL, medidos en columnas DB-WAX y DB-5MS. (Adams, 2007; Babushok *et al.*, 2011; NIST 2003/2005/2006), ^c Identificación confirmatoria por comparación de los MS e IRL usando sustancias de referencia.

En la **Tabla 18** se muestran los 32 compuestos con áreas relativas (A_i/A_{istd}) $> 0,01$, identificados en el AE y las fracciones de *T. diffusa*. En la fracción uno se observó enriquecimiento en compuestos de bajo peso molecular como Δ^3 -careno (0,84), limoneno (0,60), γ -terpineno (0,2), y *p*-cimeno (3,0) (**Figura 28**); en la fracción dos se observó enriquecimiento en sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados como β -elemeno (1,0), óxido de cariofileno (0,34) y guaiol (0,32) (**Figura 29**), la distribución por familias de compuestos al fraccionar el extracto se presenta en la **Figura 30**, los resultados se expresan como promedio de áreas relativas \pm desviaciones estándar con $n=4$, usando *n*-tetradecano a 1000 mg/mL como estándar interno y la variación de la actividad antioxidante por el método de catión-radical ABTS^{•+} se discute en la **Sección 4**.

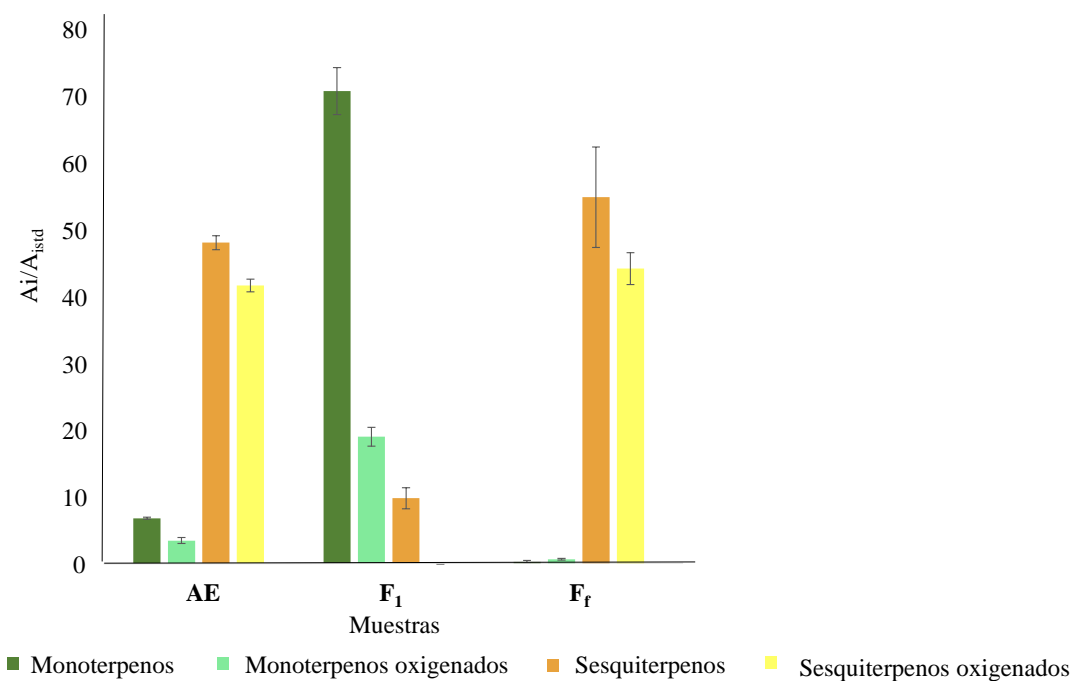


Figura 30. Variación por familias en la composición química del aceite esencial de la especie vegetal *T. diffusa* y sus fracciones.

3.2.3 Análisis HPLC/DAD de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico obtenido de *T. diffusa* y sus fracciones.

Para la obtención de los extractos hidroalcohólicos de *T. diffusa* se llevó a cabo el procedimiento expuesto en la **Sección 2.2.1**, en esta, se mencionan las condiciones experimentales, usadas para la extracción hidroalcohólica en marmita, el porcentaje de rendimiento fue de 10,0%, se calculó haciendo uso de la **Ecuación 3** (rendimiento de extracción).

En la **sección 2.2.2**, se exponen las condiciones experimentales usadas para realizar el fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, mediante cromatografía en columna abierta, los rendimientos obtenidos para cada fracción y los porcentajes de recuperación de extracto después de liofilizar se encuentran en la **Tabla 19**; las pérdidas observadas se generaron por los metabolitos que se retienen en la sílice de la columna.

Tabla 19. Rendimientos de fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de partes aéreas de *T. diffusa*.

Fr. N°	Relación solventes de elución (A:B, %)	W extracto, (mg)	Rendimiento de fraccionamiento, (%)
Fr ₁	100% A– 98:2	13,1	0,6
Fr ₂	97:3	54,0	2,7
Fr ₃	96:4	84,5	4,2
Fr ₄	95:5	15,4	0,7
Fr ₅	94:6	30,1	1,5
Fr ₆	93:7 - 92:8 - 91:9	32,8	1,6
Fr ₇	90: 10	262,0	13,1
Fr ₈	50:40 – 40:60	330,7	16,5
Fr ₉	30:70 -100% B	783,1	39,1
Total		1606,5	80,3

F: frasco; **Fr:** fracción; **A:** diclorometano; **B:** metanol

Después del fraccionamiento en columna se obtuvieron 22 viales con extractos diferenciados por la polaridad de los compuestos presentes en las mismas, al analizar estas fracciones mediante HPLC/DAD se observó que los perfiles cromatográficos entre algunas fracciones presentaban una gran similitud; estas se mezclaron, resultando finalmente en nueve fracciones del extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, véase **Tabla 19**. Los perfiles cromatográficos se pueden observar en las **Figuras 33-36**. Con el fin de identificar la variación de la composición química del extracto al someterse a fraccionamiento, se comparó el área ocupada por cada familia de compuestos, teniendo como referencia el estándar interno (salvigenina 30 mg/mL).

Tabla 20. Identificación mediante HPLC/DAD de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico y las fracciones de la especie vegetal *L. alba*. vegetal fresco de *T. diffusa*.

N° de pico Fig 19-22	Compuesto	tR (min)	λ , nm	Extracto	A/AIstd									
					F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	
27	Derivado de flavona	32.164	230 ^h , 260, 350 ^{max}	6,656								16,93		
29	Derivado de ácido orgánico	32.413	240 ^{max} , 285 ^h , 325						9,75			-	-	
39	Derivado de ácido orgánico	36.76	254 ^{max}	0,814			-		34,08		-	-	-	
43	Apigenina-7-O-gluósido	38.586	230 ^h , 270, 348 ^{max}	0,57								14,46	3,06	
48	Derivado de flavona	40.138	265, 345 ^{max}			19,23	-		-			4,03	1,02	
60	Luteolina-7-O-glucósido	42.37	230, 270, 345 ^{max}	0,609	-	3,86	-					8,72	8,17	
75	Naringenina	47.138	230, 290 ^{max}				7,31	-	-		8,13	-	8,58	
76	Apigenina	48.665	230 ^h , 270, 340 ^{max}	1,363	-	-	3,53	63,47	27,15	1,082	1,69	-	-	
78	Derivado de flavona	49.115	232, 268 ^h , 320 ^{max}			-	-	-	9,86	56,01	-	-	-	
91	Acetina	55.54	237,270, 335 ^{max}	2,007	-	-	3,48	2,26	3,48			-	-	44,21
98	Derivado de flavona	61.57	235,270, 330 ^{max}	1,127	61,11	-	-	-	-	-		-	-	

ISTD: salvigenina, 30 mg/L. ^a Identificación confirmatoria por comparación con espectro UV-Vis y t_R (min) de sustancia de referencia certificada. max: Máximo. h: Hombro.

Los flavonoides tienen la capacidad de absorber radiación UV-Vis, esto se refleja en bandas de absorción características que dependen de su estructura, el extracto hidroalcohólico y las fracciones de extracto de partes aéreas de *T. diffusa*, se analizaron mediante HPLC/DAD.

En el extracto hidroalcohólico obtenido de partes aéreas de *T.diffusa* se identificaron 19 picos (**Anexo 11**), de los cuales la apigenina, la luteolina-7-*O*-glucósido y la acacetina fueron identificados confirmatoriamente por comparación del espectro UV-Vis y los tiempos de retención con las sustancias de referencia certificada (véase **Figura 31**). Teniendo en cuenta que un espectro típico de flavonoide incluye dos bandas de absorción: Una banda A que se encuentra entre los 310-350 nm para los flavonoides de tipo flavona y otra banda B que se encuentra en un rango de 250-290 nm similar en todos los subgrupos de flavonoides [Markham T y col., 1980]. Se observó que la mayoría de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa* son derivados de flavonas; esto concuerda con trabajos realizados por Singh S y col (2020), Jang, Y y col., (2020), y Alexandra, G. y col., (2021) quienes reportan derivados de flavonas (luteolina, acaetina, apigenina *O*-glucosilados entre otros) con actividad antimicrobial, antibacterial, antiviral, antioxidante y antiangiogénica como componentes del extracto de *T. diffusa*.

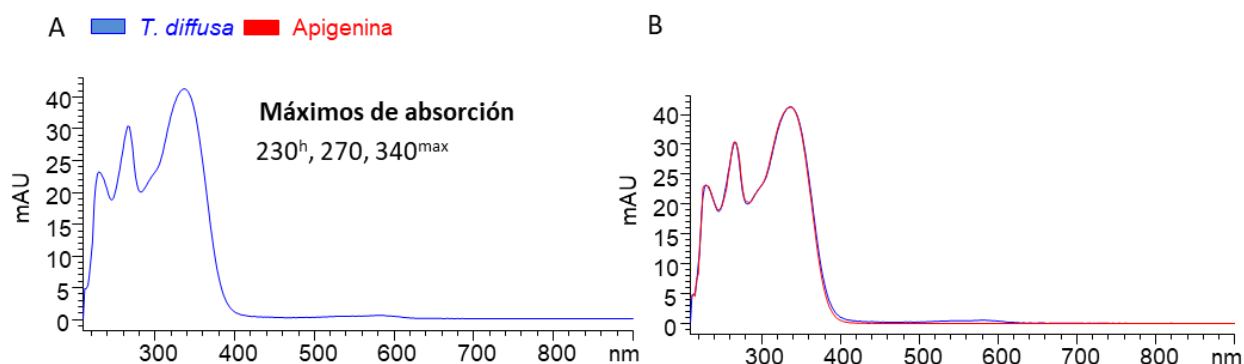


Figura 31. Espectros UV obtenidos a $\lambda = 290$ nm. A. Espectro UV de la señal con $t_{R}:38,5$ del extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*. B. Comparación de los espectros UV del extracto hidroalcohólico de *T. diffusa* y de la sustancia de referencia apigenina. max: Máximo h: Hombro.

Al analizar el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa* antes de ser sometido a fraccionamiento se observó que el 73% de los compuestos detectados pertenecen a la familia de las flavonas, mientras que el 15% eran ácidos orgánicos y el 13% fenoles, el porcentaje restante pertenece a las flavononas y a compuestos no identificados.

En las **Figuras 34-36** se evidencia una variación significativa al someter el extracto a fraccionamiento. Por ejemplo, en la fracción 1 se observó una señal con $A/A_{Istd} :61,11$, correspondiente a un derivado de flavona, el porcentaje de área ocupada por flavonas incrementa al 95% en la fracción 2 identificándose la luteolina-7-*O*-glucósido como compuesto confirmatorio. En las fracciones 3 y 5 hubo un aumento en el área (A/A_{Istd}) ocupada por ácidos orgánicos. Sin embargo, los principales metabolitos en estas fracciones seguían siendo flavonas, como: naringenina (7,31), acetina (3,53) y apigenina (3,48).

La fracción 4 está constituida en un 85% por apigenina (A/A_{Istd} :63,47), un compuesto con actividades biológicas interesantes (Anticancerígena Wei H, y col (1990) y Antiinflamatorias Lindenmeyer F, y col (2001)). En la fracción 6 el compuesto mayoritario, fue un derivado de flavona con A/A_{Istd} : 56,01, además de la presencia de naringenina y apigenina.

Las fracciones 7 y 8 presentan similitudes en su composición química, estas fracciones están enriquecidas en apigenina-7-*O*-glucósido, naringenina y luteolina-7-*O*-glucósido, finalmente en la fracción 9 se identificó a acetina confirmatoriamente como compuesto mayoritario, ocupando A/A_{Istd} :44,21.

La variación de área ocupada por los metabolitos (A/A_{Istd}) se presenta en la **Tabla 20** y la discusión de las propiedades biológicas en la **Tabla 23**.

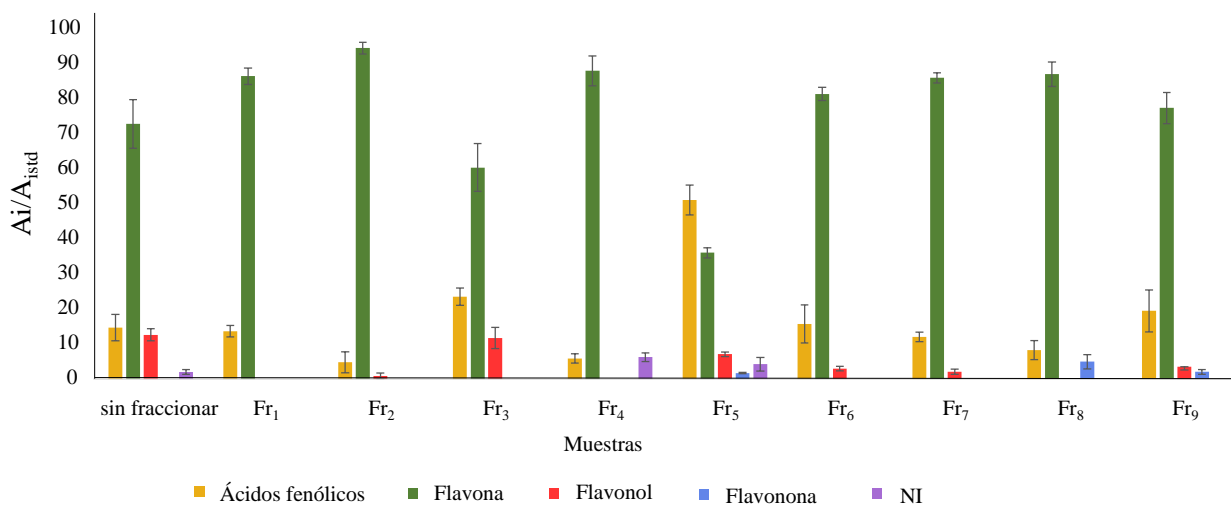


Figura 32. Variación en la composición química, por familias, del extracto hidroalcohólico de la especie vegetal *T. diffusa*. y las fracciones.

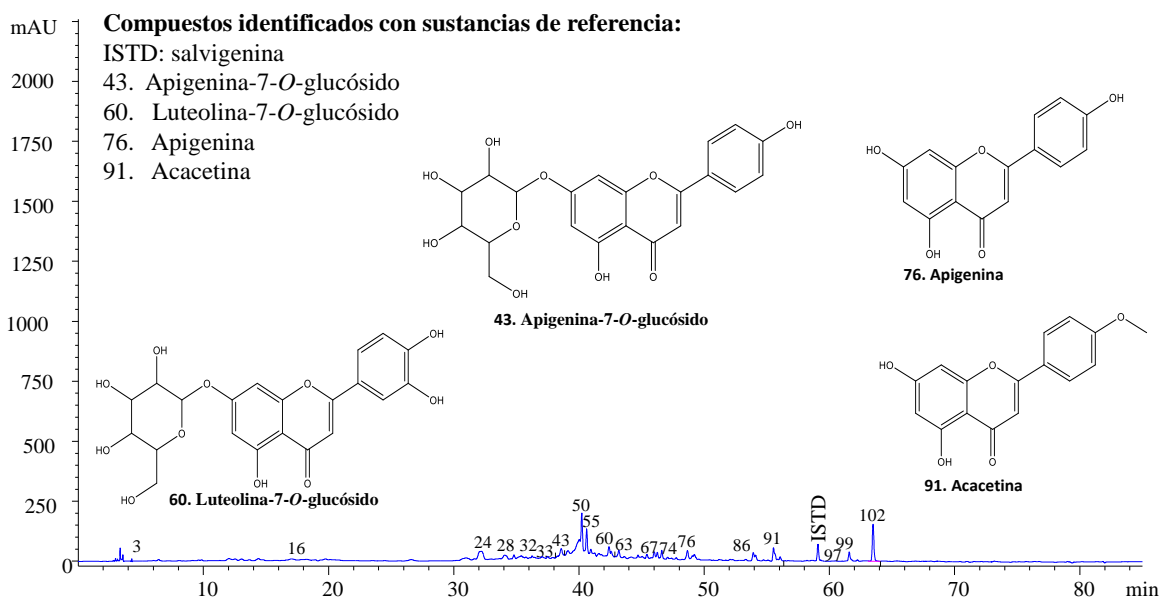


Figura 33. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD del extracto HA de material vegetal bajo estudio de *T. diffusa*. Columna GEMINI C₁₈. ISTD: salvigenina, 30 mg

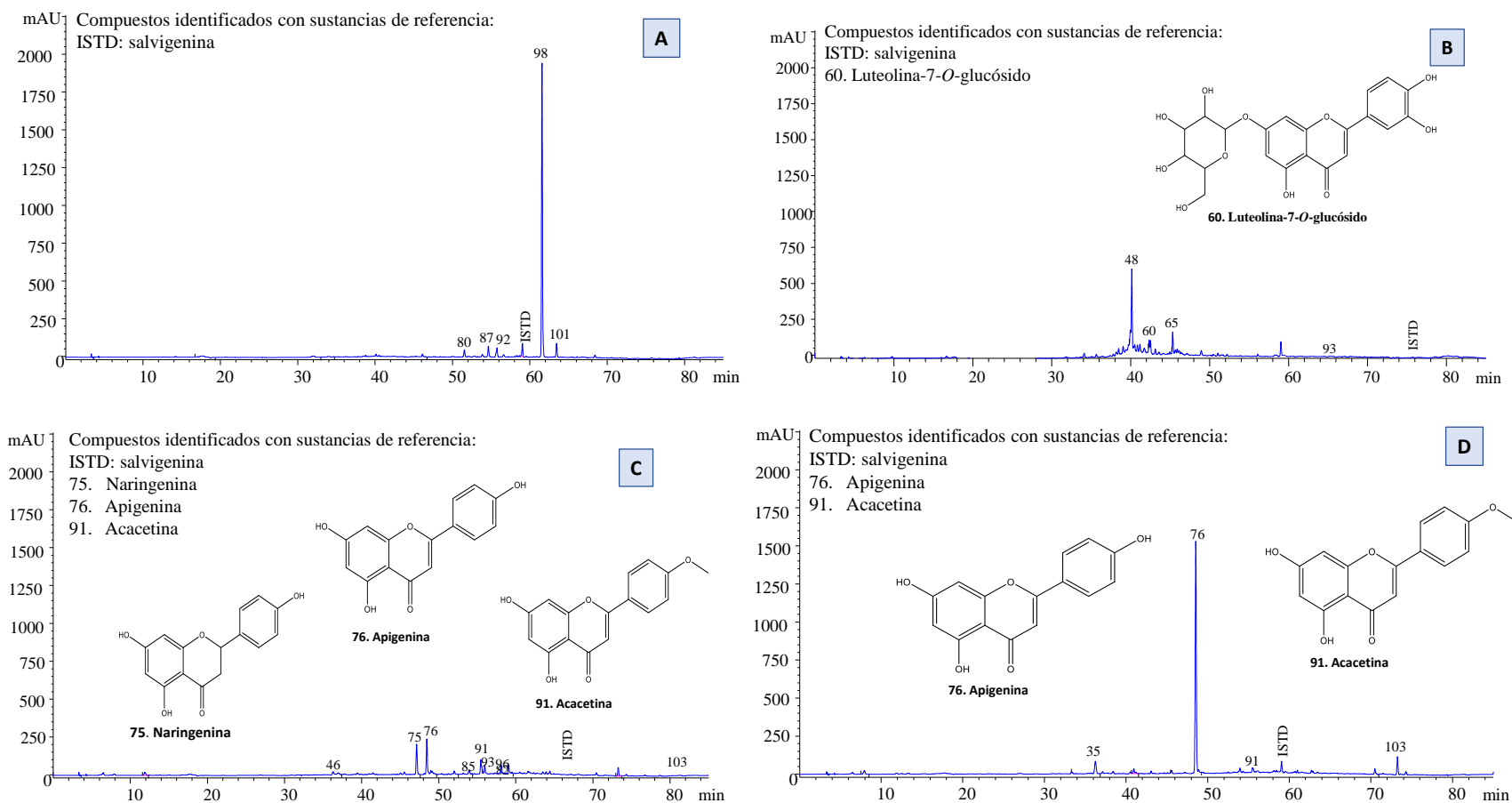


Figura 34. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos bajo estudio de *T. diffusa*. A. Fracción 1; B. Fracción 2; C. Fracción 3; D. Fracción 4. Columna GEMINI C₁₈. ISTD: salvigenina 30 mg/L. La identificación se muestra en el Anexo 11.

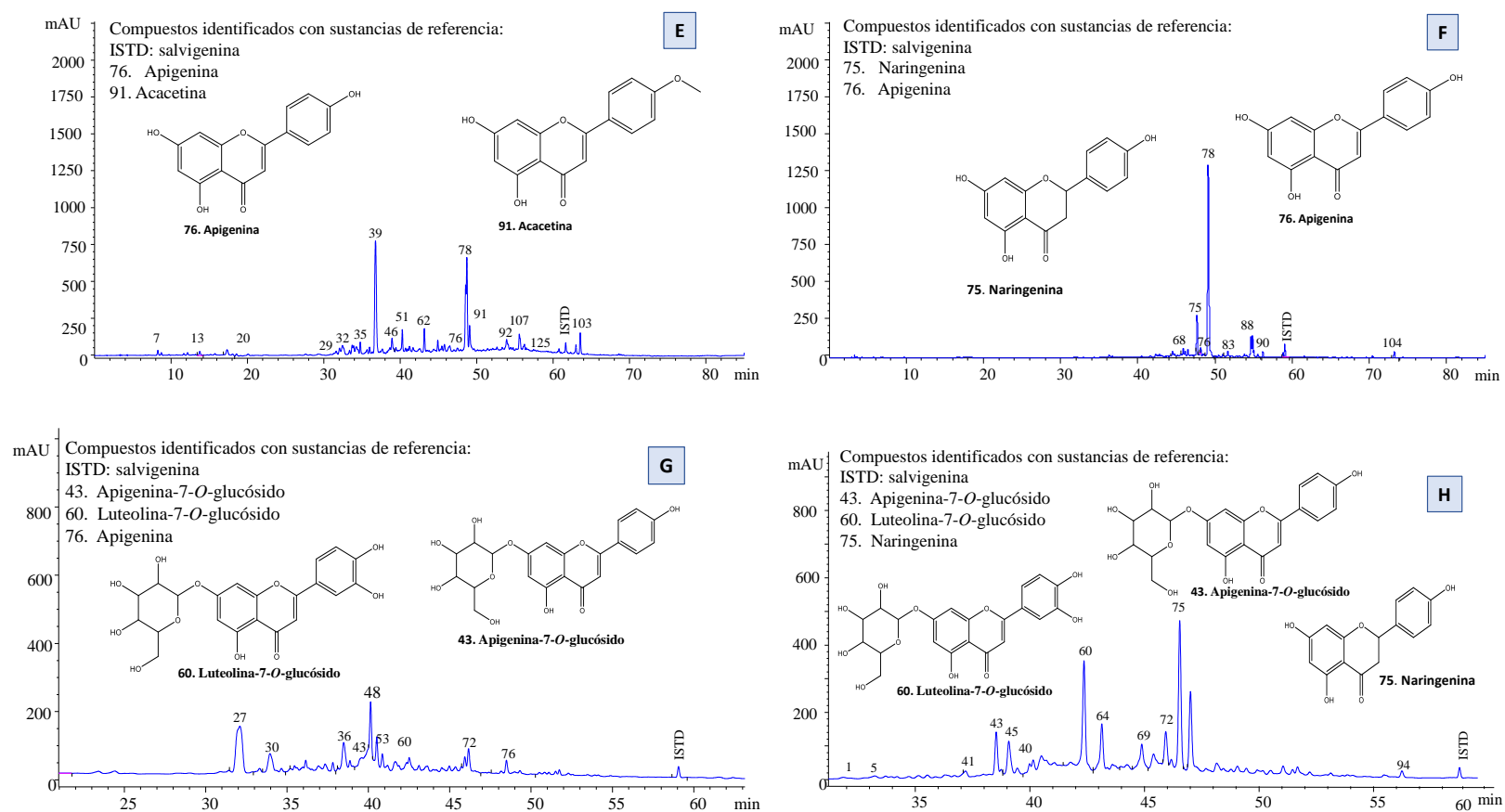


Figura 35. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD de los extractos bajo estudio de *T. diffusa*. E. Fracción 5; F. Fracción 6; G. Fracción 7; H. Fracción 8. Columna GEMINI C18. ISTD: salvigenina 30 mg/L. La identificación se muestra en el

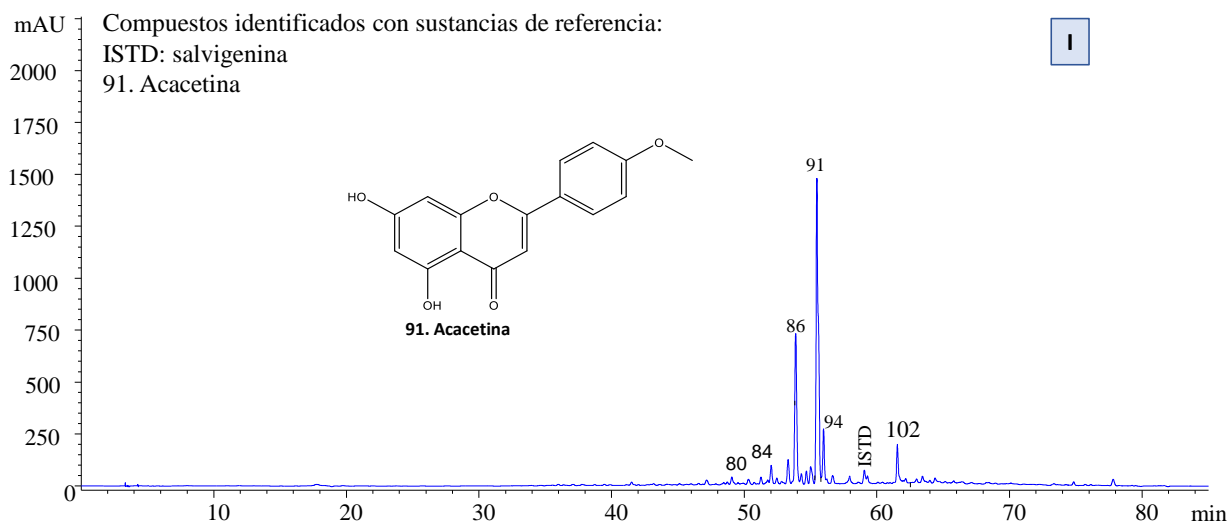
ESTUDIO DEL AE, EXTRACTO VEGETAL Y FRACCIONES DE *L. alba* Y *T. diffusa*

Figura 36. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD del extracto HA de material vegetal bajo estudio de *T. diffusa*. Columna GEMINI C18. ISTD: salvigenina, 30 ppm. La identificación se muestra en el Anexo 11.

3.2.4 Caracterización química por UHPLC/ESI^{+/-}-Orbitrap/MS del extracto hidroalcohólico de *T. diffusa* y sus fracciones.

Las corrientes iónicas extraídas (EIC) de las moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, de los once compuestos identificados, presentes en el extracto hidroalcohólico de partes aéreas frescas de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco, fueron obtenidas mediante análisis por UHPLC/ESI^{+/-}-Orbitrap-MS en modo SIM. (Vease figura 37)

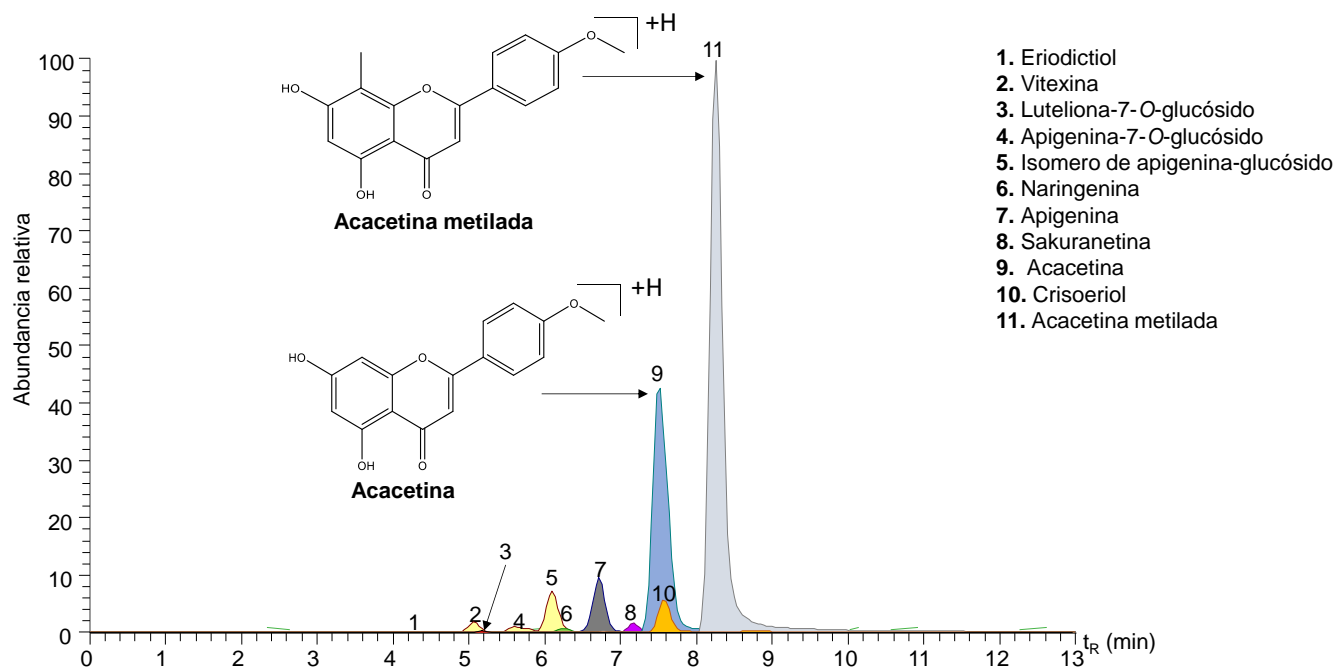
ESTUDIO DEL AE, EXTRACTO VEGETAL Y FRACCIONES DE *L. alba* Y *T. diffusa*

Figura 37. Corrientes iónicas extraídas por UHPLC/ESI^{+/-}-Q-Orbitrap-MS obtenidas en modo SIM, de moléculas protonadas [M+H]⁺ y deprotonadas [M-H]⁻ presentes en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, Véase la identificación de los compuestos en la Tabla 21

Tabla 21. Masas exactas de iones o moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ identificadas por UHPLC/ESI^{+/−}-Orbitrap-MS de compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco.

N° Fi. 30	Compuesto	t _R , min	Fórmula	Masa molecular		Δ ppm	HCD eV ^d	Iones producto		
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻			Fragmento	Fórmula (Δ ppm)	m/z, (%)
1	Eriodictiol ^{a, b, c}	4,9	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	289,07040(100)	287,05611	-0,901	20	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271,05969(3,54)
								[(M+H)-C ₆ H ₆ O ₂] ⁺	C ₉ H ₇ O ₄	179,03374(2,73)
								[(M+H)-H ₂ O-C ₆ H ₄ O ₂] ⁺	C ₉ H ₇ O ₃	163,03882(12,82)
								[(M+H)-C ₈ H ₈ O ₂] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄	153,01810(13,79)
2	Vitexina ^{a, b, c}	5,03	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433,11292(15,91)	431,09837	-0,864	30	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₂₁ H ₁₉ O ₉	415,10168(43,74)
								[(M+H)-H ₂ O-H ₂ O] ⁺	C ₂₁ H ₁₇ O ₈	397,09122(67,56)
								[(M+H)-C ₂ H ₄ O ₂ -2H ₂ O] ⁺	C ₁₉ H ₁₃ O ₆	337,07010(27,97)
								[(M+H)-C ₄ H ₈ O ₄] ⁺	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313,07016 (100)
								[(M+H)-C ₅ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	283,05966 (33,99)
3	Luteolina -7-O-glucósido ^{a, b, c}	5,28	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449,10724(100)	447,10784	1,3339	30	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,05466 (93,21)
4	Apigenina-7-O-glucósido ^{a, b, c}	5,61	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433,11246(3,96)	431,09837	-1,076	20	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271,06014(100)
5	Isómero de apigenina-glucósido ^{a, b}	6,18	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433,11218(100)	431,09837	-1,71	10	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₂₁ H ₁₉ O ₉	415,10168(26,42)
								[(M+H)-H ₂ O-H ₂ O] ⁺	C ₂₁ H ₁₇ O ₈	39,09122(28,31)
								[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271,06014(2,87)
6	Naringenina ^{a, b, c}	6,24	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273,07541(3,06)	271,06119	-1,249	50	[(M+H)-C ₈ H ₈ O] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄	153,01828(100)
								[(M+H)-C ₆ H ₆ O ₃] ⁺	C ₉ H ₇ O ₂	147,04393(42,27)

7	Apigenina ^{a, b, c}	6,77	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271,05984(67,10)	269,04554	0,9406	70	[(M+H)-CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₁ O ₄	243,06558(8,16)
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄	153,01848(100)
								[(M+H)-C ₆ H ₆ O ₃] ⁺	C ₉ H ₅ O ₂	145,02841(16,84)
								[(M+H)-C ₇ H ₄ O ₄] ⁺	C ₈ H ₇ O	119,04931(55,68)
8	Sakuranetina ^{a, b}	7,15	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	287,09140(25,96)	285,07684	1,0627	70	[(M+H)-C ₈ H ₈ O] ⁺	C ₈ H ₇ O ₄	167,03386(27,01)
								[(M+H)-C ₆ H ₆ O ₃] ⁺	C ₁₀ H ₉ O ₂	161,05965(58,88)
								[(M+H)-C ₉ H ₁₀ O] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄	153,01819(100)
								[(M+H)-C ₇ H ₈ O ₃] ⁺	C ₉ H ₇ O ₂	147,04402(18,24)
9	Acacetina ^{a, b, c}	7,46	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285,07575(100)	283,06119	1,8387	50	[(M+H)-CH ₃] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,05273(51,33)
								[(M+H)-CH ₃ -CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₀ O ₄	242,05754(49,41)
								[(M+H)-C ₉ H ₈ O] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄	153,01842(4,46)
								[(M+H)-C ₇ H ₄ O ₄] ⁺	C ₉ H ₉ O	133,06500(3,62)
10	Crisoeriol ^{a, b}	7,53	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301,07066(100)	299,05611	1,6763	50	[(M+H)-CH ₃] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,04718(28,01)
								[(M+H)-CH ₃ -CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	258,05222(29,54)
								[(M+H)-C ₉ H ₈ O ₂] ⁺	C ₇ H ₅ O ₄	153,01855(11,01)
11	Acacetina metilada ^{a, b}	8,22	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	299,09140(100)	297,07684	1,3261	50	[(M+H)-CH ₃] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,06763(65,80)
								[(M+H)-CH ₃ -CO] ⁺	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256,07263(71,18)
								[(M+H)-C ₉ H ₈ O] ⁺	C ₈ H ₇ O ₄	167,03383(4,88)
								[(M+H)-C ₈ H ₆ O ₄] ⁺	C ₉ H ₉ O	133,06477(3,29)

A

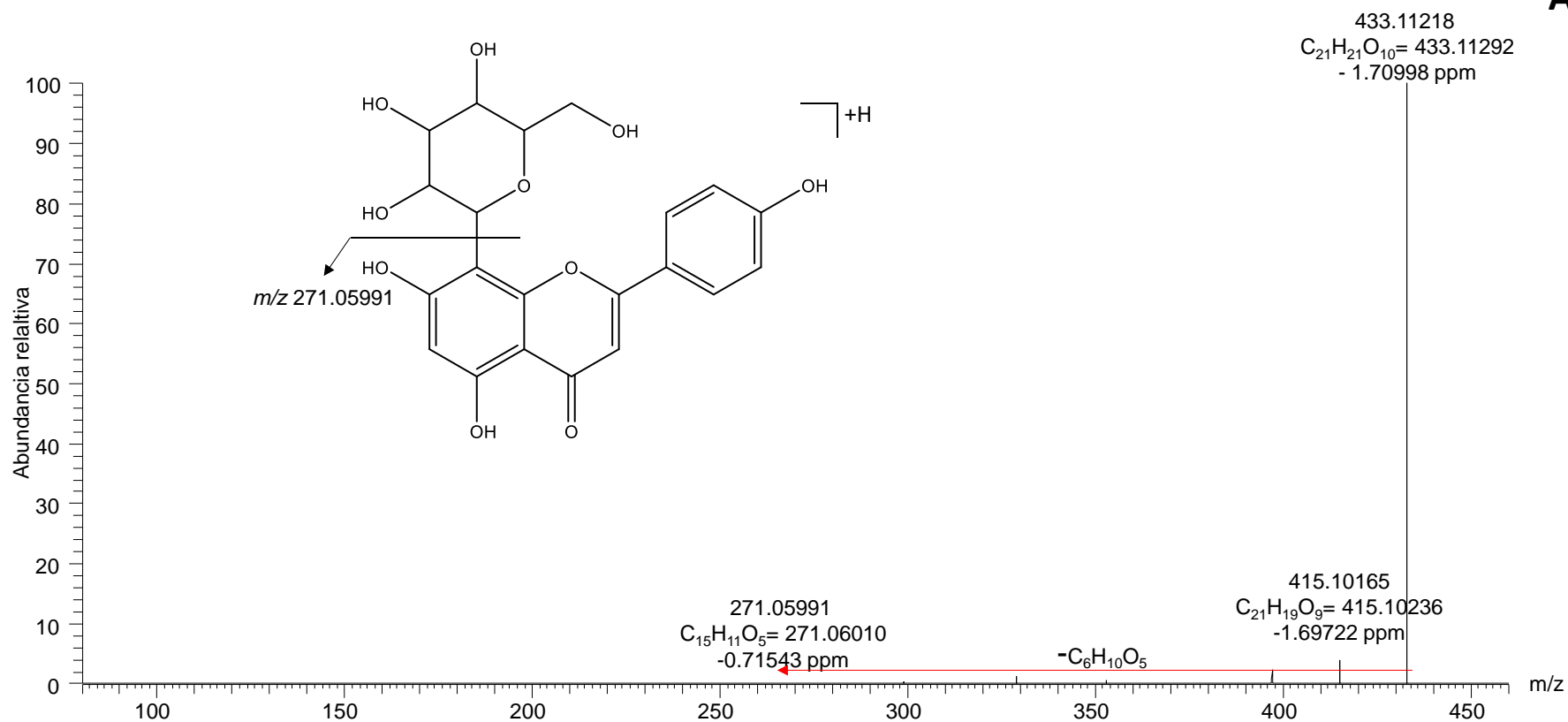


Figura 38. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de la molécula protonada [(M+H)]⁺ de un isómero de apigenina-*O*-glucósido, [SIM, *m/z*: 433, HCD; 10 eV], presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. Véase Tabla 21.

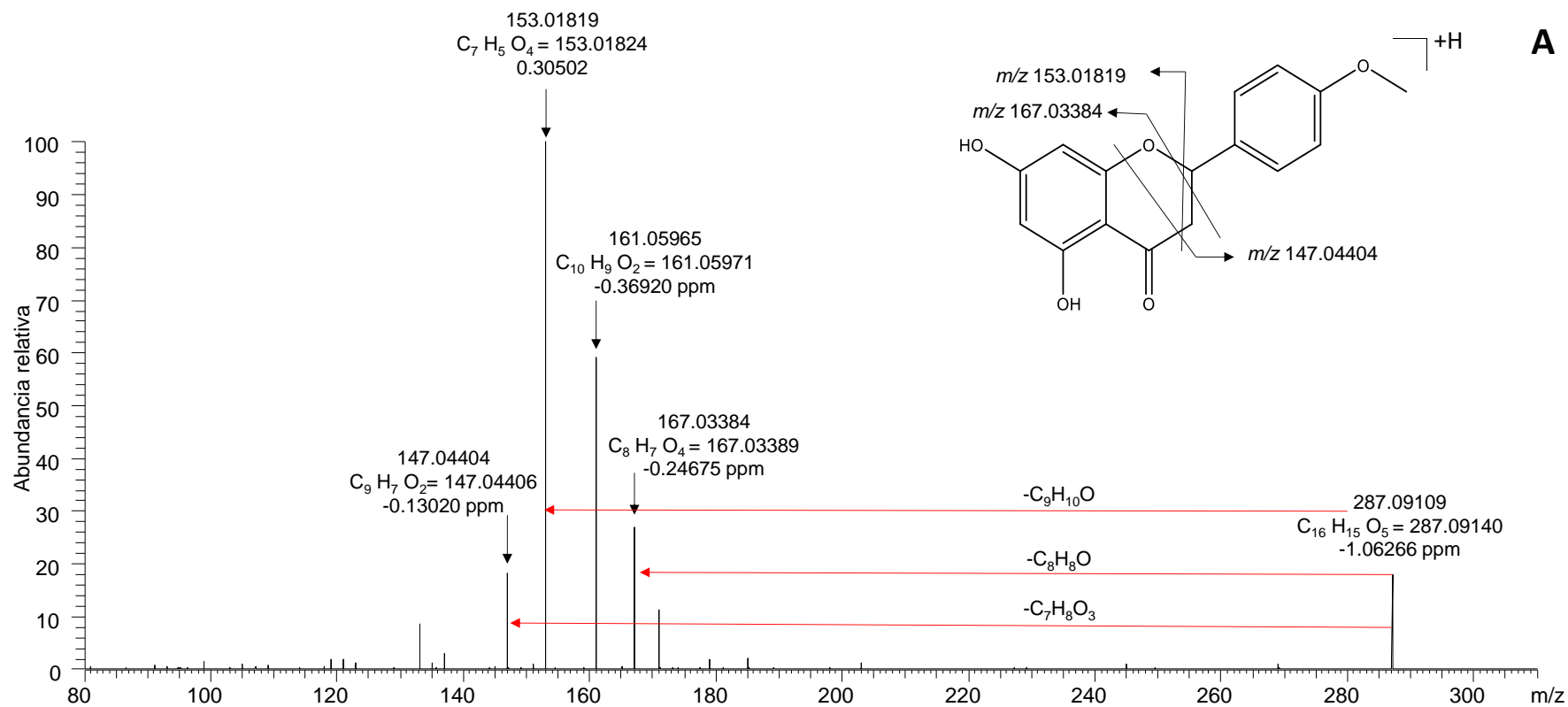


Figura 39. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de la molécula protonada [(M+H)⁺] de sakuranetina [SIM, m/z : 287, HCD; 70 eV], presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. Véase Tabla 21.

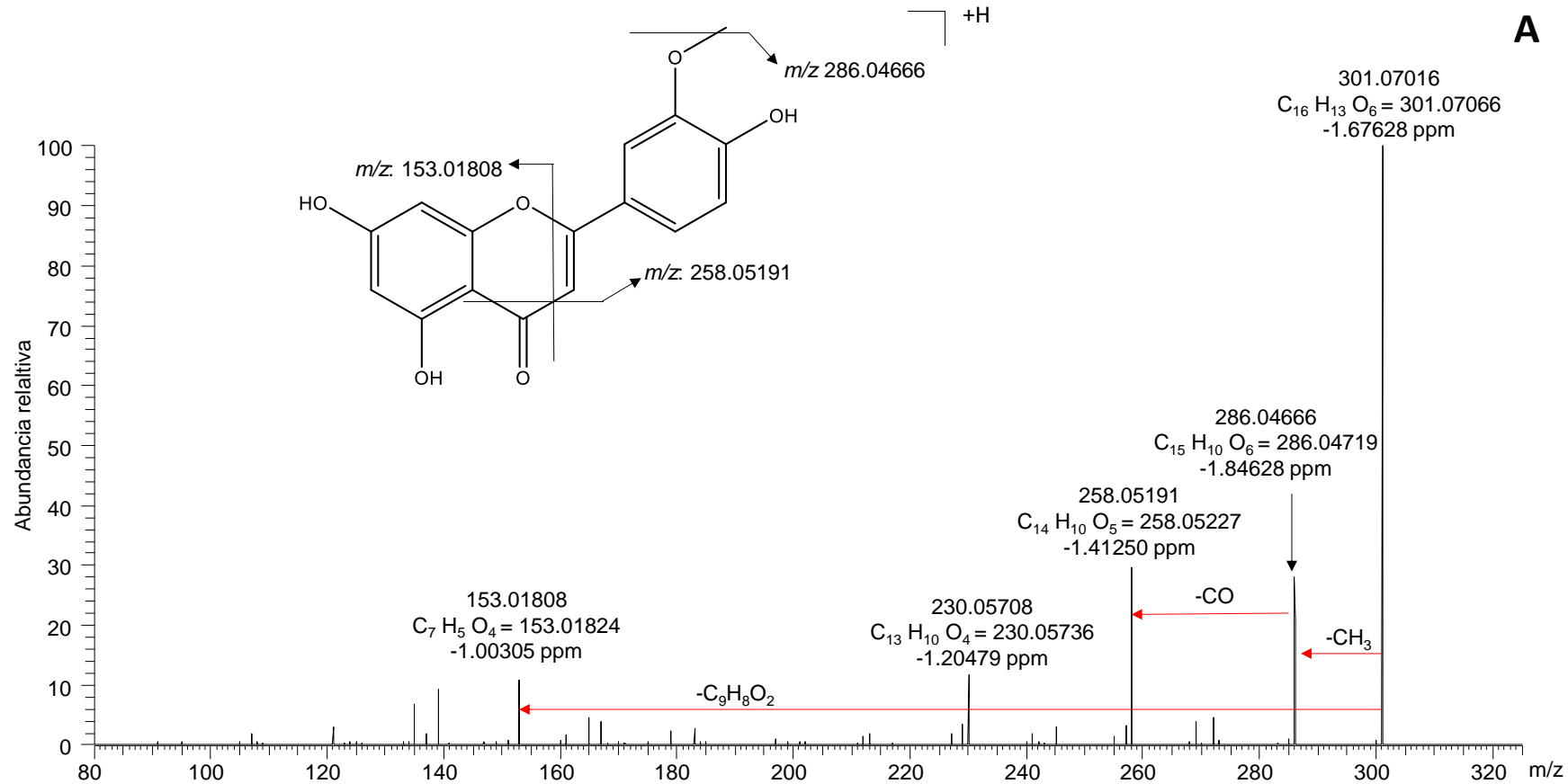


Figura 40. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de la molécula protonada [(M+H)]⁺ de crisoeriol [SIM, m/z : 301, HCD; 50 eV], presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. Véase Tabla 21.

A

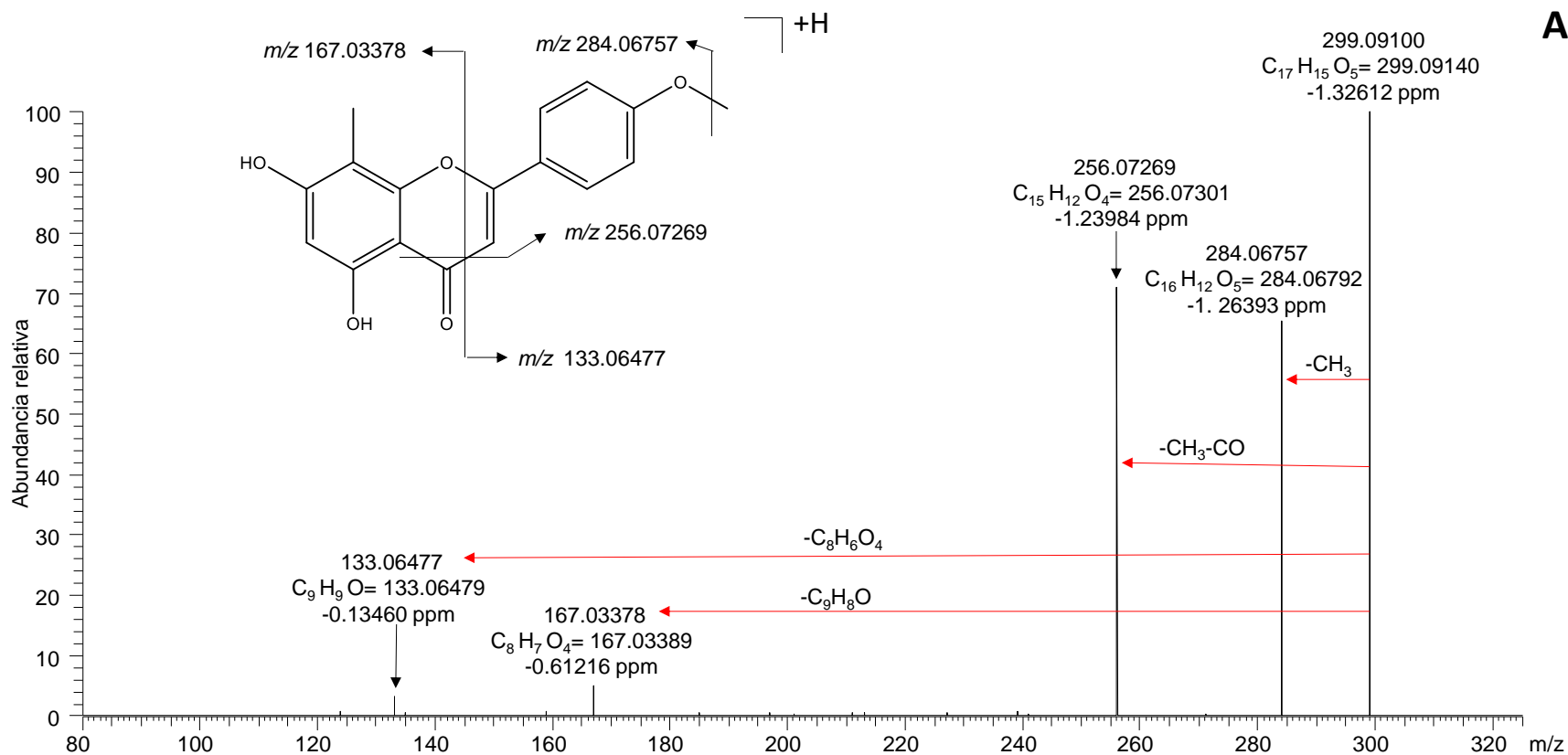


Figura 41. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de la molécula protonada [(M+H)]⁺ de acetina metilada [SIM, m/z : 299, HCD; 50 eV], presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. Véase Tabla 21.

Las corrientes iónicas extraídas (EIC) de las moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa* obtenido de material vegetal fresco se muestran en la **Figura 37**. La identificación de los compuestos se presenta en la **Tabla 21**. En los resultados del análisis por UHPLC/ESI⁺-Orbitrap-MS en modo de adquisición *full scan*, se observaron las señales de once moléculas, estas, fueron encontradas nuevamente haciendo uso del monitoreo de ion seleccionado (SIM) y finalmente usando el modo *step scan* se observó la variación del espectro de masas al variar la energía de la celda de colisiones activadas (HCD), con energías de 10, 20, 30, 40, 50, 60, y 70 eV. Las señales observadas se compararon con sustancias de referencia certificadas, confirmando la presencia de eriodictiol, vitexina, luteolina-7-*O*-glucósido, apigenina-7-*O*-glucósido, naringenina, apigenina y acacetina, véanse **Anexos 12-18**. También se identificaron sakuranetina, acacetina metilada y un isómero de apigenina-7-*O*-glucósido de forma tentativa por comparación con las bases de datos (*Human Metabolome Database* HMDB 2019 y *MassBank of North América* 2018) véanse **Figuras 38-41**.

En las fracciones del extracto hidroalcohólico de *T. diffusa* se observó una variación en el área ocupada por cada uno de los metabolitos secundarios, se encontró que en la fracción 1 el compuesto mayoritario fue acacetina metilada, este resultado, concuerda con el obtenido mediante análisis HPLC/DAD, en donde se encontró un derivado de flavona con $t_R:61,5$, como compuesto mayoritario de la fracción 1. En la **Tabla 22** se expone la variación de la composición química de cada una de las fracciones y en la **Tabla 23** se discuten las propiedades biológicas que el enriquecimiento en ciertos compuestos de interés pueden proporcionar a la muestra.

Tabla 22. Compuestos identificados por UHPLC/ESI[±]-Q-Orbitrap-MS en las fracciones de los extractos hidroalcohólicos de *T. diffusa*.

Compuesto	Formula	Área cromatográfica, cuentas x10 ⁵									
		Extracto	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	Fracción 5	Fracción 6	Fracción 7	Fracción 8	Fracción 9
Eriodictiol	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	13,0	ND	ND	32,2	281	298	908	21,7	16,1	0,22
Vitexin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	446	ND	667	857	7,3	190	431	46,9	105	ND
Luteolina-7-glucocido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	84,1	22,2	173	45,6	96,7	846	210	743x10 ²	9270	ND
Apigenina-7-O-glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	357	71,6	117	426	978	507	2520	215x10 ²	203x10 ²	0,26
Isómerode apigenina-O-glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	1820	26,2	1840	2230	487	241	306	1,62x10 ⁸	162	140
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	118	1220	71,2	709	282	392	6150	577	8190	0,55
Apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	2040	ND	307x10 ²	560x10 ²	539x10 ³	141x10 ²	3860	72,2	21,2	24,6
Sakuranetina	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	184	ND	ND	2500	297	482	10,4	5,5	12,5	ND
Acetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	9210	114	363x10 ²	1940	3600	3930	259	693	389	389x10 ³
crisoeriol	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	871	ND	2970	3770	662x10 ²	1960	160	12,6	23,4	ND
Acetina metilada	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	182x10 ²	419x10 ³	511x10 ²	6910	2250	4820	3830	1580	1780	ND

^a Identificación tentativa basada en el espectro de masas y el patrón de fragmentación.

^b Identificación tentativa basada en [M+H]⁺, reportado en la literatura científica para *T. diffusa*.

^c Identificación confirmatoria basada en el espectro de masas y por su comparación con el espectro de masas de una sustancia de referencia certificada.

^d HCD: Celda de disociación por colisión de alta energía. [10, 20,30,40,50,60,70] eV.

*N.D.: No identificado.

Tabla 23. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados, presentes en los extractos hidroalcohólicos de *T. diffusa*.

Compuesto	Grupo	Actividad biológica	Metodo de evaluación	Referencia
Eriodictiol	flavanona	Antioxidante	<i>In vitro</i> : células de cáncer de hígado humano (HepG2)	Akanda M, y col (2017)
		Antiinflamatoria	<i>In vitro</i> : condrocitos estimulados con IL-1 β	Wang Y, y col (2018)
Naringenina	flavanona	Expectorante	<i>In vivo</i> : ratones Kunming machos y hembras	Lin B, y col (2008)
		Antioxidante	<i>In vitro</i> : ABTS, FRAP	Cavia, y col (2010)
Sakuranetina	Flavonol	Antioxidante	<i>In vivo</i> : método de <i>Aebi</i> en ratas <i>Wistar</i> hembra	Doğan Z, y col (2015)
		Antiinflamatoria	<i>In vitro</i> : inhibición de la expresión del gen COX-2	Wang L, y col (2008)
		Antioxidante	<i>In vitro</i> : DPPH	
Apigenina	Flavona	Anticancerígena	<i>In vivo</i> : <i>Rattus norvegicus</i>	Wei H, y col (1990)
		Antiinflamatorias	<i>In vivo</i> : ratones BALB/C inmunizados con ovoalbúmina	Liang Y, y col (1999)
		Antitumoral	<i>In vivo</i> : células endoteliales humanas	Lindenmeyer F, y col (2001)
Tricina-7-glucurónido		Antioxidante	<i>In vitro</i> , DPPH	Almeida J, y col (2007)
		Antiproliferativa	<i>In vitro</i> : células de la línea NIC/ADR (Humano)	
Crisoeriol		Antioxidante	<i>In vitro</i> : BHT	David J, y col (2002)
Acacetina	flavona	Neuroprotectora	<i>In vivo</i> : ratones C57BL/6	Kim, M. y col (2012)
		Antiinflamatoria	<i>In vitro</i> : tejido pulmonar de ratones C57BL/6 asmáticos sensibilizados con ovoalbúmina	Huang W, y col (2012)
		Hepatoprotectora	<i>In vivo</i> : ratones C57BL/6	Liu X, y col (2018)
		Antihistamínica,	<i>In vitro</i> en mastocitos intestinales de ratas cultivadas infectadas con <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> .	

4. Ensayo de actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales, extractos vegetales y sus fracciones de *L. alba* y *T. diffusa* mediante ensayos de decoloración del catión-radical ABTS⁺

En la **Figura 42**, se presenta la curva de calibración de Trolox®, usada para la cuantificación de la actividad antioxidante, medida por el método de decoloración del catión-radical ABTS⁺, de los AE, extractos vegetales y sus fracciones obtenidos de *L. alba* y *T. diffusa*. Los resultados se presentan en la **Tabla 24**, como equivalentes μmol de Trolox®/g de muestra.

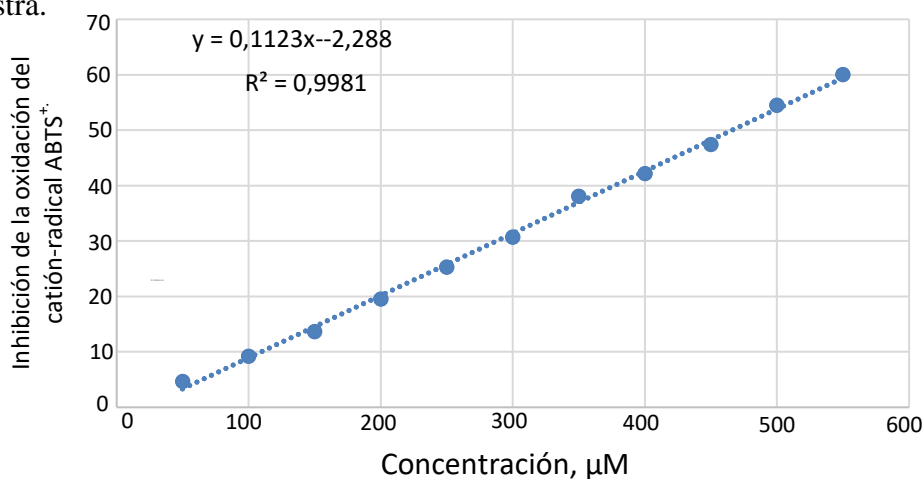


Figura 42. Curva de calibración de Trolox® usada para cuantificar la actividad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺.

Tabla 24. Resultados de actividad antioxidante media por ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺ para los AE y extractos vegetales de *L. alba* y *T. diffusa*.

Decoloración del catión-radical ABTS ⁺			
<i>L. alba</i>		<i>T. diffusa</i>	
Aceite esencial	μmol Trolox®/g de muestra	Aceite esencial	μmol Trolox®/g de muestra
AE sin fin fraccionar	12,10± 0,02	AE sin fin fraccionar	20,10 ± 0,02
Fracción 1	7,0 ± 03	Fracción volátil	43,7 ± 0,3
Fracción 2	10,8± 0,2	Fracción de fondo	22,2 ± 2
Fracción 3	16,6± 0,2		
Fr. de fondo	18,91 ± 0,7		
Extractos hidroalcohólicos		Extractos hidroalcohólicos	
Extracto de <i>L. alba</i>	352 ± 3	Extracto de <i>T. diffusa</i>	371± 6
Fracción 1	48,5 ± 5	Fracción 1	522± 6
Fracción 2	287 ± 3	Fracción 2	689± 8
Fracción 3	667 ± 7	Fracción 3	122± 5
Fracción 4	306 ± 8	Fracción 4	320± 10
Fracción 5	1092 ± 4	Fracción 5	340 ± 10
Fracción 6	1442±7	Fracción 6	961± 9
Fracción 7	1190 ± 6	Fracción 7	904 ± 8
Fracción 8	850 ± 6	Fracción 8	880± 35
Fracción 9	949 ± 4	Fracción 9	520± 32
Patrones			
BHT	3190± 10	Luteolina	4800± 31
σ-tocoferol	415± 9	Apigenina	2700± 15
Quercetina	992± 13	Vitexina	2700± 12

E
n los
ensay
os de
activi
dad
antiox
idante
con el
catión
-
radica
l
ABTS
+ del

AE destilado de *L. alba* y sus fracciones, se observó que al fraccionar el AE hay una variación en la actividad antioxidante, las fracciones con mayor porcentaje de cetonas metiladas (fracción 1) y monoterpenos (fracción 2), véase **Tabla 10**, presentaron una disminución en la actividad antioxidante 7,04 y 10,81 μmol Trolox®/g de muestra respectivamente, en relación con

el AE sin fraccionar (12,10 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra) mientras que la fracción enriquecida en monoterpenos oxigenados tales como neral, geranial, geraniol y linalol, presentaron aumento de inhibición con 16,61 y 18,94 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra en las fracciones 3 y 4 respectivamente. véase **Tabla 24**.

Con relación a la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico obtenido de *L. alba* quimiotipo citral, se observó que las fracciones 3, 5, 6, 7, 8 y 9 presentaron aumento en la actividad antioxidante y las fracciones 1, 2 y 4 una disminución al compararla con la muestra de extracto sin fraccionar.

La fracción 1 carece de compuestos que otorguen actividad antioxidante significativa (48,53 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra), en la fracción 2 la familia más abundante es la de las flavonas, con luteolina-7-*O*-glucósido como compuesto mayoritario y principal responsable de la actividad antioxidante reportada (287,08 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra). En la fracción 3 hay dos compuestos mayoritarios ocupando más del 60% del área cromatográfica, estos son de las familias de los ácidos orgánicos y las flavonas, con una actividad antioxidante de 667,38 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra, en la fracción 4 se observaron un gran número de compuestos en bajas concentraciones, mayoritariamente pertenecientes a la familia de los ácidos orgánicos, su actividad antioxidante fue inferior al extracto previo al fraccionamiento (306,06 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra).

Las fracciones 5, 6 y 7 presentaron un aumento en la actividad antioxidante con respecto al extracto previo al fraccionamiento, teniendo; 1092, 1442 y 1190 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra respectivamente, estas fracciones están enriquecidas en más del 94% con ácidos orgánicos véase **Figura 18**; destacándose los ácidos rosmarínico y ácido ferúlico, compuestos reportados con actividad antioxidante por Tupas y col. (2020). En la fracción 8 se reportó una actividad

antioxidante de 849,56 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra y está constituida por dos familias, principalmente, los ácidos orgánicos y las flavonas. finalmente la fracción 9 presento uno de los mayores resultados en inhibición de oxidación con 949,21 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra, esto es debido a que esta fracción está constituida en un 95% de derivados de flavonas, siendo mayoritaria la apigenina, compuesto con actividad antioxidante reportada por Oliveira G y col. (2018) y Chies C y col. (2013) en Colombia.

El AE de *T. diffusa* ha sido estudiado por diversos investigadores; Urbizu G y colaboradores en 2017 determinaron por ensayos de actividad antioxidante con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ una moderada actividad antioxidante, similar al obtenido experimentalmente en este estudio $20,10 \pm 0,02 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra. Al someter este AE al fraccionamiento a presión reducida se obtuvieron dos fracciones ampliamente diferenciadas en su composición química veasé **Sección 3.2.1**. La fracción 1, está constituida en más del 90% en compuestos volátiles, con enriquecimiento principalmente en *p*-cimeno ($\text{AI}/\text{A}_{\text{Istd}} 3 \pm 01$), la actividad antioxidante de este monoterpeneo fue estudiada y reportado por Olivera y col. (2014) y es el principal contribuyente del aumento en la actividad antioxidante de esta fracción $42,67 \pm 0,32$. La fracción 2 esta enriquecida en un 99% en sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados, siendo los compuestos mayoritarios aristolocheno (sesquiterpeno) y dehidrofuquinona (sesquiterpeno oxigenado), estos compuestos no tienen reportes de ensayos de actividades biológicas relacionada con la actividad antioxidante, sin embargo el resultado del ensayo realizado con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ en este estudio mostró baja actividad antioxidante para esta fracción ($22,3 \pm 2,27 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra).

El extracto hidroalcohólico y las fracciones de *T. diffusa* exhibieron una menor capacidad para atrapar el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ en comparación con las sustancias de referencia (BHT y α -

tocopherol) y más bajos que los reportados por Wong-Paz y col en 2014 quienes reportaban un alto potencial antioxidante. El extracto de *T. diffusa* estaba constituido, principalmente, por flavonas como luteolina, acacetina y quercetina, y mostró una actividad antioxidante de 371 ± 6 , $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra, después de someter este extracto a fraccionamiento se conservó este comportamiento; en las fracciones 1,2,3,4,6,7,8,9 la familia predominante fue la de las flavonas, presentando enriquecimiento en ciertos compuestos característicos que otorgan una actividad antioxidante determinada, en la fracción 1 se observó un aumento de la actividad antioxidante obteniendo $522,03 \pm 6,32$ $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra, con un pico N.I perteneciente a un derivado de flavona ocupando el 85% del área, la mayor actividad antioxidante se observó en las fracciones 6, 7 y 8 con $961,01 \pm 9,27$, $903,83 \pm 7,59$ y $882,78 \pm 34,73$ $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra respectivamente, en estas fracciones se observó enriquecimiento en flavonas como apigenina, luteolina, acacetina y sus derivados glucosilados, reportadas con actividad antioxidante por ensayo de ABTS⁺ por Yuri-Cordoba y colaboradores en 2019.

5 Conclusiones

Mediante fraccionamiento en columna rotatoria a presión reducida (*BR-instrument 800-High Efficiency Micro Destillation*) se enriquecieron en compuestos de interés los AE de las especies vegetales *L. alba* y *T. diffusa*. En el AE de *L. alba* se observó que las fracciones obtenidas a temperaturas (T_1) mayores que 77 °C, enriquecidas en monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos presentan un aumento en la actividad antioxidante medida por el método de catión-radical ABTS⁺. con respecto al AE sin fraccionar.

En el AE destilado la especie vegetal *T. diffusa* se observó que la fracción volátil presentaba un aumento en la actividad antioxidante respecto al AE sin fraccionar, medido por el método de catión-radical ABTS⁺, este aumento se debe al enriquecimiento en los monoterpenos *p*-cimeno y Δ^3 -careno, reportados con potencial antioxidante por Olivera y col., (2014).

Mediante UHPLC/ESI^{+/-}-Q-Orbitrap-HRMS se identificaron compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos obtenidos del material vegetal de las plantas bajo estudio. En el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa* se identificaron por primera vez la vitexina y la sakuranetina pertenecientes a las familias flavona y flavanona, respectivamente. En el extracto hidroalcohólico de *L. alba* se identificaron por primera vez la cumarina mahalebósido junto con dos de sus isómeros y el flavonol 3,7-dimetilquercetina.

El fraccionamiento mediante Prep/HPLC permitió obtener fracciones enriquecidas con los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*. Se observó que después de 11.7 minutos de corrida cromatográfica, es decir, una relación de solventes agua tipo I/metanol HPLC (A/B, %) comprendida entre 70A/30B a 100%B, aumentó la actividad antioxidante en comparación con el extracto previo al fraccionamiento. Este intervalo corresponde a las

fracciones 5, 6, 7, 8 y 9. En las fracciones 5 a 7, la familia mayoritaria fue la de los ácidos orgánicos con ácido rosmarínico, ácido clorogénico y ácido ferúlico como compuestos mayoritarios. En las fracciones 8 y 9, se observó una actividad antioxidante comparable a la de los patrones de referencia (como el σ -tocoferol), generada por el enriquecimiento en flavonas como luteolina y apigenina (David J. *et al.*, 2002, y Rice C. *et al.*, 2022).

Mediante cromatografía en columna abierta se lograron separar los compuestos coeluidos analizados por HPLC/DAD del extracto complejo de la especie *T. diffusa*, generando fracciones sencillas diferenciadas en su composición. Las fracciones de mayor polaridad, obtenidas con la relación de solventes diclorometano/metanol (A/B, %) 93A/7B - 100% B presentaron la mayor actividad antioxidante *in vitro*, medida por el método de catión-radical ABTS⁺, y enriquecimiento en flavonas como apigenina y acacetina principales responsables de la actividad antioxidante (David J y col. 2002).

Divulgación de resultados

Participé en 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, el XVIII COLACRO, el X COCOCRO, el II SPAE y el IV C2B2, bajo la modalidad póster, titulado: Caracterización química por GC/MS de los compuestos presentes en el aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. Cartagena de indias. Colombia. 11 al 15 de octubre del 2021.

Participé en el congreso: XII international mass spectrometry conference on petrochemistry, environmental and food chemistry, bajo la modalidad póster, titulado: GC/MS characterization of the major compounds in the essential oil and its fractions obtained from two chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae). Creta. Grecia. 16 de abril del 2022.

Participé en 3rd Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry, bajo la modalidad póster, titulado: GC/MS analysis from *Lippia alba* essential oil and its fractions, harvested in different locations of Santander Colombia. Rio de Janeiro. Brasil. 10 al 15 de diciembre del 2022.

Referencias bibliográficas

- Agudelo, G., Lee, S., Durán, C., Stashenko, E., Betancur, L. (2010). Composición química y evaluación de la actividad antiherpética *in vitro* de aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown y sus componentes mayoritarios. *Salud UIS*. 42(3), 230-239.
- Alcaraz, M. L., Delgado, R. J., Real, C. S. (2004). Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*, 75(7-8), 696-701.
- Alexandra Ghițu, Ioana Zinuca Pavel, Stefana Avram, Brigitta Kis, Daliana Minda, Cristina Adriana Dehelean, Valentina Buda, Roxana Folescu, Corina Danciu, (2021). Una evaluación *in vitro-in vivo* del efecto antiproliferativo y antiangiogénico de Flavone Apigenin contra SK-MEL- 24 Línea celular de melanoma humano, *Patología celular analítica*, (1-5).
- Amir, D., Yakir, E. y Bohbot, JD (2019). The sulcatone receptor of the nectar-feeding mosquito *Toxorhynchites amboinensis stricto*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 111.
- Antonio, N. S., Selene M., Machado, M. M., Vasconcelos, S., Malta, L. (2021). Actividad antiviral sobre el virus del Zika y actividad larvicida sobre el *Aedes* spp del aceite esencial de *Lippia alba* y β -cariofileno. *Industrial Crops and Products*. 162, 113281.
- Avelino-Flores, M. D. C., Cruz-López, M. D. C., Jimenez-Montejo, F. E., Reyes-Leyva, J. (2015). Cytotoxic activity of the methanolic extract of *Turnera diffusa* Willd on breast cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, 18(3), 299-305.
- Bagher, S., Mousavi, K., Souza, S. (ed.) (2018). Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications. 1th ed. *Wiley Blackwell. River Street, Hoboken, Estados Unidos*. 2-6.
- Bahor, A., Siddequi, A. (1999) Bioactive naturally occurring flavonoids. *Journal of Hamdard Medicus*, 52(1). 6-8.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008). Biological effect of essential oils. A review. *Food Chemistry Toxicology*, 46 (2), 446-475.

- Balcinde, Y., Tirado, S., Pérez, C., Falero, A., Martí, E., Pineda, M., Rosa, H. (2005). Cromatografía en capa delgada para la separación de los componentes del producto obtenido a partir de cera cruda de caña de azúcar. *Ciencias Químicas*, 36(1), 3–7.
- Bandoni, A. (Ed). (2000) Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 1th ed. *Red de Editoriales Universitarias*. La Plata, Argentina. 18-22.
- Barrios, S., Stashenko, E., Ocazonez, R., Fuentes, J. (2021). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas que crecen en Colombia y su efecto sobre la actividad de los antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 54(4), 1–3.
- Base de datos de educación científica de JoVE (2022). Cromatografía de gases (GC) con detección de ionización de llama. *Química analítica*. 3-6.
- Beatriz, E., Jaramillo-Colorado, Elena E. Stashenko., Peter, W. (2019). Fractionation of four Colombian essential oils by countercurrent chromatography and evaluation of their antioxidant activity. *Journal of Essential Oil Research*. 1-11.
- Belmares, C., Garza, V. D. A., Garza, G., Rodríguez, H. R., Martínez, V. M., Aguilar, C. N. (2013). Actividad citotóxica de extractos de *Turnera diffusa* fermentada y no fermentada. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 5(9), 124-136.
- Bernal, R., Robberts, S. y Celis, M. (2007). Catálogo de las plantas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 3-5.
- Bueno, J., Stashenko, E., Martínez, J., Leal, S., Escobar, P. (2011). Composición de tres aceites esenciales y su toxicidad en células de mamíferos y actividad antimicobacteriana contra cepas de micobacterias tuberculosas y no tuberculosas resistentes a los medicamentos. *Comunicaciones de Productos Naturales*, 6(11), 1743–1748.
- Castro, N. P., Flechas, M. C., Ocazonez, R., Stashenko, E., Olivero-Verbel, J. (2015). Potential interaction of components from essential oils with dengue virus proteins. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(3), 141-155.
- Cavia-Saiz, M., Busto, MD, Pilar-Izquierdo, MC, Ortega, N., Pérez-Mateos, M., & Muñiz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and protective capacity of biomolecules of the flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), 1238–1244.

- Chai, T. T., Wong, F. C. (2012). Whole plant profiling of total phenolic and flavonoid contents, antioxidant capacity and nitric oxide scavenging capacity of *Turnera subulata*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(9), 1730-1735.
- Chies, C. E., Branco, C. S., Scola, G., Agostini, F., Gower, A. E., Salvador, M. (2013). Antioxidant effect of *Lippia alba* (Miller) NE Brown. *Antioxidants*, 2(4), 194-205.
- Coronado, A. E., Sánchez, E. J., López, C. J., Robles, Z. R., Velázquez, C., Sánchez, M. D. (2016). Actividad antimicrobacteriana de plantas medicinales utilizadas por el pueblo Mayo de Sonora, México. *Revista de Etnofarmacología*, Hermosillo, México. 180, 107–112.
- Croteau, R. T. M., Kutchan, N. G. (2000) "Natural products (secondary metabolites)". *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 24th ed. *American Society of Plant Physiologists*. Maryland, Estados Unidos. 337-338.
- Cuadros, R. D. F., Martínez, H. A. L. (2007). Diseño y construcción de un equipo de destilación para la extracción de aceites esenciales, usando los métodos de hidrodestilación, arrastre con vapor y destilación agua/vapor. [Trabajo de grado]. Escuela de Química. *Universidad Industrial de Santander*. 32-33.
- David, J. P., Santos, E. O. D., Miranda, M. S., Barreiros, A. L., Santos, I. D. D., & David, J. M. (2002). Atividade antioxidante da epicatequina-(2 β →7, 4 β →8)-epicatequina isolada de *Dioclea lasiophylla*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, 5-6.
- De Oliveira, T. M., de Carvalho, R. B. F., da Costa, I. H. F., de Oliveira, G. A. L., de Souza, A. A., de Lima, S. G., & de Freitas, R. M. (2014). Evaluation of *p*-cymene, a natural antioxidant. *Pharmaceutical Biology*, 53(3), 423–428.
- Demain, A., Colmillo, A. (2000). Las funciones naturales de los metabolitos secundarios. En: Fiechter, A. (Ed). *Historia de la biotecnología moderna I. Avances en ingeniería bioquímica/biotecnología*. Berlín, Heidelberg. Springer. 69, pag.1-3.
- Días, M., Neves, L., Alves, C., Nogueira, J., Neves, F., Carvalho, J., Ferreira, M. (2021). Actividad antihelmíntica *in vitro* del aceite esencial de *Lippia alba* combinado con fibroína de seda contra monogéneos de *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae). *Aquaculture*, 52(10), 5099–50101.

- Doğan, Z., Kocahan, S., Erdemli, E. et al. (2015). Effect of chemotherapy exposure prior to pregnancy on fetal brain tissue and the potential protective role of quercetin. *Cytotechnology* 67, 1031–1038.
- Duarte-Almeida, J. M., Negri, G., Salatino, A., de Carvalho, J. E., & Lajolo, F. M. (2007). Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. *Phytochemistry*, 68(8), 1165–1171.
- Echeverría, V., Echeverría, F., Barreto, G., Echeverría, J. (2021). Estrogenic plants: to prevent neurodegeneration and memory loss and other symptoms in women after menopause. *estrogenic plants*. 12, 3–5.
- Fabricant, DS y Farnsworth, NR (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Perspectivas de salud ambiental*, 109(1), 69–75.
- Figuroa Gualteros, A. M., Castro, Triviño, E. A., Castro, H. T. (2019). Efecto bioplaguicida de extractos vegetales para el control de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo de maíz (*Zea mays*). *Acta Biológica Colombiana*, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 24(1), 58–66.
- Guiochon, G. (2002). Preparative liquid chromatography. *Chromatography Review A*, 965(1-2), 129–128, 139-152.
- H. G. Kim, M. S. Ju, S. K. Ha, H. Lee, H. Lee, S. Y. Kim, M.S. (2012). Oh Acacetin protects dopaminergic cells against neuroinflammation induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine in vitro and in vivo Biol. *Farmacia Toro*. 35 (8). 1287 – 1294.
- Henao, R, S. C., Martínez, J. D., Pacheco, N. L., Marín, J. C. (2011). Antibacterial activity of aqueous extracts of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown against *Helicobacter pylori*. *Colombian Journal of Gastroenterology*, 26(2), 82-87.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., Bailleul, F. (2008). Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 211–222.
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham C. R. (2005). The *Orbitrap*: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* 40, 430–443.
- Huang WC, Liou CJ. (2012). Dietary acacetin reduces airway hyperresponsiveness and eosinophil infiltration by modulating the cytokines eotaxin-1 and Th2 in a mouse model of asthma Obvious plugin based. *Alternative medicine*. Article 910520.

- Hubschmann, H. (2009). Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications, *Weinheim, Alemania: Editorial Wiley-VCH* 25(3), 527-530.
- Huet, B. C. (2017). Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid. 5-7.
- I. Miyahisa, N. Funa, Y. Ohnishi, S. Martens, T. Moriguchi, and S. Horinouchi, (2006) “Combinatorial biosynthesis of flavones and flavonols in *Escherichia coli*,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(1), 53–58.
- Iribarren, A., Salomone, H.E., Zamar, S.D. (2005) Operation planning in the rectification of essential oils. *Journal of Food Engineering*. 69, 207-210.
- Jang YH, Park JR, Kim KM. (2020) Antimicrobial Activity of Chrysoeriol 7 and Chochlioquinone 9, White-Backed Planthopper-Resistant Compounds, Against Rice Pathogenic Strains. *Biology (Basel)*. Nov 7;9(11):382.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. (1999). Plant systematics: a phylogenetic approach. 3th ed. *Sinauer Associates*, Massachusetts, Estados Unidos. 215-216.
- K. Markham, T. Mabry, (1980). Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids, *The Flavonoids*, 45–77.
- Koleva, I. I., Niederländer, H. A. G., & van Beek, T. A. (2001). Application of ABTS Radical Cation for Selective On-Line Detection of Radical Scavengers in HPLC Eluates. *Analytical Chemistry*, 73(14), 3373-3381.
- L. W. Soromou, X. Chu, L. Jiang et al., (2012). “In vitro and in vivo protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses,” *International Immunopharmacology*, 14(1), 66–74.
- Lega, A., Avosoh, O., Tinubu, D., Ogunwande, I., Ascrizzi, R., Flamini, G. (2020). Antinociceptive property, anti-inflammatory activity and essential oil components of leaves and stem bark of *Turnera diffusa* Wild (*Passifloraceae*) growing in Nigeria. *Journal of Biologically Active Products of Nature*, 10(6), 473–483.
- Leisegang, K., Finelli, R., (2021). Alternative medicine and herbal remedies in the treatment of erectile dysfunction. *Arab Journal of Urology*. 19(3), 323–325.

- Lemos, I., Delmondes, G., Santos, E., Oliveira, R., Figueiredo, P., Barbosa, R. (2016). Ethnobiological study of plants and animals used for the treatment of acute respiratory infections in children from a traditional community in the municipality of Barbalha, Ceará, Brasil. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(4), 166–170.
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. (1999). Supresión de ciclooxigenasa inducible y óxido nítrico sintasa inducible por apigenina y flavonoides relacionados en macrófagos de ratón. *Carcinogénesis*. 20, 1945–1952.
- Liao, P.-C., Yang, T.-S., Chou, J.-C., Chen, J., Lee, S.-C., Kuo, Y.-H., Chao, LK- PAG. (2015). Anti-inflammatory activity of neral and geranial isolated from fruits of *Litsea cubeba* Lour. *Functional Food Magazine*, 19, 248–258.
- Lin, B., Li, P., Wang, Y., Peng, W., Wu, Z., Su, W. y Ji, H. (2008). The expectorant activity of naringenin. *Pharmacology and pulmonary therapeutics*, 21(2), 259–263.
- Linde, G, A.; Colauto, N, B.; Alberto, E.; Gazin, Z, C. (2016). Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. *Revista de Plantas Medicinales*. 18(1), 3-5.
- Lindenmeyer F, Li H, Menashi S, Soria C, Lu H. (2001). Apigenin acts on the process of tumor cell invasion and regulates protease production. *nutrition cancer*. 39, 139–147.
- Liu, X.-Y., Lv, X., Wang, P., Ai, C.-Z., Zhou, Q.-H., Finel, M., Ge, G.-B. (2018). Inhibition of UGT1A1 by natural and synthetic flavonoids. *International Journal of Biological Macromolecules*. 10(2), 66–74.
- López, A., Ming, DS y Towers, GHN (2002). Actividad antifúngica de los derivados del ácido benzoico de *Piper lanceaefolium*. *Revista de Productos Naturales*, 65(1), 62–64.
- Lorenzo, D., Paz, D., Davies, P., Vila, R., Cañigüeral, S., Dellacassa, E. (2001). Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown from Uruguay. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(5), 356-359.
- Luengo, M. T. L. (2002). Flavonoides. *Farmacia y Sociedad*, 21(4), 108-113.
- M. Akanda, H.-J. Tae, I.-S. Kim et al., (2017) “Hepatoprotective role of *Hydrangea macrophylla* against sodium arsenite-induced mitochondrial-dependent oxidative stress via the

- inhibition of MAPK/Caspase-3 pathways,” *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7) p. 1482.
- Martínez. Alcaraz, M., Lilia. (1999). Estudio de las condiciones para la micropropagación de damiana *Turnera diffusa*. [Tesis de Doctorado]. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. Ciudad de México, México. 50-58.
- Meneses, R., Torres, F. A., Stashenko, E., Ocazonez, R. E. (2009). Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. *Salud UIS*, 41(3), 236-243.
- Molina, M., Stashenko, E. E., Rene, J. (2011). Determinación de antioxidantes fenólicos en plantas aromáticas del género *Lippia* sp, (familia *verbenaceae*) empleando cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia. [Trabajo de Maestría]. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Bucaramanga. Colombia.
- Montemayor, D., Cordero, P., González, L. (2017). Desarrollo de un fármaco herbario hepatoprotector a partir de *Turnera diffusa*. [Tesis doctoral], Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 5–14.
- Mora, L. N., Pérez, A. L. (2016). Determinación de la actividad larvicida de aceites esenciales, pertenecientes a ocho familias de especies botánicas, frente al *Aedes aegypti*. [trabajo de grado]. Facultad de Ciencias, Universidad Santo Tomas. Bucaramanga, Colombia. 38-43
- Morales, G., Malcher, N., Baldisserotto, B., Marcon, J., Schmidt, D., Marcon, J. (2021). Eugenol and *Lippia alba* essential oils as effective anesthetics for the Amazonian freshwater stingray. *Potamotrygon wallacei* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Physiology and Biochemistry of Fishes*, 47(6), 2101–2120.
- Muñoz, A., Bottia, E. J., Cardenas, C. Y., Patiño, J. G., Diaz, O. L., Martínez, J. R., Stashenko, E. E. (2007). Estudio comparativo sobre la capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS^{•+} por los aceites esenciales de especies aromáticas con alto contenido de *trans*-atenol y estragol. *Scientia et Technica*. 13(33), 117-120.
- Ocampo S., R. A. y Valverde R. (2000). Manual de cultivo y conservación de plantas medicinales. Tomo I. San José, Costa Rica: Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", Ministerio de la Agricultura. 97-100.

- Oliveros, C. (2015). Estudio por técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas de los alcaloides harmala en extractos de *Banisteriopsis caapi* y en muestras de orina. [Trabajo de grado]. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. 32-36, 60-65.
- Ospina, D., Hernández, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Formación Investigativa*, 4, 1–8.
- Otiniano, C., Manuel. (2004). Cálculos en destilación continua para sistemas binarios ideales utilizando hoja de cálculo. *Revista-Sociedad Química del Perú*. 70(4), 217-219.
- Pan, J., Xia, X.X., Liang, J. (2008). Analysis of pesticides multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic extraction and liquid chromatography-thandem mass spectroscopy. *Ultrasonics Sonochemistry*. 25-32.
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. S., Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3), 201-214.
- Pérez, M., Jonathan, C. (2008). Aislamiento, purificación y caracterización de compuestos con actividad antioxidante e inmunomoduladora de *Juglans mollis* y *Turnera diffusa*. [Tesis Doctoral, Medicina], Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. 43-49.
- Polo, M. D. (2015). Fundamentos de cromatografía. 1th ed. *Editorial Dextra*. Madrid, España. 231-333.
- Priscilla, M., Clarkson, H., Thompson, S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 72(2), 637–646.
- Rao, S. (2018). Potenciales hierbas anti-flavivirus: una mejor y más segura alternativa para la salud. *Plantas Medicinales*, 10(2), 89–92.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺⁺ radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.
- Reyes A. J. (1998). Diseño de columnas de rectificación y extracción multicomponente. [Tesis Doctoral]. Universidad de Alicante. San vicente, España. 15-22.
- Reyes Rueda, G. A. (2017). Efecto de la infusión de *Lippia alba* en los parámetros productivos y control bacteriano en pollos de engorde [Tesis de Pregrado]. Universidad Técnica de Machala. Ecuador. 25-28.

- Rice-Evans C A, Miller N J, Paganga G. (2002) Relaciones estructura-actividad antioxidante de flavonoides y ácidos fenólicos. *Radic Libre Biol Med.* 20 933-1056
- Ríos, N., Stashenko, E. E., Duque, J. E. (2017). Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera; Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia.* 61, 307-311.
- Rueda, S., Carlos, A., Stashenko, E. E., Martínez M., Rene, J., Marín, N. A. (2012). Estudio de la rectificación por destilación fraccionada a presión reducida y de hidrólisis básica del aceite esencial de *cymbopogon martinii* (palmarrosa). [Trabajo de grado]. Escuela de química. Universidad Industrial de Santander. 20-25.
- Ruiz P A, Haller D. (2006) Diversidad funcional de flavonoides en la inhibición de las vías de señalización proinflamatorias NF-kappaB, IRF y Akt en células epiteliales intestinales murinas. *J Nutr.* 136 664-71.
- Salazar, R., Pozos, M. E., Cordero, P., Perez, J., Salinas, M. C., Waksman, N. (2008). Determination of the antioxidant activity of plants from Northeast México. *Pharmaceutical Biology*, 46(3), 166-170.
- Salvatore, F., Haddad, R. (Ed.) (2017). Cromatografía líquida Fundamentos e Instrumentación. 3th ed. Elsevier. Miamisburg, EE. UU. 320-321.
- Sánchez V., Vicente M. S. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de Investigación Médica del de Sur México.* 20 (3), 161-167.
- Sánchez, M. F. O. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. 1th ed. *aiyana ediciones*. Madrid, España. 24-30.
- Sánchez, O. M., Bonilla C. C., Guzmán, R. S. (2004). El cultivo de pronto alivio *Lippia alba* (Miller.) N.E. Brown ex Britton and Wilson. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. (4), 4-12.
- Scigelova, M., Makarov, A. (2006). *Orbitrap* mass analyzer—overview and applications in proteomics. *Proteomics*, 6(2), 16-21.
- Senatore, F. & Rigano, D. 2001. “Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala”, *Flavour Fragr. J.* 16: 169-171.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2015) Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.

- Shimadzu. (2020). Preparative Chromatography Systems. Retrieved May 11, 2020, de <https://www.shimadzu.com/an/hplc/aplsys/prep.html>.
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, P., Mejía, A., Suarez, D. (2018). Productos naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales. *Fundación Universitaria Agraria de Colombia*, Bogotá. Entre Libros. 50-60.
- Singh, S., Gupta, P., Meena, A. y Luqman, S. (2020). Acacetina, una flavona con diverso potencial terapéutico en cáncer, inflamación, infecciones y otros trastornos metabólicos. *Toxicología química y alimentaria*, 111708.
- Skoog (2015) Principios del análisis instrumental. 9th ed. *Editorial Cengage. Singapur, EE.UU.* 181, 183, 251-283, 794-801, 960-968.
- Snyder, L., Kirkland, J., Dolan, J. (2010). Introduction to modern liquid chromatography. 3th ed. *John Wiley y Sons Inc.* Hoboken. EE.UU. 110-111.
- Sobrinho, N., Morais, M., Márcia. (2021) Antiviral activity on the *Zika* virus and larvicidal activity on the *Aedes* spp. of *Lippia alba* essential oil and β -caryophyllene. *Industrial Crops and Products*. 162, 125-132.
- Sol, J. (2007).d- Limoneno: seguridad y aplicaciones clínicas. *Alterno Medicina. Rev*,12: 259 – 264.
- Soriano, L., (2013). Contenido antioxidante en Damiana (*Turnera diffusa* Willd) y factores que lo modifican: condiciones ambientales, de cultivo, y manejo poscosecha. [Tesis Doctoral]. Centro de Investigaciones Biológicas Del Noroeste, S.C. La Paz, Bajo California. 40-44.
- Stashenko, E. E. (2009). Aceites esenciales. 1th ed. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. 37-50.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R. (2009). Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*, 3(1), 31-49.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Durán, D. C., Córdoba, Y., Caballero, D. (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en

- Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38, 89-105.
- Sulaiman, K., Okunade, W., Afolayan, F. (2020). Ethnobotanical survey of plants used in cancer therapy in Iwo and Ibadan, southwestern Nigeria. *Journal of Research in Pharmacy and Pharmacognosy*, 8(5), 346–350.
- Syukri, D., Darwis, D., & Santoni, A. (2013). Preparative HPLC for the purification of major Anthocyanins from *Ficus padana* Burm . L. *Research Journal of Chemical Sciences*, 3(12), 60–64.
- Szewczyk, k., Zidorn, C. (2014). Etnobotánica, fitoquímica y bioactividad del género *Turnera* (*Passifloraceae*) con énfasis en damiana— *Turnera diffusa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 152(3), 424-426.
- Teixeira de Oliveira, G., Ferreira, J. M., Lima, W. G., Ferreira, A. L., Duarte-Almeida, J. M., Alves, R. S. L. (2018). Phytochemical characterization and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). *Natural Product Research*, 32(6), 723-731.
- Timóteo, P., Karioti, A., Leitão, S. G., Vincieri, F. F., Bilia, A. R., (2014). A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. *Food Chemistry Journal*. 320,10-21.
- Toro, D., Martínez, Aguilar, Y., Rodríguez, B., Pupo, R., Torres, G., Rosabal, O., Olmo González, C. (2017). Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 2-5.
- Trevisan, M. T., Marques, R. A., Silva, M. G., Scherer, D., Haubner, R., Ulrich, C. M., Owen, R. W. (2016). Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: identification, quantitation and antioxidant capacity. *Records of Natural Products*, 10(4), 485.
- Tubay, C. J. (2018). Composición química (volátiles), caracterización físico-química y actividades biológicas del aceite esencial de *Lippia alba* de Ecuador [Tesis Doctoral]. Facultad de Ciencias, Universidad Politécnica de Leira. España. 43-44.

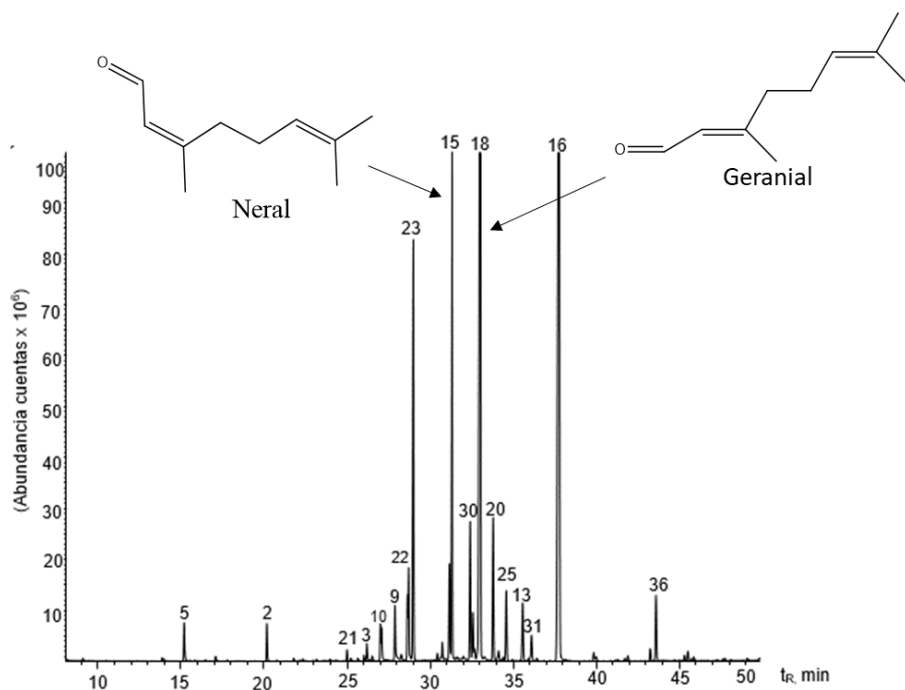
- Tupas, G. D., Otero, M. C. B., Ebhohimen, I. E., Egbuna, C., & Aslam, M. (2020). Antidiabetic lead compounds and targets for drug development. In *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery* (pp. 1–15). Elsevier.
- Urbizu, G.A., Castillo, R.O., Martínez, G.C., Torres, J.A. (2017). Natural variability of essential oil and antioxidants in the medicinal plant *Turnera diffusa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(2),121-125.
- Urbizu, G.A., Castillo, R.O., Martínez, G.C., Torres, J.A. (2017). Natural variability of essential oil and antioxidants in the medicinal plant *Turnera diffusa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(2),121-125.
- Valcárcel, C., Gómez, H. (Ed.) (1994). *Técnicas analíticas de separación*. 1th ed. Editorial Reverté, Barcelona, España. S, A. 176-179.
- Valcárcer Cases, M., & Gómez Hens, A. (1998). *Técnicas analíticas de separación*. Reverté. Retrieved
- Velasco R., Villada, S., Carrera, J. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*. 18(1), 53-55.
- Verbeek R, Plomp A C, van Tol E A, van Noort J M. (2004). Las flavonas luteolina y apigenina inhiben la proliferación específica de antígeno *in vitro* y la producción de interferón-gamma por células T autoinmunes murinas y humanas. *Biochem Pharmacol*. 68 621-9 21 78-80 murinas. *J Nutr*. 2006; 136 664-71
- Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. (2006). Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem*. 54, 9798–9804.
- Wang, Y., Chen, Y., Chen, Y., Zhou, B., Shan, X., & Yang, G. (2018). Eriodictyol inhibits IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 1128–1134.
- Wei H, Tye L, Bresnick E, Birt DF. (1990) Efecto inhibitor de la apigenina, un flavonoide vegetal, sobre la ornitina descarboxilasa epidérmica y la promoción de tumores cutáneos en ratones. *Cáncer Res*. 50, 499–502.
- Winkel-Shirley, B. (2001). It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology*, 127, 1399-1404.

- Wong, J. E., Muñiz, D. B., Aguilar, P., Rodríguez, H. R., Aguilar, C. N. (2014). Microplate quantification of total phenolic content from plant extracts obtained by conventional and ultrasound methods. *Phytochemical Analysis*. 25(5), 125-126.
- Wong, J. E., Muñiz, D. B., Martínez, Á. G. C., Belmares, C. R. E., Aguilar, C. N. (2015). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochemistry*. 22, 474–481.
- Wong-Paz, J., Contreras-Esquivel, J., Muñoz-Marquez, D., Belmares, R., Rodriguez, R., Flores, P., y Aguilar, C. (2014). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from semiarid plants. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 9, 299-310.
- Zacaria, B., Ahamd, F. (2006). Extraction of Gaharu essential oil using spinning band distillation, Malaysia. [Tesis de grado, Ing. Química]. *University college of engineering y Technology Malaysia. Faculty of chemical y Natural Resources Engineering. Lumut, Malasia*. 11-15.
- Zhao, J., Dasmahapatra, A. K., Khan, S. I., Khan, I. A. (2008). Anti-aromatase and estrogenic activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). *Journal of Ethnopharmacology*, 120(3), 387–393.
- Zubarev, R. A., Makarov, A. (2013). *Orbitrap Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 85(11), 5288–5296

Anexos

Anexos A. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (*full scan*) del aceite esencial de *Lippia alba*, quimiotipo citral. Columna DB-WAX (60 m), inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV).

Véase la identificación en la **Tabla 8**



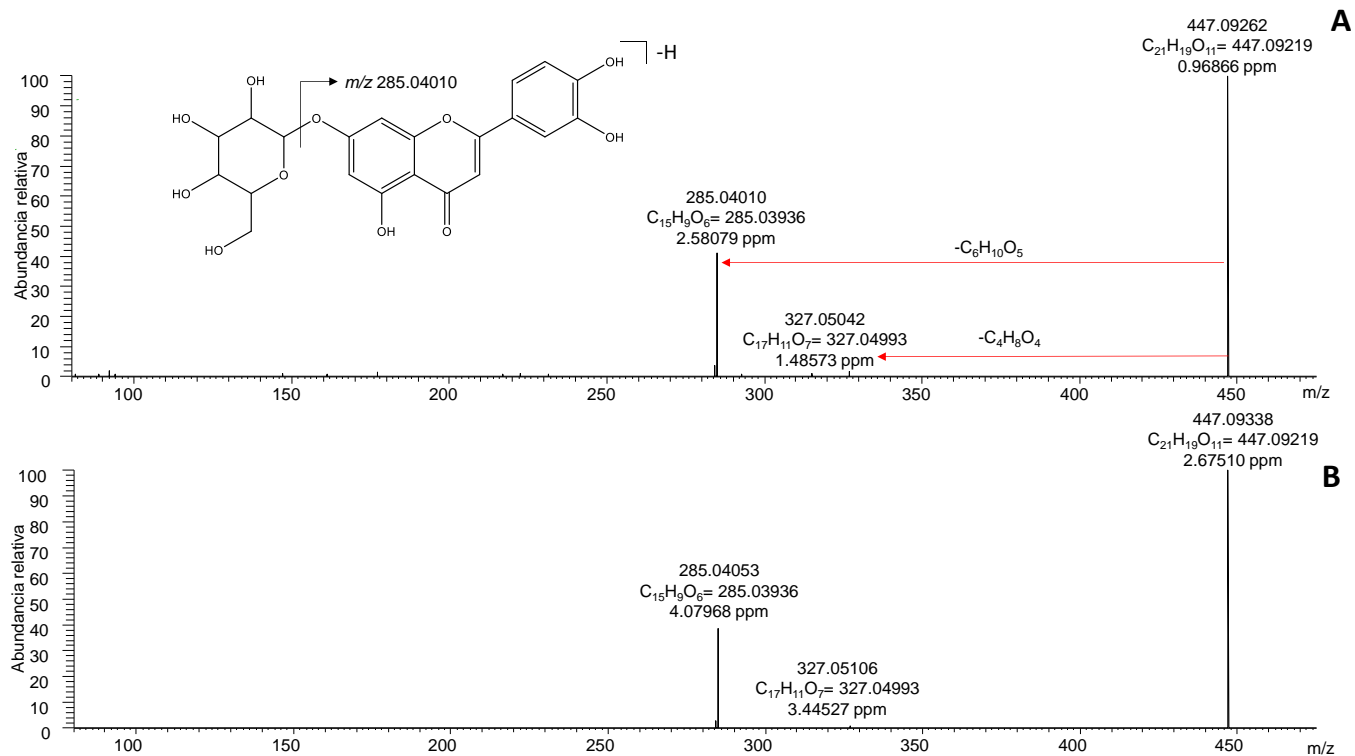
Anexos B. Identificación mediante HPLC-DAD de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico y las fracciones de la especie vegetal *L. alba*.

Muestra	Nº de pico	Compuesto	t _R , min	Especto UV	Ai/AIstd
Extracto	2	Derivado de flavonol	3.32	250 ^h , 320 ^{max}	0.09
Extracto	5	Derivado de ácido orgánico	16.21	216, 232, 290 ^h , 330 ^{max}	0.21
Extracto	19	Ácido ferúlico	32.69	232, 290 ^h , 325 ^{max}	0.12
Extracto	21	Derivado de ácido orgánico	33.63	230, 290 ^h , 330 ^{max}	0.17
Extracto	25	Derivado de ácido orgánico	35.08	230, 290 ^h , 330 ^{max}	0.17
Extracto	26	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	35.83	230,250 ^h , 270 ^h ,350 ^{max}	1,17
Extracto	29	Derivado de ácido orgánico	36.59	230, 290 ^h , 330 ^{max}	0.51
Extracto	33	Derivado de ácido orgánico	38.11	240, 320 ^{max}	0.38
Extracto	37	Derivado de flavona	38.79	230,350 ^{max}	0.23
Extracto	38	Derivado de ácido orgánico	38.88	230,290 ^h , 330 ^{max}	0.24
Extracto	39	Ácido rosmarínico	38.91	230,290 ^h , 330 ^{max}	0.15
Extracto	53	Derivado de ácido orgánico	48.95	230 ^h ,290 ^{max} , 330 ^{max}	0,18
Extracto	18	Derivado de ácido orgánico	30.42	228,250 ^h ,300, 330 ^{max}	0.16
Extracto		ISTD	48.65	230 ^h ,280 ^{max}	1
Fr1	1	Derivado de flavonol	3.345	234 ^{max}	0.3
Fr1	15	Derivado de ácido orgánico	28.63	220 ^h ,228 ^h ,280 ^{max}	0.15
Fr1		ISTD	48.59	230 ^h ,280 ^{max}	1,00
Fr2	1	Derivado de flavonol	3.259	234 ^{max}	0.25
Fr2	4	Derivado de ácido orgánico	16.19	240,330 ^{max}	3,24
Fr2	9	Derivado de ácido orgánico	19.77	260 ^{max} ,295 ^h	0.22
Fr2	13	Derivado de flavona	26.76	230,270,335 ^{max}	1,15
Fr2	17	Derivado de ácido orgánico	28.73	232, 310 ^{max}	0.55
Fr2	19	Acido ferúlico	32.12	232, 290 ^h , 330 ^{max}	0.42
Fr2	21	Derivado de ácido orgánico	33.56	230,290 ^h , 330 ^{max}	0.04
Fr2	24	Derivado de flavona	34.89	235, 268, 340 ^{max}	0.61
Fr2	26	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	35.73	248,265 ^h , 352 ^{max}	8,23
Fr2	34	Derivado de flavona	38.12	230,350 ^{max}	0.49
Fr2	36	Derivado de flavona	38.78	232, 270 ^h , 320 ^{max}	0.22
Fr2	42	Derivado de flavona	41.60	230,270,335 ^{max}	1,07
Fr2		ISTD	48.61	230 ^h ,280 ^{max}	1,00
Fr3	3	Derivado de ácido orgánico	15.31	260 ^{max} ,295 ^h	0.41
Fr3	7	Derivado de ácido orgánico	18.21	250,300 ^h , 330 ^{max}	0.66
Fr3	8	Acido clorogénico	19.62	250,300 ^h , 330 ^{max}	0.34
Fr3	10	Derivado de ácido orgánico	20.93	240,290 ^h ,325 ^{max}	0.63
Fr3	11	Derivado de ácido orgánico	21.49	245,300 ,330 ^{max}	0.29

Muestra	Nº de pico	Compuesto	t _R , min	Especto UV	Ai/AIstd
Fr3	12	Derivado de ácido orgánico	26.02	245,300 ,330 ^{max}	0.24
Fr3	14	Derivado de ácido orgánico	27.73	230, 290 ^h , 330 ^{max}	0.63
Fr3	16	Derivado de ácido orgánico	28.66	230, 290 ^h , 330 ^{max}	2,36
Fr3	18	Derivado de ácido orgánico	29.99	230, 290 ^h , 330 ^{max}	0.88
Fr3	28	Derivado de ácido orgánico	36.53	260 ^{max} , 295 ^h	0.41
Fr3	32	Derivado de ácido orgánico	38.02	235,315 ^h	3,26
Fr3	40	Derivado de ácido orgánico	40.64	230,290 ^h , 330 ^{max}	0.94
Fr3	41	Derivado de ácido orgánico	39.859	235,270 ^h , 350 ^{max}	4,97
Fr3		ISTD	48.59	230 ^h , 280 ^{max}	1,00
Fr4	6	Derivado de ácido orgánico	17.75	240,330 ^{max}	0.24
Fr4	18	Derivado de ácido orgánico	29.94	260 ^{max} , 295 ^h	0.91
Fr4	19	Ácido ferúlico	32.57	232, 290 ^h , 330 ^{max}	3,38
Fr4	20	Derivado de ácido orgánico	33.10	230, 290 ^h , 330 ^{max}	1,02
Fr4	21	Derivado de ácido orgánico	33.55	230, 290 ^h , 330 ^{max}	3,89
Fr4	22	Derivado de ácido orgánico	33.79	230, 290 ^h , 330 ^{max}	1,48
Fr4	23	Derivado de ácido orgánico	34.05	230, 290 ^h , 330 ^{max}	2,37
Fr4	25	Derivado de ácido orgánico	35.01	230, 290 ^h , 330 ^{max}	1,47
Fr4	45	Derivado de flavonol	42.52	230,285, 330 ^h	0.37
F4		ISTD	48.60	230 ^h , 280 ^{max}	1,00
Fr5	25	Derivado de ácido orgánico	34.99	244, 290 ^h , 325 ^{max}	23,95
Fr5	27	Derivado de ácido orgánico	35.96	230, 290 ^h , 330 ^{max}	2,32
Fr5	27	Derivado de ácido orgánico	36.50	230, 290 ^h , 330 ^{max}	5,12
Fr5	30	Derivado de ácido orgánico	37.24	230, 290 ^h , 330 ^{max}	1,97
Fr5		ISTD	48.56	230 ^h , 280 ^{max}	1,00
Fr6	25	Derivado de ácido orgánico	35.05	232, 290 ^h , 330 ^{max}	0.51
Fr6	29	Derivado de ácido orgánico	36.53	232, 290 ^h , 330 ^{max}	5,14
Fr6	30	Derivado de ácido orgánico	37.22	230,290 ^h , 330 ^{max}	1,40
Fr6	31	Derivado de ácido orgánico	37.98	232, 290 ^h , 330 ^{max}	1,93
Fr6	35	Derivado de ácido orgánico	38.67	232, 290 ^h , 330 ^{max}	6,47
Fr6	39	Ácido rosmarínico	39.65	230,290 ^h , 330 ^{max}	1,10
Fr6	40	Derivado de ácido orgánico	41.19	230, 290 ^h , ^{max}	3,62
Fr6		ISTD	48.62	230 ^h , 280 ^{max}	1,00
Fr7	40	Derivado de ácido orgánico	41.16	232, 290 ^h , 330 ^{max}	0.21
Fr7	41	Derivado de ácido orgánico	41.59	230, 290 ^h , 330 ^{max}	0.41
Fr7	44	Derivado de ácido orgánico	42.49	230, 326	1,08
Fr7	46	Derivado de flavona	42.97	230 ^h , 250, 270 ^h , 350 ^{max}	0.21
Fr7	47	Derivado de flavona	43.27	232, 270 ^h , 320 ^{max}	0.30
Fr7	48	Derivado de flavona	44.52	230, 272 ^h , 320 ^{max}	0.32
Fr7	50	Derivado de ácido orgánico	44.96	242, 290 ^h , 330 ^{max}	1,04
Fr7	51	Ácido rosmarínico	48.24	238, 290 ^h , 330 ^{max}	10,28

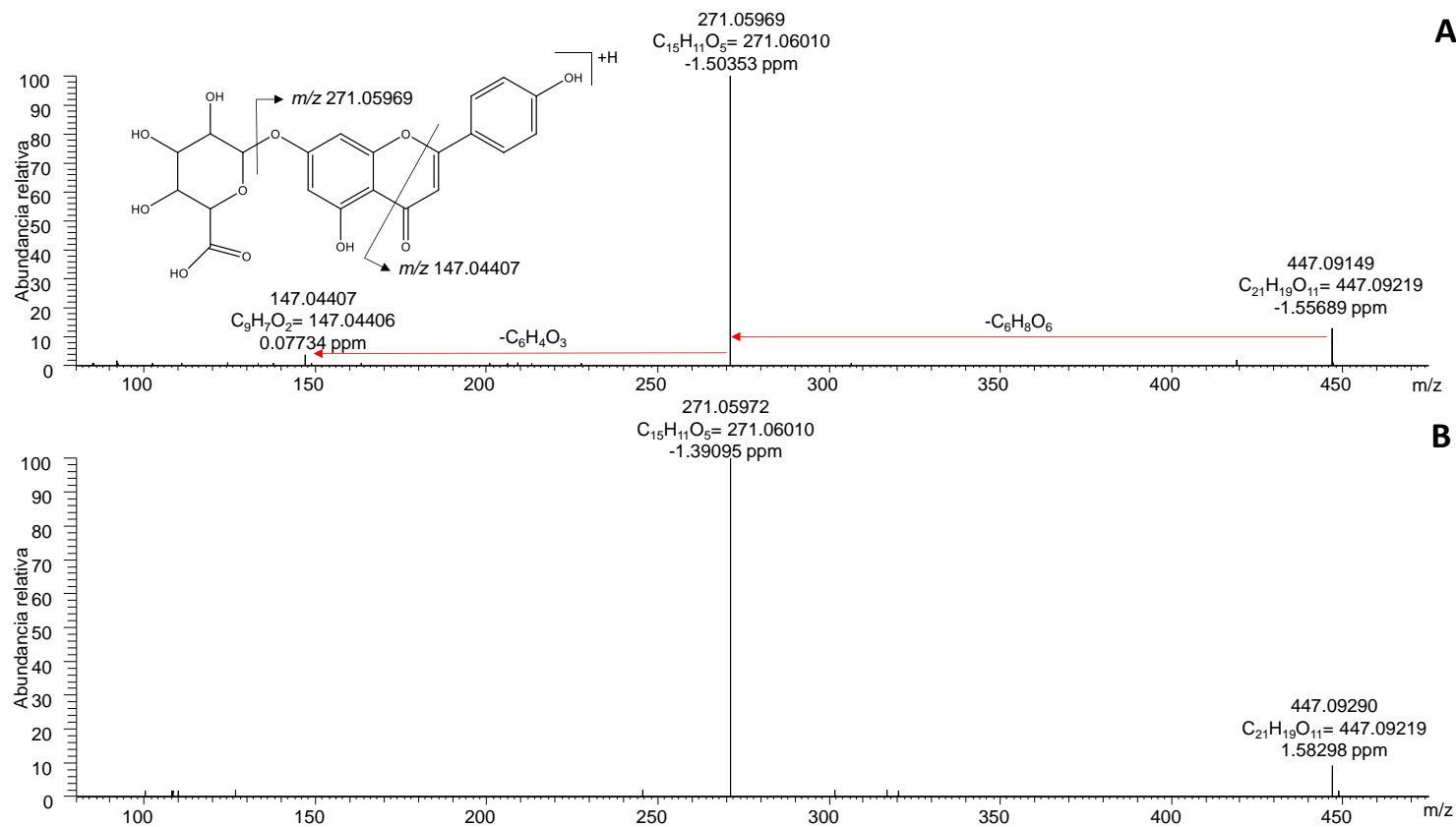
Muestra	N° de pico	Compuesto	t _R ,min	Especto UV	Ai/AIstd
Fr7	54	Derivado de ácido orgánico	49.05	238 ^{max} , 285 ^h , 330	2,21
Fr7		ISTD	48.62	230 ^h , 280 ^{max}	1,00
Fr8	46	Derivado de flavona	42.83	230 ^h , 255 ^h , 265, 355 ^{max}	0.19
Fr8	49	Derivado de flavona	44.95	230 ^h , 250, 270 ^h , 350 ^{max}	1,51
Fr8	50	Derivado de ácido orgánico	47.46	240 ^{max} , 285 ^h , 325	0.03
Fr8	56	Derivado de ácido orgánico	49.54	220 ^h , 228 ^h , 280 ^{max}	0.70
Fr8	57	Derivado de ácido orgánico	50.54	240, 287h, 325	1,13
Fr8	58	Derivado de ácido orgánico	52.57	238 ^{max} , 280 ^h , 320	0.04
Fr8		ISTD	48.62	230h, 280 ^{max}	1,00
Fr9	43	Derivado de ácido orgánico	41.76	240 ^{max} , 285 ^h , 325	0.19
Fr9	52	Apigenina	48.69	230, 270, 330 ^{max}	9,72
Fr9	55	Derivado de flavona	49.22	230h, 250, 270 ^h , 350 ^{max}	4,45
Fr9	59	Derivado de flavona	52.89	230, 275 ^h , 350 ^{max}	1,48
Fr9	60	Derivado de ácido orgánico	55.78	240, 290 ^h , 335 ^{max}	0.97
Fr9	61	Derivado de ácido orgánico	63.44	245, 285 ^h , 325	0.30
Fr9		ISTD	48.62	230 ^h , 280 ^{max}	1,00

Anexos C. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de las moléculas deprotonadas [(M-H)]⁻ de luteolina-7-glucósido [SIM, *m/z* 447, HCD; 20 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, luteolina-7-glucósido. Véase **Tabla 13**.

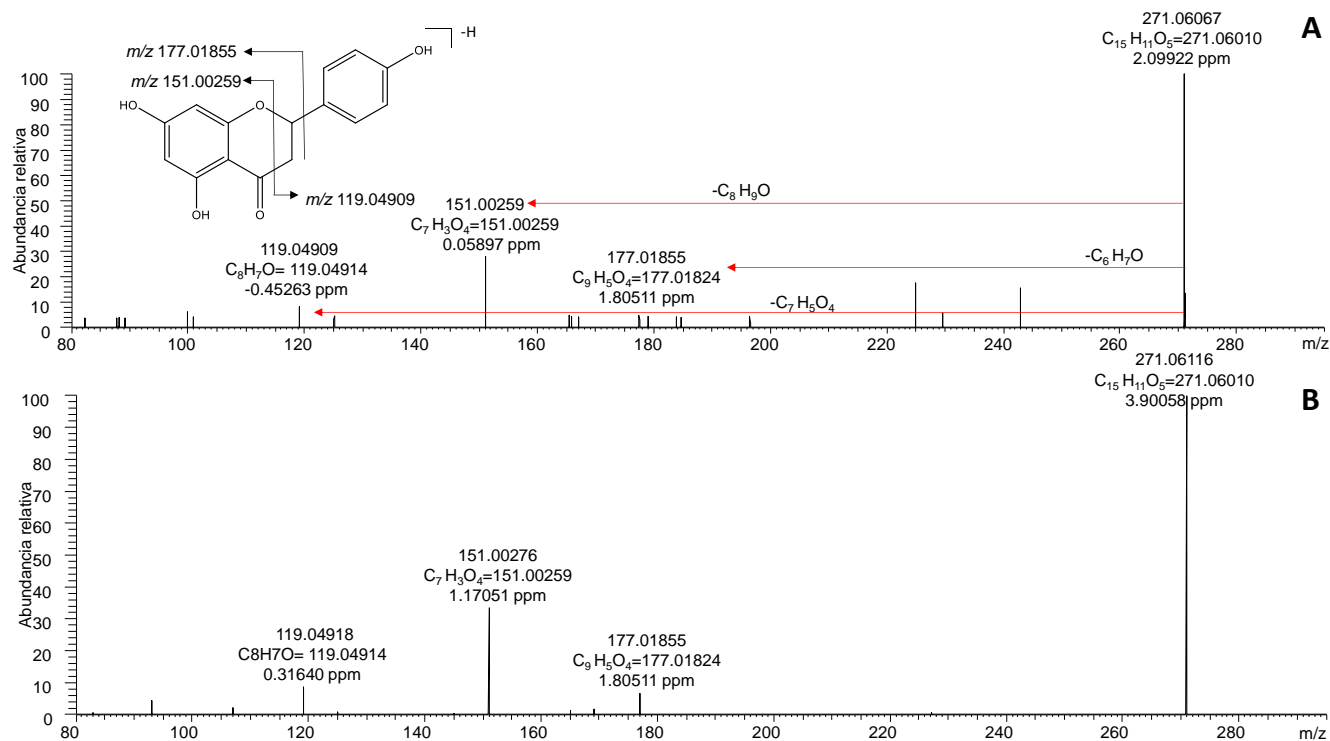


Anexos D. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI^{+/−}-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)]⁺ de apigenina-7-glucurónico [SIM, *m/z* 447, HCD; 20 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco.

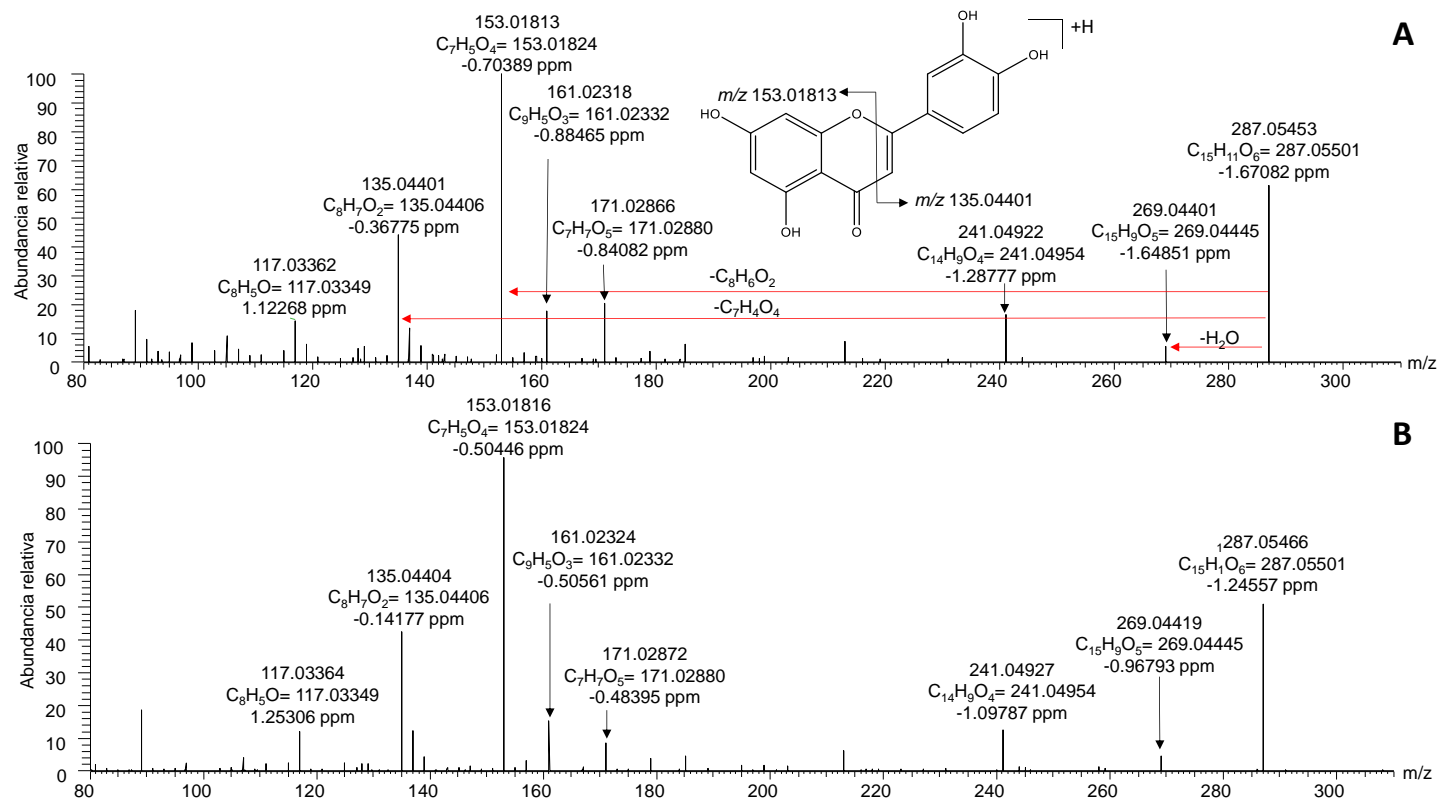
B. Sustancia de referencia, apigenina-7-glucurónico. Véase **Tabla 13**.



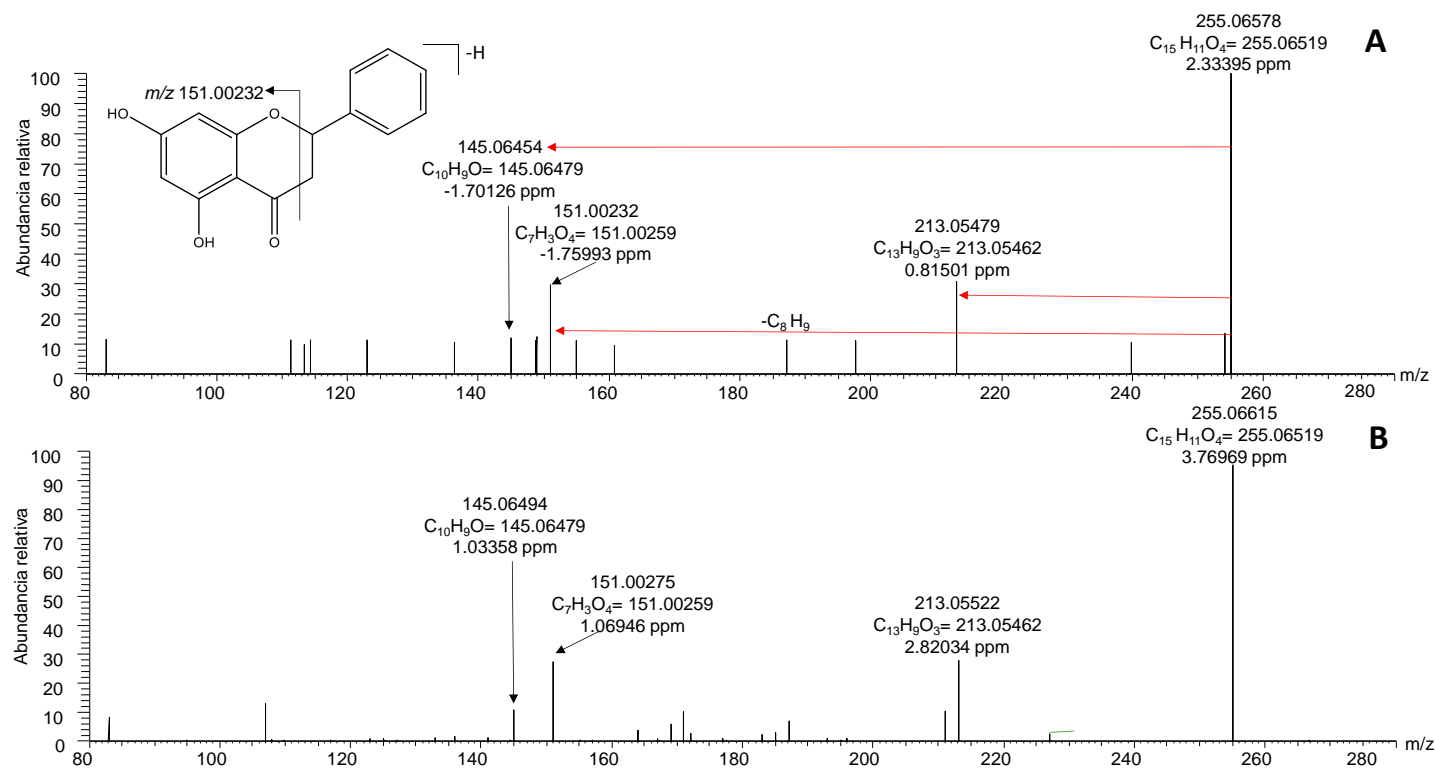
Anexos E. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de las moléculas deprotonadas [(M-H)]⁻ de naringenina [SIM, *m/z* 271, HCD; 50 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, naringenina. Véase **Tabla 13**.



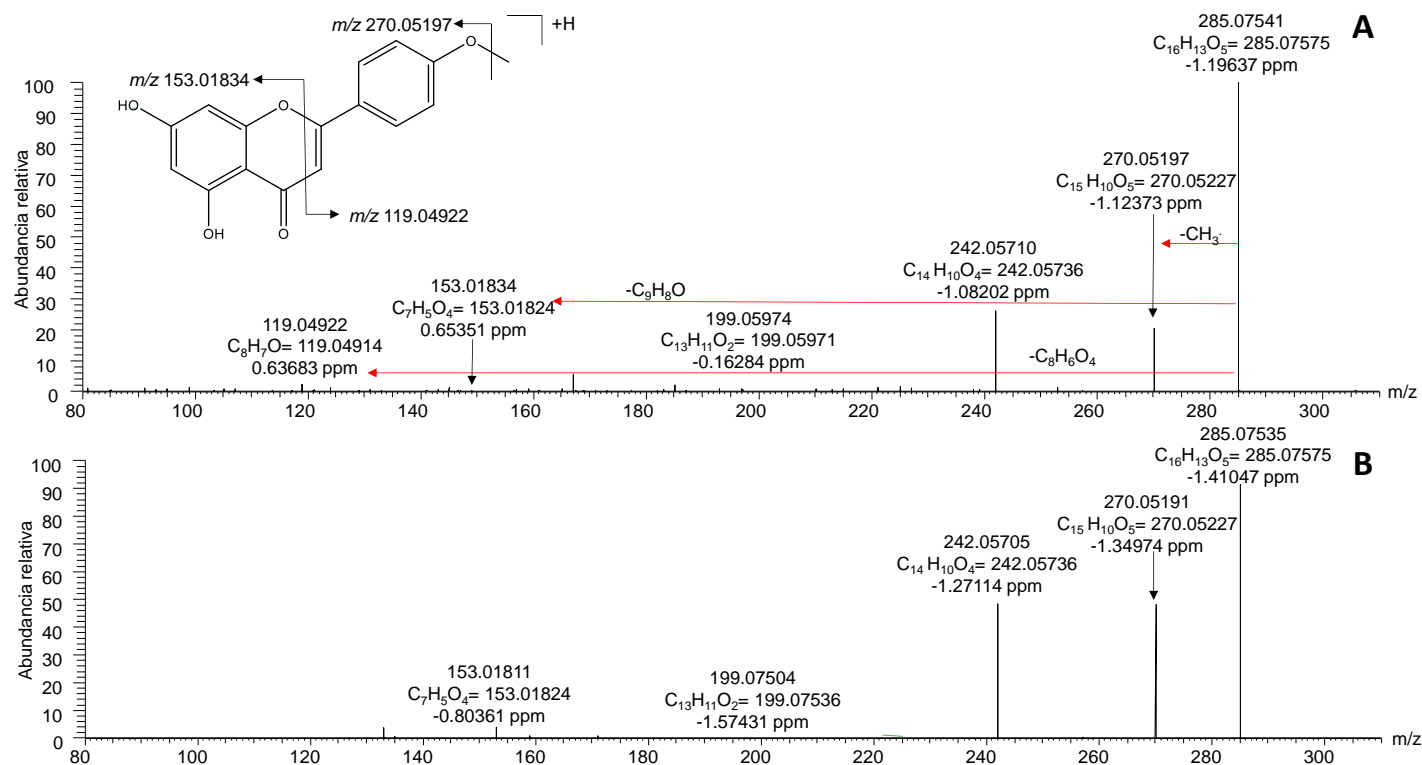
Anexos F. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI^{+-Orbitrap}-MS de las moléculas protonadas [(M+H)⁺ de luteolina [SIM, *m/z*: 287, HCD; 70 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, luteolina. Véase **Tabla 13**.



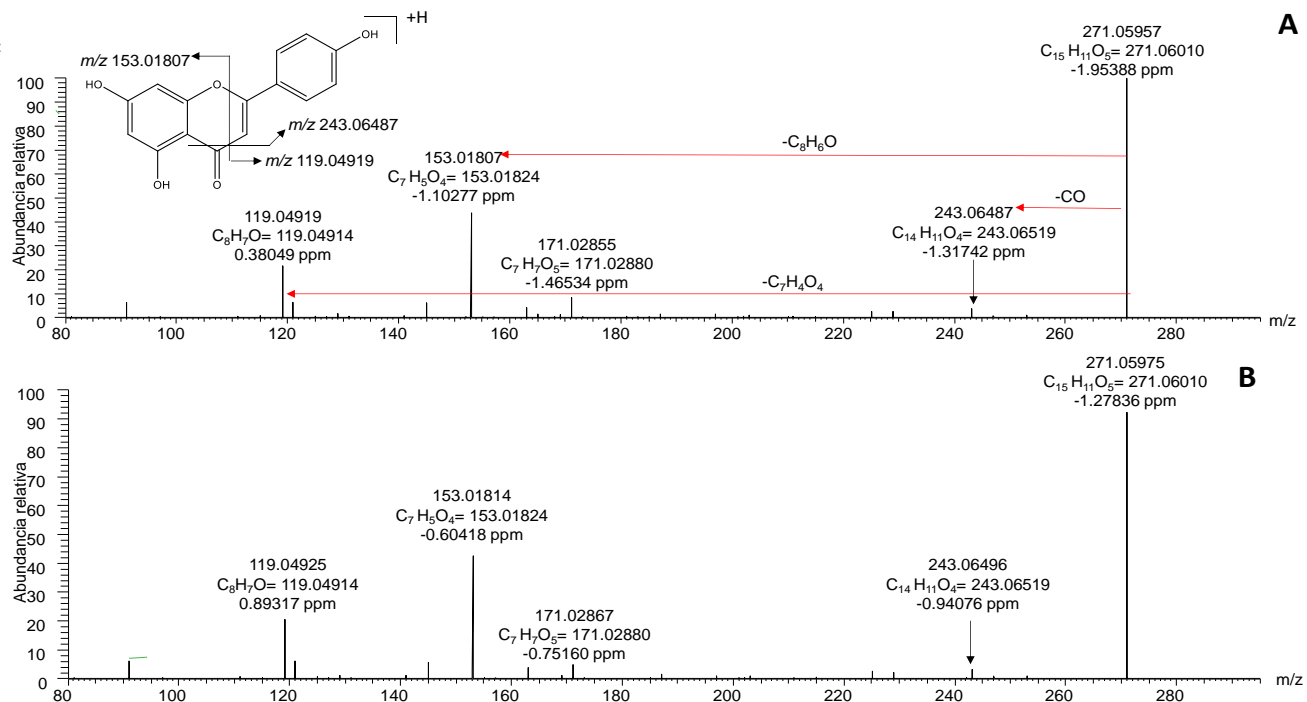
Anexos G. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI⁺-Orbitrap-MS de las moléculas deprotonadas [(M-H)]⁻ de pinocembrina [SIM, *m/z*: 255, HCD; 40 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, pinocembrina. Véase **Tabla 13**.



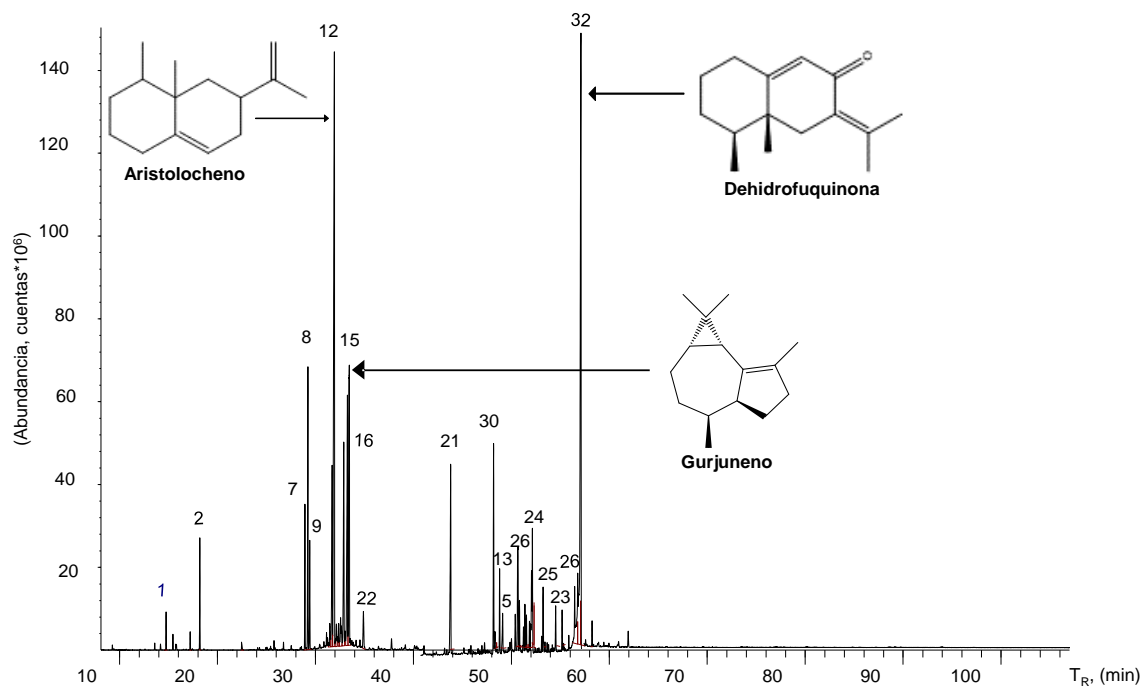
Anexos H. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)]⁺ de acetina [SIM, *m/z*: 285, HCD; 50 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, acetina. Véase **Tabla 13**.



Anexos I. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)⁺] de apigenina [SIM, m/z 271, HCD; 60 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *L. alba*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, apigenina. Véase **Tabla 13**.



Anexos J. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (*full scan*) del aceite esencial de *Turnera diffusa*. Columna DB-WAX (60 m), inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los compuestos en la **Tabla 16**.



Anexos K. Identificación mediante HPLC-DAD de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico y las fracciones de la especie vegetal *T. diffusa*.

Muestra	Nº pico	Compuesto	t _R , min	λ, nm	Area/ISTD
Extracto	3	Derivado de flavanol	3.347	230 ^{max} , 300	1,307
Extracto	16	Derivado de ácido orgánico	17.062	230, 280, 222 ^h	0,746
Extracto	24	Derivado de flavona	30.975	350 ^{max} , 255, 230 ^h	2,285
Extracto	28	Derivado de flavona	32.164	230 ^h , 260, 350 ^{max}	6,656
Extracto	32	Derivado de flavona	34.094	230, 270, 340 ^{max}	3,573
Extracto	33	Derivado de flavona	34.808	230 ^h , 260 ^{max} , 360	7,668
Extracto	43	Apigenina-7- <i>O</i> -glucósido	38.586	230 ^h , 270, 348 ^{max}	4,855
Extracto	50	Derivado de flavona	40.216	230 ^h , 270, 350 ^{max}	8,352
Extracto	55	Derivado de flavonol	40.607	230, 270 ^{max} , 350	2,780
Extracto	60	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	42.37	230, 270, 345 ^{max}	0,609
Extracto	63	Derivado de flavona	43.182	230, 270, 340 ^{max}	0,801
Extracto	67	Derivado de flavona	45.419	237, 270, 330 ^{max}	0,543
Extracto	74	Derivado de ácido orgánico	46.609	230, 270 ^h , 320 ^{max}	1,023
Extracto	76	Apigenina	48.665	230 ^h , 270, 340 ^{max}	1,363
Extracto	86	Derivado de flavonol	53.973	230 ^{max}	2,790
Extracto	91	Acacetina	55.54	237, 270, 335 ^{max}	2,007
Extracto	97	Salvigenina	59.079	330, 280 ^{max} ,	1,000
Extracto	99	Derivado de flavona	61.586	250 ^{max} , 280 ^h	1,127
Extracto	102	Derivado de ácido orgánico	63.496	250, 280 ^h	6,244
Fr1	26	Derivado de flavona	32.012	232 ^h , 260 350 ^{max}	0,724
Fr1	71	Derivado de flavona	46.112	233, 252 ^h , 295, 328	0,744
Fr1	80	Derivado de ácido orgánico	51.532	255 ^{max} , 230 ^h , 300	1,665
Fr1	84	Derivado de ácido orgánico	53.868	250 ^{max}	0,793
Fr1	87	Derivado de ácido orgánico	54.65	250 ^{max}	2,595
Fr1	92	Derivado de ácido orgánico	55.732	235 ^h , 275 ^{max} , 320	2,348
Fr1	97	Salvigenina	59.035	225, 275, 330 ^{max}	1,000
Fr1	98	Derivado de flavona	61.57	235, 270, 330 ^{max}	61,114
Fr1	101	Derivado de ácido orgánico	63.451	250 ^{max} , 280	2,481
Fr2	4	Derivado de flavonol	3.364	235 ^{max} , 385	0,251
Fr2	8	Derivado de ácido orgánico	9.78	230, 280, 222 ^h	0,375
Fr2	14	Derivado de ácido orgánico	16.684	220 ^h , 228 ^h , 280 ^{max}	0,479

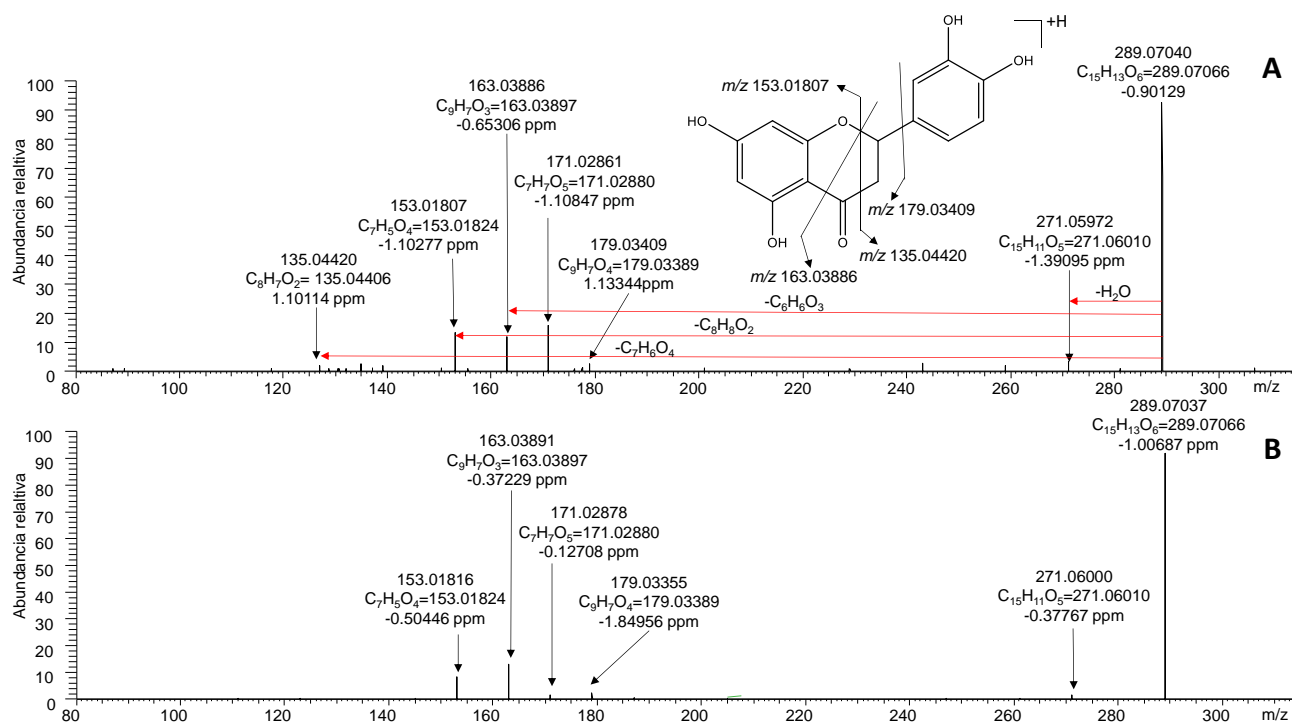
Muestra	Nº pico	Compuesto	t _R , min	λ, nm	Area/ISTD
F _{r2}	17	Derivado de ácido orgánico	19.464	238 ^{max} , 280 ^h , 320	0,541
F _{r2}	48	Derivado de flavona	40.138	265, 345 ^{max}	19,238
F _{r2}	60	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	42.337	235,270, 340 ^{max}	3,865
F _{r2}	65	Derivado de flavona	45.322	240 ^h , 270, 335	4,519
F _{r2}	97	Salvigenina	59.037	230,275, 330 ^{max}	1,000
F _{r3}	6	Derivado de flavonol	6.493	230 ^{max} ,300	1,031
F _{r3}	10	Derivado de ácido orgánico	11.893	240 ^{max} , 280h, 320	1,036
F _{r3}	38	Derivado de flavona	36.293	350 ^{max} ,255, 230 ^h	0,814
F _{r3}	40	Derivado de ácido orgánico	36.964	220 ^h ,228 ^h ,280 ^{max}	0,599
F _{r3}	46	Derivado de flavona	39.448	230, 290 ^{max}	0,814
F _{r3}	58	Derivado de ácido orgánico	41.463	230, 280,222 ^h	0,259
F _{r3}	75	Naringenina	47.138	230, 290 ^{max}	7,314
F _{r3}	76	Apigenina	48.457	230 ^h , 270, 340 ^{max}	0,008
F _{r3}	82	Derivado de ácido orgánico	52.019	250 ^{max} ,280	0,475
F _{r3}	85	Derivado de ácido orgánico	53.935	238 ^{max} , 280 ^h , 320	1,416
F _{r3}	91	Acacetina	55.442	230,267,330 ^{max}	3,489
F _{r3}	93	Derivado de flavonol	55.968	230 ^h ,265, 365	1,747
F _{r3}	96	Derivado de ácido orgánico	58.103	230, 280,222 ^h	1,803
F _{r3}	97	Salvigenina	59.051	230 ^{max} ,275,330	1,000
F _{r3}	100	Derivado de flavona	61.639	350 ^{max} ,255, 230 ^h	1,072
F _{r3}	103	NI	73.287	240, 295 ^{max}	1,912
F _{r4}	35	Derivado de ácido orgánico	36.041	260 ^{max} ,290	4,383
F _{r4}	76	Apigenina	48.613	230 ^h , 270, 340 ^{max}	63,471
F _{r4}	91	Acacetina	55.404	237,270, 335 ^{max}	2,267
F _{r4}	97	Salvigenina	58.944	230 ^{max} ,275,330	1,000
F _{r4}	103	NI	73.081	240, 295 ^{max}	4,626
F _{r5}	7	Derivado de flavonona	8.3	230, 290 ^{max}	1,641
F _{r5}	13	Derivado de flavonol	13.759	232max, 278,305 ^h	2,580
F _{r5}	20	Derivado de flavonona	20.063	235, 290 ^{max}	1,088
F _{r5}	29	Derivado de ácido orgánico	32.413	240 ^{max} , 285 ^h , 325	9,759
F _{r5}	39	Derivado de ácido orgánico	36.76	254 ^{max}	34,087
F _{r5}	44	Derivado de ácido orgánico	38.928	228 ^{max} , 290	1,782
F _{r5}	51	NI	40.275	228, 255 ^h , 350	2,948

Muestra	Nº pico	Compuesto	t _R , min	λ, nm	Area/ISTD
F _r 5	62	Derivado de flavonol	43.152	225 ^{max} , 290	4,161
F _r 5	76	Apigenina	48.713	228 ^{max} , 268, 334	27,159
F _r 5	77	posible iso artemeina	49.08	226, 266 ^h , 365	3,869
F _r 5	91	Acacetina	55.601	224, 268h, 330	3,488
F _r 5	97	Salvigenina	61.67	230 ^{max} , 275, 330	1,000
F _r 5	103	Derivado de ácido orgánico	63.554	252	3,277
F _r 6	68	Derivado de flavona	45.892	235, 290 ^{max}	0,964
F _r 6	75	Naringenina	47.663	230, 290 ^{max}	8,136
F _r 6	76	Apigenina	48.141	230sh, 270, 340 ^{max}	1,082
F _r 6	78	Derivado de flavona	49.115	232, 268 ^h , 320 ^{max}	56,010
F _r 6	83	Derivado de ácido orgánico	53.838	240, 290 ^h , 335 ^{max}	1,281
F _r 6	88	Derivado de ácido orgánico	54.67	220h, 228 ^h , 280 ^{max}	2,209
F _r 6	90	Derivado de flavona	54.887	230, 285 ^{max} , 320	2,106
F _r 6	97	Salvigenina	59.053	270, 350 ^{max}	1,000
F _r 6	103	NI	70.471	230 ^{max} , 300	0,698
F _r 6	103	NI	73.251	237, 270, 335 ^{max}	1,478
F _r 7	2	Derivado de flavonol	3.334	230 ^h , 265, 365	0,817
F _r 7	11	Derivado de ácido orgánico	12.025	250, 290 ^h , 335 ^{max}	1,876
F _r 7	12	Derivado de ácido orgánico	12.892	230 ^h , 250, 295 ^{max}	1,229
F _r 7	18	Derivado de ácido orgánico	19.517	232, 290h, 330 ^{max}	6,840
F _r 7	21	Derivado de flavona	23.388	250 ^{max} , 280 ^h	0,764
F _r 7	22	Derivado de flavonol	24.398	245 ^h , 285 ^h	0,897
F _r 7	27	Derivado de flavona	32.067	235 ^h , 260, 350 ^{max}	16,913
F _r 7	30	Derivado de flavona	33.975	232, 270, 338 ^{max}	6,240
F _r 7	36	Derivado de flavona	36.145	230 ^h , 240, 250 ^h , 350 ^{max}	6,462
F _r 7	43	Apigenina-7- <i>O</i> -glucósido	38.496	232 ^h , 259, 350 ^{max}	14,468
F _r 7	47	Derivado de flavona	40.133	230 ^h , 256, 260 ^h , 350 ^{max}	4,039
F _r 7	53	Derivado de flavona	40.513	250 ^{max} , 280 ^h	2,223
F _r 7	59	Derivado de flavona	41.683	355 ^{max} , 260, 230 ^h	3,584
F _r 7	60	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	42.489	270, 232 ^h , 350 ^{max}	8,728
F _r 7	72	Derivado de flavona	46.136	253, 295, 328 ^{max}	6,166
F _r 7	76	Apigenina	48.485	230 ^h , 270, 340 ^{max}	1,699
F _r 7	97	Salvigenina	59.061	270, 350 ^{max}	1,000

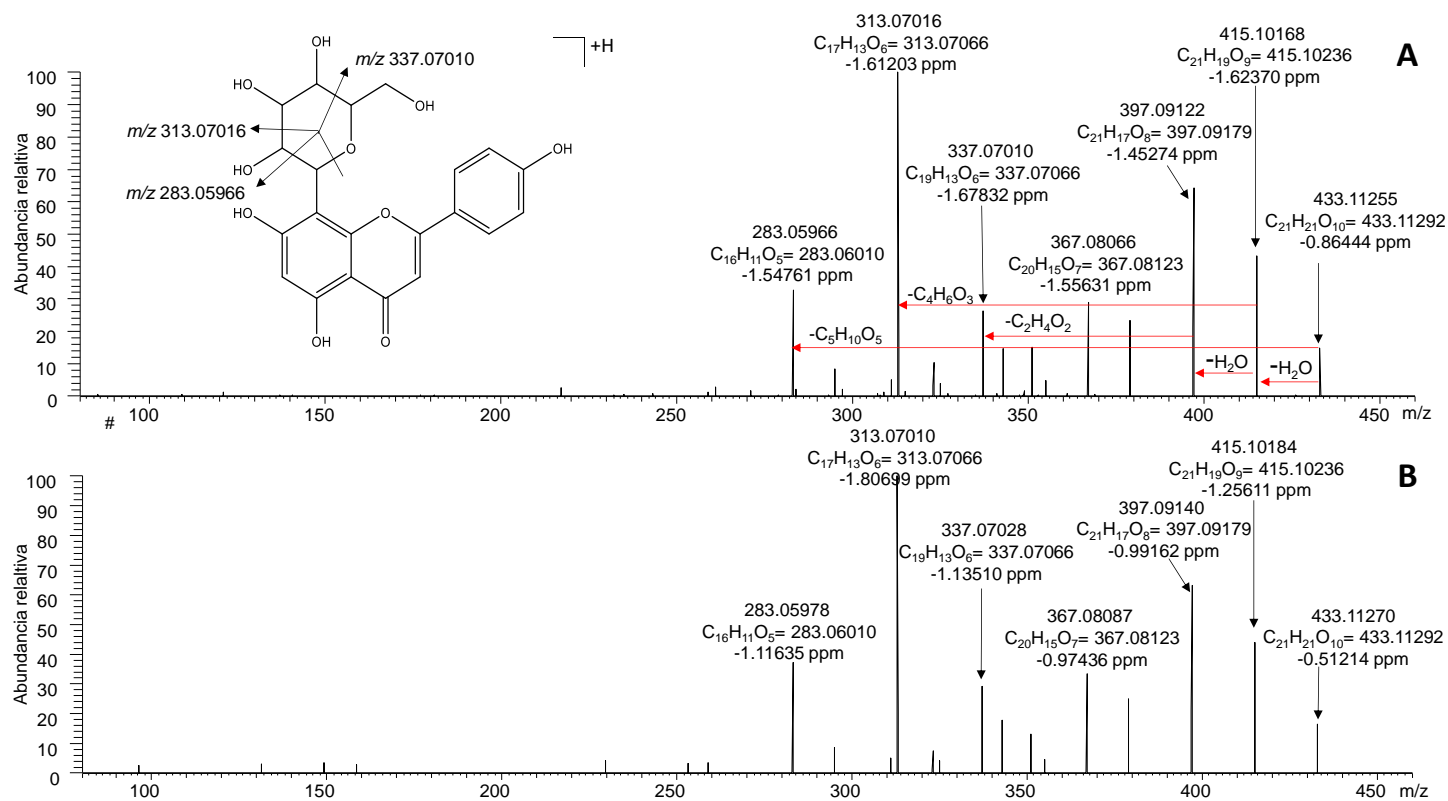
Muestra	Nº pico	Compuesto	t _R , min	λ, nm	Area/ISTD
F _r 8	1	Derivado de ácido orgánico	3.194	230 ^h , 265, 365	1,986
F _r 8	5	Derivado de flavonona	6.384	350 ^{max} , 255, 230 ^h	1,405
F _r 8	9	Derivado de ácido orgánico	9.787	235, 280 ^h , 320 ^{max}	1,824
F _r 8	41	Derivado de flavonona	37.157	230, 285 ^{max}	0,862
F _r 8	43	Apigenina-7- <i>O</i> -glucósido	38.531	235, 266, 340 ^{max}	3,069
F _r 8	45	Derivado de flavona	39.083	234 ^h , 252, 268 ^h , 345 ^{max}	2,862
F _r 8	52	Derivado de flavona	40.51	235 ^{max} , 270, 335	1,946
F _r 8	60	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	42.359	233, 270, 340 ^{max}	8,175
F _r 8	61	Derivado de flavona	43.139	233, 270 ^{max} , 340	2,879
F _r 8	64	Derivado de flavona	44.886	230 ^{max} , 270, 320	2,009
F _r 8	69	Derivado de flavona	45.928	228, 270 ^h , 350 ^{max}	2,483
F _r 8	73	Derivado de flavona	46.537	233, 270 ^h , 320 ^{max}	10,925
F _r 8	75	Naringenina	47.005	233, 270 ^h , 320 ^{max}	5,589
F _r 8	94	Derivado de flavonol	56.237	230 ^h , 265, 365 ^{max}	0,437
F _r 8	97	Salvigenina	59.048	270, 350 ^{max}	1,000
F _r 9	80	Derivado de ácido orgánico	51.532	255 ^{max} , 230 ^h , 300	1,596
F _r 9	84	Derivado de ácido orgánico	53.868	250 ^{max}	0,760
F _r 9	86	Derivado de flavonol	53.973	230 ^{max}	0,659
F _r 9	91	Acacetina	55.388	224, 268 ^h , 330	2,224
F _r 9	94	Derivado de flavonol	56.237	235 ^{max}	0,441
F _r 9	97	Salvigenina	59.048	270, 350 ^{max}	1,000

t_R: tiempo de retención; Fr: fracción ISTD: salvigenina 30ppm; A/Aistd: Área de compuesto/Area de ISTD.

Anexos L. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI⁺-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)⁺] de eriodictiol [SIM, *m/z*: 289, HCD; 20 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, eriodictiol. Véase **Tabla 21**.

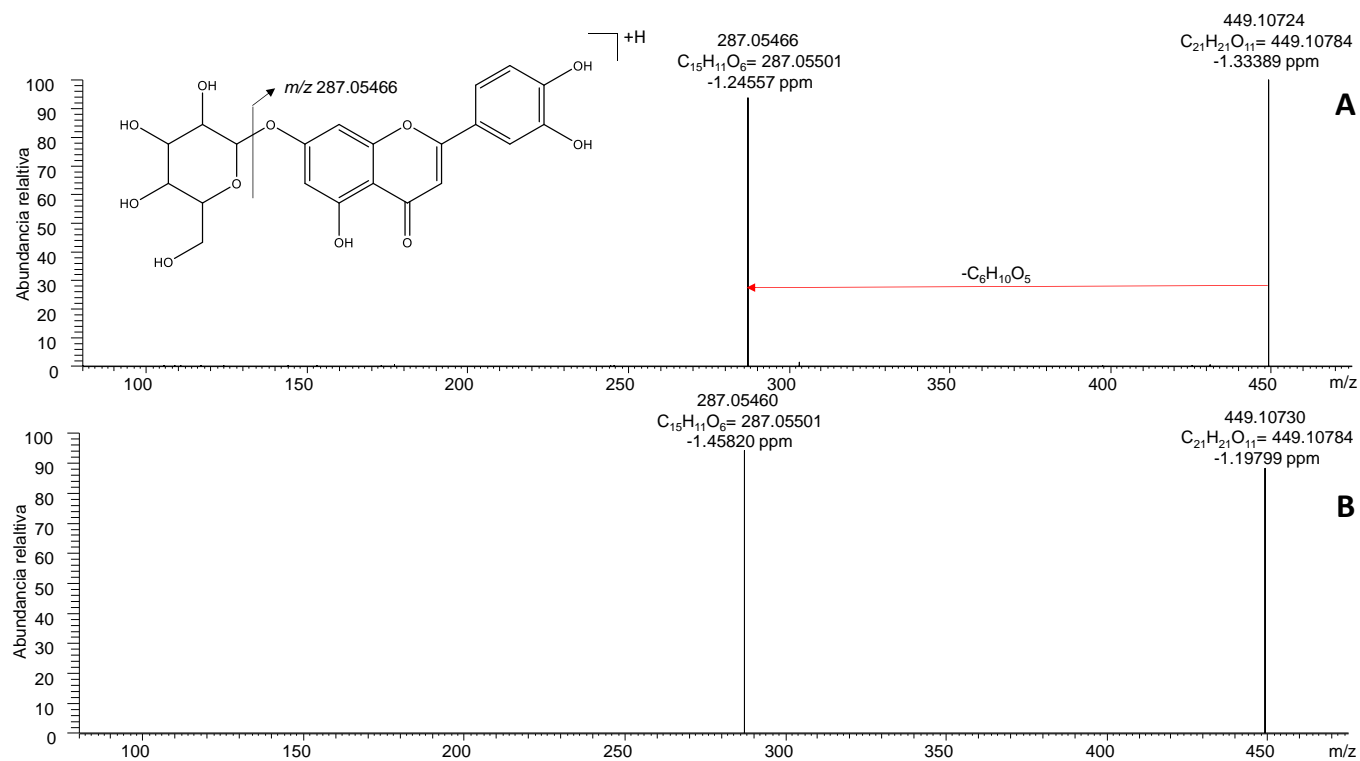


Anexos M. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)⁺] de vitexina [SIM, *m/z*: 433, HCD; 30 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, vitexina. Véase **Tabla 21**.



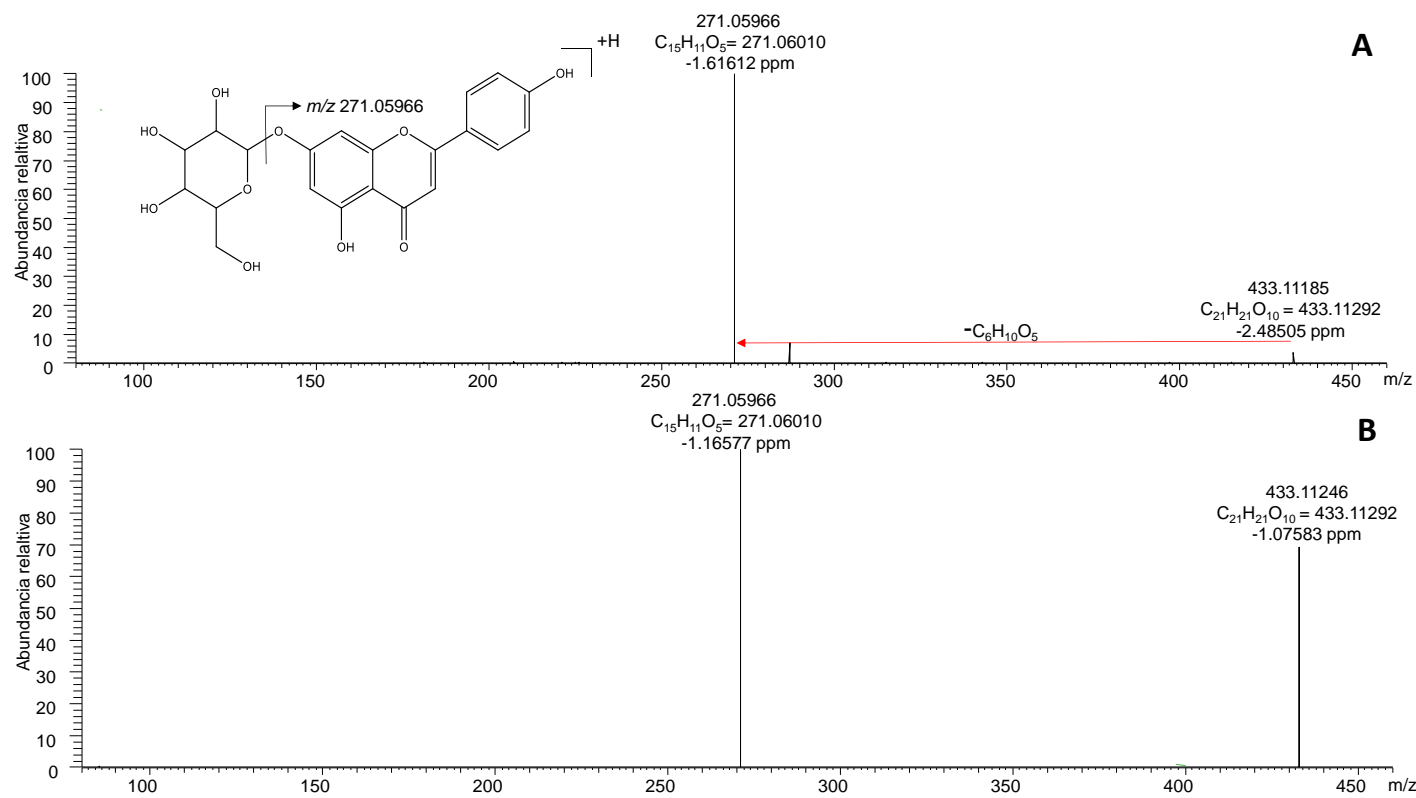
Anexos 1 Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)⁺] de luteolina-7-O-glucósido [SIM, m/z: 449, HCD; 30 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco.

B. Sustancia de referencia, luteolina-7-O-glucósido. Véase **Tabla 21**.

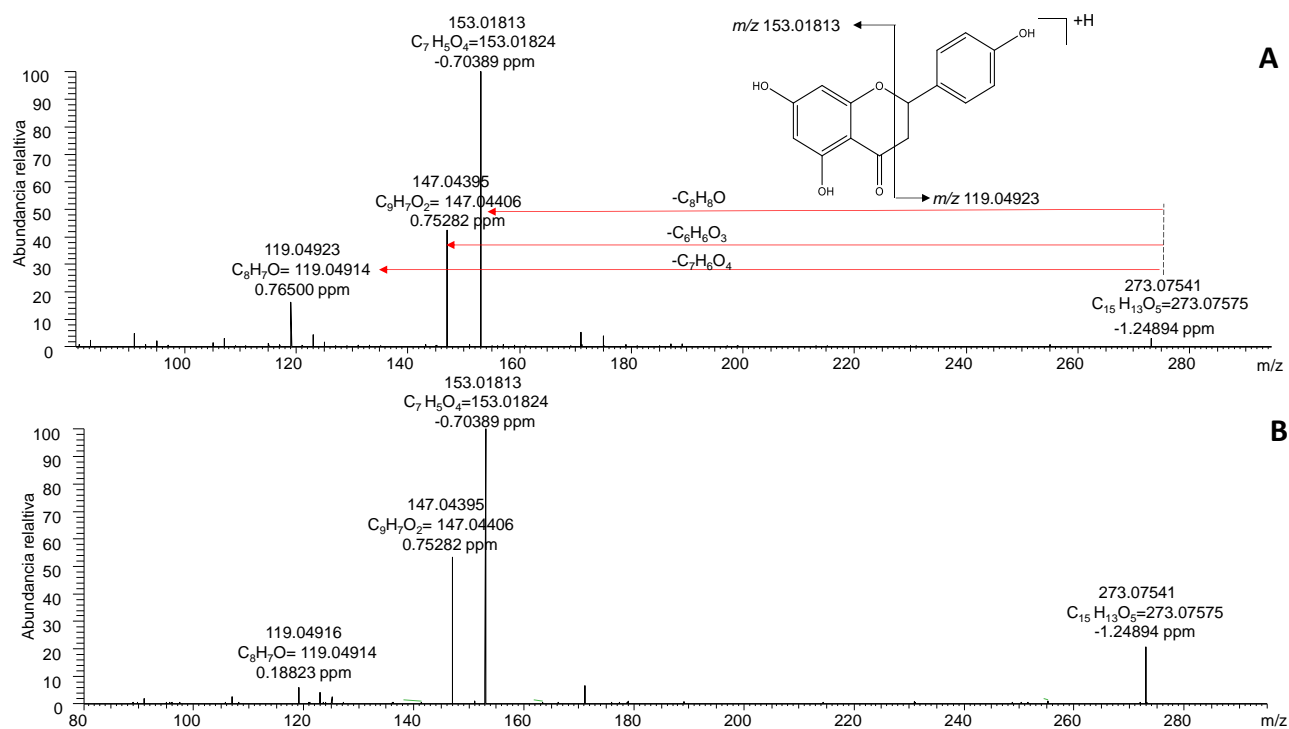


Anexos O. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)⁺] de apigenina-7-*O*-glucósido [SIM, *m/z*: 433, HCD; 20 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco.

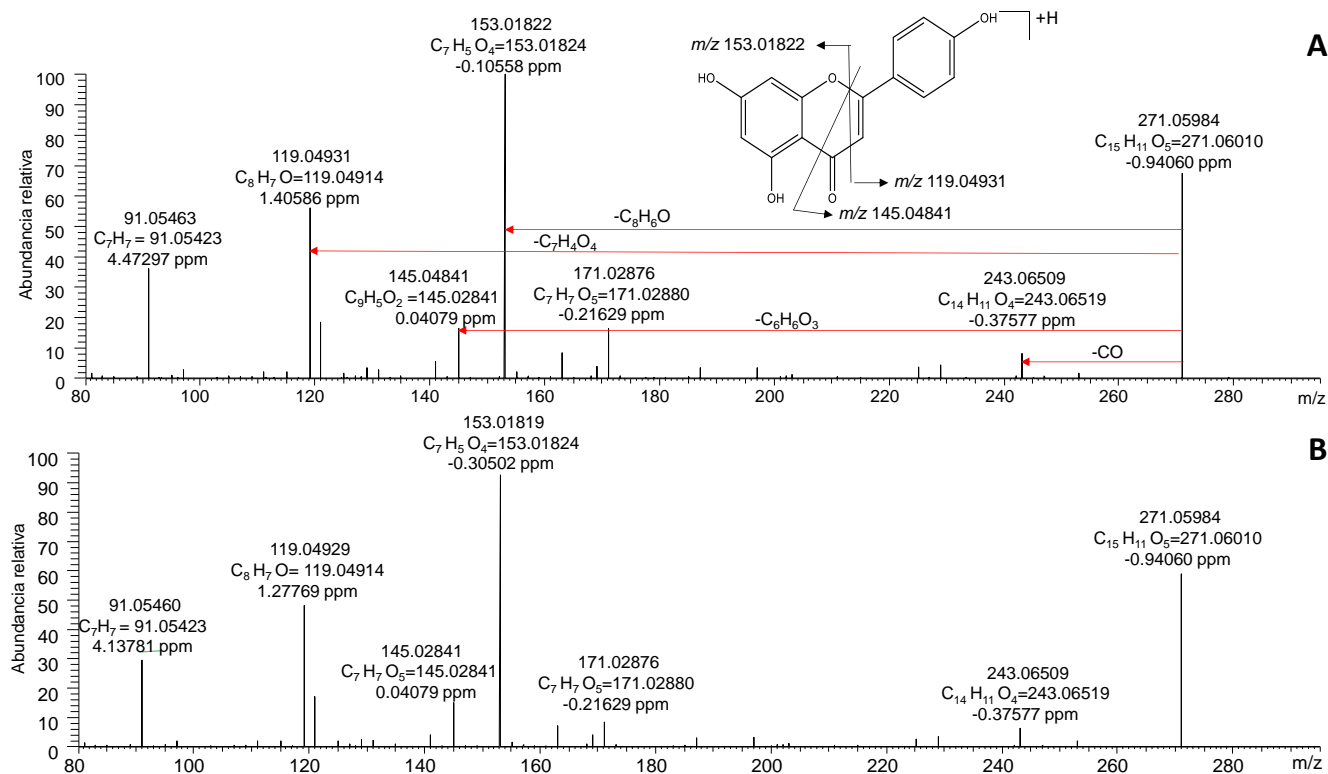
B. Sustancia de referencia, apigenina-7-*O*-glucósido. Véase **Tabla 21**.



Anexos P. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)⁺] de naringenina [SIM, m/z: 273, HCD; 50 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, naringenina. Véase **Tabla 21**.



Anexos Q. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI[±]-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)⁺] de apigenina [SIM, *m/z*: 271, HCD; 70 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, apigenina. Véase **Tabla 21**.



Anexos R. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI^{+/−}-Orbitrap-MS de las moléculas protonadas [(M+H)⁺] de acetina [SIM, *m/z*: 285, HCD; 50 eV]. A. Presente en el extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, obtenido de material vegetal fresco. B. Sustancia de referencia, acetina. Véase **Tabla 21**.

