

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS



**"PERFIL DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN
REPRESENTANTES PERUANOS DE LA TRIBU *MENTHEAE*
(*Nepetoideae*, *Lamiaceae*) Y OBTENCIÓN DE LOS
COMPONENTES MAYORITARIOS "**

Presentada por:

CARLOS ALBERTO SERRANO FLORES

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS.**

Lima - Perú

2022

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS

**"PERFIL DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN
REPRESENTANTES PERUANOS DE LA TRIBU *MENTHEAE*
(*Nepetoideae*, *Lamiaceae*) Y OBTENCIÓN DE LOS
COMPONENTES MAYORITARIOS "**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
*DOCTORIS PHILOSOPHIAE (Ph D.)***

Presentada por:

CARLOS ALBERTO SERRANO FLORES

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

**Dr. Raúl Blas Sevillano
PRESIDENTE**

**Dra. Gretty Villena Chávez
ASESOR**

**Dr. Carlos Areche Medina
CO-ASESOR**

**Dra. Rosa Espejo Joya
MIEMBRO**

**Ph.D. Ana Kitazono Sugahara
MIEMBRO**

**Dra. Ingrit Elida Collantes Díaz
MIEMBRO EXTERNO**

DEDICATORIA

A mi esposa Belea, mi hija Carla Gabriela, su esposo Daniel y mis nietos Daniel Esteban y Aura Emilia. Con amor.

A mis padres Martín y Graciela, siempre presentes en mí.

A mi hermano José Francisco, fundamental.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores la Dra. Gretty Katherina Villena Chávez y el Dr. Carlos Alberto Areche Medina.

A los botánicos Eric Frank Rodríguez Rodríguez y Hamilton Wilmer Beltrán Santiago.

A los integrantes del Jurado por sus importantes recomendaciones.

A los profesores y compañeros de la Escuela Doctoral en Ciencias e Ingeniería Biológicas-UNALM. Particularmente al Dr. Germán Fernando de la Cruz Lapa.

A la vertientes occidental y oriental de los Andes Peruanos y todos esos lugares allí escondidos.

A Gari Vidal Ccana Ccapatinta. Ejemplo.

A la Carrera Profesional de Química de UNSAAC.

A los amigos que me quedan y a los que partieron

Lo mejor.....

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	6
2.1. LA TRIBU <i>MENTHEAE</i>	6
2.2. LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN <i>MENTHEAE</i>	11
2.2.1. Aceites esenciales en especies de la tribu <i>Mentheae</i> del Perú.....	15
2.2.2. Investigaciones sobre sesquiterpenoides y diterpenoides en <i>Mentheae peruanas</i>	17
2.2.3. Los ácidos triterpénicos en <i>Mentheae</i>	22
2.2.4. Ácidos fenólicos en <i>Mentheae</i>	25
2.2.5. El ácido rosmarínico (AR).....	26
2.2.6. Flavonoides en <i>Mentheae peruanas</i>	29
2.2.7. Metabolómica.....	30
2.3. LA FITOQUÍMICA PREPARATIVA.....	35
2.3.1. Optimización de las extracciones y cristalizaciones.....	44
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	47
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS.....	56
3.2.1. Materiales de laboratorio.....	56
3.2.2. Reactivos y solventes.....	56
3.2.3. Equipos.....	57
3.3. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS.....	57
3.4. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS.....	57
3.5. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	58

3.6. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES.....	58
3.7. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINNÁMICOS TOTALES.....	59
3.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL.....	59
3.9. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EN TRECE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE <i>MENTHEAE</i>.....	59
3.10. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS TRITERPÉNICOS EN TRECE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE <i>MENTHEAE</i>.....	60
3.11. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO A PARTIR DE <i>LEPECHINIA MEYENII</i>.....	61
3.12. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EN TRECE EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 20% DE <i>MENTHEAE</i>.....	61
3.13. PERFIL DE METABOLITOS EN TRECE <i>MENTHEAE</i> POR UHPLC-ESI- MSMS.....	62
3.14. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDO ROSMARÍNICO A PARTIR DE <i>LEPECHINIA MEYENII</i>.....	63
3.15. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO URSÓLICO A PARTIR DE <i>CLINOPODIUM REVOLUTUM</i>.....	64
3.16. OPTIMIZACIÓN DE LA RECRISTALIZACIÓN DEL ÁCIDO URSÓLICO.....	64
3.17. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INFUSIÓN ACUOSA DE LAS TRECE <i>MENTHEAE</i>.....	65
3.18. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO OBTENIDO EN 3.14 POR ¹H RMN Y ¹³C RMN	65
3.19. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DEL ÁCIDO URSÓLICO RECRISTALIZADO POR ¹³C RMN.....	66
IV. RESULTADOS Y CONCLUSION 	67
4.1. CONTENIDO DE EXTRACTO ETANÓLICO SECO, ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LAS TRECE ESPECIES DE	

MENTHEAE ESTUDIADAS.....	67
4.2. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LAS TRECE MENTHEAE.....	71
4.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS TRITERPÉNICOS EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE TRECE ESPECIES DE MENTHEAE.....	74
4.4. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO A PARTIR DE LEPECHINIA MEYENII.....	77
4.5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EN TRECE MENTHEAE EN LOS EXTRACTOS EN ETANOL AL 20%.....	82
4.6. PERFIL DE METABOLITOS EN TRECE ESPECIES DE MENTHEAE POR UHPLC-ESI-MSMS.....	87
4.7 PURIFICACIÓN DE ÁCIDO ROSMARÍNICO A PARTIR DE LEPECHINIA MEYENII.....	158
4.8. OBTENCIÓN DE ÁCIDO URSÓLICO A PARTIR DE CLINOPODIUM REVOLUTUM.....	161
4.9. OPTIMIZACIÓN DE CRISTALIZACIÓN DEL ÁCIDO URSÓLICO.....	161
4.10 CARACTERIZACIÓN DE LA INFUSIÓN ACUOSA DE LAS TRECE MENTHEAE.....	165
V. CONCLUSIONES.....	167
VI. RECOMENDACIONES.....	170
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171
VIII. ANEXOS.....	193

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principales sitios de almacenamiento de metabolitos secundarios en estructuras vegetales	3
Figura 2: Estructura química del ácido rosmarínico	5
Figura 3: Distribución del género <i>Lepechinia</i> en América. Es probable que <i>Lepechinia</i> se haya diversificado primero en Centro América.	10
Figura 4: Micrografías electrónicas de barrido y luz de tricomas no glandulares de la tribu <i>Mentheae</i> .	13
Figura 5: Estructura química del isopreno.	14
Figura 6: Principales esqueletos carbonados de sesquiterpenoides presentes en <i>Salvia</i> .	17
Figura 7: Principales esqueletos carbonados de diterpenoides presentes en <i>Salvia</i> .	18
Figura 8: Estructura del 12-hidroxi-11, 14 – diceto-6, 8, 12 – abietatrien-19, 20-olido de <i>Salvia cuspidata</i> (R. y P.) subespecie <i>gilliesi</i> (Benth.) J.R.I. Wood.	19
Figura 9: Estructura de la molécula de 5-epi-icetexona de <i>Salvia gilliesi</i> con actividad contra <i>T. cruzi</i> .	19
Figura 10: Estructura química de 5 diterpenoides tipo ent-clerodano de <i>Salvia haenkei</i> .	20
Figura 11: Estructuras químicas de diterpenoides fenólicos de <i>Lepechinia meyenii</i> .	21
Figura 12: Estructuras químicas de los principales ácidos triterpénicos presentes en el género <i>Salvia</i> , <i>Mentheae</i> .	22
Figura 13: Precios de algunos metabolitos secundarios provenientes de plantas.	24
Figura 14: Estructuras químicas de ácidos fenólicos comunes reportados en <i>Mentheae</i> .	25
Figura 15: Estructura química del ácido rosmarínico.	28

Figura 16: Estructura química de glicósidos de flavonoide reportados para <i>Minthostachys spicata</i> y la flavona diosmetina de <i>Lepechinia meyenii</i> .	29
Figura 17: La <i>metabolómica</i> en el contexto del flujo de la información genética.	31
Figura 18: Diagrama de flujo para el estudio metabolómico en plantas.	32
Figura 19: Espectrometría de masas como herramienta para metabolómica.	33
Figura 20: Particiones sucesivas de un extracto etanólico de <i>Brucea antidysinterica</i> (<i>Simaroubaceae</i>) para separar sus principios antileucémicos.	37
Figura 21: Método de fraccionamiento optimizado.	38
Figura 22: Esquema de fraccionamiento de extractos de plantas para evitar la formación de emulsiones durante la recuperación de terpenoides.	39
Figura 23: Esquema general de la recristalización de sustancias orgánicas.	40
Figura 24: Esquema general de la recristalización de sustancias orgánicas.	41
Figura 25: Variación de la pureza y rendimiento de los cristales en función al número de recristalizaciones.	42
Figura 26: La cristalización por deshidratación al vacío.	43
Figura 27: Perfiles de enfriamiento para controlar la cristalización.	46
Figura 28: <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.)(Epl.), Pumahuanca – Cusco, febrero 2014.	48
Figura 29: <i>Clinopodium brevicalyx</i> Epling (Harley & Granda), Tambomachay-Cusco, junio 2017.	48
Figura 30: <i>Salvia oppositiflora</i> R. y P. Saxaywamán – Cusco, junio 2017.	49
Figura 31: <i>Lepechinia floribunda</i> (Benth). Huarán-Cusco, julio 2014.	49
Figura 32: <i>Minthostachys mollis</i> Griseb. Cajatambo, Lima, junio 2017.	50
Figura 33: <i>Salvia sagittata</i> R. y P. Sullcapunta-Huánuco, enero 2014.	50
Figura 34: <i>Salvia cuspidata subsp. cuspidata</i> . (R. y P.) Cajatambo, -Lima, junio 2017.	51
Figura 35: <i>Clinopodium revolutum</i> (Briq. et Engl.) (Harley & Grandes).	51
Figura 36: <i>Clinopodium sericeum</i> (Presl ex Benth) Govaerts. Gocta-Amazonas, febrero 2016.	52
Figura 37: <i>Salvia haenkei</i> Benth. Cuchumbaya-Moquegua, julio 2013.	52
Figura 38: <i>Salvia dombeyi</i> , Epling, Laraos-Lima, febrero 2018.	53

Figura 39: <i>Hedeoma mandoniana</i> , Anta-Cusco, febrero 2018.	53
Figura 40: <i>Clinopodium pulchellum</i> . Carhuayoc, San Marcos-Ancash, marzo 2018.	54
Figura 41: Mapa de zonas de colecta de las 13 especies de <i>Mentheae</i> analizadas en esta investigación.	55
Figura 42: Esquema general para la purificación de ácido rosmarínico a partir de <i>L. meyenii</i> .	63
Figura 43: Perfil de compuestos fenólicos en las trece especies <i>Mentheae</i> .	68
Figura 44: Cromatografía de ácidos triterpénicos en las trece <i>Mentheae</i> .	69
Figura 45: Cromatogramas de la cuantificación de ácido rosmarínico.	73
Figura 46: Cromatogramas de ácidos triterpénicos.	76
Figura 47: Diagrama de Pareto	79
Figura 48: Gráfico de superficie - respuesta para la extracción de AR.	80
Figura 49: Recuperación de ácido rosmarínico a partir de <i>Lepechinia meyenii</i> .	81
Figura 50: Cromatogramas de extractos etanólicos al 20% .	84
Figura 51: Contenido de ácidos triterpénicos y de ácido rosmarínico.	86
Figura 52: Fragmentación del ácido rosmarínico.	136
Figura 53: Componentes fenólicos comunes en <i>Mentheae</i> .	137
Figura 54: La fragmentación del aldehído protocatechuico.	138
Figura 55: Patrón de fragmentación del ácido cafeico.	138

Figura 56: Esquema de la fragmentación del danshensu.	139
Figura 57: Estructura química del ácido salviánico C.	140
Figura 58: Planteamiento de fragmentación del ácido salviánico C.	141
Figura 59: Los ácidos cafeoilquínicos o ácidos clorogénicos.	142
Figura 60: Los ácidos cafeoilquínicos o ácidos clorogénicos.	149
Figura 61 Diversidad de ácidos salvianólicos.	150
Figura 62: Fragmentaciones del ácido sagerínico con datos de <i>L. meyenii</i> .	151
Figura 63: Fragmentación del ácido salvianólico B de <i>Clinopodium brevicalyx</i> .	152
Figura 64: Fragmentación del ácido salvianólico A.	153
Figura 65: Descarboxilación del ácido salvianólico F.	153
Figura 66: Planteamiento de fragmentación del ácido yunnaneico E.	154
Figura 67: Planteamiento de fragmentación del ácido clerodendranoico H.	154
Figura 68: Fragmentación del ácido litospérmico en <i>Clinopodium sericeum</i> .	155
Figura 69: El ácido carnósico, rosmanol y carnosol.	156
Figura 70: Diterpenoides de <i>Lepechinia</i> y componentes de <i>S. cuspidata</i> y <i>S. dombeyi</i> .	157
Figura 71: Cromatogramas mostrando el “ácido rosmarínico al 100% de pureza”	160
Figura 72: Primera optimización de la recristalización de ácido ursólico	162
Figura 73: Rendimiento y grado de pureza de ácido ursólico obtenido mediante el segundo experimento de optimización de la recristalización.	164
Figura 74: Cromatograma del ácido ursólico al 98.52% de pureza.	165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tipos y número de metabolitos secundarios presentes en plantas	2
Tabla 2: Número de especies de plantas por género depositadas en el Neotropical Herbarium y en el Herbario UNMSM.	7
Tabla 3: Principales tipos de terpenoides en plantas.	14
Tabla 4: Reacciones comunes en EM con ionización negativa ESI (-).	35
Tabla 5: Comparación de términos empleados en 3 procedimientos de fraccionamiento.	40
Tabla 6: Variables para la optimización en la extracción del ácido rosmarínico.	61
Tabla 7: Porcentajes de extracto etanólico seco en trece especies de <i>Menthae</i> .	67
Tabla 8: Resumen del contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinnámicos totales y la actividad antioxidante en extractos etanólicos de trece especies de <i>Menthae</i> .	70
Tabla 9: Contenido de ácido rosmarínico en trece especies de <i>Menthae</i> utilizando etanol como extractante.	72
Tabla 10: Contenido (%) de ácido oleanólico y ácido ursólico en las trece especies peruanas de <i>Menthae</i> .	75
Tabla 11: Variables en Diseño Box–Behnken para extraer ácido rosmarínico a partir de <i>Lepechinia meyenii</i>	77
Tabla 12: Diseño Box Behnken para la optimización de la extracción de ácido rosmarínico.	78
Tabla 13: Rendimiento de extracción (mg) de ácido rosmarínico según el número de extracciones	81

Tabla 14: Contenido de ácido rosmarínico en trece especies de <i>Mentheae</i> utilizando etanol al 20% como extractante.	83
Tabla 15: Relación de los contenidos de ácido rosmarínico y ácidos triterpénicos en las trece especies peruanas de <i>Mentheae</i> .	85
Tabla 16: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Lepechinia meyenii</i> .	87
Tabla 17: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Clinopodium brevicalyx</i>	91
Tabla 18: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Salvia oppositiflora</i> .	95
Tabla 19: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Lepechinia floribunda</i> .	97
Tabla 20: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Minthostachys mollis</i>	102
Tabla 21: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Salvia sagittata</i> .	107
Tabla 22: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Salvia cuspidata</i> .	110
Tabla 23: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Clinopodium revolutum</i>	114
Tabla 24: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Clinopodium sericeum</i>	119
Tabla 25: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Salvia haenkei</i>	122
Tabla 26: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Salvia dombeyi</i>	124
Tabla 27: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Hedeoma mandoniana</i>	126
Tabla 28: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de <i>Clinopodium pulchellum</i>	

Tabla 29: Resumen de metabolitos en trece especies peruanas de <i>Menthae</i> con mención a su fragmentografía MS/MS.	128
Tabla 30: Agliconas de flavonoide presentes en las trece especies peruanas de <i>Menthae</i> estudiadas.	132
Tabla 31: Acidos fenólicos superiores presentes en las trece especies peruanas de <i>Menthae</i> estudiadas.	143
Tabla 32: Condiciones y resultados del procedimiento optimizado para obtener ácido rosmarínico a partir de <i>Lepechinia meyenii</i> .	145
Tabla 33: Solubilidad del ácido ursólico en etanol.	158
Tabla 34: Primer experimento de recuperación y pureza del ácido ursólico.	161
Tabla 35: Segundo experimento de recuperación y pureza del ácido ursólico	162
Tabla 36: Fenoles totales, capacidad antioxidante y contenido en ácido rosmarínico de las trece infusiones de <i>Menthae</i> .	163
	166

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Certificación botánica	193
ANEXO 2: Especies de <i>Mentheae</i> en dos herbarios	194
ANEXO 3: Espectros de RMN de AR y AU	199
ANEXO 4: Los trece cromatogramas DAD-UHPLC MS/MS	205
ANEXO 5: Fragmentaciones de los metabolitos encontrados	218
ANEXO 6: Publicaciones generadas en la presente investigación.	225

RESUMEN

Las *Mentheae* (*Lamiaceae*) del Perú están representadas por los géneros *Clinopodium*, *Hedeoma*, *Lepechinia*, *Minthostachys* y *Salvia*. Los metabolitos de *Mentheae* los podemos clasificar en lipofílicos (mono, sesqui, di y triterpenoides) e hidrofílicos (fenilpropanoides, flavonoides, ácidos salvianólicos), algunos de estos metabolitos son característicos solo para la familia *Lamiaceae* y otros poseen propiedades biológicas importantes lo que ha determinado el uso fitoterápico de las plantas estudiadas. Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron identificar, cuantificar y obtener algunos compuestos fenólicos y terpenoidales a partir de los extractos alcohólicos de trece especies de la tribu *Mentheae* (*Nepetoideae*, *Lamiaceae*) procedentes de la sierra de cinco departamentos del Perú, y así los objetivos específicos fueron: 1) La determinación de su capacidad antioxidante total, su contenido de fenoles totales, de flavonoides totales y de ácidos hidroxicinnámicos totales así como su concentración en ácido rosmarínico y de los ácidos triterpénicos oleanólico y ursólico. 2) El perfil de metabolitos fenólicos y terpenoidales mediante cromatografía líquida de ultra desempeño acoplada a espectrometría de masas de alta resolución en tándem UHPLC-ESI-MSMS, 3) El desarrollo de métodos preparativos para la obtención de metabolitos bioactivos en aquellas plantas con alta concentración en éstos, y 4) La evaluación de la capacidad antioxidante, el contenido de ácido rosmarínico y de ácidos triterpénicos en las infusiones acuosas, forma tradicional de uso. Los resultados más importantes fueron que todas las especies estudiadas tienen actividad antioxidante directamente relacionada con su contenido en fenoles totales y particularmente con su contenido en ácido rosmarínico. También es notable la presencia, en todas las muestras, de los ácidos triterpénicos, oleanólico y ursólico. Los metabolitos determinados por UHPLC-ESI-MSMS son los flavonoides, terpenoides y notablemente los derivados de los ácidos cafeico y el 3,4-dihidroxifenil-láctico, entre los cuales resaltan los ácidos monocateoilquínicos o ácidos clorogénicos y los llamados ácidos salvianólicos, siendo el ácido rosmarínico el más importante de ellos y a partir del cual se producen los ácidos salvianólicos A, B y F, el ácido litospermico, el ácido yunnaneico E, el ácido sagerínico y el ácido clerodendranoico H. Los ácidos salvianólicos A y B son particularmente útiles por su efecto contra las fibrosis, patología siempre presente en cánceres y el decaimiento neurodegenerativo. La planta *Lepechinia meyenii* se mostró como la mejor fuente de ácido

rosmarínico mientras que *Clinopodium revolutum* como la mejor en ácido ursólico, dos moléculas farmacológicamente importantes. Además las especies de *Lepechinia* muestran la presencia de los terpenoides fenólicos, ácido carnósico, el rosmanol y carnosol que también son moléculas bioactivas muy importantes. Por otro lado *Lepechinia floribunda* y *Clinopodium sericeum* son las especies con mayor diversidad en ácidos salvianólicos. Así las *Menthae* peruanas son potencialmente útiles como agentes fitoterapéuticos tal como sus equivalentes asiáticos y europeos. Posteriormente se muestra el desarrollo de métodos preparativos optimizados de extracción y purificación, sobre *Lepechinia meyenii* para ácido rosmarínico mediante cristalización por deshidratación al vacío y sobre *Clinopodium revolutum* para ácido ursólico mediante recristalización por enfriamiento, obteniéndose en ambos casos productos de alta pureza. Finalmente, se determinó la capacidad antioxidante total y las concentraciones de ácido rosmarínico y de ácidos triterpénicos en las infusiones acuosas de las trece plantas, encontrándose el ácido rosmarínico en todas ellas más al contrario, en ninguna, la presencia de los ácidos triterpénicos oleanólico y ursólico. Solamente en la decocción de *Clinopodium revolutum* se ha detectado trazas de estos triterpenoides. Por eso, la presencia de estas sustancias en los preparados acuosos justifican en parte el uso que se hace de ellas. Las plantas de mayor tradición etnofarmacológica son precisamente las de mayor concentración en ácido rosmarínico y en ácidos triterpénicos.

Palabras clave : *Menthae*, *Lepechinia*, *Salvia*, *Hedeoma*, *Clinopodium*, *Minthostachys*, *Lamiaceae*, metabolitos secundarios, cromatografía, espectrometría de masas, ácido rosmarínico, ácido ursólico.

ABSTRACT

The *Mentheae* (Lamiaceae) of Perú are represented by the genera *Clinopodium*, *Hedeoma*, *Lepechinia*, *Minthostachys*, and *Salvia*. *Mentheae* metabolites can be classified into lipophilic (mono, sesqui, di and triterpenoids) and hydrophilic (phenylpropanoids, flavonoids, salvianolic acids), some of these metabolites are characteristic only for the *Lamiaceae* family and others have important biological properties, which has been determined the phytotherapeutic use of the plants studied. The objectives of this research work were to identify, quantify and obtain some phenolic and terpenoidal compounds from the alcoholic extracts of thirteen species the *Mentheae* tribe (*Nepetoideae*, *Lamiaceae*) from the highlands of five departments of Peru, and thus the specific objectives were: 1) The determination of its total antioxidant capacity, its content of total phenols, total flavonoids and total hydroxycinnamic acids as well as its concentration in rosmarinic acid and triterpenic acids, oleanolic and ursolic. 2) The profile of phenolic and terpenoidal metabolites by ultra high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry in tandem UHPLC-ESI-MSMS. 3) The development of preparative methods for obtaining bioactive metabolites in those plants with high concentration in these, and 4) The evaluation of the antioxidant capacity, the content of rosmarinic acid and triterpenic acids in aqueous infusions, the traditional way of use. All the species studied have antioxidant activity directly related to their total phenol content and particularly to their rosmarinic acid content. The presence of triterpenic acids, oleanolic and ursolic is also notable in all samples. The metabolites determined by UHPLC-ESI-MSMS are flavonoids, terpenoids and notably those derived from caffeic and 3,4-dihydroxyphenyl-lactic acids, among which the monocaffeoylquinic acids or chlorogenic acids and the so-called salvianolic acids stand out, being the rosmarinic acid, the most important of them and from which salvianolic acids A, B and F, lithospermic acid, yunnaneic acid E, sagerinic acid and clerodendranoic acid H are produced. Salvianolic acids A and B are particularly useful for their effect against fibrosis, a pathology always present in cancers and neurodegenerative decay. The herb *Lepechinia meyenii* was shown as the best source of rosmarinic acid while *Clinopodium revolutum* as the best in ursolic acid, two pharmacologically important molecules. In addition, *Lepechinia* species show the presence of phenolic terpenoids,

carnosic acid, rosmanol and carnosol, which are also very important bioactive molecules. On the other hand, *Lepechinia floribunda* and *Clinopodium sericeum* are the species with the greatest diversity in salvianolic acids. Thus the Peruvian *Mentheae* are potentially useful as phytotherapeutic agents just like their Asian and European counterparts. Subsequently, the development of optimized preparative extraction and purification methods is shown, on *Lepechinia meyenii* for rosmarinic acid by crystallization by vacuum dehydration and on *Clinopodium revolutum* for ursolic acid by recrystallization by cooling, obtaining in both cases high purity products. Finally, the total antioxidant capacity and the concentrations of rosmarinic acid and triterpenic acids in the aqueous infusions of the thirteen plants were determined, finding rosmarinic acid in all of them, more to the contrary, in none, the presence of triterpenic acids, oleanolic and ursolic. Traces of these triterpenoids have only been detected in the decoction of *Clinopodium revolutum*. For this reason, the presence of these substances in aqueous preparations partially justifies the use made of them. The plants with the greatest ethnopharmacological tradition are precisely those with the highest concentration of rosmarinic acid and triterpenic acids.

Keywords: *Mentheae*, *Lepechinia*, *Salvia*, *Hedeoma*, *Clinopodium*, *Minthostachys*, *Lamiaceae*, secondary metabolites, chromatography, mass spectrometry, rosmarinic acid, ursolic acid.

I. INTRODUCCIÓN

Un aspecto típico de las plantas es su capacidad para sintetizar una enorme variedad de compuestos de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios, aparentemente cumplen un rol defensivo y como agentes de señalización y son importantes en la supervivencia de la planta y en su habilidad reproductiva. Algunos metabolitos secundarios no tienen una función clara y se sintetizan mediante mecanismos enzimáticos complejos.

Los metabolitos secundarios tienen pesos moleculares usualmente menores a 2 kDa y se producen generalmente en pequeñas cantidades y en tipos particulares de plantas. El metabolismo secundario no es exclusivo de plantas y también se produce en microorganismos, en organismos acuáticos e incluso en animales superiores (Mattern *et al.* 1997). Estos además son mediadores en las interacciones entre organismos, por ejemplo, en la relación planta - microbioma (Pang *et al.* 2021).

La Tabla 1 muestra los principales tipos de metabolitos secundarios en plantas. Un aspecto particular de los metabolitos secundarios es que se acumulan en órganos vegetales importantes para la supervivencia y la reproducción con niveles traza o incluso mayores al 3% (Ngo *et al.* 2018). En la Figura 1 se muestran los principales sitios de almacenamiento de metabolitos secundarios. La célula vegetal se distingue de otras células eucarióticas por poseer una pared celular rígida basada en celulosa, cloroplastos y una gran vacuola central (Wink 1993, 2011). El principal componente del líquido vacuolar es el agua, generalmente a pH ácido, aquí están disueltas sales, azúcares, algunas proteínas solubles, metabolitos secundarios hidrofílicos como los glicósidos de flavonoides y otros compuestos fenólicos. También productos tóxicos como la nicotina o pigmentos antociánicos. Las vacuolas están también implicadas en la desintegración de macromoléculas para reciclaje dentro de la célula. En cambio, los metabolitos secundarios lipofílicos se depositan en ductos de resina, laticíferos, tricomas, células oleosas o en la cutícula. Como los sitios de síntesis no son necesariamente los sitios de almacenamiento, hay transporte de larga distancia mediante el xilema, floema o mediante el apoplasto. Este transporte implica mecanismos intra e

intercelulares que utilizan proteínas transportadoras. El entendimiento de los mecanismos de transporte y síntesis de metabolitos en la planta es fundamental para aplicaciones biotecnológicas de producción de metabolitos secundarios a altas concentraciones (Gani *et al.* 2020).

Tabla 1: Tipos y número de metabolitos secundarios presentes en plantas

Tipo de metabolito secundario	Número
Con nitrógeno	
Alcaloides	21000
Aminoácidos no proteicos	700
Aminas	100
Glicósidos cianogénicos	60
Glucosinolatos	100
Alcamidas	150
Lectinas, péptidos y polipéptidos	2000
Sin nitrógeno	
Mono, sesqui, di, tri y tetraterpenoides	22000
Flavonoides, taninos	5000
Fenilpropanoides, lignina, coumarinas, lignanos	2000
Poliacetilenos, ácidos grasos, ceras	1500
policétidos	750
Carbohidratos, ácidos orgánicos	200

Fuente: Wink (2010)

Entre los roles más importantes de los metabolitos secundarios vegetales se consideran: (i) la protección contra condiciones ambientales adversas, (ii) la protección contra patógenos y herbívoros, (iii) como disuasivos alimentarios y (iv) como atrayentes de polinizadores y dispersadores de semillas (Bottger *et al.* 2018). Los metabolitos secundarios incluyen a colorantes, saborizantes, fragancias, estimulantes, alucinógenos, insecticidas, venenos o agentes medicinales.

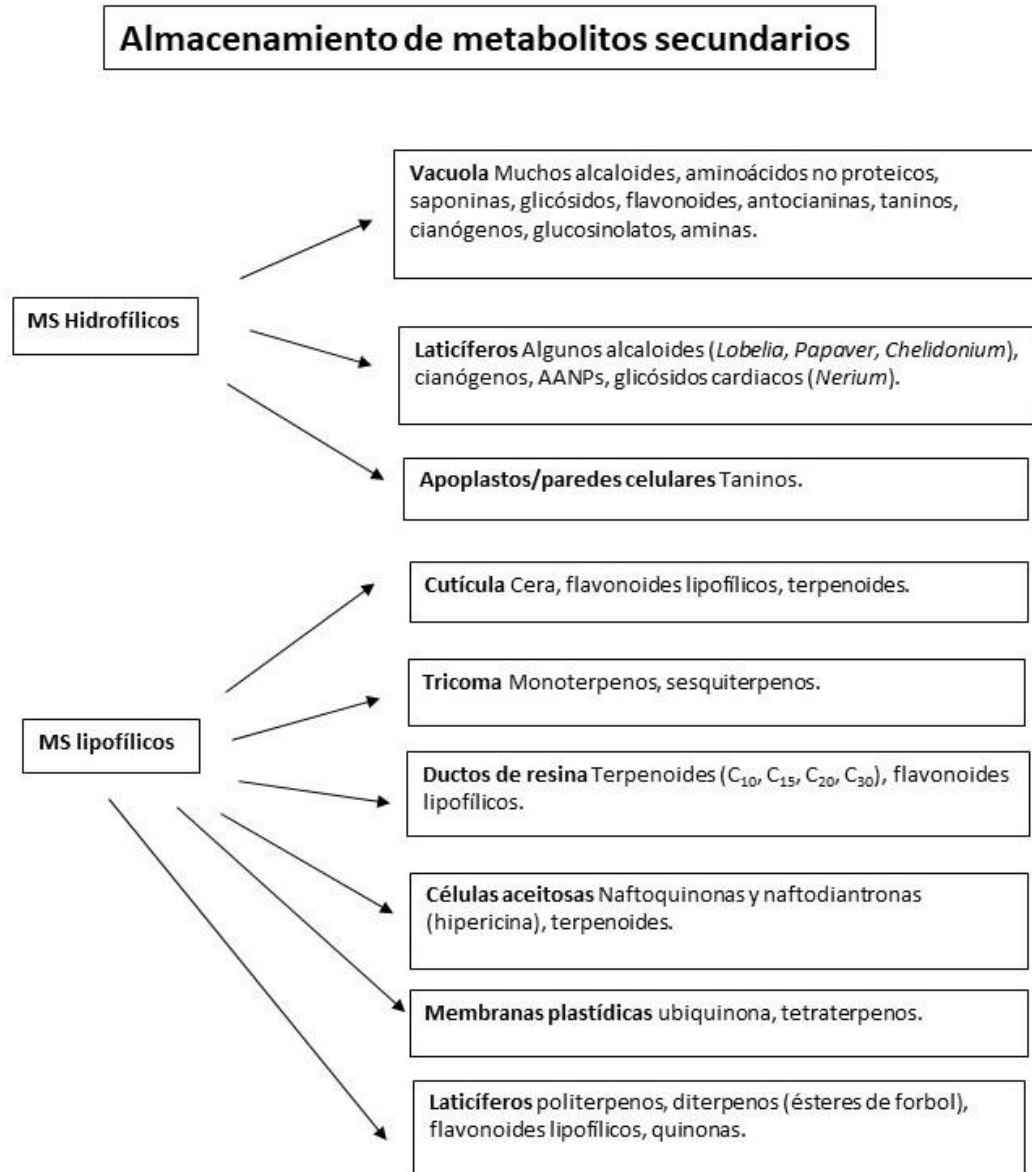


Figura 1: Principales sitios de almacenamiento de metabolitos secundarios en estructuras vegetales.

Fuente: Wink (2010).

Entre las plantas que contienen altas concentraciones de metabolitos secundarios, se encuentran las pertenecientes a la familia *Lamiaceae* que, de acuerdo con su estructura floral, se muestra altamente evolucionada. La variabilidad estructural entre las especies de dicha familia ha hecho difícil darle un sistema de clasificación inequívoco. Mientras que atribuirle como 7000 especies y más de 220 géneros no fue problema, agruparlas en subfamilias, tribus

y subtribus ha sido materia de debate desde los trabajos de Bentham en 1876. Clásicamente “*Labiatae*”, basada en la morfología del polen, estaba dividida en dos subfamilias: *Nepetoideae* y *Lamioideae*. Los metabolitos secundarios característicos de *Lamiaceae* incluyen los mono, sesqui, di y triterpenoides (ubicados en tricomas, cutícula de hojas) y variedad de compuestos fenólicos en la vacuola (Häusler *et al.* 1993) destacando los ácidos fenólicos y los flavonoides por su abundancia, en cambio los metabolitos nitrogenados como los alcaloides son prácticamente ausentes en *Lamiaceae*. Los iridoides (que son glicósidos de monoterpenos) presentes en *Lamioideae* (Von Poser *et al.* 2000), son buenos marcadores taxonómicos puesto están ausentes en *Nepetoideae* que, en cambio, producen mono y sesquiterpenos volátiles ubicados en tricomas y un compuesto fenólico particular que es el ácido rosmarínico (**AR**) que se acumula en la vacuola (Chaprin *et al.* 1984; Häusler *et al.* 1988) y que no lo produce *Lamioideae* (Wink 2003). Si bien el ácido rosmarínico permite diferenciar entre *Lamioideae* y *Nepetoideae*, esta sustancia no es buen marcador para *Lamiaceae* pues también está presente en otras familias como *Boraginaceae*, *Asteraceae*, *Onagraceae*, *Celastraceae*, *Rosaceae*, *Cucurbitaceae*, *Malvaceae*, *Sterculiaceae*, *Tiliaceae*, *Rubiaceae*, *Plantaginaceae*, *Acanthaceae*, *Scrophulariaceae*, *Hydrophyllaceae*, *Apiaceae*, *Araliaceae*, *Dipsacaceae*, en monocotiledoneas, en algas (Petersen *et al.* 2009). El ácido rosmarínico (Figura 2) posee una actividad antioxidante bien documentada, puede prevenir el daño celular causado por los radicales libres, reduciendo así el riesgo de cáncer y arterioesclerosis. Además, tiene actividad antiinflamatoria y antialérgica. Una revisión exhaustiva de aplicaciones del ácido rosmarínico es la presentada por (Bulgakov *et al.* 2012).

Las salvias (*Salvia*), mentas (*Mentha*), oreganos (*Origanum*), el romero (*Rosmarinus*), toronjil (*Melissa*) entre otras plantas aromáticas-medicinales son las plantas más representativas de la gran familia *Lamiaceae*, todas ellas pertenecen a la sub-familia *Nepetoideae*, pero más exactamente a la tribu *Mentheae*. El Perú posee un buen número de éstas, en los géneros *Salvia*, *Lepechinia*, *Minthostachys*, *Clinopodium* y *Hedeoma*.

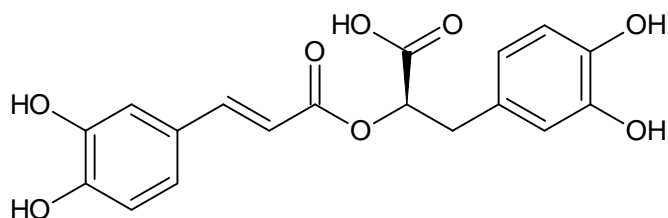


Figura 2: Estructura química del ácido rosmarínico (**AR**)

En el presente trabajo de tesis se plantea utilizar métodos altamente sensibles como es la cromatografía líquida asociada a la espectrometría de masas de alta resolución para caracterizar los principales compuestos fenólicos y terpenoides en un grupo de *Menthaes* del Perú con objeto de entender el uso tradicional de éstas y también para considerar su uso como materia prima para preparar sustancias puras. Resulta necesario generar información científicamente validada de los metabolitos presentes en *Menthae* del Perú y comparar su composición con *Menthae* de otros lugares del mundo para definir adecuadamente su aplicación fitoterapéutica.

Objetivo General:

Identificar, cuantificar y obtener los compuestos fenólicos y triterpenoides en extractos etanólicos de representantes peruanos de la tribu *Menthae* (*Nepetoideae*, *Lamiaceae*).

Objetivos Específicos:

- Determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxycinnámicos totales y la actividad antioxidante de los extractos etanólicos, particularmente su contenido en ácido rosmarínico y en ácidos triterpénicos bioactivos por DAD-UHPLC.
- Evaluar el perfil de sustancias fenólicas y terpenoidales en el extracto etanólico de las plantas en estudio mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas de alta resolución en tándem.
- Desarrollar métodos preparativos para la obtención de los principales metabolitos bioactivos en aquellas plantas con mayores contenidos en éstos.
- Determinar los compuestos fenólicos, actividad antioxidante, concentración de ácido rosmarínico y de ácidos triterpénicos en las infusiones acuosas de las *Menthae* en estudio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LA TRIBU *MENTHEAE*

Lamiaceae es una familia botánica cosmopolita con más de 236 géneros y aproximadamente 7000 especies (Moon *et al.* 2008). La familia *Lamiaceae* en el Perú presenta alrededor de 21 géneros y 190 especies, mayormente hierbas y arbustos. El Perú tiene 57 especies endémicas en 9 géneros (Rodríguez *et al.* 2006).

La familia *Lamiaceae* tiene 12 subfamilias (Zhao *et al.* 2021):

- *Ajugoideae*
- *Lamioideae*
- ***Nepetoideae* (3400 especies, 105 géneros)**
- *Prostantheroideae*
- *Scutellaroideae*
- *Symphorematoideae*
- *Viticoideae*
- *Callicarpoideae*
- *Tectonoideae*
- *Premnoideae*
- *Peronematoideae*
- *Cymaroideae*

La subfamilia *Nepetoideae* tiene 3 tribus (Drew *et al.* 2011):

Elsholtzieae

***Mentheae* (65 géneros)**

Ocimeae

Mentheae es la más grande y económicamente importante tribu de la subfamilia *Nepetoideae* con 2300 especies y 65 géneros (Drew *et al.* 2012). La subfamilia se caracteriza por el polen

hexacolpado, semillas exalbuminosas, embrión tipo invertido y la presencia de aceite esencial y de ácido rosmarínico.

La tribu *Mentheae*, a su vez, se divide en cinco sub-tribus (Brauchler *et al.* 2010; Drew *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2021):

***Menthinae* (43 géneros)**

***Salviinae* (10 géneros)**

y también *Nepetinae*, *Prunellinae* y *Lycopinae*.

Un inventario de la tribu *Mentheae* realizado en setiembre y octubre del 2017 en dos herbarios: el Neotropical Herbarium (Field Museum Natural History-Chicago) y el herbario del Museo de Historia Natural – UNMSM “Javier Prado” registró los datos mostrados en la Tabla 4.1.

Tabla 2: Número de especies de plantas por género depositadas en el Neotropical Herbarium y en el Herbario UNMSM.

Género	Neotropical Herbarium	Herbario UNMSM
<i>Clinopodium</i>	22	29
<i>Hedeoma</i>	1	1
<i>Lepechinia</i>	5	11
<i>Minthostachys</i>	2	7
<i>Salvia</i>	63	59

En Perú, la tribu *Mentheae* tiene cinco géneros: *Clinopodium*, *Hedeoma* y *Minthostachys* (*Menthinae*) y también *Lepechinia* y *Salvia*, (*Salviinae*). En el Anexo 2 se muestra una relación de las especies de los cinco géneros mencionados en los dos herbarios considerados.

Hasta donde se tiene conocimiento, no hay representantes peruanos en la subtribu *Nepetinae* ni en las recién creadas subtribus *Prunellinae* y *Lycopinae* (Zhao *et al.* 2021).

Las plantas de *Mentheae* han sido y son objeto de diversos estudios botánicos, ecológicos y farmacognósticos. Los trabajos más clásicos en sistemática de *Lamiaceae* sudamericanos corresponden a Carl Epling (Epling, 1927, 1944, 1948, 1957, 1960, 1963, 1964). Posteriormente se publicó la sistemática de *Lamiaceae* para el Norte del Perú, (López 1998), y el reporte de especies de *Clinopodium* *tropicale*, (Harley *et al.* 2000). También se han revisado aspectos estructurales y ecológicos, incluyendo la morfología del polen y la polinización en *Salvia* (Moon *et al.* 2008; Wester *et al.* 2011).

Asimismo, hay que mencionar un reporte relacionado a la etnobotánica del subgénero de *Salvia* llamado *Calosphace* *sensu* Bentham, 1876, (Jenks *et al.* 2013). En este subgénero están presentes todas las especies de *Salvia* que se tratarán en este trabajo de tesis.

Algunos géneros han sido revisados exhaustivamente en varios países de Sudamérica: *Salvia* en Colombia, (Wood *et al.* 1989). *Salvia* en Bolivia, (Wood 2007). *Clinopodium* en Bolivia, (Wood 2011). También recientemente, se realizó una revisión de la familia *Lamiaceae* en Chile (Morales 2018).

En una investigación sobre *Hedeoma mandonianum* en Argentina (Slanis *et al.* 2005) se menciona que el género *Hedeoma* consta de 43 especies en toda América, pero para Perú solamente está descrita *Hedeoma mandonianum* (Roque *et al.* 2008). Otro trabajo muestra controversias respecto a la tipificación de *Hedeoma* y *Lepechinia* (O'Leary 2015) y se sugiere que *Lepechinia sagittata* es sinónimo de *Lepechinia floribunda*.

Con respecto al uso tradicional de plantas medicinales en el sur andino del Perú (Roersch *et al.* 1988, Roersch 1994) mencionaron algunas especies de *Mentheae*, por ejemplo reportan a *Lepechinia meyenii* (Walp.) (Epling) “Puna salvia” con un nombre antiguo *Sphacele tenuiflora* Kunth. Por otro lado, es particularmente interesante el hecho que casi siempre las plantas medicinales mencionadas se utilizan como mezclas de ellas registrándose ejemplos donde se mezclan hasta quince especies distintas.

Un libro de nombre sugerente “Superación de la enfermedad en las alturas de los andes del Perú” (Hahold *et al.* 1990), describe un estudio hecho en la provincia de Espinar-Cusco en altitudes de 3800 a 4500 msnm y reporta a *Lepechinia meyenii* como la tercera planta más utilizada en comunidades cuya salud entonces dependía casi exclusivamente en el empleo de plantas medicinales. En la tesis “Especies del Género *Salvia* (*Lamiaceae*) en la flora del departamento de Lambayeque” (Llatas 1996), se describen catorce especies de *Salvia* con ilustración botánica profesional y mapas de gran utilidad. La ilustración botánica artística, así como historia de la botánica para *Salvia dombeyi* y *Salvia macrophylla* han sido publicadas por (Wood 2014, 2018).

Terreros y Reynel (2016) proponen el uso de *Clinopodium breviflorum*, *Minthostachys mollis*, *Salvia oppositiflora* y *Salvia sagittata* en prácticas de control de la erosión, así como su propagación en la región andina, siendo el primer caso donde se da importancia a las raíces de estas plantas.

En otro aspecto, las herramientas moleculares han aportado al estudio taxonómico en plantas. Es notable el trabajo de (Bräuchler *et al.* 2010) en la filogenia molecular de *Menthinae* el cual estudia 278 especies en 38 de los 40 géneros de la subtribu *Menthinae* y 11 géneros distintos utilizando código de barras de ADN mediante el análisis de 3 secuencias de DNA cloroplástico y nuclear en un intento de construir su filogenia. En base a ello, se tiene que para *Clinopodium* del nuevo mundo la circunscripción actual del género es altamente antinatural y se sugiere regresar a antiguos géneros como *Gardoquia* (R. y P.), *Xenopoma* (Willd.) y *Satureja* (Epl.). El género *Lepechinia* también se ha estudiado utilizando secuencias de DNA cloroplásticas y nucleares sobre 31 especies (Drew *et al.* 2013) para explicar la radiación del género en América del norte y del sur (Figura 3).

Las delimitaciones e interrelaciones en *Minthostachys* (Schmidt-Lebuhn 2007, 2008) se han trabajado utilizando el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism- un tipo de marcador molecular basado en la restricción enzimática del DNA genómico seguido de la amplificación de los fragmentos obtenidos), pero no ha sido posible reconstruir la filogenia de *Minthostachys*. Por ello, el análisis basado en biogeografía sigue siendo muy importante para entender la distribución de *Minthostachys*. La mejor aproximación a la taxonomía en *Mentheae* combina los estudios de

DNA con estudios morfológicos (Walker *et al.* 2004; Drew *et al.* 2011) y también ecológicos (polinización) (Wester *et al.* 2006; Fragoso-Martinez *et al.* 2018).

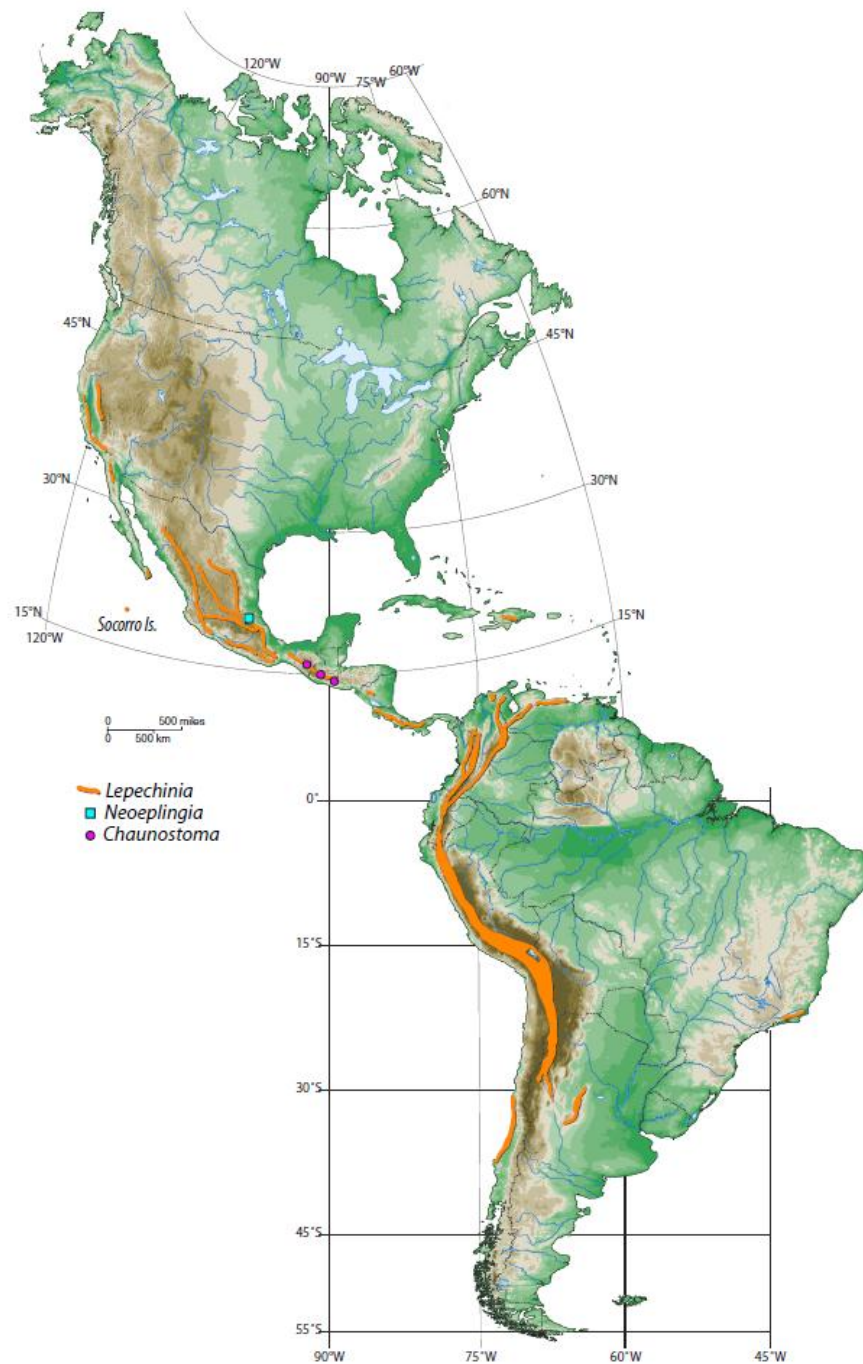


Figura 3: Distribución del género *Lepechinia* en América. Es probable que *Lepechinia* se haya diversificado primero en Centro América.

Fuente: Drew *et al.* (2013).

2.2. LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN *MENTHEAE*

El aspecto más característico de la subfamilia *Nepetoideae* es la producción y acumulación de grandes cantidades de monoterpenos volátiles, generalmente ubicados en estructuras especializadas como los tricomas. La Figura 4, muestra microfotografías de tricomas no glandulares de la tribu *Mentheae*. Los tricomas de las plantas *Mentheae* suelen secretar los monoterpenos y sesquiterpenos volátiles o también llamados “aceites esenciales” (Moon *et al.* 2009). También los di y tri terpenoides son secretados via tricomas (Siebet 2004).

A su vez, la producción de monoterpenos volátiles es exclusiva a la producción de iridoides (monoterpenos glicosilados no volátiles) que son más propios de la sub familia *Lamioideae* y de la familia *Verbenaceae*. Además de la producción de aceites esenciales (monoterpenos volátiles), la sub-familia *Nepetoideae* se caracteriza por la producción del compuesto fenólico ácido rosmarínico (Wink 2003).

Los polifenoles, en sentido amplio, son un grupo de sustancias presentes en hierbas, frutos y vegetales en general. Su capacidad antioxidante se basa en grupos funcionales capaces de captar radicales libres. Los polifenoles se han estudiado extensivamente por ser generadores de salud y en el tratamiento de enfermedades. Así, existe un gran interés por dilucidar la influencia de factores ambientales que inciden en su síntesis y acumulación como también de los métodos para aislarlos e identificarlos (Watson 2014). Un antioxidante biológico, es una sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones en comparación con la de un sustrato oxidable, lo protege a través de sus productos de oxidación, impidiendo la oxidación del sustrato y finalmente protege al organismo de los efectos nocivos del estrés oxidativo. El estrés oxidativo es el resultado de un desbalance en la producción de radicales libres durante el metabolismo, lo cual implica un daño sobre distintas especies moleculares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo cual a su vez se asocia a muchas patologías complejas como los desórdenes inflamatorios, enfermedades cardiovasculares y cáncer en humanos (Soares *et al.* 2017).

Sawa *et al.* (1999), mediante un bioensayo con *Staphylococcus aureus* via inhibición de radicales alquilperóxido, determinaron la capacidad antioxidante de flavonoides y otros compuestos fenólicos, estableciendo de mayor a menor capacidad a los siguientes metabolitos: rutina > ácido clorogénico > vainillina > ácido vainílico > neohesperidina > ácido gálico > ácido shikimico > rhamnetina > kaempferol > α -tocoferol > naringenina > quercetina > ácido cafeico > daidzeína > isoquercitrina > robinina > kaempferol-7-O-rhamnósido. En otro trabajo (Hossain *et al.* 2008), mediante ensayos FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid test) y MLP (Microsomal Lipid Peroxidation), demostraron que el ácido rosmarínico y el eugenol (del clavo de olor, *Syzygium aromaticum*, *Myrtaceae*) tienen mayor capacidad antioxidante que el galato de propilo (el antioxidante sintético más potente). El orden que establecieron para fenólicos antioxidantes fue: ácido rosmarínico > eugenol > kaempferol > ácido ferúlico > 6-gingerol > capsaicina > curcumina > timol. Finalmente (Berker *et al.* 2010) utilizando el método ferricianuro/azul de Prusia optimizado, ordenaron de la siguiente manera la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos: Ácido rosmarínico > catequina > rutina > quercetina > ácido gálico > ácido ferúlico > ácido cafeico > ácido ascórbico > trolox. Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) es un análogo sintético de la vitamina E, pero a diferencia de ésta, es soluble en agua. Esta sustancia se utiliza como estándar para medir actividad antioxidante (TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

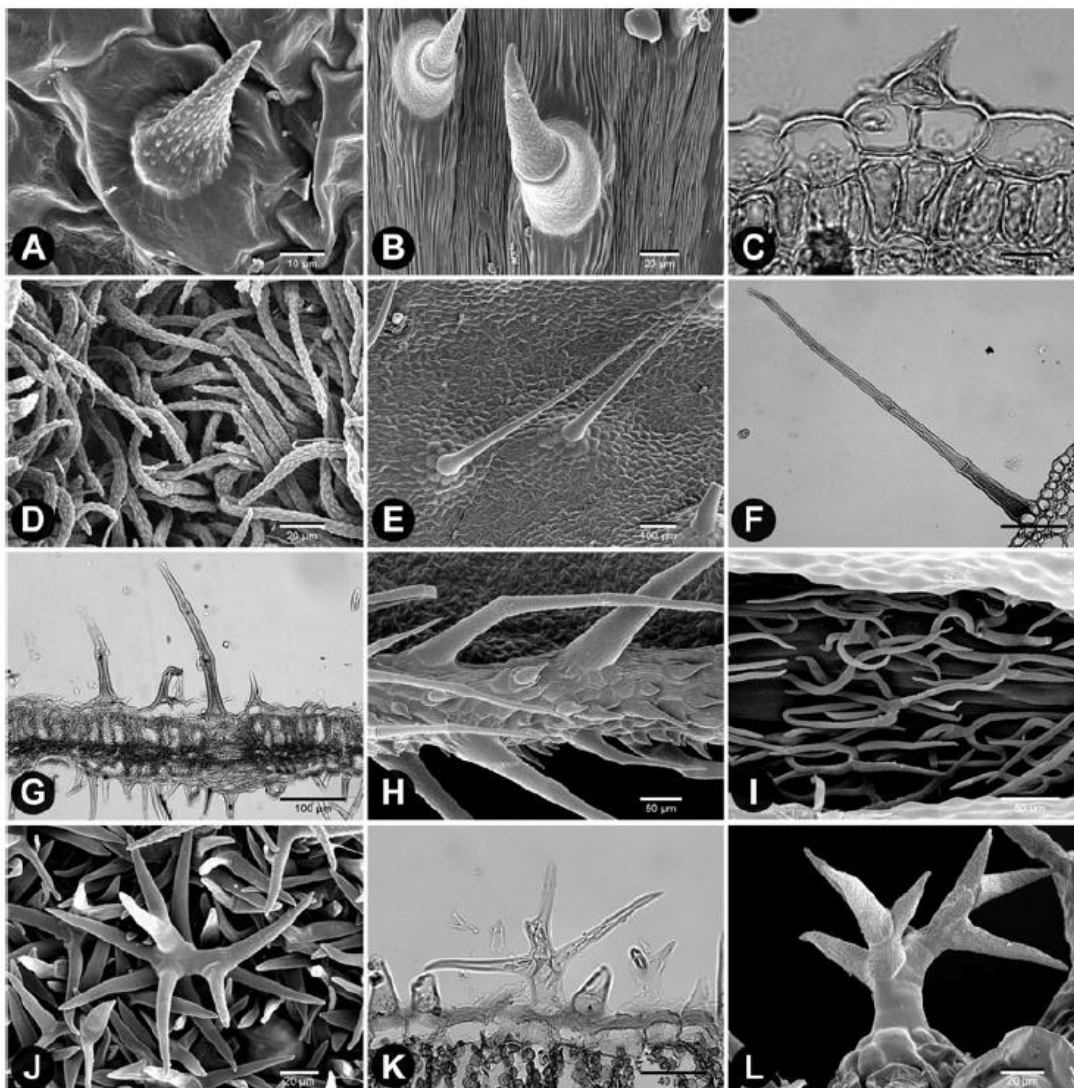


Figura 4: Micrografías electrónicas de barrido y luz de tricomas no glandulares de la tribu *Mentheae*. Las imágenes muestran tricomas no glandulares de : (A) *Blephilia ciliata* , (B) *Micromeria marginata* (C) *Glechoma hederacea* (D) *Conradina grandiflora*, (E) *Clinopodium vulgare* (G) *Conradina canescens* (H) *Clinopodium vulgare* (I) *Rosmarinus officinalis* (J,K) *Hedeoma ciliolata* (L) *Perovskia abrotanoides*. La imagen F corresponde a la estructura del tricoma no glandular uniseriado largo en la superficie de hoja en *Minthostachys mollis*

Fuente: Moon *et al.* (2009).

Los terpenoides son moléculas que tienen un origen biosintético común. Todos los terpenoides se basan en la molécula de isopreno, cuya estructura química de 5 carbonos se presenta en la figura 5. Los esqueletos carbonados de los terpenoides se construyen por unión de dos o más unidades de isopreno.

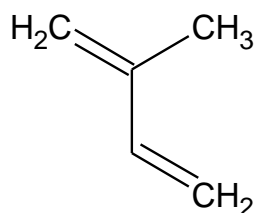


Figura 5: Estructura química del isopreno, molécula precursora para la síntesis de terpenoides.

En la Tabla 3 se muestra la clasificación de los terpenoides según (Harborne 1992)

Tabla 3: Principales tipos de terpenoides en plantas.

Número de unidades de isopreno	Número de carbonos	Nombre o clase	Ocurrencia
1	5	isopreno	En hojas de <i>Hamamelis japónica</i>
2	10	monoterpenos	En aceites esenciales
3	15	sesquiterpenos	En aceites esenciales, en sesquiterpenlactonas en <i>Compositae</i>
4	20	diterpenos	En resinas vegetales
6	30	triterpenos	Esteroles, ácidos triterpénicos, saponinas
8	40	tetraterpenos	Carotenoides
n	5n	poliisoprenos	Caucho, latex

Fuente: Harborne (1992)

Para las plantas de la tribu *Mentheae* y en general para todas las plantas los terpenoides constituyen la fracción lipofílica (insolubles en agua) del tejido vegetal. Mientras que los

compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos y los flavonoides son más bien hidrófilos (Harborne 1992).

2.2.1. Aceites esenciales en especies de la tribu *Mentheae* del Perú

La tribu *Mentheae* del Perú o América del Sur cuenta con varios estudios relacionados a sus aceites esenciales.

Por ejemplo, (Svendsen *et al.* 1987), utilizando hidrodestilación obtuvieron 1% de aceite esencial de *Minthostachys glabrescens* de Cusco-Perú e identificaron 36 componentes, es decir el 95% del total. La pulegona constituyó el 45% del aceite esencial mientras que la mentona el 18%.

En un estudio sobre la variabilidad en la composición de los aceites esenciales de *Minthostachys andina* en Bolivia central (Muñoz *et al.* 1993), analizaron 129 muestras de 7 sub-regiones, el 87% de ellas tuvo un porcentaje de (pulegona + mentona) > al 65%. Además se identificaron quimiotipos, uno de ellos rico en (timol + carvacrol) y otro abundante en (sabineno + p-cimeno). En general a mayor altitud mayor porcentaje de (pulegona + mentona).

La composición del aceite esencial de *Minthostachys spicata* (Benth.)Epl. de Cusco, Perú fue estudiada por (Senatore 1995). Obtuvo 0.53% de aceite esencial cuyo análisis GC/MS identificó un 54.7% de monoterpenos oxigenados siendo la mentona el 14.5% y la pulegona el 9.7%.

Más adelante, (Fernández *et al.* 1996) investigaron el aceite esencial de *Salvia oppositiflora*, obtuvieron un aceite constituido por un 59.5% de terpenoides oxigenados donde el guaiol constituye el 34.2%.

También, un análisis comparativo de los aceites esenciales de *Minthostachys andina* y *Hedeoma mandonianum* bolivianos en relación a su actividad insecticida publicado por Fournet *et al.* (1996) mostraron 25.5% y 44.6% de pulegona en cada caso, mientras que la mentona e isomentona fueron como el 33% de ambos aceites. Fue notable la bioactividad observada frente a *Triatoma infestans* vector de *Trypanosoma cruzi*.

En la destilación del aceite esencial de *Minthostachys setosa* de Lima, Perú (Senatore 1998) obtuvo 0.68% de aceite esencial. El análisis GC/MS identificó a 43 de los 50 componentes siendo las monoterpenonas el 79.2% del aceite y la pulegona la más abundante de ellas.

En dos especies de *Satureja*: *S. boliviana* y *S. brevicalyx* de Cusco, Perú (Senatore *et al.* 1998), por hidrodestilación produjeron 1.03 y 0.96% de aceites, respectivamente. En los dos aceites identificaron 65 componentes siendo mentona (24.2 y 35.7%) e isomentona (29.7 y 25.1%), los más abundantes.

La composición del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. de Ecuador fue estudiada por (Malagón *et al.* 2003), mostrando 55 componentes (representa el 94% del aceite), 60% de monoterpenos oxigenados, mentona (16%), acetato de carvacrilo (10%), pulegona (10%), carvacrol (9%).

Posteriormente Fajardo *et al.* (2007) analizaron el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* obteniendo una composición de 43% de guaiol, 17.4% de α -bisabolol, 11.8% de bulnesol, 8% de β -bisaboleno, 7.5% de α -eudesmol, 3.9% de β -eudesmol y 2.7% de γ -eudesmol, constituyendo un 94.3% de componentes identificados.

En un trabajo sobre los componentes químicos del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. en Huánuco, (Maquera *et al.* (2009) analizaron muestras de 2 lugares distintos siendo mentona y pulegona los componentes principales en ambos casos.

Los análisis de los aceites esenciales bolivianos de *Lepechinia meyenii* y *Lepechinia floribunda* (Lopez *et al.* 2009), mostraron en el primer caso que los monoterpenos son el 40% del aceite seguido por un 31% de monoterpenos oxigenados. En el segundo caso 20-28% de sesquiterpenos, 20-21% de monoterpenos, 21-23% de sesquiterpenos oxigenados y 13-18.5% de monoterpenos oxigenados. En *L. meyenii* el α -pineno fue el componente principal (25%) mientras que en *L. floribunda* predominaron el acetato de bornilo (11-12%) y el β -cariofileno (9-10%).

La composición química y actividad insecticida del aceite esencial de *Hedeoma mandoniana* estudiada por Vilaseca *et al.* (2014) mostraron 58 componentes, de 37 a 46% de pulegona, de

10 a 14 de 1,8-cineol, de 7 a 12 % de linalool y de 7 a 12% de 1-octen-3-il-acetato. El aceite esencial mostró ser activo frente a *Triatoma infestans*.

Y recientemente, se determinó la composición química y actividades antioxidante y antiproliferativa del aceite esencial de *Minthostachys spicata* (Benth.) Epl. de Cusco (Solís *et al.* 2015) con 87.4% de monoterpenos oxigenados, pulgeona, mentona e isomentona los principales. El aceite mostró capacidad antioxidante utilizando el reactivo DPPH.

2.2.2. Investigaciones sobre sesquiterpenoides y diterpenoides en *Menthae* peruanas

El trabajo de Wu *et al.* (2012) es una revisión sobre los constituyentes y actividades biológicas en *Salvia*, fundamentalmente con especies de Asia y Europa. Ellos mencionaron, hasta el año 2010, 791 compuestos de los cuales, 46 son sesquiterpenoides incluyendo esqueletos fundamentalmente del tipo germacrano, carotano, guaiano y cariofilano (Figura 6).

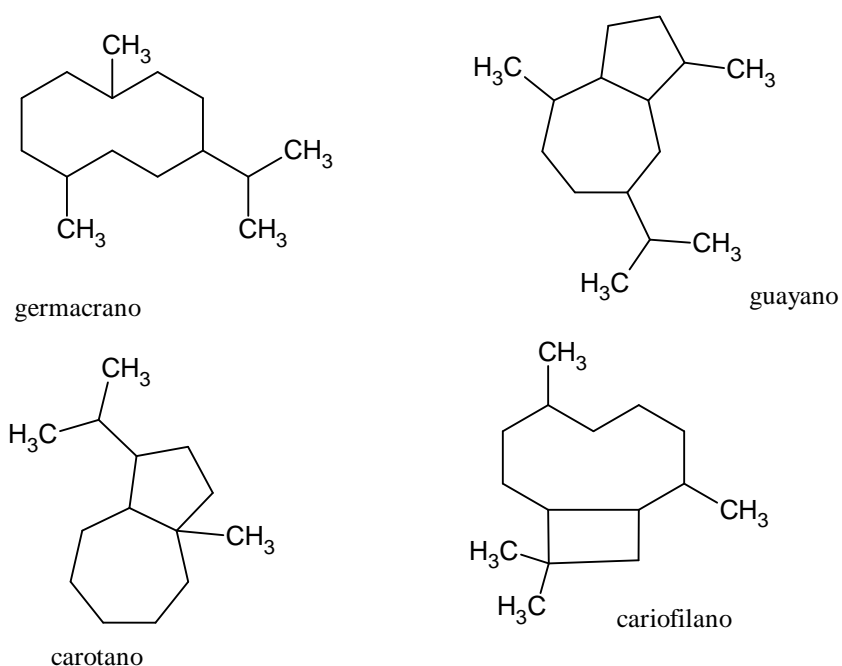


Figura 6: Principales esqueletos carbonados de sesquiterpenoides presentes en *Salvia*. Fuente: Wu *et al.* (2012).

De los 791 compuestos mencionados en este estudio, 545 corresponden a diterpenoides que a su vez se clasifican dentro de los siguientes grupos: abietanos, clerodanos, pimaranos, labdanos (Figura 7).

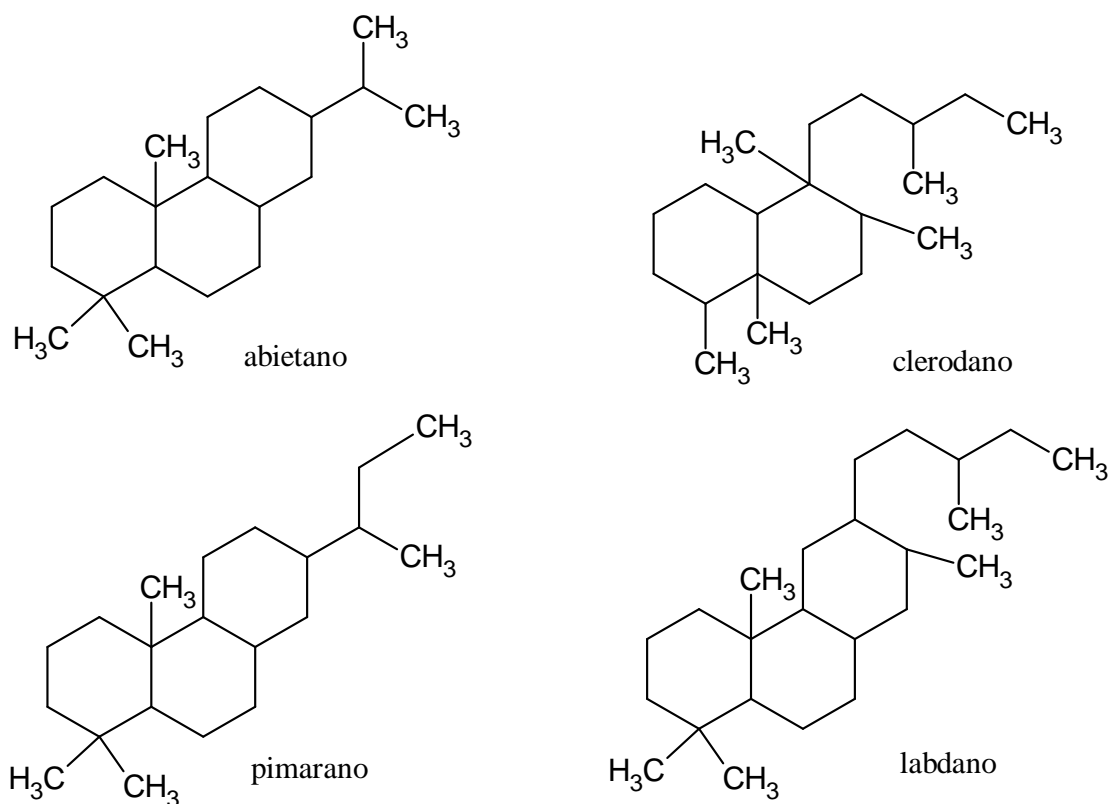


Figura 7: Principales esqueletos carbonados de diterpenoides presentes en *Salvia*.
Fuente: Wu *et al.* (2012).

De otro lado, Lozano *et al.* (2015), reportaron un diterpeno de tipo abietano, el 12-hidroxi-11, 14 – diceto-6, 8, 12 – abietatrien-19, 20-olido, activo contra *Trypanosoma cruzi* (vector de la enfermedad de Chagas) obtenido de *Salvia cuspidata* (R. y P.) subespecie *gilliesi* (Benth.) J.R.I. Wood (Figura 8).

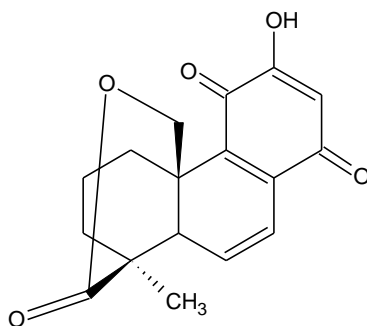


Figura 8: Estructura del 12-hidroxi-11, 14 – diceto-6, 8, 12 – abietatrien-19, 20-olido de *Salvia cuspidata* (R. y P.) subespecie *gilliesi* (Benth.) J.R.I. Wood. Fuente: Lozano *et al.* (2015).

Previamente se habían aislado de la misma planta la 5-epi-icetexona (Figura 9), también activo contra *T. cruzi* (Nieto *et al.* 2000; Sanchez *et al.* 2006).

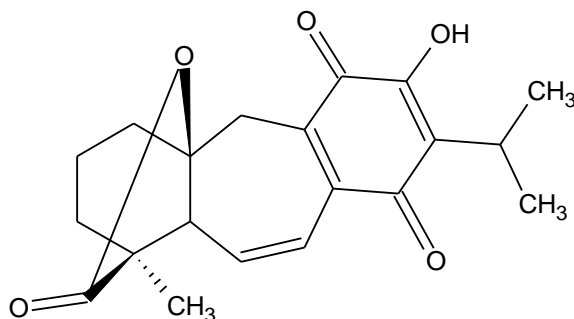


Figura 9: Estructura de la molécula de 5-epi-icetexona de *Salvia gilliesi* con actividad contra *T. cruzi*.

Fuente: Nieto *et al.* (2000).

Por otro lado, se aislaron 5 di-terpenoides tipo ent-clerodano de *Salvia haenkei* (Figura 10), un triterpenoide del tipo ursano y además el triterpenoide ácido ursólico (Almanza *et al.* 1997).

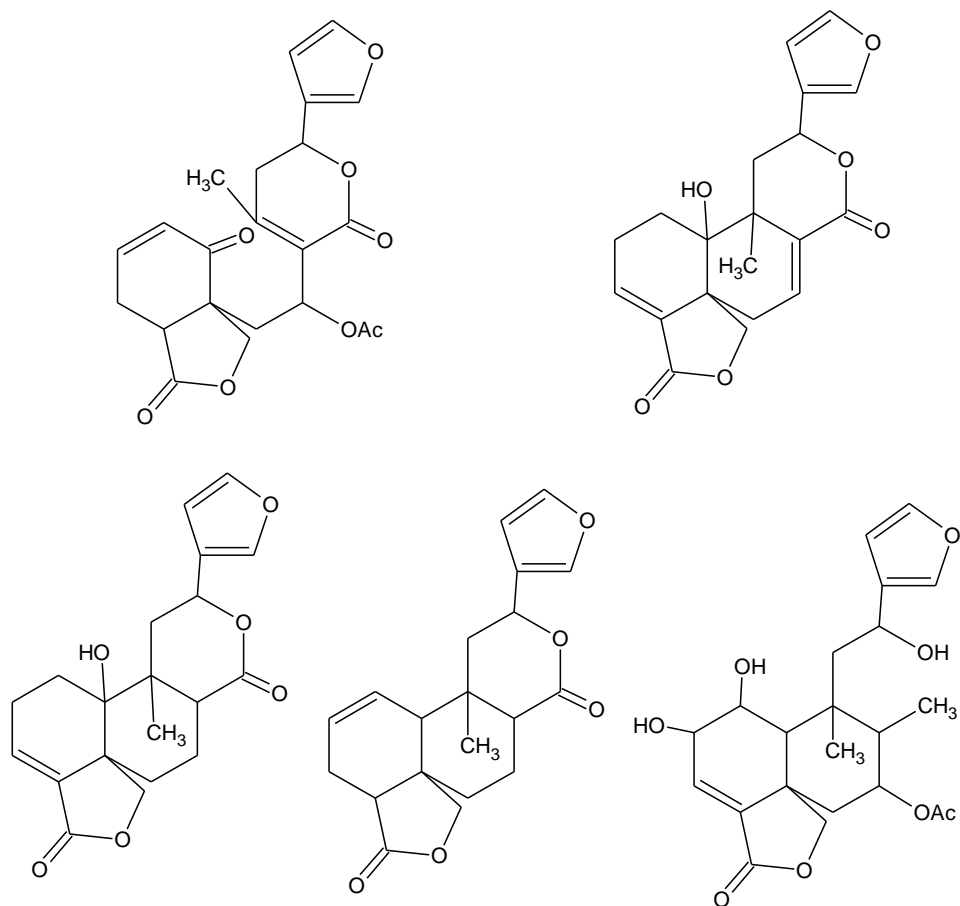


Figura 10: Estructura química de 5 diterpenoides tipo ent-clerodano de *Salvia haenkei*.
Fuente: Almanza *et al.* (1997).

También, en *Lepechinia meyenii*, además de una notable cantidad de una mezcla de los ácidos triterpénicos ursólico y oleanólico se han encontrado diterpenoides del tipo abietano (Bruno *et al.* 1991) (Figura 11).

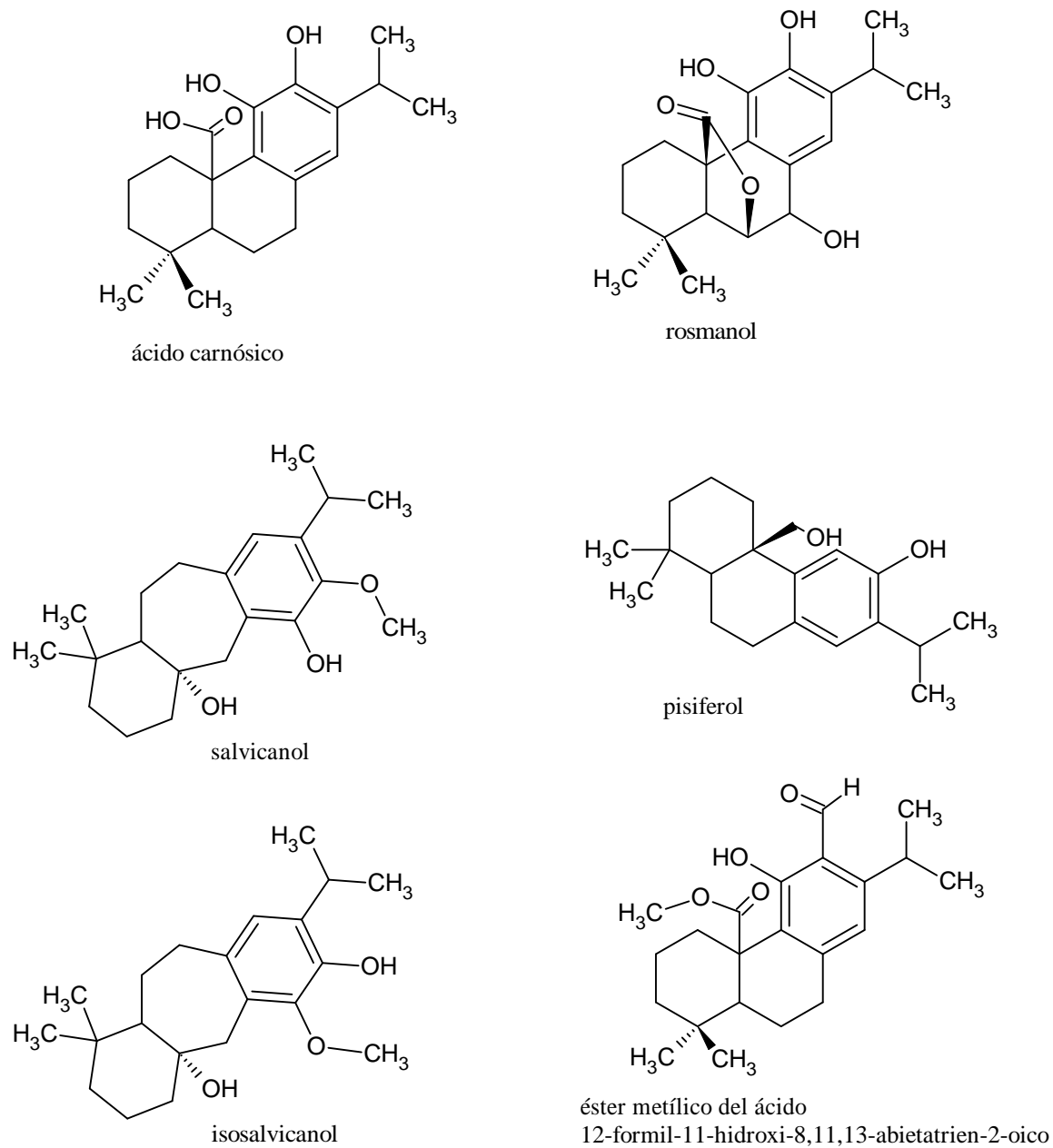


Figura 11: Estructuras químicas de diterpenoides fenólicos de *Lepechinia meyenii*.
Fuente: Bruno *et al.* (1991).

El rosmanol y el ácido carnósico están presentes en el “romero” *Rosmarinus officinalis* L. (*Menthae*) (Sharma *et al.* 2020).

2.2.3. Los ácidos triterpénicos en *Mentheae*

Para las especies del género *Salvia*, sobre 791 compuestos registrados, 74 corresponden a triterpenoides y esteroides (Wu *et al.* 2012). Estos se clasifican en ursanos, oleananos, lupananos, dammaranos y esteroides. Dentro de las dos primeras categorías se tiene al ácido ursólico (AU) y el ácido oleanólico (AO) (Figura 12).

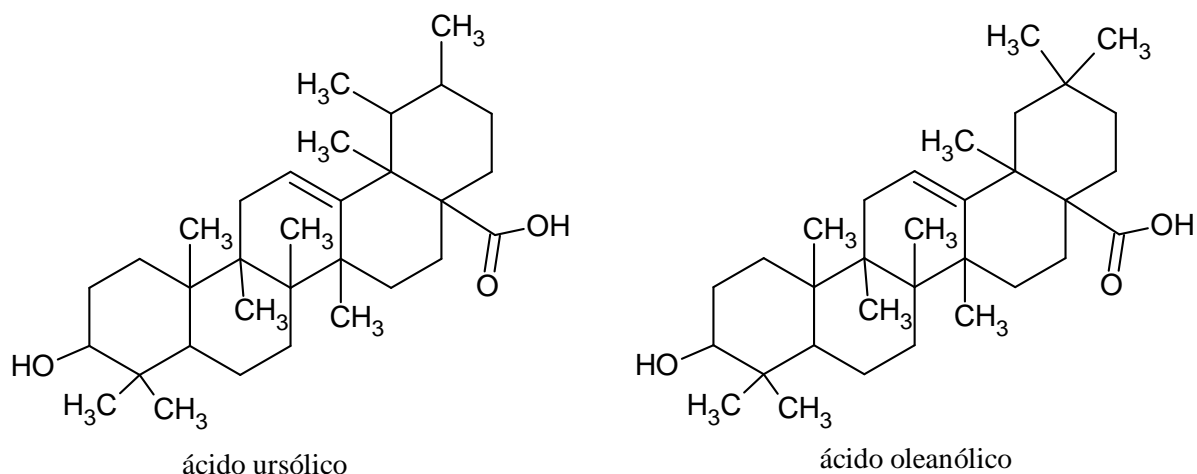


Figura 12: Estructuras químicas de los principales ácidos triterpénicos presentes en el género *Salvia*, *Mentheae*.

Fuente: Wu *et al.* (2012).

Uno de los primeros trabajos sobre ácidos triterpénicos en *Lamiaceae* fue realizado por Passannanti *et al.* (1983) quienes reportan sobre los ácidos ursólico y oleanólico en *Salvia splendens* (esta especie está reportada para Cusco en el Neotropical Herbarium pero no así en el Herbario del Museo de Historia Natural “Javier Prado”- UNMSM). Otro trabajo primordial fue el tamizaje de ácido ursólico y oleanólico realizado por cromatografía de gases en 88 especies de *Lamiaceae* (Janicsak *et al.* 2006): La sub-familia *Lamioideae* es pobre en ácidos triterpénicos con respecto a la sub-familia *Nepetoideae*. Tanto el ácido ursólico como el ácido oleanólico se reportaron en *Lepechinia meyenii* (Bruno *et al.* 1991) y en *Salvia haenkei* (Almanza *et al.* 1997). Un trabajo más reciente (Serrano *et al.* 2014) reportó la presencia de estos ácidos en representantes de *Clinopodium* peruanos: *C. bolivianum*, *C. sericeum* y *C. revolutum*. Los ácidos triterpénicos, así como los monoterpenos-diterpenos, son también usualmente exudados a la superficie de los tejidos vegetales, la cutícula vegetal, son comunes los casos de la superficie de hoja de *Olea europaea* (Kubo *et al.* 1984).

También son abundantes en la cáscara de manzana, *Malus domestica*, en las hojas de Eucalipto, *Eucalyptus sp*, entre otras fuentes (Jager *et al.* 2009).

Los ácidos triterpénicos son moléculas muy estables y se han utilizado como biomarcadores de coníferas y angiospermas para reconstruir paleovegetaciones (Giri *et al.* 2015).

Los ácidos triterpénicos son particularmente solubles en etanol y metanol, también en acetato de etilo, isopropanol y en soluciones alcalinas. La solubilidad de los ácidos oleanólico y ursólico se ha estudiado a gran detalle (Fan *et al.* 2011, 2012, 2017) denotando el interés de obtener estas sustancias a escala industrial.

Tiempo atrás Mezzetti *et al.* (1971) consideraban el ácido ursólico como farmacológicamente inactivo. Más recientemente se le han reportado muchas propiedades biológicas como antimicrobiano e inhibidor de la formación de biopelículas (*antibiofilm*), antiprotozoárico, antiinflamatorio, antitumoral (para diferentes tipos de cáncer) (Tasca *et al.* 2017).

Igualmente, Kashiap *et al.* (2016) reportan efectos antibacteriales, antivirales, antiparasitarios, antifúngicos, en enfermedad de Alzheimer, antidepresivo/ansiolítico, antidiabético, antihiperlipidémico, antilipasa/lipolítico, cardioprotector, hepatoprotector, nefroprotector, neuroprotector, gastroprotector, antiasmático, antihormonal, en sepsis, enfermedades autoinmunes, antiartrítico, osteoprotector, dermoprotector, y otros.

La literatura respecto a propiedades farmacológicas del ácido ursólico, ácido oleanólico y otros ácidos triterpénicos no tan comunes en *Lamiaceae* como el ácido betulínico, maslínico, así como derivados semisintéticos a partir de ellos es profusa y diversa. Igualmente profusa resulta la literatura en química analítica de estas sustancias. Una revisión reciente de Xu *et al.* (2018) con 133 referencias que plantean el uso de cromatografía de gases; de HPLC con detección UV o de fluorescencia, espectrometría de masas; electroforesis capilar, cromatografía en capa fina, cromatografía con fluidos supercríticos, espectroscopía RMN e incluso espectroscopía de rayos X.

En una publicación reciente López *et al.* (2018) muestran las diferentes metodologías para preparar el ácido ursólico a partir de diversas materias primas vegetales como *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Satureja montana* y otras no *Lamiaceae*. Están implicadas

extracciones intensificadas con ultrasonido, microondas asociadas a procedimientos de optimización y purificaciones por adsorción, cromatografía, cristalización. Varias de las referencias mostradas en ese trabajo son patentes. Un trabajo muy reciente (Grabowska *et al.* 2021) analiza la extractabilidad de los ácidos oleanólico y ursólico en dos especies de *Glechoma (Nepetinae)*, considerando como mejor sistema extractante el diclorometano a reflujo. Además, propone una metodología basada en UPLC/MSMS para analizar los extractos. Desde el punto de vista económico, el precio del ácido ursólico, siendo relativamente abundante en la naturaleza, es bastante alto comparado con otros metabolitos secundarios como se reporta en la Figura 13.

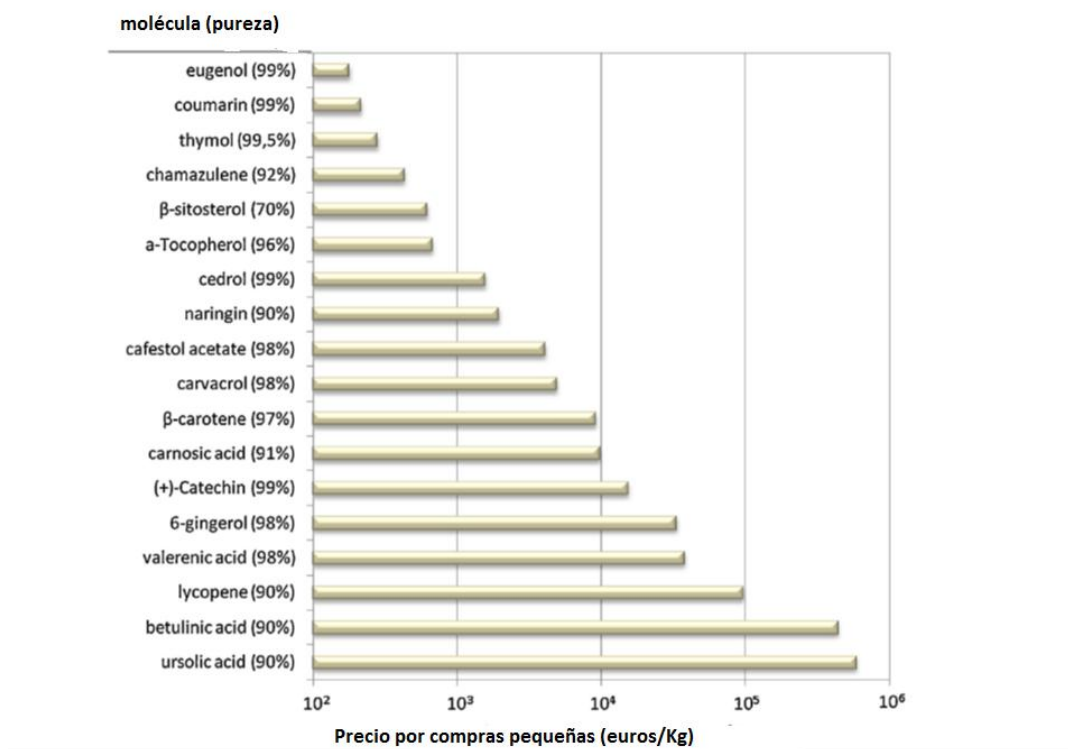


Figura 13: Precios de algunos metabolitos secundarios provenientes de plantas. Fuente: De Melo *et al.* (2014).

2.2.4. Ácidos fenólicos en *Menthae*

Los ácidos fenólicos presentes en *Menthae* incluyen a los monómeros y oligómeros del ácido cafeico y además los derivados del ácido rosmarínico cuyas estructuras se muestran en la Figura 14.

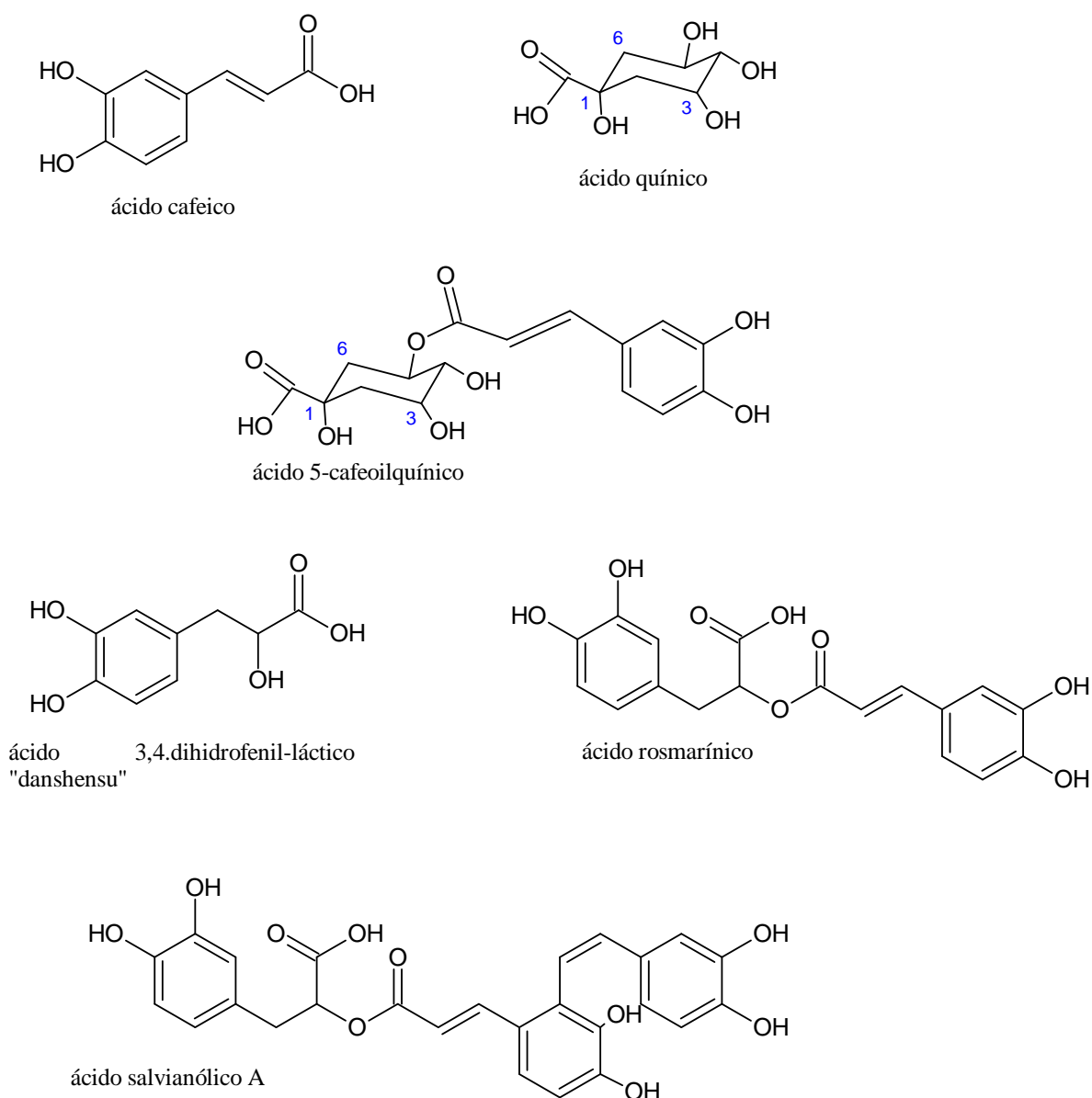


Figura 14: Estructuras químicas de ácidos fenólicos comunes reportados en *Menthae*.

Fuente: Ma *et al.* (2019); Velamuri *et al.* (2020).

Los ácidos cafeoilquínicos (CQAs) o ácidos clorogénicos son ésteres del ácido cafeico y el ácido quínico, son compuestos biológicamente importantes presentes en muchas especies vegetales (Gil *et al.* 2017). Abundan en el café, mango, coles, bayas, apio, culantro, entre otros. Son particularmente relevantes en la familia Asteráceae. Por ejemplo, la alcachofa, *Cynara scolymus*, contiene hasta 8% de ácidos clorogénicos en material joven.

Recientemente se ha revisado la estereo nomenclatura de los ácidos clorogénicos (Kremr. *et al.* 2016; Abrankó *et al.* 2017).

Respecto a la polaridad, los ácidos monocafeoilquínicos son más polares que los dicafeoilquínicos y ambos son solubles en alcoholes de bajo peso molecular y mezclas de alcohol-agua. Son insolubles en éter de petróleo, benceno y cloroformo. Los ácidos dicafeoilquínicos, son además solubles en acetato de etilo o butilo y también en acetona. El grado de solubilidad en agua, de mayor a menor, de los ácidos monocafeoilquínicos, dependiendo de la posición de sustitución del cafeoil sobre el núcleo de ácido quínico es: 1- > 3- > 4- > 5-. Sin embargo en HPLC de fase reversa el orden de elución es 1- > 3- > 5- > 4-. (Schutz *et al.* 2004). El orden de solubilidad en agua de los ácidos dicafeoilquínicos es: 1,3- > 1,4- > 3,4- > 1,5- > 3,5- > 4,5- (Gil *et al.* 2018).

2.2.5. El ácido rosmarínico (AR)

El ácido rosmarínico, es el antiguamente llamado “Labiatergerbstoffe” (el tanino de las *Labiadas*) (Petersen *et al.* 2003). Sin embargo, la sustancia fue por primera vez aislada por italianos (Scarpati *et al.* 1958). Probablemente, el tamizaje pionero de ácido rosmarínico en *Lamiaceae* fue realizado por Litvinenko *et al.* (1975) mediante cromatografía de papel. Posteriormente, Janisáck *et al.* (1997, 1999), hicieron lo propio utilizando cromatografía de capa fina sobre gel de sílice. En ambos trabajos se observó que *Nepetoideae* es rico en ácido rosmarínico mientras que en *Lamioideae* no se detectó.

El AR está presente en diversas fuentes incluyendo helechos, algas, y en buen número de monocotiledóneas y dicotiledóneas y por ello no se considera un buen marcador quimiotaxonómico para *Lamiaceae*.

Sin embargo, se encuentra en cantidades considerables en *Lamiaceae* y *Boraginaceae* (*Lamiales*) aunque producidos por diferentes mecanismos de síntesis, lo que sugiere una complicada historia evolutiva en la biosíntesis del ácido rosmarínico (Levsh *et al.* 2019).

La molécula de ácido rosmarínico (Figura 15) se conoce desde hace 63 años, sus precursores biosintéticos hace 53 años y sus enzimas biosintéticas hace 33 años (Petersen 2013). En muchas plantas, se han identificado todos los genes que codifican la biosíntesis del ácido rosmarínico (Trócsányi *et al.* 2021).

La importancia del ácido rosmarínico ha sido resaltada en una revisión que abarca diversos aspectos, desde la extracción, aislamiento, métodos analíticos, desarrollo farmacéutico y actividades biológicas no clínicas y clínicas, además estudios farmacocinéticos y de estabilidad (Amoah *et al.* 2016). También se han publicado varios estudios sobre solubilidad para la purificación del ácido rosmarínico a gran escala (Aydi *et al.* 2016; Wüst *et al.* 2016; Li *et al.* 2017). El trabajo de Ngo *et al.* (2018) describe las técnicas de extracción y fraccionamiento para conseguir un mayor rendimiento de ácido rosmarínico enfocando su potencial como antidiabético. Los métodos de extracción incluyen maceraciones, reflujo, Soxhlet, con ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos, líquidos presurizados y en los métodos de fraccionamiento están incluidos el reparto líquido-líquido, extracción en fase sólida, cromatografía en columna, el intercambio iónico, electrodiálisis, separación en membranas líquidas, precipitación con fluidos supercríticos y cristalización-recristalización.

Hoy en día, la tendencia es a la producción biotecnológica de AR (Petersen, 2013; Babaei *et al.* 2021). Entre los potenciales usos de esta molécula se describen, la prevención de daño cromosómico, protección de la piel contra radiación UV, neuroprotector, tratamiento de la retinopatía, prevención en diversidad de cánceres, en fibrosis hepática, en el tratamiento de la artritis reumatoide y en la prevención de efectos colaterales en quimioterapia (Bulgakov *et al.* 2012).

Recientemente Crespo *et al.* (2019) describieron la presencia de ácido rosmarínico, cafeico y p-coumarico en *Lepechinia meyenii* colectada en Cordoba-Argentina, demostrando su actividad inhibitoria sobre tirosinasa. Esta bioactividad es importante en industria alimentaria porque está relacionada al pardeamiento enzimático de frutas, verduras e incluso mariscos. Un

trabajo más reciente, Hitl *et al.* (2021) reportan la farmacocinética del ácido rosmarínico en humanos que puede administrarse por vía oral, intravenosa y por inhalación nasal-pulmonar. El ácido rosmarínico cumple con todos los requisitos de la regla de Lipinski para ser candidato como droga de administración oral: peso fórmula menor a 500, $\log P < 5$, grupos donadores en enlace de hidrógeno = 5 y grupos aceptores de enlace hidrógeno < 10. Sin embargo la molécula se degrada en el tracto intestinal a fenoles más sencillos. Se resaltan beneficios en dermatología, desordenes alérgicos y osteoartíticos, en el mejoramiento del desempeño cognitivo y en el tratamiento del síndrome metabólico.

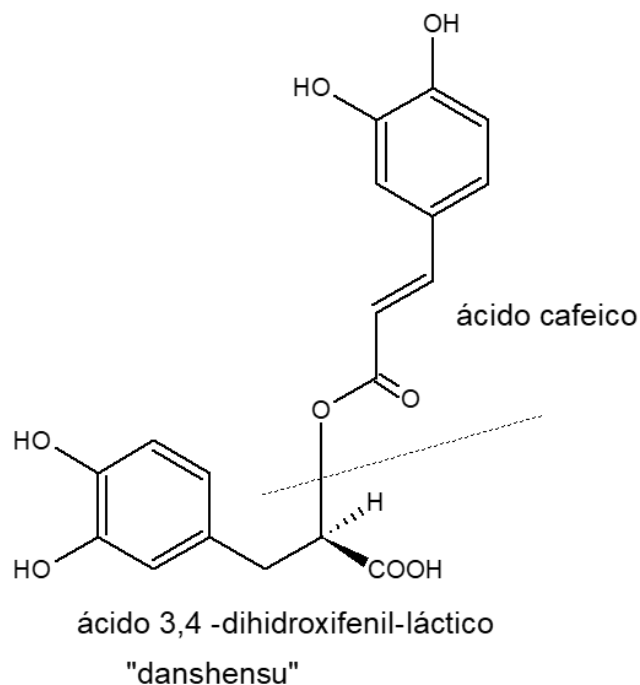


Figura 15: Estructura química del ácido rosmarínico, correspondiente a un éster del ácido cafeico con el hidroxiaácido conocido como “danshensu”, vocablo que deriva del chino Danshen (*Salvia miltiorrhiza*), una importante planta medicinal. Notar además que la configuración del AR natural es R- (+).

Fuente: Trute *et al.* (1996).

2.2.6. Flavonoides en *Mentheae* peruanas

Los flavonoides también constituyen parte de la fracción hidrosoluble o vacuolar de las plantas. No existen muchos trabajos sobre flavonoides en *Mentheae* peruanas.

Para *Minthostachys spicata*, Senatore *et al.* (1995) reportaron como componentes a cuatro flavonoides: quercetin-3-O-galactósido; quercetin-3-O-glucósido; 3',4'-diacetilquercetin-3-O-glucósido; isosakuranetin-7-O-rutinósido. Otro reporte para *Lepechinia meyenii* identificó la flavona diosmetina (Castillo 2004). Las estructuras de estos compuestos se muestran en la Figura 16.

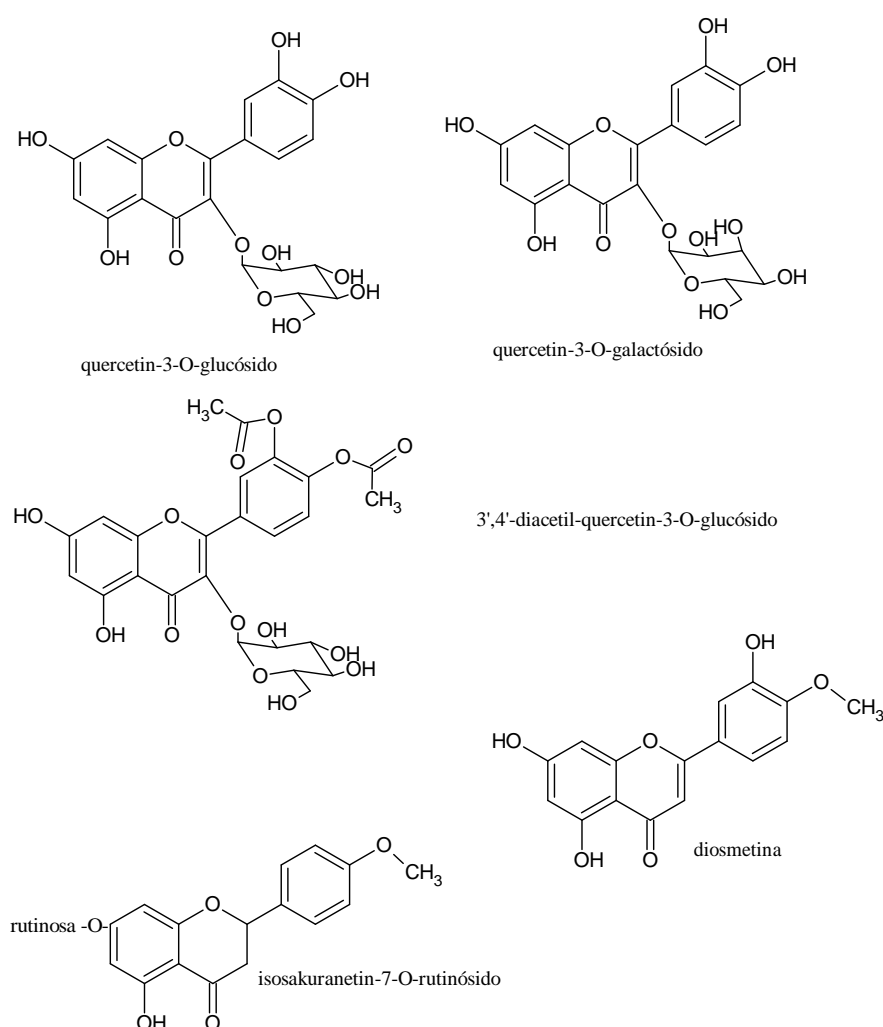


Figura 16: Estructura química de glicósidos de flavonoide reportados para *Minthostachys spicata* (Senatore *et al.* 1995) y la flavona diosmetina de *Lepechinia meyenii* (Castillo 2004).

2.2.7. Metabolómica

La metabolómica es el estudio científico de los procesos químicos involucrados en la síntesis y acumulación de moléculas pequeñas (metabolitos) presentes en un sistema biológico (Figura 17). En los sistemas biológicos, diferentes genes, proteínas y metabolitos estructural y funcionalmente diversos se relacionan por interacciones lineales y no lineales. La expresión génica en respuesta a factores medioambientales finalmente se refleja en la naturaleza y concentración de los metabolitos. Las interacciones entre organismos (por ejemplo, filosfera-rizomicrobioma) afectan también el metaboloma vegetal: mutualismo, neutralismo, competencia, antagonismo (de Falco *et al.* 2018; Tugizimana *et al.* 2018).

La metabolómica, más allá de una descripción, implica investigación cualitativa y cuantitativa de todos los metabolitos en equilibrio dinámico. Las plantas en su necesidad de protección y supervivencia frente a un medio ambiente permanentemente cambiante dependen de un sistema inmune que controla la señalización química propia y ajena mediante metabolitos primarios y secundarios. La metabolómica así puede entenderse como una medida cuantitativa de las respuestas metabólicas multiparamétricas de los sistemas vivos frente a perturbaciones genéticas o ambientales (Tugizimana *et al.* 2018).

Los metabolitos representan la respuesta “final” de la actividad celular de un organismo. El genotipo de un organismo es el conjunto de instrucciones heredadas que lleva en su código genético. Se denomina fenotipo a la expresión del genotipo en función de un determinado ambiente. El metaboloma de una planta podría variar dependiendo de donde crece la planta, de las variedades, y de los ecotipos.

Hay varias maneras de clasificar los metabolitos: en primarios y secundarios o en metabolitos hidrofílicos vs lipofílicos y también en metabolitos volátiles vs no volátiles. En la investigación de productos naturales el término *metabolito* se refiere a moléculas pequeñas con pesos moleculares menores a 2000 Da. Se consideran como *metabolitos primarios* porque corresponden a vías metabólicas esenciales relacionadas a biosíntesis y crecimiento (por ejemplo, aminoácidos, lípidos, carbohidratos, nucleótidos). En cambio los *metabolitos secundarios* sin ser esenciales, son necesarios para respuestas adaptativas y de supervivencia

en un determinado medio ambiente (por ejemplo, polifenoles, alcaloides, terpenoides) (Wolfender *et al.* 2015).

La *huella digital de metabolitos* (*metabolic finger printing*) es un registro rápido de metabolitos de un organismo sin identificación específica. El *perfil de metabolitos* (*metabolite profiling*) es la identificación y cuantificación de un grupo de metabolitos, por ejemplo sustancias fenólicas. El *análisis de metabolitos objetivo* (*metabolite target analysis*), en cambio, se enfoca en determinados metabolitos en particular, por ejemplo, ácido rosmarínico o solo ácidos triterpénicos (Ernst *et al.* 2014).

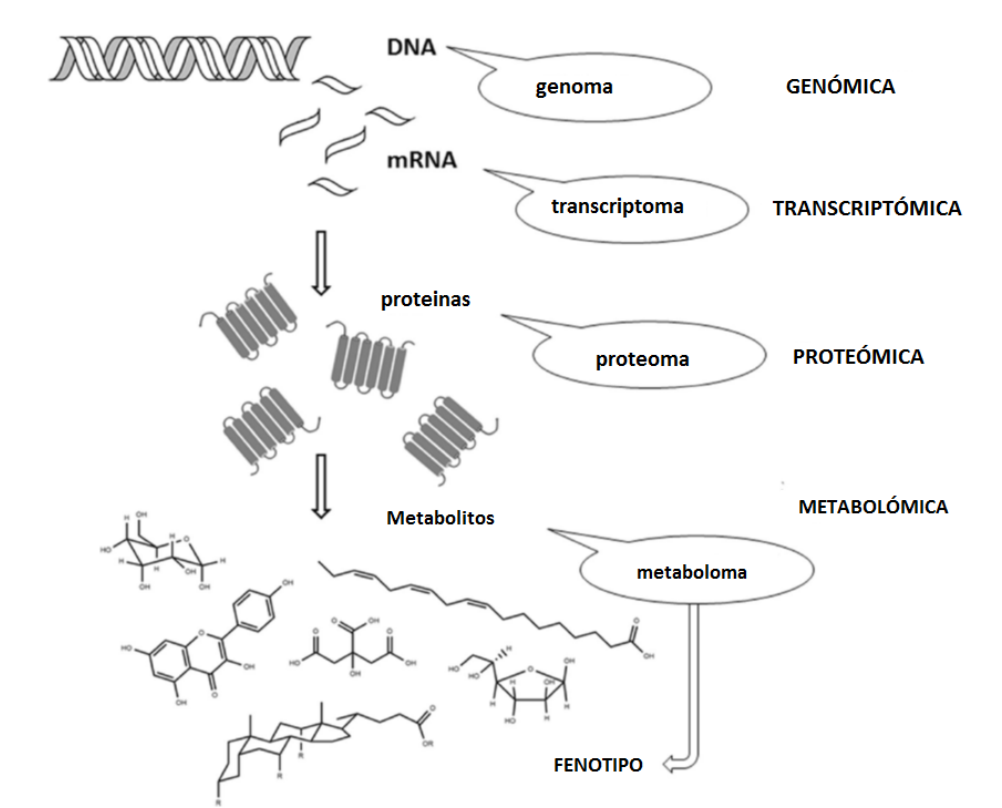


Figura 17: La *metabolómica* en el contexto del flujo de la información genética. Fuente: de Falco *et al.* (2018).

El procedimiento general del trabajo metabolómico se puede resumir en la Figura 18 (Kim *et al.* 2010).

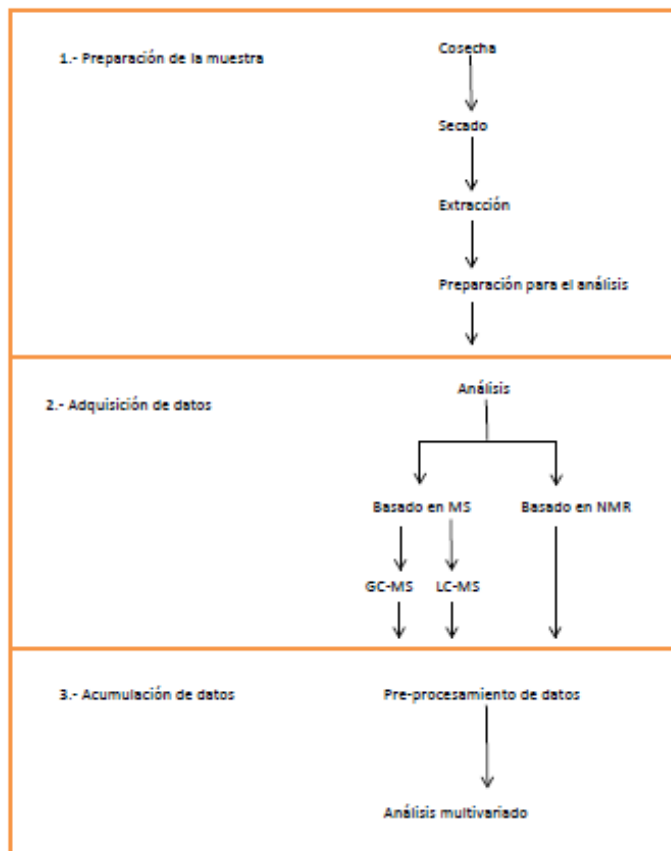


Figura 18: Diagrama de flujo para el estudio metabolómico en plantas. Fuente: Kim *et al.* (2010).

Los análisis metabolómicos producen una enorme cantidad de datos lo que requiere aplicar métodos estadísticos, computacionales y bioinformáticos para evaluarlos.

El campo de la metabolómica computacional está en pleno desarrollo y sus avances serán un factor clave en hacer de ella un procedimiento analítico estándar en diferentes áreas de investigación (Ernst *et al.* 2014).

Según la Figura 18 una de las técnicas disponibles para la obtención del perfil de metabolitos secundarios es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. La adquisición de datos puede realizarse mediante LC-MS, (cromatografía líquida-espectrometría de masas) particularmente UHPLC-ESI-ORBITRAP-MSMS.

En este sentido, la secuencia básica de eventos en un espectrómetro de masas aparece en la Figura 19 (Greaves *et al.* 2014).

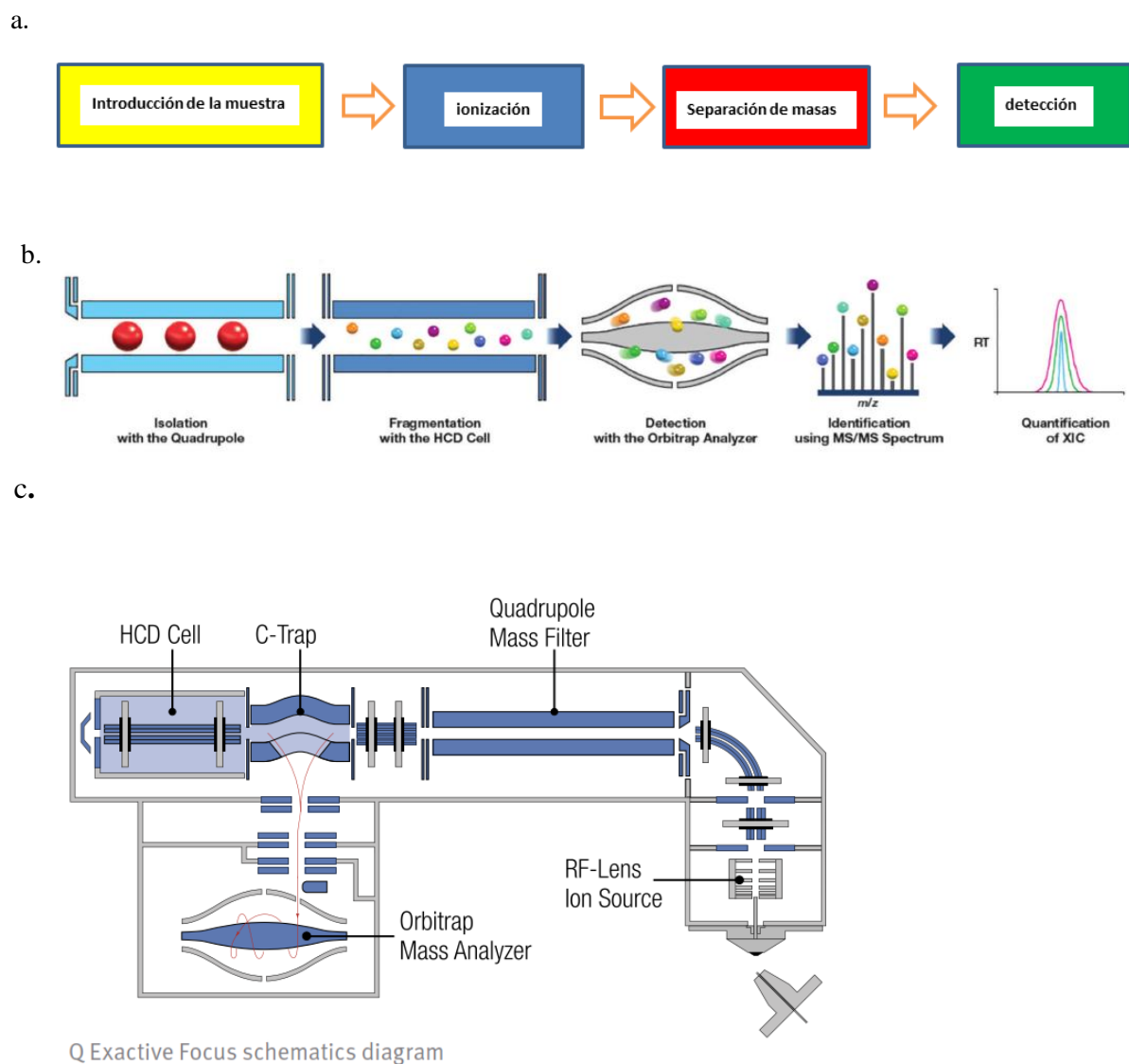


Figura 19: Espectrometría de masas como herramienta para metabolómica.

a. Funcionamiento y adquisición de datos en un espectrómetro de masas. b. Esquema de un espectrómetro en tandem MS/MS que combina cuadrupolo con una celda de colisión y analizador de masas orbitrap. c. Arquitectura del espectrómetro ThermoQ-Exactive Focus. Fuente: Greaves *et al.* (2014)

Inicialmente, la muestra se introduce via la salida de efluentes del cromatógrafo UHPLC. Así la muestra vaporizada entra en la cámara de ionización. El haz de iones formado se separa en espacio o en tiempo en el analizador de iones. Finalmente, los iones resueltos según su relación m/z llegan hasta el detector (Figura 19 a).

En la figura Figura 19 b, el cuadrupolo celeste (MS) selecciona iones provenientes del ionizador (ESI) que son desintegrados en la celda de colisión azul (HCD) en iones más pequeños (MS^2) para luego ir al analizador de masas Orbitrap que finalmente produce el espectro de masas para análisis cualitativo de metabolitos e incluso cuantitativo si se dispone de estándares (Greaves *et al.* 2014).

La Figura 19 c, es el esquema de un espectrómetro Thermo-Q-Exactive Focus.

Se prefiere la ionización **ESI** (Electron Spray Ionization) porque es la más adecuada para compuestos de mediana a alta polaridad y pesos moleculares de 100 a 100,000 Da. Se adapta bien a los sistemas HPLC o UHPLC en fase reversa. Se puede optar por dos tipos de ionización, ionización positiva $[M+H]^+$ y también ionización negativa $[M-H]^-$. Los iones así formados se conducen y seleccionan en el cuadrupolo (MS) asociado a la celda de colisión **HCD** (High energy collisional dissociation) para una segunda ionización (MS^2).

De otro lado, entre los analizadores de masa, el analizador **Orbitrap** -que separa iones en un campo eléctrico oscilante- permite la selección sistemática y fragmentación del pico base del espectro *full scan* para la adquisición del espectro MSMS. Este sistema requiere de un vacío de 10^{-10} torr. El rol del **detector** es determinar la abundancia de iones separados (según m/z) en el analizador de masas. El sistema de detección que utiliza Orbitrap es del tipo Image Current “Método de detección de iones midiendo la corriente que resulta de la imagen de carga inducida por un movimiento coherente de iones pasando cerca de un conductor”.

Para el análisis de metabolitos ácidos y fenólicos se utiliza la ionización negativa, ESI (-) que produce iones negativos “desprotonados” $[M-H]^-$. Algunas reacciones comunes en ESI (-) aparecen en la tabla 4. Las masas de los iones generados (m/z) se obtienen con 4 decimales que implica errores menores a 5 ppm respecto a la masa teórica (m/z). La manipulación de los espectros de masa se realiza con software ad hoc. En este trabajo en particular, XCalibur v. 2.3 (Thermo Fischer Scientific) y la asignación de estructuras incluye la prospección de

similitud espectral, iones producto característicos y búsqueda de pérdidas de fragmentos neutrales.

Tabla 4: Reacciones comunes en espectrometría de masas con ionización negativa ESI (-)

ion	explicación	<i>m/z</i>
[M-H] ⁻ , “ion molecular”	deprotonación	M-1.0078
[M-H-n H ₂ O] ⁻	Deprotonación + deshidratación	M-10078- n(18.0105)
[M-H-CO ₂] ⁻	descarboxilación	M-1.0078- 43.9898
[2M-H] ⁻	dimerización	2M-1.0078

Elaboración Propia

En el caso de flavonoides, la fragmentación de los aglicones de flavonoides ha sido descrita por Fabre *et al.* (2001) y por Yang *et al.*(2012). En los glicósidos de flavonoides son comunes las pérdidas neutrales de azúcares, hexosa 162, vicianosa 294, rutinosa 308, ácido glucurónico 176 (Li, 2019). Los flavonoides monometoxilados se caracterizan con iones [M-H-metil]⁻, [M-H-metil-CO]⁻ y [M-H-metil-HCO]⁻ mientras que los flavonoides dimetoxilados muestran iones [M-H-metil]⁻, [M-H-2 metil]⁻ y [M-H-2metil-CO]⁻ (Gu *et al.* 2012; Justesen 2001). Los patrones de fragmentación en ácidos salvianólicos, terpenoides y otros tipos de moléculas se describen en el capítulo IV de Resultados y Discusión.

2.3. LA FITOQUÍMICA PREPARATIVA

Históricamente, el primer reporte de aislamiento de ácido rosmarínico por *prima volta* Scarpati *et al.* (1958, 1958a) ilustran un trabajo clásico en purificación de un producto natural: “*Las hojas picadas se hierven durante 1.5 horas con 5 L de agua con agitación ocasional. La decocción se decanta y se mezcla con el líquido obtenido de prensar las hojas, se filtra y se precipita con una solución al 20% de acetato de plomo neutro. El precipitado amarillo de sales de plomo se centrifuga y se lava con agua también por centrifugación. Luego se suspende en agua y se descompone con sulfuro de hidrógeno. Una vez que la precipitación fue completa, el líquido se calentó en baño de vapor y se filtró en caliente el sulfuro de plomo con un embudo de Buchner ancho. El precipitado se lavó con agua hirviente. El líquido filtrado se concentra a presión reducida y luego se extrae con éter*

etílico. El extracto etéreo se evapora y el residuo se cristaliza de agua. 2-3% de rendimiento.”

El procedimiento de adición de acetato de plomo para la precipitación de polifenoles se llamaba “defecación con plomo” (Giral 1978, pag.51). Hoy en día, su utilización sería inaceptable por la toxicidad del plomo y también del sulfuro de hidrógeno.

Existen diversos procedimientos para el aislamiento y recuperación de productos naturales, que incluyen extracciones, reparto líquido-líquido, los diversos tipos de cromatografía incluyendo la cromatografía líquida a contracorriente, la cristalización y el scaling-up en el aislamiento de los productos naturales (Cannell 1998; Houghton *et al.* 1998; Sarker *et al.* 2006, 2012; Hostettmann *et al.* 1998).

Una de las metodologías clásicas corresponde a la que utilizó Morris Kupchan para purificar terpenoides anticancerígenos en los años 1960-1980 (Figura 20). Una de las desventajas de estos fraccionamientos es la formación de emulsiones que tardan días en resolverse. Posteriormente se hicieron modificaciones a los métodos propuestos por (Kupchan *et al.* 1975).

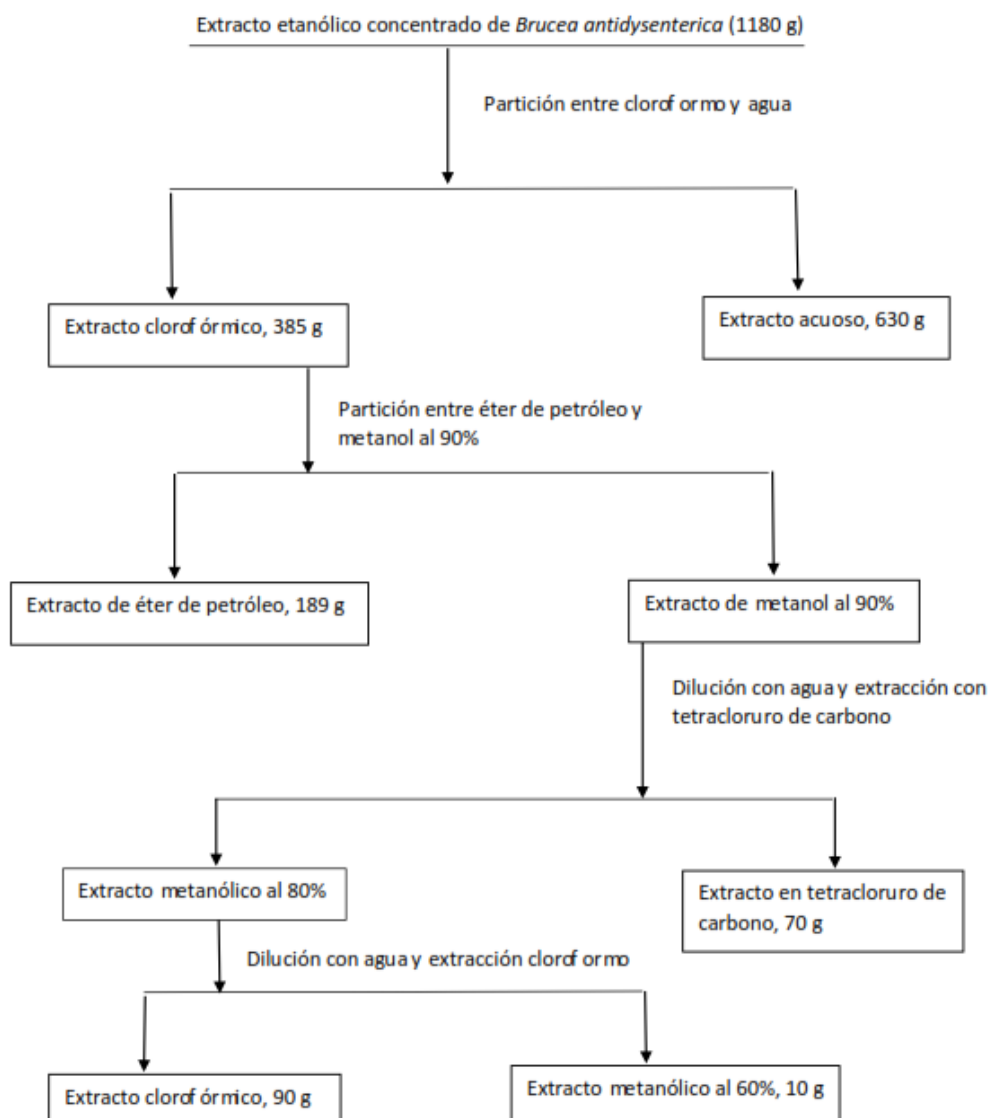


Figura 20: Particiones sucesivas de un extracto etanólico de *Brucea antidysenterica* (*Simaroubaceae*) para separar sus principios antileucémicos.

Fuente: Kupchan *et al.* (1975).

En 2016, se formó TriforC (Triterpenes for Commercialization) que reúne varias universidades europeas (Goossens *et al.* 2018). Plantean un esquema que mejora a las metodologías de Kupchan El método propuesto aparece en la Figura 21, sin embargo, aún tiene el problema de la formación de emulsiones.

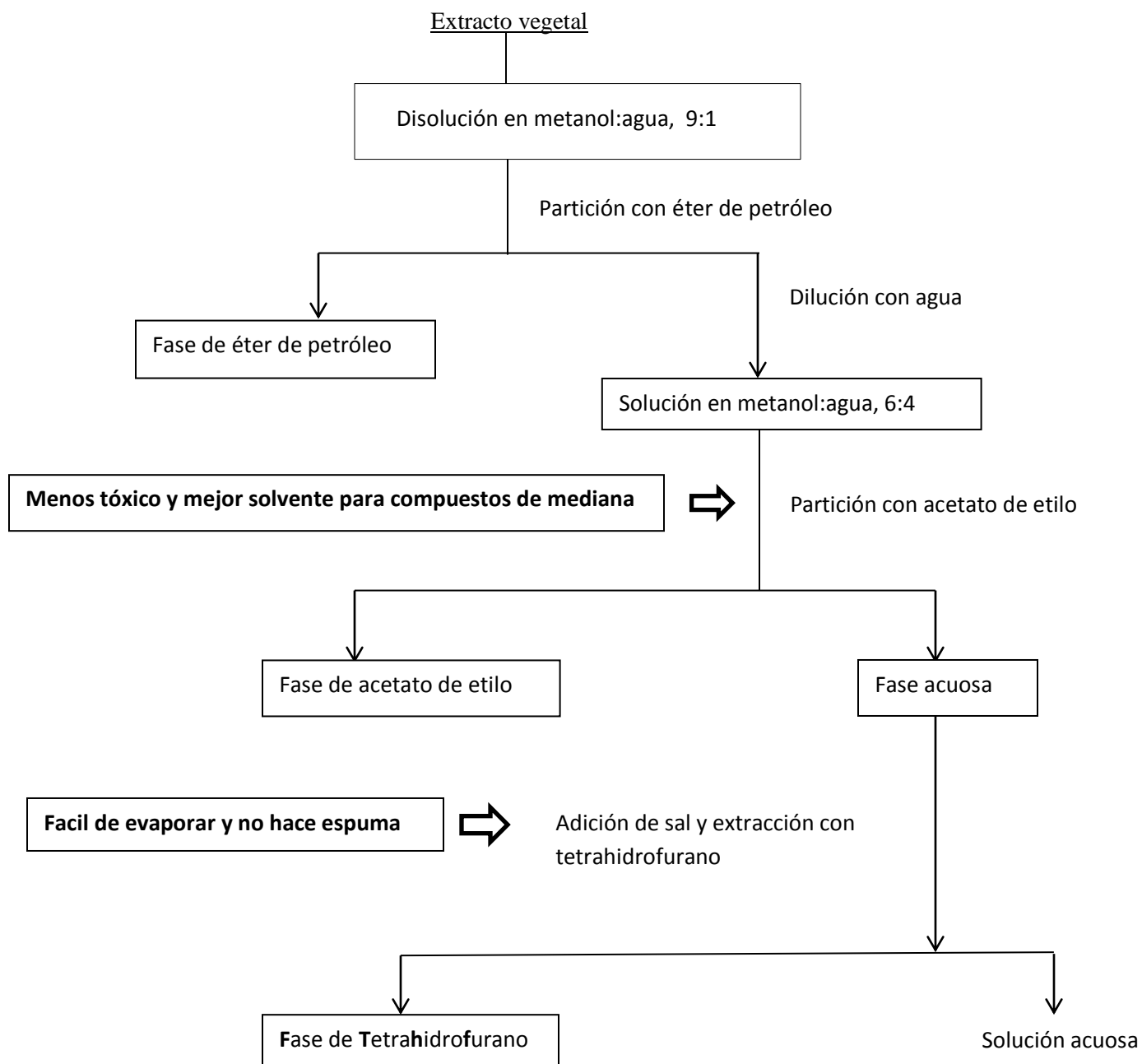


Figura 21: Método de fraccionamiento optimizado.

Fuente: TriforC Database.

En el marco del mismo consorcio, el grupo de la Universidad de Piamonte Orientale (UPO) propuso la metodología mostrada en la figura 22 (Chianese *et al.* 2019). En este caso, no hay formación de emulsiones pero puede haber adsorción irreversible de los compuestos más polares.

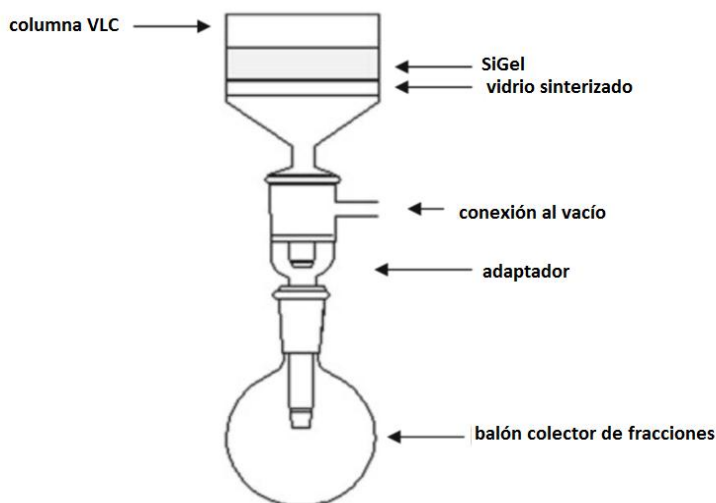
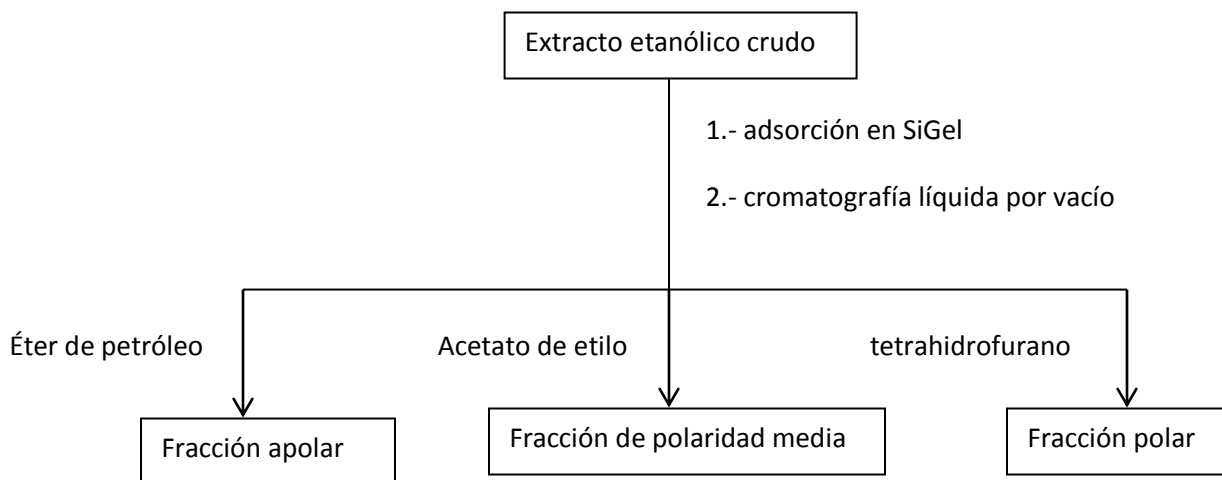


Figura 22: Esquema de fraccionamiento de extractos de plantas para evitar la formación de emulsiones durante la recuperación de terpenoides. VLC: Vaccum Liquid Chromatography.

Fuente: Chianese *et al.* (2019); Coll *et al.* (1986); Pelletier *et al.* (1986).

Otro aspecto a resaltar, es la cristalización de productos naturales que constituye la etapa final en el fraccionamiento y purificación de extractos naturales (Figura 23).

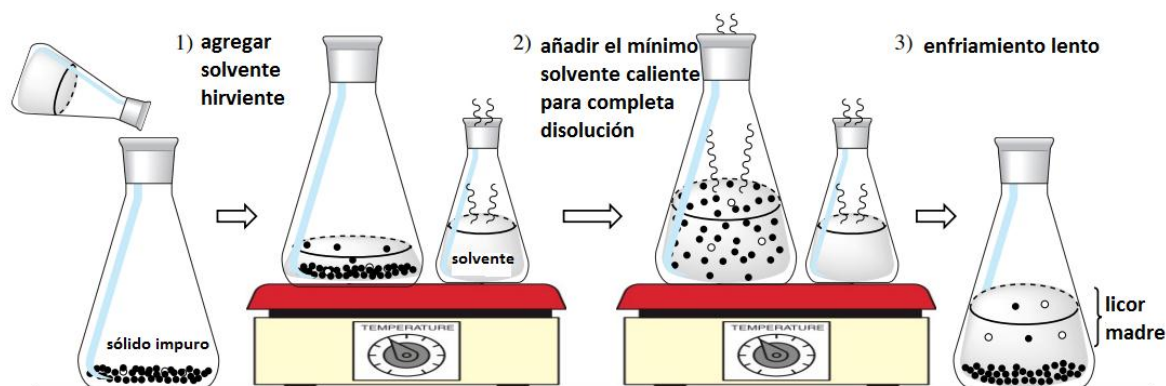


Figura 23: Esquema general de la recristalización de sustancias orgánicas. Fuente: Nichols (2017).

Un trabajo fundamental en recristalización fue el de Tipson (1950). En éste se relacionaban los términos empleados en tres tipos de fraccionamiento, la recristalización, la destilación y la extracción líquido – líquido (Tabla 5).

Tabla 5: Comparación de términos empleados en 3 procedimientos de fraccionamiento de una sustancia “A” .

Recristalización	Destilación	Extracción líquido-líquido
Cristalizando	Destilando	Extrayendo
Un ciclo de recristalización	Una destilación simple	Una equilibración
Cristales	destilado	Extracto
Licor madre	residuo	rafinato
Constante de distribución = Peso de A en los cristales/peso de A en el licor madre		Coefficiente de partición = Peso de A en el extracto/peso de A en el rafinato

Fuente. Tipson (1950)

El esquema de una recristalización simple se ilustra en la Figura 24, utilizado en química orgánica sintética y también de productos naturales.

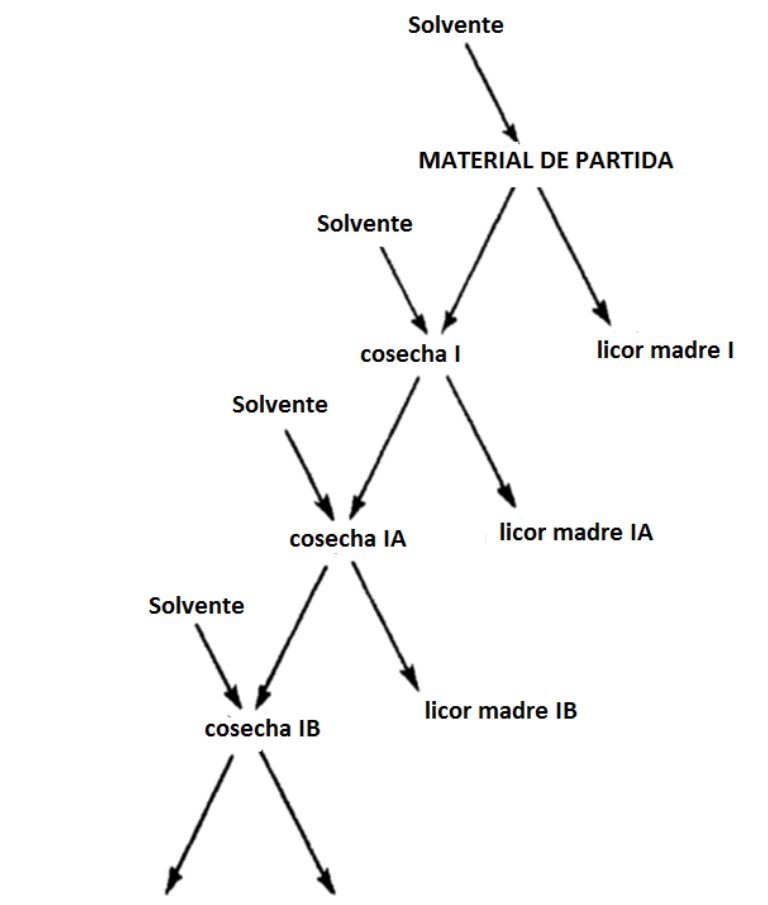


Figura 24: Esquema de procedimiento de recristalización simple de sustancias orgánicas.

Fuente: Tipson (1950).

La pureza de los cristales y el rendimiento de los mismos es una figura antagónica, a mayor pureza, menor rendimiento. Este efecto se ilustra en la Figura 25 (Tipson 1950).

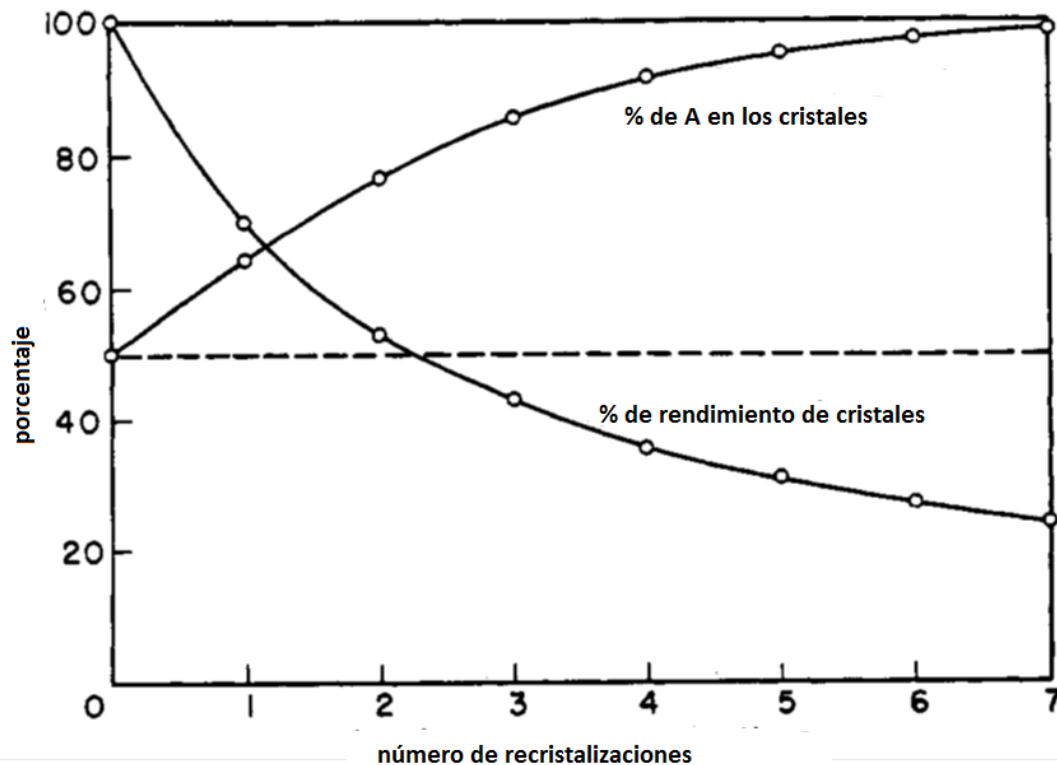


Figura 25: Variación de la pureza y rendimiento de los cristales en función al número de recristalizaciones.

Fuente: Tipson (1950).

La recristalización puede describirse como aquel proceso donde se obtiene una sustancia cristalina a partir de otras formas sólidas de la misma, estas podrían ser amorfas o cristalinas. En solución la cristalización es la creación de una fase cristalizada por un proceso de agregación molecular, conducente a la formación de núcleos cristalinos (la más pequeña posible unidad de red cristalina) y posteriormente el crecimiento de cristal. Los procedimientos de cristalización- recristalización a partir de soluciones (McKeown *et al.* 2011) se pueden clasificar en:

- Cristalización evaporativa. La evaporación del solvente aumenta la concentración de soluto hasta el límite de su solubilidad. Entonces comienza la cristalización.
- Cristalización por enfriamiento. A mayor enfriamiento la solubilidad disminuye y el soluto inicia a cristalizar.
- Cristalización por adición de antisolvente. El antisolvente es un líquido donde el soluto no disuelve. Al agregar antisolvente a una disolución del soluto, entonces primero hay enturbiamiento y luego cristalización.
- Cristalización reactiva. Cuando el soluto en disolución reacciona con una sustancia que lo vuelve iónico o simplemente insoluble y así cristaliza.

Esta investigación tuvo un particular interés en la cristalización-recristalización del AR a partir de soluciones acuosas. En este sentido se consideró el procedimiento llamado “por deshidratación al vacío”, donde una solución acuosa de la sustancia a purificar se pone en un desecador con ácido sulfúrico o con gel de sílice recién deshidratado (Figura 26). La solución acuosa va perdiendo paulatinamente agua hasta que el soluto precipita o cristaliza. Si la solución, simplemente, se deja al medio ambiente, tarda demasiado o nunca se alcanza las condiciones de nucleación. Este tipo de cristalización se clasifica como una cristalización evaporativa (McKeown *et al.* 2011).

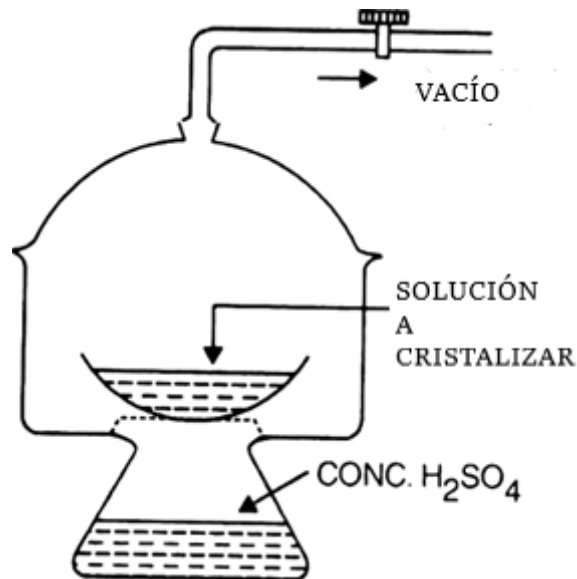


Figura 26: La cristalización por deshidratación al vacío. Elaboración propia.

En la presente investigación, se consideró la cristalización evaporativa sobre disoluciones acuosas (para el ácido rosmarínico) y la cristalización por enfriamiento de soluciones alcohólicas (ácido ursólico). Un tratamiento muy gráfico sobre la cristalización por enfriamiento, evaporativa y también por antisolvente es la de Coquerel (2014).

2.3.1. Optimización de las extracciones y cristalizaciones

La extracción es la primera etapa importante para obtener compuestos bioactivos a partir de plantas. En la extracción están implicados muchos factores como la temperatura de extracción, la relación solvente-planta, el tiempo de extracción, la composición del solvente, y la presión de extracción, entre otras variables que, afectan significativamente la eficacia de la extracción.

La optimización de las condiciones de extracción en productos naturales se consigue utilizando diseños y herramientas estadísticas (Das *et al.* 2018).

Por ejemplo, para la optimización de la extracción ácidos fenólicos de las hojas de *Melissa officinalis* se utilizó el método de superficie de respuesta, incluyendo experimentos preliminares para definir tres variables independientes (concentración de etanol, temperatura y relación solvente muestra) y tres niveles (bajo, medio, alto) así como la respuesta (rendimiento de sustancia en mg/ g planta utilizado) y aplicando el diseño Box-Behnken que implicó 15 corridas experimentales (Yoo *et al.* 2018).

Los métodos de optimización, no solo se utilizan para procesos de extracción sino también para purificación: cromatografía y en recristalización. Un ejemplo reciente (Ding *et al.* 2017), corresponde a la purificación de un coumestano antihepatotóxico, la *wedelolactona*. Para ello, optimizaron una cromatografía de columna con Si Gel tipo flash, de dimensiones 3 x 50 cm, elución isocrática con diclorometano: metanol a un flujo de 3 mL/minuto y por metodología superficie-respuesta. La respuesta evaluada fue el rendimiento de *wedelolactona* y las variables consideradas fueron: la composición de la fase móvil, acidez de la fase móvil y tamaño de la muestra a separar. Seguidamente, en la recristalización de la *wedelolactona* (recristalización con adición de antisolvente, con el par de solventes etanol:agua), se disolvió la sustancia en el mínimo volumen posible de etanol a 60°C mientras que se bombeaba el

antisolvente agua a 200 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ y agitación a 220 rpm. Así, mediante análisis de factor individual, las variables consideradas fueron: cantidad de antisolvente, tiempo de cristalización y temperatura final; mientras que las respuestas evaluadas incluían el rendimiento y la pureza de producto.

La optimización de las cristalizaciones, se realizan actualmente con ayuda de unidades de programación de temperaturas y dispositivos de monitoreo de tamaño de cristal. En las cristalizaciones por enfriamiento, la forma de ejercer presión de cristalización es precisamente el enfriamiento (presión de cristalización \approx enfriamiento), la disminución de temperatura puede hacerse sin control alguno “al natural” o mejor enfriando muy lentamente de manera programada, lo que minimiza la nucleación y asegura el crecimiento cristalino evitando la formación de finos. Este llamado “enfriamiento cúbico” con una disminución de temperatura muy lenta al comienzo, permite la formación de pocos núcleos cristalinos que con el tiempo crecen dando buenos cristales. En cambio, el enfriamiento rápido o “al natural” produce muchas semillas, generando cristales menudos (Anderson 2012). El proceso se describe en la Figura 27.

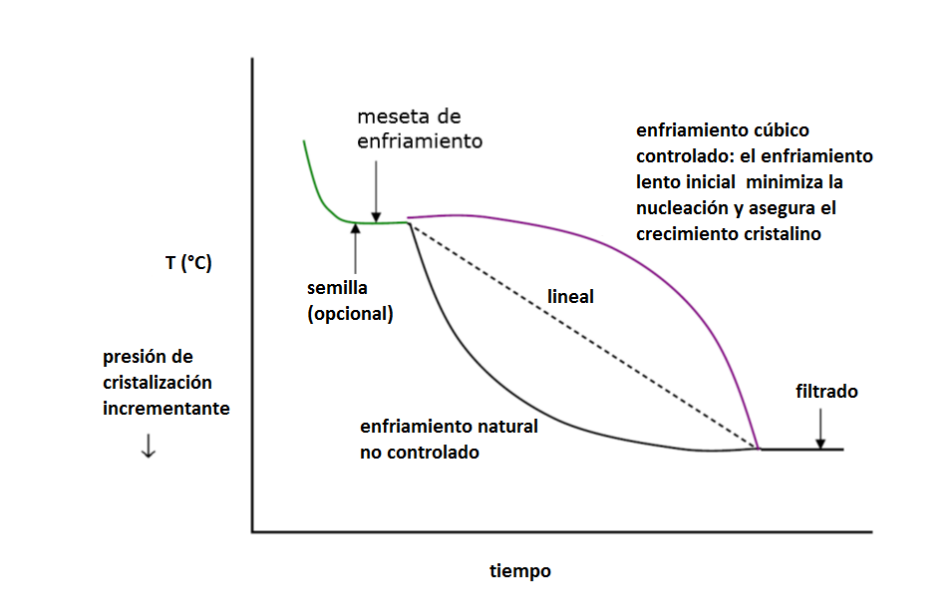


Figura 27: Perfiles de enfriamiento para controlar la cristalización mediante “enfriamiento cúbico”.

Fuente: Anderson (2012).

El enfriamiento cúbico responde a la ecuación (1):

$$T = T_{max} - (T_{max} - T_{min}) * (t/t_{total})^3 \quad (1)$$

Donde T es la temperatura en el tiempo t; T max y Tmin son las temperaturas inicial y final para la cristalización.

Así, por este modo de ingeniería de cristalización, en el enfriamiento cúbico, a menor velocidad de enfriamiento se favorece el crecimiento cristalino de las semillas en lugar de la aparición de nuevos núcleos. Se generan cristales más grandes, tortas de filtración de menor compresión, que permite una fácil deslicorización y enjuague y también se mejora el filtrado y secado de los cristales (Kim *et al.* 2005). Algunas mejoras a técnicas comunes para recrystallizar moléculas bioorgánicas pequeñas fue publicado por Rychkov *et al.* (2014).

Diseños de cristizador, filtrador y desecador compacto para producción de pequeños lotes de ingredientes farmacéuticos activos han sido descritos por Wong *et al.* (2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

En este estudio se colectaron trece especies de *Mentheae*. Los lugares de muestreo se indican en la Figura 41 y los ejemplares colectados se muestran en las Figuras 28 a 40. Las fechas de colección corresponden a los años 2013 hasta el 2018.

Los mejores ejemplares se herborizaron y luego fueron identificados por el Botánico Eric Frank Rodríguez Rodríguez y depositados en el “Herbarium Truxillense” (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo –Perú. La ficha de depósito se adjunta en el Anexo 1.

Las especies colectadas fueron las siguientes:

- 1 *Lepechinia meyenii* Walp. (Epl.) (*Salviinae*)
- 2 *Clinopodium brevicalyx* Epling (Harley & Granda) (*Menthinae*)
- 3 *Salvia oppositiflora* (R. y P.) (*Salviinae*)
- 4 *Lepechinia floribunda* (Benth.) (*Salviinae*)
- 5 *Minthostachys mollis* Griseb. (*Menthinae*).
- 6 *Salvia sagittata* R. y P. (*Salviinae*)
- 7 *Salvia cuspidata* subsp. *cuspidata* (R. y P.) (*Salviinae*)
- 8 *Clinopodium revolutum* (R. y P.) (*Menthinae*)
- 9 *Clinopodium sericeum* (Briq. et Benth)Govaerts (*Menthinae*)
- 10 *Salvia haenkei* Benth. (*Salviinae*)
- 11 *Salvia dombeyi* Epl. (*Salviinae*)
- 12 *Hedeoma mandoniana* Wedd. (*Menthinae*)
- 13 *Clinopodium pulchellum* Kunth (Govaerts) (*Salviinae*)

Para propósito de las extracciones, la desecación se realizó a la sombra en ambiente aireado. Posteriormente se trituró en molino de alta velocidad obteniéndose de 10 a 25 g de material pulverizado.

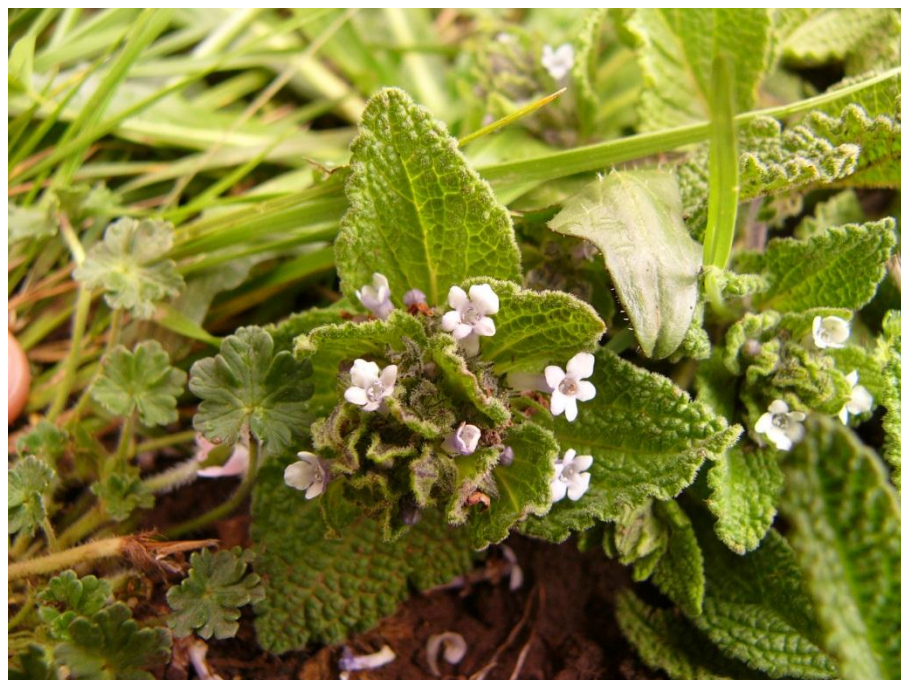


Figura 28: *Lepechinia meyenii* (Walp.)(Epl.), Pumahuanca – Cusco, febrero 2014. Código HUT 59504.



Figura 29: *Clinopodium brevicalyx* Epling (Harley & Granda), Tambomachay-Cusco, junio 2017. Código HUT 59506.



Figura 30: *Salvia oppositiflora* R. y P. Saxaywamán – Cusco, junio 2017. Código HUT 59502.



Figura 31: *Lepechinia floribunda* (Benth). Huarán-Cusco, julio 2014. Código HUT 59503.



Figura 32: *Minthostachys mollis* Griseb. Cajatambo, Lima, junio 2017. Código HUT 59766.



Figura 33: *Salvia sagittata* R. y P. Sullcapunta-Huánuco, enero 2014. Código HUT 59499.



Figura 34: *Salvia cuspidata subsp. cuspidata*. (R. y P.) Cajatambo, -Lima, junio 2017. Código HUT 59505.



Figura 35: *Clinopodium revolutum* (Briq. et Engl.) (Harley & Grandes). Sullcapunta-Huánuco, enero 2014. Código HUT 58329.



Figura 36: *Clinopodium sericeum* (Presl ex Benth) Govaerts. Gocta-Amazonas, febrero 2016.
Código HUT 58332.



Figura 37: *Salvia haenkei* Benth. Cuchumbaya-Moquegua, julio 2013. Código HUT 59500.



Figura 38: *Salvia dombeyi* Epling, Laraos-Lima, febrero 2018. Código HUT 59764.



Figura 39: *Hedeoma mandoniana* Wedd., Anta-Cusco, febrero 2018. Código HUT 59763.



Figura 40: *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts.
Carhuayoc, San Marcos-Ancash, marzo 2018. Código
HUT 59765.

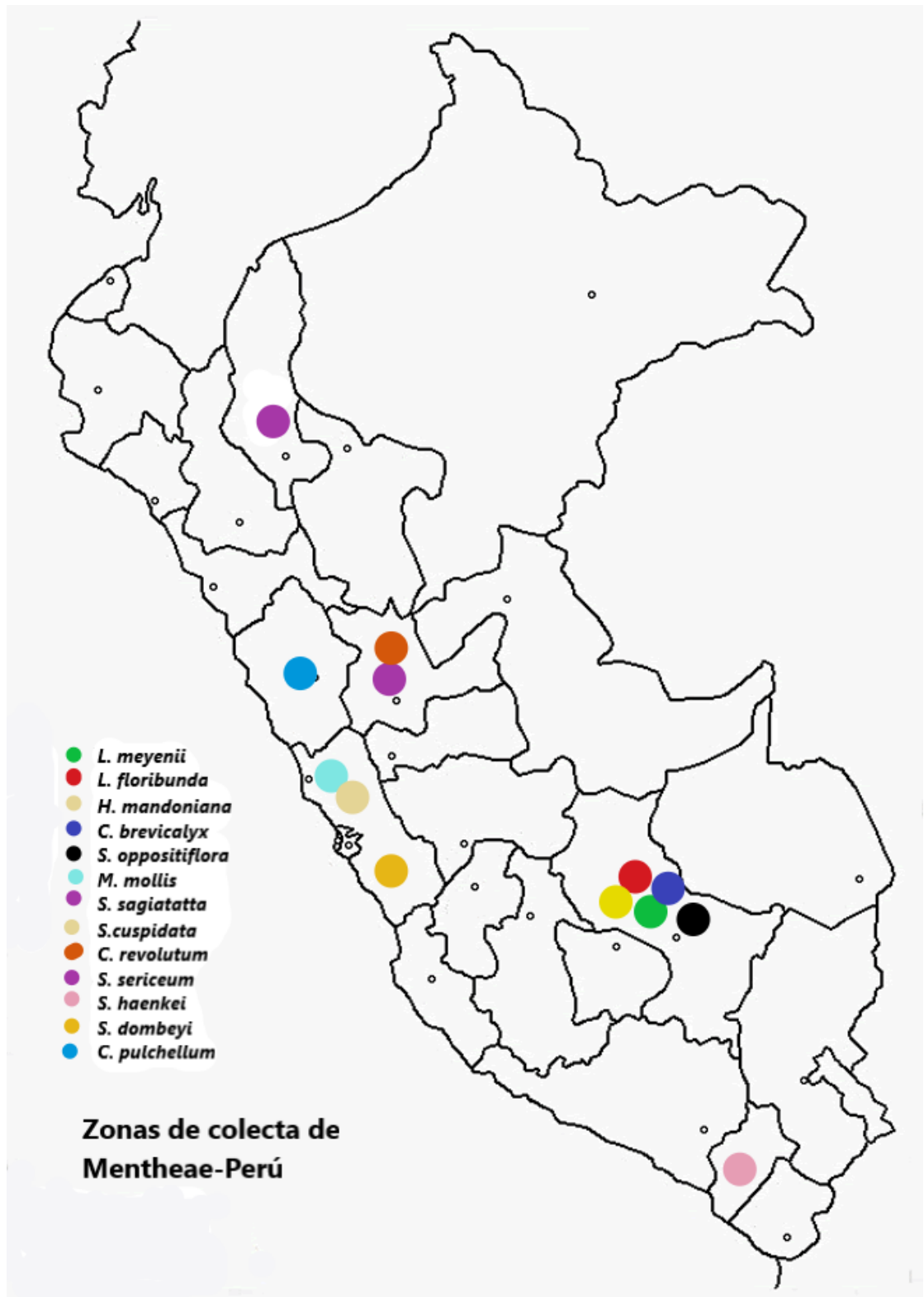


Figura 41: Mapa de zonas de colecta de las 13 especies de *Mentheae* analizadas en esta investigación.

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1. Materiales de laboratorio

- Columna *Phenomenex Lichrospher RPC18* 25 x 0.46 cm x 5 μm
- Columna *RPC₁₈ Zorbax Rapid Resolution* de 100 x 2.1 mm x 1.8 μm
- Columna *Acclaim RPC₁₈* 150 x 4.6 mm x 1.8 μm
- Guarda columna UHPLC *Zorbax Eclipse* 2.1 x 1.5 mm x 1.8 μm
- Guarda columna HPLC *Zorbax Eclipse* 2.1 x 1.5 mm x 5 μm
- Micropipetas de 2 y 10 μL
- Cámara cromatográfica (Camag)
- Material de vidrio general (tubos, viales, vasos, matraces, pipetas, embudos, fiolas)
- Filtros teflón UHPLC de 0.22 μm

3.2.2. Reactivos y solventes

- Acetonitrilo, Metanol, Acetona, acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, cloroformo, tolueno, éter de petróleo (Merck) grado analítico o HPLC
- Estándares de ácidos cafeico (Aldrich), rosmarínico (Aldrich), oleanólico y ursólico (Chromadex), quercetina (Merck), ácido gálico (Merck), ácido ascórbico (Merck)
- Cromatofolios *SiGel G60F₂₅₄* (Merck)
- *SiGel Flash* (40-63 μm) (Merck)
- *SiGel azul* para desecador
- Ácido sulfúrico comercial
- Difenilborinato de etanolamina (Fluka)
- Molibdato de amonio
- Ortofosfato de sodio
- Reactivo de Folin Ciocalteu (Merck)
- Cloruro de aluminio
- Acetato de sodio
- Nitrito de sodio

- Ácido clorhídrico 37% (Baker)
- Ácido sulfúrico 98% (Baker)
- Arena blanca

3.2.3. Equipos

- Baño ultrasónico (JeioTech)
- Rotavapor (Buchi R210)
- Estufa (Mettler UNB)
- Espectrofotómetro UV-visible (Thermoscientific Genesys 20)
- DAD-UHPLC (Dionex Thermoscientific Ultimate 3000 UHPLC)
- DAD-UHPLC (Dionex Thermoscientific Ultimate 3000 UHPLC asociado a espectrómetro de masas ThermoQ-Exactive-Focus)
- Lámpara UV 254 y 366 nm (Camag)
- Purificador de agua HPLC (Wasserlab)
- Espectrómetro RMN Bruker de 400MHz
- Molino de alta velocidad IKA A-11

3.3. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS

Una muestra de 500 mg de vegetal pulverizado fue sometida a baño ultrasónico por cinco minutos con 10 mL de etanol y el extracto se filtró. Se repitió el proceso dos veces más. Los filtrados se aforaron a 50 mL con etanol. Cinco mL se evaporaron en estufa a 40°C para determinar el peso de extracto seco y el resto del extracto se almacenó a 4°C hasta la realización de los análisis subsecuentes: cromatografía en capa fina, fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinnámicos totales y capacidad antioxidante total.

3.4. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

Para los componentes fenólicos se utilizó cromatoplasmas de SiGel G 60F₂₅₄ (Merck) de 20 x 10 cm. Se utilizó como fase móvil cloroformo:acetona: ácido fórmico (6:4:1) (Wagner *et al.*

2001) y el revelado se realizó con Naturstoffreagenz (1% de difenilborinato de etanolamina en etanol) bajo luz UV de onda larga (365 nm). Tanto los extractos como los estándares se aplicaron en volúmenes de 2 a 4 μ L.

Para los ácidos triterpénicos se utilizaron cromatoplasmas de SiGel G 60F₂₅₄ (Merck) de 20 x 10 cm. Se trabajó con prederivatización con solución clorofórmica de iodo al 1% según lo descrito por (Mucaji *et al.* 2011): El extracto etanólico de la planta y/o soluciones de AO/AU estándar (de 2 a 4 μ L) se aplica en la cromatoplasma y sobre esta aplicación se coloca igual volumen de la solución de iodo al 1%. Se dejó en oscuridad por 10 minutos y luego se desarrolló con cloroformo:metanol (48:2). La placa se reveló por inmersión en ácido sulfúrico al 10% y aplicación de calor. Los ácidos triterpénicos se muestran como zonas de color rojo.

3.5. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

Se utilizó el método de Folin Ciocalteu (Gálvez *et al.* 2005), 50 ó 100 μ L de extracto se diluyeron hasta 2 mL con agua. Luego se agregaron 100 μ L de Reactivo de Folin Ciocalteu (Merck) en dilución (1:10) en agua + 200 μ L de solución de Na₂CO₃ al 20%. El desarrollo del color se realizó durante 30 minutos en oscuridad y luego se midió la absorbancia a 765 nm. La curva de calibración se obtuvo empleando solución de ácido gálico (1 mg/ 10 mL). El análisis se ejecutó por triplicado.

3.6. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

Se empleó el método del cloruro de aluminio (Bag *et al.* 2015). A 50 μ L de extracto se agregó 0.1 mL de AlCl₃ al 10%, 0.1 mL de acetato de sodio 0.1 M, 1.5 mL de etanol y agua suficiente para completar 6 mL. Se mezcló adecuadamente y se midió absorbancia a 415 nm. El blanco de reacción se realizó reemplazando los 0.1 mL de AlCl₃ al 10% por 0.1 mL de agua. La diferencia de lecturas se utilizó para los cálculos. La curva de calibración se realizó utilizando una solución de quercetina (1 mg/10mL). El análisis se ejecutó por triplicado.

3.7. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINNÁMICOS TOTALES

Se empleó el método de Arnow (Stefan *et al.* 2013). Sobre 20 a 300 μ L de extracto se le agregaron 2 mL de HCl 0.5 M, 2 mL del reactivo de Arnow, 2 mL de NaOH al 8.5% y agua suficiente para completar 11 mL. Se mezcló bien y se leyó a 505 nm. Además, se hizo una secuencia de compensación utilizando 2 mL de agua en lugar del reactivo de Arnow. La diferencia de lecturas se utilizó para los cálculos. El reactivo de Arnow se preparó disolviendo 10 g de nitrito de sodio, 10 g de molibdato de amonio en agua hasta 100 mL. La curva de calibración se obtuvo empleando ácido rosmarínico (1 mg/10 mL) en etanol al 20%. El análisis se ejecutó por triplicado.

3.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

Se trabajó con el método del azul de molibdeno (V) a partir de molibdeno (VI) (Prieto *et al.* 1999; Bag *et al.* 2015). A 100 μ L de extracto se agregó 1 mL de reactivo de fosfomolibdato, 1 mL de agua y se calentó en estufa a 80°C por una hora. En este tiempo se desarrolló el color. Luego se diluyó con 5 mL de agua y la lectura se hizo a 695 nm. El reactivo de fosfomolibdato fue una solución compuesta de molibdato de amonio (4.66 g/L), $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (10.64 g/L) y H_2SO_4 concentrado 32.61 mL/L. La curva de calibración se obtuvo con solución de ácido ascórbico (1 mg/10 mL). El análisis se ejecutó por triplicado.

3.9. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EN TRECE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *MENTHAE*

Una muestra de 50 mg de vegetal pulverizado se sometió a baño ultrasónico por 5 minutos con 1 mL de etanol x 3 veces. Los filtrados se aforaron a 5 mL con el mismo solvente. Este filtrado nuevamente se filtró a viales a través de membrana de teflón de 0.22 μ m.

Para la separación cromatográfica mediante DAD-UHPLC (Dionex Thermoscientific Ultimate 3000 UHPLC con software Chromeleon 7.2) (Venskutonis *et al.* 2017) se utilizó una

columna *RPC₁₈ Zorbax Eclipse Rapid Resolution* de 100 x 2.1 mm x 1.8 µm y guarda columna *UHPLC Zorbax Eclipse* 1.5 x 2.1 mm x 1.8 µm.

Las condiciones de trabajo fueron:

- Temperatura de separación: 40°C.
- Flujo: 0.4 mL/minuto.
- Gradiente: a) H₂CO₂ al 0.1 %; b) acetonitrilo; (tiempo, %b): (0,0); (1,0); (6,40); (9,100); (13,100); (14,0); (17,0).
- DAD: 200-500 nm; UVVis 1 : 254 nm; UVVis 2: 330 nm; UV Vis 3: 280 nm; UV Vis 4: 370 nm.

La cuantificación se hizo con las lecturas obtenidas a 330 nm. Paralelamente se realizó una curva de calibración con ácido rosmarínico estándar (Aldrich) de 2, 1.5, 1, 0.5 y 0.2 mg/mL con una linealidad de 0.999. El análisis se ejecutó por triplicado.

3.10. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS TRITERPÉNICOS EN TRECE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *MENTHEAE*

Se utilizaron las mismas soluciones de la cuantificación de AR (sección 3.9). La separación mediante UHPLC (Dionex Thermoscientific Ultimate 3000 UHPLC, con software Chromeleon 7.2) (Srivastava *et al.* 2010) se realizó utilizando una columna *Phenomenex Lichrospher RPC₁₈* 25 x 0.46 cm x 5 µm y guarda columna *HPLC Zorbax Eclipse* 1.5 x 4.6 mm x 5 µm.

Las condiciones de corrida fueron las siguientes:

Tiempo de análisis: 20 minutos.

Temperatura: 30°C.

Modo de elución: isocrático (acetonitrilo: agua, 8:2).

Detección : Mediante arreglo de diodos DAD: 200-400 nm, longitud de onda de detección a 209 nm.

Se realizó una curva de calibración con estándar mixto de ácido oleanólico y ácido ursólico (Chromadex) de 2, 1, 0.5 y 0.3 mg/mL de AO y AU. El análisis se ejecutó por triplicado.

3.11. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO A PARTIR DE *LEPECHINIA MEYENII*

Se trabajó en base a un diseño Box-Behnken utilizando quince experimentos con 200 mg de planta seca y molida, en donde las variables son: concentración de etanol, temperatura y la proporción solvente/muestra (Tabla 6).

Tabla 6: Variables para la optimización en la extracción del ácido rosmarínico.

factor	bajo	medio	alto
% Etanol	20	40	60
Temperatura, °C	40	50	60
Proporción solvente/muestra	10	15	20

El tiempo de extracción se mantuvo constante en todos los casos a 10 minutos. La respuesta es el rendimiento en ácido rosmarínico (mg AR/ g planta). El diseño se ejecutó dos veces y los resultados experimentales se procesaron utilizando el software Statgraphics Centurion 17. El ácido rosmarínico se cuantificó según lo descrito en la sección 3.9.

3.12. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EN TRECE EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 20% DE *MENTHEAE*

Se emplearon muestras de 50 mg que se extrajeron con 1 mL de alcohol al 20% a 60°C, en baño ultrasónico por 10 minutos por 3 veces, los filtrados se aforaron a 5 mL y se filtraron a

través de membrana de teflón con 0.22 µm de poro y se analizaron por triplicado en su contenido en ácido rosmarínico por el método descrito en la sección 3.9.

3.13. PERFIL DE METABOLITOS EN TRECE *MENTHEAE* POR UHPLC-ESI-MSMS

Los extractos etanólicos obtenidos (sección 3.3) se analizaron en un sistema UHPLC Dionex Thermoscientific Ultimate 3000 UHPLC controlado con software Chromeleon 7.2 e hifenado a un espectrómetro de masas Q-Orbitrap-MS/MS (ThermoQ-Exactive Focus) controlado por software XCalibur 2.3. Se utilizó una columna Acclaim RPC₁₈ 150 x 4.6 mm x 1.8 µm con un gradiente de a) 0.1% H₂CO₂ en agua y b) acetonitrilo: (tiempo, %b): (0,5); (5,5); (10,30); (15,30); (20,70); (25,70); (35,5).

La detección se realizó mediante arreglo de diodos DAD: UV Vis 1 255 nm; UV Vis 2 280 nm; UV Vis 355 nm; UV Vis 4 640 nm.

Los parámetros de trabajo para el análisis de espectrometría de masa fueron:

Ionización : El HESI (Heated Electrospray Ionization Probe) tiene un caudal de gas de revestimiento de 75 unidades; el flujo de gas auxiliar de 20 unidades; temperatura del capilar 400°C; temperatura del calentador de gas auxiliar 500°C; voltaje de pulverización de 2500 V (ESI -).

Rango de escudriño de 50/750 *m/z*; velocidad de exploración 1 scan/s; energía de colisión 40 eV; resolución 35000; polaridad negativa.

La detección se basó en el cálculo de masa exacta. El umbral de tolerancia de masa fue de 5 ppm.

3.14. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO A PARTIR DE *LEPECHINIA MEYENII*

El material vegetal utilizado, *Lepechinia meyenii* “Puna salvia”, se compró fresco en el mercado “San Pedro” de Cusco, se secó a la sombra y se trituroó en molino de cuchillas. El contenido en AR se realizó mediante el método descrito en 3.9 y fue de 5.69 %. Se trabajó en base a dos procedimientos descritos por Christ *et al.* (1980) y Serrano *et al.* (2012) que se resume en la Figura 42.

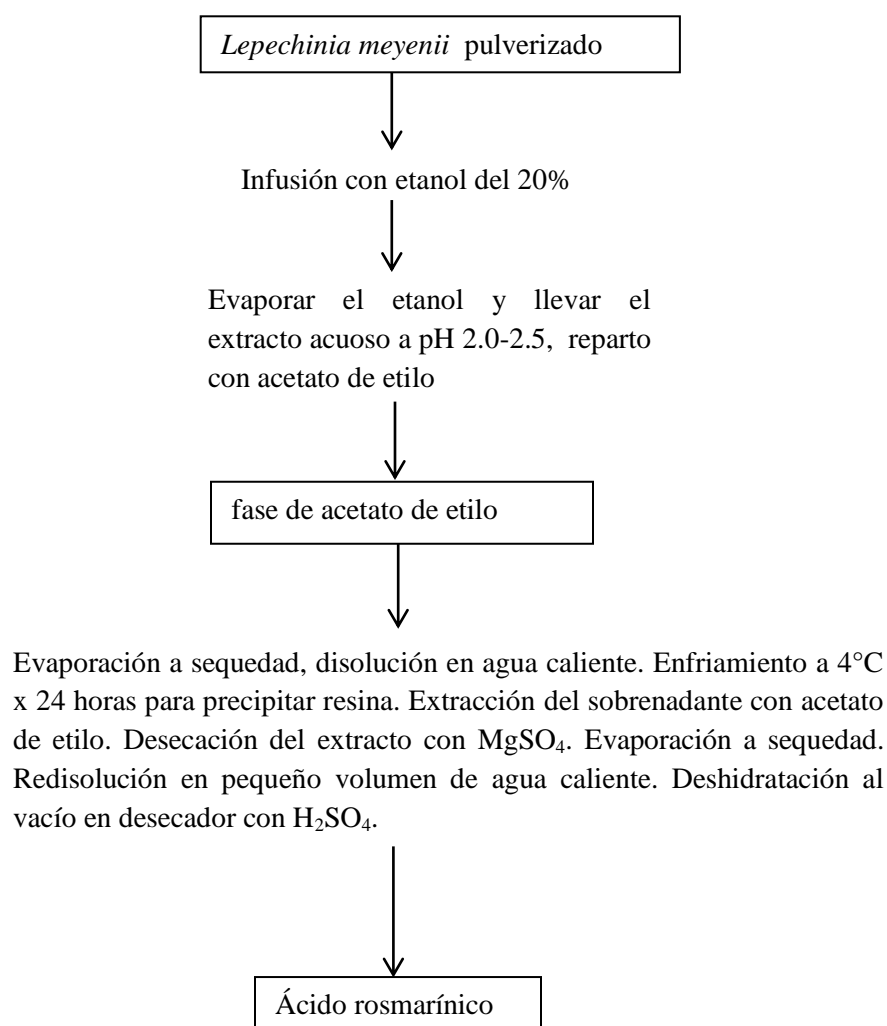


Figura 42: Esquema general para la purificación de ácido rosmarínico a partir de *L. meyenii*.

La caracterización espectroscópica del ácido rosmarínico obtenido se hizo según lo descrito en la sección 3.18 y el Anexo 3.

3.15. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO URSÓLICO A PARTIR DE *CLINOPODIUM REVOLUTUM*

Se utilizó material vegetal seco y molido comprado seco del mercado “San Pedro” (Cusco) con un contenido de 4.48% de AU y 1.27 % de AO. 53.880 g de vegetal pulverizado se desengrasaron en frío utilizando éter de petróleo (40-60°C). El residuo se dejó evaporar para eliminación del éter de petróleo. Luego el material vegetal desgrasado se extrajo en Soxhlet con etanol del 96% hasta agotamiento. El extracto se evaporó a sequedad y el extracto etanólico seco se siguió desgrasando con 3 porciones de 50 mL de éter de petróleo frío. Este extracto desgrasado se puso en estufa a 40°C para eliminar todo el petróleo. El peso del extracto etanólico fue 15 g. El extracto etanólico se disolvió en etanol a 60°C (rotavapor) y se le agregó 13.747 g de SiGel de 40-63µm. Luego se evaporó a sequedad para impregnación del extracto en el SiGel. Posteriormente se armó un sistema de cromatografía líquida por vacío (Coll *et al.* 1986; Pelletier *et al.* 1986), en un embudo fritado de 9 cm de diámetro con 1 cm de altura de SiGel y encima de ella se puso cuidadosamente la muestra impregnada haciendo también 1 cm de altura. La columna se eluyó primero con 300 mL de éter de petróleo, este eluato se desechó. Luego se eluyó con 300 mL de acetato de etilo para dar 7.1252 g de extracto. (Trazas de AU). Finalmente se eluyó con 700 mL de etanol del 96% para dar 7.5294 g de extracto. Los 7.5 g de eluato alcohólico se disolvieron en 80 mL de etanol caliente (rotavapor) y por abandono de una noche cayó precipitado terroso que se elimina. El filtrado en las 24 horas siguientes produjo 1200 mg de agujas de AU de 90.91% de pureza. Este producto por recristalización en 100 mL de etanol del 96% produjo 900 mg de cristales de 95.34 % de pureza en ácido ursólico (1.67% de rendimiento, 37.28% de recuperación).

Para verificar la identidad del producto obtenido se obtuvo el espectro ¹HRMN y ¹³CRMN (ver sección 3.19 y Anexo 3). Como se observó que la recristalización final es crítica se decidió optimizar dicho proceso según lo descrito en la sección 3.16. Los resultados aparecen en la sección 4.8.

3.16. OPTIMIZACIÓN DE LA RECRISTALIZACIÓN DEL ÁCIDO URSÓLICO

Se utilizó como base el trabajo de solubilidades del ácido ursólico a diferentes temperaturas (Fan *et al.* 2011) y modificación del método “*single factor analysis for dilution*”

crystallization” para wedelolactona (Ding *et al.* 2017). Se estudió la mejor relación, volumen de etanol/masa de cristalizando, utilizando muestras cristalinas de aproximadamente 50 mg con una pureza de 90% de ácido ursólico en viales de 10 mL cerrados herméticamente con tapa rosca y ayuda de una estufa de precisión (Mettler). Las muestras se disolvieron con etanol al 96% y luego se enfriaron lenta y espontáneamente hasta temperatura ambiente por 24 horas, manteniendo la estufa cerrada. Se filtró y enjuagó el producto con dos porciones de 0.5 mL de etanol. Se registró la masa de cristales obtenido y su correspondiente pureza por HPLC (sección 3.10). Los resultados se muestran en la sección 4.9.

3.17. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INFUSIÓN ACUOSA DE LAS TRECE *MENTHEAE*

Una muestra de 50 mg de planta se infusionó con 10 mL de agua hirviendo durante 10 minutos. Se filtró y en el filtrado se cuantificó fenoles totales (Folin Ciocalteu), capacidad antioxidante (Azul Mo(V)) y el contenido de AR y de ácidos triterpénicos por UHPLC (secciones 3.9 y 3.10).

Solamente para el caso de *Clinopodium revolutum* cuyo empleo tradicional reporta “*hacer hervir una cucharada en 1 L de agua durante 2 a 3 minutos*”, se sometieron a ebullición 63.8 mg de muestra (2.55% AO + 4.81% AU), con 10 mL de agua durante 10 minutos e inmediatamente se filtró con algodón. El filtrado frío se extrajo con acetato de etilo. El extracto se desecó con MgSO₄. Luego se evaporó a sequedad y redisolución en 1 mL de metanol. Análisis HPLC según la sección 3.10.

Este procedimiento no se hizo con las otras plantas, pues sus contenidos menores en ácidos triterpénicos no lo ameritaban. Los resultados se muestran en la sección 4.10.

3.18. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO OBTENIDO EN 3.14 POR ¹H RMN Y ¹³C RMN

La muestra se disolvió en deuteroacetona y los espectros se registraron en un equipo Bruker de 400 MHz. Los resultados se muestran en el Anexo 3.

3.19. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DEL ÁCIDO URSÓLICO RECRISTALIZADO POR ^1H RMN Y ^{13}C RMN

La muestra se disolvió en deuterometanol y los espectros se registraron en un equipo Bruker de 400MHz. Los resultados se muestran en el Anexo 3.

IV . RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONTENIDO DE EXTRACTO ETANÓLICO SECO, ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LAS TRECE ESPECIES DE *MENTHEAE* ESTUDIADAS

El porcentaje de extracto etanólico de las trece *Mentheae* estudiadas aparece en la Tabla 7.

Tabla 7: Porcentajes de extracto etanólico seco en trece especies de *Mentheae*.

Muestra	g de extracto etanólico seco/100 g de planta
1 <i>Lepechinia meyenii</i> , Lm	24.07±0.25
2 <i>Clinopodium brevicalyx</i> , Cb	37.93±0.06
3 <i>Salvia oppositiflora</i> , So	32.10±0.26
4 <i>Lepechinia floribunda</i> , Lf	25.13±0.06
5 <i>Minthostachys mollis</i> , Mm	33.93±0.25
6 <i>Salvia sagitatta</i> , Ss	24.10±0.10
7 <i>Salvia cuspidata</i> , Sc	29.93±0.06
8 <i>Clinopodium revolutum</i> , Cr	36.10±0.10
9 <i>Clinopodium sericeum</i> , Cs	31.87±0.12
10 <i>Salvia haenkei</i> , Sh	26.20±0.10
11 <i>Salvia dombeyi</i> , Sd	27.00±0.00
12 <i>Hedeoma mandoniana</i> , Hm	34.13±0.15
13 <i>Clinopodium pulchellum</i> , Cp	36.10±0.20

Los valores presentados representan el promedio de tres repeticiones.

Inmediatamente se procedió a registrar el perfil de compuestos fenólicos y triterpénicos por cromatografía en capa fina (Figuras 43 y 44).

La figura 43 corresponde al perfil de compuestos fenólicos. A excepción de la muestra 11, correspondiente a *Salvia dombeyi*, *Sd*, se detectó la presencia de ácido rosmarínico en todas las muestras. No hay reportes previos sobre la presencia de ácido rosmarínico en estas especies salvo lo reportado cualitativa y cuantitativamente para *L. meyenii*, *Clinopodium revolutum* y *C. sericeum* (Serrano *et al.* 2012 y 2016) – ver sección 4.5. En la parte superior del cromatograma se nota la presencia del ácido cafeico, más intenso en las muestras 4-7.

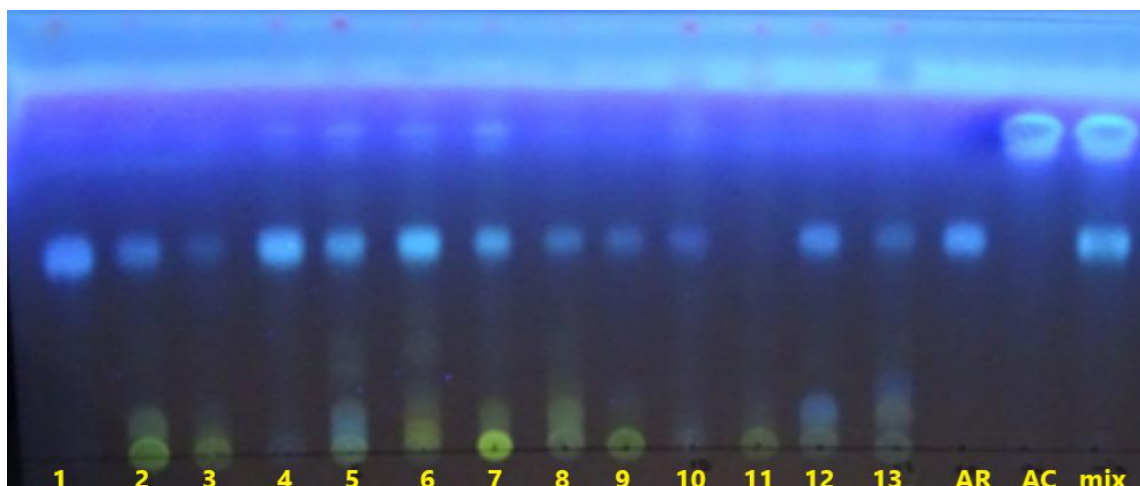


Figura 43: Perfil de compuestos fenólicos en las trece especies *Menthae*.

AR: estándar de ácido rosmarínico; AC: estándar de ácido cafeico; mix: mezcla de AR y AC.

El empleo del difenilborinato de etanolamina o “Naturstoff reagenz A” en la cromatografía en capa fina de compuestos fenólicos está descrita por (Wagner *et al.* 2011), los flavonoides se muestran como zonas amarillo-naranjas y otros compuestos como los derivados de coumarinas y los ácidos fenólicos como zonas celestes. Hay que advertir que estos cromatogramas son netamente cualitativos. Los volúmenes aplicados son 2 ó 4 μL , según la muestra sea rica o pobre en ácido rosmarínico, respectivamente. Ambos estándares tienen una concentración de 1 mg/mL.

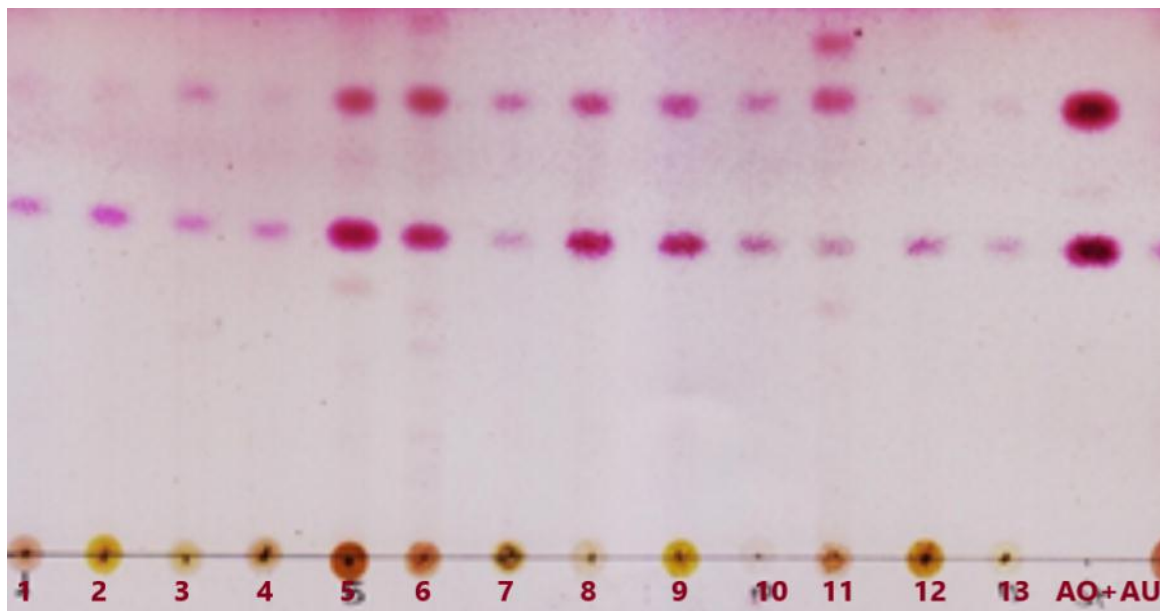


Figura 44: Cromatografía de ácidos triterpénicos en las trece *Menthae*. AO+AU: mezcla de ácido ursólico (zona inferior) y de ácido oleanólico (zona superior) a concentraciones de 1 mg/mL.

En la Figura 44 se muestra el cromatograma cualitativo de ácidos triterpénicos. Se observa claramente que todas las muestras contienen ácido oleanólico y ácido ursólico, los que parecen como zonas de color rojo. En la muestra 5, 6 y 11, *Minthostachys mollis*, *Salvia sagitatta* y *Salvia dombeyi* se nota mayor diversidad de sustancias terpénicas.

En este caso también, los registros previos de la presencia de los ácidos oleanólico y ursólico por cromatografía en capa fina para *L. meyenii*, *C. revolutum* y *C. sericeum* corresponden a Serrano *et al.* (2016). Es importante mencionar que para que el ácido oleanólico se pueda resolver del ácido ursólico, la prederivatización con yodo es indispensable. De no hacerlo, ambas sustancias harán una sola zona cromatográfica. Tanto la cromatografía de capa fina del ácido rosmarínico como la de los ácidos triterpénicos se puede hacer de manera cuantitativa empleando escáner y software adecuados como el CAMAG TLC Scanner + visión CATS (Shanaida *et al.* 2020).

El contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxycinnámicos totales y la capacidad antioxidante total de estos extractos se muestra en Tabla 8.

Tabla 8: Resumen del contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxycinnámicos totales y la actividad antioxidante en extractos etanólicos de trece especies de *Mentheae*.

Muestra	Fenoles totales (µg AG/100 µg de extracto etanólico)	Flavonoides Totales (µg Qu/100 µg de extracto etanólico)	Ácidos hidroxycinnámicos totales (µg AR/100 µg de extracto etanólico)	Actividad antioxidante (µg vitamina C/ 100 µg de extracto etanólico)
<i>Lepechinia meyenii</i>	50.00±0.98	10.82±0.55	37.59±2.78	25.79±0.56
<i>Clinopodium brevicalyx</i>	30.14±0.40	12.07±0.13	14.39±0.88	13.69±0.67
<i>Salvia oppositiflorum</i>	7.78±0.73	5.38±0.20	6.61±0.29	8.33±0.11
<i>Lepechinia floribunda</i>	20.77±0.00	3.69±0.07	18.05±0.05	14.11±0.02
<i>Minthostachys mollis</i>	28.87±0.79	8.18±0.19	7.51±0.08	17.28±0.25
<i>Salvia sagittata</i>	34.76±0.42	11.28±0.14	21.45±1.54	20.21±0.53
<i>Salvia cuspidata</i>	21.60±0.31	14.29±0.82	8.03±0.04	10.08±0.07
<i>Clinopodium revolutum</i>	16.12±0.33	3.18±0.46	12.00±0.37	14.70±0.07
<i>Clinopodium sericeum</i>	34.05±0.47	11.36±0.46	24.31±0.00	13.31±0.34
<i>Salvia haenkei</i>	8.21±0.06	3.77±0.38	n.d.	18.03±0.10
<i>Salvia dombeyi</i>	6.45±0.12	7.26±0.33	n.d.	11.71±0.16
<i>Hedeoma mandoniana</i>	14.15±0.25	4.74±0.00	12.84±1.18	10.00±0.10
<i>Clinopodium pulchellum</i>	16.08±0.14	5.48±0.23	9.04±0.58	9.87±0.14

Los valores mostrados representan el promedio de tres repeticiones.

La muestra 1, *Lepechinia meyenii*, es claramente la muestra con mayor contenido de fenoles totales, ácidos hidroxycinnámicos totales y mayor actividad antioxidante. Por el contrario, la muestra 3, *Salvia oppositiflora*, es la de menor capacidad antioxidante con un contenido muy

bajo de fenoles totales y ácidos hidroxycinnámicos totales. El *ranking* general para fenoles totales es $Lm > Ss > Cs > Cb > Mm > Sc > Lf > Cr > Cp > Hm > Sh > So > Sd$. Mientras que con la capacidad antioxidante es $Lm > Ss > Sh > Mm > Cr > Lf > Cb > Cs > Sd > Sc > Hm > Cp > So$.

Los flavonoides totales tienen como figura:

$Sc > Cb > Cs > Ss > Lm > Mm > Sd > Cp > Hm > Sh > So > Lf > Cr$ y los ácidos hidroxycinnámicos totales, $Lm > Cs > Ss > Lf > Cb > Hm > Cr > Cp > Sc > Mm > So$.

La expresión de resultados como μg de ácido gálico/ $100 \mu\text{g}$ de extracto seco, μg de quercetina/ $100 \mu\text{g}$ de extracto seco, μg de AR/ $100 \mu\text{g}$ de extracto seco y la capacidad antioxidante total como μg de ácido ascórbico/ $100 \mu\text{g}$ de extracto seco se muestra particularmente adecuada. Algunos autores, por ejemplo, Bahadori *et al.* (2018), prefieren expresar la capacidad antioxidante total como milimoles de equivalentes Trolox/ g extracto. En la determinación de la capacidad antioxidante total, el método del azul de molibdeno empleado se basa en la reducción de un fosfocomplejo de Mo(VI) a Mo(V) azul, es de fácil ejecución y con reactivos relativamente fáciles de conseguir y sus resultados de fácil interpretación, por ejemplo, “ $100 \mu\text{g}$ de extracto de *Salvia sagittata* tienen una capacidad antioxidante tanto como $20.21 \mu\text{g}$ de vitamina C”. De hecho, hay otras metodologías, las que emplean DPPH y ABTS, las más difundidas. Pero en realidad no hay un procedimiento estándar para determinar la actividad antioxidante en todas las matrices y así los resultados que se publican son de difícil comparación (Carocho *et al.* 2013).

4.2. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LAS TRECE DE MENTHEAE

Los resultados aparecen en la Tabla 9. Los contenidos de ácido rosmarínico en las trece muestras, $Lm > Lf > Ss > Cb > Mm = Sc > Cs > So > Cr > Sh > Hm > Cp > Sd$. La planta con mayor contenido en ácido rosmarínico es *Lepechinia meyenii* y en *Salvia dombeyi* no se detectó.

Tabla 9: Contenido de ácido rosmarínico en trece especies de *Mentheae* utilizando etanol como extractante

Muestra	% AR (g AR/100 g planta)
<i>Lepechinia meyenii</i>	4.61±0.06
<i>Clinopodium brevicalyx</i>	1.12±0.02
<i>Salvia oppositiflora</i>	0.65±0.00
<i>Lepechinia floribunda</i>	1.43±0.01
<i>Minthostachys mollis</i>	0.91±0.02
<i>Salvia sagittata</i>	1.42±0.03
<i>Salvia cuspidata</i>	0.91±0.02
<i>Clinopodium revolutum</i>	0.63±0.01
<i>Clinopodium sericeum</i>	0.81±0.02
<i>Salvia haenkei</i>	0.54±0.01
<i>Salvia dombeyi</i>	No detectado
<i>Hedeoma mandoniana</i>	0.33±0.02
<i>Clinopodium pulchellum</i>	0.19±0.01

Los valores mostrados representan el promedio de tres repeticiones

Los cromatogramas de este análisis se aprecian en la Figura 45. Los contenidos de ácido rosmarínico en las trece especies de *Mentheae*, están en rangos parecidos a los que se ve en especies de origen europeo o asiático (Ngo *et al.* 2018). Las mejores especies que se muestran en dicha referencia son las semillas de comino, *Cuminum cyminum*; las *Mentheae* *Dracocephalum moldávica*, *Melissa officinalis* y la *Ocimeae* (*Nepetoideae*), *Ortosiphon stamineus*. Sin embargo, se advierte, como veremos más adelante, que el etanol puro no es el mejor extractante de ácido rosmarínico. De manera que la valoración, comparación y discusión se realizará con los resultados de porcentajes de ácido rosmarínico obtenidos con etanol al 20% (sección 4.5).

Cabe señalar que el análisis UHPLC/ MSMS se realizó con los extractos de etanol al 96%.

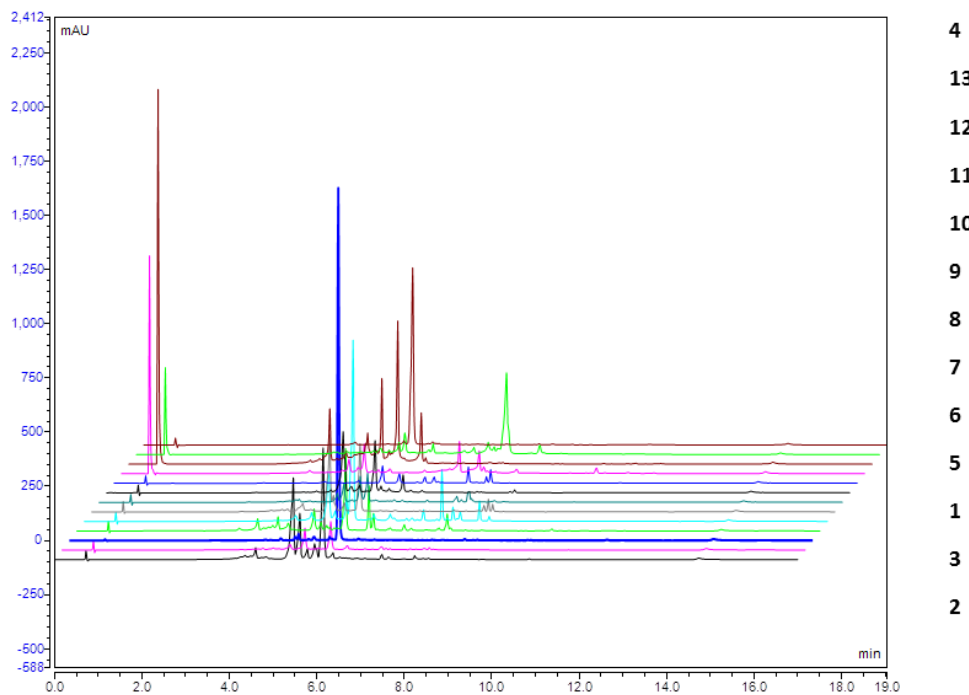


Figura 45: Cromatogramas de la cuantificación de ácido rosmarínico en los extractos etanólicos de *Menthae* a 330 nm. Resaltado en azul, el cromatograma de *Lepechinia meyenii* (muestra 1).

Es pertinente mencionar los errores comunes en el análisis cualitativo y cuantitativo cuando se hacen análisis HPLC (Kellogg *et al.* 2019):

- Asumir que las intensidades relativas de los picos en un cromatograma representan las concentraciones relativas en la muestra.
- Intentar cuantificar analitos sin utilizar estándares de referencia.
- Asumir que la ausencia de un constituyente en los datos significa la ausencia del compuesto en la muestra.
- Sobrevalorar la precisión de los resultados de concentración obtenidos. La “concentración absoluta” es difícil de lograr.
- Asumir confirmación de identidad con datos de espectrometría de masas. Esto es cuando se trata con estereoisómeros que deben trabajarse por RMN.
- Extrapolar resultados más allá del rango lineal de la curva de calibración.
- No tomar en cuenta la interferencia que ocasiona la matriz vegetal.
- Asumir que la muestra es pura solo con datos HPLC-UV. Trabajar a diferentes longitudes de onda o utilizar RMN cuantitativo.
- Asumir que cada pico del cromatograma HPLC-UV representa un solo compuesto.
- Asumir que cada pico del espectro de masa representa un ion diferente.

Todo esto se ha considerado, tanto para la cuantificación de **AR** como para los ácidos triterpénicos (**AT = AO + AU**). Pero además algunos de estos “10 mandamientos” se aplicaron en el análisis cualitativo de las muestras por UHPLC/ MSMS.

4.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS TRITERPÉNICOS EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE TRECE ESPECIES DE *MENTHEAE*

La planta con mayor contenido en los ácidos oleanólico y ursólico es *Clinopodium revolutum* y la de menor contenido es *Lepechinia floribunda*.

Para todas las muestras, el orden de abundancia en ácidos triterpénicos es: *Cr*>*Cs*>*Ss*>*Sc*>*Sh*>*Mm*>*Cp*>*Hm*>*Sd*>*Lm*>*So*>*Cb*>*Lf*. Los resultados aparecen en la Tabla 10. Asimismo, algunos cromatogramas aparecen en la Figura 46. Hay que notar que para

algunas muestras (*Minthostachys mollis*, por ejemplo) el contenido en ácidos triterpénicos, resultan pequeños en comparación con los picos de mayor polaridad. Esto no dificulta la cuantificación, pero en una imagen completa del cromatograma, los picos de los ácidos triterpénicos, no se notan.

Tabla 10: Contenido porcentual de ácido oleanólico y ácido ursólico en las trece especies peruanas de *Mentheae*.

Muestra	% AO	%AU	%AO +%AU
<i>Lepechinia meyenii</i>	0.50±0.06	0.79±0.01	1.29
<i>Clinopodium brevicalyx</i>	0.38±0.00	0.77±0.00	1.15
<i>Salvia oppositiflora</i>	0.64±0.00	0.58±0.01	1.22
<i>Lepechinia floribunda</i>	0.31±0.00	0.53±0.00	0.84
<i>Minthostachys mollis</i>	1.11±0.03	1.76±0.04	2.87
<i>Salvia sagittata</i>	1.35±0.03	1.97±0.07	3.31
<i>Salvia cuspidata</i>	1.70±0.04	1.42±0.03	3.12
<i>Clinopodium revolutum</i>	2.55±0.05	4.81±0.10	7.36
<i>Clinopodium sericeum</i>	1.91±0.04	3.34±0.01	5.26
<i>Salvia haenkei</i>	1.16±0.00	1.95±0.01	3.11
<i>Salvia dombeyi</i>	0.71±0.01	1.18±0.02	1.88
<i>Hedeoma mandoniana</i>	0.75±0.01	1.33±0.01	2.07
<i>Clinopodium pulchellum</i>	1.07±0.04	1.58±0.02	2.65

Los valores presentados representan el promedio de tres repeticiones.

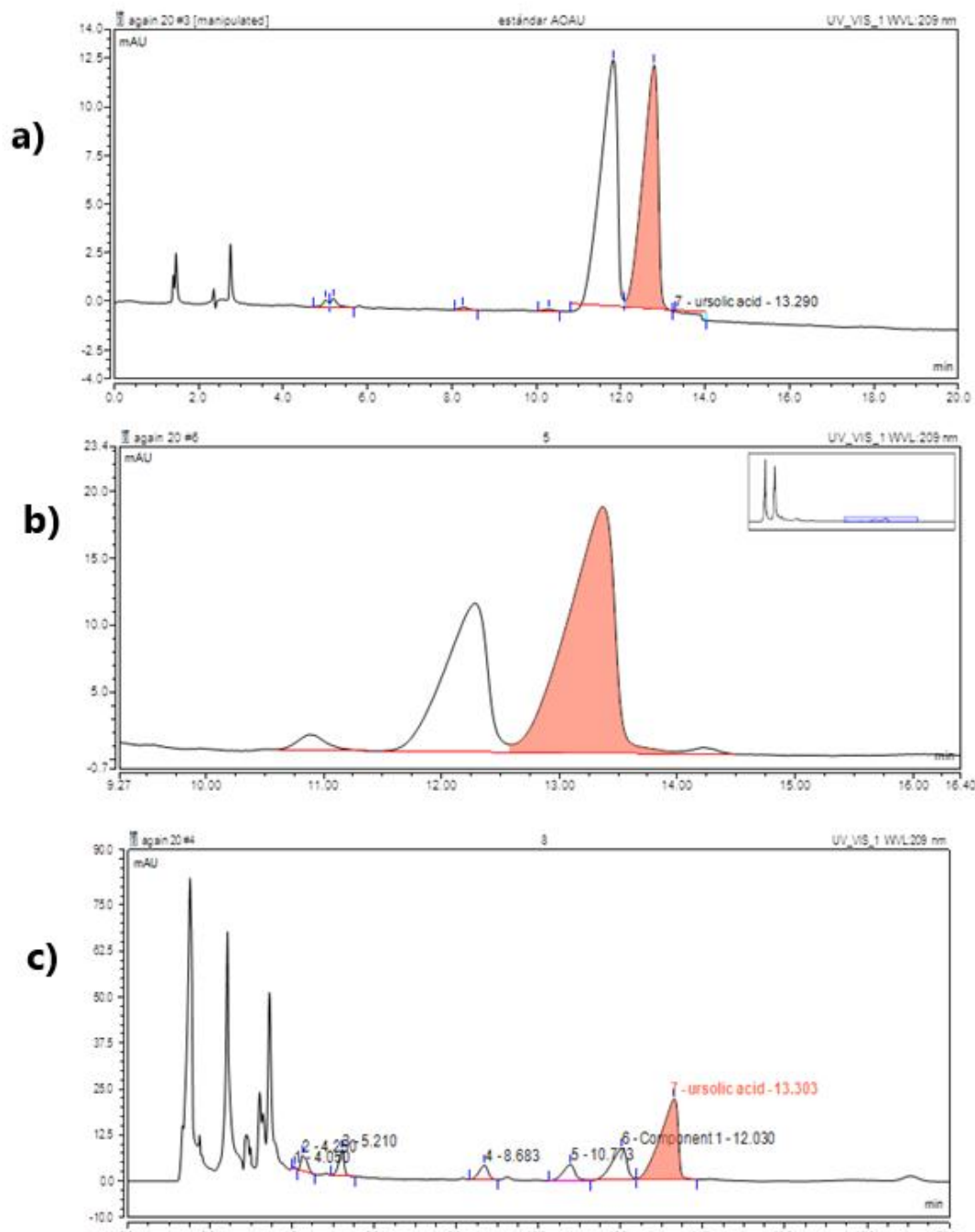


Figura 46: Cromatogramas de ácidos triterpénicos. a) Cromatograma correspondiente una mezcla de estándares de AO y AU a una concentración de 1 mg/mL (AO izquierda, AU derecha), b) cromatograma de *Minthostachys mollis* (notar el zoom) y c) cromatograma de *Clinopodium revolutum*.

Debido a que *C. revolutum* tuvo un mayor contenido en ácidos triterpénicos, se utilizó esta muestra para la obtención de ácido ursólico. En el trabajo de (Jager *et al.*(2009), se analizan 39 especies y el contenido más alto en dicho ácido corresponde a *Rosmarinus officinalis* “romero” (1.8 %). Comparado a ello, *C. revolutum* contiene casi el triple de ácido ursólico. Sin embargo, es una especie silvestre y muchísimo mas rara que el romero.

4.4. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO A PARTIR DE *LEPECHINIA MEYENII*

Se trabajó en base a un diseño Box-Behnken utilizando (quince experimentos) x 2 con 200 mg de planta seca y molida. Las variables consideradas fueron: concentración de etanol, temperatura y la proporción solvente/muestra, según la Tabla 11.

Tabla 11: Variables en Diseño Box–Behnken para extraer ácido rosmarínico a partir de *Lepechinia meyenii*

factor	bajo	medio	alto
% Etanol	20	40	60
Temperatura, °C	40	50	60
Proporción solvente/muestra	10	15	20

El tiempo de extracción se mantuvo constante en todos los casos a 10 minutos. La respuesta evaluada fue el rendimiento en ácido rosmarínico en mg AR/ g planta. Los resultados experimentales se procesaron utilizando el software Statgraphics Centurion 17 en base al diseño presentado en la Tabla 12.

Tabla 12: Diseño Box Behnken para la optimización de la extracción de ácido rosmarínico en *L. meyenii*.

Experimento	% etanol	°C	Proporción solvente/muestra	Rendimiento mg AR/g planta
1	20	40	15	44.55
2	60	40	15	13.47
3	20	60	15	48.70
4	60	60	15	0.48
5	20	50	10	44.46
6	60	50	10	10.31
7	20	50	20	49.02
8	60	50	20	5.45
9	40	40	10	12.00
10	40	60	10	14.24
11	40	40	20	12.68
12	40	60	20	3.97
13	40	50	15	12.73
14	40	50	15	7.43
15	40	50	15	4.49
1	20	40	15	41.28
2	60	40	15	15.43
3	20	60	15	41.68
4	60	60	15	1.06
5	20	50	10	45.59
6	60	50	10	9.88
7	20	50	20	44.34
8	60	50	20	7.10
9	40	40	10	13.51
10	40	60	10	17.62
11	40	40	20	17.37
12	40	60	20	6.70
13	40	50	15	10.82
14	40	50	15	6.53
15	40	50	15	5.12

Así, las condiciones optimizadas para un evento de extracción de 10 minutos fueron:

[etanol], A : 20.1%

Temperatura, B : 60.0°C

Relación solvente/muestra, C: 10.0

Rendimiento optimizado en AR (mg AR/g planta), D: 52.2

Generando el siguiente polinomio, $D = 85.3644 - 2.80139A + 0.149542B + 0.045375C + 0.0407161 A^2 - 0.0232125AB - 0.0136875AC + 0.0152771B^2 - 0.0643BC + 0.115158 C^2$.

$R^2 = 98.2899$

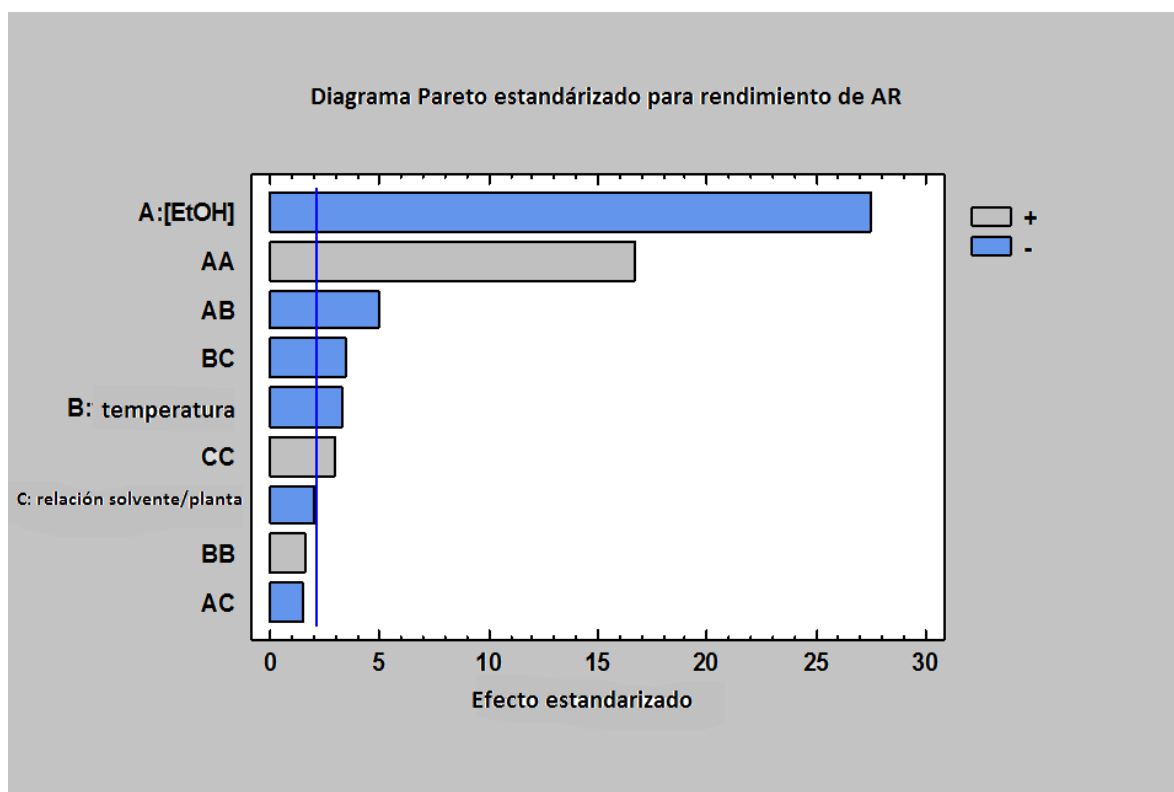


Figura 47: Diagrama de Pareto mostrando los efectos principales, concentración de etanol, temperatura y relación solvente/muestra en la extracción de ácido rosmarínico a partir de *Lepechinia meyenii*.

De acuerdo a la Figura 47 se ve que la concentración de etanol es el factor más importante en la optimización de la extracción del ácido rosmarínico, mientras que la relación solvente/muestra es de menor importancia en el proceso planteado.

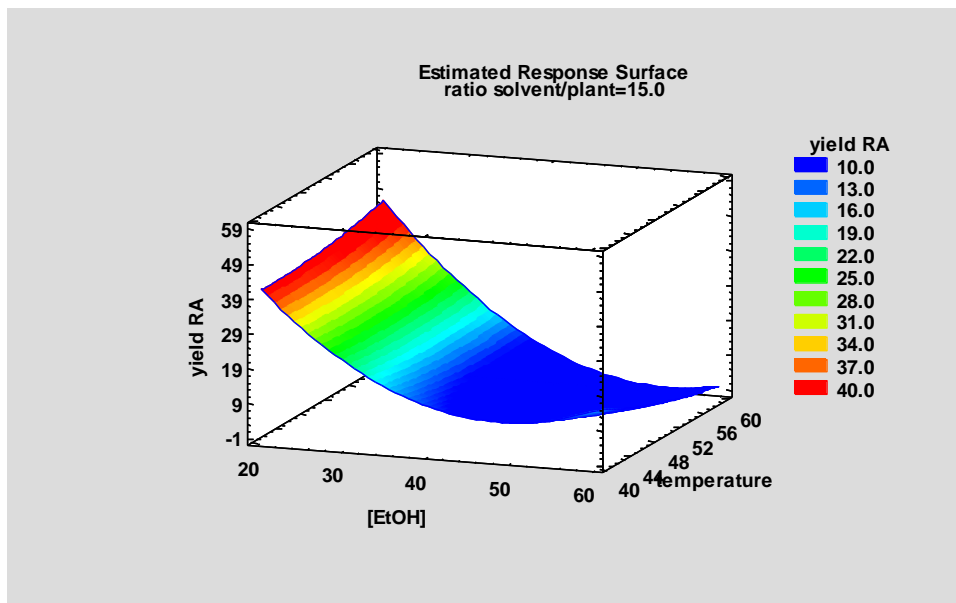


Figura 48: Gráfico de superficie - respuesta para la extracción de AR con mezclas hidroetanólicas.

Las condiciones óptimas obtenidas corresponden a 20% de etanol, 60°C de temperatura y una relación solvente/muestra de 10 (Figura 48).

Luego de encontrar el mejor solvente, temperatura y relación solvente/muestra, se investigó el número de eventos necesarios para extraer la totalidad del AR de *Lepechini meyenii* (1000 mg de planta + 10 mL de Etanol al 20% a 60°C por 10 minutos). Los resultados se muestran en la Tabla 13 y Figura 49.

Tabla 13: Rendimiento de extracción (mg) de ácido rosmarínico según el número de extracciones en *Lepechinia meyenii*.

Número de extracciones	mg de AR extraídos
1	29.55 ± 0.5
2	63.1 ± 0.6
3	79.1 ± 0.5
4	80 ± 1.0
5	79.5 ± 0.9

Los valores son el promedio de tres repeticiones

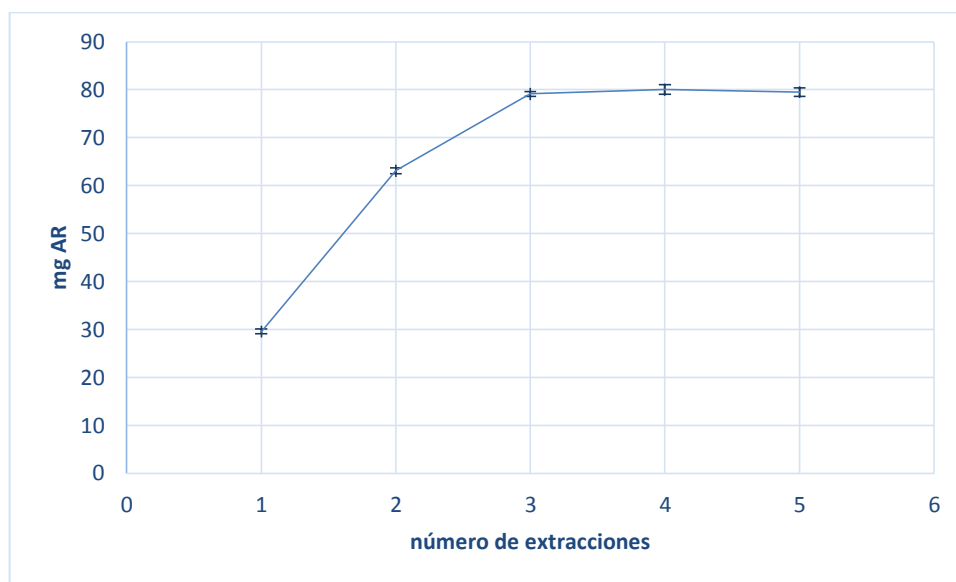


Figura 49: Recuperación de ácido rosmarínico a partir de *Lepechinia meyenii* mostrando que mediante 3 extracciones de 10 minutos a 60°C con etanol al 20% extraerán la “totalidad” del ácido rosmarínico.

De acuerdo a los resultados se aprecia que el porcentaje de ácido rosmarínico en el lote de planta utilizado “Pumahuanca”, es de aproximadamente 8 %.

Es interesante notar que si bien la molécula de ácido rosmarínico es soluble en etanol e insoluble en agua (Jacotet *et al.* 2018), la mayor extractabilidad se da en etanol al 20%. Esto se debe a que la solubilidad no es lo mismo que extractabilidad. La solubilidad es la máxima cantidad de soluto que puede disolverse en un solvente a determinada temperatura. En cambio la extractabilidad es un fenómeno que depende de la difusión del solvente por las partículas de vegetal, de la desorción del ácido rosmarínico de la matriz vegetal por afinidad química con el solvente y de la transferencia de masa del ácido rosmarínico hacia el solvente. Así, el clásico principio de alquimia “lo semejante disuelve lo semejante” no puede traducirse a “lo semejante extrae lo semejante”. En este caso, la mayoría de polifenoles acumulados en la vacuola celular no serían alcanzados por el etanol puro porque éste, al desnaturalizar proteínas forma barreras físicas que se lo impiden. Esto no sucede con mezclas hidroalcohólicas que son ricas en agua. La extracción no es simplemente solubilización, la histolocalización del ácido rosmarínico influye mucho en la extracción. En el trabajo de Jacotet *et al.* (2018) el mejor extractante de ácido rosmarínico a partir de *Rosmarinus officinalis* es el metanol al 30%. Mientras que en otro trabajo, Yoo *et al.* (2018) reportan metanol al 30%, a 81°C y la relación solvente/planta 30, como el mejor extractante de ácido rosmarínico en hojas de *Melissa officinalis* L. Entonces el sistema extractante optimizado con etanol al 20% en *Lepechinia meyenii* es concordante a esos dos resultados.

4.5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EN TRECE *MENTHEAE* EN LOS EXTRACTOS EN ETANOL AL 20%

Se determinó que el etanol al 20% es el mejor extractante del ácido rosmarínico en *Lepechinia meyenii*. Aunque, este resultado no necesariamente es aplicable a otras especies, sin embargo, se utilizó esta concentración de alcohol para medir el contenido de ácido rosmarínico en las trece especies de *Menthae*. Los resultados aparecen en la Tabla 14.

Tabla 14: Contenido de ácido rosmarínico en trece especies de *Menthae* utilizando etanol al 20% como extractante.

Muestra	% de extracto	% AR promedio
<i>Lepechinia meyenii</i>	33.80±0.22	8.12±0.77
<i>Clinopodium brevicalyx</i>	36.20±0.40	2.16±0.05
<i>Salvia oppositiflora</i>	23.81±0.23	0.94±0.01
<i>Lepechinia floribunda</i>	20.20±0.50	2.51±0.08
<i>Minthostachys mollis</i>	18.32±0.65	0.85±0.02
<i>Salvia sagittata</i>	23.67±0.12	1.86±0.08
<i>Salvia cuspidata</i>	34.32±0.20	1.30±0.07
<i>Clinopodium revolutum</i>	16.63±0.09	1.04±0.01
<i>Clinopodium sericeum</i>	26.01±0.09	1.37±0.04
<i>Salvia haenkei</i>	21.15±0.50	0.88±0.01
<i>Salvia dombeyi</i>	20.58±0.42	No detectado
<i>Hedeoma mandoniana</i>	14.36±0.11	0.29±0.01
<i>Clinopodium pulchellum</i>	11.86±0.12	0.30±0.01

Los valores representan el promedio de tres repeticiones.

De acuerdo a los resultados, se observa que contenido de AR en las 13 especies de *Menthae* varía de mayor a menor concentración en el siguiente orden: *Lm*>*Lf*>*Cb*>*Ss*>*Cs*>*Sc*>*Cr*>*So*>*Sh*>*Mm*>*Cp*>*Hm*. En casi todos los casos el contenido de ácido rosmarínico es mayor respecto a los extractos hechos con alcohol puro. El 8.12% de ácido rosmarínico en *L. meyenii* es un gran valor pero no como el 28% reportado para *Melissa officinalis* por (Peev *et al.* 2008). Esta referencia es la más alta, de acuerdo a la revisión hecha por Ngo *et al.* (2018). Para las 13 especies de *Menthae* estudiadas no hay reportes en la literatura, excepto aquellos reportados para *L. meyenii* (2.5%), *C. revolutum* (0.64%) y *C. sericeum* (0.56 %) por Serrano *et al.* (2012 y 2016). Además, hay que notar que en el caso de

S. dombeyi no se ha podido detectar ácido rosmarínico ni en los extractos etanólicos ni en los extractos de etanol al 20%.

Los cromatogramas de los extractos en EtOH al 20% aparecen en la Figura 50.

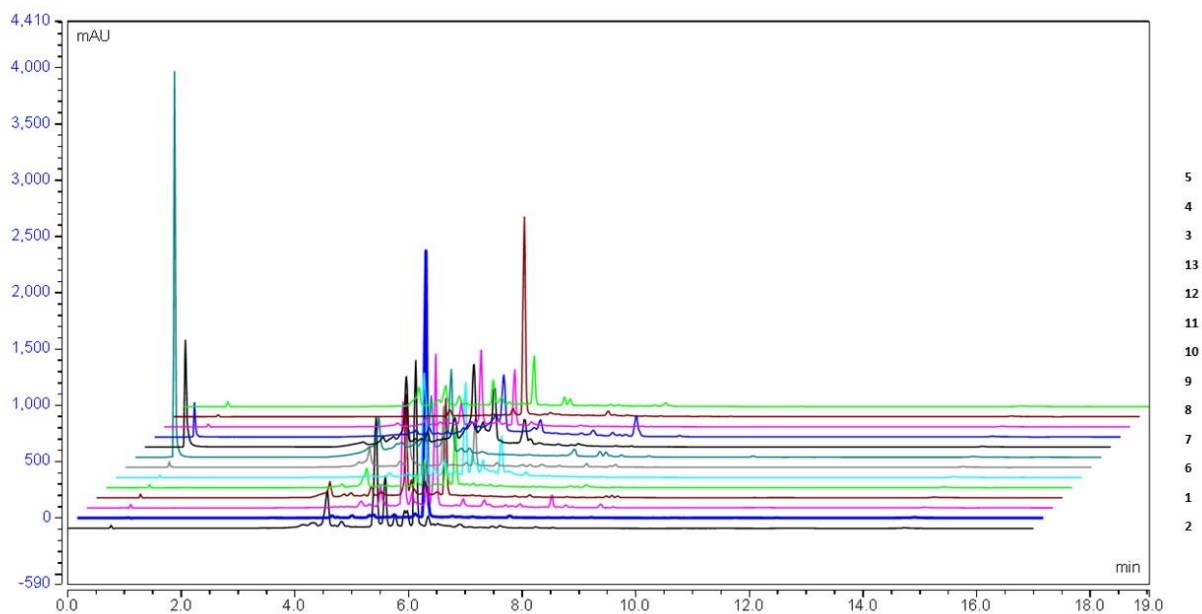


Figura 50: Cromatogramas de extractos etanólicos al 20% de las trece especies peruanas de *Mentheae* a 330 nm.

El cromatograma de *Lepechinia meyenii* está resaltado en azul. El pico más alto corresponde a AR.

La relación entre los contenidos de ácido rosmarínico con el contenido de ácidos triterpénicos se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Relación de los contenidos de ácido rosmarínico y ácidos triterpénicos en las trece especies peruanas de *Mentheae*.

Muestra	% AO	%AU	%AO + % AU	% AR	(%AO+%AU)/%AR
<i>Lepechinia meyenii</i>	0.50	0.79	1.28	8.12	0.16
<i>Clinopodium brevicalyx</i>	0.38	0.77	1.15	2.16	0.53
<i>Salvia oppositiflora</i>	0.64	0.58	1.22	0.94	1.30
<i>Lepechinia floribunda</i>	0.31	0.53	0.84	2.51	0.34
<i>Minthostachys mollis</i>	1.11	1.76	2.87	0.85	3.38
<i>Salvia sagittata</i>	1.35	1.97	3.31	1.86	1.78
<i>Salvia cuspidata</i>	1.70	1.42	3.12	1.3	2.40
<i>Clinopodium revolutum</i>	2.55	4.81	7.36	1.04	7.07
<i>Clinopodium sericeum</i>	1.91	3.34	5.26	1.37	3.84
<i>Salvia haenkei</i>	1.16	1.95	3.11	0.88	3.53
<i>Salvia dombeyi</i>	0.71	1.18	1.88	n.d.	n.d.
<i>Hedeoma mandoniana</i>	0.75	1.33	2.07	0.29	7.15
<i>Clinopodium pulchellum</i>	1.07	1.58	2.65	0.3	8.84

%AT = %AO + % AU.

La Figura 51 muestra la proporción entre el contenido de ácido rosmarínico y ácidos triterpénicos en las trece especies de *Mentheae* estudiadas.

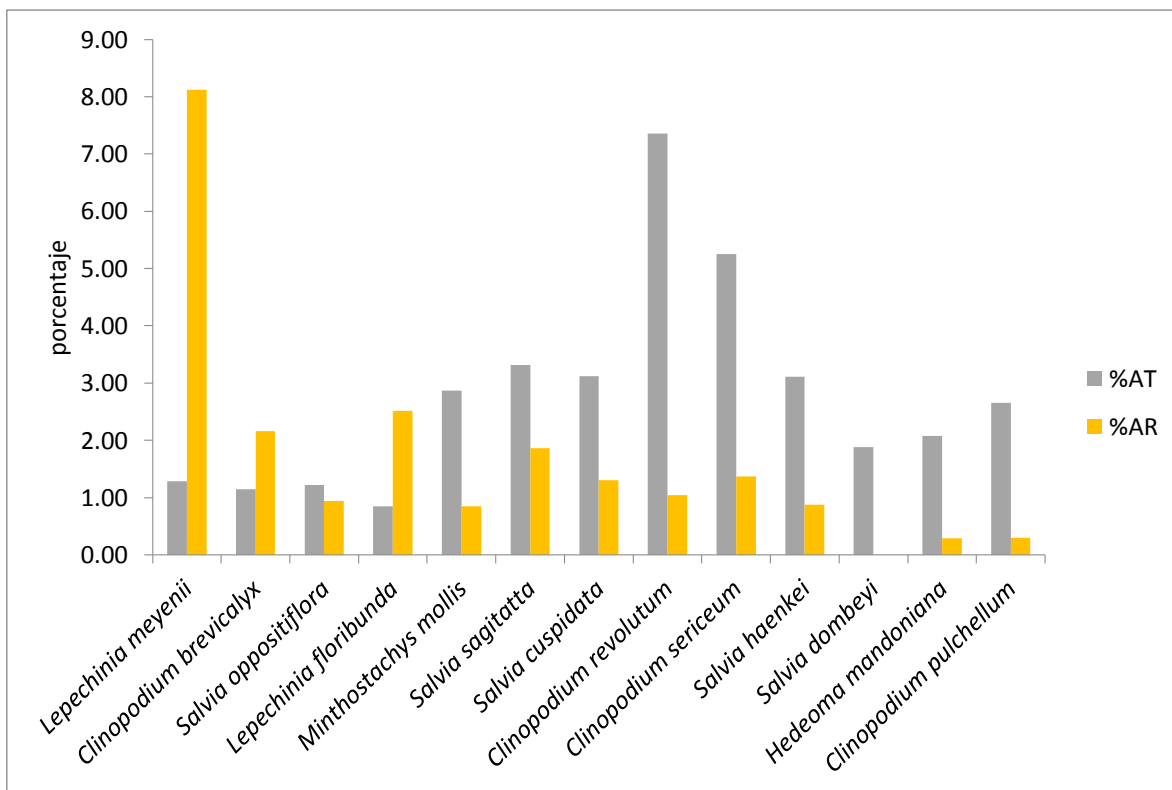


Figura 51: Contenido de ácidos triterpénicos y de ácido rosmarínico en las trece especies de *Menthae* estudiadas.

En general, se observa la figura de que a mayor contenido de ácido rosmarínico, menor contenido de ácidos triterpénicos y viceversa. Al revisar la literatura no se ha encontrado un trabajo que relacione el contenido de ácido rosmarínico con el contenido de ácidos triterpénicos en *Salvias* o en *Menthaes*. Es probable que sea la primera vez que se muestra esta tendencia.

4.6. PERFIL DE METABOLITOS EN TRECE ESPECIES DE *MENTHEAE* POR UHPLC-ESI-MSMS

Todos los cromatogramas de las trece especies de *Menthae* se muestran en el Anexo 4. La identificación de los componentes mediante UHPLC-ESI-MSMS se muestran en las Tablas 16 a 28. La Tabla 29 resume la presencia de metabolitos en las especies estudiadas con especial mención a su fragmentografía MS/MS. El Anexo 5 muestra a más detalle las fragmentaciones inventariadas o planteadas.

Tabla 16: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Lepechinia meyenii*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido quínico	1.33	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0559	1.57	127.0394
2	Isómero del ácido quínico	1.44	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0560	2.09	127.8695
3	Ácido 3,4-dihidroxifenil láctico “danshensu”	4.05	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	197.0454	2.02	135.0446, 179.0346, 123.0445
4	Aldehído protocatechuico	7.73	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.0239	0	108.0207, 136.0162

<<Continuación>>

5	Ácido cafeico	9.64	C ₉ H ₇ O ₄	179.0345	179.0348	1.67	135.0446, 161.0446
6	Glucósido del ácido tuberónico	9.86	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	387.1655	387.1665	2.58	225.8972, 207.1028, 163.0033
7	Acido salviánico C	10.20	C ₁₈ H ₁₇ O ₉	377.0873	377.0882	2.4	359.0776, 197.0453, 347. 1712, 137.0239
8	Ácido salviánico C malonato	10.47	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0877	463.0885	1.7	267.0511, 377.0882, 359.0775
9	Luteolin-O-hexósido	11.02	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0928	447.0936	1.78	285.0406
10	Ácido clerodendranoico H	11.58	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1612	719.1600	1.67	359.0775, 179.0345, 197.0453, 161.0240, 135.0445, 539.1186, 522.1346

<<Continuación>>

11	Ácido dihidrorosmarínico	11.75	C ₁₈ H ₁₇ O ₈	361.0924	361.0932	2.22	197.0453, 165.0553
12	Acido sagerínico	11.92	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1612	719.1600	1.67	359.0775, 179.0346, 161.0240, 539.1192
13	Ácido rosmarínico	12.04	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0775	2.23	161.0240, 179.0345, 197.0452
14	Ácido cafeoil-(4'- hidroxifenil)-láctico "ácido isorínico"	12.95	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343.0818	343.0827	2.62	327.2181, 161.0241
15	Etil ester del ácido cafeico	14.66	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	207.0658	207.0661	1.44	179.0347
16	Acido salvianólico F	15.45	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0712	313.0720	2.6	269.0816, 159.0657
17	Rosmarinato de etilo	17.23	C ₂₀ H ₁₉ O ₈	387.1080	387.1088	2.07	359.0777, 206.9724, 179.0344
18	Rosmanol	19.34	C ₂₀ H ₂₅ O ₅	345.1702	345.1711	2.61	283.1704, 301.1809

<<Continuación>>

19	Isómero del rosmanol	19.78	C ₂₀ H ₂₅ O ₅	345.1702	345.1710	2.32	283.1703
20	Sageona	20.10	C ₁₉ H ₂₃ O ₃	299.1647	299.1655	2.67	283.1334, 281.1550, 269.1547, 257.1184, 256.1105, 241.7579, 229.0861
21	Isómero del rosmanol	20.22	C ₂₀ H ₂₅ O ₅	345.1702	345.1710	2.32	283.1703
22	Ácido hidroxycarnósico	20.52	C ₂₀ H ₂₇ O ₅	347.1859	347.1866	2.02	302.1844
23	Isómero del rosmanol	20.79	C ₂₀ H ₂₅ O ₅	345.1702	345.1710	2.32	283.1707
24	Oxorosmanol	20.94	C ₂₀ H ₂₃ O ₆	359.1495	359.1503	1.39	315.1607
25	Oxorosmanol isómero	21.21	C ₂₀ H ₂₃ O ₆	359.1495	359.1503	1.39	315.1606
26	Hidroxirosmanol	21.44	C ₂₀ H ₂₅ O ₆	361.1651	361.1659	2.22	317.1760
27	Dehidrorosmanol	21.76	C ₂₀ H ₂₃ O ₅	343.1546	343.1553	2.04	299.1650
28	Sageona isómero	21.91	C ₁₉ H ₂₃ O ₃	299.1647	299.1652	1.67	256.1107
29	Metilrosmanol	22.03	C ₂₁ H ₂₇ O ₅	359.1859	359.1867	2.23	345.1711

<<Continuación>>

30	Carnosol	22.20	C ₂₀ H ₂₅ O ₄	329.1752	329.1761	2.7	285.1861
31	Carnosol isómero	22.46	C ₂₀ H ₂₅ O ₄	329.1752	329.1760	2.43	285.1861
32	Dehidrorosmanol isómero	22.66	C ₂₀ H ₂₃ O ₅	343.1546	343.1554	2.33	299.1653
33	Etilrosmanol	22.93	C ₂₂ H ₂₉ O ₅	373.2014	373.2022	2.14	329.1761
34	Ácido carnósico	23.93	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	331.1910	331.1917	2.11	244.1466, 287.2017
35	7-O-acetilhorminona	24.04	C ₂₂ H ₂₉ O ₅	373.2015	373.2022	1.88	330.1802
36	Salvinina o isómero	25.68	C ₂₀ H ₂₉ O ₃	317.2117	317.2125	2.52	287.2012
37	Salvinina o isómero	27.68	C ₂₀ H ₂₉ O ₃	317.2117	317.2124	2.21	287.2013

Tabla 17: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Clinopodium brevicalyx*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido quínico	1.32	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0559	1.57	127.0395

<<Continuación>>

2	Isómero del ácido quínico	1.45	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0559	1.57	127.8695
3	Ácido 3,4-dihidroxifenil láctico "danshensu"	4.02	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	197.0453	1.52	123.0445, 135.0446, 179.0346
4	Aldehído protocatechuico	7.74	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.0239	0	109.0287, 136.0162
5	Ácido cafeoilquínico	9.42	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0881	2.27	179.0345, 191.0557
6	Ácido eucómico	9.54	C ₁₁ H ₁₁ O ₆	239.0556	239.0561	2.09	195.0660, 178.0586
7	Luteolin-7-O-rutinósido	10.79	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	593.1507	593.1508	0.17	285.0403, 447.0934
8	Luteolin-O-hexósido	11.05	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0928	447.0935	1.57	285.0407
9	Naringenin-7-O-Glc-Rha	11.33	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	579.1714	579.1714	0	271.0612, 235.0611 151.0030
10	Hesperidina (hesperetin-7-O-rutinósido)	11.64	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	609.1820	609.1819	0.16	301.0718

<<Continuación>>

11	Ácido rosmarínico	12.11	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0755	3.34	161.0240, 179.0343, 197.0452
12	Acido salvianólico B	12.53	C ₃₆ H ₂₉ O ₁₆	717.1456	717.1443	1.81	295.0611, 321.0408, 339.0512, 493.1137, 519.0930, 537.1024
13	Ácido cafeoil-4'- hidroxifeniláctico "ácido isorínico"	13.0	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343.0818	343.0827	2.62	327.2178, 161.0240
14	Eriodictiol	13.60	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.0556	287.0563	2.44	135.0446, 151.0030
15	Luteolina	13.62	C ₁₅ H ₉ O ₆	285.0399	285.0408	3.16	133.0289, 151.0032
16	Etil ester del ácido cafeico	14.70	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	207.0658	207.0661	1.44	179.0346

<<Continuación>>

17	Quercetin dimetiléter	15.49	C ₁₇ H ₁₃ O ₇	329.0662	329.0669	2.13	314.0432, 299.0196
18	Ácido trihidroxilinoleico	16.05	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	327.2172	327.2180	2.44	269.0456
19	Rosmarinato de etilo	17.26	C ₂₀ H ₁₉ O ₈	387.1080	387.1088	2.07	359.0781, 206.9725, 179.0345
20	Ácido sanleng (ácido 6,9,10-trihidroxi-7-octodecenoico)	18.13	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	329.2328	329.2336	2.43	171.0195, 224.7632, 250.1448
21	Trihidroxi-trimetoxiflavona	18.73	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0766	0.28	344.0546, 329.0299, 314.2232, 301.6655
22	Eupatorina	20.02	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343.0818	343.0826	2.33	313.0355, 298.0128, 269.7467, 257.8196, 257.8196, 215.0097, 328.0593, 147.1741, 132.8673

Tabla 18: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Salvia oppositiflora*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido quínico	1.31	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0560	2.09	127.0396
2	Ácido cítrico	1.77	C ₆ H ₇ O ₇	191.0192	191.0196	2.09	111.0081
3	Ácido succínico	1.98	C ₄ H ₅ O ₄	177.0188	117.0187	0.85	
4	Ácido 3,4-dihidroxifenil láctico “danshensu”	4.02	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	197.0455	2.54	123.0446, 135.0447, 179.0348
5	Aldehído protocatechuico	7.70	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.0240	0.73	108.0208, 136.0162
6	Acido hidroxihéptandioico	8.78	C ₇ H ₁₁ O ₅	175.0607	175.0611	2.28	
7	Ácido cafeico -O-hexósido	9.02	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	341.0873	341.0883	2.93	179.0347, 251.0564, 233.0458, 281.0670
8	Ácido cafeoilquínico	9.41	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0883	2.83	135.0446, 173.0452, 197.0816
9	Ácido cafeico	9.62	C ₉ H ₇ O ₄	179.0345	179.0349	2.23	135.0447

<<Continuación>>

10	Hexósido del ácido tuberónico	9.86	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	387.1655	387.1667	3.4	225.1129, 207.0297, 163.0398
11	Ácido 4-p-coumaroilquínico	10.10	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	337.0924	337.0934	2.97	118.9653, 163.0397, 173.0454, 191.0557
12	Quercetin-3-O-hexósido	11.02	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0877	463.0886	1.94	301.0358
13	Quercetin-3-O-glucurónido	11.09	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	477.0669	477.0679	2.10	301.0356
14	Luteolin-7-O-glucurónido	11.56	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂	461.0720	461.0729	1.95	285.0407, 151.0395, 133.0290
15	Ácido dimetilrosmarínico	11.67	C ₂₀ H ₁₉ O ₈	387.1080	387.1091	2.84	179.0347, 135.0447, 161.0452, 207.0661, 359.0781
16	Isorhamnetin-3-O-glucurónido	11.70	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₃	491.0826	491.0834	1.62	315.0517, 177.0190
17	Ácido rosmarínico	12.07	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0777	2.78	161.0241, 179.0346, 197.0453

<<Continuación>>

18	Isorhamnetina	12.48	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.0505	315.0515	3.17	271.1550, 300.0276
19	Dihydrophilonotisflavona	13.64	C ₃₀ H ₁₉ O ₁₂	571.0877	571.0888	0.53	285.0409, 286.0440
20	Tri hidroximetoxiflavona	19.23	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299.0556	299.0565	3.01	151.0397, 179.0346, 284.0327
21	Ácido octanodecenodioico	20.68	C ₁₈ H ₃₁ O ₄	311.2223	311.2232	2.89	310.2107

Tabla 19: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Lepechinia floribunda*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido quínico	1.32	C ₇ H ₁₁ O ₁₆	191.0556	191.0559	1.57	127.0395
2	Isómero del ácido quínico	1.46	C ₇ H ₁₁ O ₁₆	191.0556	191.0560	2.09	127.8696
3	Ácido succínico	1.98	C ₄ H ₅ O ₄	117.0188	117.0188	0	
4	Ácido 3,4-dihidroxifenil láctico “danshensu”	4.02	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	197.0454	2.03	135.0447, 179.0347
5	Ácido protocatechuico	4.64	C ₇ H ₅ O ₄	153.0188	153.0190	1.31	135.0448, 109.0289

<<Continuación>>

6	Aldehído protocatechuico	7.71	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.0240	0.73	109.0287, 136.0161
7	Ácido cafeico	9.63	C ₉ H ₇ O ₄	179.0345	179.0348	1.68	135.0447
8	Glucósido del ácido tuberónico	9.88	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	387.1655	387.1666	2.84	163.0034, 207.0296, 225.0807
9	Ácido salviánico C o isómero	10.48	C ₁₈ H ₁₇ O ₉	377.0873	377.0884	2.92	359.0777, 197.0454, 347.0776, 137.0240
10	Ácido yunnaneico E o isómero	10.54	C ₂₇ H ₂₃ O ₁₄	571.1088	571.1093	0.88	179.0357, 135.0447, 301.0733, 197.0455, 285.0773, 347.0784, 391.0674, 373.0576, 161.0241, 255.0879 330.0707, 527.1198, 197.0453

<<Continuación>>

11	Acido salviánico C malonato	11.05	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0877	463.0887	2.15	301.0354
12	Ácido clerodendranoico H	11.59	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1612	719.1601	1.53	161.0241, 179.0347, 359.0775, 539.1188
13	Ácido sagerínico	11.93	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1612	719.1602	1.39	359.0779, 179.0347, 197.0452, 161.0241, 135.0447, 539.1193, 522.2628, 503.2507, 495.0935, 477.2341, 341.1980, 315.1451, 297.0404
14	Ácido rosmarínico	12.10	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0776	2.51	161.0240, 179.0346, 197.0453
15	Ácido cafeoil-(4'-hidroxifenil)láctico "ácido isorínico"	12.98	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343.0818	343.0829	3.21	313.0726, 327.1448

<<Continuación>>

16	Rosmarinato de metilo	13.28	C ₁₉ H ₁₇ O ₈	373.0924	373.0935	2.95	359.0778, 194.0540, 179.0347
17	Etil ester del ácido cafeico	14.73	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	207.0658	207.0662	2.4	179.0346
18	Ácido salvianólico F	15.53	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0712	313.0721	2.88	269.0821, 159.0448
19	Cafeato de vinilo	17.05	C ₁₁ H ₉ O ₄	205.0501	205.0505	1.95	162.0193
20	Rosmarinato de etilo	17.34	C ₂₀ H ₁₉ O ₈	387.1080	387.1089	2.6	359.0776, 206.9724, 179.0346
21	Ácido salvianólico F isómero	17.58	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0712	313.0721	2.88	269.0821, 159.0448
22	Ácido hidroxycarnósico	18.5	C ₂₀ H ₂₇ O ₅	347.1859	347.1869	2.88	303.1606, 331.1918
23	Ácido hidroxycarnósico isómero	18.92	C ₂₀ H ₂₇ O ₅	347.1859	347.1869	2.88	303.1234, 331.1919
24	Horminona o isómero	19.50	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	331.1910	331.1919	0.30	112.9850, 170.8329, 197.5107, 301.1813, 313.0712, 456.0566, 492.0332

<<Continuación>>

25	Horminona o isómero	20.05	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	331.1910	331.1919	0.30	112.9850, 170.8328, 197.5106, 313.2389, 456.0567, 492.0332
26	Isómero del rosmanol	20.28	C ₂₀ H ₂₅ O ₅	345.1702	345.1712	2.90	283.0616,
27	Horminona o isómero	22.08	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	331.1910	331.1919	0.30	112.9489, 170.8329, 197.5107, 311.2237, 456.0567, 492.0331
28	Acido hidroxycarnósico	22.14	C ₂₀ H ₂₇ O ₅	347.1859	347.1869	2.88	331.1919
29	Ácido carnósico	23.19	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	331.1910	331.1917	2.11	287.2017
30	Hidroxycarnosato de etilo	23.48	C ₂₂ H ₃₁ O ₅	375.2172	375.2182	2.67	347.1869
31	Rosmaridifenol	25.98	C ₂₀ H ₂₇ O ₃	315.1960	315.1969	2.86	285.1853
32	Carnosato de etilo	26.62	C ₂₂ H ₃₁ O ₄	359.2223	359.2232	2.51	331.1919
33	Acetilhorminona	28.41	C ₂₂ H ₂₉ O ₅	373.2015	373.2024	2.41	331.1918

Tabla 20: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Minthostachys mollis*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido quínico	1.32	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0560	2.09	181.5571
2	Isómero del ácido quínico	1.44	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0560	2.09	181.0714
3	Ácido succínico	1.99	C ₄ H ₅ O ₄	117.0188	117.0188	0	
4	Ácido 3,4-dihidroxifenil láctico “danshensu”	4.01	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	197.0445	2.54	123.0446, 135.0447, 179.0347
5	Ácido cafeoilquínico	6.39	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0883	2.83	135.0447, 179.0347, 191.0559
6	Aldehído protocatechuico	7.67	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.024	0.73	108.9350, 136.0161
7	Ácido coumaroilquínico	8.83	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	337.0924	337.0934	2.96	119.0496, 163.0398, 173.0453, 191.0559

<<Continuación>>

8	Ácido cafeoilquínico	8.99	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0883	2.83	173.0453, 179.0559 191.056
9	Ácido cafeoilquínico	9.04	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0883	2.83	191.056
10	Ácido cafeoilquínico	9.41	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0884	3.12	135.0447, 173.0454, 191.0559
11	Ácido cafeico	9.63	C ₉ H ₇ O ₄	179.0345	179.0349	2.23	135.0446
12	Ácido coumaroilquínico	10.12	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	337.0924	337.0934	2.97	119.0496, 163.0397, 191.0348
13	Ácido feruolquínico	10.38	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	367.1029	367.104	3.00	149.0240 191.0560, 193.0504, 173.0453
14	Ácido tuberónico	10.55	C ₁₂ H ₁₇ O ₄	225.1127	225.1133	2.67	147.0814

<<Continuación>>

15	Rutina (quercetin-3-O-rutinósido)	10.8	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609.1456	609.1459	0.49	301.0356, 447.1873
16	Quercetin-O-hexósido	11.04	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0877	463.0887	2.1	301.0366
17	Naringenin-7-O-Glc-Rha	11.35	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	579.1714	579.1718	0.69	271.0613, 151.0397
18	Kaempferol-3-O-glucósido	11.51	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0928	447.0939	2.46	284.0331, 285.0407, 255.0299
19	Hesperidin-7-O-Glc-Rha	11.65	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	609.1820	609.1821	0.16	301.0721, 343.1401, 257.8194
21	Ácido rosmarínico	12.09	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0777	2.78	161.0241, 179.0346, 197.0453
22	Neoponcirina (isosakuranetin-rutinósido)	13.15	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₄	593.1871	593.1874	0.51	594.1905, 593.1873, 285.077

<<Continuación>>

23	Trihidroxi-dimetoxiflavona	15.53	$C_{17}H_{13}O_7$	329.0662	329.0672	3.04	151.0398, 201.8020, 257.8197, 283.0612, 313.0722, 314.0754, 299.0201
24	Ácido trihidroxilinoleico	16.15	$C_{18}H_{31}O_5$	327.2172	327.2181	2.75	269.0457
25	Ácido Sanleng (ácido 6,9,10-trihidroxi-7-octodenoico)	18.17	$C_{18}H_{33}O_5$	329.2328	329.2339	3.34	171.0196, 224.7627,
26	Trihidroxi-trimetoxiflavona	18.76	$C_{18}H_{15}O_8$	359.0767	359.0778	3.06	329.0305, 344.0542, 314.0069

<<Continuación>>

28	Tri hidroximetoxiflavona	19.24	$C_{16}H_{11}O_6$	299.0556	299.0565	0.33	179.0349, 151.0396, 284.0328
30	Eupatorina	20.04	$C_{18}H_{15}O_7$	343.0818	343.0828	2.91	313.0358, 298.0127, 270.0128, 257.8198, 242.0280, , 225.7962, 215.0098, 198.0039, 328.0592, 147.1836, 132.8674
31	Dihidroximetoxiflavona	20.32	$C_{16}H_{11}O_5$	283.0607	283.0617	3.53	268.0386, 151.0034, 107.0327
32	Dihidroximetoxiflavanona	20.36	$C_{16}H_{13}O_5$	285.0763	285.0773	3.51	153.0190, 161.0453, 179.0349, 151.0397, 243.0668, 270.0535, 164.0012

Tabla 21: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Salvia sagitatta*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido málico	1.36	C ₄ H ₅ O ₅	133.0137	133.0139	1.5	
2	Ácido succínico	1.99	C ₄ H ₅ O ₄	117.0188	117.0189	0.85	
3	Monoacetilglicerol	2.09	C ₅ H ₉ O ₄	133.0501	133.0502	0.75	
4	Aldehído protocatechuico	7.69	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.0241	2.19	108.0209, 136.0162
5	Ácido hidroxihexanoico	8.77	C ₇ H ₁₁ O ₅	175.0607	175.0612	2.86	
6	Ácido cafeico hexósido	9.02	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	341.0873	341.0884	3.22	179.0348, 251.0565, 233.0455, 281.0669
7	Ácido coumárico	9.28	C ₉ H ₇ O ₃	163.0395	163.0399	2.45	119.0497
8	Ácido cafeico	9.62	C ₉ H ₇ O ₄	179.0345	179.0350	2.79	135.0447
9	Glucósido del ácido tuberónico	9.85	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	387.1655	387.1668	0.77	225.1133, 207.1028, 163.0034

<<Continuación>>

10	Quercetin-O-hexósido	10.48	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0877	463.0889	2.59	300.0268, 301.0361
11	Quercetin-3-O-glucurónido	10.53	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	477.0669	477.0682	2.72	301.0360
12	Luteolin-7-O-glucósido	11.07	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0928	447.0941	2.46	285.0411, 284.0330,
13	luteolinglucurónido	11.17	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂	461.0720	461.0732	2.60	285.0408,
14	Isorhamnetin-3-O-glucósido	11.23	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	477.1033	477.1046	2.72	315.0824, 357.0352, 462.0768
15	Cafeoldihidroxi-hexil ester	11.63	C ₁₅ H ₁₉ O ₆	295.1182	295.1193	3.73	179.0347, 161.0242
16	Cafeoldihidroxi-hexil ester	11.93	C ₁₅ H ₁₉ O ₆	295.1182	295.1193	3.73	179.0349, 161.0245
17	Ácido rosmarínico	12.11	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0779	3.34	133.0290, 161.0242, 197.0454
18	Ácido isorínico	12.98	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343.0818	343.0830	3.5	161.0241, 327.0515
19	Cafeoiloxohidroxi-hexil ester	13.23	C ₁₅ H ₁₇ O ₆	293.1025	293.1035	3.41	161.0242
20	Dihydrophilonotisflavona	13.63	C ₃₀ H ₁₉ O ₁₂	571.0877	571.0883	1.05	285.0410, 286.0441
21	Crisoeriol	14.0	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299.0556	299.0565	3.01	269.0457
22	Ácido trihidroxilinoleico	16.03	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	327.2172	327.2183	2.75	

<<Continuación>>

23	Apigenina	16.15	C ₁₅ H ₉ O ₅	269.0450	269.0459	3.35	151.0396, 117.0187, 149.0240
24	Naringenina	16.39	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.0607	271.0616	3.32	151.0397, 177.0190
25	Dimetilquercetina	17.59	C ₁₇ H ₁₃ O ₇	329.0662	329.0673	3.34	161.0241, 132.8674, 314.0756, 299.0200
26	Cirsimaritina	19.34	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0712	313.0724	3.19	283.0249, 298.0488
27	Eupatorina	20.06	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343.0818	343.0829	3.21	313.0360, 298.0125, 257.8195, 241.7580, 214.7832, 198.1019, 328.0595, 146.9834, 132.8674
28	Teucrol	20.30	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315.0869	315.0880	3.49	179.0349, 135.0447, 161.0244
29	Genkwanina	20.47	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	283.0607	283.0616	3.18	263.0386, 151.0398
30	Carnosol	22.26	C ₂₀ H ₂₅ O ₄	329.1752	329.1765	3.95	285.1864

<<Continuación>>

31	Ácido 9,10-dihidroxiesteárico	23.47	C ₁₈ H ₃₅ O ₄	315.2536	315.2547	3.49	
----	-------------------------------	-------	--	----------	----------	------	--

Tabla 22: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Salvia cuspidata*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido málico	2.01	C ₄ H ₅ O ₅	133.0137	133.0138	0.75	
2	Ácido succínico	2.89	C ₄ H ₅ O ₄	117.0188	117.0187	0.85	
3	Ácido 3,4-dihidroxifenil láctico “danshensu”	5.91	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	197.0453	1.52	135.0446, 197.0453
4	Ácido protocatechuico	6.83	C ₇ H ₅ O ₄	153.0188	153.0188	0	109.0288
5	Ácido cafeico-O-hexósido	9.77	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	341.0873	341.0880	2.05	179.0345, 281.0666, 281.0560

<<Continuación>>

6	Ácido cafeico-O-hexósido	10.14	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	341.0873	341.0880	2.05	179.0345, 281.0667, 251.0561, 235.0453
7	p-Coumaroilhexósido	10.38	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	325.0924	325.0930	1.85	119.0496, 163.0396
8	Ácido-cafeoilquínico	10.45	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0880	1.12	135.0445, 179.0345, 191.0557
9	p-Coumaroilhexósido	10.59	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	325.0924	325.093	1.85	119.0496, 163.0396
10	Ácido cafeico	10.83	C ₉ H ₇ O ₄	179.0345	179.0347	1.12	135.0445
11	Feruoil hexósido	11.12	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	355.1029	355.1036	1.97	193.0502
12	Luteolin-O-rutinósido	11.59	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	593.1507	593.1504	0.51	285.0403, 447.0928
13	quercetin-3-O-hexósido	11.86	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0877	463.0882	1.08	300.0281, 271.0252
14	Isorhoifolina (apigenin-7-O-rutinósido)	12.13	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	577.1558	577.1556	0.35	269.1030

<<Continuación>>

15	Dihidrobaicalina	12.31	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0928	447.0936	1.79	403.1613, 271.0250
16	Ácido sagerínico o isómero	12.42	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1612	719.1598	1.94	161.0605, 179.0344, 359.0778, 539.1176
17	Ácido rosmarínico	12.92	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0773	1.67	161.0239, 179.0344, 197.0451
18	Ácido ferúlico	13.68	C ₁₀ H ₉ O ₄	193.0501	193.0504	1.55	134.0367, 149.0239, 178.0224
19	Ácido isorínico	13.92	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343.0818	343.0829	3.21	161.0240, 327.1093
20	Rosmarinato de metilo	14.18	C ₁₉ H ₁₇ O ₈	373.0924	373.0931	1.88	179.0345, 311.0926, 355.0827
21	Tetrahidroxiflavona	14.72	C ₁₅ H ₉ O ₆	285.0399	285.0406	2.46	161.0240, 151.0396, 135.0444
22	Quercetina	14.97	C ₁₅ H ₉ O ₇	301.0349	301.0356	2.33	179.0344, 121.0288, 273.1719

<<Continuación>>

23	Etil ester del ácido cafeico	16.14	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	207.0658	207.0660	0.97	179.0346
24	Ácido trihidroxilinoico	16.45	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	327.2172	327.2179	2.14	269.1393
25	Ácido salvianólico F	16.87	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0712	313.0719	2.23	269.0822, 159.0658
26	Apigenina	17.69	C ₁₅ H ₉ O ₅	269.0450	269.0457	2.60	117.0185, 149.0239, 151.0395
27	Hidroxi pentametoxiflavona	18.47	C ₂₀ H ₁₉ O ₈	387.1080	387.1087	1.81	285.0403
28	Isolariciresinol	19.61	C ₂₀ H ₂₃ O ₆	359.1495	359.1502	1.95	344.1582, 345.1346, 313.0714
29	Rosmadial	20.03	C ₂₀ H ₂₃ O ₅	343.1546	343.1552	1.75	299.1652, 315.1598, 285.2072
30	Ácido octadihidroxiocadecadienoico	21.15	C ₁₈ H ₃₁ O ₄	311.2223	311.2229	1.93	197.8076
31	Carnosol	22.09	C ₂₀ H ₂₅ O ₄	329.1752	329.1758	1.82	285.1855
32	5-epi-Icetexona	22.45	C ₂₀ H ₂₁ O ₅	341.1389	341.1396	0.88	297.1492, 299.1652

Tabla 23: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Clinopodium revolutum*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido quínico	1.58	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0558	1.05	127.0032
2	Isómero del ácido quínico	1.74	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0559	1.57	127.0395
3	Ácido succínico	2.42	C ₄ H ₅ O ₄	117.0188	117.0187	0.85	
4	Ácido 3,4-dihidroxifenil láctico “danshensu”	4.98	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	197.0453	1.52	123.0445, 135.0446, 179.0346
5	Aldehido protocatechuico	8.94	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.0239	0	109.0288, 136.0152
6	Ácido cafeoilquínico	9.68	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0881	2.27	135.0445, 179.0346, 191.0560
7	Ácido cafeoilquínico	9.93	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0880	1.98	135.0446, 173.0451, 191.0557
9	Ácido cafeico	10.20	C ₉ H ₇ O ₄	179.0345	179.0347	1.12	135.0446

<<Continuación>>

10	Isómero del O-glucósido del ácido tuberónico	10.31	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	387.1655	387.1664	2.32	163.0395, 207.8366, 225.1131
11	Ácido salviánico C o isómero	10.67	C ₁₈ H ₁₇ O ₉	377.0873	377.0881	2.12	359.0775, 347.1708, 197.0453
12	Ácido tuberónico	11.0	C ₁₂ H ₁₇ O ₄	225.1127	225.1131	1.78	
13	Luteolin-O-rutinósido	11.16	C ₂₉ H ₂₇ O ₁₅	593.1507	593.1508	0.17	285.0409, 447.0927
15	Kaempferol-3-O-glucósido	11.44	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0928	447.0934	1.34	285.0406
16	Apigenin-7-O-Glc-Rha	11.66	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	577.1558	577.1557	0.17	269.0453
17	Luteolin-3-O-glucurónido	11.53	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂	461.0720	461.0726	1.30	285.0403
18	Tetrahidroximetoxiflavona glucósido	11.78	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	477.1033	477.1041	1.68	315.1451, 163.8391, 162.8398

<<Continuación>>

19	Ácido sagerínico	11.96	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1612	719.1599	3.20	359.0776, 179.0345, 161.0240, 197.0452, 161.0239, 135.0446, 539.1187, 522.1684, 503.2506, 495.0556, 477.1974, 341.1970, 315.1453, 297.1345
20	Apigenin – 6- C-hexósido	12.01	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	431.0979	431.0984	1.16	331.1396, 341.1960, 283.1192
21	Luteolin-7-O-hexósido	12.06	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0928	447.0934	1.34	269.0455, 285.0404
23	Ácido rosmarínico	12.48	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0775	2.23	161.0240, 179.0345, 197.0452

<<Continuación>>

24	Luteolina-O- acetil glucósido	12.71	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂	489.1033	489.1039	1.23	285.0404, 447.0935
25	Quercetin -3-O-(3'-O-p-coumaroil)-glucósido (Helichrisroside)	13.51	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	609.1245	609.1242	0.49	301.0719, 447.0940, 462.0747, 594.1343,
26	7-O-(4-Hidroxibenzoil)glucósido del ácido protocatechuico	13.94	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₁	435.0928	435.0935	1.61	297.1346, 153.0191, 315.1452, 137.0239
27	Kaempferol	14.18	C ₁₅ H ₉ O ₆	285.0399	285.0406	2.46	161.0450, 151.0032, 135.0445
28	Apigenina	16.92	C ₁₅ H ₉ O ₅	269.0450	269.0457	2.60	201.8018, 225.7960, 227.1288, 241.7575, 151.0396, 149.0238, 117.0186

<<Continuación>>

29	Ácido 10-(1-hidroxihexoxi)-10-oxodecanoico	18.80	C ₁₆ H ₂₉ O ₅	301.2015	301.2023	2.66	201.8017
30	Tri hidroximetoxiflavona	19.55	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299.0556	299.0563	1.00	151.0395, 179.0346, 284.0328
31	Cirsimaritina	19.62	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0712	313.0720	2.56	161.0242, 132.8672
32	Eupatorina	20.30	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343.0818	343.0825	2.04	313.0353, 328.0591, 147.4391, 132.8672, 298.0123
33	Sakuranetina	20.57	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285.0763	285.0771	2.81	119.0497, 165.0188, 151.0396

<<Continuación>>

34	Genkwanina	20.66	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	283.0607	283.0614	2.47	215.0096, 151.0760
----	------------	-------	--	----------	----------	------	-----------------------

Tabla 24: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Clinopodium sericeum*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Isómero del ácido quínico	1.41	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0559	1.57	127.0395
2	Ácido quínico	1.56	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0561	2.62	127.0395
3	Ácido succínico	2.17	C ₄ H ₅ O ₄	117.0188	117.0188	0	
4	Ácido 3,4-dihidroxifenil láctico “danshensu”	4.50	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	197.0454	2.03	123.0445, 135.0446, 179.0346
5	Ácido protocatechuico	5.22	C ₇ H ₅ O ₄	153.0188	153.0189	0.65	109.0288
6	Aldehido protocatechuico	8.41	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.0239	0	136.0162, 109.0287

<<Continuación>>

7	Ácido cafeico	9.95	C ₉ H ₇ O ₄	179.0345	179.0347	1.12	135.0446
8	Quercetin-3,7-di-O-glucósido	10.54	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	625.1405	625.1401	0.64	463.0882
9	Eriodictiol-O-rutinósido	10.92	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595.1663	595.1661	0.34	287.0561, 151.0031
10	Pentahidroximetoxiflavona glucósido	11.12	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₃	493.0982	493.0989	1.42	331.0827, 315.1089, 163.0397, 162.8387
11	Luteolin-O-hexósido	11.24	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0928	447.0935	1.57	269.0669, 285.0407
12	Eriodictiol-O-neohesperidósido (neoeriocitrin)	11.40	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595.1663	595.1665	0.34	287.0564, 151.0033
13	Narirutina (naringenin-7-O-rutinósido)	11.51	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	579.1714	579.1716	0.35	271.0610,
14	Isómero del ácido salvianólico A	11.75	C ₂₆ H ₂₁ O ₁₀	493.1135	493.1142	1.42	179.0344, 197.0450, 269.0821, 295.1192, 313.0723, 359.0778
15	Ácido salvianólico B	11.99	C ₃₆ H ₂₉ O ₁₆	717.1456	717.1443	2.23	321.0616, 519.0945
16	Ácido rosmarínico	12.24	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0775	2.23	161.0240, 179.0347, 197.7152

<<Continuación>>

17	Ácido litospérmico	13.03	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₂	537.1033	537.1038	0.93	493.1147, 295.0610
18	Ácido salvianólico A	13.87	C ₂₆ H ₂₁ O ₁₀	493.1135	493.1141	1.22	159.8595, 179.0345, 197.0451, 269.0821 , 295.0612, 313.0719, 359.0774
19	Dimetil derivado del ácido cafeico	15.01	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	207.0658	207.0661	1.45	161.0239, 151.0396, 147.0652
20	Ácido salvianólico F o isómero	15.85	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0712	313.0721	2.88	269.0821, 159.0658
21	Ácido trihidroxilinoico	16.33	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	327.2172	327.2180	2.44	
22	Ácido salvianólico F o isómero	17.87	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0712	313.0721	2.87	269.0821, 159.0448
23	Ácido Sanleng (ácido 6,9,10-trihidroxilinoico)	18.28	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	329.2328	329.2337	2.73	171.0197, 224.7630, 250.1144
24	Ácido 8-hidroxihexadecanodioico	18.63	C ₁₆ H ₂₉ O ₅	301.2015	301.2025	3.32	

Tabla 25: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Salvia haenkei*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido piroglutámico	1.87	C ₅ H ₆ O ₃ N	128.0348	128.0348	0	
2	Ácido succínico	2.11	C ₄ H ₅ O ₄	117.0188	117.0189	0.56	
3	Ácido 3,4-dihidroxifenil láctico “danshensu”	4.37	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	197.0455	2.54	123.0446, 135.0447, 179.0347
4	Aldehído protocatechuico	8.24	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.0239	0	109.0287
5	Ácido cafeico	9.85	C ₉ H ₇ O ₄	179.0345	179.0348	1.68	135.0446
6	Glucósido del ácido tuberónico	9.99	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	387.1655	387.1665	2.58	225.8976, 207.0661, 163.0033
7	Ácido 12-hidroxijasmónico	10.67	C ₁₂ H ₁₇ O ₄	225.1127	225.1132	2.22	134.8648, 146.9382, 168.8359, 187.9417, 213.0961
8	Eriodictiol-O-rutinósido	10.89	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595.1663	595.1661	0.34	287.0562, 151.0397

<<Continuación>>

9	Luteolin-7-O-glucurónico	11.25	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂	461.0720	461.0729	1.95	285.0406, 151.0032, 133.0289
10	Ácido dimetilrosmarínico	11.59	C ₂₀ H ₁₉ O ₈	387.1080	387.1091	2.84	179.0347, 135.0447, 161.0240, 359.0782, 206.9727, 179.0346
11	Trihidroximetoxiflavona glucósido	11.89	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁	461.1084	461.1093	1.95	299.1296, 162.0193
12	Ácido rosmarínico	12.24	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0775	2.23	161.0240, 179.0346, 197.8079
13	Isorhamnetina	12.58	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.0505	315.0513	2.54	271.1549, 300.0273
14	Artemetina	12.80	C ₂₀ H ₁₉ O ₈	387.1080	387.1089	2.32	341.1035, 315.0512, 301.0302, 245.1292, 191.0714, 161.0606
15	Tri hidroximetoxiflavona	14.09	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299.0556	299.0564	2.68	284.0329, 150.6036
16	Salvifarin epóxido	17.94	C ₂₀ H ₁₉ O ₆	355.1182	355.1190	2.25	311.1291
17	Tri hidroximetoxiflavona	19.33	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299.0556	299.0564	2.68	151.0394, 179.0347

<<Continuación>>

18	Genkwanina	20.47	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	283.0607	283.0615	2.83	268.0379, 239.0346, 132.8673, 151.0397
19	Ácido octadecenodioico	20.71	C ₁₈ H ₃₁ O ₄	311.2223	311.2231	2.57	

Tabla 26: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Salvia dombeyi*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido quínico	1.36	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0560	2.09	127.0031
2	Ácido málico	1.41	C ₄ H ₅ O ₅	133.0137	133.0138	0.75	
3	Ácido succínico	2.09	C ₄ H ₅ O ₄	117.0188	117.0189	0.85	
4	Ácido cafeico	9.84	C ₉ H ₇ O ₄	179.0345	179.0349	2.23	135.0447
5	Glucósido del ácido tuberónico	9.98	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	387.1655	387.1665	2.58	225.1135, 207.2051, 163.0033
6	Quercetin-3-O-vicianoside	10.64	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆	595.1299	595.1301	0.34	301.0356, 433.2081

<<Continuación>>

7	Ácido tuberónico	10.67	C ₁₂ H ₁₇ O ₄	225.1127	225.1133	1.78	
8	Rutina (quercetin-3-O-rutinósido)	10.88	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609.1456	609.1458	0.33	301.0363, 447.1302
9	Kaempferol-3-O-glucósido	11.63	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0928	447.0937	2.01	285.0407
10	Quercetin-3-O-glucurónido	11.16	C ₂₁ H ₁₇ O ₃	477.0669	477.0677	1.68	151.0395, 178.8149, 301.0357
11	Trihidroximetoxiflavona glucósido	11.59	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁	461.1084	461.1094	2.17	299.1301, 162.0194
12	Cimifugina	12.10	C ₁₆ H ₁₇ O ₆	305.1025	305.1035	3.28	247.0979
13	Ácido rosmarínico	12.20	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0776	2.51	161.0240, 179.0346, 197.0453
14	Artemetina	12.58	C ₂₀ H ₁₉ O ₈	387.1080	387.1090	2.58	341.1039, 315.0514, 301.1440, 244.9857, 190.9284, 161.0243
15	Isorhamnetinacetildihidroxi butil éster	12.61	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₀	445.1135	445.1144	2.02	387.1090, 315.0514, 151.0396
16	Heptametoxiflavona	12.81	C ₂₂ H ₂₃ O ₉	431.1342	431.1352	2.32	419.1714

<<Continuación>>

17	Pentametoxiflavona	13.36	C ₂₀ H ₁₉ O ₇	371.1131	371.1140	2.43	284.1382, 133.0290
18	Pentametoxiflavona	13.79	C ₂₀ H ₁₉ O ₇	371.1131	371.1140	2.43	133.0291, 285.0407
19	Pentametoxiflavona	14.38	C ₂₀ H ₁₉ O ₇	371.1131	371.1140	2.43	285.0406, 133.0295
20	Lariciresinol	14.84	C ₂₀ H ₂₃ O ₆	359.1495	359.1505	2.78	419.1715
21	Dimetilquercetina	17.57	C ₁₇ H ₁₃ O ₇	329.0662	329.0670	2.43	299.0197, 314.0432
22	Acido octadecenodioico	20.73	C ₁₈ H ₃₁ O ₄	311.2223	311.2231	2.57	

Tabla 27: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Hedeoma mandoniana*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido salviánico C o isómero	1.32	C ₁₈ H ₁₇ O ₉	377.0873	377.0861	2.12	347.0753, 359.0982
2	Isómero del ácido salviánico C	1.47	C ₁₈ H ₁₇ O ₉	377.0873	377.0861	2.12	347.0750 359.0992
3	Ácido succínico	2.07	C ₄ H ₅ O ₄	117.0188	117.0188	0	

<<Continuación>>

4	Ácido 3,4-dihidroxifenil láctico “danshensu”	4.32	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	197.0455	2.54	123.0446, 135.0447, 179.0347
5	Ácido protocatechuico	4.98	C ₇ H ₅ O ₄	153.0188	153.0190	1.31	109.0288
6	Aldehído protocatechuico	8.14	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.0240	0.73	136.0163, 108.0208
7	Ácido cafeoilquínico	8.99	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0883	2.83	191.0559
8	Ácido cafeoilquínico	9.04	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0883	2.83	191.0560
9	Ácido cafeoilquínico	9.56	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0882	2.55	135.0446, 179.0346, 191.0558
10	Eriocitrina (eriodictiol-7-O- rutinósido)	10.87	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595.1663	595.1658	0.84	287.0563, 151.0028
11	Naringósido (naringenin-7- rhamnósido-glucósido)	11.43	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	579.1714	579.1719	0.86	271.0613
12	Hesperidina	11.73	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	609.1820	609.1821	0.16	301.0719, 271.0615
13	Acetilglicitina	11.96	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₁	487.1241	487.1250	1.85	267.0720, 241.1080, 444.0807
14	Ácido rosmarínico	12.17	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0777	2.78	161.0241, 179.0346, 197.0453

<<Continuación>>

15	Ácido salvianólico B	12.40	C ₃₆ H ₂₉ O ₁₆	717.1456	717.1445	1.53	519.0938, 321.0619, 339.1821
16	Ácido isorínico	13.06	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343.0818	343.0829	3.21	313.0725, 327.2178
17	Luteolina	13.75	C ₁₅ H ₉ O ₁₀	285.0399	285.0410	0.70	133.0290, 151.0033, 175.0398
18	Ácido trihidroxilinoico	16.20	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	327.2172	327.2182	3.06	
19	Ácido trihidroxioctadecaenoico	18.22	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	329.2328	329.2338	3.04	

Tabla 28: Perfil UHPLC-ESI-MS/MS del extracto etanólico de *Clinopodium pulchellum*

Pico	Identificación tentativa	tR (min.)	[M-H] ⁻	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	Iones (m/z)
1	Ácido quínico	1.34	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0560	2.09	127.0395
2	Isómero del ácido quínico	1.47	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.0556	191.0560	2.09	127.0395
3	Ácido mesacónico	2.96	C ₅ H ₅ O ₄	129.0188	129.0190	1.55	
4	Ácido protocatechuico	4.94	C ₇ H ₅ O ₄	153.0188	153.0190	1.31	135.0445, 109.0289

<<Continuación>>

5	Aldehído protocatechuico	8.10	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.0240	0.73	136.0163
6	Ácido cafeoilquínico	9.56	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0873	353.0883	2.83	135.0447, 173.0452, 191.0559
7	Luteolin-O-rutinósido	9.92	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	593.1507	593.1509	0.34	285.0618, 447.1513
8	Quercetin-3,7-di-O-glucósido	10.43	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	625.1405	625.1407	0.32	301.1303
9	Rutina (quercetin-3-O-rutinósido)	10.85	C ₂₂ H ₂₉ O ₁₆	609.1456	609.1457	0.16	301.0569, 447.1870
10	Quercetin-3-O-hexósido	11.08	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0877	463.0887	2.16	301.0363
11	Quercetin-3-O-hexósido	11.14	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0877	463.0886	1.94	271.0613, 300.0279
12	Naringósido (naringenin-7-rhamnósido- glucósido)	11.43	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	579.1714	579.1718	0.69	271.0613
13	Hesperidina	11.70	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	609.1820	609.1823	0.49	301.0720, 271.0619
14	Ácido rosmarínico	12.17	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0777	2.78	161.0240, 179.0345, 197.0453
15	Isosakuranetin-7-O-neohesperidósido	13.21	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₄	593.1870	593.1873	0.51	285.0770, 269.1587

<<Continuación>>

16	Ácido salvianólico A	13.54	C ₂₆ H ₂₁ O ₁₀	493.1135	493.1143	1.62	295.0615, 159.8597, 313.1656, 179.0710, 197.0818
17	Eriodictiol	13.76	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.0556	287.0565	3.14	151.0033, 135.0446
18	Hesperetin-O-glucósido	14.27	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	463.1241	463.1250	2.06	285.0773, 301.0720
19	Naringenina	16.48	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.0607	271.0616	3.32	151.0033, 165.0190, 119.0495
20	Dimetilquercetina	17.48	C ₁₇ H ₁₃ O ₇	329.0662	329.0670	2.43	299.0200, 314.0437
21	Hesperetina	17.66	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	301.0712	301.0722	3.32	286.0495, 257.0822, 241.7579
22	Trihidroxitrimetoxiflavona	18.82	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0777	2.78	179.0349, 197.0818, 161.0240, 344.0544, 329.0301, 314.0067
23	Trihidroximetoxiflavanona	19.15	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	301.0712	301.0721	2.87	161.0240, 139.0032
24	Tri hidroxi metoxiflavona	19.34	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299.0556	299.0565	3.01	151.0765, 179.0349, 284.0326

<<Continuación>>

25	Ácido salvianólico F o isómero	19.77	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0712	313.0722	3.19	269.0459, 159.8597,
26	Eupatorina	20.08	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343.0818	343.0828	2.91	313.0356, 298.0128, 270.0163, 197.8078, 215.0096, 328.0594, 146.9381, 132.8672
27	Dihidroximetoxiflavona	20.44	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	283.0607	283.0616	3.18	268.0378, 179.0349, 151.0765

Tabla 29: Resumen de metabolitos en trece especies peruanas de *Menthae* con mención a su fragmentografía MS/MS

Componentes	Lm	Cb	So	Lf	Mm	Ss	Sc	Cr	Cs	Sh	Sd	Hm	Cp	Referencias
Isómeros del ácido quínico	+	+	+	+	+			+	+		+		+	(Taamalli et al.2015; Sharma et al. 2020; Velamuri et al.2020).
Ácido málico						+	+				+			(Taamalli et al.2015)
Ácido cítrico			+											(Taamalli et al.2015)
Ácido piroglutámico										+				(Taamalli et al.2015)
Ácido succínico			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		(Taamalli et al.2015; Liu 2007).
Monoacetilglicerol						+								
Ácido mesacónico													+	
Danshensu	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+		(Li, C. et al.2019; Luo et al.2019; Guo et al.2019).
Ácido protocatechuico				+			+		+			+	+	(Li, C. et al.2019).
Ácido cafeico hexósido							+							(Abu Reidah et al. 2012; Shen et al.2018).
Coumaroil o feruoil-hexósidos							+							(Abu Reidah et al. 2012)
Ácido hidroxihéptandioico			+			+								
Aldehido protocatechuico	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	(Li, C et al. 2019)
Ácidos cafeoilquínicos “ácidos clorogénicos”		+	+		+		+	+				+	+	(Sharma et al.2020; Velamuri et al. 2020; Gil et al. 2017 y 2018; Schutz et al. 2004; Li,Q. et al. 2016.; Gu et al. 2012).
Ácidos coumaroil y feruoil quínicos			+		+									Sharma 2020; Velamuri 2020; Krzyznowska 2018; Li 2016.; Gu 2012.
Ácido coumárico						+								(Sharma et al.2020 ; Velamuri et al.2020.
Ácido eucómico		+												
Ácido cafeico	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+			(Sharma et al.2020; Shen et al. 2018; Velamuri et al. 2020)
Hexósido del ácido tuberónico	+			+		+		+		+	+			(Taamalli et al. 2015)
Ácido salviánico C e isómeros	+			+				+				+		(Shen et al. 2018)

<<Continuación>>

Malonato del ácido salviánico C	+			+										(Shen et al. 2018)
Ácido tuberónico					+					+	+			(Taamalli et al.2015)
Luteolin glicósidos	+	+	+			+	+	+	+	+				(Li J. et al. 2019.;Mena et al. 2016; Sharma et al. 2020;Velamuri et al. 2020; Abu Reidah et al. 2012; Li Q. et al. 2016; Mirón et al.2013; Dimitrova et al. 2019; Gu et al. 2012.)
Quercetin glicósidos			+		+	+	+		+		+		+	(Abu Reidah et al.2012; Sulniuté et al.2017; Dimitrova et al. 2019; Gu et al.2012)
Naringenin glicósidos		+			+				+			+	+	(Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020; Abu Reidah et al.2012; Dimitrova et al.2019)
Hesperetin glicósidos		+			+								+	(Sharma et al.2020; Velamuri et al. 2020)
Isorhamnetin glicósidos			+			+								(Mena et al. 2016 ; Sharma et al. 2020; Velamuri et al.2020)
Kaempferol glicósidos					+			+			+			(Abu Reidah et al. 2012; Mistic et al. 2015; Sulniuté et al.2017; Guet al. 2012)
Isosakuranetin glicósidos					+								+	(Dimitrova et al. 2019)
Cafeoldihidroxilhexil ésteres						+								
Apigenin glicósidos							+	+						(Li J. et al.2019; Li et al. 2016; Sharma et al.2020; Velamuri et al. 2020; Abu Reidah et al. 2012; Mena et al. 2016; Dimitrova et al. 2019; Gu et al. 2012)
Eriodictiol glicósidos									+	+		+		(Boudair et al.2019)
Ácido yunnaneico E				+										(Luo et al. 2019; Dimitrova et al.2019)
Ácido clerodendranoico H	+			+				+						(Luo et al. 2019)
Ácido dihidrorosmarínico	+													
Ácido dimetil rosmarínico										+				
Ácido sagerínico	+			+			+							(Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020; Barros et al. 2013, Fialová et al. 2015; Mirón et al. 2013; Dimitrova et al.2019)

<<Continuación>>

Ácido salvianólico A									+				+	(Shen et al. 2018; Liu et al. 2007; Li,C. et al. 2019; Lu et al.1999; Dimitrova et al. 2019)
Ácido rosmarínico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(Sharma et al. 2020; Velamuri et 2020; Barros et al. 2013; Fialová et al. 2015, Luo et al.2019; Guo et al.2019; Dimitrova et al.2019)
Ácido ferúlico								+						(Luo et al. 2019; Mistic et al.2015; Li, J. et al. 2019)
Ácido isorínico	+	+		+				+					+	(Shen et al.2018; Satake et al. 1999)
Ácido litospérmico									+					(Shen et al. 2018; Li C. et al.2019)
Ácido salvianólico B		+							+				+	(Shen et al. 2018; Li et al. 2016; Guo et al. 2019; Mirón et al. 2013; Luo et al. 2019)
Ácido salvianólico F	+			+					+				+	(Shen et al. 2018; Dimitrova et al. 2019)
Teucrol							+							
Metil y etil derivados del ácido rosmarínico	+	+		+				+						(Li J. et al. 2019; Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020)
Ésteres del ácido cafeico	+	+		+		+			+					
Agliconas de flavonoide		+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	(Farbre et al. 2001; Keckes et al. 2013; Chen et al. 2015; Brito et al. 2014; Li Q. et al.2016.; Mistic et al. 2015; Ertas et al. 2015; Peter et al. 2015, Guo et al. 2019; Li L. et al. 2019.; Mena et al. 2016; Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020; Sulniuté et al. 2017; Li J. et al. 2019; Yang et al. 2012; Guet al.2012)
Ácidos grasos		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		(Taamalli et al. 2015)
Rosmanol y derivados	+			+										(Zimmerman et al. 2011; Wang, L. et al.2017; Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020; Mena et al. 2016)
Sageona	+													

<<Continuación>>

Carnosol y derivados	+			+		+	+								(Zimmerman et al.2011; Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020;Mena et al. 2016; Sulniuté et al. 2017)
Ácido carnósico y derivados	+			+											(Zimmerman et al. 2011; Wang L. et al. 2017; Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020; Sulniuté et al.2017)
Horminona y derivados	+			+											(Wang Y. et al.2018)
Salvinina	+														(Ahmed et al. 2004)
Rosmaridifenol				+											(Loussarn et al. 2017; Pertino et al. 2010)
Lariciresinol isómeros							+					+			(Fischer et al. 2012; Abu Reidah et al.2012)
Rosmadial							+								(Sharma et al. 2020; Velamuri et al.2020)
5-epi-Icetexona							+								(Nieto et al.2000)
Cimifugina												+			(Gurbuz et al.2018)
Salviafaricin epóxido											+				

Las trece muestras contienen ácido rosmarínico, incluso *Salvia dombeyi*. La fragmentación bajo ionización negativa de esta molécula es consistente con la Figura 52.

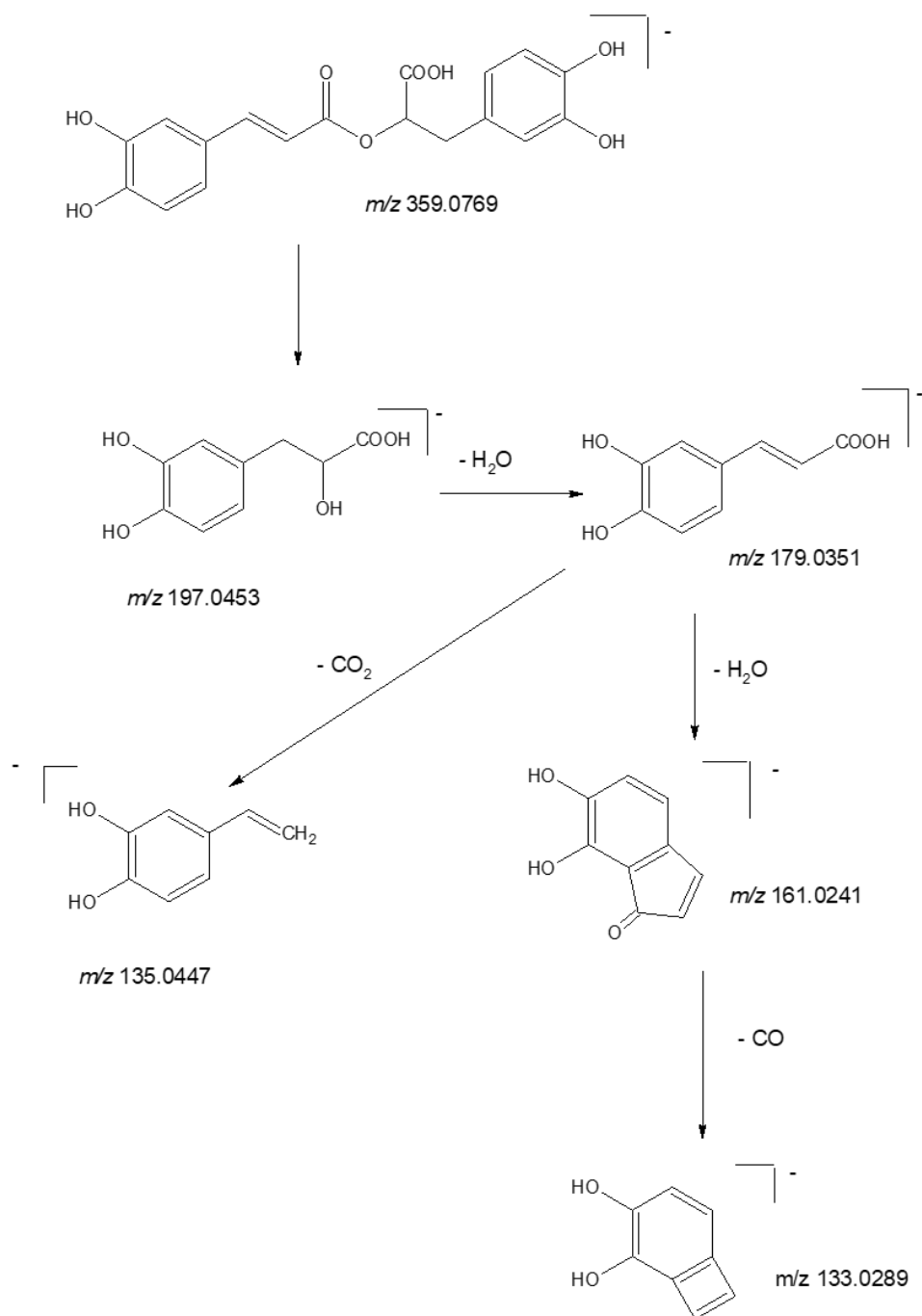


Figura 52: Fragmentación del ácido rosmarínico. Los fragmentos 135, 179 y 197 son característicos del ácido rosmarínico. Esquema elaborado con los datos de *Lepechinia meyenii*.

En *Lepechinia meyenii*, *Clinopodium brevicalyx*, *Lepechinia floribunda* y *Salvia cuspidata* se encontró además los ésteres etílico/metílico del ácido rosmarínico .

El aldehído protocatechuico, el ácido cafeico, el ácido 3-(3,4-Dihidroxifenil)-2-hidroxiopropanoico o “Danshensu” se encontraron en muchas de las especies de *Menthae* analizadas (Figura 53).

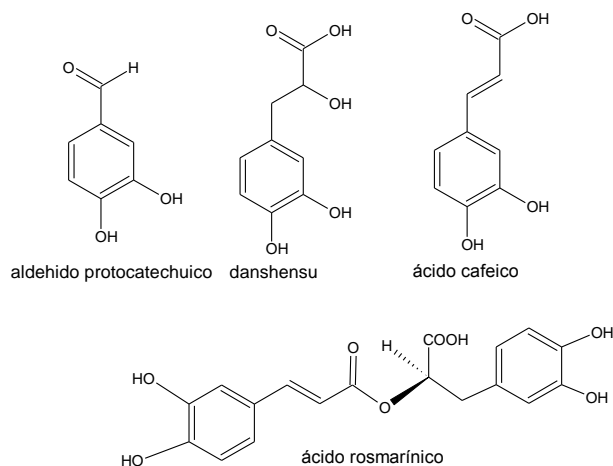


Figura 53: Componentes fenólicos comunes en *Menthae*.

El aldehído protocatechuico está presente en once de las especies analizadas, el ácido cafeico en diez, el danshensu también en diez.

En las Figuras 54, 55 y 56 se muestran las fragmentaciones del aldehído protocatechuico, el ácido cafeico y el ácido 3,4-dihidroxifenil-láctico “danshensu” según Li *et al.* (2019).

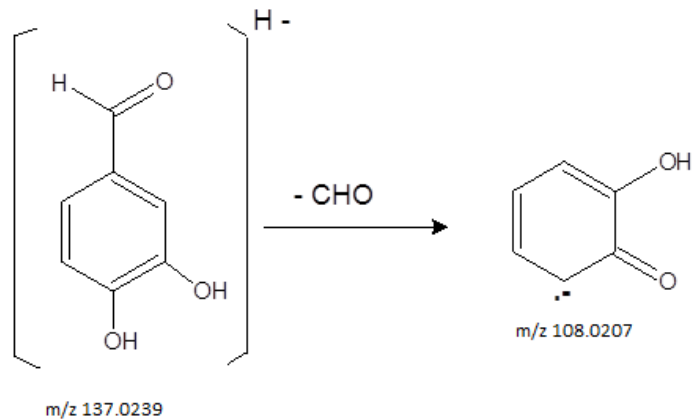


Figura 54: La fragmentación del aldehído protocatechuico. Se muestra el anión radical.
 Fuente: Li *et al.* (2019).

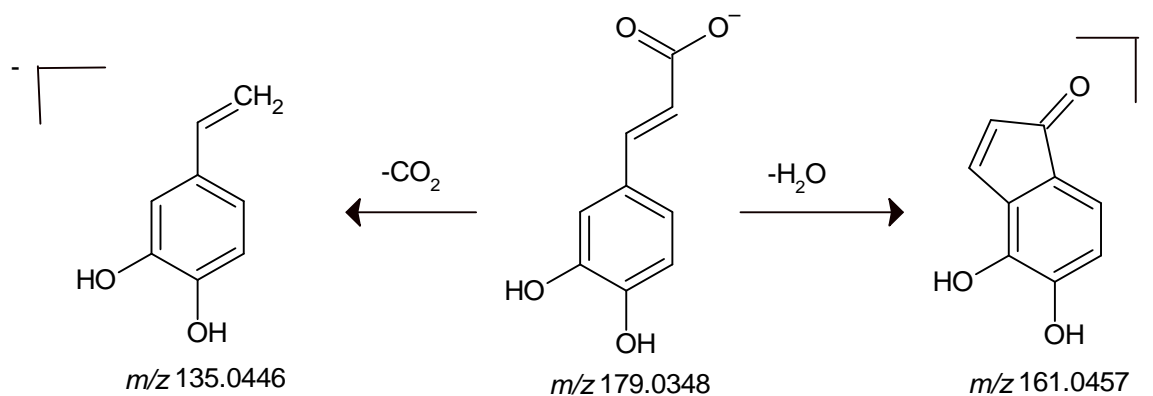


Figura 55: Patrón de fragmentación del ácido cafeico.
 Fuente: Li *et al.* (2019).

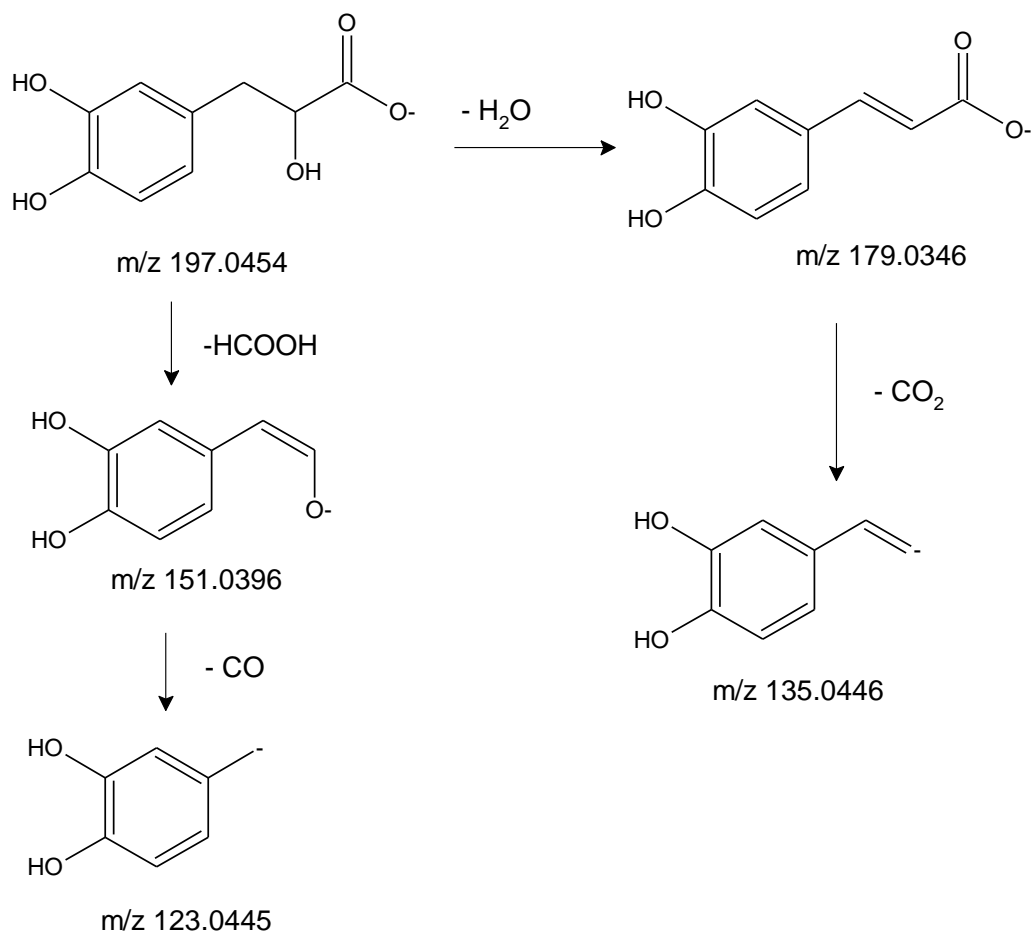


Figura 56: Esquema de la fragmentación del danshensu.

Fuente: Li *et al.* (2019).

En las dos especies de *Lepechinia* y también en *Clinopodium revolutum* y *Hedoma mandoniana* se encontró la molécula de ácido salvianico C, que sería producto de la hidratación del doble enlace alqueno del ácido rosmarínico, su estructura se muestra en la Figura 57.

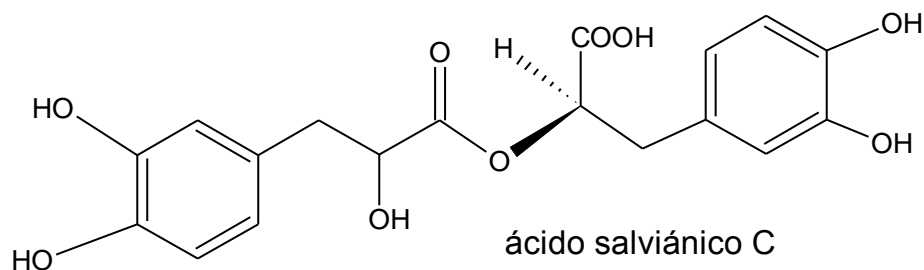


Figura 57: Estructura química del ácido salviánico C.

El ácido salviánico C se ha reportado en *Salvia miltiorrhiza* “Dan Shen”, planta medicinal china. Sin embargo, no hay mucha información sobre esta sustancia (Shen *et al.* 2018, Pezeshki y Petersen 2018). Además en *Salvia cuspidata* y *Hedeoma mandoniana* se encontraron isómeros de ácido salviánico C con tiempos de retención menores a dos minutos. En las especies de *Lepechinia* esta molécula aparece además como éster del ácido malónico. El patrón de fragmentación de estos metabolitos se muestra en la Figura 58.

En *Salvia sagittata* se detectó teucrol que es una molécula de ácido rosmarínico descarboxilado. En las dos especies de *Lepechinia* así como en *Clinopodium brevicalyx* y en *Salvia cuspidata* está presente la molécula del ácido cafeoil-4'-hidroxifenil-láctico o ácido isorínico que es una molécula de ácido rosmarínico sin el hidroxilo en 3'. Esta molécula se encontró por primera vez en *Helicteres isora* (*Sterculiaceae*) (Satake *et al.* 1999).

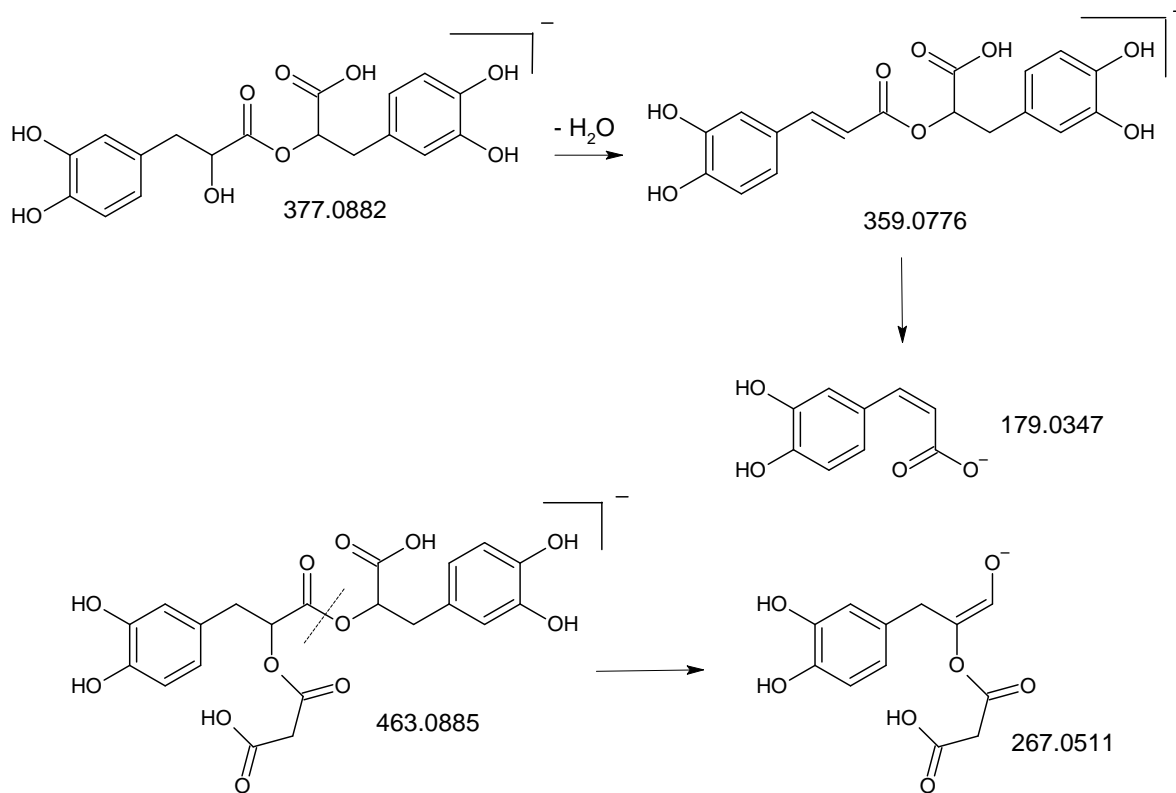


Figura 58: Planteamiento de fragmentación del ácido salviánico C y de su malonato utilizando los datos de *Lepechinia floribunda*.

En siete de las especies analizadas se detectó la presencia de ácidos mono cafeoil quínicos (CQAs) o también llamados ácidos clorogénicos que son ésteres del ácido cafeico con el ácido quínico (Figura 59). Es notable que en *Lepechinia* si bien están presentes el ácido cafeico y el ácido quínico no existen los ácidos clorogénicos. En *Minthostachys mollis* se encontró incluso cuatro ácidos monocafeoilquínicos. En ningún caso se detectó la presencia de ácidos di o tri cafeoil quínicos.

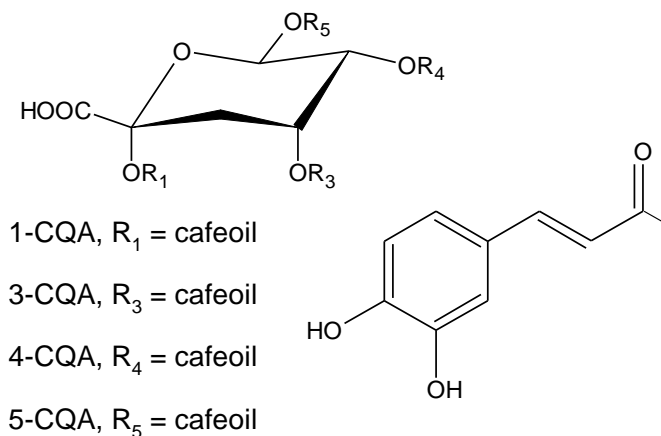


Figura 59: Los ácidos cafeoilquínicos o ácidos clorogénicos. Fuente: Abrankó *et al.* (2017).

El 4-CQA también se llama ácido criptoclorogénico, el 5-CQA ácido clorogénico y el 3-CQA ácido neo-clorogénico. El 1-CQA no tiene otro nombre. Todos ellos tienen el ion molecular a m/z 353. El pico m/z 191, que se observa en todos los casos, corresponde a [ácido quínico]. Es posible individualizar la asignación de los ácidos cafeoilquínicos por el orden de elución: 1-CQA, 3-CQA, 5-CQA y 4-CQA. El 1-CQA se diferencia notablemente de los otros por su tiempo de retención temprano y porque tiene un pico a m/z 191 más intenso. En cambio 4-CQA se identifica por su elución al último y porque el pico m/z 173 es el más intenso (Schutz *et al.* 2004, Gil *et al.* 2018). Sin embargo, se recomienda utilizar estándares.

Además, en todas las plantas, se ha detectado la presencia de flavonoides, particularmente flavonoles, flavonas y flavanonas. Estas aparecen libres y también en forma glicosilada. En algunos casos comunes se hacen asignaciones específicas pero hay que ser prudente pues la isomería abunda no solo en la aglicona sino también en la parte azucarada. Los luteolin y quercetin glicósidos son los más abundantes. En *Salvia dombeyii* resalta la abundancia de flavonoides polimetoxilados que al parecer le confieren una textura pegajosa a sus hojas distinta respecto a las otras *Salvias*. Igualmente en *Lepechinia*, los flavonoides se expresan poco, solo se ha encontrado un glicósido de luteolina en *Lepechinia meyenii*, esta poca presencia de flavonoides en *Lepechinia* también se ha observado en *Melissa* (Barros *et al.* 2013; Miron *et al.* 2013), ambas son *Salviinae*. En cambio todas las *Salvias*

(*Salviinae*) analizadas si tienen abundancia y diversidad de flavonoides. Además *Minthostachys mollis*, *Clinopodium sericeum* y *Clinopodium pulchellum* (*Menthinae*) son las más diversas respecto a sus flavonoides. En la Tabla 30 se muestran las agliconas de flavonoides encontradas en las trece especies de *Mentheae* estudiadas.

Tabla 30: Agliconas de flavonoide presentes en las trece especies peruanas de *Mentheae* estudiadas.

Especie	Aglicona de flavonoide
<i>Lepechinia meyenii</i>	Luteolina.
<i>Clinopodium brevicalyx</i>	Luteolina, naringenina, hesperetina, eriodictiol, quercetina, eupatorina, trihidroxitrimetoxiflavona.
<i>Salvia oppositiflora</i>	Quercetina, luteolina, isorhamnetina, dihidrophilonotisflavona, trihidroximetoxiflavona.
<i>Lepechinia floribunda</i>	n.d.
<i>Minthostachys mollis</i>	Quercetina, naringenina, kaempferol, hesperetina, trihidroximetoxiflavona, eupatorina, isosakuranetina, trihidroxidimetoxiflavona, trihidroxitrimetoxiflavona, eupatorina, dihidroximetoxiflavona.
<i>Salvia sagittata</i>	Quercetina, luteolina, apigenina, crisoeriol, isorhamnetina, cirsimaritina, eupatorina, dihidrophilonotisflavona, naringenina, genkwanina.
<i>Salvia cuspidata</i>	Luteolina, quercetina, apigenina, dihidrobaicalina, tetrahidroxiflavona.
<i>Clinopodium revolutum</i>	Kaempferol, apigenina, luteolina, tetrahidroximetoxiflavona, quercetina, trihidroximetoxiflavona, cirsimaritina, eupatorina, sakuranetina, genkwanina.
<i>Clinopodium sericeum</i>	Quercetina, eriodictiol, luteolina, naringenina, pentahidroximetoxiflavona.
<i>Salvia haenkei</i>	Eriodictiol, luteolina, isorhamnetina, artemetina, trihidroximetoxiflavona, genkwanina.
<i>Salvia dombeyi</i>	Quercetina, kaempferol, trihidroximetoxiflavona, pentametoxiflavona, artemetina, heptametoxiflavona.
<i>Hedeoma mandoniana</i>	Eriodictiol, naringenina, hesperetina, acetilglicitina, luteolina
<i>Clinopodium pulchellum</i>	Luteolina, quercetina, naringenina, hesperetina, isosakuranetina, eriodictiol, jaceidina, trihidroxitrimetoxiflavona, trihidroxitrimetoxiflavanona trihidroximetoxiflavona, eupatorina, dihidroximetoxiflavona.

En la Tabla 31 se muestra los derivados superiores al ácido rosmarínico encontrados. Los polifenoles superiores al ácido rosmarínico también se llaman ácidos salvianólicos, están presentes en *Lamiaceae* los ácidos salvianólicos A, B, C, D, E, F, G, H, y como se ve en este trabajo, se ha detectado varios de ellos (Figura 60 y Figura 61). El ácido salvianólico F no es “superior” puesto que su peso molecular es menor al del ácido rosmarínico. La maquinaria biosintética de *Menthae*, los fabrica en base al ácido cafeico, el danshensu y el ácido rosmarínico y su aparición y concentración cambiará como resultado de variables ecológicas (Petersen 2013). Esto mismo pasa también con los aceites esenciales, diterpenoides, flavonoides y otros metabolitos.

Tabla 31: Acidos fenólicos superiores presentes en las trece especies peruanas de *Mentheae* estudiadas.

Identificación	tR	[M-H] ⁻	Masa experimental m/z (error)	iones	Referencia
<i>Lepechinia meyenii</i>					
Ácido clerodendranoico H	11.58	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1600 (1.67)	359.0775, 179.0345, 197.0453, 161.0240, 135.0445, 539.1186, 522.1346	(Luo et al. 2019).
Ácido sagerínico	11.92	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1600 (1.67)	359.0775 179.0346 161.0240 539.1192	(Fialová et al. 2015; Barros et al. 2013; Mirón et al. 2013)
Ácido salvianólico F	15.45	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0720 (2.6)	269.0816, 159.0657	(Shen et al. 2018)
<i>Clinopodium brevicalyx</i>					
Ácido salvianólico B o isómero	12.53	C ₃₆ H ₂₉ O ₁₆	717.1443 (1.81)	295.0611, 321.0408, 339.0512, 493.1137, 519.0930, 537.1024	(Shen et al. 2018)

<<Continuación>>

<i>Lepechinia floribunda</i>					
Ácido yunnaneico E o isómero	10.54	C ₂₇ H ₂₃ O ₁₄	571.1093(0.88)	179.0357, 135.0447, 301.0733, 197.0455, 285.0773, 347.0784, 391.0674, 373.0576, 161.0241, 255.0879 527.1198 330.0707	(Luo et al. 2019)
Ácido clerodendranoico H	11.59	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1601 (1.53)	359.0779, 179.0347, 161.0241 539.1188	(Luo et al. 2019)
Ácido sagerínico	11.93	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1602 (1.39)	359.0779, 179.0347, 197.0452, 161.0241, 135.0447, 539.1193, 522.2628, 503.2507, 495.0935, 477.2341, 341.1980, 315.1451, 297.0404	(Fialová et al. 2019)
Ácido salvianólico F	15.53	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0721 (2.88)	269.0821, 159.0448	(Shen et al. 2018)
<i>Salvia sagittata</i>					
Teucrol	20.30	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315.0880 (3.49)	179.0349, 135.0447, 161.0244	
<i>Salvia cuspidata</i>					
Acido sagerínico	12.42	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1598 (1.94)	161.0605, 179.0344, 359.0778, 539.1176	(Fialová et al. 2019)

<<Continuación>>

Ácido salvianólico F	16.87	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0719 (2.23)	269.0822, 159.0658	(Shen et al. 2018)
<i>Clinopodium revolutum</i>					
Ácido sagerínico	11.96	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1599 (3.20)	359.0776, 179.0345, 161.0240, 197.0452, 161.0239, 135.0446, 539.1187, 522.1684, 503.2506, 495.0556, 477.1974, 341.1970, 315.1453, 297.1345	(Fialová et al. 2015; Barros et al. 2013; Mirón et al. 2013)
<i>Clinopodium sericeum</i>					
isómero del ácido salvianólico A	11.75	C ₂₆ H ₂₁ O ₁₀	493.1142 (1.42)	179.0344, 197.0450, 269.0821, 295.1192, 313.0723, 359.0778	(Liu et al. 2007; Shen et al. 2018)
Ácido salvianólico B	11.99	C ₃₆ H ₂₉ O ₁₆	717.1443 (2.23)	321.0616, 519.0945	(Shen et al. 2018)
Ácido litospérmico	13.03	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₂	537.1038 (0.93)	493.1147, 295.0610	(Shen et al. 2018)

<<Continuación>>

Ácido salvianólico A	13.87	C ₂₆ H ₂₁ O ₁₀	493.1141 (1.22)	159.8595, 179.0345, 197.0451, 269.0821, 295.0612, 313.0719, 359.0774	(Liu et al. 2007; Shen et al. 2018)
Ácido salvianólico F o isómero	15.85	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0721 (2.88)	269.0821, 159.0658	(Shen et al. 2018)
Ácido salvianólico F o isómero	17.87	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0721 (2.87)	269.0821, 159.0448	(Shen et al. 2018)
<i>Hedeoma mandoniana</i>					
Ácido salvianólico B	12.40	C ₃₆ H ₂₉ O ₁₆	717.1445 (1.53)	321.0619, 339.1821, 519.0938	(Shen et al. 2018)
<i>Clinopodium pulchellum</i>					
ácido salvianólico A	13.54	C ₂₆ H ₂₁ O ₁₀	493.1143 (1.62)	295.0615, 159.8597	(Shen et al. 2018)
Ácido salvianólico F o isómero	19.77	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0722 (3.19)	269.0459, 159.8597	(Shen et al. 2018)

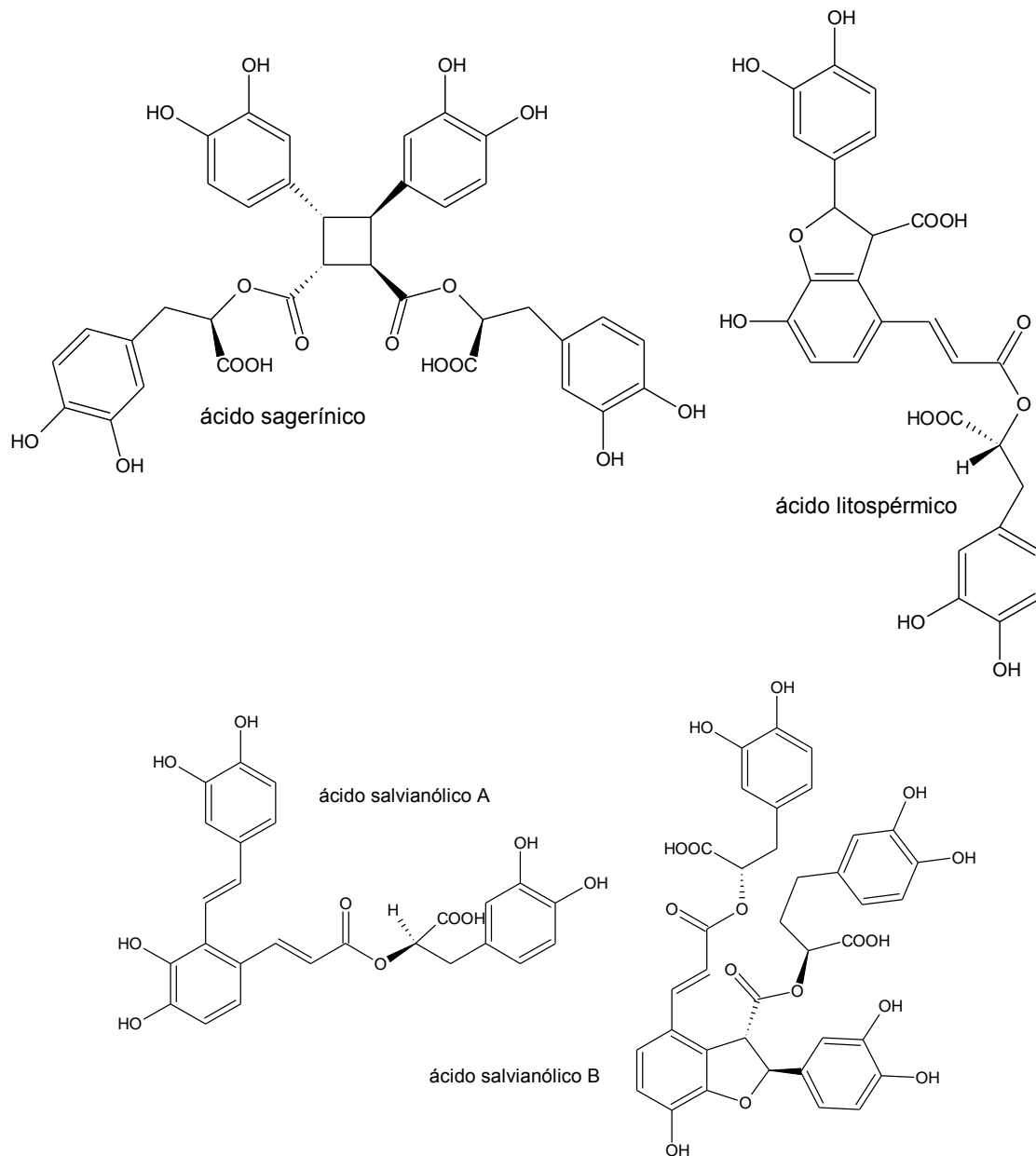


Figura 60: Ácidos salvianólicos encontrados en los extractos etanólicos de las especies de *Menthae* estudiadas.

Fuente: Petersen (2013); Pezeshki *et al.* (2018).

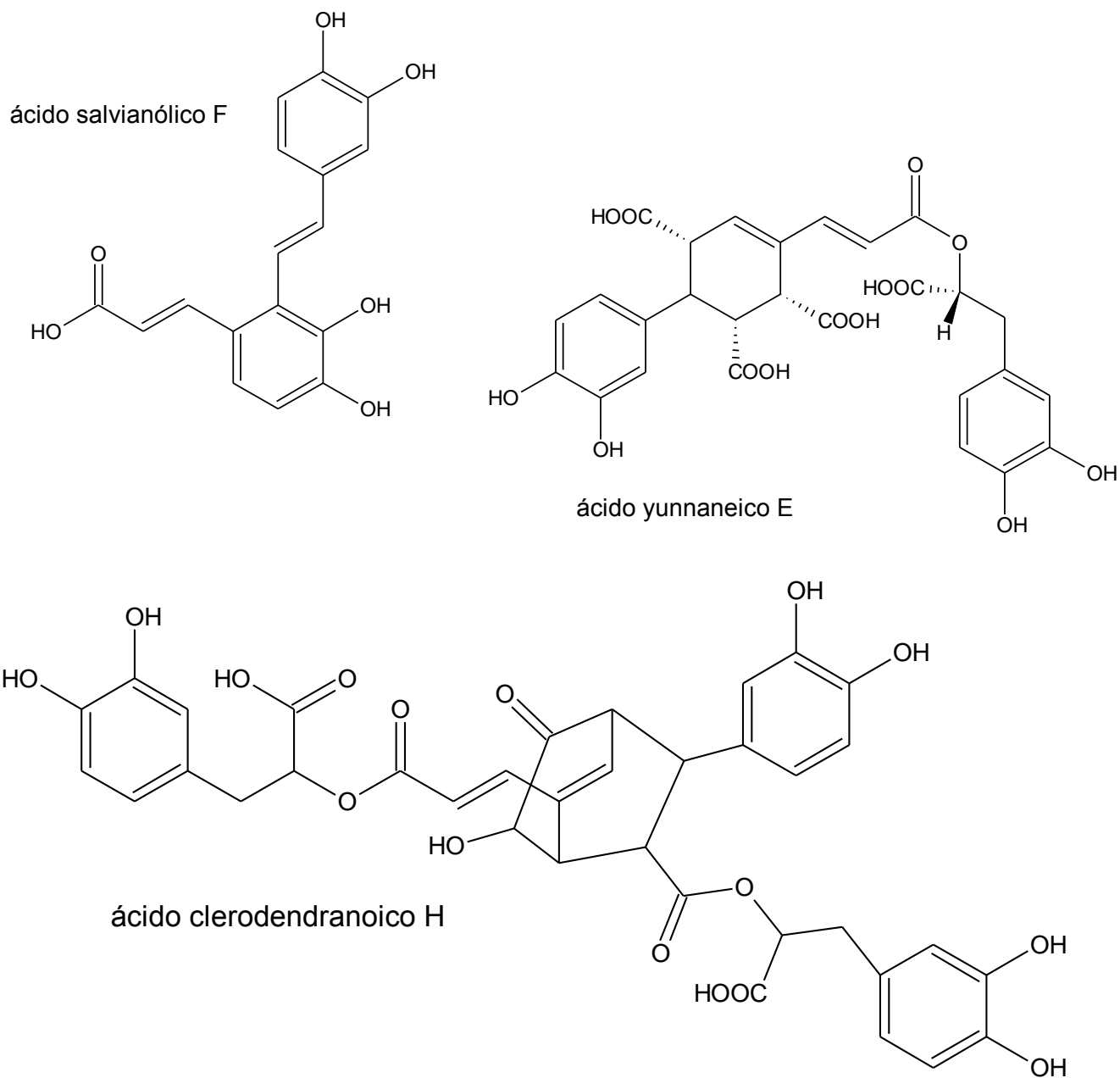


Figura 61: Diversidad de ácidos salvianólicos encontrados en las trece especies de *Mentheae* estudiadas .

Fuente: Luo *et al.* (2019).

El espectro de masas del ácido sagerínico encontrado en las dos especies de *Lepechinia* es congruente a lo reportado por Fialová *et al.* (2015) (Figura 62). Este compuesto fue por primera vez determinado en *Salvia officinalis* (Lu *et al.* 1999).

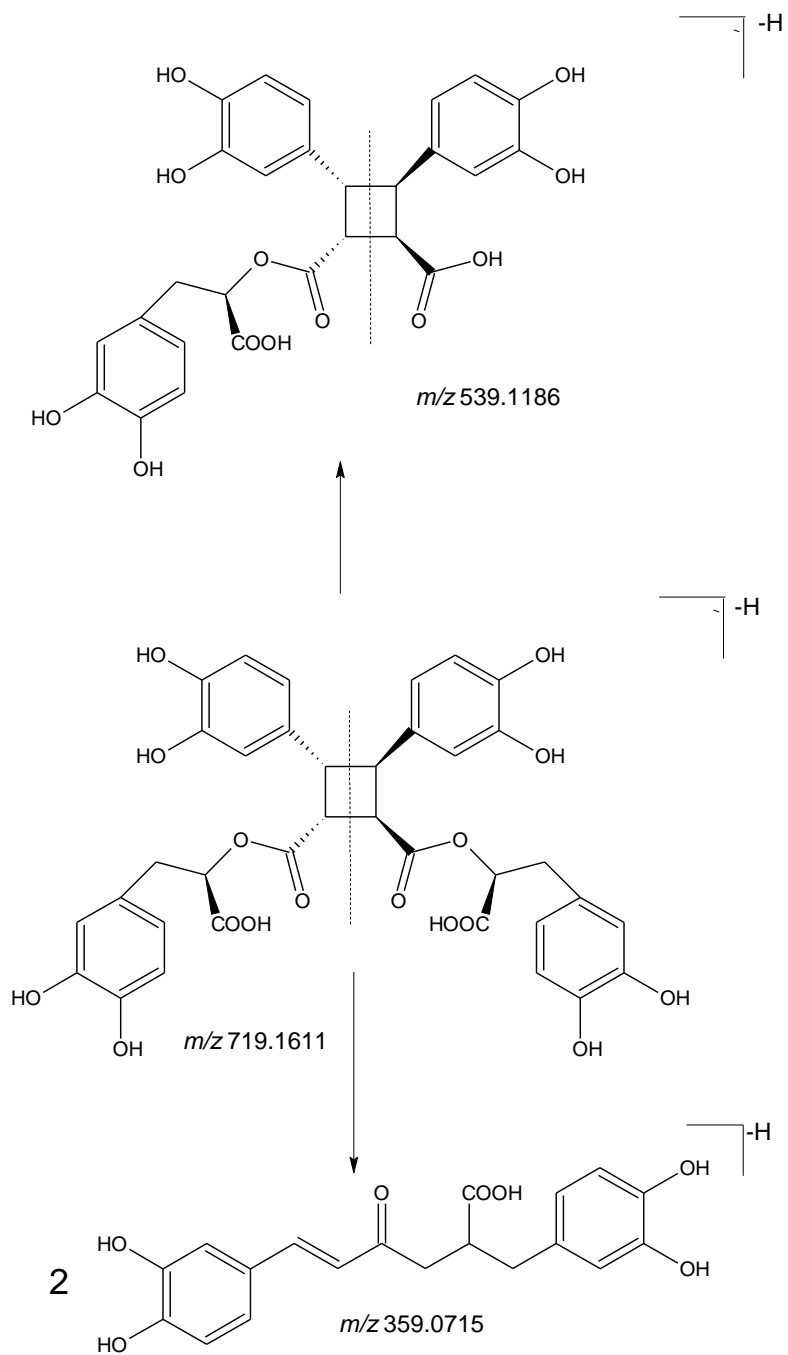


Figura 62: Fragmentaciones del ácido sagerínico con datos de *Lepechinia meyenii*.

En las Figuras 63 y 64 se muestran los patrones de fragmentación del ácido salvianólico B y del ácido salvianólico A (Luo *et al.* 2019). En las Figuras 65, 66, 67 y 68 se muestran planteamientos de fragmentación para el ácido salvianólico F, el ácido yunnaneico E, el ácido clerodendranoico H y el ácido litospérmico, respectivamente.

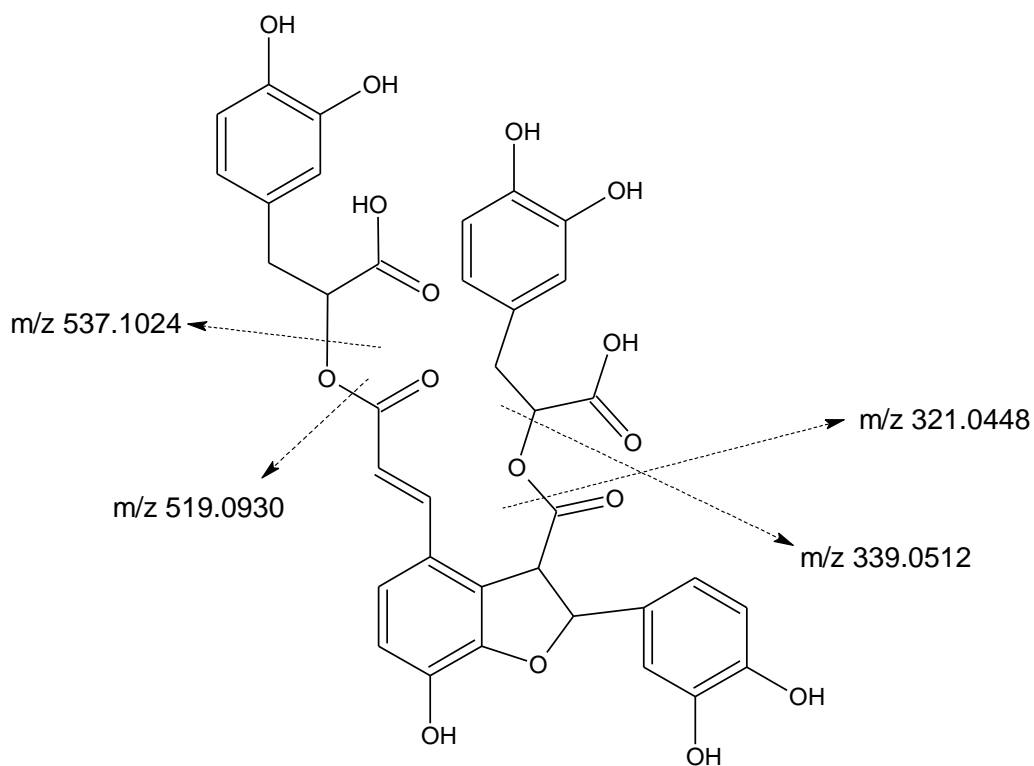


Figura 63: Fragmentación del ácido salvianólico B de *Clinopodium brevicalyx*.

Fuente: Luo *et al.* (2019).

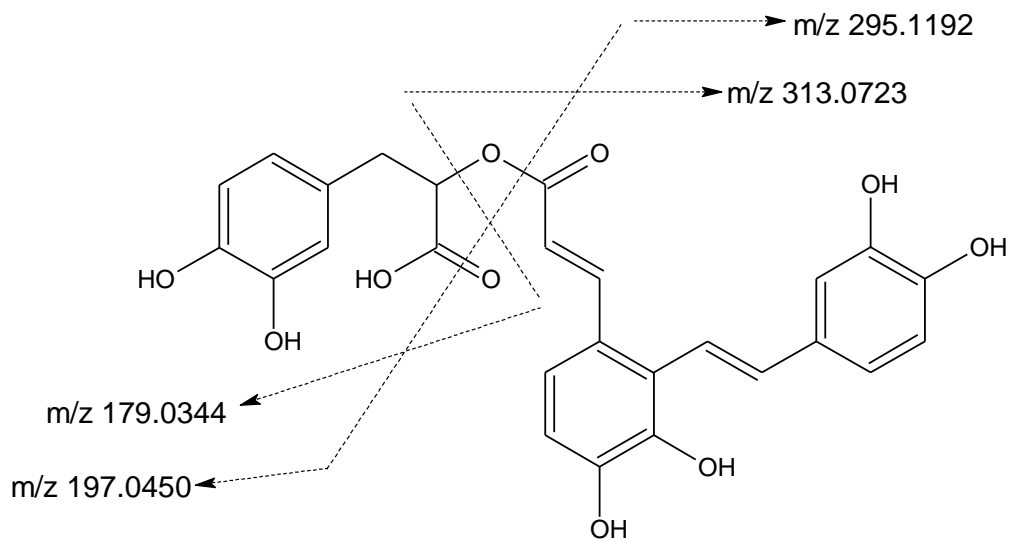


Figura 64: Fragmentación del ácido salvianólico A. Los datos corresponden a *Clinopodium sericeum*.

Fuente: Luo *et al.* (2019).

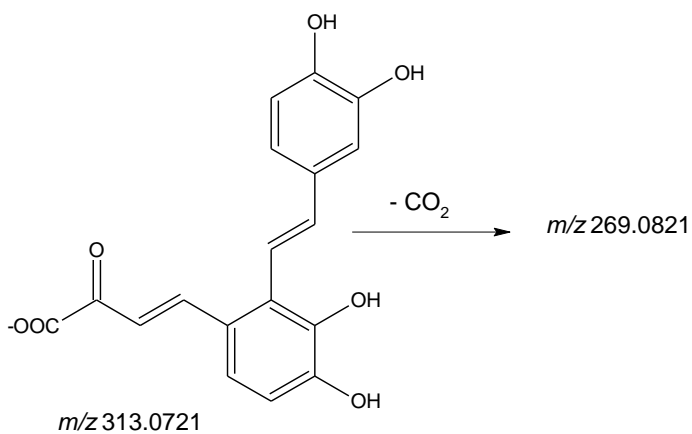


Figura 65: Descarboxilación del ácido salvianólico F a partir de los datos obtenidos para *Clinopodium sericeum*.

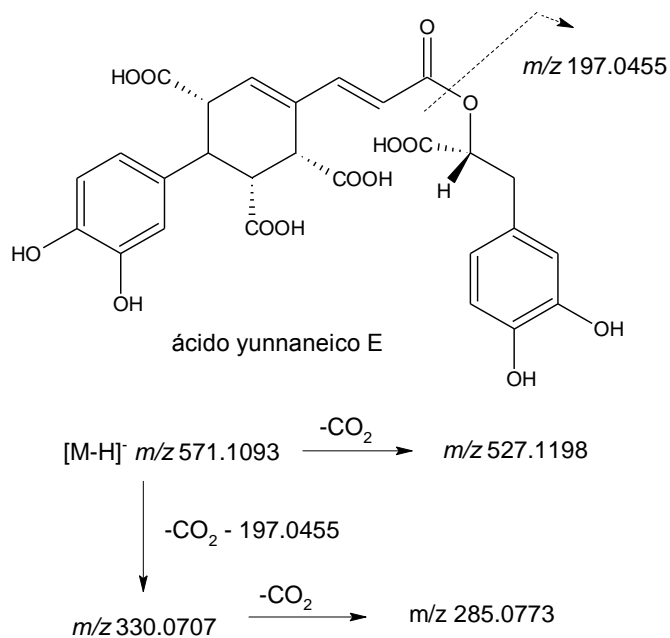


Figura 66: Planteamiento de fragmentación del ácido yunnaneico E a partir de los datos obtenidos para *Lepechinia floribunda*.

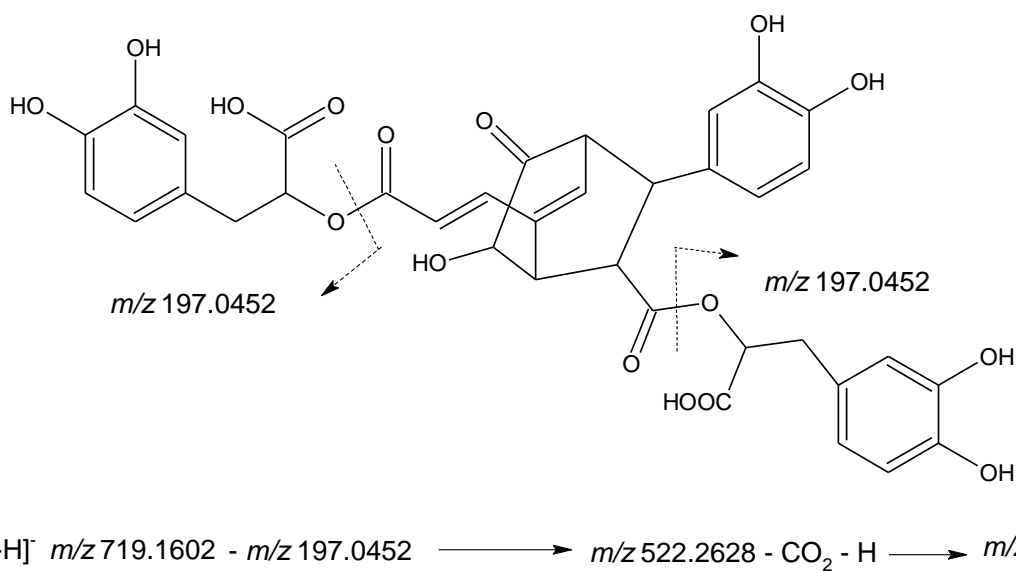


Figura 67: Planteamiento de fragmentación del ácido clerodendrónico H a partir de los datos obtenidos para *Lepechinia floribunda*.

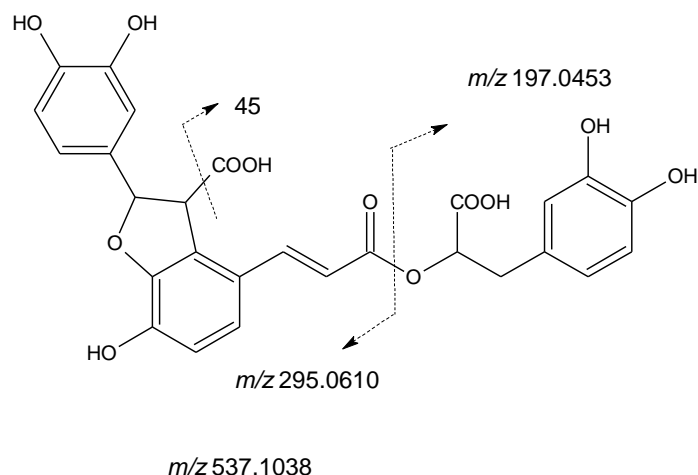


Figura 68: Fragmentación del ácido litospérmico en *Clinopodium sericeum* mostrando fragmentos de 493.1147 [M-CO₂-H]⁻ y de 295.0610 [493.1145- 197-H]⁻.

Es la primera vez que se reporta la presencia de este tipo de sustancias fenólicas en estas especies peruanas de *Menthae*. En este sentido, *Clinopodium sericeum* “romero de jalca”, y *Lepechinia floribunda*, presentan los perfiles metabólicos más interesantes que correlacionarían con estudios farmacológicos recientes respecto a los ácidos salvianólicos en el tratamiento de la fibrosis y el cáncer - entiéndase por fibrosis como una etapa crónica de muchas enfermedades que lleva a daño estructural de tejidos y disfunción orgánica ocasionada por ciertos insultos químicos, reacciones autoinmunes, radiación, respuestas alérgicas e infecciones persistentes que juegan un papel crucial en la destrucción del hígado, riñón, corazón y pulmón (Ma *et al.* 2019). El ácido salvianólico B, que es el componente hidrosoluble mayoritario en *Dan Shen* (*Salvia miltiorrhiza*) se viene estudiando intensamente por su efecto sobre las enfermedades neurodegenerativas (Zhao R. *et al.* 2019). En cambio muy poco se sabe del efecto del ácido clerodendranoico H, molécula de estructura particularmente exótica, hasta el momento solo la planta *Clerodendranthi spicata* “*Shen Cha*” (*Ajugoideae, Lamiaceae*) es la única fuente de esta molécula, dicha planta, en China se emplea para el tratamiento de la nefritis, cistitis y reumatismo (patente china del 2014, CN 103804185A). Tampoco se conoce mucho sobre el ácido yunnaneico E, aislado por primera vez de *Salvia yunnanensis* que es una planta sustituto de *Salvia miltiorrhiza* “*Dan Shen*” (Tanaka *et al.* 1997) y también presente en *Pulmonaria officinalis* (*Boraginaceae*) (Krzyzanowska *et al.* 2018).

En las especies del género *Lepechinia*, *Lepechinia meyenii* y *Lepechinia floribunda* además se encontraron los diterpenoides fenólicos con núcleo abietano, carnosol, isómeros del rosmanol y el ácido carnósico (Figura 69) esta última sustancia se sabe tiene actividad antioxidante (Richheimer *et al.* 1996). Su aislamiento usualmente requiere de atmósfera inerte (Paris *et al.* 1993).

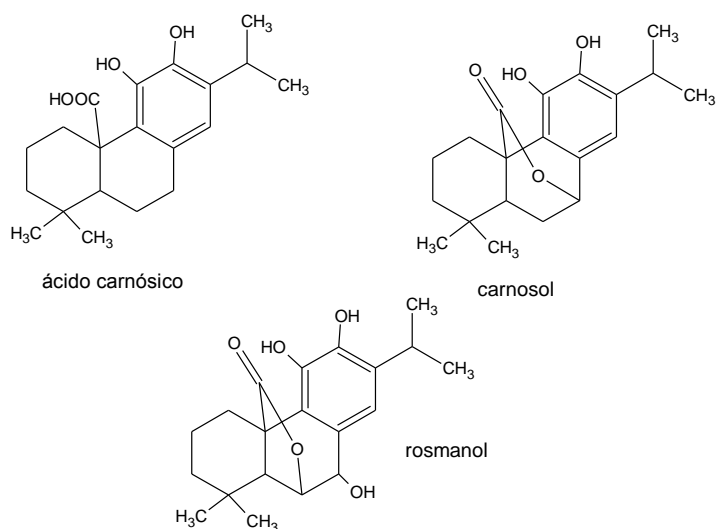


Figura 69: El ácido carnósico tiene un [M-H]⁻ de 331.1917, los isómeros del rosmanol 345.1711 y del carnosol 329.1761.

Además estructuras donde estos núcleos están hidroxilados, esterificados y oxidados. En *Lepechinia meyenii* además se ha detectado 7-*O*-acetilhorminona junto a isómeros de la dicetona salvinina y el abietano sageona. En cambio en *L. floribunda* están la horminona libre y también acetilada junto al rosmaridifenol (Figura 70). En *Salvia cuspidata* se ha podido detectar 5-epi-icetexona, descrito por Nieto *et al.* (2000) (Figura 9), agente bioactivo respecto a *Trypanosoma cruzii*. En esta misma planta se ha detectado el lignano isolariciresinol, cuyo isómero el lariciresinol está presente en *Salvia dombeyi* junto al oxaciclo cimifugina de propiedades antialérgicas (Wang *et al.* 2017) (Figura 70).

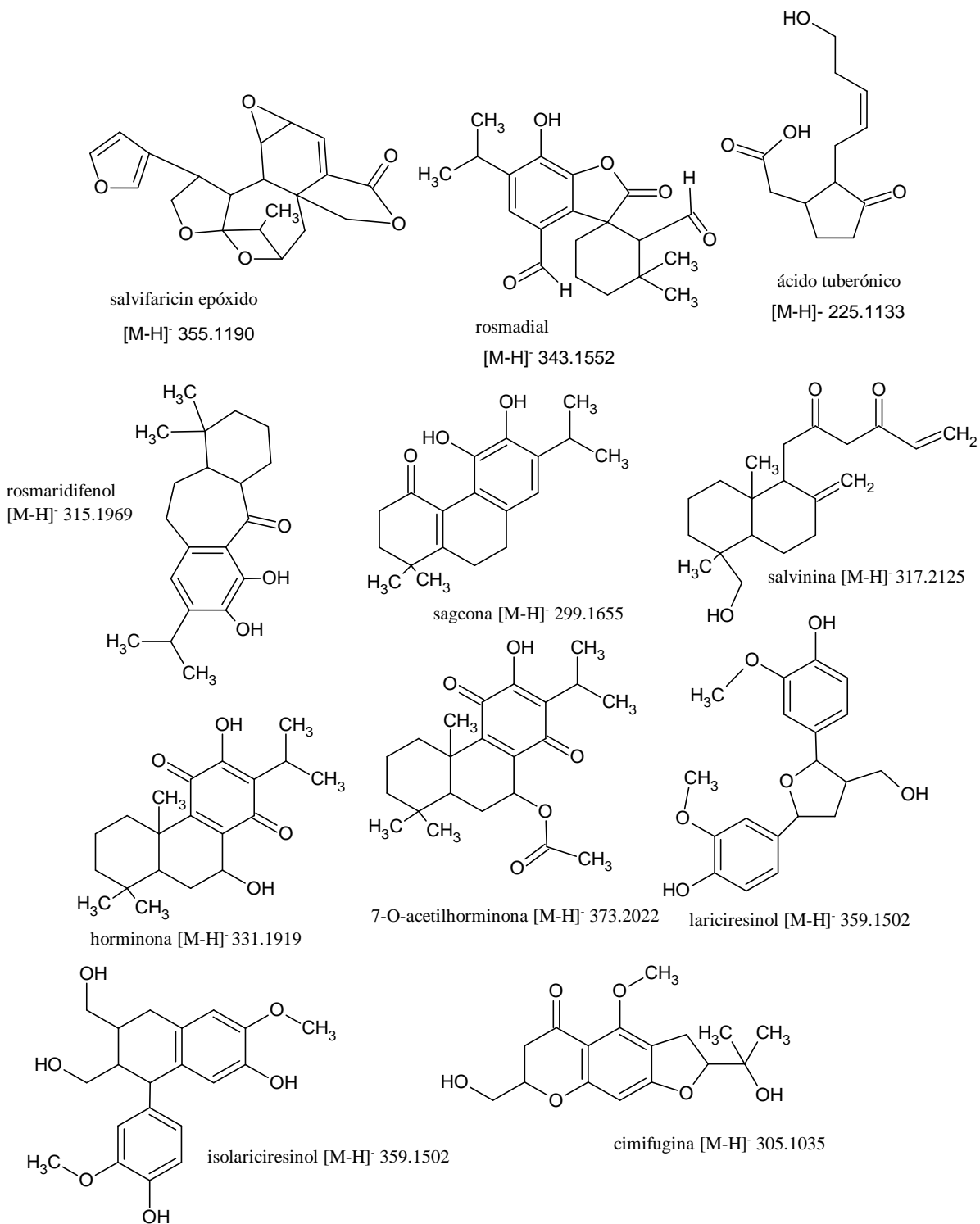


Figura 70: Diterpenoides de *Lepechinia* y componentes de *Salvia cuspidata* y *S. dombeyi*.

4.7. PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO A PARTIR DE *LEPECHINIA MEYENII*

Se trabajó utilizando los parámetros encontrados como resultado de la optimización de la extracción, es decir utilizando como extractante etanol al **20%**; temperatura de extracción de **60°C** y una relación de solvente/peso de muestra igual a **10** y el fraccionamiento según el esquema descrito en 3.14 . Las condiciones y resultados se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32: Condiciones y resultados del procedimiento optimizado para obtener ácido rosmarínico a partir de *Lepechinia meyenii*.

Condiciones	Experimento 1	Experimento 2
Gramos de planta	10.000	10.023
Porcentaje real de ácido rosmarínico en la planta (DAD-UHPLC)	5.69	5.69
Maceración con etanol 20%	(100 mL x 24 h)x3 veces a 60°C	(100 mL x 24 h)x3 veces a 60°C
Primer reparto con acetato de etilo	20 mL x 7 = 140 mL	20 mL x 7 = 140 mL
Gramos del extracto de acetato de etilo	1.0205	1.0205
Disolución en agua hirviendo	20 mL	20 mL
Segundo reparto con acetato de etilo	10 mL x 4 = 40 mL	10 mL x 4 = 40 mL
Gramos del nuevo extracto en AcOEt	0.5996	0.5872
Disolución en agua hirviendo	10 mL	10 mL
Gramos de ácido rosmarínico	0.2200	0.2211
Pureza DAD-UHPLC (a 330, 254 y 280 nm)	100% a tres longitudes de onda distintas.	100% a tres longitudes de onda distintas
Rendimiento en ácido rosmarínico (%)	2.20	2.21
Porcentaje de recuperación del ácido rosmarínico respecto al porcentaje real.	38.66	38.79

El porcentaje de rendimiento en ácido rosmarínico = (g ácido rosmarínico/g planta seca)*100.

El porcentaje de recuperación del ácido rosmarínico = (% de rendimiento/% real)*100.

La cristalización final se hizo por deshidratación al vacío tal como se describió en la Figura 26 y el producto que se obtuvo por análisis DAD-UHPLC da una pureza del 100% (Figura 71). Esto significa que no fue necesario nueva recristalización.

En el Anexo 3 se muestra la caracterización por $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ del producto obtenido en relación a (Wang *et al.* 1998 ; Gao *et al.* 2019).

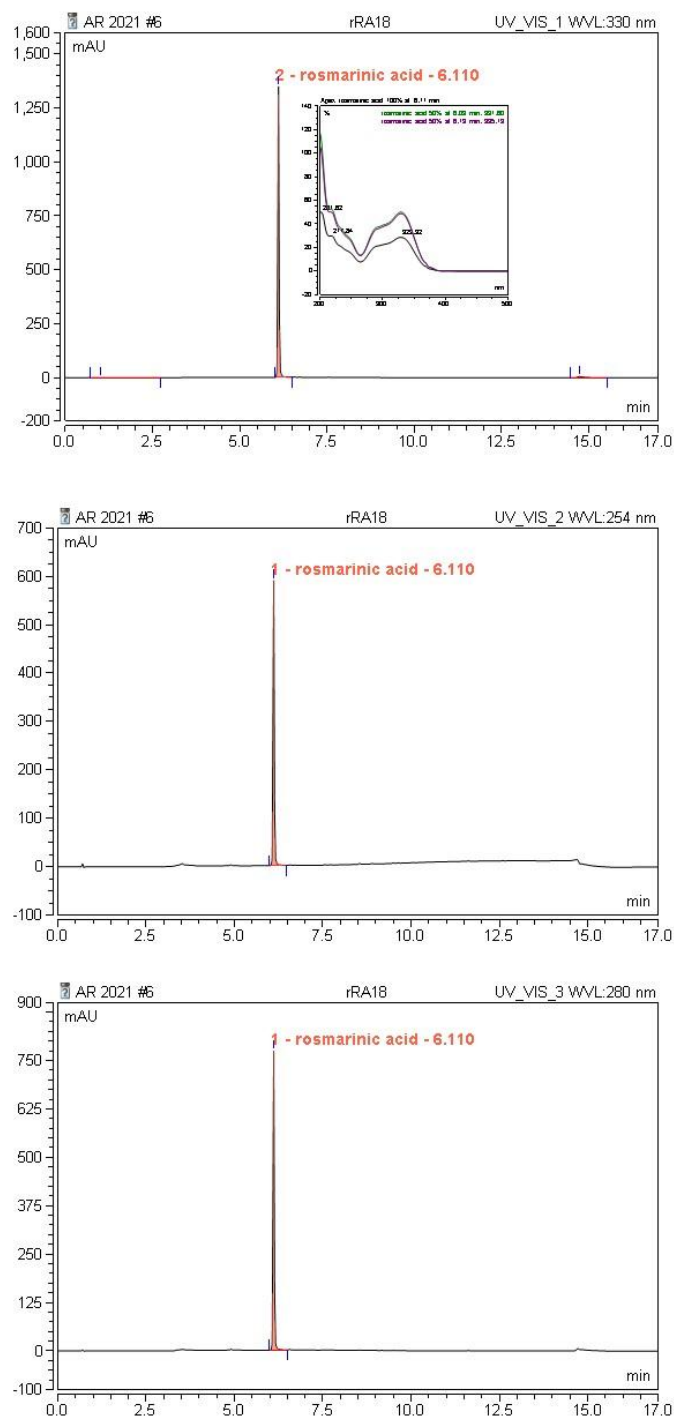


Figura 71: Cromatogramas mostrando el “ácido rosmarínico al 100% de pureza” del experimento optimizado a 330, 254 y 280 nm (Kellogg *et al.* 2019).

4.8. OBTENCIÓN DE ÁCIDO URSÓLICO A PARTIR DE *CLINOPODIUM REVOLUTUM*

En un trabajo previo con esta especie, Ludeña (2018) obtuvo ácido ursólico con 0.742% de rendimiento y pureza mayor al 95%. El procedimiento utilizó el material vegetal entero, lo que significa que la sustancia extraída correspondió a aquella segregada fuera de la célula vegetal, es decir en la cutícula de la hoja .

Para el presente trabajo, se planteó mejorar el rendimiento sin desmedro de la pureza utilizando vegetal triturado. Se consiguió un material vegetal con 4.48% de contenido en AU y 1.27% de AO cuando se emplea material triturado. Su contenido de AU en la misma muestra pero sin triturar se encontró solamente 3.00 % de AU y 0.9% de AO.

Así, utilizando el procedimiento descrito en 3.15, se obtuvo AU del 95.34% de pureza con 1.67% de rendimiento (37.28% de recuperación respecto al contenido real). En el Anexo 3 se muestra el espectro ¹HMRN y ¹³CRMN del producto.

4.9. OPTIMIZACIÓN DE CRISTALIZACIÓN DEL ÁCIDO URSÓLICO

Es posible mejorar la pureza del ácido ursólico por recristalización. Con este fin se utilizaron los datos de solubilidad del AU en etanol según Fan *et al.* (2011) (Tabla 33).

Tabla 33: Solubilidad del ácido ursólico en etanol. Fuente: Fan *et al.* (2011)

temperatura °C	solubilidad (mg AU/g etanol)	solubilidad (mg AU/mL etanol)	g de etanol para disolver 100 mg de AU	mL de etanol para disolver 100 mg de AU
20.45	5.10	4.08	19.61	24.51
26.95	7.61	6.09	13.14	16.43
32.05	7.30	5.84	13.70	17.12
36.85	7.56	6.05	13.23	16.53
46.95	10.39	8.31	9.62	12.03
50.05	10.41	8.33	9.61	12.00
56.55	16.34	13.07	6.12	7.65

Así, a partir de un material cristalino, “el recicristalizando”, con 91.15% de AU y 4.65% de AO se realizaron 4 experimentos de recicristalización lo que implicó disolver aproximadamente 50 mg de éste en volúmenes variables de etanol al 96% en viales herméticos y en una estufa a 60°C (Memmert UNB) para luego dejar enfriar espontáneamente durante 24 horas hasta temperatura ambiente final de 16.8°C, tiempo en el cual se dio la recicristalización, en todos los casos la apariencia de lo cristales fue de “agujas finas”, luego filtración y enjuague con dos porciones de 0.5 mL de etanol y análisis HPLC para verificar la pureza. Los resultados aparecen en la Tabla 34 y la Figura 72.

Tabla 34: Primer experimento de recuperación y pureza del ácido ursólico recicristalizado según la relación material/volumen solvente. (Recicristalizando de 91.15% de AU y 4.65% de AO).

% (masa/volumen) de recicristalizando en etanol del 96%	% de recuperación	% de pureza en AU del recicristalizado
0.84	39.53	95.51
0.88	40.46	95.57
0.99	51.09	98.52
1.39	38.07	99.47

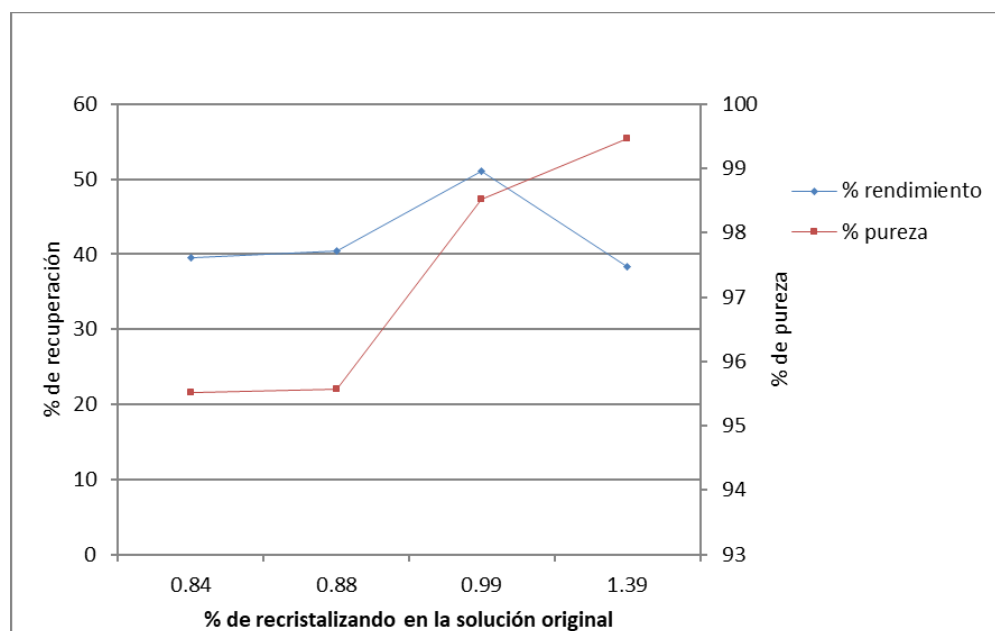


Figura 72: Primer experimento de optimización de la recicristalización de ácido ursólico .

A una concentración de recristalizando del 1% se recuperó más del 50% del ácido ursólico con una pureza mayor al 98% y menor al 99%. Así se tiene que si 100 mg de ácido ursólico con 91.15% de pureza se disuelven a 60°C en 10 mL de etanol al 96%, en 24 horas y a una temperatura final de 16.8°C producirán 50 mg de agujas de ácido ursólico con 98% de pureza.

En un experimento posterior pero utilizando un recristalizando con 89.84% de AU y 4.70% de AO se obtuvo los resultados que se muestran en la Tabla 35 y la Figura 73.

Tabla 35: Segundo experimento de porcentaje de recuperación y pureza del ácido ursólico recristalizado según la relación material/volumen solvente. (Recristalizando de 89.84% de AU y 4.70% de AO).

% (masa/volumen) de cristalizando en etanol al 96%	% de recuperación	% de pureza en AU del recristalizado
1.0	47.29	98.52
1.1	47.34	98.63
1.2	45.64	97.49
1.3	44.27	98.24

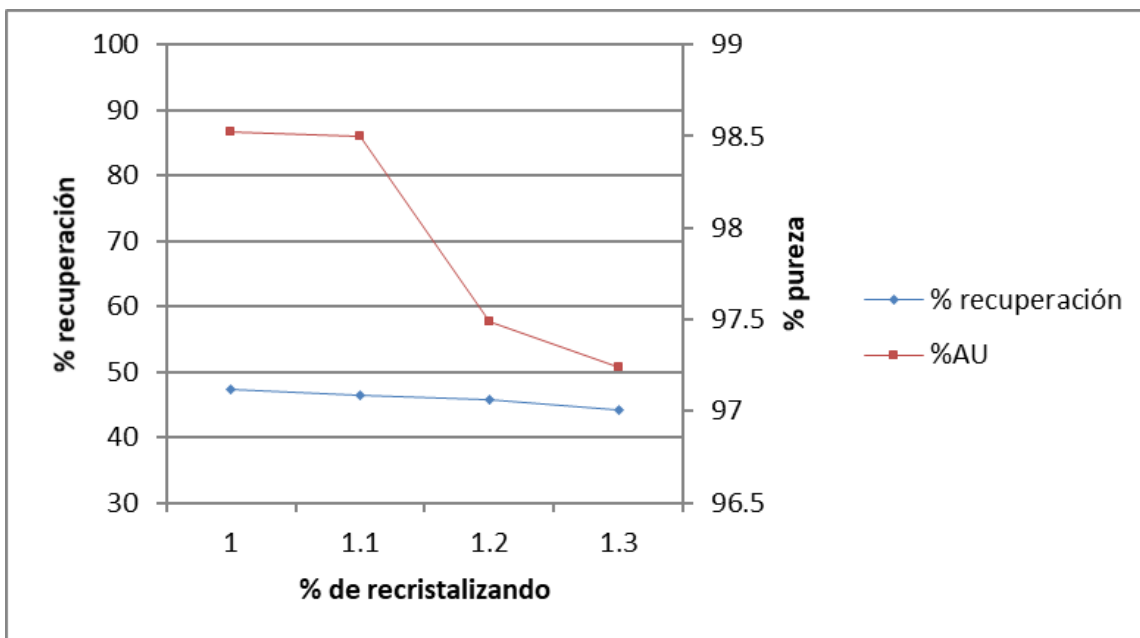


Figura 73: Rendimiento y grado de pureza de ácido ursólico obtenido mediante el segundo experimento de optimización de la recristalización.

En el rango de 1 a 1.3% de recristalizando respecto al etanol se recupera ahora poco menos del 50% con un porcentaje de pureza en AU mayor a 97.5 y menor a 98.7%. En el segundo experimento, tenemos que si 100 mg de AU con 89.84% de pureza se disuelven a 60°C en 10 mL de etanol al 96%, en 24 horas y a una temperatura final de 15.8°C producirán 47.3 mg de agujas de ácido ursólico con 98.52 % de pureza (Figura 74).

Según los resultados de los dos experimentos se determinó que 1000 mg de material con aproximadamente 90 % de AU se deben recristalizar de 100 mL etanol al 96%, se recuperarán 500 mg de cristales con pureza mayor al 98%.

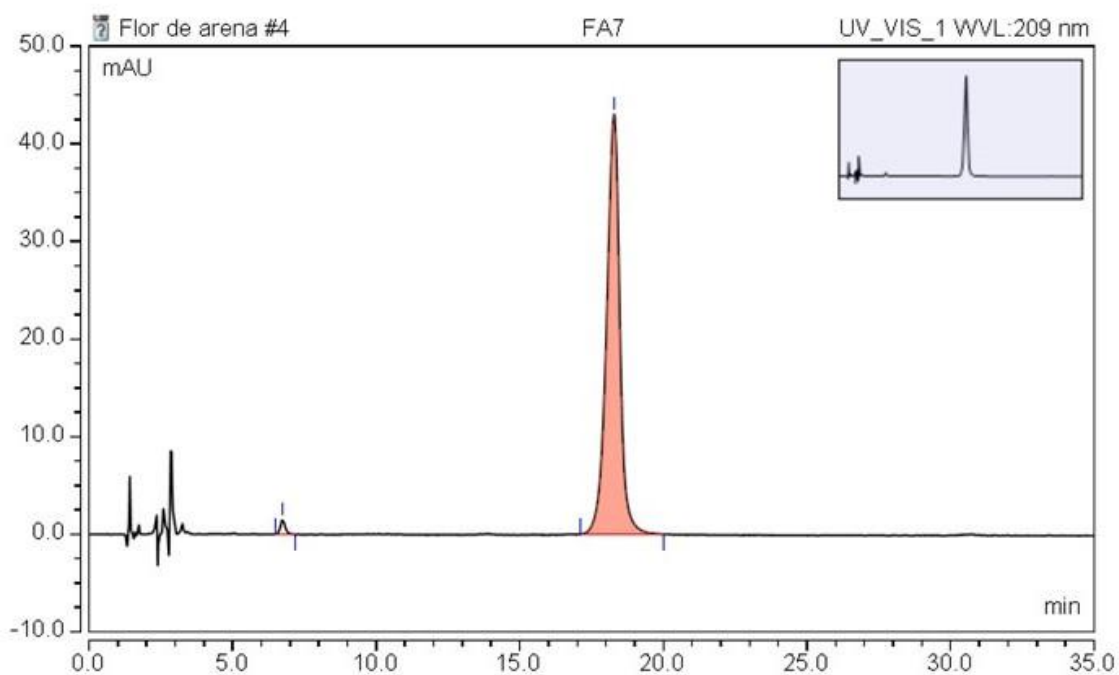


Figura 74: Cromatograma del ácido ursólico al 98.52% de pureza.

4.10. CARACTERIZACIÓN DE LA INFUSIÓN ACUOSA DE TRECE ESPECIES PERUANAS DE *MENTHEAE*

Los resultados del análisis de fenoles totales, capacidad antioxidante y contenido en ácido rosmarínico de las infusiones acuosas (resultado de infusionar 50 mg de planta con 10 mL de agua hirviente y abandono durante diez minutos) aparecen en la Tabla 36.

Tabla 36: Fenoles totales, capacidad antioxidante y contenido en ácido rosmarínico de las trece infusiones de *Mentheae*.

Muestra	Fenoles totales (mg ácido gálico/10mL)	Actividad Antioxidante (mg vitamina C/10 mL)	mg AR/10 mL
<i>Lepechinia meyenii</i>	6.32±0.18	5.22±0.04	3.27±0.03
<i>Clinopodium brevicalyx</i>	4.08±0.05	2.72±0.02	0.90±0.01
<i>Salvia oppositiflora</i>	2.19±0.01	1.82±0.26	0.21±0.01
<i>Lepechinia floribunda</i>	3.61±0.23	2.45±0.20	0.98±0.01
<i>Minthostachys mollis</i>	2.07±0.00	1.53±0.24	0.26±0.00
<i>Salvia sagittata</i>	3.25±0.05	2.19±0.04	0.79±0.01
<i>Salvia cuspidata</i>	3.96±0.09	2.84±0.16	0.41±0.00
<i>Clinopodium revolutum</i>	3.72±0.03	2.46±0.17	0.32±0.01
<i>Clinopodium sericeum</i>	4.20±0.12	2.96±0.06	0.39±0.01
<i>Salvia haenkei</i>	2.08±0.01	1.63±0.18	0.22±0.00
<i>Salvia dombeyi</i>	1.65±0.02	0.88±0.13	No detectado
<i>Hedeoma mandoniana</i>	2.00±0.03	1.65±0.22	0.02±0.00
<i>Clinopodium pulchellum</i>	1.49±0.01	1.14±0.15	0.05±0.00

Los valores representan el promedio de tres repeticiones.

También, en todos los casos se analizó el contenido de ácidos triterpénicos pero no se encontró en ninguna de las trece infusiones acuosas incluso en la muestra 8, *Clinopodium revolutum*, la planta con el mayor contenido de ácido ursólico en su extracto etanólico. Por eso con esta muestra se hizo una decocción con 10 mL de agua tal que, a partir de 63.8 mg de muestra (2.55% AO + 4.81% AU) se extrajeron 44 µg de AO y 126 µg de AU, lo que implica un 2.70 % de extracción de AO respecto al contenido real en la planta, y de un 4.10% para el AU. De esta manera, se encontró que todas las infusiones acuosas de *Mentheae* contenían ácido rosmarínico, lo que apoya su uso medicinal. Por el contrario, no se detectó ácidos triterpénicos en las infusiones acuosas de las mismas. Sin embargo, el decocto de *Clinopodium revolutum*, exhibió una cantidad de ácidos triterpénicos que sugiere que en esta forma de uso hay acción conjunta de ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido rosmarínico.

V. CONCLUSIONES

1. En el extracto etanólico de las trece especies de *Mentheae*, por cromatografía en capa fina, se detectaron principalmente el ácido rosmarínico y los ácidos triterpénicos, ácido oleanólico y ácido ursólico. En este extracto se ha cuantificado los fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinnámicos totales y la capacidad antioxidante. En general, se encontró una correlación en la que la mayor concentración de compuestos fenólicos otorga mayor actividad antioxidante. *Lepechinia meyenii* es la muestra con mayor concentración de fenoles totales, ácidos hidroxicinnámicos totales y mayor capacidad antioxidante total.
2. El análisis DAD-UHPLC de los extractos en etanol permitió cuantificar la concentración de ácido rosmarínico en todas las muestras, excepto en *Salvia dombeyi*. La muestra con mayor concentración de ácido rosmarínico fue *Lepechinia meyenii* con 4.61%.
3. El extracto etanólico por análisis DAD-HPLC, mostró las concentraciones de ácido oleanólico y ácido ursólico en todas las muestras, la planta con mayor contenido fue *Clinopodium revolutum* cuyo contenido en ácido oleanólico y ácido ursólico es 2.55 y 4.81%, respectivamente.
4. Para poder obtener ácido rosmarínico a escala preparativa se definió el mejor sistema extractante con *Lepechinia meyenii* utilizando metodología superficie-respuesta Box – Behnken. Para un tiempo de maceración de diez minutos, las mejores condiciones fueron: Concentración de etanol: 20%; Temperatura: 60°C; Relación solvente/muestra: 10 mL/g. Posteriormente se determinó que tres eventos de extracción extraen la “totalidad” del ácido rosmarínico.

5. Con este sistema extractante se cuantificó ácido rosmarínico en las trece especies de *Menthae*, obteniéndose mayor concentración de éste en casi todos los casos. Siendo así éstas las concentraciones reales de ácido rosmarínico. *Lepechinia meyenii* fue la muestra con mayor contenido en ácido rosmarínico: 8.12%. Se notó que a mayor concentración de ácido rosmarínico, menor concentración de ácidos triterpénicos y viceversa.

6. Con el extracto etanólico de las trece *Menthae* y utilizando cromatografía UHPLC hifenada a espectrometría de masas de alta resolución ESI- ORBITRAP se hizo el perfil de componentes fenólicos. La información obtenida fue de naturaleza cualitativa. Todas las muestras exhibieron ácido rosmarínico, incluso *Salvia dombeyi*. *Lepechinia meyenii* y *Lepechinia floribunda* mostraron los diterpenoides fenólicos ácido carnósico, carnosol, rosmanol y otros diterpenoides como la sageona, la horminona y 7-*O*-acetilhorminona, rosmaridifenol e isómeros de salvinina. El “danshensu” (ácido 3,4-dihidroxifenil-láctico) estuvo presente en diez especies, el aldehído protocatechuico en once y el ácido cafeico en diez. En varias muestras estuvieron presentes los llamados ácidos clorogénicos o ácidos cafeoilquínicos, así en *Minthostachys mollis* se encontró cuatro ácidos clorogénicos. En todas las muestras además, se ha detectado diversidad de flavonoides (flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanonoles) tanto libres como glicosilados. La diversidad de flavonoides es más notable en *Minthostachys* y *Clinopodium*. Lo más interesante ha sido la detección de ácidos salvianólicos: En *Lepechinia meyenii*, el ácido sagerínico, una molécula que implica un anillo ciclobutano estabilizado y el ácido clerodendranoico H, molécula poca conocida detectada en *Clerodendrum spicatum* Thunb. (*Lamiaceae*, *Ajugoideae*). Igualmente en *Lepechinia floribunda*, además del ácido sagerínico se encontró el ácido yunnaneico E y el ácido clerodendranoico H. En *Clinopodium brevicalyx* y *Hedeoma mandoniana* se detectó el ácido salvianólico B, sustancia particularmente importante por su efecto en las enfermedades neurodegenerativas. *Clinopodium pulchellum* contiene el ácido salvianólico A y también el ácido salvianólico F. Pero la planta con mayor diversidad de ácidos salvianólicos es *Clinopodium sericeum* pues en ella se han encontrado el ácido

litospérmico, el ácido salvianólico B, dos isómeros del ácido salvianólico A y dos isómeros del ácido salvianólico F. Este tipo de sustancias son muy importantes por su efecto en la fibrosis celular (formación de cicatrices) en directa relación con el cáncer.

7. Utilizando el sistema extractante optimizado en *Lepechinia meyenii*, seguido de particiones con acetato de etilo y cristalización por deshidratación al vacío se pudo recuperar hasta un 39% del ácido rosmarínico contenido en la planta dando un producto con pureza mayor al 99%. Puede utilizarse como estándar cromatográfico y para ensayos biológicos.
8. A partir del extracto etanólico obtenido de *Clinopodium revolutum* previamente desengrasado, por adsorción en gel de sílice y elución de menor a mayor polaridad seguido de cristalización por enfriamiento se recuperó hasta un 37% del ácido ursólico contenido en la planta con una pureza mayor al 95%. Este producto por recristalización alcanzó purzas del 98-99% con un rendimiento del 50% respecto al material de partida. Puede utilizarse como estándar cromatográfico y para ensayos biológicos.
9. Las infusiones acuosas de las trece especies de *Menthae* mostraron todas, actividad antioxidante y concentraciones diversas de ácido rosmarínico, siendo el caso más significativo, *Lepechinia meyenii*. En ninguna de las infusiones se pudo detectar la presencia de ácidos triterpénicos. La decocción de *Clinopodium revolutum* si mostró la presencia de los ácidos oleanólico y ursólico que significó una extracción menor al 5% del contenido real. Así, la presencia de los ácidos rosmarínico, oleanólico y ursólico explica de algún modo el uso tradicional de estas especies. Es notable el hecho que *L. meyenii* “Puna Salvia” y *C. revolutum* “Flor de arena” sean metabólicamente las más interesantes y a la vez las de mayor tradición etnofarmacológica.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda hacer el escalamiento de los procedimientos preparativos descritos para la recuperación de ácido rosmarínico y ácido ursólico.
2. Como todas las especies estudiadas son silvestres, es altamente recomendable la domesticación o cultivo *in vitro* de las mismas para evitar actividades extractivas depredatorias.
3. Es recomendable ampliar esta investigación para determinar los metabolitos presentes en las raíces, ya que existen estudios que demuestran la presencia de tanshinonas bioactivas importantes en especies asiáticas.
4. En todos los casos, particularmente en *Lepechinia floribunda*, *Salvia cuspidata* y *Salvia dombeyi* debe hacerse análisis fitoquímico orientado a los diterpenoides, ya que de acuerdo a los perfiles metabólicos encontrados se presume que la posibilidad de encontrar estructuras nuevas es alta. También se debe estudiar los extractos polares o acuosos de *Lepechinia floribunda* y *Clinopodium sericeum* enfocado a obtención de ácidos salvianólicos.
5. Esta investigación corresponde a un estudio inicial de caracterización metabólica de plantas medicinales peruanas que debería replicarse para abarcar un mayor número de especies de nuestra biodiversidad.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrankó, L.; Clifford, M. 2017. An unambiguous nomenclature for the acyl-quinic acids commonly known as chlorogenic acids. *J. Agricultural & Food Chemistry* 65 (18), 3602-3608.

Abu Reidah, I.; Arráez, D.; Quirantes, R.; Fernández, S.; Segura, A.; Fernández, A. 2012. HPLC–ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. *Food Res. Int.* 46, 108-117.

Ahmed, B.; Al-Howiriny, T.; Al-Rehaily, A.; Mossa, J. 2004. Verbenacine and Salvinine: Two New Diterpenes from *Salvia verbenaca*. *Z. Naturforsch.* 59C, 9-14.

Almanza, G.; Balderrama, L.; Labbé, C.; Lavaud, C.; Massiot, G.; Nuzillard, J.; Connolly, J.; Farrugia, L.; Rycroft, D. 1997. Clerodane diterpenoids and an ursane triterpenoid from *Salvia haenkei*. Computer- assisted structural elucidation. *Tetrahedron* 53, 14719-14728.

Amoah, S.; Sandjo, L.; Kratz, J.; Biavatti, M. 2016. Rosmarinic acid-pharmaceutical and clinical aspects. *Planta Medica* 82, 388-406.

Anderson N. 2012. Practical Process Research and development: A guide for organic chemists. p. 337. 2nd Ed. Academic Press 2012.

Aydi, A.; Claumann, C.; Wüst, A.; Abderrabba, M. 2016. Differential Scanning Calorimetry Data and Solubility of Rosmarinic Acid in Different Pure Solvents and in Binary Mixtures (Methyl Acetate + Water) and (Ethyl Acetate + Water) from 293.2 to 313.2 K. *J. Chem. Eng. Data* 61(11), 3718-3723(2016).

Babaei, M.; Zamfir, G.; Chen, X.; Christensen, H.; Kristensen, M.; Nielsen, J.; Borodina, I. 2020. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for rosmarinic acid production. *ACS Synthetic Biology* 9, 1978-1988.

- Bag, G.; Grinhajali, P.; Bhaigyabati, T. 2015. Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 30(1), 154-159.
- Bahadori, M.; Zengin, G.; Bahadori, S.; Dinparast, L.; Movahhedin. 2018. Phenolic composition and functional properties of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha*(Stapf.)Briq.). *International J. Food Properties* 21, 198-208.
- Barros, L.; Dueñas, M.; Dias, M.; Sousa, M.; Santos, C.; Ferreira, I. 2013. Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chemistry* 136, 1-8.
- Berker, K.; Guglú, K.; Tor, I.; Demirata, B.; Apak R. 2010. Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/Prussian blue method. *Food Analytical. Methods.* 3(3), 154-168.
- Bottger, A.; Vothknecht, U.; Bolle, C.; Wolf, A. 2018. *Lessons on caffeine, cannabis & co.* Springer Verlag.
- Boudair, T.; Lozano, J.; Boulaem, H.; del Mar, M.; Segura, A. 2019. Phytochemical characterization of bioactive compounds composition of *Rosmarinus eriocalyx* by RP-HPLC-ESI-QTOF-MS. *Natural Prods. Res.* 33, 2208-2214.
- Bräuchler, C.; Heubl, G.; Meimberg, H. 2010. Molecular Phylogeny of *Menthinae* (*Lamiaceae*, *Nepetoideae*, *Mentheae*)-taxonomy, biogeography and conflicts. *Molecular Phylogenetics & Evolution* 55(2), 501-523.
- Brito, A.; Ramírez, J.; Areche, C.; Sepúlveda, B.; Simirgiotis, M. 2014. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three *Citrus* Species Consumed in Northern Chile. *Molecules* 19, 17400-17421.
- Bruno, M.; Savona, G.; Piozzi, F.; de la Torre, M.; Rodriguez, B.; Marlier, M. 1991. Abietane diterpenoids from *Lepechinia meyenii* and *Lepechinia hastata*. *Phytochemistry* 30(7), 2339-2343.

Bulgakov, V.; Inyushkina, Y.; Fedoreyev, S. 2012. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Current Reviews in Biotechnology* 32(3), 203-217.

Cannell R. 1998. *Natural Products Isolation*. 1st Ed. Humana Press.

Carocho, M.; Ferreira, C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51, 15-25.

Castillo P. 2004. Estudio químico y de actividad antioxidante de *Lepechinia meyenii* (Walp.). Tesis Maestría en Química PUCP. nnn,m

Chaprin, N.; Ellis, B. 1984. Microspectrophotometric evaluation of rosmarinic acid accumulation in single cultured plant cells. *Canadian J. Botany* 62, 2278-2282.

Chen, Y.; Yu, H.; Wu, H.; Pan, Y.; Wang, K.; Jin, Y.; Zhang C. 2015. Characterization and quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in pollen *Typhae* for transformation rule exploration. *Molecules* 20, 18352-18366.

Chianese, G.; Golin, S.; Tagliatela, O.; Collado, J.; Muñoz, E.; Appendino, G.; Pollastro, F. 2019. Bioactive triterpenoids from the caffeine rich plants guayusa and mate. *Food Research International* 115, 504-510.

Christ, B.; Kesselring, K. 1980. Process for isolating rosmarinic acid from plants. U.S. Patent 4,354,035.

Coll, J.; Bowden B. 1986. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. *J. Natural Products* 49, 934-936.

Coquerel, G. 2014. Crystallization of molecular systems from solution: phase diagrams, supersaturation and other basic concepts. *Chem. Soc. Reviews* 43, 2286-2300.

Crespo, M.; Funes, M.; Ailín, P.; Joray, M.; Palacios, S.; Vera, D.; Carpinella M. 2019. Inhibitory effects of compounds isolated from *Lepechinia meyenii* on tyrosinase. *Food and Chemical Toxicology*. doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.019.

- Das, A.; Dewanjee, S. 2018. Chapter 3. Optimization of extraction using mathematical models and computation, in Sarker, S.; Nahar L. (Eds.), Computational Phytochemistry. Elsevier.
- De Falco, B.; Lanzotti V. 2018. NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics analysis of *Salvia*. Phytochemistry Reviews 17, 951-972.
- De Melo, M.; Silvestre, A.; Silva, C. 2014. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. The J. of Supercritical Fluids 92, 115-176.
- Dimitrova, D.; Simeonova, R.; Gevrenova, R.; Savov, Y.; Balanova, B.; Nasar, G.; Bardarov, K.; Danchev, N. 2019. In vitro toxicity assesment of *Clinopodium vulgare* L. wáter extract characterized by UHPLC-HRMS. Food and Chemical Toxicology 134, 110841.
- Ding, H.; Wang, Y.; Gao, Y.; Han, X.; Liu, S.; Tang, G.; Li, J.; Zhao, D. 2017. Purification of wedelolactone from *Eclipta alba* and evaluation of antioxidant activity. Separation Science and technology 52(17), 2732-2741.
- Drew, B.; Sytsma, K. 2011. Testing the Monophyly and placement of *Lepechinia* in the tribe *Menthae* (*Lamiaceae*). Systematic Botany 36(4), 1038-1049.
- Drew, B.; Sytsma, K. 2012. Phylogenetics, Biogeography, and staminal evolution in the tribe *Menthae* (*Lamiaceae*). American J. Botany 99(5), 933-953.
- Drew, B.; Sytsma, K. 2013. The southamerican radiation of *Lepechinia* (*Lamiaceae*): phylogenetics, divergence times and evolution of dioecy. Botanical J. of the Linnean Society 171, 171-190.
- Epling, C. 1927. Studies on SouthAmerican Labiatae III. Synopsis of the Genus *Satureia*. Annals of the Missouri Botanical Garden 13, 47-86.
- Epling, C. 1944. Supplementary Notes on American Labiatae-III. Bulletin of the Torrey Botanical Club 71(5), 484-497.
- Epling, C. 1948. A synopsis of the tribe *Lepechiniae* (*Labiatae*). Brittonia 6(3), 352-364.

- Epling, C.; Mathias, M. 1957. Supplementary Notes on American Labiatae-VI. *Brittonia* 8(4), 297-313.
- Epling, C. 1960. Labiatae Juss. in MacBride J. 1960. Flora of Peru XIII- Field Museum of Natural History- Botany-XIII, pags. 721-829, V,2, December 9.
- Epling, C.; Jativa, C. 1963. Supplementary Notes on American Labiatae-VIII. *Brittonia* 15, 366-376.
- Epling, C.; Jativa, C. 1964. Revisión del género *Satureja* en América del Sur. *Brittonia* 16, 393-416.
- Ernst, M.; Brentan, D.; Silva, R.; Vencio, R.; Peporine, N. 2014. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. *Natural Products Reports* 31, 784-806.
- Ertas, A.; Boga, M.; Yilmaz, M.; Yesil, Y.; Tel, G.; Temel, H.; Gazioglu, I.; Hasimi, N.; Ozturk, M.; Ugurlu, P. 2015. A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymus nummularius* (Anzer tea): Rosmarinic acid. *Industrial Crops and Products* 67, 336-345.
- Fabre, N.; Rustan, I.; de Hoffmann, E.; Quetin, J. 2001. Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 12, 707-715.
- Fan, J.; Kong, T.; Tian, Z.; Duan, Y.; Tong, S.; Zhang, X.; Zhang, L. 2011. Solubilities of Ursolic Acid and Oleanolic Acid in Four Solvents from (283.2 to 329.7) K. *J. Chem. Eng. Data* 56(5), 2723-2725.
- Fan, J.; Kong, T.; Zhang, X.; Zhang, L. 2012. Solubilities of oleanolic acid and ursolic acid in (ethanol + water) mixed solvents from T = (292.2 to 328.2) K. *J. Chemical Thermodynamics* 47, 372-375.

Fan, J.; Cao, Y.; Zhang, X.; Jiang, D. 2017. Determination and Modeling of the Solubilities of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in Ethanol + Sodium Hydroxide + Water Mixed Solvents from T = 283.2 to 323.2 K. J.Chem. Eng. Data 62 (11), 3991-3997.

Fajardo, S. ; Valencia, A.; Serrano C. 2007. Estudio de la composición y actividad antioxidante de *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epl. (*Lamiaceae*). XXIII Congreso Peruano de Química.Lima.

Fernández, G.; Fernández, I.; Hammond, G. 1996. Investigation of essential oils of *Senecio tephrosoides* and *Salvia oppositiflora*. R. Latinoamericana de Química 25, 14-16.

Fialová, S.; Slobodnikova, L.; Veizerova, L.; GranCai, D. 2015.*Lycopus europaeus*: phenolic fingerprint, antioxidant activity and antimicrobial effect on clinical *Staphylococcus aureus* strains. Natural Products Research, doi.org/10.1080/14786419.2015.1010086.

Fischer, U.; Jacksh, A.; Carle, R.; Kammerer, D. 2012. Determination of Lignans in Edible and Nonedible Parts of Pomegranate (*Punica granatum* L.) and Products Derived Therefrom, Particularly Focusing on the Quantitation of Isolariciresinol Using HPLC-DAD-ESI/MSn. J. Agricultural & Food Chemistry 60, 283-292.

Fournet, A.; Rojas, B.; Charles, B.; Bruneton, J. 1996. Chemical constituents of essential oils of Muña bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chaga's disease vectors. J. Ethnopharmacology 52, 145-149.

Fragoso-Martinez, I; Martinez, M.; Salazar, G.; Sazatornil, F.; Jenks, A.; García, M.; Barrera, G.; Benitez, S.; Magallón, S.; Cornejo, C.; Granados, C. 2018. Phylogeny of the neotropical sages (*Salvia*, subg. *Calosphace*; *Lamiaceae*) and insights into pollinator and área shifts. Plant Systematics and Evolution 304, 43-55.

Gálvez, M.; Martín, C.; Houghton, P.; Ayuso, M. 2005. Antioxidant Activity of Methanol Extracts Obtained from *Plantago* Species. J. Agric. & Food Chem. 53, 1927-1933.

Gani, U.; Vishwakarma, R.; Misra, P. 2020. Membrane transporters: the key drivers of transport of secondary metabolites in plants. Plant Cell Reports <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02599-9>.

Gao, Y., Sicker, D., Zeller, K., Siehl, H., Berger, S. Rosmarinic acid in Sicker, D., Zeller, K., Siehl, H., Berger, S. (Eds.).2019. Natural Products: Isolation, Structure Elucidation, History. 391-410. Wiley-VCH.

Gil, M.; Wianowska, D.2017. Chlorogenic acids-their properties, occurrence and analysis. Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska Lublin Polonia LXXII, 61-104.

Gil, M.; Wianowska, D.2018. Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. Phytochemistry Reviews 10.1007/s11101-018-9592-y.

Giral, F. 1978. Enseñanza de la Química Experimental. Monografía N°6 Serie Química.OEA.

Giri, S.; Diefendorf, A.; Lowell, T. 2015. Origin and sedimentary fate of plant derived terpenoids in a small river catchment and implications for terpenoids as quantitative paleovegetation proxies. Organic Geochemistry 82, 22-32.

Goossens, A., Osbourn, A., Michoux, F., & Bak, S. 2018. Triterpene messages from the EU-FP7 project TriForC. Trends in Plant Science, 23(4), 273-276.

Grabowska, K.; Zmudzki, P.; Wrobel, D.; Podolak, I. 2021. Simultaneous quantification of ursolic and oleanolic acids in *Glechoma hederacea* and *Glechoma hirsute* by UPLC/MS/MS. Planta Medica 87, 305-313.

Greaves, J.; Roboz, J. 2014. Mass spectrometry for the novice. CRC Press Taylor & Francis Group 2014.

Gu, D.; Yang, Y.; Abdulla, R.; Aisa, H. 2012. Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight tandem mass spectrometry. Rapid Comm. in Mass Spectrometry 26, 83-100.

Guo, Z.; Liang, X.; Xie, Y. 2019. Qualitative and quantitative analysis on the chemical constituents in *Orthosiphon stamineus* Benth. using ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Pharmaceutical & Biomedical Analysis 164, 135-147 (2019).

- Gurbuz, P.; Baran, M.; Demirezer, L.; Guvenalp, Z.; Kuruuzum, A. 2018. Phenylacylated flavonoids from *Peucedanum chryseum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 28, 228-230.
- Hahold, A. y Kroeger, A. 1990. Superación de la enfermedad en las alturas de los andes del Perú. CMA 1990.
- Hamzah, A.; Lajis, N. 1998. Chemical constituents of *Hedyotis herbacea*. ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation. Article II.
- Harborne, J. 1996. *Phytochemical Methods*. Chapman-Hall.
- Harley, J.; Granda, A. 2000. List of species of Tropical American *Clinopodium (Labiatae)*, with new combinations. *Kew Bulletin* 55(4), 917-927.
- Häusler, E.; Petersen, M.; Alfermann, W. 1993. Isolation of proplasts and vacuoles from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth. *Plant Cell Reports* 12, 510-512.
- Hitl, M.; Kladar, N.; Gavaric, N.; Bozin, B. 2021. Rosmarinic Acid–Human Pharmacokinetics and Health Benefits. *Planta Medica* 87, 273-282.
- Hossain, M.; Brunton, N.; Barry, C.; Martin, A.; Wilkinson, M. 2008. Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants. *Rasayan J. Chemistry* 1(4), 751-756.
- Hostettmann, K.; Marston, A.; Hostettmann, M. 1998. *Preparative Chromatographic Techniques. Applications in Natural Products isolation*. Springer Verlag.
- Houghton, P.; Raman, A. 1998. *Laboratory Handbook for the fractionation of natural extracts*. Chapman & Hall.
- Jacotet, M.; Laguerre, M.; Fabiano, A.; Tenon, M.; Feuillere, N.; Bily, A.; Chemat, F. 2018. What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts. *Electrophoresis* 39(15), 1946-1956.

- Jager, S.; Trojan, H.; Kopp, T.; Laszczyk, M.; Scheffler, A. 2009. Pentacyclic triterpene distribution in various plants- rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* 14, 2016-2031.
- Janicsák, G.; Máthé, I. 1997. Parallel determination of rosmarinic and caffeic acids by TLC-densitometry. *Chromatographia* 46 (5/6)322-324.
- Janicsák, G.; Máthé, I.; Mikklósy, V.; Blunden, G. 1999. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of *Lamiaceae* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 27(7), 733-738.
- Janicsák, G.; Veres, K.; Kakasy, A.; Máthé, I. 2006. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the *Lamiaceae*. *Biochemical & Systematics Ecology* 34, 392-396.
- Jenks, A.; Seung-Chul, K. 2013. Medicinal plant complexes of *Salvia* subgenus *Calosphace*: An ethnobotanical study of new world sages. *J. Ethnopharmacology* 146(1), 214-224.
- Jenks, A. 2009. Systematics and Ethnobotany of *Salvia* subgenus *Calosphace* and origins of the hallucinogenic Sage, *Salvia divinorum*. PhD Theses, University of California-Riverside.
- Justesen U. 2001. Collision induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. *J. of Mass Spectrometry* 36, 169-178.
- Kashiap, D.; Singh, H.; Sharma, A. 2016. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sciences* 146, 201-213.
- Keckes, S.; Gasic, U.; Circovij, T.; Milojkovic, D.; Natic, M.; Tesic, Z. 2013. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chem.* 138, 32-40.
- Kellogg, J.; Paine, M.; McCune, J.; Oberlies, N.; Cech, N. 2019. Selection and characterization of botanical natural products for research studies : a NaPDI center recommended approach. *Natural Products Reports* DOI: 10.1039/c8np00065d.

- Kim, S.; Lotz, B.; Lindrud, M.; Girard, K.; Moore, T.; Nagarajan, K.; Alvarez, M.; Lee, T.; Nikfar, F.; Davidovich, M.; Srivastava, S.; Kiang S. 2005. Control of the particle properties of a drug substance by crystallization engineering and the effect on drug formulation . *Organic Process Research and Development* 9, 894-901.
- Kim, H.; Verpoorte, R. 2010. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis* 21(1), 4-13.
- Kremr, D.; Bajer, T.; Bajerova, P.; Surmova, S.; Ventura, K. 2016. Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: A review. *Quimica Nova* 39(4), 530-533.
- Krzyzanowska, J.; Pecio, L.; Moldoch, J.; Ludwiczuk, A.; Kowalczyk, M. 2018. Novel Phenolic constituents of *Pulmonaria officinalis* L. LC-MS/MS comparison of spring and autumn metabolites profiles. *Molecules* 23, 2227.
- Kubo, I. ; Matsumoto, A. . 1984. Secreted oleanolic acid on the cuticle *Olea europaea* (*Oleaceae*); a chemical barrier to fungal attack. *Experientia* 40, 937-938.
- Kupchan, M.; Britton, M.; Lacadie, J.; Ziegler, M.; Sigel, C. 1975. The isolation and structural elucidation of bruceantin and bruceantanol, new potent antileukemic Quassinoids from *Brucea antidysenterica*. *J. Organic Chemistry* 40(5), 648-654.
- Levsh, O.; Pluskal, T.; Carballo, V.; Mitchell, A.; Weng, J. 2019. Independent evolution of rosmarinic acid biosynthesis in two sister families under the *Lamiids* clade of flowering plants. *J. Biol. Chemistry* 294(42), 15193-15205.
- Li, C.; Yang, J.; Tong, X.; Zhao, C.; He, Y.; Wan, H. 2019. Precursor ion scan enhanced rapid identification of the chemical constituents of Danhong injection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: An integrated strategy. 10.1016/j.chroma.2019.04.023.
- Li, J.; Wen, Q.; Feng, Y.; Zhang, J.; Luo, Y.; Tan, T. 2019. Characterization of the multiple chemical components of *Glechomae herba* using ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight tandem mass spectrometry with diagnostic ion filtering strategy. *J. Sep. Sci.* 42, 1312-1322.

- Li, L.; Chen, Y.; Feng, X.; Yin, J.; Li, S.; Sun, Y.; Zhang, L. 2019. Identification of metabolites of eupatorin in vivo and in vitro based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS. *Molecules* 24, 2658.
- Li, Q.; Liu, Y.; Han, L.; Liu, J.; Liu, W.; Feng, F.; Zhang, J.; Xie, N. 2016. Chemical constituents and quality control of two *Dracocephalum* species based on high-performance liquid chromatographic fingerprints coupled with tandem mass spectrometry and chemometrics. *J. Sep. Sci.* 21, 4071-4085.
- Li, X.; Wang, M.; Du, C.; Cong, Y.; Zhao, H. 2017. Preferential solvation of rosmarinic acid in binary solvent mixtures of ethanol + water and methanol + water according to the inverse Kirkwood–Buff integrals method. *J. Molecular Liquids* 240, 56-64.
- Liu, A.; Guo, H.; Ye, M.; Lin, Y. 2007. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatography A* 1161(1-2):170-82.
- Litvinenko, V.; Popova, T.; Simonjan, A.; Sokolov, V.; Zoz, I. 1975."Gerbstoffe" und oxyzimtsäureabkömmlinge in Labiaten.- *Planta Medica* 27,372-380.
- López, J.; Collin, G.; Garneau, F.; Jean, F.; Gagnon, H. 2009. Essential oils from Bolivia.VI. Lamiaceae: *Lepechinia graveolens* (Reg.) Epling L., *L. floribunda* (Benth) Epl., and *L. meyenii* (Walp.)Epling. *J. Essential Oil Res.* 21, 36-40.
- López, L.; Pérez, P.; González, M.; Falqué, E. 2018. Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A Review. *Food Research International* 103, 130-149.
- López, A. 1998. Catalogo de la Flora del Departamento de La Libertad (V parte). *Arnaldoa* 5(2), 215-263.
- Loussaurn, M.; Lizkay, A., 2017.Carnosic Acid and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms. *Plant Physiology* 1975, 1381-1394.
- Lozano, E.; Spina, R.; Tonn, C.; Sosa, M.; Cifuentes, D. 2015. An abietane diterpene from *Salvia cuspidata* and some new derivatives are active against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25(23), 5481-5484.

- Llatas, S. 1996. Especies del género *Salvia* (*Lamiaceae*) en la flora del departamento de Lambayeque. Tesis de Maestría en Botánica Tropical UNMSM.
- Lu, Y.; Foo, Y. 1999. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 51, 91-94.
- Ludeña, M. 2018. Método preparativo para la preparación de ácido ursólico a partir de *Clinopodium revolutum*. *Revista Colombiana de Química* 47(1), 10-15.
- Luo, Y.; Wen, Q.; Jian Sheng, C.; Feng, Y.; Tan, T. 2019. Characterization of the polymeric phenolic acids and flavonoids in *Clerodendranthi spicati* herba using ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight tandem mass spectrometry with target and nontarget data mining strategy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 33, 1884-1893.
- Ma, L.; Tang, L.; Yi, Q. 2019. Salvianolic acids: potential source of natural drugs for the treatment of fibrosis and cancer. *Frontiers in Pharmacology*, in press.
- Malagón, O.; Vila, R.; Iglesias, J.; Zaragoza, T.; Cañigual, S. 2003 Composition of the essential oils of 4 medicinal plants from Ecuador. *Flavour and Fragrance J.* 18, 527-531.
- Maquera, D.; Tello, M.; Romero, S.; Cotacallapa, D. 2009. Componentes químicos de los aceites esenciales de muña *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. en Huánuco. *Investigación Valdizana* 3(2), 100-106.
- Mattern, D. L.; Scott, W. D.; McDaniel, C. A.; Weldon, P. J.; Graves, D. E. 1997. Cembrene A and a Congeneric Ketone Isolated from the Paracloacal Glands of the Chinese Alligator (*Alligator sinensis*). *Journal of Natural Products*, 60(8), 828–831.
- Mazumder, K.; Siwu, E.; Nozaki, S.; Watanabe, Y.; Tanaka, K.; Fukase, K. 2011. Ursolic acid derivatives from Bangladeshi medicinal plant, *Saurauja roxburghii*: Isolation and cytotoxic activity against A431 and C6 glioma cell lines. *Phytochemistry Letters* 4(3), 287-291.
- McKweon, R.; Wertman, J.; Dell'Orco, P. 2011. Crystallization design and scale up, in *Chemical Engineering in Pharmaceutical Industry: R&D to manufacturing*. Am ende, D. (ed.). Wiley.

- Mena, P.; Cirlini, M.; Tassotti, M.; Herrlinger, K.; Dall'Asta, Ch.; Del Rio, D. 2016. Phytochemical Profiling of Flavonoids, Phenolic Acids, Terpenoids, and Volatile Fraction of a Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract Molecules 21, 1576.
- Mezzetti, T.; Orzalesi, G.; Bellavista, V. 1971. Chemistry of ursolic acid . Planta Medica 20 (3), 244-252.
- Miron, T.; Herrero, M.; Ibáñez, E. 2013. Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. J. Chromatography A 1288, 1-9.
- Misic, D.; Siler, B.; Gasic, U.; Avramov, S.; Zivkovic, S.; Nestorovic, J.; Milutinovic, M.; Tesic, Z. 2015. Simultaneous UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS analysis of phenolic acids and nepetalactones in methanol extracts of *Nepeta* species: A possible application in chemotaxonomic studies. Phytochemical Analysis 26, 72-85.
- Moon, H.; Vinckier, S.; Walker, J.; Smets, E.; Huysmans, S. 2008. A search for phylogenetically informative pollen characters in the sub-tribe *Salviinae* (*Mentheae*: *Lamiaceae*). International J. Plant Sciences 169(3), 455-471.
- Moon, H.; Hong, S.; Smets, E.; Hysmans, S. 2009. Phylogenetic significance of leaf micromorphology and anatomy in the tribe *Mentheae* (*Nepetoideae*, *Lamiaceae*). Botanical J. of the Linnean Society 160, 211-231.
- Morales, R. 2018. Las *Labiadas* (*Lamiaceae*) de Chile. Anales del Jardín Botánico de Madrid 75(1): e067.
- Mucaji, N.; Nagy, M. 2011. Contribution to the tlc separation of ursolic and oleanolic acid mixture. Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae 58: 56-61.
- Muñoz, S.; Soriano, J.; Collin, G.; Jean, F.; Deslauriers, H. 1993. Variability in the composition of the essential oils of *Minthostachys andina* in central Bolivia. Phytochemistry 33, 123-127.

Ngo, Y.; Haan, C.; Suan, L. 2018. Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food & Chemical Toxicology* 121, 687-700.

Nichols, L. 2017. *Organic Chemistry Laboratory Techniques* 2nd Ed. chem.libretexts.org.

Nieto, M.; García, E.; Giordano, O.; Tonn, C. 2000. Ictetexane and abietane diterpenoids from *Salvia gilliesi*. *Phytochemistry* 53, 911-915.

O'Leary, N. 2015. Tipificaciones en especies sudamericanas de *Hedeoma*, *Lepechinia* y *Stachys* (*Lamiaceae*) y nuevo sinónimo en *Lepechinia*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 50(2), 217-220.

Pang, Z.; Cheng, J.; Wang, T.; Gao, C.; Li, Z.; Guo, L.; Xu, J.; Cheng, Y. 2021. Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: A review. *Frontiers in Plant Science* 12, 621276.

Paris, A.; Strukelj, M.; Renko, M.; Turk, V.; Pukl, M.; Umek, A.; Korant, B. 1993. Inhibitory effect of carnosolic acid on HIV-1 protease in cell free assays. *J. Natural Products* 56, 1426-1430.

Passannanti, S.; Paternostro, M.; Piozzi F. 1983. Triterpene acids from *Salvia* and *Teucrium* species. *Phytochemistry* 22(4), 1044-1045.

Peev, G.; Penchev, P.; Peshev, D.; Angelow, G. 2011. Solvent extraction of rosmarinic acid from lemon balm and concentration of extracts by nanofiltration: effect of plant pre-treatment by supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Research Design* 89, 2236-2243.

Pelletier, W.; Chokshi, H.; Desai, H. 1986. Separation of Diterpenoid Alkaloid Mixtures Using Vacuum Liquid Chromatography. *J. Natural Products* 49, 892-900.

Peter, S.; Peru, K.; Fahlman, B.; McMartin, M.; Headley, J. 2015. The application of HPLC ESI MS in the investigation of the flavonoids and flavonoid glycosides of a Caribbean *Lamiaceae* plant with potential for bioaccumulation. *J. Environmental Sci. and Health B*, 50, 819-826.

Petersen, M.; Simmonds, M. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121-125.

Petersen, M.; Abdullah, Y.; Benner, J.; Eberle, D.; Gehlen, K.; Hücherig, S.; Janiak, V.; Kim, K.; Sander, M.; Weitzel, C.; Wolters, S. 2009. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70, 1663-1679.

Petersen, M. 2013. Rosmarinic acid: New aspects. *Phytochemistry Reviews* 12, 207-227.

Pertino, M.; Schmeda, G. 2010. The corrected structure of rosmaridiphenol, a bioactive diterpene from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica* 76, 629-632.

Pezeshki, S.; Petersen, M. 2018. Rosmarinic acid and related metabolites in W. Schwab ,Lange B., Wust M. (eds.) *Biotechnology of Natural Products*. Springer 2018.

Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269, 337-341.

Richheimer, S.; Bernart M.; King, G.; Kent, M.; Bailey, D. 1996. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *JAOCS* 73, 507-514.

Roersch, C. y van der Hoogte, L. 1988. *Plantas Medicinales del Sur Andino del Perú*. CMA 1988.

Roersch, C. 1994. *Plantas Medicinales en el Sur Andino del Perú*. Koeltz Scientific Books 1994.

Rodriguez, M. 2006. Lamiaceae endémicas del Perú. *Revista Peruana de Biología* (número especial) "El Libro rojo de las Plantas Endémicas del Perú" León, B. y col. (eds.).-13(2), 371s-3789s.

Roque, J. ; Ramírez, E. 2008. Flora vascular y vegetación de la laguna de Parinacochas y alrededores (Ayacucho, Perú). *Revista Peruana de Biología* 15 (1), 61-72.

Rychkov, D.; Arkhipov, S.; Boldyreva, E. 2014. Simple and efficient modifications of well known techniques for reliable growth of high quality crystals of small bioorganic molecules. *J. Applied Crystallography* 47, 1435-1442.

Sánchez, A.; Jiménez, V.; Sartor, T.; Tonn, C.; García, E.; Nieto, M.; Burgos, M.; Sosa, M. 2006. A novel icetexane diterpene, 5-epi-ice-texone from *Salvia gilliesi* is active against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 98, 118-124.

Sarker, S.; Latif, Z.; Gray, A. (Eds.) 2006. *Natural Products Isolation* 2nd Ed. Humana Press.

Sarker, S.; Nahar, L. (Eds.) 2012. *Natural Products Isolation* 3rd Ed. Humana Press.

Sawa, T.; Nakao, M.; Akaike, T.; Ono, K.; Maeda, H. 1999. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the antitumor promoter effect of vegetables. *J. Agricultural & Food Chemistry* 47, 397-402.

Satake, T.; Kamiya, K.; Saiki, Y.; Hama, T.; Fujimoto, Y.; Kitanaka, S.; Kimura, Y.; Uzawa, J.; Endang, H.; Umar, M. 1999. Studies on the constituents of fruits of *Helicteres isora* L. *Chem. Pharm. Bull.* 47(10), 1444-1447 .

Scarpati, M.; Oriente, G. 1958. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus off.*) *Ricerca Scientifica* 28, 2329-2333.

Scarpati, M.; Oriente, G. 1958a. Chicoric acid (dicaffeyltartaric acid): its isolation from Chicory (*Chicorium intybus*) and synthesis. *Tetrahedron* 4, 43-48.

Schmidt-Lebuhn, A. 2007. Using amplified fragment length polymorphism (AFLP) to unravel species relationships and delimitations in *Minthostachys* (*Labiatae*). *Botanical J. of the Linnean Society* 153, 9-19.

Schmidt-Lebuhn, A. 2008. Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (*Lamiaceae*). 118, 343-353.

Schutz, K.; Kammerer, D.; Carle, R.; Schieber, A. 2004. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids in artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *J. Agricultural & Food Chemistry* 52, 4090-4096.

Senatore, F. 1995. Composition of the essential oil of *Minthostachys spicata* (Benth.)Epl. *Flavour and Fragrance J.* 10, 43-45.

Senatore, F.; de Feo, V. 1995. Flavonoid Glycosides from *Minthostachys spicata* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 23, No. 5, 573-574.

Senatore, F. 1998. Volatile constituents of *Minthostachys setosa* (Briq.)Epl. (Lamiaceae) from Perú. *Flavour and Fragrance J.* 13, 263-265.

Senatore, F.; Urrunaga, E.; Urrunaga, R.; Della Porta, G.; de Feo V. 1998. Essential oils from two peruvian *Satureja* species. *Flavour and Fragrance J.*13, 1-4.

Serrano, C.; Fajardo, S.; Lechuga, A.; Luizar, C.; Cjuno, M.; Choquenaira, J.; Gonzáles, J. 2012. Obtención no cromatográfica del ácido rosmarínico a partir de una planta medicinal peruana *Lepechinia meyenii* Walp. Epling (Lamiaceae) "Puna Salvia". *Revista Universitaria (UNSAAC)* N° 141, 141-146.

Serrano, C; Calsino, B.; Tupa, A; Huamán, R.; Ludeña, M.; Rodríguez, E. 2016. Cuantificación de ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido rosmarínico en tres especies peruanas de *Clinopodium* (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae). *Arnaldoa* 23(1), 333-349.

Shanaida, M.; Jasicka-Misiak, I.; Makowicz, E.; Stanek, N.; Shanaida, V.; Wieczorek, P. 2020. Development of high-performance thin layer chromatography method for identification of phenolic compounds and quantification of rosmarinic acid content in some species of the *Lamiaceae* family. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 12(2), 139-145.

Sharma, Y.; Velamuri, R.; Fagan, J.; Schaefer, J. 2020. Full-spectrum analysis of bioactive compounds in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) as influenced by different extraction methods. *Molecules* **25**, 4599 .

Shen ,Y.; Feng, Z.; Yang, M.; Zhou, Z.; Han, S.; Hou, J.; Li, Z.; Wu, W.; Guo, D. 2018. Rapid profiling of polymeric phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* by hybrid data-dependent/targeted multistage mass spectrometry acquisition based on expected compounds prediction and fragment ion searching. *J. Separation Science* 41, 1888-1895.

Siebert, D. 2004. Localization of salvinatorin A and related compounds in glandular trichomes of the psychoactive sage, *Salvia divinorum*. *Annals of Botany* 93, 763-771.

Slanis, A.; del Valle, E. 2005. *Hedeoma mandonianum* (Lamiaceae) en Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 40 (3-4), 285-287.

Soares, C.; Correia, M.; Delerue, C.; Barroso, M. 2017. Investigating the antioxidant capacity of fruits and fruit byproducts through an introductory food chemistry experiment for high school. J. Chemical Education 94, 1291-1295.

Solís, L.; Tomaylla, C.; Callo, Y.; Solís, A.; Rodeiro, I.; Hernández, I.; Fernández, M.; Pino, J. 2015. Chemical composition, antioxidant and antiproliferative activities of essential oil from *Schinus areira* L. and *Minthostachys spicata* (Benth.) Epl. Grown in Cuzco-Perú. J. Essential Oil Res. 28(3), 234-240.

Srivastava, P.; Kasoju, N.; Bora, U.; Chaturvedi, R. 2010. Simultaneous determination and quantification of three pentacyclic triterpenoids - betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid- in cell cultures of *Lantana camara* L.- In Vitro Cell Development Biology 46, 549-557.

Stefan, M.; Vukovic, J.; Blazekovic, B.; Kindl, M.; Vladimir, S. 2014. Total Hydroxycinnamic Acids Assay: Prevalidation and Application on *Lamiaceae* Species. Food Anal. Methods 7(2), 326-336.

Stieger, N.; Liebenberg, W. 2012. VII. Recrystallization of active pharmaceutical ingredients. In Andreetta, M. (Ed.), Crystallization Science and Technology. Intechopen.

Sulniutė, V.; Pukalskas, A.; Venskutonis, P. 2017. Phytochemical composition of fractions isolated from ten *Salvia* species by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction methods. Food Chem 224, 37-47.

Svendsen, A.; Scheffer, J.; Looman, A. 1987. Composition of the volatile oil of *Minthostachys glabrescens* Epl. Flavour and Fragrance J. 2, 45-46.

Taamalli, A.; Arráez, D.; Abaza, L.; Iswaldi, I.; Fernández, A.; Zarrouk, M.; Segura, A. 2015. LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. Phytochemical Analysis 26, 320-330.

- Tanaka, T.; Nishimura, A.; Kouno, I.; Nonaka, G.; Yang, C. 1997. Four new caffeic acid metabolites, yunnaneic acids E-H, from *Salvia yunnanensis*. Chem. & Pharm. Bulletin 45, 1596-1600.
- Tasca, S.; Baggio, S. 2017. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties. Food Chemistry 220, 477-489.
- Terreros, S.; Reynel, C. (2016). Arbustos del valle del Mantaro, Dp. de Junín (Perú) y su potencial para la protección de suelos. Universidad Nacional Agraria La Molina, Herbario de la Facultad de Ciencias Forestales. Lima, Perú. ISBN: 978-9972-9733-7-6.
- Tipson, S. 1950. Theory, scope and methods of recrystallization. Analytical Chemistry 22(5), 628-635.
- Trócsányi, E.; Görgy, Z.; Németh, E. 2021. New insights into rosmarinic acid biosynthesis based on molecular studies. Current Plant Biology 100162.
- Trute, A.; Nahrstedt, A. 1996. Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods (HPLC, CE, GC) and the determination of rosmarinic acid in *Hedera helix* L. Phytochemical Analysis 7, 204-208.
- Tugizimana, F.; Mhlongo, M.; Piater, L.; Dubery, I. 2018. Metabolomics in Plant Priming Research: The Way Forward? Int. J. Mol. Sci. 19, 1759.
- Velamuri, R.; Sharma, Y.; Fagan, J.; Schaefer, J. 2020. Application of UHPLC-ESI-QTOF-MS in phytochemical profiling of sage (*Salvia officinalis*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Planta medica Int. Open 7, e133-e144 .
- Vilaseca, A.; Guy, I.; Charles, B.; Guinaudeau, H.; Rojas, A.; Fournet, A. 2014. Chemical composition and insecticidal activity of *Hedeoma mandoniana* essential oils. J. Essential Oil Res. 16, 380-383.
- Von Poser, G.; Henriques, A.; Schripsema, J. 2000. The distribution of iridoids sensu lato. Acta Farmaceutica Bonaerense 19(1), 69-71.

Wagner, H.; Bladt, S. 2011. Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography Atlas. Springer Verlag, 2nd edition.

Walker, J.; Sytsma, K.; Treutlein, J.; Wink, M. 2004. *Salvia (Lamiaceae)* is not monophyletic: Implications for the systematics, radiation and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Mentheae*. American J. Botany 91(7), 1115-1125.

Wang, L.; Gan, C.; Wang, Z.; Liu, L; Gao, M.; Li, Q.; Yang, C. 2017. Determination and Pharmacokinetic Study of Three Diterpenes in Rat Plasma by UHPLC-ESI-MS/MS after Oral Administration of *Rosmarinus officinalis* L. Extract. Molecules 22, 934.

Wang, M.; Li, J.; Rangarajan, M.; Shao, Y.; LaVoie, E.; Huang, T.; Ho, C. 1998. Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*). J. Agricultural & Food Chemistry 46(12), 4869-4873.

Wang, X.; Jiang, X.; Yu, X.; Liu, H.; Tao, Y.; Jiang, G.; Hong, H. 2017. Cimifugin suppresses allergic inflammation by reducing epithelial derived initiative key factors via regulating tight junctions. J. Cell. Mol. Medicine 20, 1-11.

Wang, Y.; Yu, Y.; Li, S.; Liu, W.; Li, W.; Morris, S.; Goto, M.; Lee, K.; Huang, X. 2018. Salvisertin A, a New Hexacyclic Triterpenoid, and Other Bioactive Terpenes from *Salvia deserta* Root. Chemistry & Biodiversity 10.1002/cbdv.201800019.

Watzke, A.; O'Malley, S.; Bergman, R.; Ellman, J. 2006. Reassignment of the configuration of salvianolic acid B and establishment of its identity with lithospermic acid B. J. Natural Products 69, 1231-1233.

Watson, R.R. 2014. Polyphenols in plants: Isolation, Purification and extract preparation. Academic Press.

- Wester, P.; Claben-Bockhoff, R. 2006. Humming bird pollination in *Salvia haenkei* (Lamiaceae) lacking the typical lever mechanism. *Plant Systematics and Evolution* 257, 133-146.
- Wester, P.; Claben-Bockhoff, R. 2011. Pollination syndromes of new world *Salvia* species with special references to bird pollination. *Annals Missouri Botanical Garden* 98, 101-155.
- Wink, M. 1993. The plant vacuole: A multifunctional compartment. *J. Experimental Botany* 44 Supp., 231-246.
- Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64, 3-19.
- Wink, M. 2010. Biochemistry, Physiology and ecological functions of secondary metabolites. *Annual Plant Reviews* 40, 1-19.
- Wink, M. 2011. An introduction to molecular biotechnology. Wiley-Blackwell.
- Wolfender, J.; Marti, G.; Thomas, A.; Bertrand, S. 2015. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *J. Chromatography A* 1382, 136-164.
- Wong, S.; Chen, J.; Forte, L.; Myerson, A. 2013. Compact crystallization, filtration, and drying for the production of active pharmaceutical ingredients. *Organic Process Res. & Dev.* 17, 684-692.
- Wood, J.; Harley, M. 1989. The genus *Salvia* in Colombia. *Kew Bulletin* 44(2), 211-278.
- Wood, J. 2007. The *Salvias* (Lamiaceae) of Bolivia. *Kew Bulletin* 62, 177-222.
- Wood, J. 2011. *Clinopodium* L. (Lamiaceae) in Bolivia. *Kew Bulletin* 66, 199-226.
- Wood, J. 2014. *Salvia dombeyi* Lamiaceae. *Curtis's Botanical Magazine* 31(2), 143-153.
- Wood, J. 2018. *Salvia macrophylla* Lamiaceae. *Curtis's Botanical Magazine* 35(1), 75-88.
- Wood, J.; Mercado Ustariz, M.; Beck, S. 2015. El género *Lepechinia* (Lamiaceae) en Bolivia. *Revista de la Sociedad Boliviana de Botánica* 8(1), 27-50.

Wu, Y.; Ni, Z.; Shi, Q.; Dong, M.; Kiyota, H.; Gu, Y.; Cong, B. 2012. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chemical Reviews* 1112, 5967-6026.

Wüst, A.; Aydi, A.; Claumann, C.; Eladeb, A.; Adberraba, M. 2016. Correlation of solubility and prediction of the mixing properties of rosmarinic acid in different pure solvents and in binary solvent mixtures of ethanol+water and methanol+water from (293.2 to 318.2) K. *J. Molecular Liquids* 216, 370-376.

Xu, C.; Wang, B.; Pu, Y.; Tao, J.; Zhang, T. 2018. Techniques for the analysis of pentacyclic triterpenoids in medicinal plants. *J. Separation Science* 41, 6-19.

Yang, W.; Ye, M.; Qiao, X.; Wang, Q.; Bo, T.; Guo, D. 2012. Collision-induced dissociation of 40 flavonoid aglycones and differentiation of the common flavonoid subtypes using electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry and quadrupole time of flight mass spectrometry. *European J. Mass Spectrometry* 18, 493-503.

Yoo, G.; Lee, I.; Park, S.; Kim, N.; Park, J.; Kim, S. 2018. Optimization of the extraction conditions from the leaves of *Melissa officinalis* L. using response surface methodology. *Pharmacognosy Magazine* 14 (54), 155-161.

Zhao, R.; Liu, X.; Zhang, L.; Yang, H.; Zhang, Q. 2019. Current progress of research on neurodegenerative diseases of salvianolic acid B. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2019/3281260>.

Zhao, F.; Chan, Y.; Salmaki, Y.; Drew, B.; Wilson, T.; Scheen, A.; Celep, F.; Bräuchler, C.; Bendiksby, C.; Wang, Q.; Min, D.; Peng, H.; Olmstead, R.; Li, B.; Xiang, Ch. 2021. An updated tribal classification of *Lamiaceae* based on plastome phylogenomics. *BMC Biology* 19:2. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00931-z>.

Zimmerman, B.; Walch, S.; Tinzoh, L.; Stühlinger, W.; Lachenmeier, D. 2011. Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *J. Chromatography B* 879, 2459-2464 (2011).

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Certificación botánica



Herbarium Truxillense (HUT) Universidad Nacional
de Trujillo Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392 , Trujillo – Perú



“AÑO DEL DIÁLOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL”

Constancia N° 02-2018-HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO,

Da Constancia:

Que este despacho ha recibido de parte del Mg. Carlos Alberto Serrano Flores la donación de 13 muestras botánicas de herbario correctamente herborizadas y determinadas taxonómicamente, correspondientes a Proyecto de tesis: "Perfil de metabolitos secundarios en representantes peruanos de la tribu *Mentheae* (*Nepetoideae*, *Lamiaceae*) y obtención de los componentes mayoritarios" que se indican a continuación:

Especte	Lugar (fecha colección), altitud (m)	Código HUT
<i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.) Epling	Pumahuanca, Cusco (febrero 2014), 3800 m	59504
<i>Clinopodium brevicalyx</i> (Epling) Harley & A. Granda	Tambomachay, Cusco (junio 2017), 3715 m	59506
<i>Salvia oppositiflora</i> Ruiz & Pav.	Saxaywamán, Cusco (junio 2017), 3656 m	59502
<i>Lepechinia floribunda</i> (Benth.) Epling	Huarán, Cusco (julio 2014), 3160 m	59503
<i>Minthostachys mollis</i> Griseb.	Cajatambo, Lima (junio 2017), 3315 m	59766
<i>Salvia sagittata</i> Ruiz & Pav.	Sullcapunta, Huánuco (enero 2014), 3500 m	59499
<i>Salvia cuspidata</i> Ruiz & Pav.	Cajatambo, Lima (junio 2017), 3315 m	59505
<i>Clinopodium revolutum</i> (Ruiz & Pav.) Govaerts	Sullcapunta, Huánuco (enero 2014), 3975 m	58329
<i>Clinopodium sericeum</i> (C. Presl ex Benth.) Govaerts	Gocta, Amazonas (febrero 2016), 2090 m	58332
<i>Salvia haenkei</i> Benth.	Cuchumbaya, Moquegua (julio 2013), 2930 m	59500
<i>Salvia dombeyi</i> Epling	Laraos, Lima (febrero 2018), 3310 m	59764
<i>Hedeoma mandoniana</i> Wedd.	Inquilpata, Anta, Cusco (febrero 2018), 3850 m	59763
<i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts	Carhuayoc, Huarí, Ancash (marzo 2018), 3460 m	59765

Se agradece al Sr. Serrano Flores por tan importante y valiosa colección botánica y expide la presente Constancia para los fines que hubiera lugar.

Trujillo, 01 de agosto del 2018

cc. Herbario HUT

E-mail: herbariumhut@unitru.edu.pe

Dr. José Montenegro León
Director del Herbario HUT

ANEXO 2. Especies de *Menthaeae* en el Neotropical Herbarium y en el Herbario UNMSM

Especie	Neotropical Herbarium	Herbario UNMSM
<i>Clinopodium</i>		
<i>acutifolium</i>	+	+
<i>bolivianum</i>	+	+
<i>brevicalyx</i>	+	+
<i>breviflorum</i>	+	+
<i>cilindrostachys</i>	+	+
<i>clivorum</i>	-	+
<i>elliptica</i>	-	+
<i>fasciculatum</i>	-	+
<i>flabellifolium</i>	+	-
<i>gilliesi</i>	+	+
<i>guamaniensis</i>	-	+
<i>jacquelinae</i>	-	+
<i>loeseniarum</i>	+	-
<i>mathewsii</i>	+	-
<i>nubigenum</i>	+	+
<i>obovatum</i>	+	+
<i>parvifolium</i>	+	+
<i>pavonianum</i>	+	+
<i>plicatulum</i>	+	+
<i>pulchellum</i>	+	+
<i>revolutum</i>	+	+
<i>sericeum</i>	+	+
<i>sericifolium</i>	+	-
<i>speciosum</i>	+	+

<i>sphenophyllum</i>	+	+
<i>striatum</i>	+	+
<i>taxifolium</i>	+	+
<i>tenella</i>	-	+
<i>thymifolium</i>	-	+
<i>tomentosum</i>	+	+
<i>vanum</i>	+	+
<i>vargasii</i>	+	+
<i>weberbaueri</i>	+	+
Hedeoma		
<i>mandonianum</i>	+	+
Lepechinia		
<i>codon</i>	+	+
<i>conferta</i>	-	+
<i>floribunda</i>	+	+
<i>heteromorpha</i>	-	+
<i>lamifolia</i>	+	+
<i>meyenii</i>	+	+
<i>mollis</i>	+	+
<i>radula</i>	-	+
<i>scobina</i>	-	+
<i>tomentosa</i>	-	+
<i>vesiculosa</i>	-	+
Minthostachys		
<i>acris</i>	-	+
<i>glabrescens</i>	-	+
<i>mollis</i>	+	+
<i>salicifolia</i>	-	+
<i>setosa</i>	-	+
<i>spicata</i>	+	+

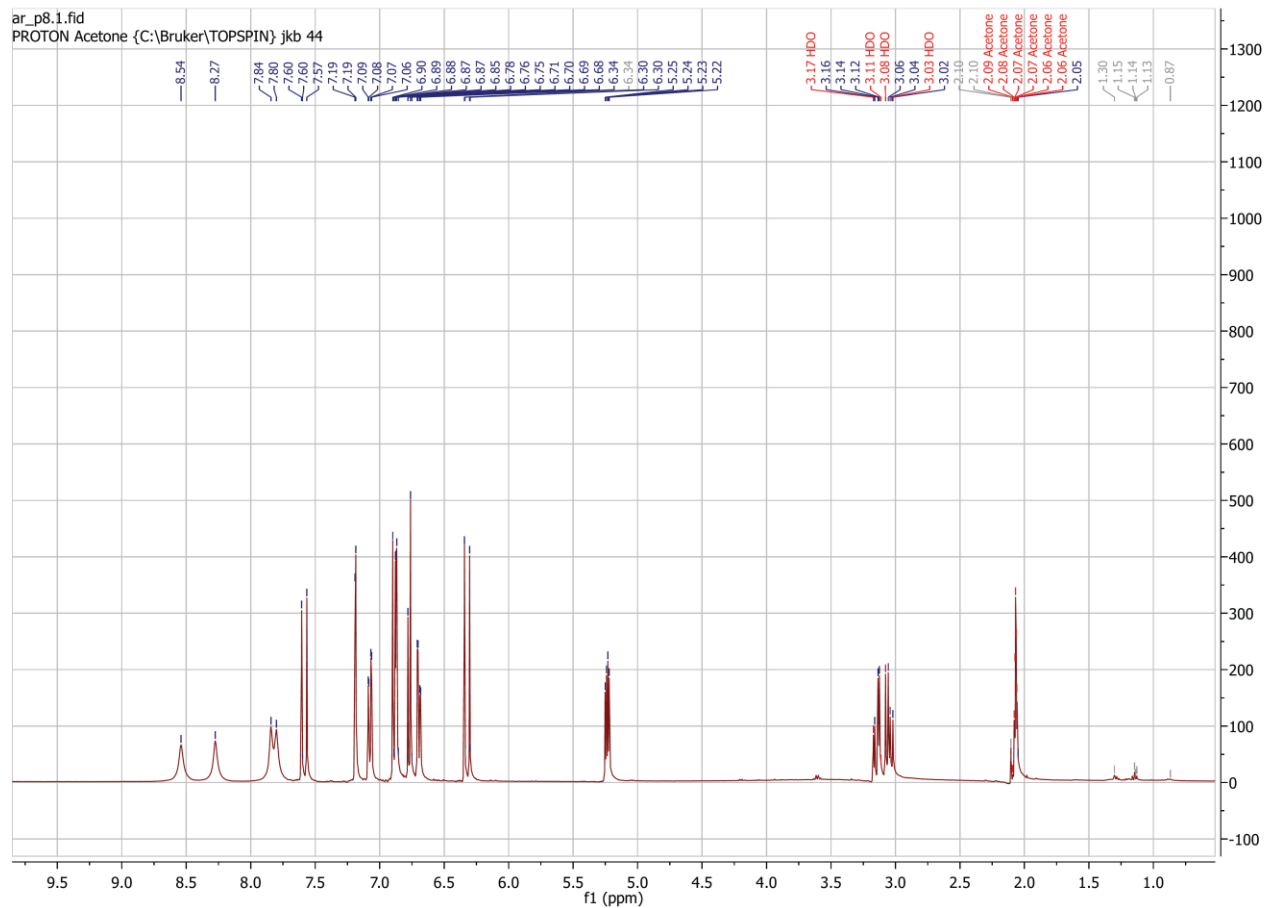
<i>tomentosa</i>	-	+
<i>Salvia</i>		
<i>acuminata</i>	+	-
<i>alata</i>	+	+
<i>alborosea</i>	+	+
<i>atrocalyx</i>	+	-
<i>ayavacensis</i>	+	+
<i>bullulata</i>	+	+
<i>coccinea</i>	+	-
<i>consobrina</i>	+	+
<i>corrugata</i>	+	+
<i>cruikshansii</i>	+	+
<i>cuspidata</i>	+	+
<i>cyanicalyx</i>	+	+
<i>discolor</i>	+	+
<i>dombeyi</i>	+	+
<i>florida</i>	+	+
<i>formosa</i>	+	+
<i>grisea</i>	+	+
<i>haenkei</i>	+	+
<i>hapalophylla</i>	+	+
<i>heerii</i>	+	+
<i>herrerae</i>	+	-
<i>hirta</i>	+	+
<i>incurvata</i>	+	-
<i>integrifolia</i>	+	+
<i>lachnostoma</i>	+	-
<i>lanicaulis</i>	+	+
<i>leucantha</i>	-	+
<i>loxensis</i>	-	+

<i>macrophylla</i>	+	+
<i>malacophylla</i>	+	+
<i>mcbridei</i>	+	+
<i>misella</i>	+	+
<i>occidentalis</i>	+	+
<i>ocrantha</i>	+	+
<i>oppositiflora</i>	+	+
<i>paposana</i>	-	+
<i>pauciserrata</i>	+	+
<i>pavonii</i>	+	-
<i>penduliflora</i>	+	+
<i>perlucida</i>	+	+
<i>plumosa</i>	+	-
<i>pseudorosmarinus</i>	+	+
<i>psilantha</i>	+	-
<i>psilostachya</i>	+	+
<i>punctata</i>	+	+
<i>revoluta</i>	+	+
<i>rhodostephana</i>	+	+
<i>rhubifolia</i>	+	+
<i>riparia</i>	-	+
<i>rubrifaux</i>	+	-
<i>rosea</i>	-	+
<i>rubescens</i>	-	+
<i>rugulosa</i>	-	+
<i>sagitatta</i>	+	+
<i>sarmentosa</i>	+	+
<i>scandens</i>	+	+
<i>scutellaroides</i>	+	+
<i>silvarum</i>	-	+

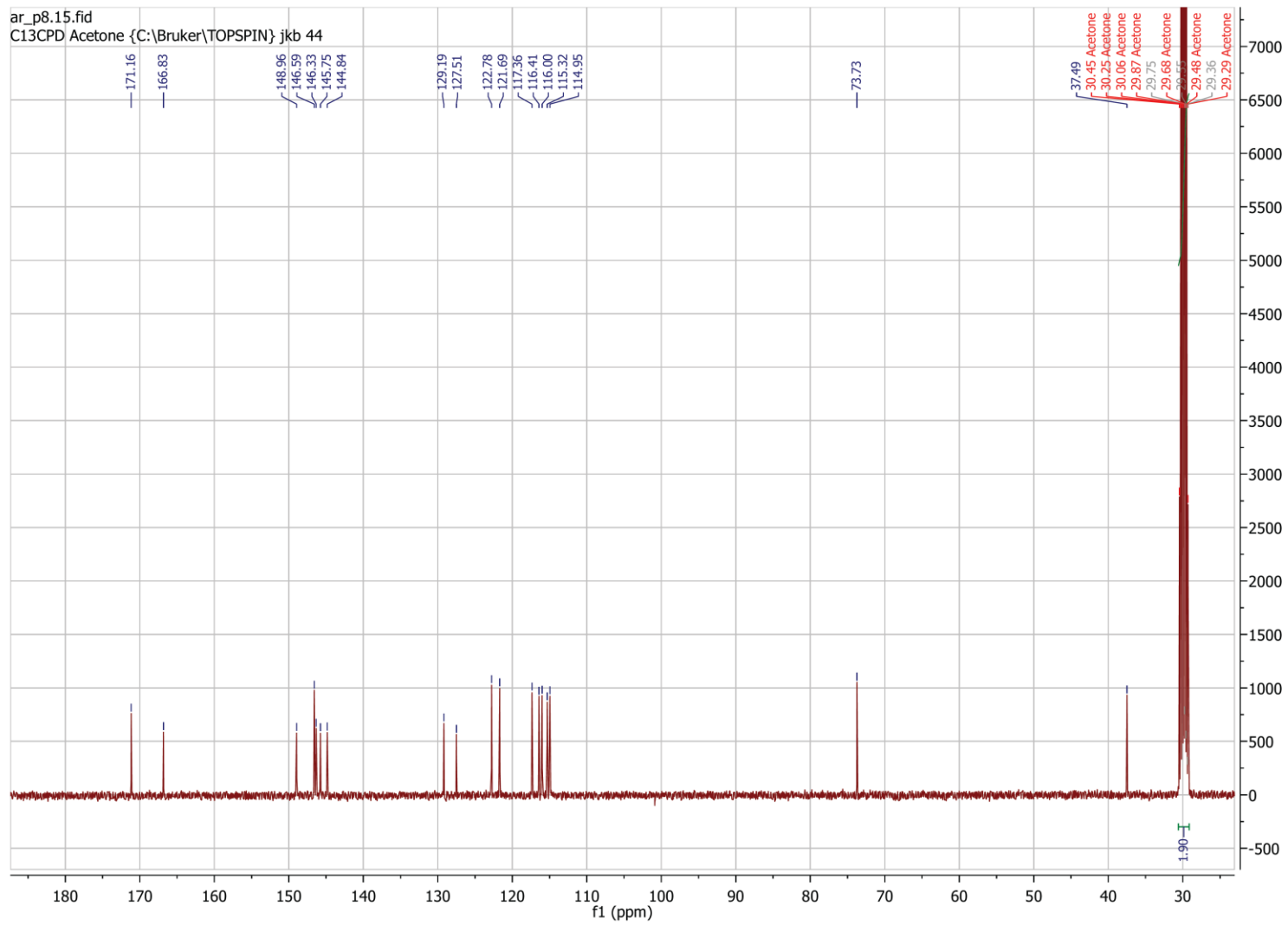
<i>speciosa</i>	+	+
<i>splendens</i>	+	-
<i>squalens</i>	+	+
<i>striata</i>	+	+
<i>stypkelus</i>	+	+
<i>subscandens</i>	-	+
<i>tafallae</i>	+	+
<i>tiliifolia</i>	-	+
<i>trifilis</i>	+	+
<i>tubiflora</i>	+	+
<i>umbratica</i>	+	-
<i>vargasllosae</i>	+	-
<i>verbenacea</i>	+	+
<i>weberbaueri</i>	+	+
<i>xanthophylla</i>	+	+

ANEXO 3. Espectros RMN de AR y AU

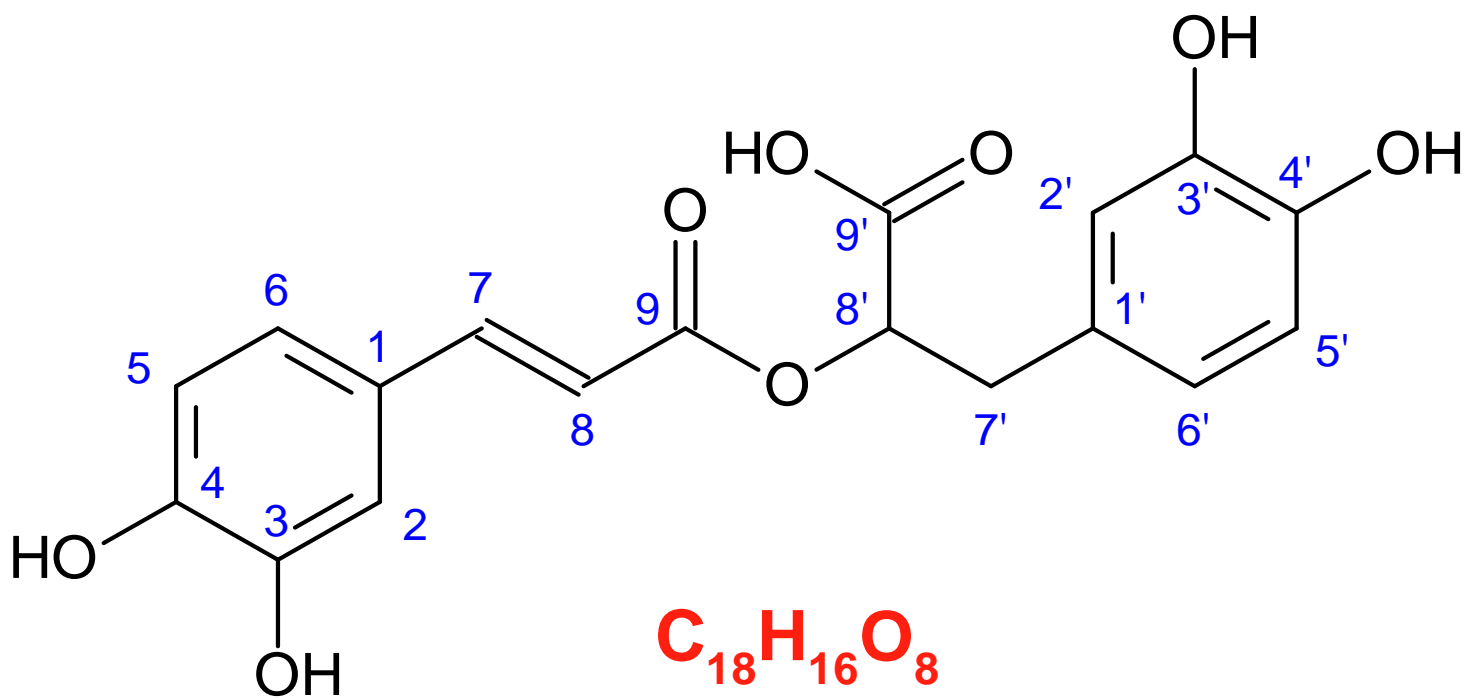
¹HRMN ácido rosmarínico



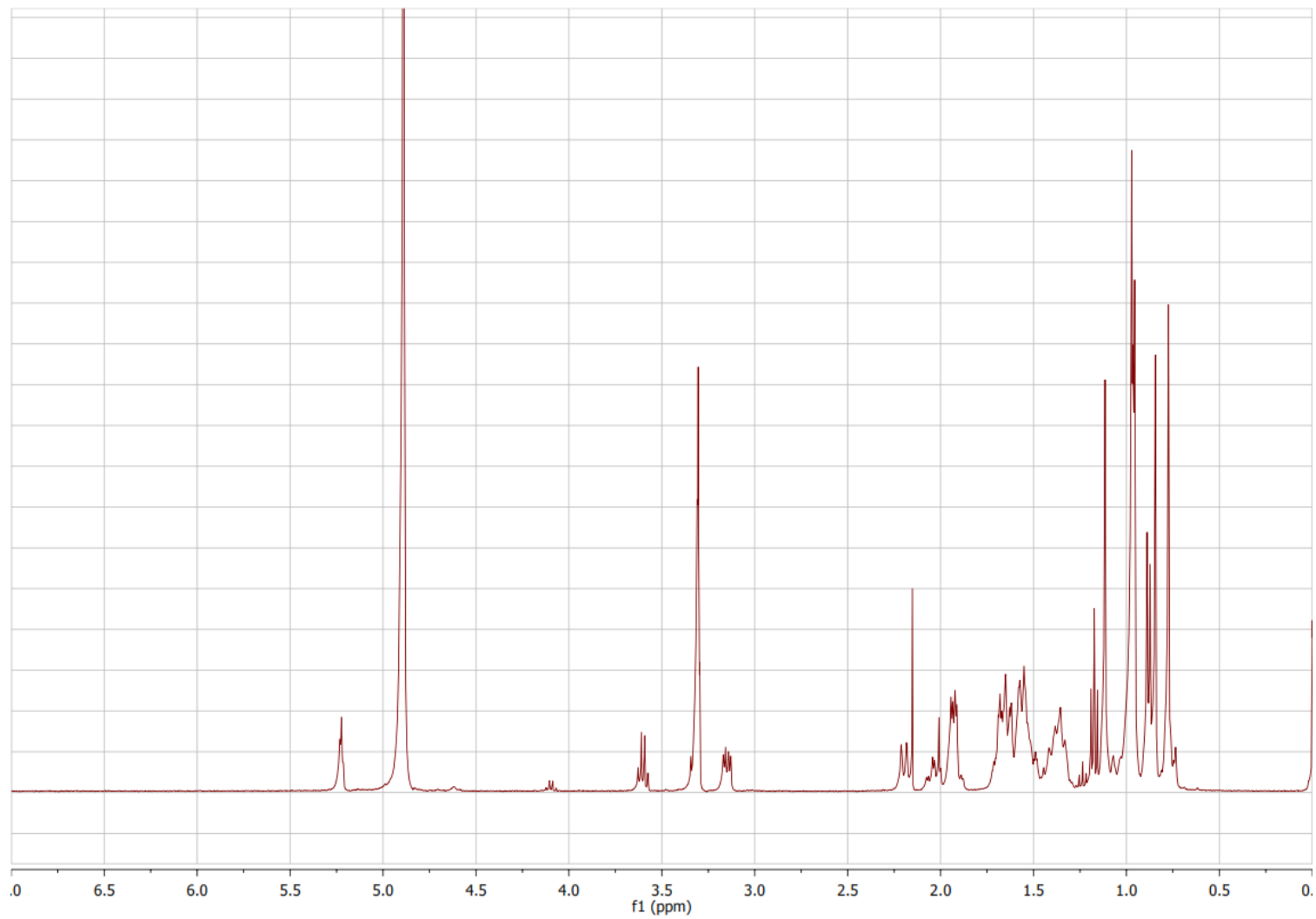
¹³CRMN ácido rosmarínico



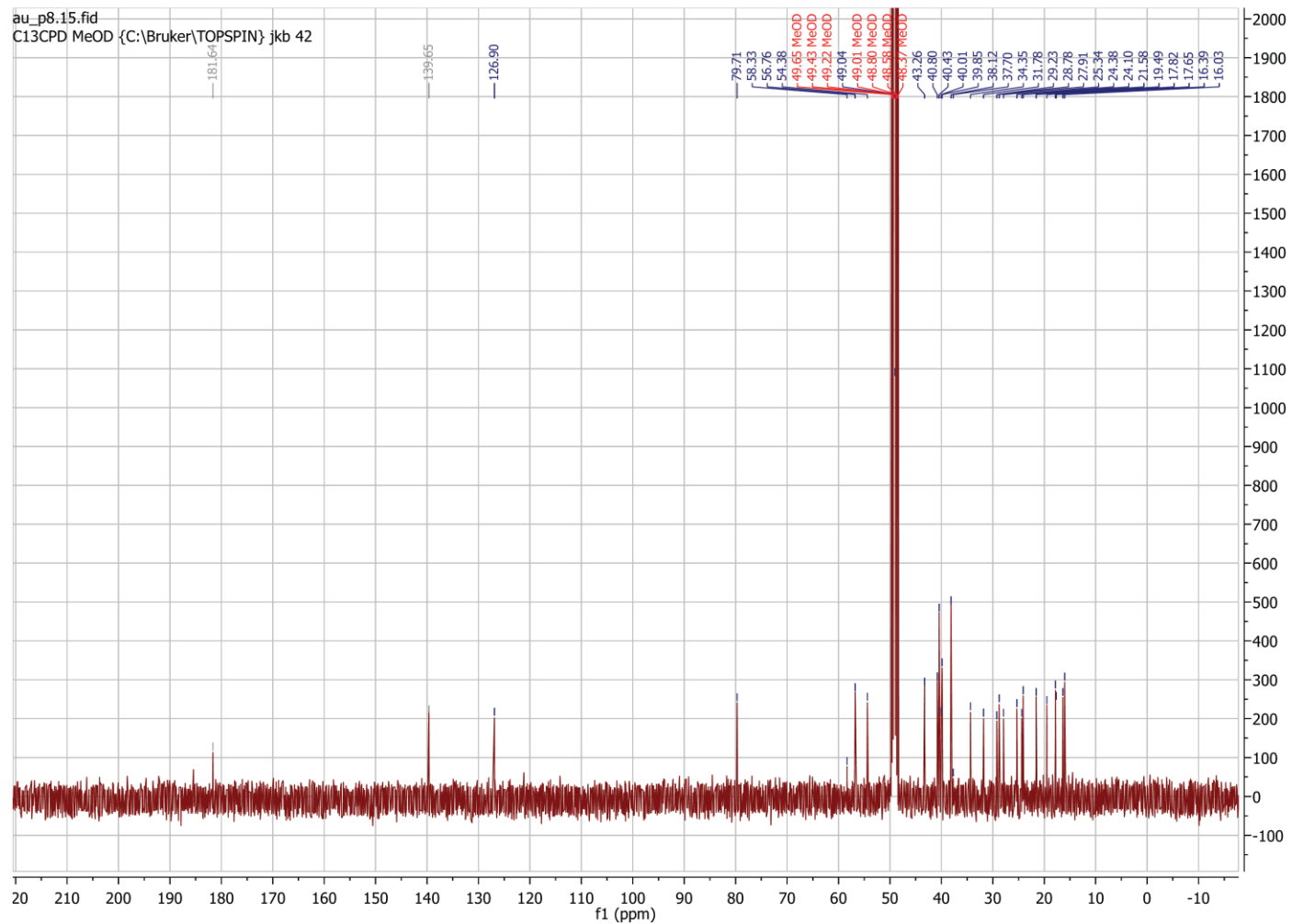
Las señales coinciden con las descritas por (Wang et al. 1998 y Gao et al. 2019). ¹H-RMN (en CD₃-CO-CD₃, 400 MHz): δ 3.04 (2H, m, H-7'), 5.24 (1H, m, H-8'), 6.32(1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 6.70 (1H, dd, J = 8.1, 2.1, H-6'), 6.77 (1H, d, J = 8, H-5'), 6.87 (1H, d, J = 2.0, H-2'), 6.89 (1H, d, J = 8.2, H-5), 7.08 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, H-6), 7.19 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2), 7.29 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7). ¹³C-RMN (in CD₃-CO-CD₃, 101 MHz): δ 171.16 (C-9'), 166.83 (C-9), 148.95 (C-4), 146.59 (C-3), 146.33 (C-7), 145.75 (C-3'), 144.84 (C-4'), 129.19 (C-1'), 127.51 (C-1), 122.78 (C-6), 121.69 (C-6'), 117.36 (C-2'), 116.41(C-5), 116.00 (C-5'), 115.32(C-2), 114.95(C-8), 73.73(C-8'), 37.49(C-7').



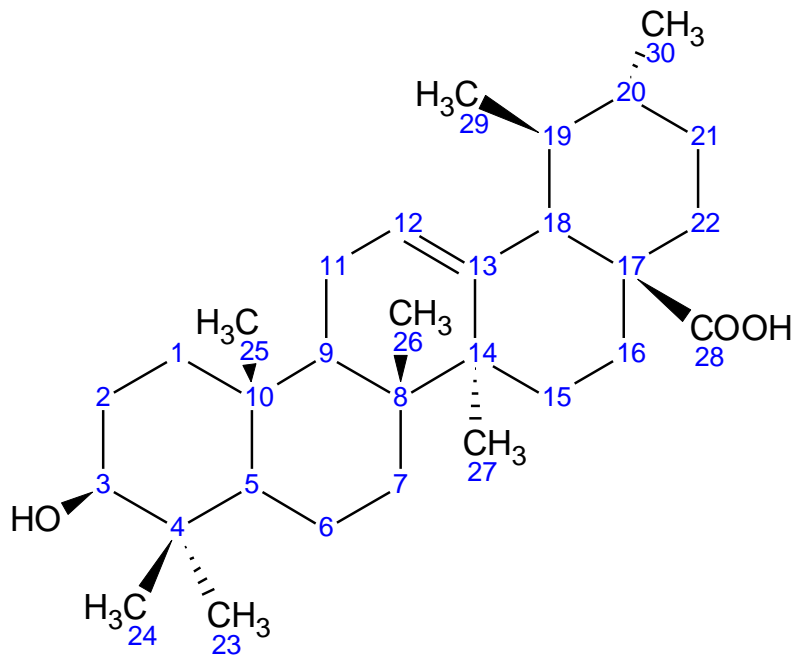
¹H RMN ácido ursólico



¹³CNMR ácido ursólico

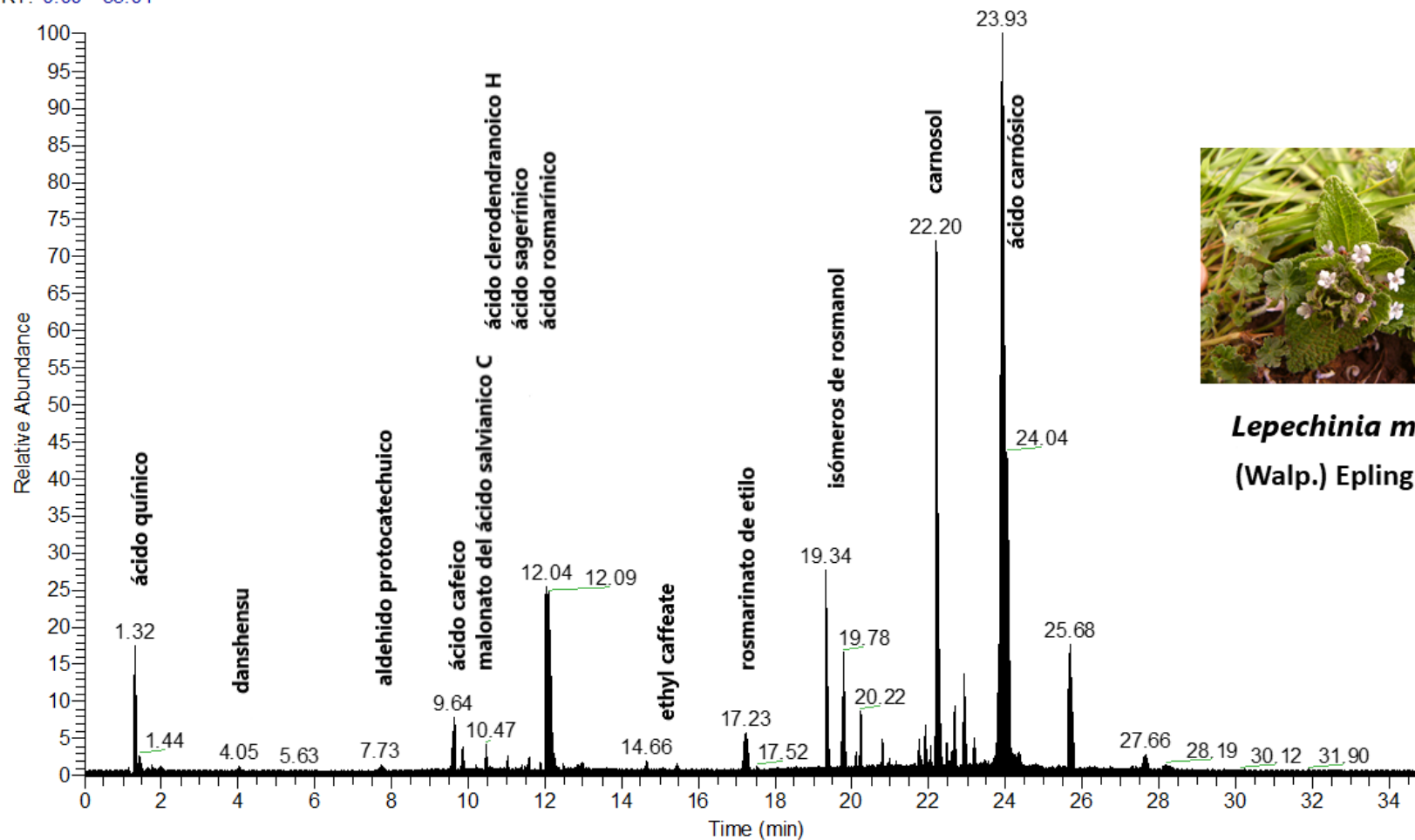


Las señales coinciden con las descritas por (Hamzah et al. 1998 y Mazumder et al. 2011). $^1\text{H-RMN}$ (en CD_3OD , 400 MHz): δ 5.22, 1H, m, H-12; δ 3.15, 1H, m, H-3; δ 2.20, 1H, $J = 11.2$ Hz, H-18; δ 2.02-1.15, m, H-22; δ 1.12, 3H, s, H-23; δ 0.972, 3H, s, H-27; δ 0.966, 3H, s, H-26; δ 0.956, 3H, s, H-24; δ 0.88, 3H, d, H-29; δ 0.84, 3H, d, H-30; δ 0.77, 3H, s, H-25 $^{13}\text{C-RMN}$ (in $\text{CD}_3\text{-OD}$, 101 MHz): δ 38.12 (C-1), 27.91 (C-2), 79.71 (C-3), 40.43 (C-4), 58.33 (C-5), 19.49 (C-6), 34.35 (C-7), 40.80 (C-8), 49.04 (C-9), 38.15 (C-10), 17.82 (C-11), 126.90 (C-12), 139.64(C-13), 43.26 (C-14), 29.23(C-15), 25.34(C-16), 48.37(C-17), 54.38(C-18), 40.01(C-19), 39.85 (C-20), 31.78 (C-21), 32.70 (C-22), 28.78 (C-23), 16.03 (C-24), 16.39 (C-25), 17.65 (C-26), 24.10 (C-27), 181.64 (C-28), 16.39 (C-29), 21.58 (C-30).



ANEXO 4. Los trece cromatogramas UHPLC- MSMS

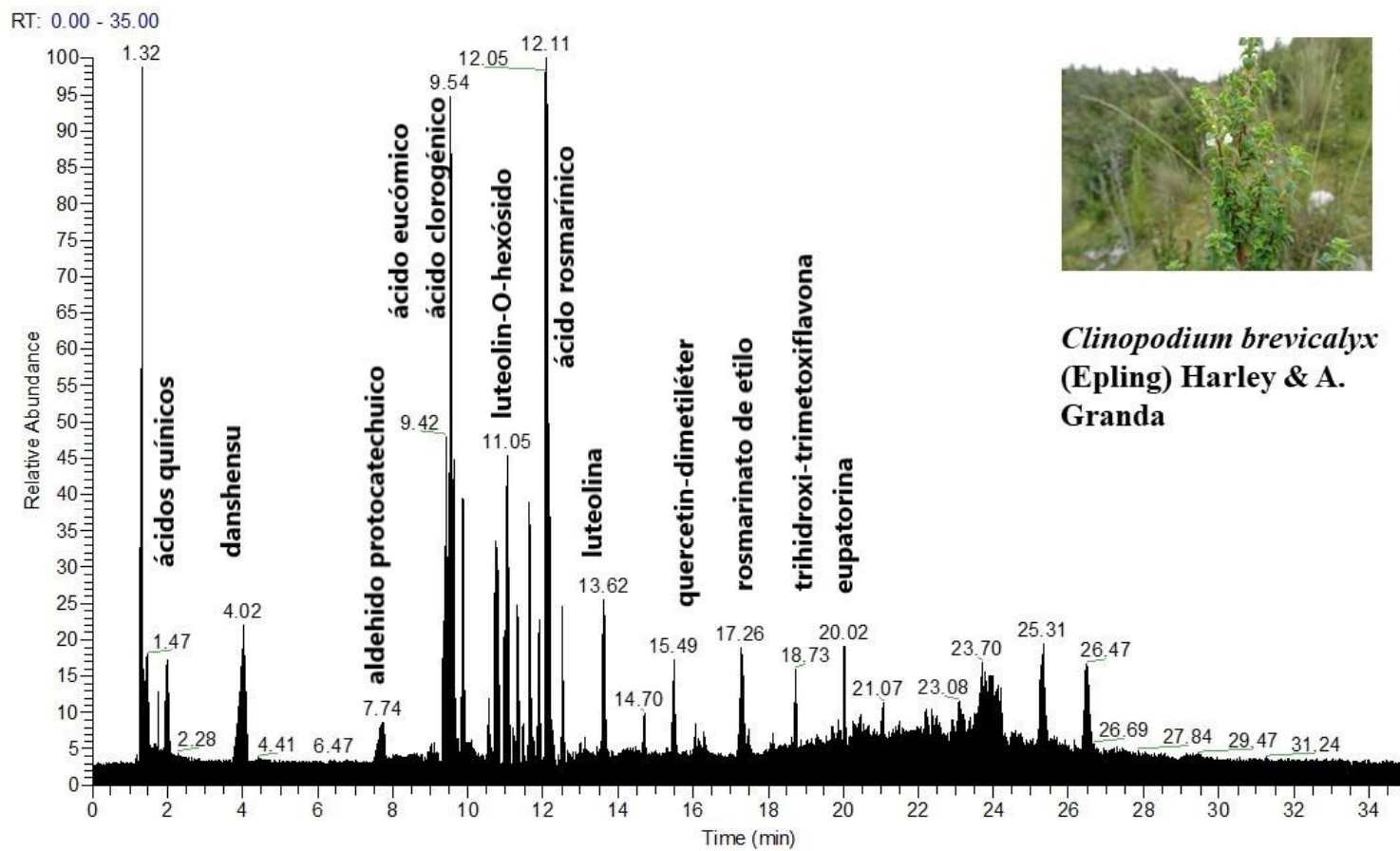
RT: 0.00 - 35.01



NL:
8.18E8
Base Peak
MS CAS1

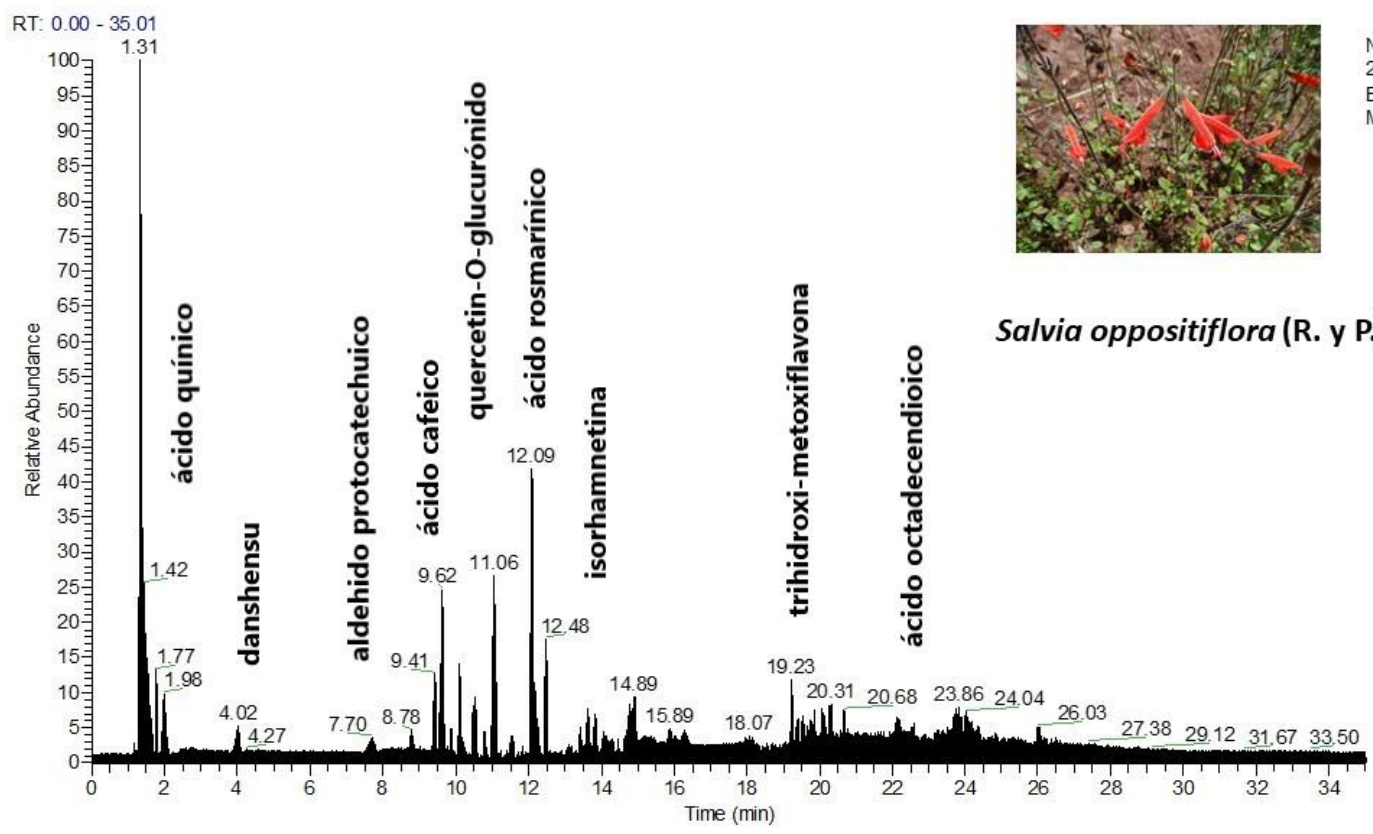


Lepechinia meyenii
(Walp.) Epling



NL:
1.60E8
Base Peak
MS CAS2

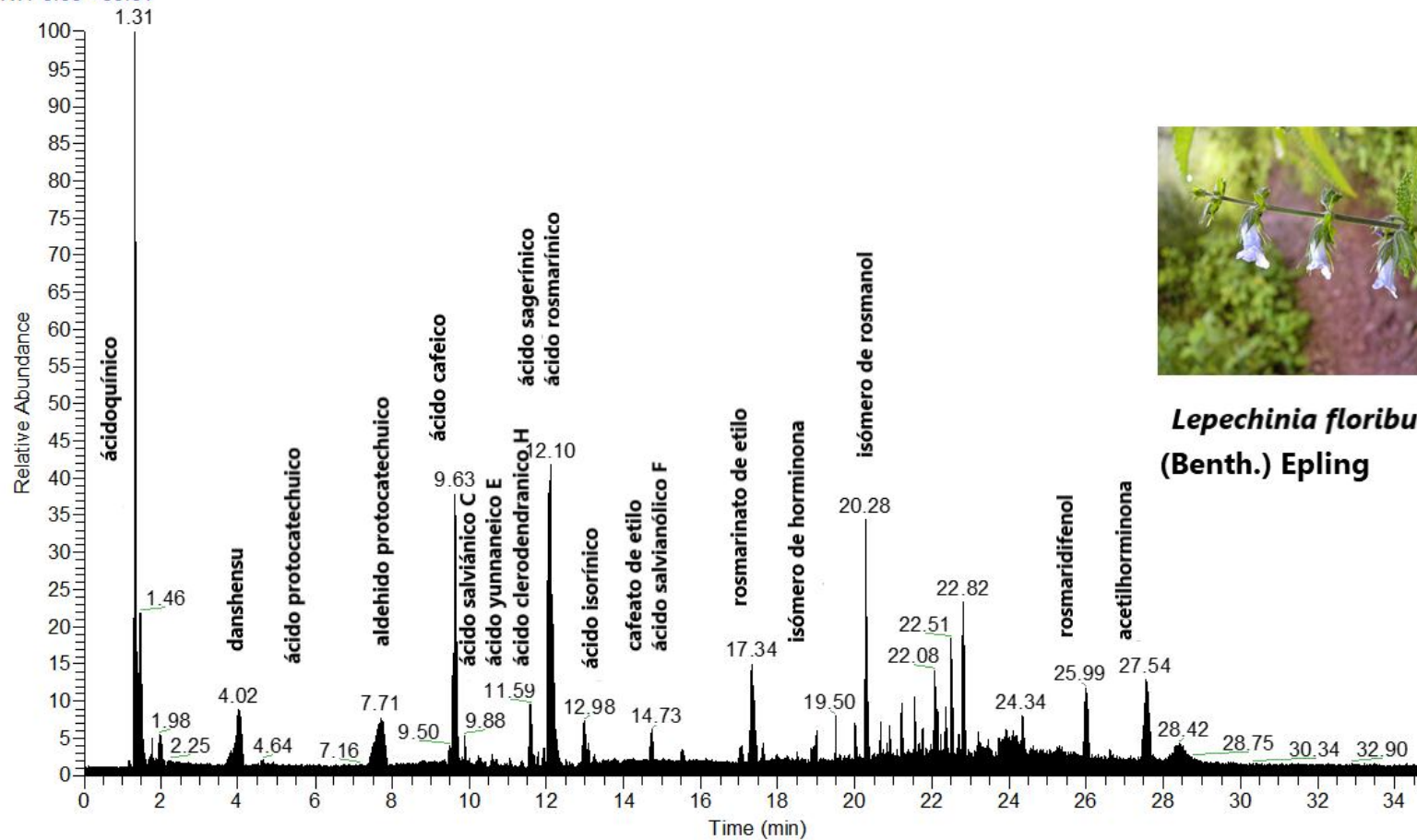
Clinopodium brevicalyx
(Epling) Harley & A.
Granda



NL:
2.89E8
Base Peak
MS CAS3

Salvia oppositiflora (R. y P.)

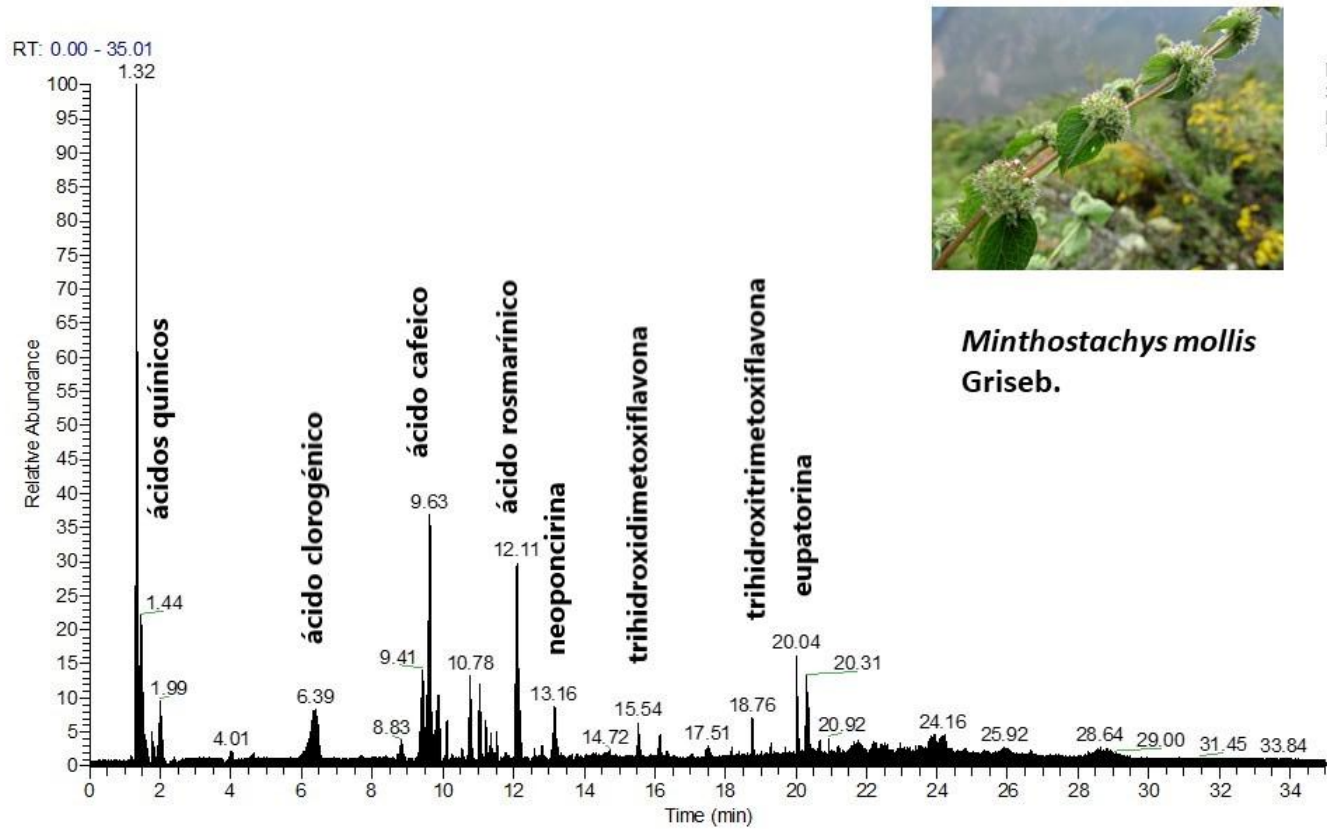
RT: 0.00 - 35.01



NL:
3.08E8
Base Peak
MS CAS4



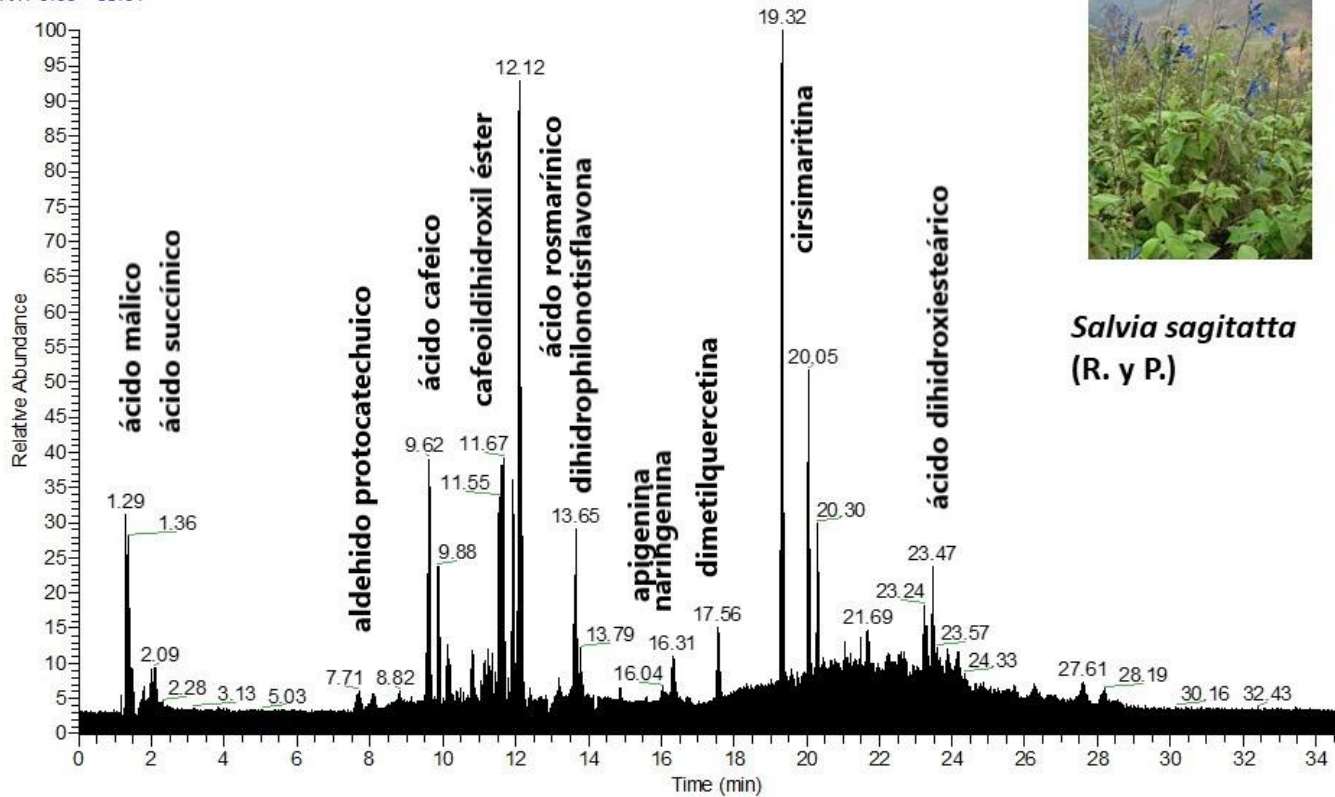
***Lepechinia floribunda*
(Benth.) Epling**



NL:
3.70E8
Base Peak
MS CAS5

Minthostachys mollis
Griseb.

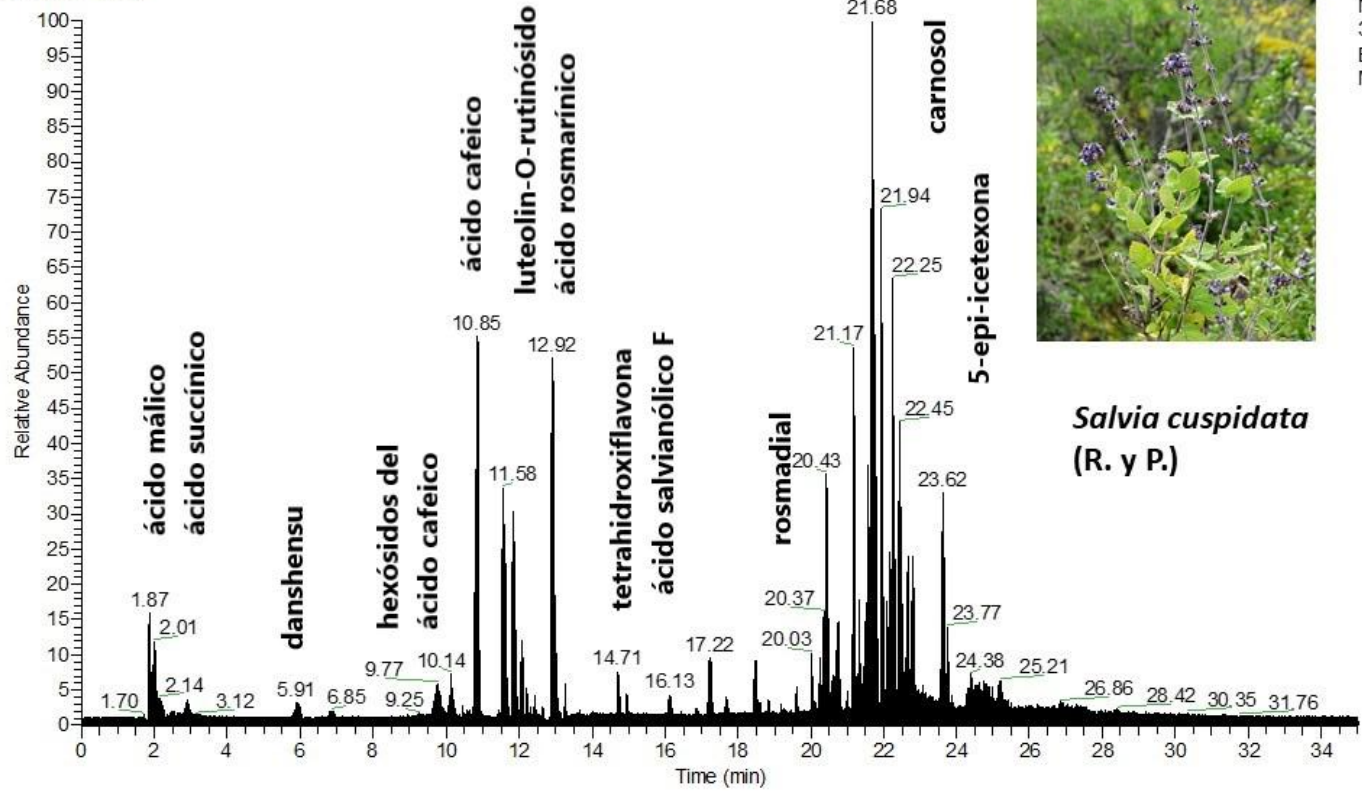
RT: 0.00 - 35.01



Salvia sagittata
(R. y P.)

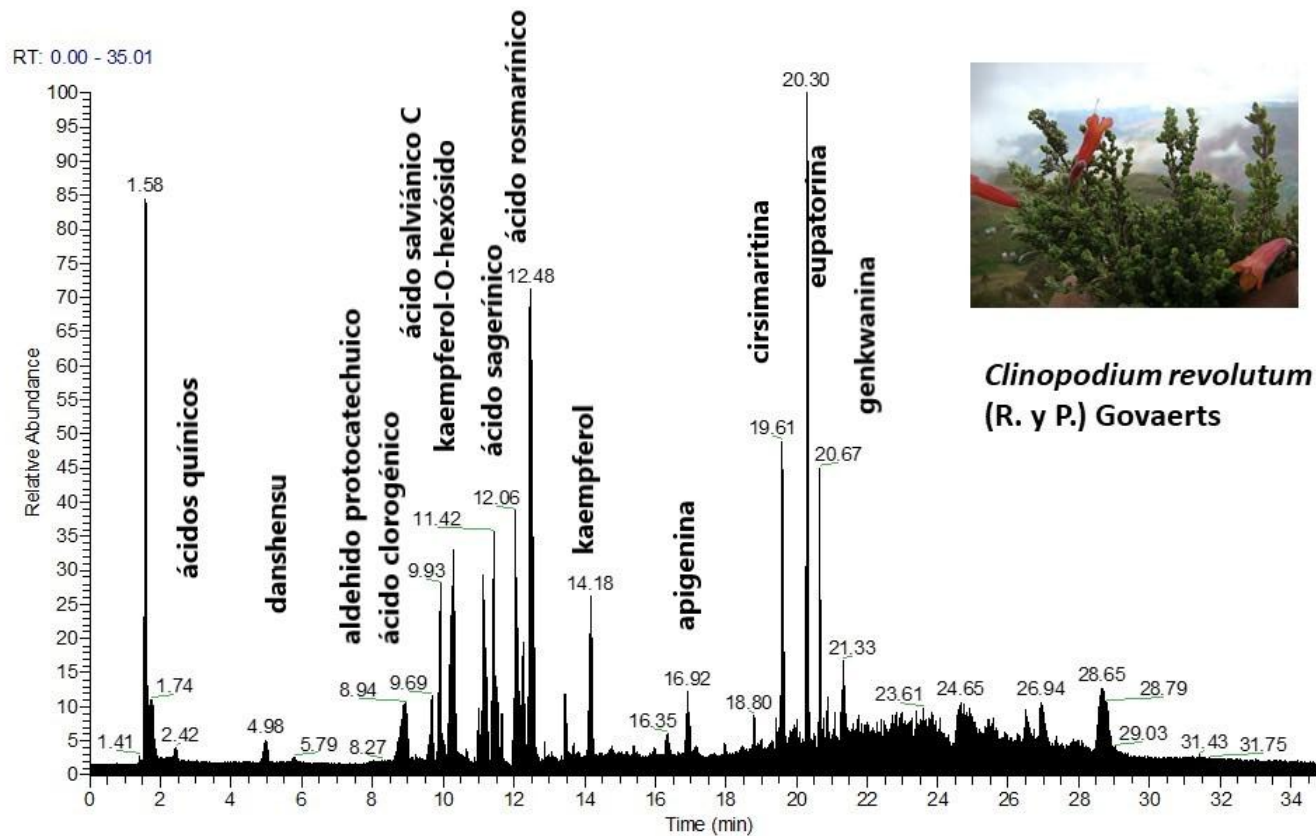
NL:
1.48E8
Base Peak
MS CAS6

RT: 0.00 - 35.01



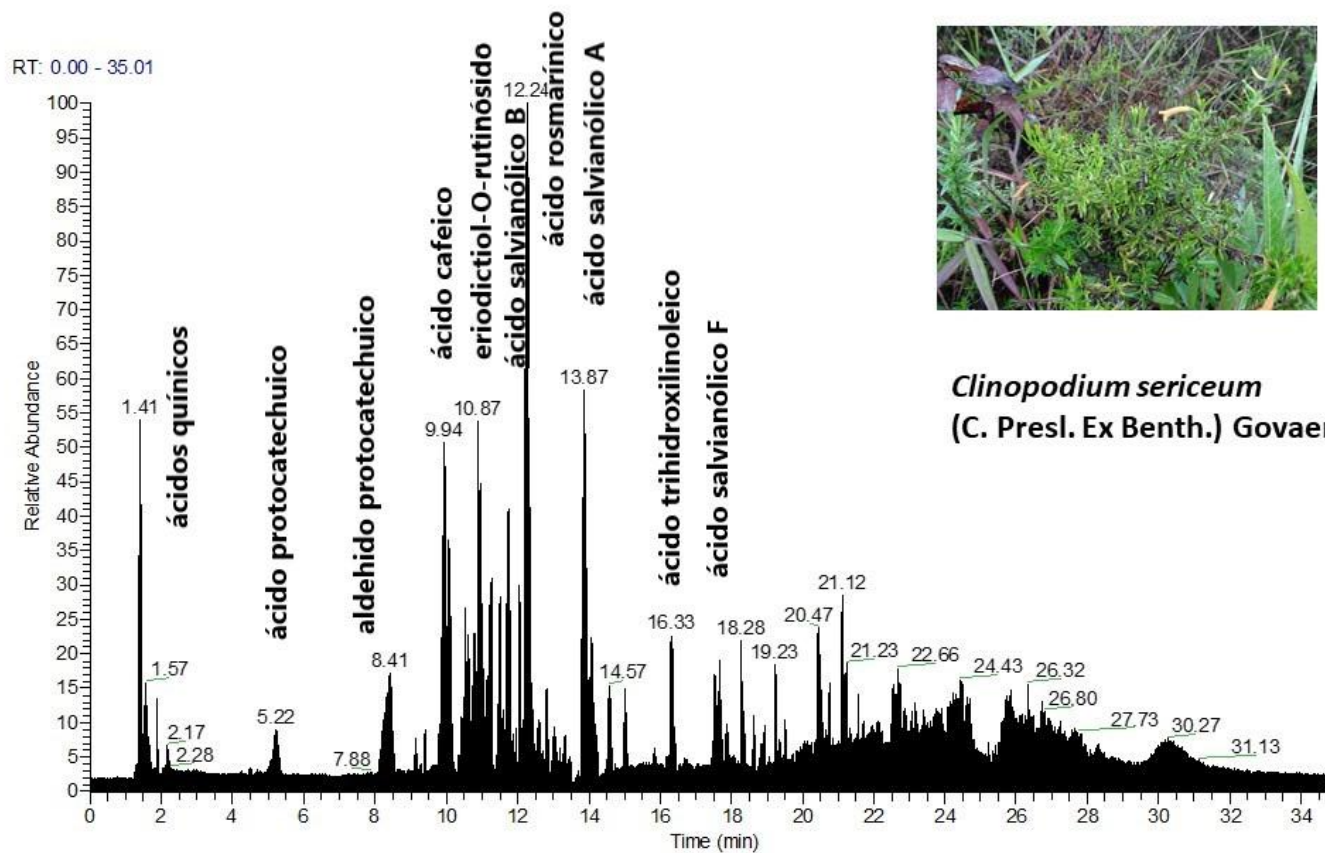
Salvia cuspidata
(R. y P.)

NL:
3.65E8
Base Peak
MS CAS7



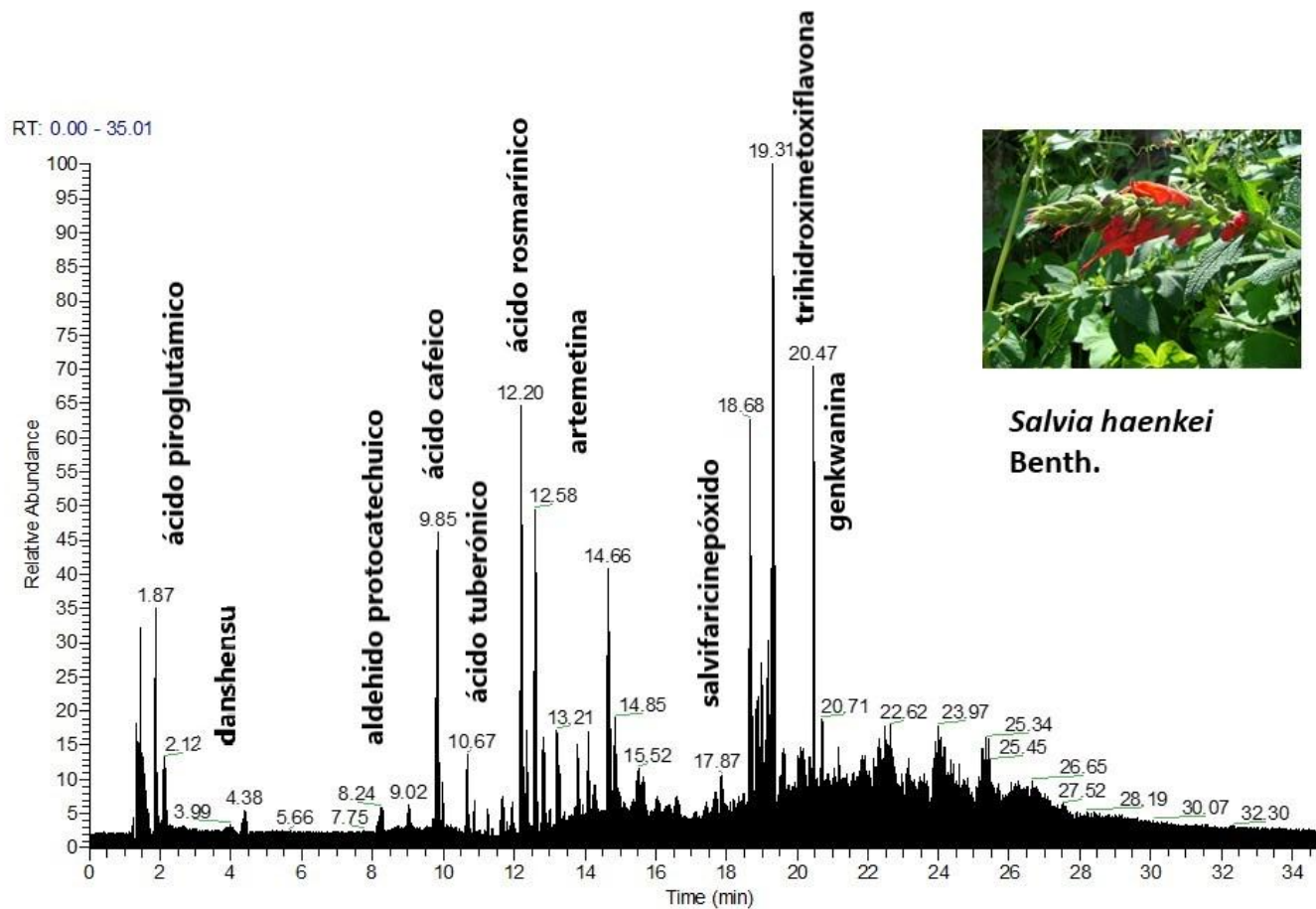
NL:
2.02E8
Base Peak
MS CAS8

Clinopodium revolutum
(R. y P.) Govaerts



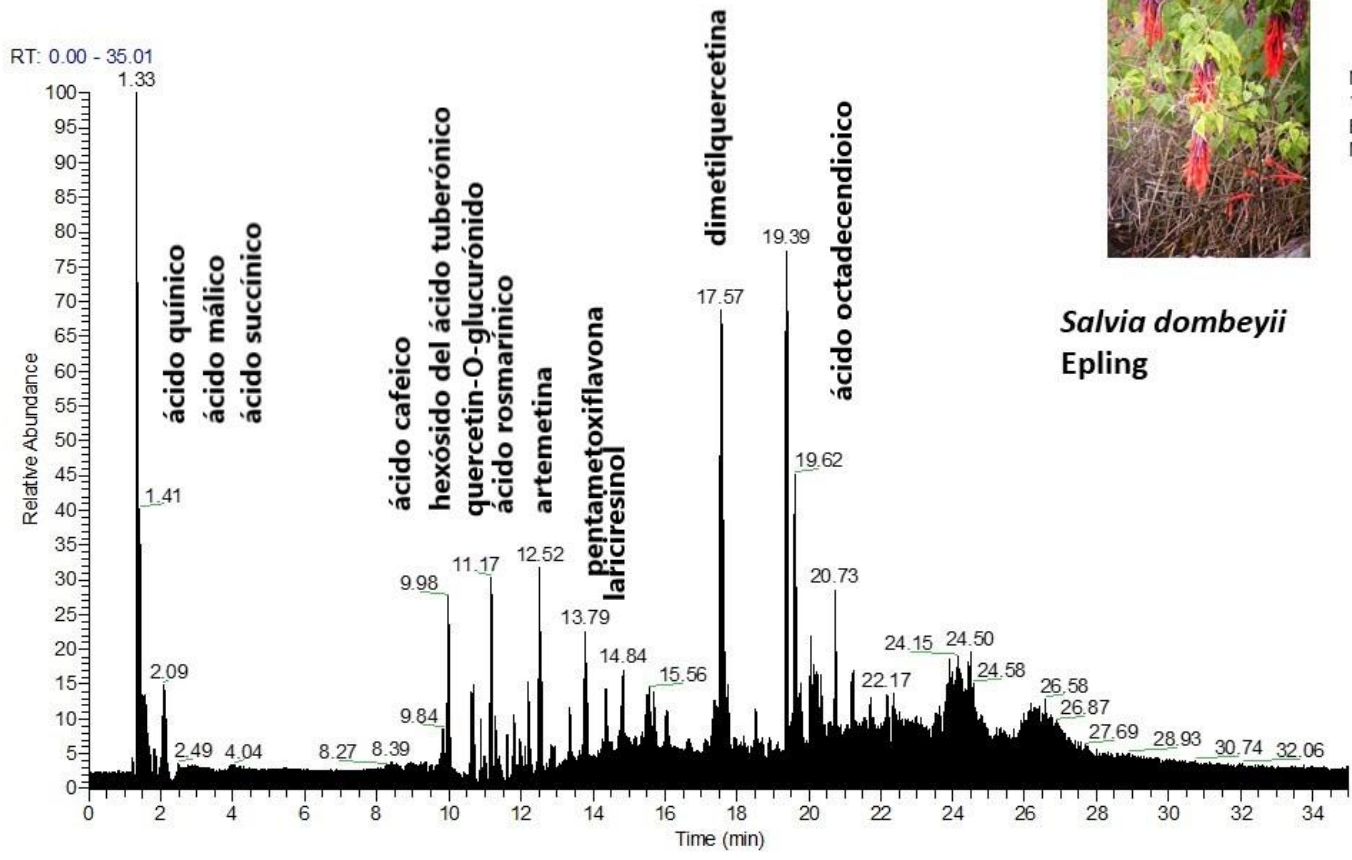
NL:
1.47E8
Base Peak
MS CAS9

Clinopodium sericeum
(C. Presl. Ex Benth.) Govaerts



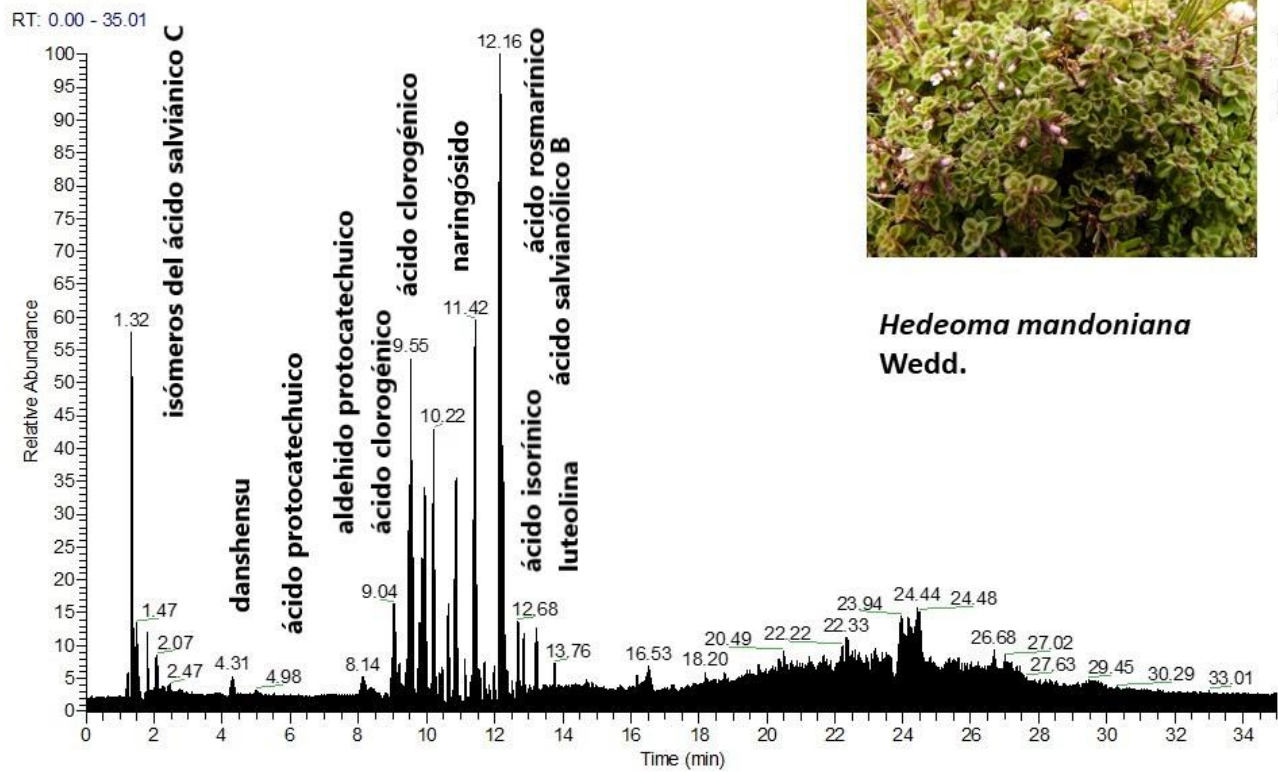
Salvia haenkei
Benth.

NL:
1.23E8
Base Peak
MS CAS10



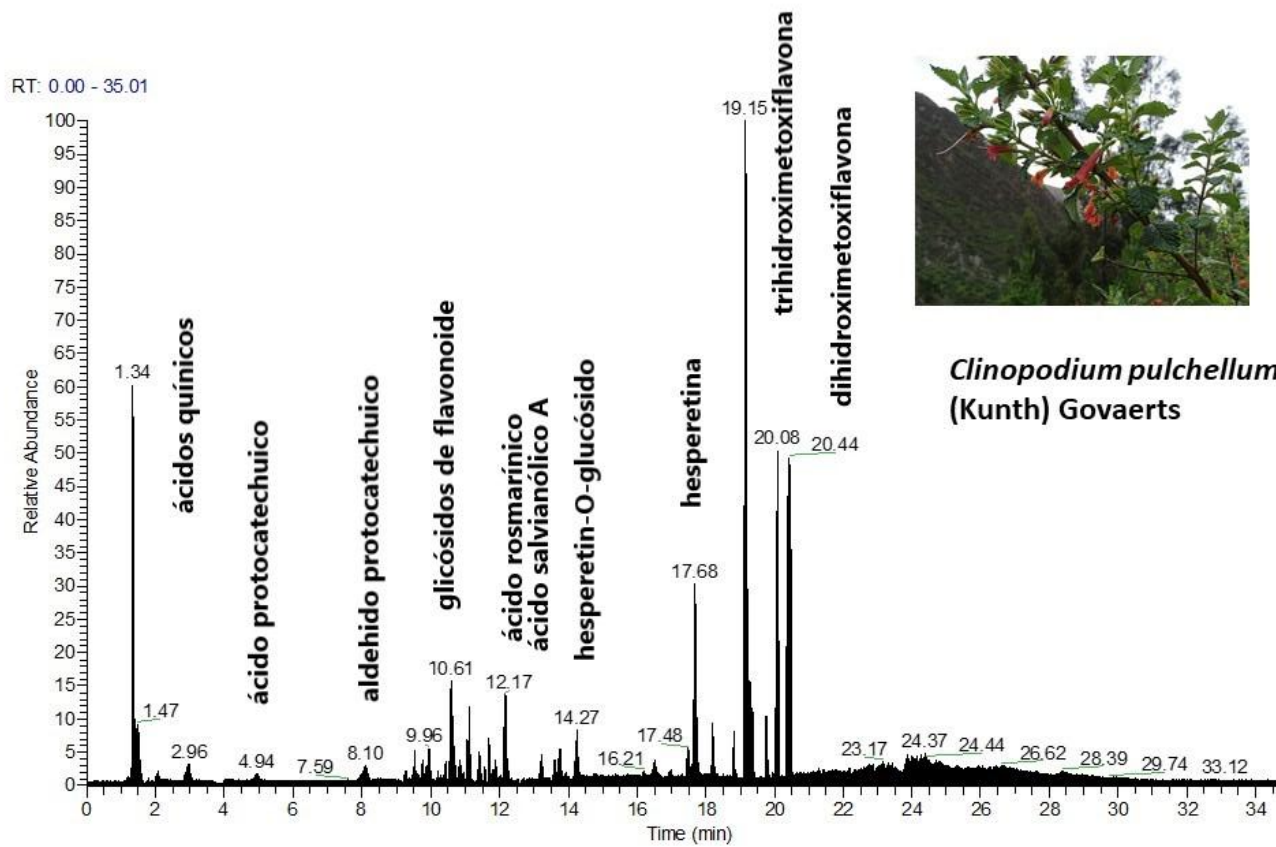
Salvia dombeyi
Epling

NL:
1.07E8
Base Peak
MS CAS11



NL:
1.12E8
Base Peak
MS CAS13

Hedeoma mandoniana
Wedd.



NL:
3.42E8
Base Peak
MS CAS14

Clinopodium pulchellum
(Kunth) Govaerts

ANEXO 5.- Fragmentaciones de los metabolitos encontrados.-

Fenólicos

Danshensu, 197.0454[M-H]⁻, 179.0346[M-H-H₂O]⁻, 135.0446[M-H-H₂O-CO₂]⁻, 123.0445[M-H-HCOOH-CO]⁻. [Li,C. et al.2019; Luo 2019et al. ; Guo et al. 2019.].

Ácido protocatechuico, 153.0190[M-H]⁻, 135.0448[M-H-H₂O]⁻, 109.0289[M-H-CO₂]⁻. [Li, C. et al. 2019].

Aldehido protocatechuico, 137.0239[M-H]⁻, 109.0289[M-2H-CO]⁻. [Li, C. et al. 2019].

Hexósido del ácido cafeico, 341.0883[M-H]⁻, 179.0347[ácido cafeico- H]⁻. [Abu-Reidah et al. 2012; Shen et al. 2018].

Ácido coumárico, 163.0399[M-H]⁻, 119.0497[M-carboxil]⁻ [Sharma et al. 2020; Velamuri et al.2020].

Ácido cafeoilquínico, 353.0883[M-H]⁻, 191.0560[ácido quínico-H]⁻, 179.0559[ácido cafeico- H]⁻, 135.0447[ácido cafeico-H-CO₂]⁻. [Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020; Gil et al. 2017 y 2018; Schutz et al. 2004; Li, Q. et al. 2016].

Ácido cafeico, 179.0348[M-H]⁻, 135.0446 [M-H-CO₂]⁻. [Sharma et al. 2020; Shen et al. 2018; Velamuri et al. 2020].

Ácido 4-O-(p-coumaroil)quinico, 337.0934[M-H]⁻, 191.0557[ácido quínico-H]⁻, 163.0397[ácido p-coumárico -1]⁻, 118.9653[ácido p-coumárico -H-CO₂]⁻. [Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020; Krzyznowska et al. 2018; Li, Q. et al. 2016].

p-Coumaroil hexósido, 325.093[M-H]⁻, 119.0496[coumaroato – CO₂]⁻, 163.0396[coumaroato]⁻. [Abu-Reidah et al. 2012].

Feruloil hexósido, 355.1036[M-H]⁻, 193.0502[ferulato]⁻, 149.0240[ferulato-CO₂]⁻. [Abu-Reidah et al.2012].

Cafeöldihidroxihexil ester 295.1193[M-H]⁻, 161.0242[C₉H₅O₃]⁻.

Ácido ferúlico, 193.0504[M-H]⁻, 149.0239[ácido ferúlico-H-CO₂]⁻, 178.0224[M-H-CH₃]⁻. [Luo et al. 2019; Misic et al. 2015; Li, J. et al. 2019].

Acido feruloilquínico, 367.1029 [M-H]⁻, 193.0501[ferulato]⁻, 191.0560[quinato]⁻, 149.0240[quinato-CO₂]⁻.

Cafeato de etilo, 207.0661[M-H]⁻, 179.0347[ácido cafeico- H]⁻.

Cafeato de vinilo, 205.0505[M-H]⁻, 179.0350 [cafeato]⁻, 162.0193[cafeoil-H]⁻.

Ácidos salvianólicos

Ácido salviánico C, 377.0884[M-H]⁻, 359.0777[M-H₂O]⁻, 197.0454[HOOC-CHOH-CH₂-C₆H₃(OH)₂ - H]⁻. [Shen et al. 2018].

Importante: [HOOC-CHOH-CH₂-C₆H₃(OH)₂-H]⁻ = 197.0454 y HOOC-CH-CH₂-C₆H₃(OH)₂ = 181

Malonato del ácido salviánico C, 463.0885[M-H]⁻, 267.0511 [M-197.0454]⁻, 377.0881, 359.0775[rosmarinato]⁻. [Shen et al. 2018]

Ácido yunnaneico E, 571.1093[M-H]⁻, 527.1198[M-H-CO₂]⁻, 330.0707[M-H-CO₂-197]⁻, 285.0773[M-H-197-CO₂- COOH]⁻ [Luo et al. 2019].

Ácido sagerínico, 719.1600[M-H]⁻, 539.1186[M-181]⁻, 359.0715[M-AR-H]⁻, donde AR = ácido rosmarínico. El ácido sagerínico es la unión [2+2] via dobles enlaces de 2 moléculas de AR [Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020; Barros et al. 2013; Fialová et al. 2015; Mirón et al. 2013].

Ácido clerodendranoico H, 719.1597[M-H]⁻, 522.1326[M-danshensu-H]⁻, 629.1397[M- 2 carboxyl-H]⁻. [Luo et al. 2019].

Ácido dimetilrosmarínico, 387.1091[M-H]⁻, 179.0347, 135.0447, 161.0452.

Ácido dihidrorosmarínico, 361.0932[M-H]⁻, 197.0453, 165.0553.

Ácido rosmarínico 359.0775 [M-H]⁻, 197.0452, 179.0345, 161.0240. [Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020; Barros et al. 2013, Fialová et al. 2015; Luo et al. 2019; Guo et al. 2019].

Ácido cafeoil-4'-hidroxifenil-lactico, “ácido isorínico” 343.0827[M-H]⁻, 327.2181[M-OH]⁻ [Shen et al. 2018 , Satake et al. 1999].

Rosmarinato de metilo, 379.0935 [M-H]⁻, 359.0778,194.0540, 179.0347. [Li, J. et al. 2019; Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020].

Ácido salvianólico F, 313.0721 [M-H]⁻, 269.0821, 159.0656. [Shen et al. 2018].

Rosmarinato de etilo, 387.1088[M-H]⁻, 359.0777[M-ethyl]⁻, 206.9724[M- cafeato-H]⁻. [Li, J.et al. 2019; Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020].

Teucrol, 315.088[M-H]⁻, 179.0349[ácido cafeico-H]⁻, 135.0447[ácido cafeico-H-CO₂]⁻, 161.0244.

Ácido litospérmico 537.1038 [M-H]⁻; 493.1147 [M-CO₂-H]⁻, 295.0610 [493.1145-197.0453-H]⁻ [Shen et al. 2018; Li, C. et al. 2019].

Ácido salvianólico A 493.1135[M-H]⁻; 313.0723[M-179.0380-2H]⁻; 295.1192[M-197.0450-2H]⁻ [Shen et al. 2018; Liu et al. 2007; Li,C. et al. 2019; Luo et al. 2019].

Ácido salvianólico B 717.1456[M-H]⁻; 537.1024[M- 179.0380- 2H]⁻; 519.0930 [M-197.0450-2H]⁻; 321.0488[519.0930-197.0450-H]⁻; 339.0512[519.0930- 179.0380-H]⁻. [Shen et al. 2018; Li, Q. et al. 2016; Guo et al. 2019; Mirónet al. 2013; Luo et al. 2019].

Flavonoides

Qu-3-O-vicianósido, 595.1301 [M-H]⁻, 301.0363[M-vicianosa-H]⁻ = [M-294-H]⁻.

Qu-3-O-rutinósido, 609.1457[M-H]⁻, 301.0357[M-rutinosa-H]⁻ = [M- 308-H]⁻. [Abu-Reidah et al. 2012].

Eriodyctiol-O-rutinósido, 595.1661[M-H]⁻, 287.0562, 151.0397. [Boudair et al. 2019].

Luteolin-O-rutinósido, 593.1504[M-H]⁻, 285.0403[M-rutinosa-H]⁻, 447.0928. [Li, J. et al. 2019].

Apigenin-O-rutinósido, 577.1556[M-H]⁻, 269.103[M-rutinosa-H]⁻. [Li, J 2019.; Li, Q. et al. 2016].

Luteolin-O-hexósido, 447.0936[M-hexosa-H]⁻, 285.0406. [Mena et al. 2016].

Quercetin-O-hexósido, 463.0886[M-H]⁻, 301.0358[M-hexosa-H]⁻ = [M-162-H]⁻. [Sulniuté et al. 2017, Abu-Reidah et al. 2012].

Qu-3-O-GlcA, 477.0679[M-H]⁻, 301.0356[M-GlcA-H]⁻ = [M-176-H]⁻. [Sulniuté et al. 2017].

Isorhamnetin-O-hexósido, 477.1046[M-H]⁻, 315.0824[isorhamnetin-H]⁻, 357.0352, 462.0768. [Mena et al.2016].

Lu-O-GlcA, 461.0729[M-H]⁻, 285.0407[M-GlcA-H]⁻. [Sulniuté et al. 2017].

Kaempferol-O-hexósido, 447.0937[M-H]⁻, 285.0407[kaempferol-hexosa]⁻. [Abu-Reidah et al. 2012].

Dihidrobaicalina, 447.0936[M-H]⁻, 403.1613[M-H-CO₂]⁻, 271.0250[M-ácido glucurónico]⁻.

Qu-O-glucuronide metil éster, 491.0834[M-H]⁻, 299.0565, 301.0358[quercetina-H]⁻, 302.0388.

Trihidroximetoxiflavona hexósido, 461.1093[M-H]⁻, 299.0559 [M-H-hexosa]⁻.

Isorhamnetina, 315.0515[M-H]⁻, 300.0276[M-CH₃-H]⁻, 271.1550[(M-CH₃-H)-(H+CO)]⁻, 151.0397[A]⁻. [Keckes et al. 2013, Chen et al. 2015].

Isorhamnetin acetildihidroxitil éster, 445.1144[M-H]⁻, 387.1090[M-acetil]⁻, 315.0514[M-acetil, hidroxitil]⁻, 151.0396 A⁻.

Artemetina, 387.1089[M-H]⁻, 372.1184[M-H-Me]⁻, 357.0992[M-H-2Me]⁻, 342.1067[M-H-3Me]⁻, 327.1241[M-H-4Me]⁻.

Heptametoxiflavona, 431.1352[M-H]⁻, 417.1189, 402.1563, 387.1089, 372.1174.

Pentametoxiflavona, 371.114[M-H]⁻, 357.1349, 327.1241, 311.0934.

Dihidrofilonotisflavona, 571.0883[M-H]⁻, 285.0410, 286.0441[M-luteolina-H]⁻.

Crisoeriol, 299.0565[M-H]⁻, 285.0413 [M-H-metil]⁻, 151.0397 A⁻, 255.0698 [M-H-CO₂]⁻.

Trihidroximetoxiflavona, 299.0565[M-H]⁻, 151.0765[A]⁻, 284.0326[M-CH₃-H]⁻. [Brito et al. 2014].

Kf, 285.0409 [M-H]⁻, 151.0033[A]⁻. [Keckes et al. 2013].

Qu, 301.0356[M-H]⁻, 179.0344, 121.0288, 273.1719. [Keckes et al. 2013].

Ap, 269.0459[M-H]⁻, 151.0396 A⁻, 117.0187B⁻. [Keckes et al. 2013; Li, Q. et al. 2016].

Naringenin, 271.0616[M-H]⁻, 151.0397 A⁻, 177.0190 [M-H-anillo B]⁻. [Ertas et al. 2015].

Qu-dimetileter, 329.0669[M-H]⁻, 314.0756[M-CH₃-H]⁻. [Misic et al. 2015].

4',5'-Dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina), 313.0724[M-H]⁻, 298.0488[M-CH₃-H]⁻, 283.0249[M-2 CH₃-H]⁻. [Peter et al. 2015].

3',5'-Dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona (eupatorina), 343.0829[M-H]⁻, 328.0595[M-CH₃-H]⁻, 313.0360[M-2 CH₃-H]⁻, 298.0125[M-3 CH₃-H]⁻. [Guo et al. 2019; Li, L. et al. 2019].

Genkwanina, 283.0614[M-H]⁻, 151.0760[A]⁻, 268.0377[M-CH₃-H]⁻. [Mena et al. 2016].

Diterpenoides

Salvifarin epóxido, 355.119[M-H]⁻, 311.1291[M-H-CO₂]⁻.

Ácido hidroxycarnósico, 347.1869[M-H]⁻, 303.1606[M-H-CO₂]⁻, 331.1918 [M-OH]⁻.

Isómeros de rosmanol, 345.1711[M-H]⁻, 283.1704[M-CO₂-H₂O-H]⁻. [Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020; Wang, L et al. 2017].

Isómeros de horminona, 331.1919[M-H]⁻, 112.9850, 170.8329, 197.5107, 313.0712, 456.0566, 492.0332. [Wang, Y. et al. 2018].

Rosmadial, 343.1552[M-H]⁻, 299.1652 [M-H-CO₂]⁻, 315.1598 [M-formil]⁻.

Sageona, 299.1646[M-H]⁻, 256.1105[M-H- (iso-Pr)]⁻.

Oxorosmanol, 359.1503[M-H]⁻, 315.1602[M-H-CO₂]⁻.
Hidroxirosmanol, 361.1659[M-H]⁻, 317.1760 [M-H-CO₂]⁻.
Dehidrorosmanol, 343.1553[M-H]⁻, 299.1650[M-H-CO₂]⁻.
Metilrosmanol, 359.1867[M-H]⁻, 345.1711[M-H-CH₃]⁻.
Carnosol, 329.1761[M-H]⁻, 285.1861[M-H-CO₂]⁻. [Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020].
5-epi-Icetexona, 341.1396[M-H]⁻, 313.1440[M-CO-H]⁻. [Nieto et al. 2000].
Etil rosmanol, 373.2022[M-H]⁻, 329.1761[M-H-CO₂]⁻.
Etil hidroxycarnosato, 375.2182[M-H]⁻, 347.1869[M-H-ethyl]⁻.
Ácido carnósico, 331.1917[M-H]⁻, 287.2017 [M-CO₂-H]⁻. [Sharma et al. 2020; Velamuri et al. 2020].
7-O-Acetilhorminona 373.2022[M-H]⁻, 330.1802[M-H- (CO-CH₃)]⁻
Isómeros de salvinina, 317.2125[M-H]⁻, 207.1028[M-H- (CH₂-CO-CH₂-CO-CH=CH)]⁻. [Ahmed et al. 2004].
Rosmaridifenol, 315.1969[M-H]⁻, 285.1853[M-H-2methyl]⁻. [Loussaurn et al. 2017; Pertino et al. 2010].
Carnosato de etilo, 359.2232[M-H]⁻, 331.1919[M-ethyl]⁻.
Acetilhorminona, 373.2024[M-H]⁻, 331.1918[M-acetyl]⁻.

Otras sustancias

Isómeros del ácido quínico, 191.0559[M-H]⁻. [Taamalli et al. 2015].
Acido málico, 133.0139[M-H]⁻. [Taamalli et al. 2015].

Ácido cítrico, 191.0196[M-H]⁻. [Taamalli et al.2015].

Ácido piroglutámico, 128.0348[M-H]⁻. [Taamalli et al. 2015]

Ácido succínico, 117.0188[M-H]⁻. [Taamalli et al. 2015].

Ácido piroglutámico hexosa, 290.0884[M-H]⁻, 128.0346 [M-H-glucose]⁻.

Monoacetilglicerol, 133.0502[M-H]⁻.

Ácido hidroxihexanoico, 175.0611[M-H]⁻.

Glucósido del ácido tuberónico, 387.1666[M-H]⁻, 206.9725, 163.0033, 101.5668. [Taamalli et al. 2015].

Ácido tuberónico, 225.1133[M-H]⁻. [Taamalli et al. 2015].

Cimifugina, 305.1035[M-H]⁻, 274.1170[M-hidroximetil-H]⁻, 215.0098[M-CH₃COH-CH₃-H]⁻. [Gurbuz et al. 2018].

Lariciresinol, 359.1505[M-H]⁻, 419.1715. [PubChem].

Ácido trihidroxilinoico, 327.2183[M-H]⁻, 269.0457.

Isolariciresinol, 359.1502[M-H]⁻, 345.1346[M-Me]⁻, 344.1582[M-H-Me]⁻, 313.0714 [Fischer et al. 2012; Abu-Reidah et al. 2012].

Ácido octadecenoico, 311.2232[M-H]⁻. [Taamalli et al.2015].

Ácido dihidroxioctadecenoico, 311.2229[M-H]⁻. [Taamalli et al. 2015].

Ácido 9, 10-dihidroxiesteárico, 315.2547[M-H]⁻. [Taamalli et al. 2015].

ANEXO 6. Publicaciones generadas en la presente investigación

- Serrano, C. A., Villena, G. K., & Rodríguez, E. F. (2021). Phytochemical profile and rosmarinic acid purification from two Peruvian *Lepechinia* Willd. species (*Salviinae, Mentheae, Lamiaceae*). *Scientific Reports*, 11: 7260. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86692-3>.
- .
- Serrano Flores, C. A., Villena Chávez, G. K., & Rodríguez Rodríguez, E. F. (2020). Algunos componentes fitoquímicos y actividad antioxidante en representantes de la tribu *Mentheae* (*Lamiaceae*) del Perú. *Arnaldoa*, 27(1), 169-180. <http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27109>.



OPEN

Phytochemical profile and rosmarinic acid purification from two Peruvian *Lepechinia* Willd. species (*Salviinae*, *Mentheae*, *Lamiaceae*)

Carlos A. Serrano^{1✉}, Gretty K. Villena² & Eric F. Rodríguez³

The phytochemical profile of *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling and *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epling obtained by liquid chromatography associated with high-resolution mass spectrometry is presented. Forty eight compounds were detected exhibiting a variety of salvianolic acids and abietane phenolic diterpenoids. A simple procedure by cold evaporative crystallization to purify rosmarinic acid from these botanical species was also shown.

Traditional medicines in Peru like others in different parts of the world are characterized by the use of plants of the big family *Lamiaceae*^{1–4}. One of these approaches reports 25 *Lamiaceae* species out of a total of 510 medicinal plants (4.9%)⁴. *Lamiaceae* is a cosmopolitan family with more than 230 genera and approximately 7000 species^{5,6}. The *Lamiaceae* family in Peru has about 21 genera and 190 species, mostly herbs and shrubs, 57 species are endemic in 9 genera⁷. *Lamiaceae* has twelve subfamilies, one of them being *Nepetoideae* (3400 species, 105 genera)^{6,8}. *Mentheae* is the largest and economically important tribe of the *Nepetoideae* subfamily (2000 species, 60 genera, 3 tribes)^{6,9}. The *Mentheae* tribe in turn is divided into five sub-tribes: *Menthinae*, *Salviinae*, *Nepetinae*, *Prunellinae* and *Lycopinae*^{6,9,10}. In Peru *Salviinae* tribe is represented fundamentally by two genera: *Lepechinia* and *Salvia*. The pan american genus *Lepechinia* Willd. is constituted by ca 45 species, 30 of which occur in South America at elevations from 1500 to 4000 m within a broad range of habitats^{11,12}. *Lepechinia* in Peru has 4 endemic species: *Lepechinia marica* Epling & Mathias, *Lepechinia mollis* Epling, *Lepechinia scobina* Epling *Lepechinia tomentosa* (Benth.) Epling⁶. In the *Mentheae* tribe, the presence of volatile and non-volatile terpenoids, the absence of iridoids (monoterpenoglycosides) and the abundance of rosmarinic acid and their higher derivatives, salvianolic acids, is characteristic¹³. The presence of rosmarinic acid is not exclusive to *Mentheae*, but for all *Nepetoideae*^{6,13}. In contrast, rosmarinic acid is not present in the *Lamoideae* subfamily, but iridoids are¹³. In addition, it is known that rosmarinic acid is also present in very diverse taxa in dicots, monocots, ferns and hornworts and that for this reason it is not a good chemotaxonomic indicator but very useful to distinguish intrafamilial taxonomic subgroups in *Lamiaceae*¹⁴. This varied taxonomic distribution suggests a complicated evolutionary history in rosmarinic acid biosynthesis, for example *Lamiaceae* and *Boraginaceae* (order *Lamiales*) have different mechanisms for producing rosmarinic acid¹⁵ so it is likely that each case has different biosynthetic mechanisms. Rosmarinic acid and salvianolic acids, particularly salvianolic acid A and B has interesting effects on fibrosis, cancer and neurodegenerative processes^{16–18}. Other important effects of rosmarinic acid are as an anti-inflammatory, UV protector, antioxidant, cytoprotector¹⁸ and as an antihepatotoxic¹⁹. *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling is a medicinal herb that grows at 3800–4000 m of altitude where is employed for respiratory diseases². In the southern andes of Perú this plant “Puna Salvia”²⁰ was the third most used plant in communities whose health then depended almost exclusively on the use of medicinal plants. *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epling is a sub-shrub that grows in the foothills of the eastern Andes of southern Peru and according to the inhabitants of the collection area is used as a tonic and comforting for the body. In a recent work on Argentinean *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling^{21,22} was reported the presence of three hydroxycinnamic acids: caffeic, p-coumaric and rosmarinic acids and seven abietane diterpenoids: carnosol, rosmanol, carnosic acid, carnosic acid γ -lactone, 20-methyl carnosate, 11,12-*O*-diacetylmethyl carnosate and 11,12-*O*-diacetylcarnosic acid, showing

¹Laboratorio de Química Orgánica, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco, Peru. ²Laboratorio de Micología y Biotecnología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Peru. ³Herbarium Truxillense (HUT), Universidad Nacional de Trujillo-Perú, Trujillo, Peru. ✉email: carlos.serrano@unsaac.edu.pe

Peak	Assignment	Lm	Lf	tR (min.)	[M-H] ⁻	Theoretical mass (m/z)	Experimental mass (m/z)	Error (ppm)	Ions (m/z)
1	Quinic acid	+	+	1.32	C ₇ H ₁₁ O ₁₆	191.0556	191.0559	1.57	127.0395
2	Quinic acid isomer	+	+	1.46	C ₇ H ₁₁ O ₁₆	191.0556	191.056	2.09	127.8696
3	Succinic acid	-	+	1.98	C ₄ H ₅ O ₄	117.0188	117.0188	0	
4	3,4-dihydroxyphenyl lactic acid "danshensu"	+	+	4.02	C ₉ H ₉ O ₅	197.045	197.0454	2.03	135.0447, 179.0347 ^{30,33}
5	protocatechuic acid	-	+	4.64	C ₇ H ₅ O ₄	153.0188	153.019	1.31	135.0448, 109.0289
6	Protocatechuic aldehyde	+	+	7.71	C ₇ H ₅ O ₃	137.0239	137.024	0.73	108.0209, 119.0341
7	caffeic acid	+	+	9.63	C ₉ H ₇ O ₄	179.0345	179.0348	1.68	135.0447
8	Tuberonic acid glucoside	+	+	9.88	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	387.1655	387.1666	2.84	163.0034, 207.0296, 101.0236
9	Salvianic acid C or isomer	+	+	10.48	C ₁₈ H ₁₇ O ₉	377.0873	377.0884	2.92	359.0777, 197.0454, 347.0776, 137.0240 ³¹
10	Yunnaneic acid E	-	+	10.54	C ₂₇ H ₂₃ O ₁₄	571.1088	571.1093	0.88	391.0674, 373.0576, 347.0784, 285.0773, 197.0455, 179.0357, 161.0241, 135.0447; 527.1197[M-carboxyl] ⁻ , 329.0672[M-H-carboxyl-danshensu] ⁻ ³³
11	Luteolin-O-hexoside	+	-	11.02	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0928	447.0936	1.78	285.0406
12	salvianic acid C malonate	+	+	11.05	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0877	463.0887	2.15	267.0662, 377.1822, 359.0776
13	Clerodendranic acid H	+	+	11.59	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1612	719.1602	1.39	359.0779, 179.0347, 197.0452, 161.0241, 135.0447, 539.1193; 522.1127[M-danshensu-H] ⁻ , 629.1240[M-2carboxyl-H] ⁻ ^{33,40}
14	Sagerinic acid	+	+	11.93	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₆	719.1612	719.1601	1.53	161.0241, 179.0347, 359.0775, 539.1188 ^{34,35}
15	Rosmarinic acid	+	+	12.1	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0767	359.0776	2.51	161.0240, 179.0346, 197.0453 ^{34,35}
16	(caffeoyl-4'-hydroxyphenyl)lactic acid, "isorinic acid"	+	+	12.98	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343.0818	343.0829	3.21	161.0241, 327.2182 ³¹
17	methylosmarinate	-	+	13.28	C ₁₉ H ₁₇ O ₈	373.0924	373.0935	2.95	359.0778, 194.0540, 179.0347
18	ethyl caffeate	+	+	14.73	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	207.0657	207.0662	2.4	179.0346
19	salvianolic acid F	+	+	15.53	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0712	313.0721	2.88	269.0822[M-carboxyl] ⁻ , 159.0657 ³¹
20	vinyl caffeate	-	+	17.05	C ₁₁ H ₉ O ₄	205.0501	205.0505	1.95	162.0193 [Caffeoyl-H] ⁻
21	Ethyl rosmarinate	+	+	17.34	C ₂₀ H ₁₉ O ₈	387.108	387.1089	2.6	359.0776, 206.9724, 179.0346 ³⁰
22	salvianolic acid F isomer	-	+	17.58	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.0712	313.0721	2.88	269.0821, 159.0448 ³¹
23	hydroxycarnosic acid	-	+	18.5	C ₂₀ H ₂₇ O ₅	347.1859	347.1869	2.88	303.1606[M-H-CO ₂] ⁻ , 331.1918 [M-OH] ⁻
24	hydroxycarnosic acid isomer	-	+	18.92	C ₂₀ H ₂₇ O ₅	347.1859	347.1869	2.88	303.1234[M-H-CO ₂] ⁻ , 331.1919 [M-OH] ⁻
25	Horminone or isomer	-	+	19.5	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	331.191	331.1919	0.3	112.9850, 170.8329, 197.5107, 301.1813, 313.0712, 456.0566, 492.0332 ³⁸
26	Horminone or isomer	-	+	20.05	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	331.191	331.1919	0.3	112.9850, 170.8328, 197.5106, 313.2389, 456.0567, 492.0332 ³⁸
27	Rosmanol isomer	+	+	20.28	C ₂₀ H ₂₅ O ₅	345.1702	345.1712	2.9	283.0616 ^{36,37}
28	hydroxycarnosic acid isomer	+	-	20.52	C ₂₀ H ₂₇ O ₅	347.1859	347.1866	2.02	331.1918 [M-OH] ⁻
29	Rosmanol isomer	+	-	20.79	C ₂₀ H ₂₅ O ₅	345.1702	345.1710	2.32	283.1707 ^{36,37}
30	oxorosmanol	+	-	20.94	C ₂₀ H ₂₃ O ₆	359.1495	359.1503	1.39	315.1607 [M-H-CO ₂] ⁻
31	Oxorosmanol isomer	+	-	21.21	C ₂₀ H ₂₃ O ₆	359.1495	359.1503	1.39	315.1606 [M-H-CO ₂] ⁻
32	hydroxyrosmanol	+	-	21.44	C ₂₀ H ₂₅ O ₆	361.1651	361.1659	2.22	317.1760[M-H-CO ₂] ⁻
33	dehydrorosmanol	+	-	21.76	C ₂₀ H ₂₃ O ₅	343.1546	343.1553	2.04	299.1650[M-H-CO ₂] ⁻
34	sageone	+	-	21.91	C ₁₉ H ₂₃ O ₃	299.1647	299.1652	1.67	256.1107[M-H-methyl] ⁻
35	methylosmanol	+	-	22.03	C ₂₁ H ₂₇ O ₅	359.1859	359.1867	2.23	345.1711[M-H-isopropyl] ⁻
36	hydroxycarnosic acid isomer	-	+	22.14	C ₂₀ H ₂₇ O ₅	347.1859	347.1869	2.88	331.1919 [M-OH] ⁻
37	carnosol	+	-	22.2	C ₂₀ H ₂₅ O ₄	329.1752	329.1761	2.70	285.1861[M-H-CO ₂] ⁻ ^{36,37}
38	isocarnosol	+	-	22.46	C ₂₀ H ₂₅ O ₄	329.1752	329.1760	2.43	285.1861[M-H-CO ₂] ⁻ ^{36,37}
39	Dehydrorosmanol isomer	+	-	22.66	C ₂₀ H ₂₃ O ₅	343.1546	343.1554	2.33	299.1653[M-H-CO ₂] ⁻
40	ethylrosmanol	+	-	22.93	C ₂₂ H ₂₉ O ₅	373.2014	373.2022	2.14	329.1761[M-H-CO ₂] ⁻
41	ethyl hydroxycarnosate	-	+	23.48	C ₂₂ H ₃₁ O ₅	375.2172	375.2182	2.67	347.1869 [M-H-ethyl] ⁻
42	carnosic acid	+	+	23.93	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	331.191	331.1917	2.11	287.2017 ^{36,37}

Continued

Peak	Assignment	Lm	Lf	tR (min.)	[M-H] ⁻	Theoretical mass (m/z)	Experimental mass (m/z)	Error (ppm)	Ions (m/z)
43	rosmaridiphenol	-	+	25.98	C ₂₀ H ₂₇ O ₃	315.196	315.1969	2.86	285.1853[M-H-2methyl] ^{-39,41}
44	ethyl carnosate	-	+	26.62	C ₂₂ H ₃₁ O ₄	359.2223	359.2232	2.51	331.1919 [M-ethyl] ⁻
45	Acetylhorninone isomer	+	-	24.04	C ₂₂ H ₂₉ O ₅	373.2015	373.2022	1.88	331.1916 [M-acetyl] ⁻
46	Salvinine or isomer	+	-	25.68	C ₂₀ H ₂₉ O ₃	317.2117	317.2125	2.52	287.2012[M-hydroxymethyl] ⁻
47	Salvinine or isomer	+	-	27.68	C ₂₀ H ₂₉ O ₃	317.2117	317.2124	2.21	287.2013[M-hydroxymethyl] ⁻
48	Acetylhorninone isomer	-	+	28.41	C ₂₂ H ₂₉ O ₅	373.2015	373.2024	2.41	331.1918 [M-acetyl] ⁻

Table 1. Compounds detected in the ethanolic extract of *Lepechinia meyenii* Walp. (Epling) (*Lm*) and *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epling (*Lf*) by UHPLC/MSMS.

antityrosinase and antibacterial properties. The published works with *L. floribunda* (Benth.) Epling deal with the essential oil obtained from plants of Argentina and Bolivia^{23,24}. In a previous work we reported, for both species, *L. meyenii* and *L. floribunda*, the total phenolics content (50.00 and 20.77 µg gallic acid/100 µg ethanolic extract), antioxidant activity (25.79 and 14.11 µg ascorbic acid/100 µg ethanolic extract) and the rosmarinic acid content (4.61 and 1.43%)²⁵. The rosmarinic acid content in these two *Lepechinias* is high when compared with the content in species of the genus *Salvia* from other parts of the world^{26,27}. *Lepechinia* also has a higher rosmarinic acid content than Peruvian *Salvia*, and than Peruvian *Minthostachys*, *Clinopodium* and *Hedeoma* (*Menthinae*)²⁵.

Considering all the studies mentioned above, we see that *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling and *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epling have not been fully investigated for their non-volatile composition. Ultra-performance liquid chromatography associated with tandem mass spectrometry (UHPLC/MSMS) is an important structural tool for the study of complex plant extracts, for this we will use the UHPLC-Q-OT-MS technology, the Q-Exactive mass spectrometer hybridizes the high mass resolving power of orbitrap mass analyzer with the selectivity of a quadrupole, multiple precursor ions are fragmented in a high energy collision cell and the product ions could be detected with a mass error of less than 5 ppm for a wide range of analyte concentrations^{28,29}. Data processing includes spectral similarity prospection and characteristic product ions—neutral loss searching^{29,30}.

In the present work, the first objective is the phytochemical profile of the ethanolic extract of the aerial parts of both plants by UHPL-Q-OT-MS. And, our second objective is the purification of rosmarinic acid from these two species.

Results

Phytochemical profile. The phytochemical profile of the ethanolic extract of *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling and *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epling were obtained in negative mode and the detected compounds appears in Table 1. The structures are shown in the Fig. 1. Assignments were made based on data published in the literature^{30–41}. We found the free monomers 3,4-dihydroxyphenyllactic acid “danshensu” (*m/z* 197.0450)^{30,33}, caffeic acid (*m/z* 179.0345), protocatechuic aldehyde (*m/z* 137.0239) and protocatechuic acid (*m/z* 153.0188). Fragments *m/z* 197.0450 of danshensu and *m/z* 179.0345 of caffeic acid appear in the mass spectra of all salvianolic acids, they are diagnostic ions in the ion filtering strategy³⁰. Dimeric salvianolic acids were rosmarinic acid (*m/z* 359.0767)^{34,35}, salvianic acid C (*m/z* 377.0873)³¹, (caffeoyl-4-hydroxyphenyl)lactic acid, “isorinic acid”⁶⁰ (*m/z* 343.0818)³¹, and salvianolic acid F (*m/z* 313.0712)³¹. Salvianic acid C is a molecule that results from hydration of rosmarinic acid of which there is little information. The fragment *m/z* 359.0767 of rosmarinic acid it is also a diagnostic ion for the larger salvianolic acids. A trimeric salvianolic acid were yunnaneic acid E (*m/z* 571.1088)³³. Tetrameric salvianolic acids were sagerinic acid (*m/z* 719.1612)^{34,35} and clerodendranic acid H (*m/z* 719.1612)^{33,40}, Fig. 2. In both *Lepechinias* we found the phenolic diterpenoids carnosol (*m/z* 329.1752) [M-H-CO₂]^{-36,37}, rosmanol (*m/z* 345.1702) [M-H-CO₂-H₂O]^{-36,37}, carnosic acid (*m/z* 331.1910) [M-H-CO₂-iPr]^{-36,37}. The diagnostic ions are *m/z* 285.1861 for carnosol, *m/z* 283.0616 for rosmanol and *m/z* 287.2017 for carnosic acid³⁷. Other diterpenoid structures are rosmaridiphenol (*m/z* 315.1960)^{39,41}, sageone (*m/z* 299.1647), the diterpenoid diketone salvinine (*m/z* 317.2117), and the phenantrenequinone horninone (*m/z* 331.1910)³⁸. The structure presented for rosmaridiphenol has the carbonyl in position 1 and not in position 20 as established in⁴¹. Also, as can be seen, several of the assignments correspond to minor modifications of the structures described: Ethyl rosmarinate (*m/z* 387.1080)³⁰, Methyl rosmarinate (*m/z* 373.0924)³⁰, ethyl caffeate (*m/z* 207.0657)³⁰, vinyl caffeate (*m/z* 205.0501), carnosol, rosmanol and carnosic acid derivatives and acetylhorninone. Vinyl caffeate is not a rarity, it has been isolated from plants of the *Perilla* and *Isodon* genus (*Lamiaceae*)^{42,43}, has described methods to synthesize it^{44,45} and serves as a precursor to synthesize chlorogenic acids⁴⁶. Also, note the presence of quinic acid (*m/z* 191.0556) but with the absence of chlorogenic acids. The almost null presentation of flavonoids, only luteolin-O-hexoside (*m/z* 447.0928) in *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling and the presence of the glucoside of tuberonic acid (*m/z* 387.1655) which is a growth hormone. The HPLC / MSMS chromatograms of both *L. meyenii* and *L. floribunda* are shown in Fig. 3.

Rosmarinic acid purification. The purification of rosmarinic acid was carried out based on the methodology described in^{47,48} using as initial extractant 50% ethanol instead of pure ethanol^{49–52}. After evaporating the alcohol from the extract, purification involves adjusting the pH to 2–2.5 and successive partitions with ethyl

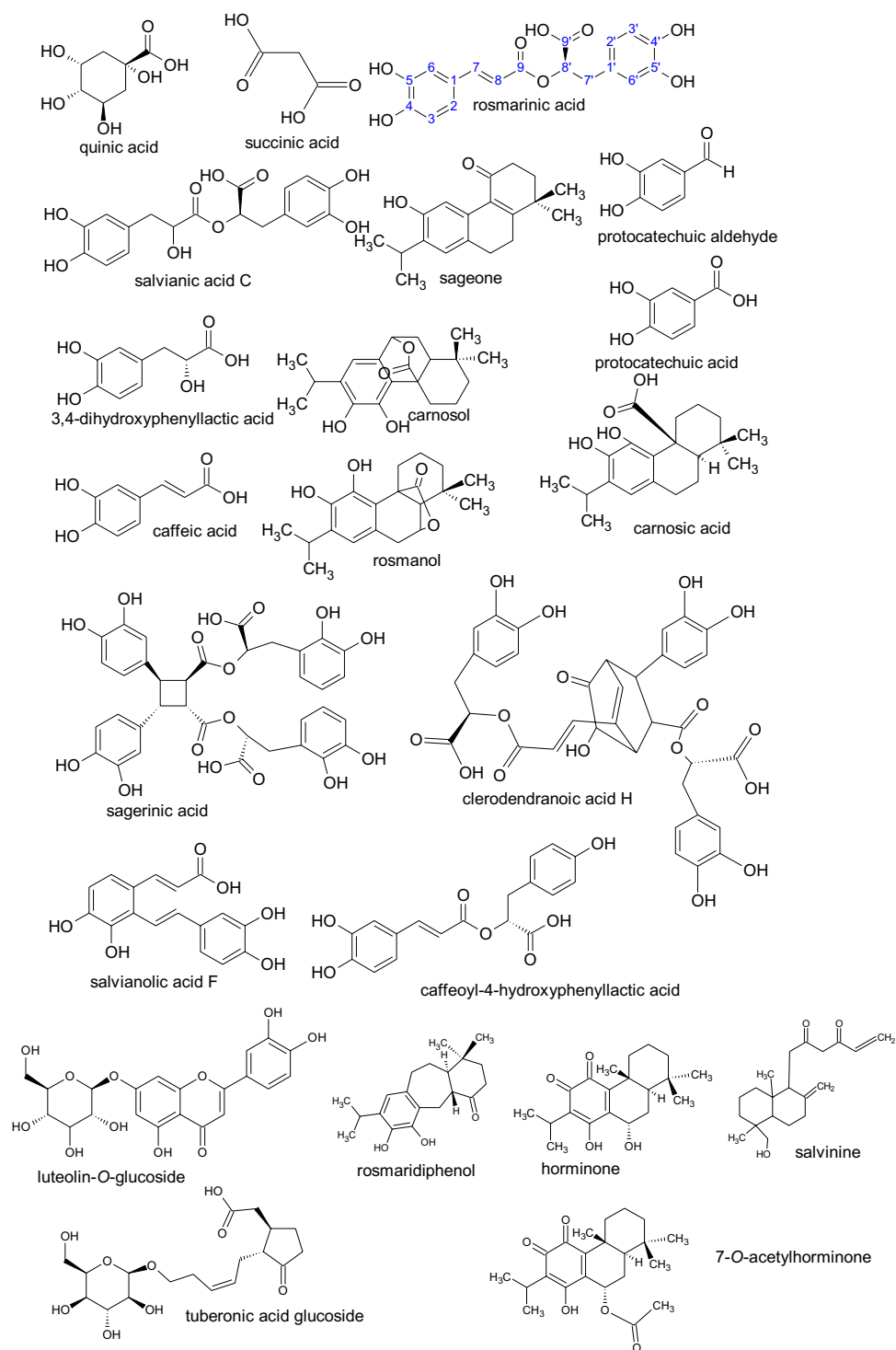


Figure 1. Detected compounds in *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling and *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epling.

acetate as described in 3.6. The choice of this pH value is obtained by simulating the log D of the rosmarinic acid molecule (Fig. 4). Log D are the logP values but over the entire pH range, 0–14.

The final stage of purification involves precipitating solid rosmarinic acid from a concentrated aqueous solution. This was done by placing said solution in a vacuum desiccator with a strong desiccant such as sulfuric acid, which concentrates the cold solution. The solid obtained can be recrystallized by the same procedure.

The yields of rosmarinic acid were 2.50% for *L. meyenii* and 1.01% for *L. floribunda* with an analytical PDA-UHPLC purity > 98% (330, 254 and 280 nm), see Fig. 5 and 3.8. The beige solid was characterized with UV, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ techniques.

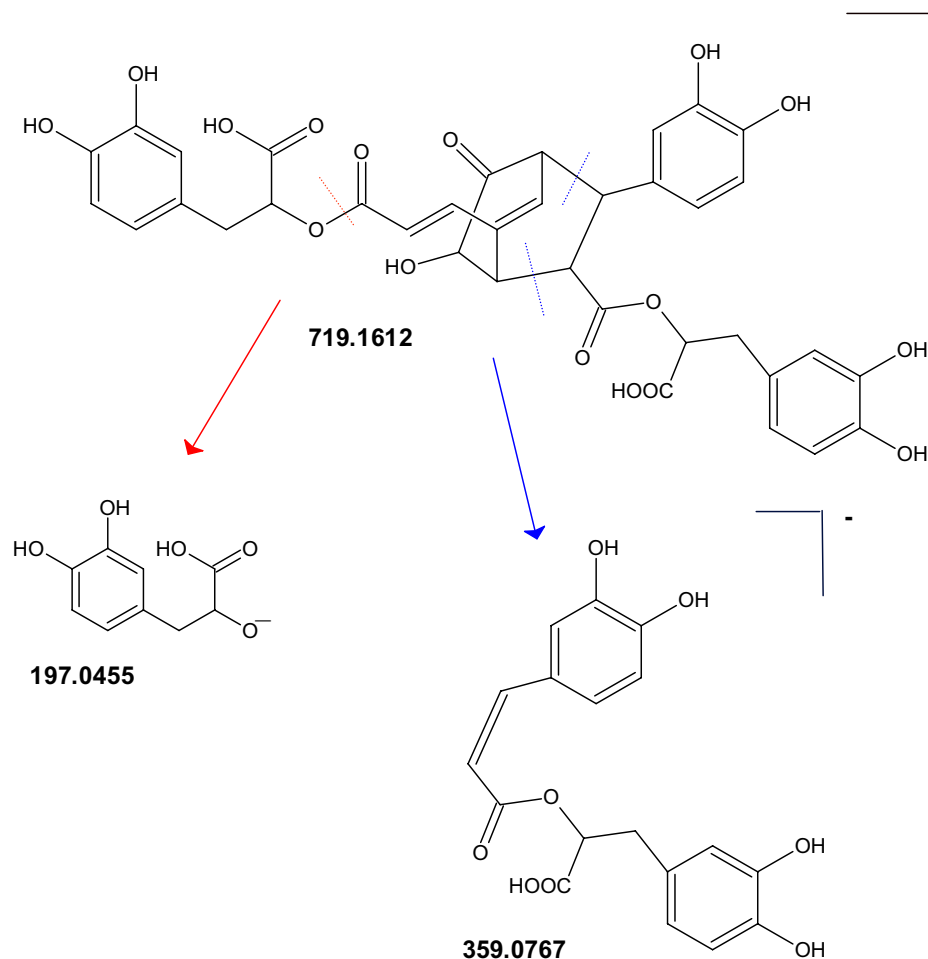


Figure 2. Proposed fragmentation of clerodendranoic acid H.

Discussion

This is the first UHPLC/MSMS phytochemical profile of *L. meyenii* and *L. floribunda* showing salvianolic acids and diterpenoids like principal components. There are the typical monomers, caffeic acid, protocatechuic aldehyde, protocatechuic acid and “danshensu”, which are considered to be the building blocks of dimeric salvianolic acids, rosmarinic acid, salvianic acid C, (caffeoyl-4-hydroxy-phenyl)lactic acid “isorinic acid” and Salvianolic acid F. The trimeric Yunnaneic acid E, salvianolic acid F and the isomeric tetramers sagerinic and clerodendranoic acid H are the more structured salvianolic acids. In addition to the salvianolic acids, we found the diterpenoid phenolics rosmanol, carnosol, carnosic acid and rosmaridiphenol, beside the phenanthrenequinone horminone, the same terpenoids as *Rosmarinus officinalis*, an old world medicinal *Mentheae-Salviinae*. These substances support the presence of *Lepechinia* within *Salviinae* beside *Salvia*, *Melissa*, *Rosmarinus*, among other genera^{27,31,32,34,36,39,54,56,57,59}. However, a recent work⁵³, based on DNA, chloroplastic, nuclear ribosomal and low-copy nuclear gene regions, lumps the small genera *Dorystaechas*, *Meriandra*, *Perovskia*, *Rosmarinus* and *Zhumeria* within *Salvia* genus while *Melissa* and *Lepechinia* do not. It is also observed that in the analyzed *Lepechinias*, flavonoids and chlorogenic acids are not significantly present as in the case of *Rosmarinus*⁵⁴. In this work, a luteolin hexoside has been detected in *Lepechinia meyenii* as the only flavonoid in the same way as, luteolin-3-O-glucuronide, is shown in *Melissa officinalis*^{34,58}.

The rosmarinic acid of both species were easily purified from the hydroethanolic extract without any preparative chromatographic method by a classical procedure⁴⁷ with an initial extraction which adapts the concept that extractability is not the same as solubility—rosmarinic acid is much more soluble in ethanol than in water, but hydroalcoholic mixtures access vacuoles more effectively than pure ethanol because it makes non-permeable to vacuolar membrane^{49,55}. Then, partitions with low toxicity solvent and precipitation of rosmarinic acid by cold evaporation of the aqueous solution with the help of a desiccant *in vacuo* and final recrystallization from hot aqueous solution. The yields of rosmarinic acid are approximately half of those of the analytical report²⁵. If the solution is simply left to the environment, it takes too long or nucleation conditions are never reached. This process of evaporating aqueous solutions without the application of heat could be applied to purify other types of phenolic acids that are usually difficult to precipitate and tend to remain glassy. Thus, high purity rosmarinic

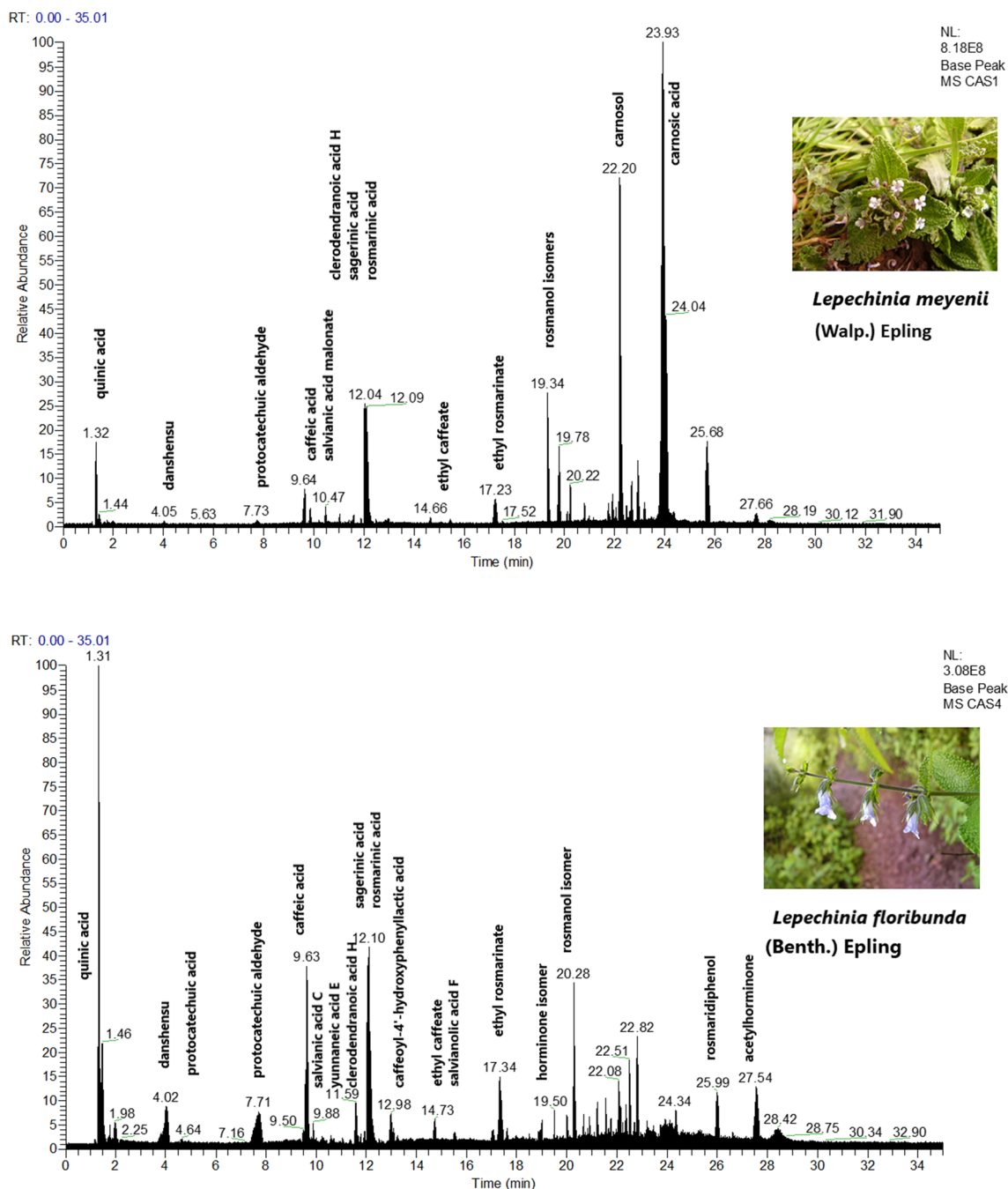


Figure 3. UHPLC/MSMS chromatograms of ethanolic extracts of *L. meyenii* and *L. floribunda*.

acid has been prepared that can be used as a chromatographic standard to study other botanical species and in the characterization of natural medicines.

Methods

Plant material. *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling was collected at the archaeological site of Tambomachay ($-13^{\circ}28'$; $-71^{\circ}58'$; altitude 3800 m) and *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epling was collected at the Urubamba Valley ($-13^{\circ}31'$; $-72^{\circ}06'$; altitude 3160 m) in Cusco-Perú. The material was collected by Carlos A. Serrano. Voucher specimen was deposited at Herbarium Truxillense of Universidad Nacional de Trujillo -Perú (HUT 59,504 and 59,503) and identified by the botanist Eric Frank Rodriguez.

Sample preparation for metabolite fingerprinting. 50 mg of powdered aerial parts were subjected to ultrasonic bath for 5 min with 1 mL of ethanol $\times 3$ times. The filtrates were dried *in vacuo* and stored at 4 °C until use.

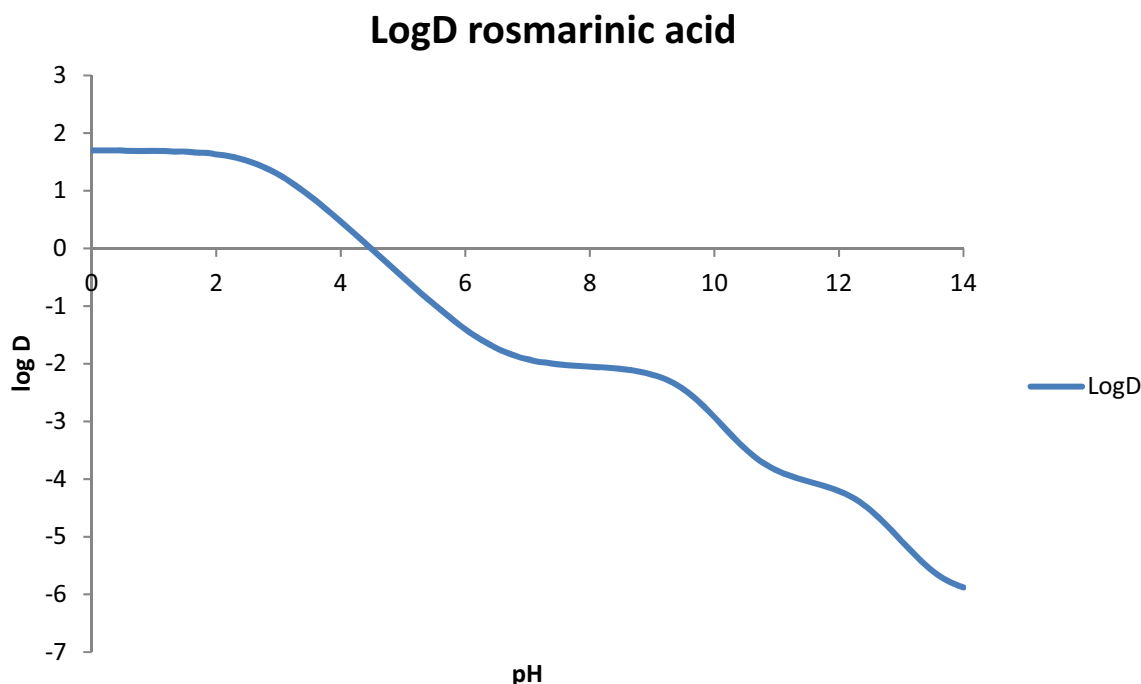


Figure 4. ACD Labs simulated Log D of rosmarinic acid.

UHPLC-Q-OT-MS²⁸. A Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC system equipped with a quaternary Series RS pump and a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series TCC-3000RS column compartments with a Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 Series WPS-3000RS autosampler and a rapid separations PDA detector controlled by Chromeleon 7.2 Software hyphenated with a Thermo high resolution Q Exactive focus mass spectrometer were used for analysis. The chromatographic system was coupled to the MS with a Heated Electrospray Ionization Source II (HESI II). Nitrogen (purity >99.999%) obtained from a Genius NM32LA nitrogen generator was employed as both the collision and damping gas. XCalibur 2.3 software and Trace Finder 3.2 were used for UHPLC control and data processing, respectively. Q Exactive 2.0 SP 2 was used to control the mass spectrometer.

LC parameters²⁸. An UHPLC C18 column (Acclaim, 150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm, Thermo Fisher Scientific) operated at 25 °C was employed. The detection wavelengths were 255, 280, 355 and 640 nm. PDA was recorded from 200 to 700 nm, and mobile phases were 0.1% formic aqueous solution (A) and acetonitrile (B). The gradient program [time (min), % B] was: (0.00, 5); (5.00, 5); (10.00, 30); (15.00, 30); (20.00, 70); (25.00, 70); (35.00, 5) and 12 min for column equilibration before each injection. The flow rate was 1.0 mL min⁻¹, and the injection volume was 10 μL. Plant extracts dissolved in 1.5 mL of methanol, filtered with a 0.22 μm Teflon membrane and were kept at 10 °C inside the autosampler.

MS parameters²⁸. The HESI (Heated Electrospray Ionization Probe) has a sheath gas flow rate of 75 units; the auxiliary gas flow of 20 units; capillary temperature 400 °C; auxiliary gas heater temperature 500 °C; spray voltage of 2500 V (ESI⁻). Scanning range of 100/1500 m/z; scan speed 1 scan / s; 40 eV collision energy; resolution 35,000; negative polarity. The detection was based on the exact mass calculation. The mass tolerance threshold was 5 ppm. Data acquisition and processing were carried out using XCalibur Version 2.3 (Thermo Fisher Scientific).

Purification of rosmarinic acid. 50 g of pulverized aerial parts of *L.meyenii*/*L.floribunda* was extracted with 500 mL of 50% (v/v) ethanol per ten minutes in the ultrasonic bath at 60 °C per three times. The collected filtrates were evaporated to eliminate the ethanol. The aqueous solution was brought to pH 2.3 and partitioned with ethyl acetate. The ethyl acetate extract was evaporated to dryness and redissolved in hot water. The aqueous solution at 4 °C per 12 h precipitates resinous material. The clear supernatant liquid was again partitioned with ethyl acetate, evaporated to dryness and dissolved in minimal volume of hot water. This aqueous solution in a vacuum desiccator with fresh sulfuric acid precipitates the rosmarinic acid. The product was recrystallized from hot water to produce 1250 or 503 mg of a beige solid, respectively. The product was characterized by HPLC and NMR methods.

Spectrometric Identification of Rosmarinic acid. Bruker ARX 400; ¹H-NMR (in CD₃-CO-CD₃, 400 MHz): δ 3.04 (2H, m, H-7'), 5.24 (1H, m, H-8'), 6.32 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 6.70 (1H, dd, J = 8.1, 2.1, H-6'), 6.77 (1H, d, J = 8, H-5'), 6.87 (1H, d, J = 2.0, H-2'), 6.89 (1H, d, J = 8.2, H-5), 7.08 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, H-6),

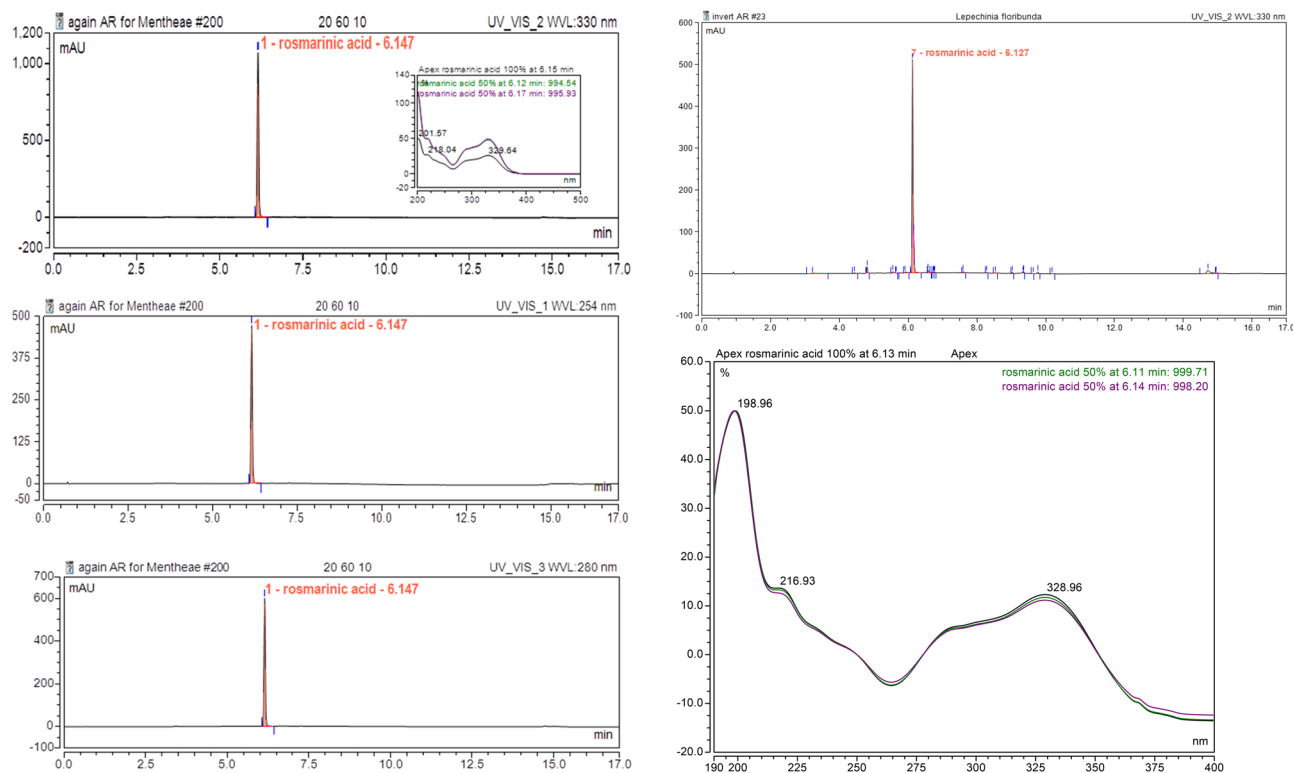


Figure 5. Chromatographic purity of rosmarinic acid at three different wavelengths.

7.19 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2), 7.29 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7). ^{13}C -NMR (in $\text{CD}_3\text{-CO-CD}_3$, 101 MHz): δ 171.16 (C-9'), 166.83 (C-9), 148.95 (C-4), 146.59 (C-3), 146.33 (C-7), 145.75 (C-3'), 144.84 (C-4'), 129.19 (C-1'), 127.51 (C-1), 122.78 (C-6), 121.69 (C-6'), 117.36 (C-2'), 116.41 (C-5), 116.00 (C-5'), 115.32 (C-2), 114.95 (C-8), 73.73 (C-8'), 37.49 (C-7'). The data were compared with⁵⁶. Spectra of rosmarinic acid appear in supplementary material.

Analytical PDA-UHPLC. (Dionex ThermoScientific Ultimate 3000 UHPLC with Chromeleon 7.2 software): $100 \times 2.1 \text{ mm} \times 1.8 \mu\text{m}$ Zorbax Rapid Resolution RPC18 column. Separation temperature: 40°C . Flow: 0.4 mL / minute. Gradient: a) H_2CO_3 0.1%; b) MeCN; (time, % b): (0.0); (1.0); (6.40); (9,100); (13,100); (14.0); (17.0). DAD: 200–500 nm; UVVis 1: 254 nm; UVVis 2: 330 nm; UV Vis 3: 280 nm; UV Vis 4: 370 nm.

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest. C.S. declares that the botanical material collected was made with permission of Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco-PERU in quantities less than 300 g of dried material in accord to institutional rules.

Received: 3 January 2021; Accepted: 18 March 2021

Published online: 31 March 2021

References

1. Roersch, C. *Plantas medicinales en el sur andino del Perú*. (Koeltz Scientific Publishing, 1994).
2. Roersch, C., van der Hoogte, L. *Plantas medicinales en el sur andino del Perú*. (Centro Medicina Andina, 1988).
3. Vásquez, L., Escurra, J., Aguirre, R., Vásquez, G., Vásquez, L. *Plantas Medicinales del Norte del Perú*. (FINCyT 2010).
4. Bussmann, R. & Sharon, D. Traditional medicinal plant use in northern Perú: tracking two thousand years of healing culture. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2**, 47 (2006).
5. Moon, H. K., Vinckier, S., Walker, J. B., Smets, E. & Huysmans, S. A search for phylogenetically informative pollen characters in the sub-tribe *Salviinae* (*Menthae*: *Lamiaceae*). *Int. J. Plant Sci.* **169**(3), 455–471 (2008).
6. Zhao, F. *et al.* An updated tribal classification of Lamiaceae based on plastome phylogenomics. *BMC Biol.* **19**, 2 (2021).
7. Rodríguez, M. *Lamiaceae* endémicas del Perú. Revista Peruana de Biología (número especial) “El Libro rojo de las Plantas Endémicas del Perú” León B. y col. (eds.). **13**(2), 371s–3789s (2006).
8. Drew, B. T. & Sytsma, K. J. Testing the monophyly and placement of *Lepechinia* in the tribe *Menthae* (*Lamiaceae*). *Syst. Bot.* **36**(4), 1038–1049 (2011).
9. Drew, B. T. & Sytsma, K. J. Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe *Menthae* (*Lamiaceae*). *Am. J. Bot.* **99**(5), 933–953 (2012).
10. Bräuchler, C., Heubl, G. & Meimberg, H. Molecular phylogeny of *Menthinae* (*Lamiaceae*, *Nepetoideae*, *Menthae*)-taxonomy, biogeography and conflicts. *Mol. Phylogenet. Evol.* **55**(2), 501–523 (2010).
11. Drew, B. T. & Sytsma, K. J. The South American radiation of *Lepechinia* (*Lamiaceae*): phylogenetics, divergence times and evolution diocyc. *Linn. Soc. Bot. J.* **171**(1), 171–190 (2012).

12. Medeiros, G., Harley, R. M., Sano, P. T. & Drew, B. T. The genus *Lepechinia* Willd (Lamiaceae – Salviinae) in Brazil. *Acta Botanica Brasiliica* **33**(3), 592–601 (2019).
13. Wink, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**, 3–19 (2003).
14. Ekiert, H., Kwiecién, I. & Szopa, A. Rosmarinic acid production in plant in vitro cultures. *Polish J. Cosmetol.* **16**(1), 49–58 (2013).
15. Levsh, O., Pluskal, T., Carballo, V., Mitchell, A. J. & Weng, J. K. Independent evolution of rosmarinic acid biosynthesis in two sister families under the Lamiids clade of flowering plants. *J. Biol. Chem.* **294**(42), 15193–15205 (2019).
16. Ma, L., Tang, L. & Yi, Q. Salvianolic acids: potential source of natural drugs for the treatment of fibrosis and cancer. *Front. Pharmacol.* **10**, 97 (2019).
17. Zhao, R., Liu, X., Zhang, L., Yang, H. & Zhang, Q. Current progress of research on neurodegenerative diseases of salvianolic acid B. *Oxid. Med. Cell. Longev.* <https://doi.org/10.1155/2019/3281260> (2019).
18. Nathiely, F. *et al.* An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: A novel approach to treating neurodegenerative disorders. *Neurochem. Int.* **122**, 47–58 (2019).
19. Elufioye, T. O. & Habtemariam, S. Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. *Biomed. Pharmacother.* **112**, 108600 (2019).
20. Hahold A. y Kroeger A. *Superación de la enfermedad en las alturas de los andes del Perú* (Centro de Medicina Andina 1990).
21. Crespo, M. I. *et al.* Inhibitory effect of compounds from *Lepechinia meyenii* on tyrosinase. *Food Chem. Toxicol.* **125**, 383–391 (2019).
22. Chabán, M. F. *et al.* Antibacterial effects of extracts obtained from plants of Argentina: Bioguided isolation of compounds from the anti-infectious medicinal plant *Lepechinia meyenii*. *J. Ethnopharmacol.* **239**, 111930 (2019).
23. Velasco, A., Esteban, J., Guzmán, C., Zygadlo, J. & Ariza, L. Essential oil of *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epl. *J. Essent. Oil Res.* **6**, 539–540 (1994).
24. López, J.B., Collin, G., Garneau, F.X., France J., Gagnon H. Essential oils from Bolivia. VI. *Lamiaceae: Lepechinia graveolens* (Reg.) Epling, *L. floribunda* (Benth.) Epling, and *L. meyeri* (Walp.) Epling. *J. Essent. Oil Res.* **21**(1), 36–40 (2009).
25. Serrano, C., Villena, G. & Rodríguez, E. Algunos componentes fitoquímicos y actividad antioxidante en representantes de la tribu *Menthae* (Lamiaceae) del Perú. *Arnaldoa* **27**(1), 101–107 (2020).
26. Shekarchi, M., Hajimehdipoor, H., Saedinia, S., Gohari, A. & Hamedani, M. P. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of *Labiatae* family. *Pharmacogn. Mag.* **8**(29), 37–41 (2012).
27. Adimcilar, V. *et al.* Rosmarinic and carnosic acid contents and correlated antioxidant and antidiabetic activities of 14 *Salvia* species from Anatolia. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **175**, 112763 (2019).
28. Castro, O. N. *et al.* Metabolomic Analysis of the lichen *Everniopsis trulla* using ultra high performance liquid chromatography-Quadrupole-Orbitrap mass spectrometry (UHPLC-Q-OT-MS). *Chromatographia* **80**, 967–973 (2017).
29. Qiao, X. *et al.* A targeted strategy to analyze untargeted mass spectral data: Rapid chemical profiling of *Scutellaria baicalensis* using ultrahigh performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry and key ion filtering. *J. Chromatogr. A* **1441**, 83–95 (2016).
30. Li, J. *et al.* Characterization of the multiple chemical components of *Glechomae Herba* using ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry with diagnostic ion filtering strategy. *J. Sep. Sci.* **42**, 1312–1322 (2019).
31. Shen, Y. *et al.* Rapid profiling of polymeric phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* by hybrid data-dependent/targeted multistage mass spectrometry acquisition based on expected compounds prediction and fragment ion searching. *J. Sep. Sci.* **41**, 1888–1895 (2018).
32. Cao, J. L. *et al.* Online comprehensive two dimensional hydrophilic interaction chromatography x reversed phase liquid chromatography coupled with hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry for the analysis of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. *J. Chromatogr. A* **1536**, 216–227 (2018).
33. Luo, Y., Wen, Q., Jian Sheng, C., Feng, Y. & Tan, T. Characterization of the polymeric phenolic acids and flavonoids in *Clerodendranthi spicati* herba using ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight tandem mass spectrometry with target and nontarget data mining strategy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **33**, 1884–1893 (2019).
34. Barros, L. *et al.* Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chem.* **136**, 1–8 (2013).
35. Fialová, S., Slobodnikova, L., Veizerova, L. & GranCai, D. *Lycopus europaeus*: phenolic fingerprint, antioxidant activity and antimicrobial effect on clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Nat. Prod. Res.* <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1010086> (2015).
36. Zimmermann, B. F., Walch, S. G., Tinzoh, L. N., Stühlinger, W. & Lachenmeier, D. W. Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *J. Chromatogr. B* **879**, 2459–2464 (2011).
37. Wang, L. *et al.* Determination and pharmacokinetic study of three diterpenes in rat plasma by UHPLC-ESI-MS/MS after oral administration of *Rosmarinus officinalis* L. Extract. *Mol.* **22**, 934 (2017).
38. Wang, Y. R. *et al.* Salvisertin A, a new hexacyclic triterpenoid, and other bioactive terpenes from *Salvia deserta* root. *Chem. Biodivers.* **15**(4), e1800019 (2018).
39. Loussouarn, M. *et al.* Carnosic acid and carnosol, two major antioxidants of Rosemary, act through different mechanisms. *Plant Physiol.* **1975**, 1381–1394 (2017).
40. Chinese Patent. CN 103804185 A (2014).
41. Pertino, M. W. & Schmeda, H. G. The corrected structure of rosmaridiphenol, a bioactive diterpene from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Med.* **76**, 629–632 (2010).
42. Kavitha, J., Rajasekhar, D., Subbaraju, G. V. & Ramesh, G. N. Synthesis of vinyl caffeate, an antioxidant from *Perilla frutescens* Britton var. *rispa* (Thunb). *Indian J. Chem.* **38B**, 1280–1281 (1999).
43. Zhou, W., Xie, H., Xu, X., Liang, Y. & Wei, X. Phenolic constituents from *Isodon lophanthoides* var. *graciliflorus* and their antioxidant and antibacterial properties. *J. Function. Foods* **6**, 492–498 (2014).
44. Kadidae, L. O., Usami, A. & Honda, M. Palladium(II) acetate as catalyst in transvinylolation reactions of hydroxycinnamic acid and its derivatives. *Asian J. Chem.* **30**(3), 589–593 (2018).
45. De Armas, M., Ruiz, E. & Ramirez, O. Caffeates and caffeamides: synthetic properties and their antioxidant properties. *Int. J. Med. Chem.* <https://doi.org/10.1155/2019/2592609> (2019).
46. Kadidae, L. O., Usami, A., Matsui, T., Honda, M. & Kunimoto, K. K. Selective synthesis of caffeoylquinic acids (CQAs) using transesterification of vinyl caffeate. *Int. J. Appl. Chem.* **12**(3), 193–207 (2016).
47. Christ B., Kesselring K. Process for isolating rosmarinic acid from plants. U.S. Patent 4,354,035 (1980).
48. Ngo, Y. L., Lau, C. H. & Chua, L. S. Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food Chem. Toxicol.* **121**, 687–700 (2018).
49. Jacotet, M. *et al.* What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts. *Electrophoresis* **39**(15), 1946–1956 (2018).
50. Yoo, G. *et al.* Optimization of extraction conditions for phenolic acids from the leaves of *Melissa officinalis* L. using response surface methodology. *Pharmacognosy Mag.* **14**(54), 155–161 (2018).
51. Sik, B., Kapcsándi, V., Székelyhidi, R., Hanckzné, E.L., Ajtony Z. Recent advances in the analysis of rosmarinic acid from herbs in the *Lamiaceae* family. *Nat. Prod. Commun.* <https://doi.org/10.1177/1934578X19864216> (2019)

52. Sik, B., Hanckzné, E. L., Kapcsándi, V. & Ajtony, Z. Conventional and non-conventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six *Lamiaceae* plants as determined by HPLC-DAD measurement. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **184**, 113173 (2020).
53. Drew, B. T. *et al.* *Salvia* united: the greatest good for the greatest number. *Taxon* **66**(1), 133–145 (2017).
54. Boudiar, T., Lozano, J., Harfi, B., Contreras, M. & Segura, A. Phytochemical characterization of bioactive compounds composition of *Rosmarinus eriocalyx* by RP-HPLC-ESI-QTOF-MS. *Nat. Prod. Res.* **33**(15), 2208–2214 (2019).
55. Häusler, E., Petersen, M. & Alfermann, A. W. Isolation of protoplasts and vacuoles from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth. *Plant Cell Rep.* **12**, 510–512 (1993).
56. Wang, M. *et al.* Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4869–4873 (1998).
57. Sharma, Y., Velamuri, R., Fagan, J. & Schaefer, J. Full-spectrum analysis of bioactive compounds in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) as influenced by different extraction methods. *Molecules* **25**, 4599 (2020).
58. Miron, T., Herrero, M. & Ibáñez, E. Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* **1288**, 1–9 (2013).
59. Velamuri, R., Sharma, Y., Fagan, J. & Schaefer, J. Application of UHPLC-ESI-QTOF-MS in phytochemical profiling of sage (*Salvia officinalis*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Planta medica Int. Open* **7**, e133–e144 (2020).
60. Satake, T. *et al.* Studies on the constituents of fruits of *Helicteres isora* L. *Chem. Pharm. Bull.* **47**(10), 1444–1447 (1999).

Acknowledgements

CS thanks to “Proyecto Cuatro Moléculas” and Vicerectorado de Investigación de San Antonio Abad University, Cusco-Perú, and a special thanks to Dr. Carlos Areche of Universidad de Chile and to Dr. Gari Vidal Ccana Ccapatinta of Sao Paulo University-Ribeirao Preto.

Author contributions

C.S., G.V., E.R. contributed to the conception and design of the work. C.S. performed the experimental part. E.R. identified the plant material. C.S., G.V. wrote the main manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86692-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.A.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Algunos componentes fitoquímicos y actividad antioxidante en representantes de la tribu Mentheae (Lamiaceae) del Perú

Carlos Alberto Serrano Flores^{1*} , Gretty Katherina Villena Chávez² , Eric F. Rodríguez Rodríguez³ 

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco, Perú.

² Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

³ Herbarium Truxillense (HUT), Universidad Nacional de Trujillo, Jr. San Martín 392, Trujillo, Perú.

* Autor para correspondencia: carlos.serrano@unsac.edu.pe

Información de financiamiento

Este estudio fue financiado por los propios autores.

Declaración de disponibilidad de datos

Toda la data relevante a la investigación se muestra dentro del mismo manuscrito.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés alguno.

Contribución de los autores

C.S.: Redacción del texto, ejecución del trabajo de campo y laboratorio, revisión de bibliografía, registro fotográfico; revisión y aprobación del texto final. G.V.: Redacción del texto, revisión de bibliografía; revisión y aprobación del texto final. E.R.: Redacción del texto, determinación taxonómica de las especies, revisión de bibliografía, registro fotográfico; revisión y aprobación del texto final.

Recibido: 2 de Enero de 2020.

Aceptado: 28 de Febrero de 2020.

Publicado (digital): 30 Marzo 2020.

Publicado (impreso): 30 Abril 2020.

Cita bibliográfica:

Serrano, C.; G. Villena & E. Rodríguez. 2020. Algunos componentes fitoquímicos y actividad antioxidante en representantes de la tribu Mentheae (Lamiaceae) del Perú. *Arnaldoa* 27 (1): e101-e107. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27109>

Resumen: Mediante métodos espectrofotométricos y de cromatografía uhlpc se evaluó el contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxycinnámicos totales, capacidad antioxidante total, el porcentaje de ácidos triterpénicos ursólico y oleanólico así como el porcentaje de ácido rosmarínico en trece representantes peruanos de la tribu *Mentheae* (Lamiaceae): *Clinopodium brevicalyx* (Epling) Harley & A. Granda, *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts, *Clinopodium revolutum* (Ruiz & Pav.) Govaerts, *Clinopodium sericeum* (C. Presl ex Benth.) Govaerts, *Hedeoma mandoniana* Wedd., *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epling, *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling, *Minthostachys mollis* Griseb., *Salvia dombeyi* Epling, *Salvia cuspidata* Ruiz & Pav., *Salvia haenkei* Benth., *Salvia oppositiflora* Ruiz & Pav., *Salvia sagittata* Ruiz & Pav. La especie con mayor actividad antioxidante y a la vez con mayor contenido en ácido rosmarínico es *Lepechinia meyenii* y la especie con mayor contenido en ácidos triterpénicos es *Clinopodium revolutum*. Todas las demás especies muestran resultados entre estas dos especies extremas. *Lepechinia floribunda* y *Salvia sagittata* son también importantes por su contenido en ácido rosmarínico y en su capacidad antioxidante mientras que *Clinopodium brevicalyx*, *Salvia sagittata*, *Salvia cuspidata* y *Clinopodium sericeum* son importantes por su contenido en flavonoides.

Palabras clave: Mentheae, Menthinae, Salviinae, ácidos triterpénicos, ácido rosmarínico.

Abstract: Some phytochemical components and antioxidant activity in representatives of the *Mentheae* tribe (Lamiaceae) of Peru. Using the spectrophotometric and uhlpc chromatography methods, the content of total phenols, total flavonoids, total hydroxycinnamic acids, total antioxidant capacity, the percentage of ursolic and oleanolic triterpenic acids as well as the percentage of rosmarinic acid in thirteen Peruvian representatives of the tribe *Mentheae* (Lamiaceae) were evaluated. The taxa are: *Clinopodium brevicalyx* (Epling) Harley & A. Granda, *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts, *Clinopodium revolutum* (Ruiz & Pav.) Govaerts, *Clinopodium sericeum* (C. Presl ex Benth.) Govaerts, *Hedeoma mandoniana* Wedd., *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epling, *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling, *Minthostachys mollis* Griseb., *Salvia dombeyi* Epling, *Salvia cuspidata* Ruiz & Pav., *Salvia haenkei* Benth., *Salvia oppositiflora* Ruiz & Pav., *Salvia sagittata* Ruiz & Pav. The species with the highest antioxidant activity and at the same time with the highest rosmarinic acid content is *Lepechinia meyenii* and the species with the highest triterpenic acid content is *Clinopodium revolutum*. All other species show results between these two extreme species. *Lepechinia floribunda* and *Salvia sagittata* are also important for their rosmarinic acid content and antioxidant capacity while *Clinopodium brevicalyx*, *Salvia sagittata*, *Salvia cuspidata* and *Clinopodium sericeum* are important for their flavonoid content.

Keywords: Mentheae, Menthinae, Salviinae, triterpenic acids, rosmarinic acid.

INTRODUCCIÓN

La gran familia *Lamiaceae* tiene siete subfamilias. La subfamilia *Nepetoideae* con 3400 especies y 105 géneros a su vez tiene tres tribus (Drew *et al.*, 2011): *Elsholtzieae*, *Ocimeae* y *Mentheae*, esta última con 65 géneros. La tribu *Mentheae* se caracteriza químicamente por poseer terpenoides volátiles y un ácido fenólico llamado ácido rosmarínico que hace que estas plantas sean aromáticas y con propiedades medicinales (Wink, 2003, Amoah *et al.*, 2016). Las *Mentheae* además se pueden clasificar en 3 subtribus: *Menthinae* (43 géneros), *Salviinae* (10 géneros) y *Nepetiinae* (12 géneros) (Bräuchler *et al.*, 2010; Drew *et al.*, 2012). En Perú los géneros de *Mentheae* son *Clinopodium* (20 especies), *Hedeoma* (1 especie), *Lepechinia* (11 especies), *Mentha* (4 especies, introducidas), *Minthostachys* (8 especies), *Rosmarinus* (1 especie, introducida) y *Salvia* (80 especies, 1 introducida) (Zarucchi, 1993; Ulloa *et al.*, 2004; Granda 2010; Sagástegui & Rodríguez, 2012). *Clinopodium*, *Hedeoma*, *Mentha* y *Minthostachys* pertenecen a la subtribu *Menthinae*, mientras que *Lepechinia*, *Rosmarinus* y *Salvia* pertenecen a la subtribu *Salviinae*. Además, 50 especies de *Mentheae* son endémicas a Perú (Rodríguez, 2006).

En la presente comunicación se evaluó el contenido de fenoles totales (Gálvez *et al.*, 2015), flavonoides totales (Bag *et al.*, 2015); ácidos hidroxicinnámicos totales (Stefan *et al.*, 2013) y la capacidad antioxidante total (Prieto *et al.* 1999, Bag *et al.*, 2015). Además, por cromatografía uhplc, se cuantificó el contenido en ácidos triterpénicos, ursólico y oleanólico (Srivastava *et al.*, 2010) y ácido rosmarínico (Venskutonis *et al.*, 2017) en trece especies peruanas de la tribu *Mentheae* (Cuadro1).

MATERIALES Y MÉTODOS

Parte Experimental

Material Vegetal: Se colectó en los departamentos de Cusco, Ancash, Lima, Amazonas, Huánuco y Moquegua en las localidades, fechas y altitudes que aparecen en el Cuadro 1 (colector: C. Serrano F. s.n.). Los ejemplares de Herbario se determinaron y depositaron en el Herbarium Truxillense (HUT), Universidad Nacional de Trujillo, Perú; además se incluyen fotos de todas las especies (Anexos 1-3).

Productos Químicos y equipamiento básico: Todos los reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico. El acetonitrilo (Merck) fue de grado HPLC. Estándares de ácidos cafeico (Aldrich), rosmarínico (Aldrich), oleanólico y ursólico (Chromadex). Baño ultrasónico (JeioTech). Rotavapor (Buchi R210). Estufa (Memmert UNB). Espectrofotómetro visible (Thermoscientific Genesys 20).

Preparación de extractos etanólicos: 50 mg de vegetal pulverizado se sometieron a baño ultrasónico por 5 minutos con 1 mL de etanol x 3 veces. Se filtró. Se aforó a 5 mL con etanol. Con 2 mL se determinó la masa total extraída en estufa a 40°C y el resto del extracto se almacenó a 4°C hasta la realización de los análisis subsecuentes.

Determinación de fenoles totales: Se utilizó el método de Folin Ciocalteau (Gálvez *et al.* 2005), 50 ó 100 µL de extracto se diluyeron hasta 2 mL con agua. Luego se agregó 100 µL de Reactivo de Folin Ciocalteau (Merck) en dilución (1:10) en agua + 200 µL de solución de Na₂CO₃ al 20%. Se esperó 30 minutos en oscuridad y luego se midió la absorbancia a 765 nm. La curva de calibración se hizo empleando solución de ácido gálico de 0.1 mg/mL. El análisis se ejecutó por triplicado.

Determinación de flavonoides totales: Se empleó el método del cloruro de aluminio (Bag *et al.* 2015). A 50 µL de extracto se agregó 0.1 mL de AlCl₃ al 10%, 0.1 mL de acetato de sodio 0.1 M, 1.5 mL de etanol y agua suficiente para completar 6 mL. Se mezcló bien. Se midió absorbancia a 415 nm. Luego se hizo otra secuencia igual a la anterior, pero en lugar de los 0.1 mL de AlCl₃ al 10% utilizar 0.1 mL de agua. I también se midió la absorbancia a 415 nm. La diferencia de lecturas se utilizó para los cálculos. La curva de calibración se hizo utilizando una solución de quercetina (1 mg/10mL). El análisis se ejecutó por triplicado.

Determinación de ácidos hidroxicinnámicos totales: Se empleó el método de Arnow (Stefan *et al.*, 2013). Sobre 20 a 300 µL de extracto se le agregaron 2 mL de HCl 0.5 M, 2 mL del reactivo de Arnow, 2 mL de NaOH al 8.5% y agua suficiente para completar 11 mL. Se mezcló bien y se leyó a 505 nm. Además, se hizo una secuencia de compensación utilizando 2 mL de agua en lugar del reactivo de Arnow. La diferencia de lecturas se utilizó para los cálculos. El reactivo de Arnow se preparó disolviendo 10 g de nitrito de sodio, 10 g de molibdato de amonio en agua hasta 100 mL. La curva de calibración se hizo con ácido rosmarínico de 0.1 mg/mL en etanol del 20%. El análisis se ejecutó por triplicado.

Determinación de la capacidad antioxidante total: Se trabajó con el método del azul de molibdeno (V) a partir de molibdeno (VI) (Prieto *et al.*, 1999; Bag *et al.*, 2015). A 100 µL de extracto se agregó 1 mL de reactivo de fosfomolibdato, 1 mL de agua y se calentó en estufa a 80°C por una hora. En este tiempo se desarrolló el color. Luego se diluyó con 5 mL de agua y la lectura se hizo a 695 nm. El reactivo de fosfomolibdato consistió de una solución que contiene molibdato de amonio (4.66 g/L), Na₃PO₄·12H₂O (10.64 g/L) y H₂SO₄ concentrado 32.61 mL/L. La curva de calibración se hizo con solución de ácido ascórbico de 100 µg/mL. El análisis se ejecutó por triplicado.

Cuantificación de AR en 13 Mentheae en extractos etanólicos: 50 mg de vegetal pulverizado se sometieron a baño ultrasónico por 5 minutos con 1 mL de etanol x 3 veces. Los filtrados se aforaron a 5 mL con el mismo solvente. Este filtrado nuevamente se filtró a viales a través de membrana de teflón de 0.22 µm. Condiciones DAD-UHPLC (Dionex Thermoscientific Ultimate 3000 UHPLC con software Chromeleon 7.2) (Venskutonis *et al.*, 2017): Columna RPC18 Zorbax Rapid Resolution de 100 x 2.1 mm x 1.8 µm. Temperatura de separación: 40°C. Flujo: 0.4 mL/minuto. Gradiente: a) H₂CO₂ al 0.1 %; b) MeCN; (tiempo, %b)): (0,0);

Tabla 1. Especies de la tribu Mentheae (Lamiaceae) estudiadas, indicando información de la colección y códigos de depósito en el herbario HUT.

Especie	Localidad, fecha, altitud (m)	Código HUT
<i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.) Epling	Pumahuanca, Cusco (febrero 2014), 3800 m	59504
<i>Clinopodium brevicalyx</i> (Epling) Harley & A. Granda	Tambomachay, Cusco (junio 2017), 3715 m	59506
<i>Salvia oppositiflora</i> Ruiz & Pav.	Saxaywamán, Cusco (junio 2017), 3656 m	59502
<i>Lepechinia floribunda</i> (Benth.) Epling	Huarán, Cusco (julio 2014), 3160 m	59503
<i>Minthostachys mollis</i> Griseb.	Cajatambo, Lima (junio 2017), 3315	59766
<i>Salvia sagittata</i> Ruiz & Pav.	Sullcapunta, Huánuco (enero 2014), 3500 m	59499
<i>Salvia cuspidata</i> Ruiz & Pav.	Cajatambo, Lima (junio 2017), 3315	59505
<i>Clinopodium revolutum</i> (Ruiz & Pav.) Govaerts	Sullcapunta, Huánuco (enero 2014), 3975 m	58329
<i>Clinopodium sericeum</i> (C. Presl ex Benth.) Govaerts	Gocta, Amazonas (febrero 2016), 2090 m	58332
<i>Salvia haenkei</i> Benth.	Cuchumbaya, Moquegua (julio 2013), 2930 m	59500
<i>Salvia dombeyi</i> Epling	Laraos, Lima (febrero 2018), 3310 m	59764
<i>Hedeoma mandoniana</i> Wedd.	Inquilpata, Anta, Cusco (febrero 2018), 3850 m	59763
<i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts	Carhuayoc, Huari, Ancash (marzo 2018), 3460 m	59765

(1,0); (6,40); (9,100); (13,100); (14,0); (17,0). DAD: 200-500 nm; UVVis 1: 254 nm; UVVis 2: 330 nm; UV Vis 3: 280 nm; UV Vis 4: 370 nm. La cuantificación se hizo con las lecturas obtenidas a 330 nm. Paralelamente se ejecutó curva de calibración con ácido rosmarínico estándar (Aldrich) de 2, 1.5, 1, 0.5 y 0.2 mg/mL con una linealidad de 0.999. El análisis se ejecutó por triplicado.

Cuantificación de ácidos triterpénicos en 13 especies de Mentheae en extractos etanólicos

Se utilizaron las mismas soluciones que para el caso de la cuantificación de ácido rosmarínico. Método cromatográfico: (Dionex Thermoscientific Ultimate 3000 UHPLC, con software Chromeleon 7.2) (Srivastava et al. 2010); Columna Phenomenex Lichrospher RPC18 25 x 0.46 cm x 5 µm. Tiempo de análisis: 20 minutos. Temperatura: 30°C. Modo de elución: isocrático (MeCN: agua, 8:2). DAD: 200-400 nm, longitud de onda detectada a 209 nm. Curva de calibración con estándar mixto de AO y AU (Chromadex) de 2, 1, 0.5 y 0.3 mg/mL de AO y AU. El análisis se ejecutó por triplicado. Todos los análisis fitoquímicos se efectuaron en el laboratorio de Química Orgánica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), Cusco, Perú.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especie con mayor actividad antioxidante y a la vez mayor contenido en ácido rosmarínico es *Lepechinia meyenii* "Puna Salvia", planta muy importante en el sur andino del Perú- en un libro de nombre particularmente sugerente "Superación de la enfermedad en las alturas de los andes del Perú" (Hahold et al., 1990), que es un estudio hecho en la provincia de Espinar-Cusco en altitudes de 3800 a 4500 msnm muestra a esta planta como la tercera planta medicinal de mayor utilización en comunidades cuya salud entonces dependía casi exclusivamente en el empleo de plantas medicinales. Un estudio reciente (Crespo et al., 2019) describe la presencia

de ácido p-coumárico, ácido cafeico y ácido rosmarínico en *L. meyenii* como inhibidores de enzima tirosinasa. Por otro lado, la especie con mayor contenido en ácidos triterpénicos es *Clinopodium revolutum* "Flor de Arena" o "Te Indio", especie medicinal de la sierra del centro y norte de Perú, que sin embargo muestra una actividad antioxidante moderada y bajo contenido en ácido rosmarínico- es difícil explicar los efectos depurativos y desintoxicantes de esta especie en base a su alto contenido en ácido triterpénicos puesto estas moléculas no se disuelven en agua y la manera como se usa la planta es precisamente, la decocción acuosa, se requieren mayores estudios. En todo caso, ambas especies, *L. meyenii* y *C. revolutum*, de todas las especies estudiadas, son las de mayor "reputación etnofarmacológica" tanto en los sistemas medicos tradicionales del sur y norte del Perú, respectivamente. Al respecto, Serrano et al. (2016) coinciden con esta aseveración y resultados referidos a *C. revolutum* por presentar una elevada concentración de metabolitos bioactivos. Todas las demás plantas muestran resultados entre estas dos especies extremas. *Lepechinia floribunda* y *Salvia sagittata* son también importantes en su contenido en ácido rosmarínico y en su capacidad antioxidante mientras que *Clinopodium brevicalyx*, *Salvia sagittata*, *Salvia cuspidata* y *Clinopodium sericeum* son importantes por su contenido en flavonoides. Así la presente comunicación provee una base para posteriores estudios en este importante grupo de plantas medicinales.

AGRADECIMIENTOS

C.S. agradece a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y también al Botánico Hamilton Beltrán del Herbario "Javier Prado" de la UNMSM. E.R. reconoce al Herbarium Truxillense (HUT) por las facilidades brindadas en la determinación taxonómica y depósito de los taxones motivo de estudio.

Tabla 2. Contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinnámicos totales, capacidad antioxidante total, contenido en ácidos triterpénicos ursólico y oleanólico, y ácido rosmarínico en trece especies peruanas de la tribu Mentheae (Lamiaceae).

Muestra	Fenoles totales (µg AG/100 µg de extracto etanólico)	Flavonoides totales (µg Qu/100 µg de extracto etanólico)	Ácidos hidroxicinnámicos totales (µg AR/100 µg de extracto etanólico)	Actividad antioxidante (µg vitamina C/ 100 µg de extracto etanólico)	Porcentaje de ácido oleanólico	Porcentaje de ácido ursólico	Porcentaje de ácido rosmarínico
<i>Lepechinia meyenii</i>	50.00±0.98	10.82±0.55	37.59±2.78	25.79±0.56	0.50±0.06	0.79±0.01	4.61±0.06
<i>Clinopodium brevicalyx</i>	30.14±0.40	12.07±0.13	14.35±0.88	13.69±0.67	0.38±0.00	0.77±0.00	1.12±0.02
<i>Salvia oppositiflorum</i>	7.78±0.73	5.38±0.20	3.84±0.29	8.33±0.11	0.64±0.00	0.58±0.01	0.65±0.00
<i>Lepechinia floribunda</i>	20.77±0.00	3.69±0.07	18.05±0.05	14.11±0.02	0.31±0.00	0.53±0.00	1.43±0.01
<i>Minthostachys mollis</i>	28.87±0.79	8.18±0.19	7.51±0.08	17.28±0.25	1.11±0.03	1.76±0.04	0.91±0.02
<i>Salvia sagittata</i>	34.76±0.42	11.28±0.14	21.45±1.54	20.21±0.53	1.35±0.03	1.97±0.07	1.42±0.03
<i>Salvia cuspidata</i>	21.60±0.31	14.29±0.82	8.03±0.04	10.08±0.07	1.70±0.04	1.42±0.03	0.91±0.02
<i>Clinopodium revolutum</i>	16.12±0.33	3.18±0.46	12.00±0.37	14.70±0.07	2.55±0.05	4.81±0.10	0.63±0.01
<i>Clinopodium sericeum</i>	34.05±0.47	11.36±0.46	24.31±0.00	13.31±0.34	1.91±0.04	3.34±0.01	0.81±0.02
<i>Salvia haenkei</i>	8.21±0.06	3.77±0.38	n.d.	18.03±0.10	1.16±0.00	1.95±0.01	0.54±0.01
<i>Salvia dombeyi</i>	6.45±0.12	7.26±0.33	n.d.	11.71±0.16	0.71±0.01	1.18±0.02	n.d.
<i>Hedeoma mandoniana</i>	14.15±0.25	4.74±0.00	12.84±1.18	10.00±0.10	0.75±0.01	1.33±0.01	0.33±0.02
<i>Clinopodium pulchellum</i>	16.08±0.14	5.48±0.23	9.04±0.58	9.87±0.14	1.07±0.04	1.58±0.02	0.19±0.01

LITERATURA CITADA

- Amoah, S.; L. Sandjo; J. Kratz & M. Biavatti.** 2016. Rosmarinic acid-pharmaceutical and clinical aspects. *Planta Medica* 82, 388-406. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1568274>
- Bag, G.; P. Grinhajali & T. Bhaigyabati.** 2015. Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley. *Int. J.Pharm Sci. Rev. Res.* 30(1), 154-159. ISSN: 0975-8585.
- Bräuchler, C.; G. Heubl & H. Meimberg.** 2010. Molecular Phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae)-taxonomy, biogeography and conflicts. *Molecular Phylogenetics & Evolution* 55(2), 501-523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.016>
- Crespo, M.; M. Funes; P. Ailín; M. Joray; S. Palacios; D.Vera & M. Carpinella.** 2019. Inhibitory effects of compounds isolated from *Lepechinia meyenii* on tyrosinase. *Food and Chemical Toxicology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.019>
- Drew, B. & K. Sytsma.** 2011. Testing the Monophyly and placement of *Lepechinia* in the tribe Mentheae (Lamiaceae). *Systematic Botany* 36(4), 1038-1049. <http://dx.doi.org/10.1600/036364411X605047>
- Drew, B. & K. Sytsma.** 2012. Phylogenetics, Biogeography, and staminal evolution in the tribe Mentheae (Lamiaceae). *American J. Botany* 99(5), 933-953. <https://dx.doi.org/10.3732/ajb.1100549>
- Gálvez, M.; C. Martín; P. Houghton & M. Ayuso.** 2005. Antioxidant Activity of Methanol Extracts Obtained from *Plantago* Species. *J. Agric. & Food Chem.* 53, 1927-1933. <http://dx.doi.org/10.1021/jf048076s>
- Granda A.** 2010. *Salvia hunzikeri* (Lamiaceae), una nueva especie de los Andes del Perú. *Rev. peru. biol.* 17(2): 151-154.
- Hahold A. & A. Kroeger.** 1990. Superación de la enfermedad en las alturas de los andes del Perú. *CMA* 1990.
- Prieto, P.; M. Pineda & M. Aguilar.** 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269, 337-341. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
- Rodríguez M.** 2006. Lamiaceae endémicas del Perú. En *El libro rojo de las plantas endémicas del Perú*. Ed.: B. León et al. *Rev. peru. biol.* Número especial 13(2): 371-379.
- Sagástegui, A. & E. Rodríguez.** 2012. Una nueva especie de *Salvia* (Lamiaceae) del Norte de Perú. *Rev. peru. biol.* 19(2): 139 - 142.
- Serrano, C.; B. Calsino; A. Tupa; R. Huamán; M. Ludeña & E. Rodríguez.** 2016. Cuantificación de ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido rosmarínico en tres especies peruanas de *Clinopodium* (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae). *Arnaldoa* 23(1), 333-350. ISSN: 1815-8242/ 2413-3299.
- Srivastava, P.; N. Kasoju; U. Bora & R. Chaturvedi.** 2010. Simultaneous determination and quantification of three pentacyclic triterpenoids - betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid- in cell cultures of *Lantana camara* L.. *In Vitro Cell Development Biology* 46, 549-557. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-010-9298-3>
- Stefan, M.; J. Vukovic; B. Blazekovic; M. Kindl & S. Vladimir.** 2014. Total Hydroxycinnamic Acids Assay: Prevalidation and Application on Lamiaceae Species. *Food Anal. Methods* 7(2), 326-336. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-013-9630-8>.
- Ulloa, C.; J. L. Zarucchi & B. León.** 2004. Diez años de adiciones a la Flora del Perú: 1993-2003. *Arnaldoa* (Edic. Espec., Nov. 2004): 1-242.
- Venskutonis, P.; V. Sulniute & A. Pukalskas.** 2017. Phytochemical compositions of fractions isolated from 10 *Salvia* species by scCO₂ and pressurized liquid extraction methods. *Food Chemistry* 224, 37-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.047>
- Wink, M.** 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64, 3-19. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00300-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00300-5)
- Zarucchi J. L.** 1993. Lamiaceae. In: Brako, L. & Zarucchi, J.L. (eds.). *Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú*. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 45: 579-590.

ANEXOS



Figura 1. *Clinopodium pulchellum*.



Figura 2. A. *Lepechinia meyenii*, B. *Clinopodium brevicalyx*, C. *Salvia oppositiflora*, D. *Lepechinia floribunda*, E. *Minthostachys mollis*, F. *Salvia sagittata*.



Figura 3. A. *Salvia cuspidata*, B. *Clinopodium revolutum*, C. *Clinopodium sericeum*, D. *Salvia haenkei*, E. *Salvia dombeyi*, F. *Hedeoma mandoniana*.