



**Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo**

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias  
Biológicas**

**Facultad de Químico Farmacobiología  
Área Temática: Biotecnología Alimentaria**

**Efecto de la temperatura y solventes en el contenido de  
compuestos fenólicos y actividad antioxidante de  
extractos de cedrón (*Aloysia citriodora*) obtenidos por  
procesos de maceración y ultrasonido**

**TESIS**

**Como requisito para obtener el grado de:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Presenta:**

**Biol. Claudia Iveth Sánchez Pahua**

**Asesor:**

**Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores**

**Morelia, Michoacán, México mayo de 2021**

## Resumen

Existen plantas medicinales de gran interés para el tratamiento de enfermedades. De acuerdo con la Organización Mundial de Salud, una planta medicinal se define como cualquier especie vegetal silvestre o cultivada que contiene sustancias capaces de ser empleadas para propósitos curativos y cuyos principios activos (compuestos bioactivos) puedan servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Las hojas de “cedrón” (*Aloysia citriodora*) son ricas en aceites esenciales y compuestos fenólicos, los cuales tienen propiedades antioxidantes que pueden proteger a las células contra el daño oxidativo y limitar el riesgo de enfermedades asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres. En este estudio se realizó la extracción de compuestos fenólicos de *Aloysia citriodora* por dos métodos: por maceración y con procesamiento ultrasónico utilizando como solventes etanol al 80 % y agua. Se realizó la caracterización de los extractos en cuanto a su contenido de compuestos fenólicos totales (CF) y flavonoides totales (FT), así como la capacidad antioxidante, la cual se evaluó mediante el ensayo de DPPH y ABTS y se calculó además la  $IC_{50}$ . En ambos métodos de extracción el etanol fue el que obtuvo mayor extracción de compuestos bioactivos a diferencia del extracto acuoso a una temperatura de 65 °C. Mientras que el método con mayor extracción fue el ultrasonido. El máximo rendimiento para CF fue obtenido por el método de ultrasonido siendo de  $15.3 \pm 0.18$  mg EAG/mL, mientras que en FT obtuvo un valor de  $6.5 \pm 0.34$  mg EQ/mL, la concentración inhibitoria media  $IC_{50}$  del radical DPPH fue de  $6.29 \pm 0.20$  mg equivalentes del extracto y para el radical ABTS la concentración inhibitoria media  $IC_{50}$  fue de  $2.74 \pm 0.10$  mg equivalentes del extracto. Asimismo, usando el solvente etanol en ambos métodos fue posible obtener una mayor extracción de los compuestos bioactivos de *Aloysia citriodora*, y el método por ultrasonido a altas temperaturas aceleró el tiempo de la ruptura mecánica de la pared celular y una mayor liberación de los compuestos bioactivos.

**Palabras clave:** *Aloysia citriodora*, compuestos fenólicos, actividad antioxidante DPPH y ABTS, concentración inhibitoria media  $IC_{50}$ .

## Abstract

There are medicinal plants of great interest for the treatment of diseases. According to the World Health Organization, a medicinal plant is defined as any wild or cultivated plant species that contain substances capable of being used for curative purposes and whose active principles (bioactive compounds) can serve as precursors for the synthesis of new drugs. The leaves of "lemon verbena" (*Aloysia citriodora*) are rich in essential oils and phenolic compounds, which have antioxidant properties that can protect cells against oxidative damage and limit the risk of diseases associated with oxidative stress caused by free radicals. In this study, the extraction of phenolic compounds from *Aloysia citriodora* was carried out by two methods: by maceration and with ultrasonic processing, using two solvents either ethanol solution at 80 % or water. The characterization of the extracts in terms of total phenolic compounds (CF) and total flavonoid compounds (FT) content and antioxidant capacity, which was evaluated by the DPPH and ABTS test and IC50 was calculated. In both extraction methods, ethanol was the one that obtained the highest extraction of bioactive compounds in contrast to the aqueous extract at a temperature of 65 °C. The method with the greatest extraction was by ultrasound. Obtained as maximum yield for (CF)  $15.3 \pm 0.18$  mg EAG/mL, while (FT) obtained a value  $6.5 \pm 0.34$  mg EQ / mL, medium inhibitory concentration of the IC50 of the radical DPPH was  $6.29 \pm 0.20$  mg extract equivalents and for the radical ABTS the percentage of inhibition IC50 was  $2.74 \pm 0.10$  mg extract equivalents. Using ethanol as solvent it was possible to obtain a greater extraction of the bioactive compounds of *Aloysia citriodora*. The ultrasound method influenced at high temperatures accelerates the time of the mechanical rupture of the cell wall and a greater release of the bioactive compounds.

**Keywords:** *Aloysia citriodora*, phenolic compounds, DPPH and ABTS antioxidant activity, medium inhibitory concentration IC50.

## Índice

1. Introducción.....	9
2. Antecedentes.....	11
<b>2.1 <i>Aloysia citriodora</i></b> .....	11
<b>2.1.1 Principales usos</b> .....	12
<b>2.1.2 Composición de las hojas</b> .....	13
<b>2.2 Metabolitos secundarios</b> .....	13
<b>2.2.1 Compuestos fenólicos</b> .....	14
<b>2.2.2 Polifenoles</b> .....	14
<b>2.2.3 Flavonoides</b> .....	16
<b>2.2.4 Taninos</b> .....	17
<b>2.3 Radicales libres</b> .....	18
<b>2.3.1 Formación de ERO</b> .....	19
<b>2.4 Antioxidantes</b> .....	21
<b>2.4.1 Antioxidantes endógenos</b> .....	21
<b>2.4.2 Antioxidantes exógenos</b> .....	22
<b>2.5 Métodos de extracción de compuestos fenólicos</b> .....	26
<b>2.5.1 Extracción por maceración</b> .....	27
<b>2.5.2 Extracción por procesamiento ultrasónico</b> .....	27
3. Hipótesis.....	28
4. Objetivo General.....	28
<b>4.1 Objetivos Particulares</b> .....	28
5. Materiales y métodos.....	29
<b>5.1 Colecta y secado de hojas de <i>Aloysia citriodora</i></b> .....	29
<b>5.2 Extracciones por maceración</b> .....	29
<b>5.2.1 extracciones acuosa y etanólica por maceración</b> .....	29
<b>5.3 Extracciones por ultrasonido</b> .....	31
<b>5.3.1 Extracciones acuosas y etanólicas asistidas por ultrasonido</b> .....	31
<b>5.4 Composición polifenólica de los extractos</b> .....	31
<b>5.4.1 Contenido de compuestos fenólicos totales</b> .....	31

5.4.2	Curva de calibración para medición de compuestos fenólicos.....	32
5.4.3	Preparación de la muestra para medición de compuestos fenólicos totales .	33
5.5	Contenido de flavonoides totales .....	34
5.5.1	Curva de calibración para medir flavonoides totales .....	34
5.5.2	Preparación de la muestra para medir flavonoides totales .....	35
5.6	Actividad antioxidante .....	37
5.6.1	DPPH.....	37
5.6.2	Determinación de la actividad antioxidante DPPH .....	37
5.7	ABTS .....	38
5.7.1	Determinación de la actividad antioxidante ABTS.....	38
5.8	Concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> ) .....	39
5.9	Análisis estadístico .....	39
6.	Resultados y discusión .....	40
6.1	Extracción por maceración .....	40
	Compuestos fenólicos totales y flavonoides totales .....	40
6.2	Capacidad antioxidante.....	43
	Concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> ) DPPH y ABTS.....	43
	Correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante DPPH y ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales por el método de maceración.....	47
6.3	Extracción asistida por ultrasonido .....	49
	Compuestos fenólicos totales y flavonoides totales .....	49
6.3.1	Capacidad Antioxidante .....	52
	Concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> ) DPPH y ABTS .....	52
	Correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante DPPH y ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales por el método de ultrasonido.....	55
7.	Conclusiones.....	57
8.	Bibliografía.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Hojas de cedrón.....	12
<b>Figura 2.</b> Molécula del citral. ....	13
<b>Figura 3.</b> Ruta de biosíntesis del ácido siquímico y formación de poli acetatos en plantas. .....	15
<b>Figura 4.</b> Estructura química de los principales grupos de flavonoides A) Flavonoides, B) Isoflavonas, C) Flavanonas, D) Antocianidinas, E) Flavanoides F) Flavonas (Santhakumar et al., 2018). ....	17
<b>Figura 5.</b> Reacciones que conducen a la formación de ROS, flechas azules representan las reacciones de Haber-Weiss, las flechas rojas representan las reacciones de Fenton y las flechas verdes la peroxidación lipídica. Las letras negritas representan los radicales o moléculas con el mismo comportamiento. La abreviación de (SOD) se refiere a las enzimas superóxido dismutasa y catalasa (CAT). Adaptado por (Carocho & Ferreira,2013). ....	20
<b>Figura 6.</b> Antioxidantes naturales separados en clases, las letras verdes representan los antioxidantes exógenos, mientras que las letras azules representan los antioxidantes endógenos. Adaptado por (Carocho & Ferreira, 2013). ....	24
<b>Figura 7.</b> Hojas de cedrón molidas. ....	29
<b>Figura 8.</b> Obtención acuosa del extracto por filtración .....	30
<b>Figura 9.</b> Obtención etanólica del extracto por filtración.....	30
<b>Figura 10.</b> Reacción colorimétrica del ácido gálico a diferentes concentraciones.....	33
<b>Figura 11.</b> Curva de calibración para cuantificación de compuestos fenólicos totales. ....	34
<b>Figura 12.</b> Reacción colorimétrica de quercetina a diferentes concentraciones.....	35
<b>Figura 13.</b> Curva de calibración para cuantificación de flavonoides totales. ....	36
<b>Figura 14.</b> Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.....	37
<b>Figura 15.</b> Estructura del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante.....	38
<b>Figura 16.</b> Determinación de fenoles totales en los extractos obtenidos por maceración utilizando diferentes solventes y temperaturas. ....	42

<b>Figura 17.</b> Determinación de flavonoides en los extractos obtenidos por maceración utilizando diferentes solventes y temperaturas.....	43
<b>Figura 18.</b> Determinación de la concentración inhibitoria media $IC_{50}$ DPPH de los extractos obtenidos por maceración utilizando diferentes solventes y temperatura. ....	45
<b>Figura 19.</b> Determinación de la concentración inhibitoria media $IC_{50}$ ABTS de los extractos obtenidos por maceración utilizando diferentes solventes y temperaturas.....	46
<b>Figura 20.</b> Determinación de fenoles totales en los extractos obtenidos por procesamiento ultrasónico utilizando diferentes solventes y temperaturas. ....	50
<b>Figura 21.</b> Determinación de flavonoides en los extractos obtenidos por procesamiento ultrasónico utilizando diferentes solventes y temperaturas. ....	51
<b>Figura 22.</b> Determinación de la capacidad inhibitoria media $IC_{50}$ DPPH de los extractos obtenidos por procesamiento ultrasónico utilizando diferentes solventes y temperaturas. ...	53
<b>Figura 23.</b> Determinación de la capacidad inhibitoria media $IC_{50}$ ABTS de los extractos obtenidos por procesamiento ultrasónico utilizando diferentes solventes y temperaturas. ...	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía de “cedrón” ( <i>Aloysia citriodora</i> ).....	11
<b>Tabla 2.</b> Estudios de algunos autores sobre la extracción de compuestos fenólicos del género <i>Aloysia</i> . .....	25
<b>Tabla 3.</b> Preparación de la curva de calibración para polifenoles totales.....	32
<b>Tabla 4.</b> Preparación del extracto. ....	33
<b>Tabla 5.</b> Preparación de la curva de calibración para flavonoides. ....	35
<b>Tabla 6.</b> Diferencia de medias de los tipos de solvente de extracción y compuestos fenólicos por el método de maceración.....	41
<b>Tabla 7.</b> Diferencia de medias de los tipos de solvente con relación a la actividad inhibitoria media $IC_{50}$ DPPH y ABTS por el método de maceración.....	46
<b>Tabla 8.</b> Análisis de correlación de Pearson entre los parámetros de la concentración inhibitoria media $IC_{50}$ de los parámetros DPPH y ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales.....	48
<b>Tabla 9.</b> Diferencia de medias de los tipos de solvente de extracción y compuestos fenólicos por dos métodos .....	51
<b>Tabla 10.</b> Diferencia de medias de los tipos de solvente con relación a la actividad inhibitoria media $IC_{50}$ DPPH y ABTS por el método de procesamiento ultrasónico.....	54
<b>Tabla 11.</b> Análisis de correlación de Pearson entre los parámetros de la concentración inhibitoria media $IC_{50}$ de los parámetros de DPPH y ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales.....	56

## 1. Introducción

Existen plantas medicinales de gran interés para el tratamiento de patologías humanas. De acuerdo con la Organización Mundial de Salud, una planta medicinal se define como cualquier especie vegetal silvestre o cultivada que contiene sustancias capaces de ser empleadas para propósitos curativos y cuyos principios activos (compuestos bioactivos) puedan servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos.

Los componentes bioactivos han cobrado relevancia en los últimos años, debido a los beneficios que generan a la salud humana, algunos previniendo enfermedades crónico-degenerativas, así como aliviando los síntomas que estas producen. Se encuentra una gran variedad de fitoquímicos bioactivos, entre los que destacan diversos compuestos de tipo: fenólico, azufrados, fitoesteroles, terpenos y carotenoides, los cuales se encuentran en frutas, verduras, cereales, leguminosas y plantas medicinales (Castillejo *et al.*, 2018).

Dentro de las plantas medicinales, el “cedrón” (*Aloysia citriodora*) ha sido estudiado en diversos países con el propósito de conocer el tipo y la cantidad de compuestos que contiene y las diferentes propiedades que éstos puedan ejercer en los sistemas biológicos. El cedrón es originario de América del Sur y es ampliamente cultivado como especie ornamental, por el agradable olor de sus flores y como especie medicinal (Flores, 2017). Al cedrón se le atribuyen propiedades antiespasmódicas, diuréticas, antipiréticas, sedantes, carminativas, digestivas, expectorantes, analgésicas, cardíaca, antihistamínica y emenagoga. En lo que respecta a su composición química, las hojas de la planta son ricas en aceites esenciales y su componente principal es el citral (38-40%), responsable de su aroma, y el limoneno (7-11%) (Di Leo-Lira *et al.*, 2016), los cuales han sido los compuestos más estudiados de esta especie; también abarcan otros tipos de compuestos como los polifenoles, donde se destaca la presencia de flavonas derivadas de luteolina, en menor medida apigenina y verbascósido que es considerado el compuesto mayoritario (Ricco *et al.*, 2011).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue comparar los efectos de la temperatura y el tipo de solventes utilizados en la aplicación de los procesos de maceración

tradicional y por ultrasonido durante la extracción de compuestos fenólicos a partir de hojas de cedrón (*Aloysia citriodora*), que permitan mantener la mayor capacidad antioxidante.

## 2. Antecedentes

### 2.1 *Aloysia citriodora*

*Aloysia citriodora* es comúnmente llamada “cedrón”. Es una planta de la familia *Verbenaceae*, originaria de América del Sur y constituye una de las especies más sobreexplotadas debido a sus propiedades medicinales y aromáticas (Di Leo-Lira *et al.*, 2016). La planta se distribuye por Mesoamérica y Centroamérica, es ampliamente cultivada como especie ornamental, y es conocida en México con diversos nombres entre los que destacan “Cedrón” o “Yerba Luisa” (Estrada *et al.*, 2013). El cedrón es una planta leñosa, arbustiva, que puede alcanzar de 3 a 4 m de altura, las hojas son simples, angostas y alargadas con peciolo cortos y la forman 3 hojas por cada nodo de los tallos (Figura 1). La lámina es de color verde pálido, de 5 a 10 cm de largo y tienen un característico aroma a limón. En la Tabla 1 se presenta la taxonomía del cedrón.

**Tabla 1.** Taxonomía de “cedrón” (*Aloysia citriodora*).

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Familia</b>	<i>Verbenaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Aloysia</i>
<b>Especie</b>	<i>Aloysia citriodora</i>

La inflorescencia es una panícula terminal delgada, las flores consisten en un pequeño cáliz, tubular con cuatro dientes largos, estrechos y una corola pálida, verde-malva divididos en cuatro lóbulos acuminados. Las hojas secas son delgadas y frágiles, de color verde; poco pecioladas, ovadas-lanceoladas, acuminadas, con pelos glandulares, poco pilosas en el envés. La hoja presenta epidermis adaxial con tricomas cistolíticos, cónicos, unicelulares de paredes gruesas verrucosas; cada uno se halla rodeado por una roseta de células basales conteniendo cistolitos (Hashemi *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Hojas de cedrón.

Las condiciones para el cultivo del cedrón son de un clima cálido constante y exposición soleada, no resiste bien las heladas, a temperaturas por debajo de 0 °C pierde las hojas, aunque la madera es lo suficientemente dura como para soportar hasta -10 °C (Botta, 1979). Requiere de un suelo bien drenado, preferiblemente margoso, bastante fértil y húmedo en verano. Se puede propagar por división de matas, acodos, o estacas, la multiplicación por semillas no se realiza debido a su escaso o nulo poder germinativo; en los cultivos comerciales el método preferido es por estacas (Vargas-Corrales, 2012).

### **2.1.1 Principales usos**

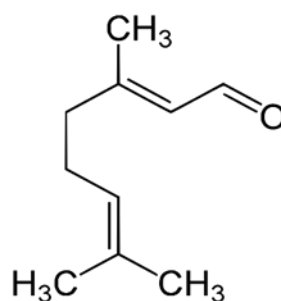
La hoja de cedrón tiene un gran uso en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. El aceite esencial se utiliza como corrector de sabor y olor en productos cítricos y como planta ornamental debido al gran aroma que expide (Cáceres *et al.*, 1990).

La infusión de sus hojas, tallos, flor y frutos es usada ampliamente en México y Sudamérica para calmar dolores, afecciones nerviosas y gastrointestinales, como son:

cólicos, diarrea, indigestión, flatulencias, náuseas y vómito. El reumatismo, úlceras y dolores menstruales son otros de los malestares (Rojas *et al.*, 2012).

### 2.1.2 Composición de las hojas

Los principales componentes de las hojas de cedrón son, aceite esencial (0.1-0.3%), alcoholes alifáticos (1-1.5%), sesquiterpenos (4-5%) mono terpenos limoneno (6%), ésteres terpénicos (6%), monoterpenos (15-16%) sesquiterpenos (18%) y aldehídos (39-40%). El principal componente del aceite esencial es el citral (Figura 2), el cual se obtiene por diferentes técnicas, de las cuales resalta el arrastre por vapor (Vargas-Corrales, 2012).



**Figura 2.** Molécula del citral.

## 2.2 Metabolitos secundarios

Las plantas tienen un metabolismo secundario que les permite acumular compuestos de naturaleza química, a los cuales se les denomina metabolitos secundarios, que presentan propiedades biológicas, funciones ecológicas o usos y aplicaciones en medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes.

La síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles esenciales, solo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o

biótico. Este aumento en los niveles de metabolitos secundarios es importante para la supervivencia de las plantas, ya que su síntesis se deriva del metabolismo primario y porque algunos compuestos son tóxicos para la misma planta. Es así como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas a heridas y al ataque por parte de las plagas (Sierra-Sarmiento *et al.*, 2018).

La clasificación de los metabolitos secundarios utiliza varios criterios, aunque en todos ellos es inevitable la superposición, los criterios de clasificación de mayor aceptación son la estructura química, el origen biogenético, la acción biológica y la actividad farmacológica. Los compuestos más importantes del metabolismo secundario son, los fenólicos, alcaloides y los terpenos.

### **2.2.1 Compuestos fenólicos**

Los fenoles son compuestos químicos con diferentes estructuras, estas poseen un anillo aromático con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos; son compuestos que forman parte importante de la dieta y la salud humana, debido a que tienen propiedades como antioxidantes que pueden proteger las células contra el daño oxidativo y limita el riesgo de enfermedades asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres, la participación en el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio (Ganoza-Yupanqui *et al.*, 2015). La mayor parte de los compuestos fenólicos están conformados por los polifenoles, de los cuales se conocen más de 8,000 de las más representativos están los flavonoides, las quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos, los estilbenos, las ligninas y los taninos (Sierra-Sarmiento *et al.*, 2018).

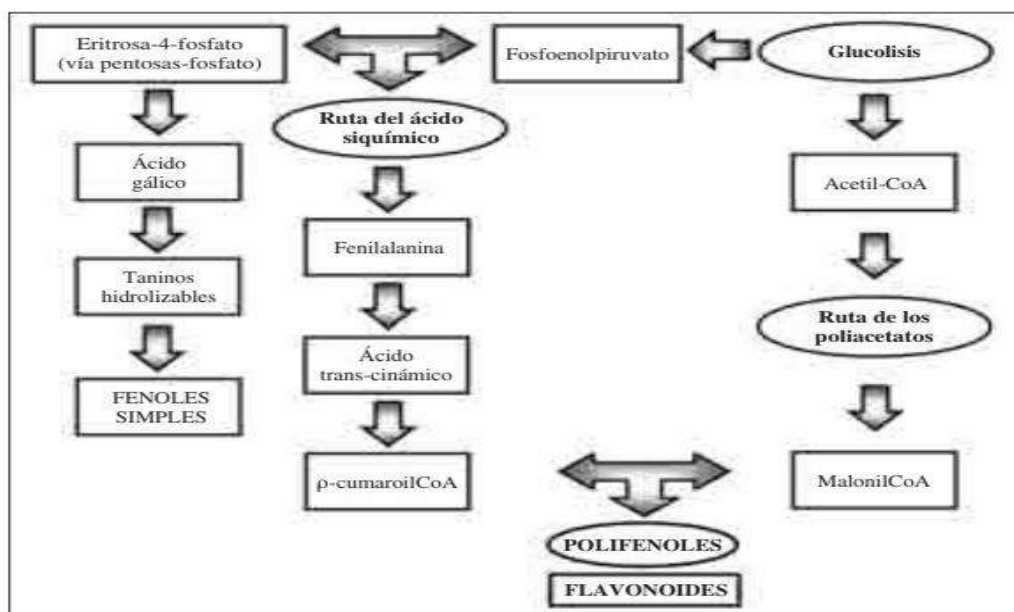
### **2.2.2 Polifenoles**

Los polifenoles tienen la capacidad para modular la actividad de diferentes enzimas en distintos procesos celulares, y participan en reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción de acuerdo a sus propiedades antioxidantes. Los principales grupos de polifenoles

son, ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Cabrera-Soto *et al.*, 2009).

### Biosíntesis de los polifenoles

Los polifenoles se sintetizan como metabolismos secundarios de las plantas, tienen lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los polis acetatos, tal como se muestra en la Figura 3 (Quiñones *et al.*, 2012)



**Figura 3.** Ruta de biosíntesis del ácido siquímico y formación de poli acetatos en plantas.

### La ruta de biosíntesis del ácido siquímico

La ruta del ácido siquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina) y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). Es dependiente de la luz y se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa-4-fostato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis. La vía del ácido siquímico puede continuar con la adhesión de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, dando lugar a la fenilalanina, un

aminoácido esencial propio del metabolismo primario de las plantas. La fenilalanina entra a formar parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando la fenilalanina en el ácido trans-cinámico. Posteriormente, el ácido trans-cinámico se transforma en ácido *p*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático. La acción de una Coenzima A (CoA), la CoA-ligasa, transforma el ácido *p*-cumárico en *p*-cumaroilCoA, que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles de origen vegetal.

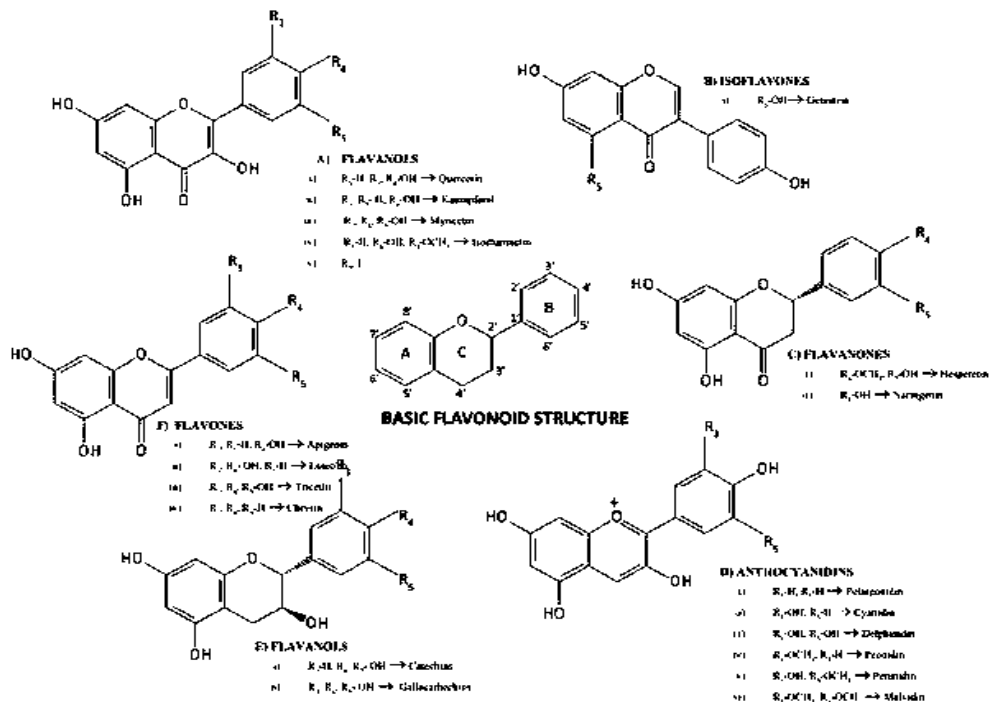
### **La ruta de formación de los poliacetatos**

Esta ruta proporciona las quinonas y las xantonas. Comienza a partir de una molécula inicial de acetil-CoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos como las quinonas y otros metabolitos (Quiñones *et al.*, 2012).

### **2.2.3 Flavonoides**

Entre los polifenoles más importantes se encuentran los flavonoides, estos tienen una gran actividad antioxidante, a los cuales se les atribuye una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónica, antiinflamatoria, analgésica, antineoplásica y antimicrobiana, entre otros (Ganoza-Yupanqui *et al.*, 2015).

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar los fenoles totales en alimentos y vegetales se establecieron debido a que poseen un gran número de grupos hidroxilos formando glucósidos, estos son polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetato de etilo o agua, en la Figura 4 se muestran los núcleos estructurales de algunos flavonoides.



**Figura 4.** Estructura química de los principales grupos de flavonoides A) Flavonoides, B) Isoflavonas, C) Flavanonas, D) Antocianidinas, E) Flavonoides F) Flavonas (Santhakumar *et al.*, 2018).

## 2.2.4 Taninos

Los taninos son solubles en agua, y existen dos tipos: taninos hidrolizables y condensados. Los hidrolizables se limitan a las dicotiledóneas, tienen un peso molecular más bajo y precipitan mucho menos que los taninos condensados. Estas propiedades están relacionadas principalmente con su capacidad de interactuar con la proteína, de quelar metales y su actividad antioxidante. Estas tres capacidades combinadas con sus efectos antiinflamatorios y antiproliferativos explican los efectos beneficiosos de los taninos sobre la salud humana. El ácido polifenólico más simple es el ácido gálico, por ello se utiliza como estándar para calcular concentración de polifenoles en equivalentes de ácido gálico. Los condensados o proantocianidinas están presentes en la mayoría de las plantas vasculares, se forman tras su degradación por el ácido clorhídrico en medio alcohólico; son pigmentos

antociánicos de coloración roja, incluyendo la cianidina y en algunos casos la delfinidina (Arapitsas, 2012).

### 2.3 Radicales libres

Los radicales libres (RL) son átomos, moléculas o iones que contienen uno o más electrones no apareados en la capa de valencia o la órbita externa y son capaces de existir de forma independiente. El número impar de electrones los hace inestables, de corta duración y altamente reactivos, se producen por reacciones químicas con otras moléculas. Los RL pueden producirse excesivamente en la mitocondria, iniciando así una cadena que destruye o causa daños a nivel celular como membranas celulares, daño a moléculas y tejidos entre otros (Phaniendra *et al.*, 2015).

Los RL se derivan de tres elementos: oxígeno, hidrógeno y azufre; creando así las especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno (ERN) y especies de azufre reactivo (ERS). Las ERO/ERN desempeñan un doble trabajo como compuestos beneficiosos y tóxicos para el cuerpo humano, a niveles moderados o bajos tienen beneficios e implican diversas funciones fisiológicas, como la función inmune (defensa contra microorganismos patógenos), vías de señalización celular, la respuesta mitogénica y la regulación redox. A concentraciones más altas generan estrés oxidativo y nitrosativo, causando daño potencial en biomoléculas. El estrés oxidativo y nitrosativo se desarrolla cuando hay exceso de producción de ERO/ERN y una deficiencia de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Carvajal-Carvajal, 2019).

Las especies ERO/ERN también pueden involucrar fuentes de tipo endógenas y exógenas. En las fuentes endógenas se encuentra la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), mieloxiperoxidasa (MPO), lipooxigenasa, angiotensina II, la NADPH oxidasa, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), superóxido dismutasa (SOD), iones hidroxilo ( $OH^-$ ), óxido nítrico (NO) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). En las fuentes exógenas la contaminación del aire y agua, tabaco, alcohol, drogas (ciclosporina, tacrolimus, gentamicina, y bleomicina), metales de transición, disolventes industriales, de cocción (carne ahumada, aceite de desecho

y grasa) y la radiación, entre otros. Estos compuestos a su vez al ser integrados al interior del organismo se metabolizan en radicales libres, los cuales pueden utilizarse como marcadores del estrés oxidativo (Phaniendra *et al.*, 2015).

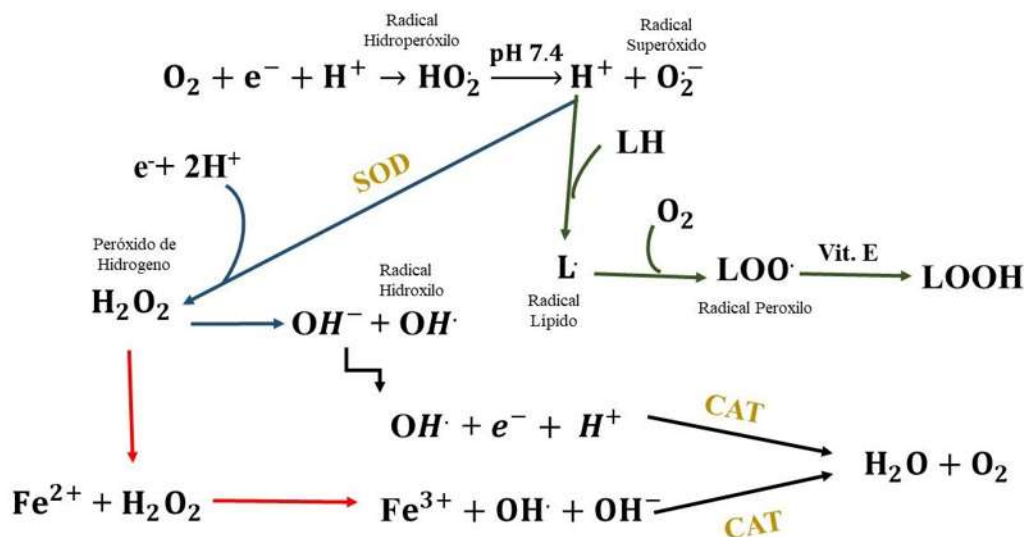
Los ERO incluyen radicales libres como anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), hidróperoxilo ( $HO_2$ ), oxígeno singlete ( $O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCL), peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ). Los ERN se derivan del óxido nítrico (NO) mediante la reacción con anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y la formación de peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ). ERS son fácilmente formadas por las reacciones de ERO con tioles para formar un disulfuro y con la oxidación adicional puede resultar disulfuro-S-monóxido y disulfuro-S-dióxido. Finalmente, la reacción con un tiol reducido puede dar lugar a la formación de sulfénico o ácido sulfinico (Liguori *et al.*, 2018).

### 2.3.1 Formación de ERO

Las reacciones que conducen a la formación de especies reactivas se muestran en la Figura 5. Donde el radical hidróperoxilo ( $HO_2$ ) disocia a pH 7 para formar el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Este anión es altamente reactivo y puede interactuar con un número de moléculas para generar ERO, ya sea directamente o a través de enzimas y procesos catalizados por metales. A continuación, se describen algunas reacciones características donde están involucradas las especies reactivas:

- Reacciones de Haber-Weiss: Donde el ion superóxido puede ser disociado a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), a través de una reacción de dismutación con la enzima superóxido dismutasa (SOD) y finalmente en agua por la enzima catalasa (CAT).
- Reacciones de Fenton: El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) reacciona con un catalizador de hierro como como el  $Fe^{2+}$ , este puede dar lugar a una reacción de Fenton  $Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$ , que a su vez forma el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y puede dismutarse con la enzima superóxido dismutasa (SOD), para finalmente convertirse en agua con la ayuda de la enzima catalasa (CAT) (Carocho & Ferreira, 2013).

Peroxidación lipídica: se inicia por un ataque hacia la cadena lateral de un ácido graso con un radical con el fin de abstraer un átomo de oxígeno de un carbono metileno, donde los dobles enlaces más fáciles para eliminar son los átomos de hidrógeno, para formar un radical y estos a su vez actúan por la siguiente reacción genérica ( $LH + OH\cdot \rightarrow H_2O + L\cdot$ ), donde (LH) representa un lípido genérico y ( $L\cdot$ ) representa un radical lipídico centrado en el carbono. El radical lipídico puede reaccionar con el oxígeno molecular y dar lugar al radical peroxilo ( $LOO\cdot$ ). El radical peroxilo lipídico se reorganiza mediante una reacción de ciclación para formar endoperóxidos, que finalmente forman malondialdehído (MDA) productos finales tóxicos de la peroxidación lipídica y estas a su vez promueven la aparición de enfermedades crónicas degenerativa (Liguori *et al.*, 2018).



**Figura 5.** Reacciones que conducen a la formación de ROS, flechas azules representan las reacciones de Haber-Weiss, las flechas rojas representan las reacciones de Fenton y las flechas verdes la peroxidación lipídica. Las letras negritas representan los radicales o moléculas con el mismo comportamiento. La abreviación de (SOD) se refiere a las enzimas superóxido dismutasa y catalasa (CAT). Adaptado por (Carocho & Ferreira, 2013).

## 2.4 Antioxidantes

Los antioxidantes neutralizan la acción antioxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los cuales son captados por los radicales libres, estos compuestos son capaces de disminuir el daño celular, proteger a las biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN) de la oxidación y/o inhibir los procesos de apoptosis celular generados por especies reactivas del oxígeno, responsables del estrés oxidante. El antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico. Existen dos tipos de antioxidantes: los endógenos y los exógenos (Figura 6), estos últimos son tomados de la dieta (Halliwell, 2013).

### 2.4.1 Antioxidantes endógenos

Los antioxidantes endógenos son producidos por el organismo como defensa ante los radicales libres (RL), estos incluyen vías enzimáticas y no enzimáticas. En cuanto a los antioxidantes enzimáticos se dividen en las defensas primarias y secundarias. Con respecto a la defensa primaria se compone de tres enzimas, el glutatión peroxidasa (GSH-Px), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). El glutatión peroxidasa (GSH-Px) puede donar dos electrones para reducir los peróxidos mediante la formación de selenoles y también elimina peróxidos como sustrato potencial en las reacciones de Fenton, la SOD actúa con el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) para convertirlo en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y la CAT finalmente descompone el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno molecular, así mismo estas enzimas ayudan a prevenir la producción de radicales hidroxilos ( $OH^{\cdot-}$ ). En cuanto a la defensa secundaria, se encuentran enzimas como glutatión reductasa que reduce el glutatión (antioxidante) de su óxido a su forma reducida y la enzima Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa regenera la NADPH (fosfato de nicotinamida adenina), estas dos enzimas no neutralizan directamente a los RL, pero tienen papeles de soporte para otros antioxidantes endógenos.

Los antioxidantes no enzimáticos son moléculas que interactúan con ERO/ERN y terminan las reacciones en cadena de RL por lo que se pueden encontrar una gran variedad, entre ellos el glutatión, ácido úrico y ubiquinol (Co-enzima Q). Algunos de estos se encuentran en los alimentos, pero estos sufren una degradación/biotransformación

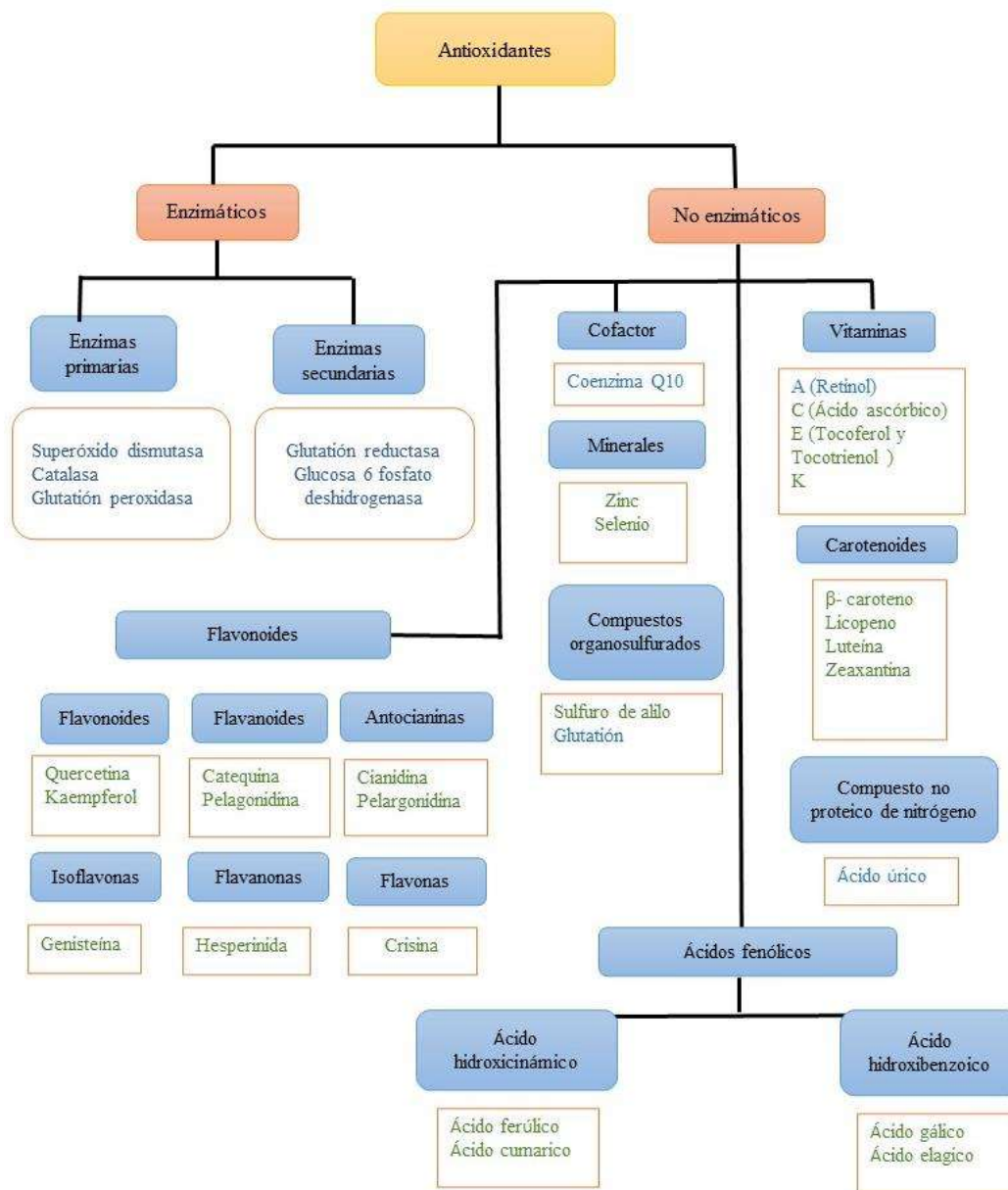
significativa a lo largo del tracto gastro-intestinal (Carocho & Ferreira, 2013, Coronado *et al.*, 2015 Phaniendra *et al.*, 2015, Liguori *et al.*, 2018).

#### 2.4.2 Antioxidantes exógenos

Los antioxidantes exógenos son tomados de la dieta, estos incluyen las lecitinas de aceite, selenio, zinc, acetilcisteína, incluyendo las vitaminas como, la vitamina A que es un carotenoide producido en el hígado y resulta de la descomposición del  $\beta$ -caroteno. Hay alrededor de una docena de formas de vitamina A que se pueden aislar. Se sabe que tiene un impacto beneficioso en la piel, los ojos y los órganos internos. Lo que confiere la actividad antioxidante es la capacidad de combinarse con los radicales peróxido antes de que propaguen la peroxidación a los lípidos. El ácido ascórbico (vitamina C) incluye dos compuestos con actividad antioxidante: ácido L-ascórbico y ácido L-deshidroascórbico que se absorben a través del tracto gastrointestinal y pueden intercambiarse enzimáticamente *in vivo*. El ácido ascórbico es eficaz para eliminar el anión del radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el oxígeno singlete y el óxido de nitrógeno reactivo (Barros *et al.*, 2011) La vitamina E está compuesta por ocho isoformas, con cuatro tocoferoles ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol) y cuatro tocotrienoles ( $\alpha$ -tocotrienol,  $\beta$ -tocotrienol,  $\gamma$ -tocotrienol y  $\delta$ -tocotrienol), siendo el  $\alpha$ -tocoferol la isoforma más potente y abundante en los sistemas biológicos. El grupo de cabeza de cromano confiere actividad antioxidante a los tocoferoles, pero la cola de fitilo no tiene influencia. La vitamina E detiene la peroxidación lipídica donando su hidrógeno fenólico a los radicales peróxidos formando radicales tocoferoxilo que, a pesar de ser también radicales, no son reactivos y no pueden continuar la reacción oxidativa en cadena. La vitamina E es el único antioxidante importante soluble en lípidos que rompe cadenas que se encuentra en el plasma, los glóbulos rojos y los tejidos, lo que le permite proteger la integridad de las estructuras lipídicas, principalmente las membranas (Burton *et al.*, 1990) Estas dos vitaminas también muestran un comportamiento sinérgico con la regeneración de la vitamina E a través de la vitamina C desde el radical tocoferoxilo a una forma intermedia, restableciendo así su potencial antioxidante. La vitamina K es un grupo de compuestos liposolubles, esencial para la conversión

postraduccion de glutamatos unidos a proteínas en carboxiglutamatos en varias proteínas diana. La estructura de 1,4-naftoquinona de estas vitaminas confiere el efecto protector antioxidante. Las dos isoformas naturales de esta vitamina son K1 y K2.

Los antioxidantes del tipo fenólico, incluyen derivados del estilbeno (resveratrol, ácidos fenólicos y flavonoides), a los cuales se les confiere las propiedades antioxidantes por los grupos hidroxilo unidos a estructuras de anillos fenólicos y estos a su vez pueden actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, inactivadores de oxígeno singlete, quelantes de metales, activan enzimas antioxidantes, mitigan el estrés nitrosativo, aumentan los niveles de ácido úrico y moléculas de bajo peso molecular, son precursores de taninos y secuestradores de RL con especial impacto en el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^\cdot^-$ ) y peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Figura 6) (Carocho & Ferreira, 2013; Corrales & Muñoz, 2012).



**Figura 6.** Antioxidantes naturales separados en clases, las letras verdes representan los antioxidantes exógenos, mientras que las letras azules representan los antioxidantes endógenos. Adaptado por (Carocho & Ferreira, 2013).

Por otro lado, en la Tabla 2 se muestran algunos estudios realizados por diferentes autores sobre compuestos bioactivos de diferentes partes de la planta del género *Aloysia*.

**Tabla 2.** Estudios de algunos autores sobre la extracción de compuestos fenólicos del género *Aloysia*.

Autores	Especie	Resultados
(Ricco <i>et al.</i> , 2011)	<p><i>Aloysia gratissima</i> var. <i>Gratissima</i></p> <p><i>Aloysia gratissima</i> var. <i>Schulziana</i></p> <p><i>Aloysia polystachya</i></p>	<p>Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides</p> <p>Infusión</p> <p>Hojas 36.94 ± 1.73 (mg EAT/gMS) y 19.23 ± 1.74 (mg ER/gMS)</p> <p>Cuantificación ABTS 219 ± 42 (µmoles EAA/gMS)</p> <p>Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides</p> <p>Hojas 45.38 ± 2.83 (mg EAT/gMS) y 31.05 ± 2.40 (mg ER/gMS)</p> <p>Cuantificación ABTS 351 ± 50(µmoles EAA/gMS)</p> <p>Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides</p> <p>Hojas 30.80 ± 1.29 (mg EAT/gMS) y 11.10 ± 1.14 (mg ER/gMS)</p> <p>Cuantificación ABTS 217 ± 20 (µmoles EAA/gMS)</p>
(Aguado <i>et al.</i> ,2013)	<i>Aloysia polystachya</i>	<p>Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides</p> <p>Maceración etanol al 70 %</p> <p>Hojas 2.32 ± 0.16 (mg EAG/mL E) y 0.37 ± 0.01 (mg EQ/mL E)</p> <p>IC<sub>50</sub> DPPH 5.30.10<sup>-3</sup> ± 1.13. 10<sup>-4</sup> mg/mL</p>
(Cheurfa & Allen, 2016)	<i>Aloysia triphylla</i>	<p>Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides</p> <p>Extracción acuosa</p> <p>Hojas 61.13 ± 0.0 (mg EAG/g) y 6.81 ± 0.1 (mg EQ/g)</p> <p>IC<sub>50</sub> DPPH 27.40 ± 0.1 mg/mL</p> <p>Extracción hidroalcohólica al 50%</p> <p>Hojas 30.84 ± 0.1 (mg EAG/g) y 6.42 ± 0.1 (mg EQ/g)</p> <p>IC<sub>50</sub> DPPH 23.52 ± 0.03 mg/mL</p>
(Alvares-Rosales <i>et al.</i> ,2019)	<i>Aloysia citriodora</i>	<p>Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides</p> <p>Extracción etanólica al 10 %</p> <p>Hojas 27.5 ± 0.10 (mg EAG/gPS) y 49.6 ± 3.13 (mg ER/gPS)</p> <p>Tallo 20.1 ± 0.17 (mg EAG/gPS) y 40.01±1.5 (mg ER/gPS)</p>

**Descripción de la tabla:** (mg EAT/gMS) miligramos equivalentes de ácido tánico/gramos de material seco, (mg ER/gMS) miligramos equivalentes a rutina/ gramos de material seco, ( $\mu$ moles EAA/gMS) micro moles equivalentes de ácido ascórbico/gramos de material seco, (mg EAG/ml E) miligramos equivalentes de ácido gálico/mililitro de extracto, (mg EQ/ml E) miligramos equivalentes de quercetina/mililitro de extracto, (mg EAG/g) miligramos equivalentes de ácido gálico / gramos de la planta, (mg EQ/g) miligramos equivalentes de quercetina/gramos de la planta, (mg EAG/gPS) miligramos equivalentes de ácido gálico/gramos peso seco, (mg ER/gPS) miligramos equivalentes de rutina/ gramos peso seco.

## 2.5 Métodos de extracción de compuestos fenólicos

La extracción de compuestos fenólicos dependerá de la textura y el contenido acuoso del material vegetal y el tipo de sustancias que se van a aislar. Los compuestos fenólicos pueden ser volátiles, oleresinosos, termoestables, lipofílicos e hidrofílicos, entre otros. Así para las sustancias de baja polaridad (lípidos) se utilizan solventes como el éter de petróleo y cloroformo, para sustancias de mediana y alta polaridad, el acetato de etilo, el etanol y la acetona (Sierra-Sarmiento *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta todas estas características se pueden seleccionar entre uno o más técnicas de extracción. Entre las técnicas convencionales de extracción se encuentran las de maceración, extracción continua en Soxhlet, extracción por hidrodestilación, destilación por arrastre de vapor y destilación por rotavapor. Dichos métodos han sido muy utilizados, pero son muy prolongados, requieren grandes cantidades de solvente orgánicos, cuyos remanentes limitan la aplicación de los extractos debido a la toxicidad del solvente, además de requerir largos tiempos de extracción y alto consumo energético (Corona-Jiménez *et al.*, 2016). Lo anterior ha impulsado la implementación de tecnologías novedosas de extracción asistida por diversos mecanismos como el ultrasonido, la energía de microondas, fluidos supercríticos y mediante la extracción acelerada por disolventes. El principal objetivo de estas tecnologías es la reducción de consumo de energía y el tiempo que es reflejado en la disminución del costo, por lo que han sido denominadas sustentables debido a que protegen tanto al medio ambiente como a la salud de los consumidores (Da Porto *et al.*, 2013, Rojas *et al.*, 2019).

### **2.5.1 Extracción por maceración**

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción, que son los que se pretende extraer. La maceración genera dos productos, el sólido ausente de esencias y el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia empleada, así como del líquido de extracción. Existen dos métodos de maceración de acuerdo con la temperatura: caliente o fría. Esta operación requiere de un tiempo largo y mayor gasto energético, aunque es recomendable por su uso convencional (Sierra-Sarmiento *et al.*, 2018, Torres-Valenzuela *et al.*, 2020).

### **2.5.2 Extracción por procesamiento ultrasónico**

La extracción por ultrasonido es un método sencillo y rápido en comparación a otros métodos, además de que presenta alta reproducibilidad en corto tiempo, es de fácil manipulación y disminuye el uso de solventes. La efectividad del ultrasonido es debido al fenómeno de cavitación que consiste en la formación, crecimiento e implosión de microburbujas de gas en el seno del líquido como consecuencia de las fluctuaciones de presión generadas por el paso de ondas, que se propagan a través del fluido, oscilando alrededor de su posición de equilibrio, haciendo que las distancias intermoleculares se modifiquen continuamente siguiendo ciclos alternos de compresión y descompresión. Dicho efecto, causa la ruptura mecánica de la pared celular para liberar los componentes bioactivos, a su vez el calentamiento del solvente hace aumentar la difusión del extracto, para mejorar así la transferencia de masas a través de la interfase sólido-líquido (Rojas *et al.*, 2019; Benavides-Guerrero *et al.*, 2020).

### **3. Hipótesis**

La modificación en la temperatura y solvente permitirán obtener un máximo de extracción de compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante de las hojas *Aloysia citriodora* al ser extraídos con los métodos de maceración y ultrasonido.

### **4. Objetivo General**

Comparar los efectos de la temperatura y el tipo de concentración de los solventes del proceso de maceración tradicional y por ultrasonido durante la extracción de compuestos fenólicos a partir de hojas de cedrón (*Aloysia citriodora*), que permitan mantener la mayor capacidad antioxidante.

#### **4.1 Objetivos Particulares**

- Obtener el extracto acuoso y el etanólico por maceración y por procesamiento ultrasónico de las hojas de cedrón.
- Evaluar el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales en los extractos obtenidos.
- Obtener la concentración inhibitoria media  $IC_{50}$  por las técnicas de DPPH y ABTS.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Colecta y secado de hojas de *Aloysia citriodora*

La muestra de hojas de *Aloysia citriodora* (Figura 7) fue comprada en el mercado independencia en la ciudad de Morelia Michoacán, México; se retiraron ramas y flores. Las hojas secas se molieron en una licuadora marca Osterizer y se cribaron usando un tamiz con malla de 0.8 mm de diámetro.



**Figura 7.** Hojas de cedrón molidas.

### 5.2 Extracciones por maceración

#### 5.2.1 extracciones acuosa y etanólica por maceración

La obtención del extracto acuoso se realizó por maceración en un matraz Erlenmeyer de 250 ml a temperatura ambiente, utilizando una relación 1:10 (masa seca de las hojas /volumen disolvente). Para ello, el matraz conteniendo la mezcla arriba mencionada, se puso en un termo baño (Julabo SW22) con una agitación de 100 rpm a temperaturas de 25 °C, 45 °C y 65 °C. Después de las 24 h el extracto se filtró a través de papel filtro comercial (Bunn) de poro mediano (Figura 8) y se refrigeró a 4 °C para su uso posterior.



**Figura 8.** Obtención acuosa del extracto por filtración

La obtención del extracto etanólico al 80 % se realizó por maceración a temperatura ambiente durante 24 h utilizando una relación de 1:10 (masa de las hojas /volumen disolvente), siguiendo el mismo procedimiento que para el acuoso. Para ello, se colocó la mezcla contenida en el matraz Erlenmeyer en un termo baño (Julabo SW22) con una agitación de 100 rpm a temperaturas de 25 °C, 45 °C y 65 °C. Después de las 24 h el extracto se filtró varias veces a través de papel filtro comercial (Bunn) (Figura 9) y se refrigeró a 4 °C para su uso posterior (García-Pérez *et al.*, 2018).



**Figura 9.** Obtención etanólica del extracto por filtración.

## **5.3 Extracciones por ultrasonido**

### **5.3.1 Extracciones acuosas y etanólicas asistidas por ultrasonido**

Con el dispositivo (ultrasonicador VCX 500) de ultrasonido de sonda se trabajó en condiciones de temperatura variable las cuales fueron seleccionadas 25 °C, 45 °C y 65 °C con una amplitud del 30 % y un tiempo de 20 min para cada muestra a 20 kHz, con una potencia máxima de 500 W y un emisor de superficie de 3.8 cm<sup>2</sup>. La obtención del extracto tanto acuoso como etanólico se realizó al colocar la muestra y disolvente en una relación de 1:10 (masa seca de las hojas molidas/ volumen del disolvente), colocándose en un vaso depresitado. La sonda ultrasónica se sumergió a 1.5 cm en la solución acuosa y/o etanólica y el vaso con la muestra se mantuvo en oscuridad, para evitar posibles daños, inducidos por la luz en el extracto. La muestra de cada extracto se centrifugo y se filtró con papel filtro comercial (Bunn), de tamaño medio por 10 min, el sobrenadante que se obtuvo se almaceno en tubos cónicos de 50 mL cubiertos con aluminio por 24h a 4 °C hasta su análisis (Corona-Jiménez *et al.*, 2016).

## **5.4 Composición polifenólica de los extractos**

En esta etapa se realizó una precaracterización química de los extractos obtenidos, que consistió en la determinación por la técnica de UV/Vis el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales.

### **5.4.1 Contenido de compuestos fenólicos totales**

El contenido de compuestos fenólicos totales se cuantificó utilizando la metodología de (Taga *et al.*, 1984) con algunas modificaciones. Se prepararon soluciones de los extractos disueltos. Se tomó 1 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% y se disolvió en 50 mL de agua destilada, la disolución se sónico por 2 min a temperatura ambiente, el reactivo de Folin-Ciocalteu comercial (2N) se diluyo en una proporción 1:1 con agua destilada y se adicionó a

la solución, dejándola reposar por 30 min y se midió a una absorbancia a 750 nm (Curifuta *et al.*, 2012).

#### 5.4.2 Curva de calibración para medición de compuestos fenólicos

La determinación del contenido total de polifenoles se calculó interpolando los resultados experimentales con una curva de calibración y se expresaron en mg EAG g<sup>-1</sup> de MA (mg equivalentes de ácido gálico por gramo de materia acuosa). Para lo anterior, se utilizó una solución madre de ácido gálico (0.2 mg/mL) donde se tomaron las siguientes concentraciones (Tabla 3) para la construcción de la curva, en la Figura 10 se observa el gráfico de calibración con ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales. Por triplicado en diez tubos se dosificaron las siguientes cantidades:

**Tabla 3.** Preparación de la curva de calibración para polifenoles totales.

<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Ácido gálico (µL)</b>	0	10	20	30	40	50	60	70	80	100
<b>Agua(µL)</b>	100	90	80	70	60	50	40	30	20	0
<b>Folin 1N(µL)</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Agitación y reposo por 2 minutos</b>										
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% (µL)</b>	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
<b>Agitación y reposos por 30 minutos</b>										
<b>Lectura a 750 nm</b>										



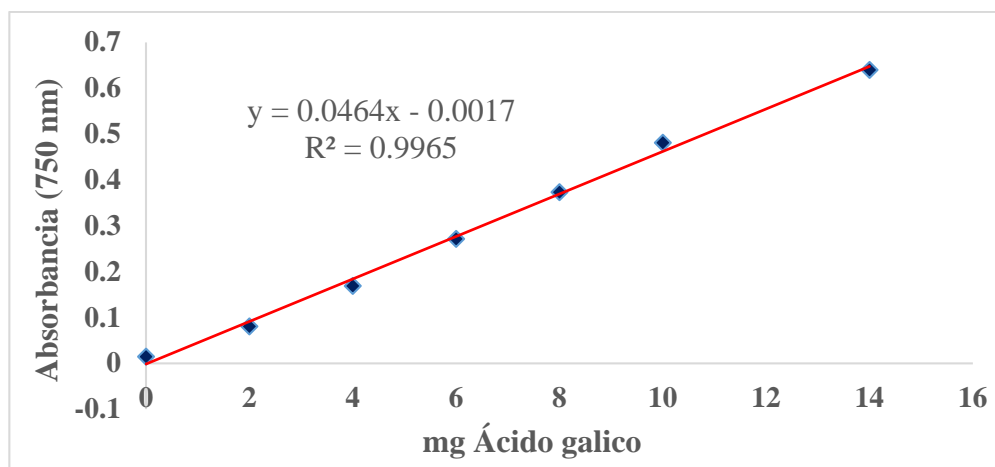
**Figura 10.** Reacción colorimétrica del ácido gálico a diferentes concentraciones.

#### 5.4.3 Preparación de la muestra para medición de compuestos fenólicos totales

En un tubo de vidrio se preparó una disolución de 50  $\mu\text{L}$  del extracto acuoso y 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada. De esa solución se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y 25  $\mu\text{L}$  de extracto diluido con agua destilada. Se realizaron las dosificaciones de la muestra por triplicado (Tabla 4). En la Figura 11 se observa el gráfico de calibración con ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

**Tabla 4.** Preparación del extracto.

<b>Extracto (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	100	50	25
<b>Agua</b>	0	50	75
<b>Folin 1N (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	100	100	100
<b>Agitación y reposo por 2 minutos</b>			
<b><math>\text{Na}_2\text{CO}_3</math> 2% (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	2000	2000	2000
<b>Agitación y reposos por 30 minutos</b>			
<b>Lectura a 750 nm</b>			



**Figura 11.** Curva de calibración para cuantificación de compuestos fenólicos totales.

## 5.5 Contenido de flavonoides totales

La cuantificación del contenido de flavonoides totales se determinó mediante un análisis espectrofotométrico utilizando la metodología de Dewanto *et al.* (2002), con algunas modificaciones. Se preparó una solución de  $\text{AlCl}_3$  2 % (m/v), para ello 0.2 g de  $\text{AlCl}_3$  se disolvieron en 10 mL metanol al 50 %, y la disolución se sónico por 5 min. A continuación, se midió a una longitud de onda de 415 nm después de 30 min en ausencia de luz. Se realizó una curva de calibración con quercetina (grado analítico, Sigma-Aldrich) entre 0 a 1400 mg/L. El contenido de flavonoides se expresó en mg EQ g<sup>-1</sup> de MA (mg equivalentes de quercetina por gramo de materia acuosa).

### 5.5.1 Curva de calibración para medir flavonoides totales

La curva de calibración se realizó utilizando una disolución madre de quercetina a 0.02 mg/mL donde se tomaron las siguientes concentraciones para la construcción de la curva. Por triplicado en seis tubos se dosificaron las siguientes cantidades (Tabla 5).

**Tabla 5.** Preparación de la curva de calibración para flavonoides.

<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Quercetina (μL)</b>	0	200	400	600	1200	1400
<b>Metanol 50 % (μL)</b>	2000	1800	1600	1400	800	600
<b>AlCl<sub>3</sub> (μL)</b>	500	500	500	500	500	500
<b>Agitación y reposos por 30 minutos</b>						
<b>Lectura a 415 nm</b>						

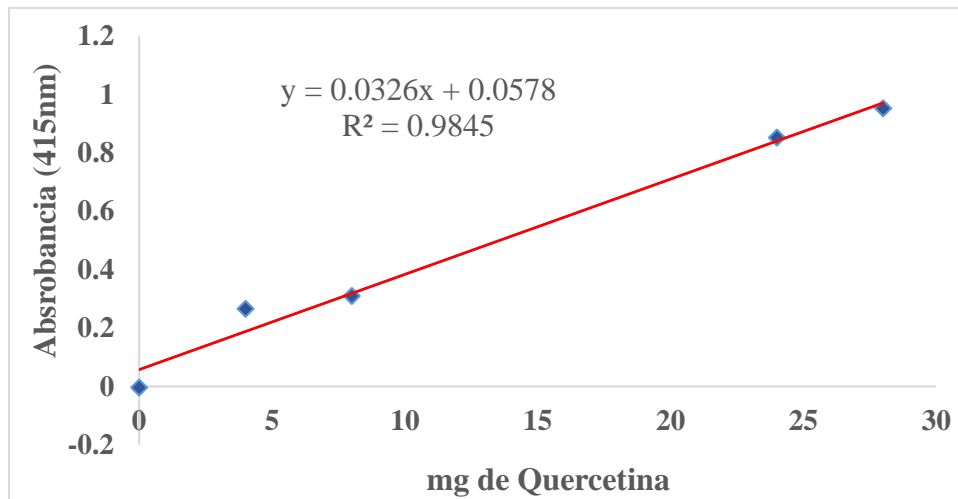
En la Figura 12 se observa la reacción colorimétrica durante la medición de flavonoides totales.



**Figura 12.** Reacción colorimétrica de quercetina a diferentes concentraciones.

### **5.5.2 Preparación de la muestra para medir flavonoides totales**

En un tubo se preparó una disolución de 250 μL del extracto acuoso y 250 μL en metanol al 50%. Se realizaron las dosificaciones de la muestra por triplicado. En la Figura 13 se observa el gráfico obtenido durante la calibración con quercetina para la medición de flavonoides totales.

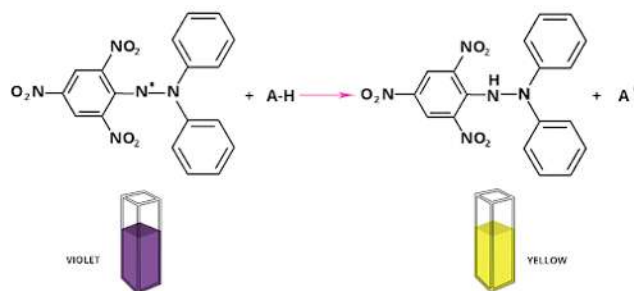


**Figura 13.** Curva de calibración para cuantificación de flavonoides totales.

## 5.6 Actividad antioxidante

### 5.6.1 DPPH

La actividad antioxidante evaluada mediante la técnica de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), demuestra la capacidad del radical libre DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno (H+) proveniente del extracto estudiado. La molécula de DPPH es conocida como un radical libre estable debido a un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual no se dimeriza. La descolonización del electrón intensifica el color violeta intenso típico del radical el cual se absorbe a una longitud de onda de 515 nm cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno. El color violeta se desvanece a un color amarillento (Figura 14), siendo monitoreado espectrofotométricamente y se utiliza en la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes.



**Figura 14.** Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.

### 5.6.2 Determinación de la actividad antioxidante DPPH

La actividad antioxidante total fue evaluada mediante la técnica de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). Esta determinación se realizó utilizando la metodología de (Brand-Williams *et al.*, 1995) a una longitud de onda de 515 nm. El reactivo 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) (Sigma Aldrich) se preparó a una concentración de  $6 \times 10^{-5}$  M utilizando como diluyente al metanol. Una vez preparado el radical, la absorbancia se midió y se ajustó a 760 nm.

Para obtener el porcentaje de inhibición se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = ((A_0 - A_1)A_0) * 100$$

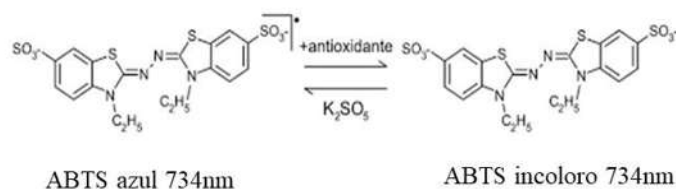
$A_0 = \text{Absorbancia del DPPH}$        $A_1 = \text{Absorbancia del Extracto} + \text{DPPH}$

$A_0 = 0.692 \pm 0.296$

## 5.7 ABTS

Se fundamenta la cuantificación de la decoloración del radical ABTS debido a la interacción con las especies donantes de hidrógeno o de los electrones. El radical catiónico de ABTS es un cromóforo que absorbe a una longitud de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azinobis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio (Figura 15) (Ordoñez-Gómez *et al.*, 2018).

La generación del radical ABTS constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas.



**Figura 15.** Estructura del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante.

### 5.7.1 Determinación de la actividad antioxidante ABTS

La actividad antioxidante total fue también evaluada mediante la técnica de ABTS (2,2'-azinobis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio). Esta determinación se realizó utilizando la metodología de (Brand-Williams *et al.*, 1995) a una longitud de onda de 734 nm. El reactivo 2,2'-azinobis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio (ABTS) (Roche),

se preparó a una concentración de 7mM utilizando como diluyente al etanol. Una vez preparado el radical, la absorbancia se midió y se ajustó a 700 nm.

Para obtener el porcentaje de inhibición se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = ((A0 - A1)A0) * 100$$

$$A0 = \text{Absorbancia del ABTS} \quad A1 = \text{Absorbancia del Extracto + ABTS}$$

$$A0 = 0.700 \pm 0.296$$

### 5.8 Concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>)

La concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) se calcula con la ecuación de la recta, la cual se obtiene de la curva de referencia del patrón analizado (ácido gálico) para el método de decoloración del radical DPPH y ABTS.

El IC<sub>50</sub> se sustituye (y) por 50, y así se calcula la concentración, o mediante un análisis de regresión del porcentaje de captación de DPPH/ABTS o porcentaje de inhibición del radical DPPH/ABTS, versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50% del radical DPPH o ABTS (Brand-Williams *et al.*, 1995)

### 5.9 Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron evaluados usando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey se consideró para todas las variables con un nivel de significancia ( $p < 0.05$ ). Se calcularon los coeficientes de correlación entre las variables de respuesta por la prueba de Pearson. Los análisis se realizaron con el software JMP versión 11. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Extracción por maceración

#### Compuestos fenólicos totales y flavonoides totales

La extracción de los compuestos fenólicos del material vegetal generalmente depende del tipo de compuesto fenólico presente y del solvente usado, incluyendo los métodos, el tipo de extracción, la polaridad del disolvente, la composición química del compuesto a extraer, así como la temperatura, tiempo de contacto, tamaño de partícula y la relación masa: solvente, entre otros (Flores, 2017). El contenido de fenoles totales para el cedrón se muestra en la Figura 16, cuyos resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por mililitro (mgEAG/mL) del extracto. En general, se observó que los extractos con mayor presencia de fenoles totales fueron los obtenidos con etanol y el incremento se vio mayormente influenciado cuando se aplicó la temperatura más alta. Lo anterior indica que es probable que los compuestos fenólicos totales presentes en *Aloysia citriodora* tuvieron una mayor afinidad hacia un solvente menos polar que el agua. La concentración máxima fue de  $3.2 \pm 0.03$  mg de EAG/mL en etanol y para el extracto acuoso fue de  $2.0 \pm 0.02$  mg de EAG/mL. Para el caso de la extracción de flavonoides totales, la tendencia fue similar que la observada cuando se midieron los compuestos fenólicos totales. El resultado se expresó en mg equivalentes quercetina/mL extracto, se obtuvo un valor de  $0.18 \pm 0.001$  mg EQ/mL del extracto acuoso y de  $0.61 \pm 0.002$  mg de EQ/mL del extracto etanólico a una temperatura de 65 °C (Figura 17).

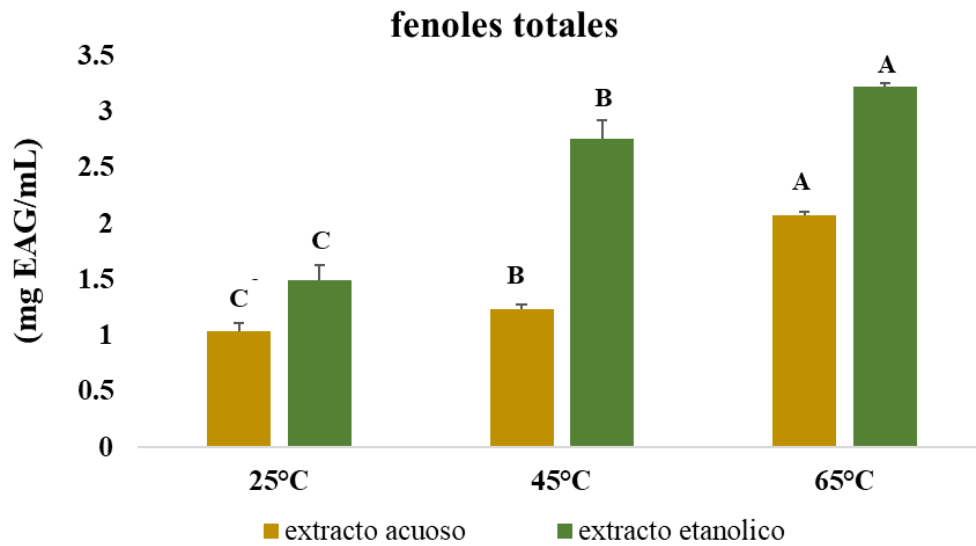
La diferencia de medias indicó un efecto significativo en el tipo de solvente de extracción y los compuestos fenólicos (polifenoles y flavonoides). En cuanto a la temperatura sobre los compuestos fenólicos totales se encontró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las tres temperaturas (25 °, 45 ° y 65 °C) con un valor de ( $p < 0.0001$ ) tanto para el extracto acuoso como para el etanólico. Respecto a los flavonoides totales no se encontró una diferencia significativa entre las temperaturas. Debido a que la temperatura a 65 °C ( $p > 0.930$ ) tendió a comportarse de la misma manera que a 45 °C, pero si diferente en relación a 25 °C ( $p < 0.0013$ ) para el extracto acuoso, en cuanto al extracto etanólico también se encontró diferencia significativa entre las tres temperaturas ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 6). Por lo tanto, los

resultados muestran que hubo una importancia significativa en cuanto a utilizar el tipo de solvente o temperatura ya que los compuestos fenólicos se encuentran presentes en el extracto ya sea en mayor o en menor cantidad, tal como también lo fue reportado por Sanchez-Gonzales *et al.* (2019). Asimismo, Zgórka (2009) y Qu *et al.* (2014), reportaron que la temperatura constituye uno de los principales efectos positivos en el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos en diferentes variedades de vegetales mediante la extracción por solventes. Este hecho está principalmente asociado al incremento de la solubilidad y las velocidades de difusión de los compuestos por efecto de esta variable. Aguado en el 2013 reportó para *Aloysia polystachya* la extracción máxima en etanol para compuestos fenólicos, que fue de  $2.32 \pm 0.16$  mg EAG/ml E, mientras que para los flavonoides fue de  $0.37 \pm 0.01$ mg EQ/ml E. Ramos *et al.*, en 2013 por su parte reportaron para la corteza de *Pinus radiata* un mayor rendimiento del extracto al disminuir la concentración de etanol utilizando una temperatura de 40 °C, mientras que Soto-García & Rosales-Castro en el 2016, reportaron para la corteza de *Pinus durangensis*, usando una concentración de etanol al 80%, una extracción máxima de fenoles totales de 712 mg EAG/g.

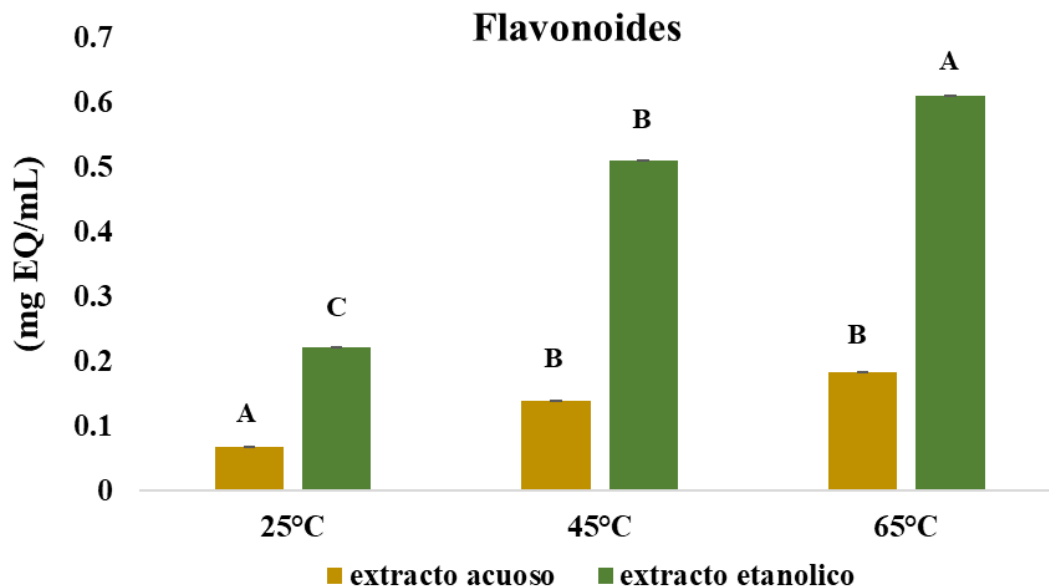
**Tabla 6.** Diferencia de medias de los tipos de solvente de extracción y compuestos fenólicos por el método de maceración.

Compuestos	Temperatura		
	25-65 °C	45-25 °C	65-45 °C
<b>Maceración</b>			
Fenólicos totales			
Extracto acuoso	p<0.0001	p<0.0047	p<0.000
Extracto etanólico	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0093
Flavonoides totales			
Extracto acuoso	p<0.0013	p<0.0142	p<0.0930
Extracto etanólico	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0028

Los datos obtenidos muestran una diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ). N = 3.



**Figura 16.** Determinación de fenoles totales en los extractos obtenidos por maceración utilizando diferentes solventes y temperaturas. \* Las letras diferentes entre temperaturas para el mismo extracto acuoso como en el etanólico indican diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ). N = 3.



**Figura 17.** Determinación de flavonoides en los extractos obtenidos por maceración utilizando diferentes solventes y temperaturas. \* Las letras diferentes entre temperaturas para el mismo extracto acuoso como en el etanólico indican diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ).  $N = 3$ .

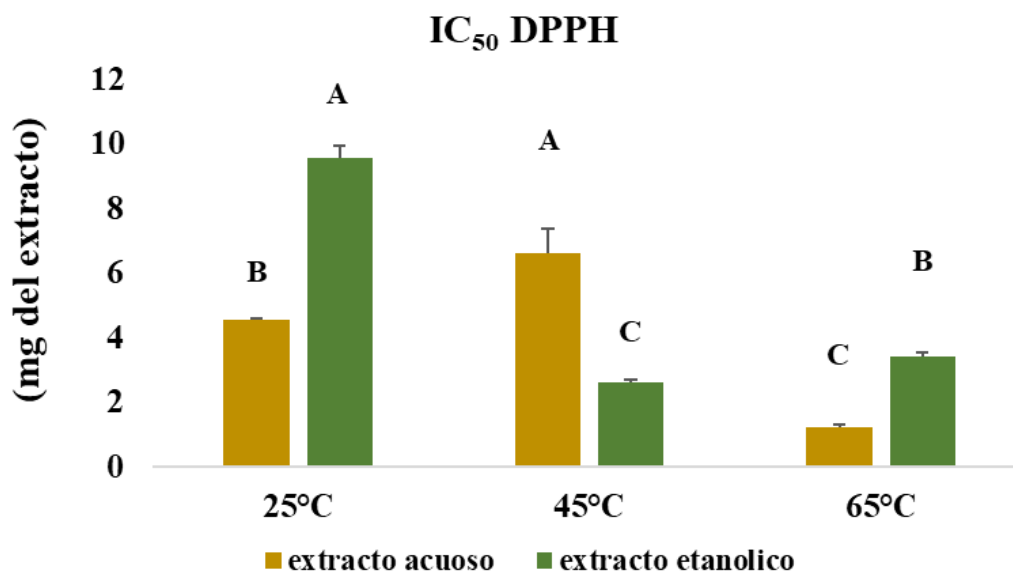
## 6.2 Capacidad antioxidante

### Concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) DPPH y ABTS

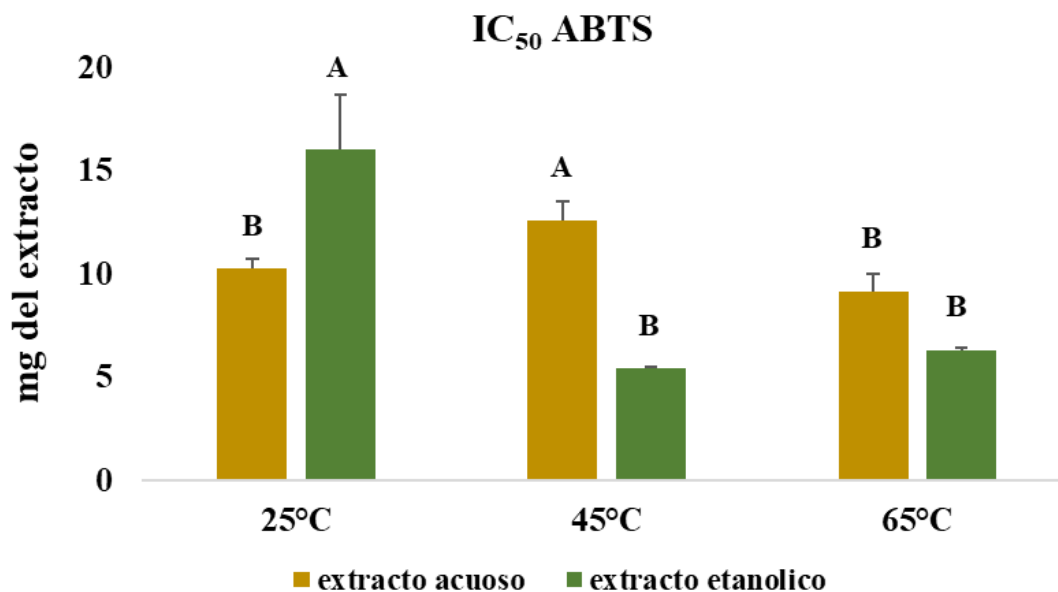
Los compuestos fenólicos poseen una estructura química adecuada para ejercer una acción antioxidante, actuando como atrapadores de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Hernández-Espinosa *et al.*, 2019). La actividad antioxidante fue evaluada con los extractos obtenidos por dos solventes de diferente polaridad (agua y etanol) a diferentes temperaturas y concentración del extracto, la concentración inhibitoria media IC<sub>50</sub> se calcula con la ecuación de la recta, la cual se obtiene de la curva de referencia de cada patrón analizado, se sustituye (y) por 50 y así se calcula la concentración mediante un análisis de regresión del porcentaje de inhibición del radical versus la concentración necesaria de los extractos para inhibir el 50 % del radical DPPH o ABTS. Para cada extracto se evaluó la concentración de la muestra la cual indicó que un valor inferior de IC<sub>50</sub> tiene mayor actividad antioxidante, por lo anterior los extractos analizados con mayor contenido fenólico y a una temperatura de 65 °C resulto ser la de mayor actividad inhibitoria media IC<sub>50</sub> del radical DPPH, ya que alcanzó el 50% de inhibición para el extracto acuoso a los  $1.24 \pm 0.06$  mg equivalentes del extracto, mientras que el extracto etanólico obtuvo una mayor actividad inhibitoria media IC<sub>50</sub> a los 45 °C con  $2.63 \pm 0.76$  mg equivalentes de extracto (Figura 18). La actividad inhibitoria media IC<sub>50</sub> del radical ABTS fue de  $9.15 \pm 0.87$  mg equivalentes del extracto para el extracto acuoso a 65 °C y para el extracto etanólico obtuvo una mejor actividad a los 45 °C con  $5.45 \pm 0.05$  mg equivalentes del extracto (Figura 19). Dicha actividad biológica se les atribuye a los compuestos fenólicos obtenidos en la fracción del disolvente y a los radicales ABTS y DPPH, que son de los más aplicados al considerarse métodos de elevada sensibilidad, prácticos, rápidos y muestran una estabilidad en ciertas condiciones, pero también diferencias (Salinas-Flores *et al.*, 2019). El DPPH por su parte mide la actividad de los compuestos polares

hidrofílicos, mientras que el ABTS puede disolverse en medios hidrofílicos y lipofílicos, cuyos efectos combinados determinan la concentración de la capacidad antioxidante y estos a su vez podrían constituir una opción válida para el tratamiento de enfermedades (Kuskoski *et al.*, 2005, Ordoñez-Gómez *et al.*, 2018, Mesa-Venegas *et al.*, 2015).

La diferencia de medias indica un efecto significativo en cuanto a la concentración inhibitoria media  $IC_{50}$  DPPH y el tipo de solvente de extracción. En cuanto a la temperatura sobre los mg del extracto que se requieren para obtener el 50 % de inhibición se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las tres temperaturas ( $25^{\circ}$ ,  $45^{\circ}$  y  $65^{\circ}C$ ), la temperatura a  $65^{\circ}C$  ( $p > 0.0001$ ) fue la que obtuvo una mayor diferencia, en cuanto a la temperatura a  $45^{\circ}C$  también se encontró una diferencia significativa respecto a la temperatura a  $25^{\circ}C$  ( $p < 0.0030$ ) para el extracto acuoso y para el extracto etanólico se encontró diferencia significativa entre las tres temperaturas las cuales se comportan de diferente manera. Respecto a la concentración inhibitoria media  $IC_{50}$  ABTS no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la temperatura, debido a que la temperatura a  $25^{\circ}C$  tendió a comportarse de la misma manera que a  $65^{\circ}C$  ( $p < 0.2813$ ) pero si diferente que a  $45^{\circ}C$  ( $p < 0.0045$ ) para el extracto acuoso, en cuanto al extracto etanólico las temperaturas a  $45$  y  $65^{\circ}C$  tendieron a comportarse de la misma manera ( $p < 0.7919$ ) pero si diferentes respecto a  $25^{\circ}C$  ( $p < 0.0004$ ) (Tabla 7). Cabe resaltar, aunque no haya una diferencia significativa entre temperaturas se utilizaría el solvente en el cual se requiere de menor cantidad de mg del extracto para alcanzar el 50 % de inhibición en este caso la temperatura más alta que fue a  $65^{\circ}C$ . Se ha indicado que ambas técnicas son adecuadas para medir la actividad antioxidante de algunos vegetales o frutos, los cuales tiene diferentes tipos de material y tienen diferente reactividad frente a los dos métodos, debido a que ambas técnicas, basan su método en reacciones de tipo redox. (Palomino *et al.*, 2009, Aguado *et al.*, 2013).



**Figura 18.** Determinación de la concentración inhibitoria media IC<sub>50</sub> DPPH de los extractos obtenidos por maceración utilizando diferentes solventes y temperatura. \* Las letras diferentes entre temperaturas para el mismo extracto acuoso como en el etanólico indican diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ). N = 3.



**Figura 19.** Determinación de la concentración inhibitoria media IC<sub>50</sub> ABTS de los extractos obtenidos por maceración utilizando diferentes solventes y temperaturas. \* Las letras diferentes entre temperaturas para el mismo extracto acuoso como en el etanólico indican diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ). N = 3.

**Tabla 7.** Diferencia de medias de los tipos de solvente con relación a la actividad inhibitoria media IC<sub>50</sub> DPPH y ABTS por el método de maceración.

Compuestos	Temperatura		
	25-65 °C	45-25 °C	65-45 °C
<b>Maceración</b>			
<b>DPPH</b>			
Extracto acuoso	p<0.0002	p<0.0030	p<0.0001
Extracto etanólico	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0211
<b>ABTS</b>			
Extracto acuoso	p<0.2813	p<0.0267	p<0.0045

Extracto etanólico	p<0.0006	p<0.0004	p<0.7919
--------------------	----------	----------	----------

Los datos obtenidos muestran una diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ). N = 3.

### **Correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante DPPH y ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales por el método de maceración**

La variación en el contenido de compuestos fenólicos en el cedrón constituye un grupo de compuestos que desempeñan una importante función. Por lo que presentan un amplio rango de actividad biológica como antioxidantes. El coeficiente de correlación de Pearson evidencia que existe una correlación ( $p < 0.05$ ) entre las dos variables de respuesta para este estudio. El valor para la relación de las pendientes DPPH/ fenoles totales y ABTS/fenoles totales encontradas para el extracto acuoso el DPPH respecto a fenoles totales obtuvo un valor de ( $r = -0.82$ ) y el ABTS ( $r = -0.53$ ) mismo extracto, ambos valores muestran una correlación negativa con un efecto grande para el DPPH y el ABTS con un efecto medio, mientras que para el extracto etanólico la correlación respecto al DPPH fue de ( $r = -0.92$ ) y para el ABTS ( $r = -0.92$ ) los cuales tuvieron un efecto de correlación negativo grande. En cuanto a la correlación de DPPH/flavonoides y ABTS/flavonoides para el extracto acuoso obtuvo una mejor correlación para el DPPH ( $r = -0.45$ ) la cual obtuvo un efecto de correlación negativa bajo, mientras que para el ABTS fue de ( $r = -0.16$ ) con un valor de correlación negativa casi nulo, a diferencia del extracto etanólico para el DPPH ( $r = -0.93$ ) y ABTS ( $r = -0.91$ ) obtuvieron una correlación con un efecto negativo grande. De acuerdo con los resultados la actividad antioxidante muestra una correlación fuerte negativa debido a que, al obtener una mayor capacidad antioxidante, se requiere de menor cantidad de compuestos fenólicos para alcanzar el 50 % de inhibición. Esta actividad antioxidante se le atribuye en parte a la relación y presencia de fenoles totales, cuya estructura química es especialmente adecuada para actuar como atrapadores de radicales libres y donadores de hidrogeno o electrones (Tabla 8) (Aguado *et al.*, 2013).

**Tabla 8.** Análisis de correlación de Pearson entre los parámetros de la concentración inhibitoria media IC<sub>50</sub> de los parámetros DPPH y ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales.

<b>Correlación</b>	<b>Valor de (r)</b>
Capacidad inhibitoria media IC <sub>50</sub> DPPH/ fenoles totales acuosos	<b>-0.82</b>
Capacidad inhibitoria media IC <sub>50</sub> DPPH/ fenoles totales etanólico	<b>-0.92</b>
Capacidad inhibitoria media IC <sub>50</sub> ABTS/ fenoles totales acuosos	<b>-0.53</b>
Capacidad inhibitoria media IC <sub>50</sub> ABTS/ fenoles totales etanólico	<b>-0.92</b>
Capacidad inhibitoria media IC <sub>50</sub> DPPH/ flavonoides acuosos	<b>-0.43</b>
Capacidad inhibitoria media IC <sub>50</sub> DPPH/ flavonoides etanólico	<b>-0.93</b>
Capacidad inhibitoria media IC <sub>50</sub> ABTS/ flavonoides acuosos	<b>-0.16</b>
Capacidad inhibitoria media IC <sub>50</sub> ABTS/ flavonoides etanólico	<b>-0.91</b>

r: Coeficiente de correlación de Pearson nivel de significancia p<0.05

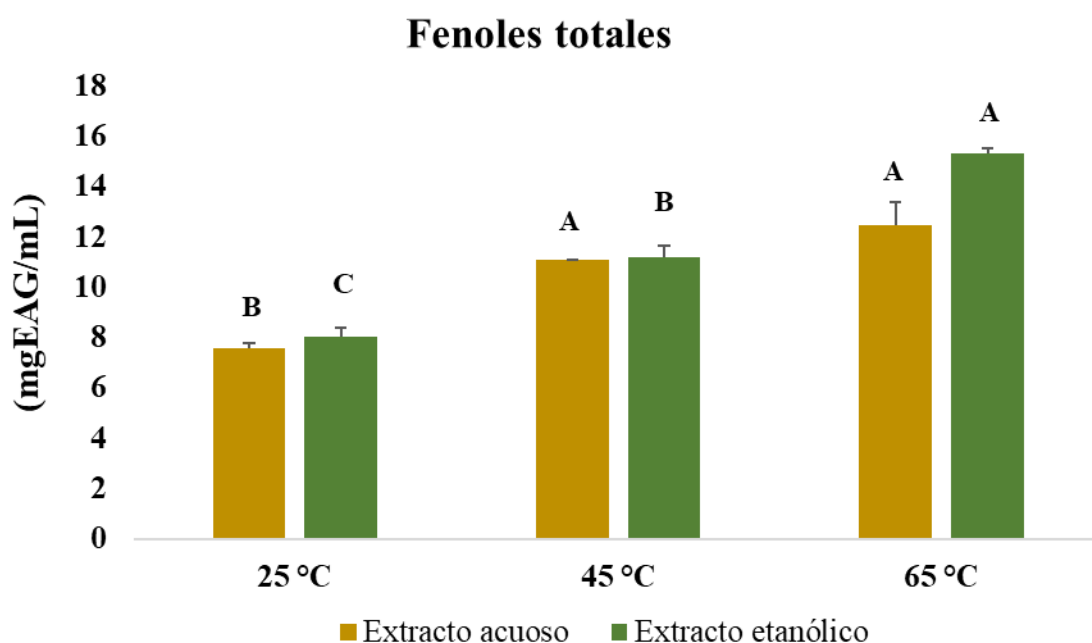
### 6.3 Extracción asistida por ultrasonido

#### Compuestos fenólicos totales y flavonoides totales

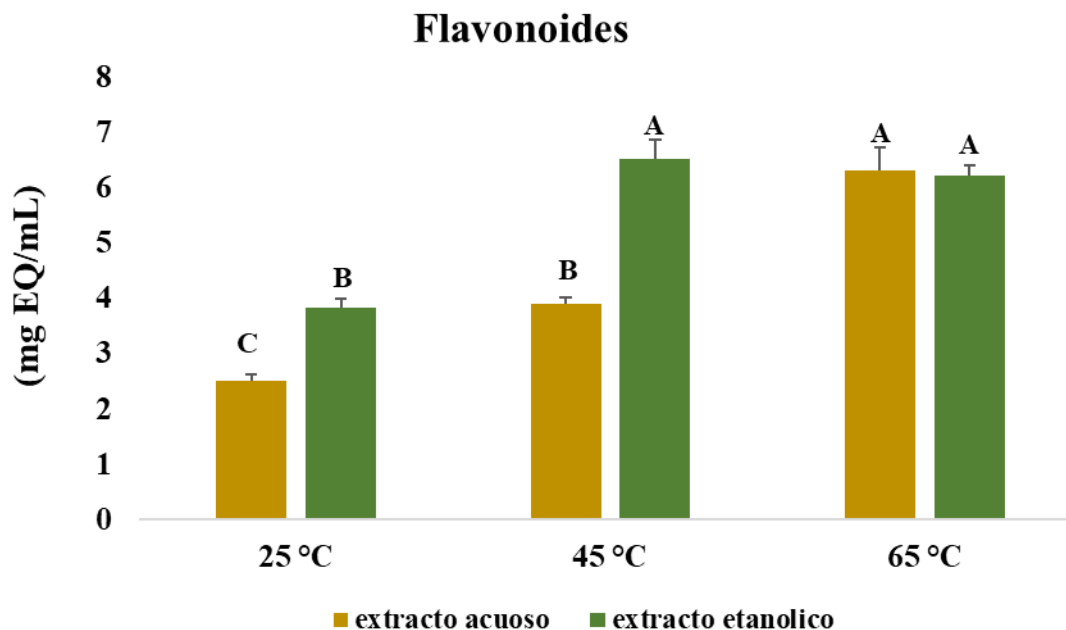
Los análisis evaluados para la cuantificación de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu para el cedrón muestran la importancia del contenido de dichos compuestos, cuyos resultados se expresan en miligramos equivalentes de ácido gálico por mililitro (mg EAG/mL) del extracto y como variable la temperatura a una amplitud constante del 30%, durante 20 min. Obteniendo como máxima cantidad de fenoles  $15.3 \pm 0.18$  mg EAG/mL del extracto etanólico a una temperatura de  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 20), mientras que para los flavonoides el resultado se expresó en miligramos equivalentes de quercetina por mililitro (mg EQ/mL) del extracto, el cual obtuvo un valor de  $6.5 \pm 0.34$  mg EQ/mL para el extracto etanólico a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 21). Los resultados muestran que el empleo del ultrasonido para recuperar los componentes fenólicos, tiene ciertos beneficios en términos de penetración del disolvente, incluyendo la intensificación de transferencia de masa, el colapso de las burbujas formadas por la cavitación cerca de las paredes celulares, la tasa de extracción, el rendimiento y la combinación de variables como la intensidad, el tiempo y el solvente podrían dar composiciones distintas en los extractos ya que la solubilidad de cada compuesto fenólico en un disolvente dado es diferente (Álvarez-Gómez *et al.*, 2016).

Esto explica que los compuestos fenólicos con características más hidrofóbicas se pueden producir en menor cantidad que aquellas con características más hidrofílicas. Por lo que el etanol como solvente con un tiempo de extracción corto y una temperatura alta, tiene un efecto significativo con un valor de ( $p < 0.0001$ ) entre las tres temperaturas ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), en cuanto a la extracción por el método acuoso no se encontró diferencia significativa entre las temperaturas debido a que la temperatura a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $p > 0.0501$ ) tendió a comportarse de la misma manera que a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pero si diferente con relación a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0.0001$ ). Respecto al contenido de flavonoides totales para el extracto etanólico tampoco se encontró diferencias significativas entre las temperaturas, por lo que la temperatura a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  se comportó de la misma manera que a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $p > 0.3562$ ) pero diferente de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0.0001$ ). En cuanto al extracto acuoso se encontraron diferencias significativas para las tres temperaturas ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 9) (Rodríguez-Chanfrau & López-Armas, 2014, Rojas *et al.*, 2019). En los estudios basados en la técnica de extracción por ultrasonido Torres-

Valenzuela *et al.*, en 2020 encontró para la pitahaya amarilla el rendimiento máximo para fenoles totales fue a los 22.5 min con una potencia máxima del 60% y un valor máximo de 973.10 mg/L. Rojas *et al.*, en 2019 reportó para la cáscara de sanky que la mejor eficiencia en cuanto a solvente fue con etanol al 50% con un tiempo de extracción a los 40 min y una temperatura de 25 °C y un valor máximo de polifenoles totales a 43.9 mg GAL/g. Benavides-Guerrero en 2020 encontró para la especie de papa *Solanum phureja* el mayor contenido de compuestos fenólicos totales a los 50 °C con un tiempo de 50 min y una potencia de 37 kHz con un valor de 931.37 mg AGE/100 g. Los resultados de los diferentes estudios muestran que la concentración de fenoles totales varía dependiendo del tipo de planta o fruto que se utilice, así como el estado de madurez de la misma, el tipo de solvente, entre otros factores. A pesar de que el método ultrasónico es muy novedoso y fácil de utilizar hacen falta más estudios sobre la extracción de compuestos fenólicos respecto a *Aloysia citriodora*.



**Figura 20.** Determinación de fenoles totales en los extractos obtenidos por procesamiento ultrasónico utilizando diferentes solventes y temperaturas. \* Las letras diferentes en cada temperatura tanto del extracto acuoso como en el etanólico indican diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ). N = 3.



**Figura 21.** Determinación de flavonoides en los extractos obtenidos por procesamiento ultrasónico utilizando diferentes solventes y temperaturas. \* Las letras diferentes en cada temperatura del extracto acuoso como en el etanólico indican diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ). N = 3.

**Tabla 9.** Diferencia de medias de los tipos de solvente de extracción y compuestos fenólicos por dos métodos

Compuestos	Temperatura		
	25-65 °C	45-25 °C	65-45 °C
<b>Ultrasonido</b>			
Fenólicos totales			
Extracto acuoso	$p < 0.0001$	$p < 0.0005$	$p < 0.0501$
Extracto etanólico	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$
Flavonoides totales			
Extracto acuoso	$p < 0.0001$	$p < 0.0016$	$p < 0.0001$

Extracto etanólico	p<0.0001	p<0.0001	p<0.3562
--------------------	----------	----------	----------

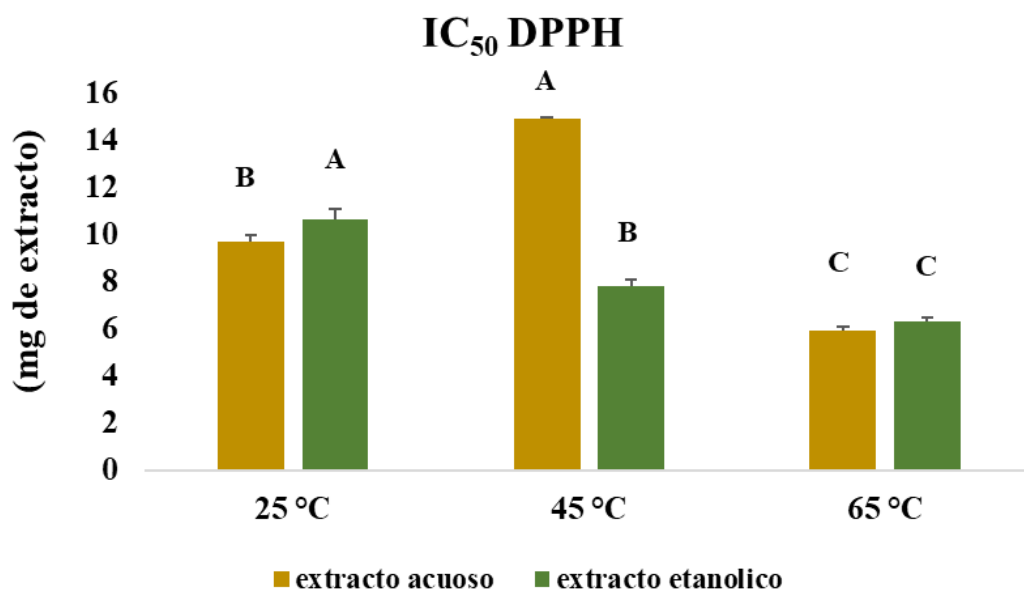
Los datos obtenidos muestran una diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ). N = 3.

### 6.3.1 Capacidad Antioxidante

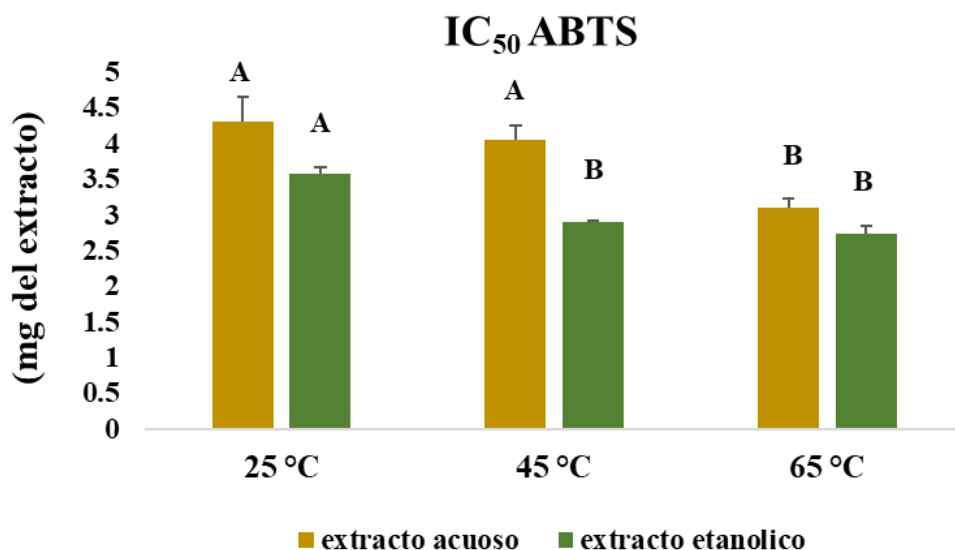
#### Concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) DPPH y ABTS

Como ya se ha mencionado los compuestos fenólicos poseen una estructura química adecuada para ejercer una acción antioxidante se le atribuye a su capacidad para eliminar radicales libres y para quelar iones que intervienen en su producción, actuando como atrapadores de especies reactivas (ROS). El poder antioxidante del extracto puede expresarse en función a la capacidad inhibitoria media IC<sub>50</sub> de DPPH y ABTS de no ser así las concentraciones del extracto se consideran poco fiables para hacer comparaciones entre extractos. Es por eso que para evitar estas situaciones se recomienda estimar la capacidad antioxidante con la inhibición media IC<sub>50</sub> que representa la concentración del extracto en la cual se obtiene el 50 % de reducción del DPPH y ABTS (García-Cruz *et al.*, 2012). Se observó que los valores están relacionados con el contenido de fenoles totales, tomados en conjunto ( $P < 0.024$ ). En la Figura 22 se muestra el IC<sub>50</sub> del radical DPPH en función de la variable temperatura. Se obtuvo el mejor valor a la temperatura de 65 °C con una IC<sub>50</sub> de  $5.94 \pm 0.16$  mg equivalentes del extracto para el extracto acuoso y  $6.29 \pm 0.20$  mg equivalentes del extracto etanólico a la misma temperatura, mientras que para la IC<sub>50</sub> del radical ABTS, a temperatura de 65 °C fue de  $3.09 \pm 0.12$  mg equivalentes del extracto para el extracto acuoso y para el extracto etanólico misma temperatura fue de  $2.74 \pm 0.10$  mg equivalentes del extracto (Figura 23). Los resultados muestran que el método de procesamiento ultrasónico en comparación con la extracción convencional necesita de menos mg de extracto para poder alcanzar el 50% de inhibición IC<sub>50</sub>, debido a que la extracción asistida por ultrasonido tiene una mejora en la tasa de extracción de compuestos fenólicos y rendimiento lo cual podría usarse como una alternativa eficiente para obtener compuestos fenólicos con capacidad antioxidante alta (Corona-Jiménez *et al.*, 2016).

La diferencia de medias indica un efecto significativo en cuanto a la concentración inhibitoria media  $IC_{50}$  DPPH y el tipo de solvente de extracción. En cuanto a la temperatura sobre los mg del extracto que se requieren para obtener el 50 % de inhibición no se encontró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las tres temperaturas (25°, 45° y 65°C), tanto para el extracto acuoso como para el extracto etanólico. Respecto a la concentración inhibitoria media  $IC_{50}$  ABTS no se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas para ambos métodos de extracción (Tabla 10). Los resultados muestran que hubo una importancia significativa en cuanto a utilizar el tipo de solvente y diferentes temperaturas. Teniendo en cuenta que cada técnica tiene diferentes condiciones de reacción y solubilidad, es posible inferir que los extractos contienen diversos compuestos con potencial antioxidante (Brighente *et al.*, 2007).



**Figura 22.** Determinación de la capacidad inhibitoria media  $IC_{50}$  DPPH de los extractos obtenidos por procesamiento ultrasónico utilizando diferentes solventes y temperaturas. \* Las letras diferentes en cada temperatura tanto del extracto acuoso como en el etanólico indican diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ). N = 3.



**Figura 23.** Determinación de la capacidad inhibitoria media IC<sub>50</sub> ABTS de los extractos obtenidos por procesamiento ultrasónico utilizando diferentes solventes y temperaturas. \* Las letras diferentes en cada temperatura tanto del extracto acuoso como en el etanólico indican diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ). N = 3.

**Tabla 10.** Diferencia de medias de los tipos de solvente con relación a la actividad inhibitoria media IC<sub>50</sub> DPPH y ABTS por el método de procesamiento ultrasónico.

Compuestos	Temperatura		
	25-65 °C	45-25 °C	65-45 °C
<b>Ultrasonido</b>			
<b>DPPH</b>			
Extracto acuoso	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001
Extracto etanólico	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0026
<b>ABTS</b>			
Extracto acuoso	p<0.0021	p<0.4489	p<0.0068
Extracto etanólico	p<0.0001	p<0.0001	p<0.1265

Los datos obtenidos muestran una diferencia significativa analizada mediante prueba estadística Tukey ( $p < 0.05$ ).  $N = 3$ .

### **Correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante DPPH y ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales por el método de ultrasonido**

El cedrón contiene una amplia variedad de compuestos fenólicos principalmente flavonoides. La variación en el contenido de flavonoides en el cedrón se le puede atribuir principalmente al estado de madurez en la planta. Se ha sugerido que el contenido de dichos compuestos juega un papel preventivo importante en el desarrollo de enfermedades, los cuales tienen propiedades curativas y pueden actuar como antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos entre otros. El análisis de correlación de Pearson evidencia que existe una correlación ( $p < 0.05$ ) entre las dos variables de respuesta por el método de ultrasónico para este estudio. El valor que se obtuvo en la relación DPPH/fenoles totales y ABTS/fenoles totales para el extracto acuoso el DPPH obtuvo un valor de ( $r = -0.17$ ), mientras que el valor para el ABTS extracto acuoso fue ( $r = -0.75$ ), ambos valores muestran una correlación negativa con un efecto casi nulo para el DPPH y el ABTS con un efecto bueno, mientras que para el extracto etanólico la correlación respecto al DPPH fue de ( $r = -0.95$ ) y para el ABTS una ( $r = -0.90$ ), los cuales obtuvieron un efecto negativo fuerte. En cuanto a la correlación de los radicales DPPH/flavonoides y ABTS/flavonoides, para el extracto acuoso el resultado del DPPH fue de ( $r = -0.54$ ) con un efecto medio mientras que para el ABTS ( $r = 0.90$ ) obtuvo un efecto negativo fuerte, respecto al extracto etanólico el DPPH fue de ( $r = -0.89$ ) y el ABTS ( $r = -0.94$ ), ambas técnicas para el estrato etanólico tuvieron un efecto negativo fuerte (Tabla 11). Las correlaciones no son completamente lineales ya que los métodos para la extracción de fenoles son más específicos y en cuanto a la actividad antioxidante también puede ser exhibida por compuestos no fenólicos. Además, es posible que se presenten interacciones entre otros compuestos fenólicos o metabolitos que puedan afectar la actividad (Álvarez-Gómez *et al.*, 2016).

Los resultados muestran para todos los extractos, valores mayores en la técnica de ABTS con respecto a la técnica de DPPH, debido a que hay una baja selectividad del radical ABTS el cual reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado, independientemente de su potencial antioxidante real. Por otro lado, si la capacidad antioxidante de los extractos se debe a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y otros polifenoles como se reporta en la literatura. Se debe tener en cuenta que el DPPH es más selectivo que el ABTS y a diferencia de este último no reacciona con los flavonoides carentes de grupos hidroxilo en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo. Este hecho explica los valores inferiores en la relación por el método DPPH con respecto al ABTS (Roginsky & Lissi, 2005).

**Tabla 11.** Análisis de correlación de Pearson entre los parámetros de la concentración inhibitoria media  $IC_{50}$  de los parámetros de DPPH y ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales.

<b>Correlación</b>	<b>Valor de (r)</b>
Capacidad inhibitoria media $IC_{50}$ DPPH/ fenoles totales acuosos	<b>-0.17</b>
Capacidad inhibitoria media $IC_{50}$ DPPH/ fenoles totales etanólico	<b>-0.95</b>
Capacidad inhibitoria media $IC_{50}$ ABTS/ fenoles totales acuosos	<b>-0.75</b>
Capacidad inhibitoria media $IC_{50}$ ABTS/ fenoles totales etanólico	<b>-0.90</b>
Capacidad inhibitoria media $IC_{50}$ DPPH/ flavonoides acuosos	<b>-0.54</b>
Capacidad inhibitoria media $IC_{50}$ DPPH/ flavonoides etanólico	<b>-0.89</b>
Capacidad inhibitoria media $IC_{50}$ ABTS/ flavonoides acuosos	<b>-0.90</b>
Capacidad inhibitoria media $IC_{50}$ ABTS/ flavonoides etanólico	<b>-0.94</b>

r: Coeficiente de correlación de Pearson nivel de significancia  $p < 0.05$

## 7. Conclusiones

En el presente estudio se evaluaron los procesos de extracción de los compuestos fenólicos totales y flavonoides totales y la actividad antioxidante de las hojas de *A. citriodora* por la aplicación de los métodos de maceración y ultrasonido.

Se estableció que el extracto etanólico de las hojas de *A. citriodora* por el método de procesamiento ultrasónico exhibieron un mayor contenido de fenoles totales los cuales podrían estar relacionados con la capacidad antioxidante de los mismos. Los rendimientos más elevados para estos compuestos se mostraron a la temperatura de 65 °C tanto en el proceso por maceración como por el de ultrasonido.

En general las hojas de *A. citriodora* con actividad antioxidante, también exhibieron la mejor capacidad inhibitoria media IC<sub>50</sub> de los radicales para el DPPH a los 65°C extracto acuoso con 1.24 ± 0.06 mg equivalentes de extracto por maceración y por el método ultrasónico obtuvo una mejor capacidad de inhibición IC<sub>50</sub> con el ABTS del extracto etanólico con 2.74 ± 0.10 mg equivalentes del extracto.

En cuanto a la diferencia de medias los resultados mostraron que hubo una importancia significativa en cuanto a utilizar el tipo de solvente o la temperatura para la extracción de fenoles totales y flavonoides en cuanto a las técnicas para inhibir el 50 % de la capacidad antioxidante DPPH y ABTS no se encontraron diferencias significativas.

Se encontró una buena correlación entre las técnicas de la capacidad inhibitoria media IC<sub>50</sub> DPPH y ABTS y el contenido de fenoles totales de los extractos.

Los procesos por extracción de ultrasonido permitieron obtener rendimientos más altos, rápidos y en poco tiempo a diferencia de los métodos convencionales que requieren un mayor tiempo y gasto energético para la extracción de fenoles y flavonoides totales.

Los resultados del trabajo contribuirían a ampliar conocimiento científico de los extractos de la especie *A. citriodora*. Sin embargo, es necesario profundizar el estudio de la composición química de los mismos y su relación con la actividad antioxidante por otras metodologías.

## 8. Bibliografía

- Aguado, M. I., Nuñez M. B., Bela A. J., Okulik, N. B., Bregni, C. (2013). Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold. (Verbenaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 44, 46-51.
- Alvarez-Gómez, F., Korbee, N., & Figueroa, F. L. (2016). Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Ciencias Marinas*, 42(4), 271-288.
- Álvarez-Rosales, J. D., Gaytán-Mares, D.L., Sosa-Morales, M.E., Baltazar-Vera, J.C., Cerón-García, A. (2019). Estimación de biocomponentes, color y pH en extractos etanólicos de tallos y hojas de cedrón (*Aloysia citrodora*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 4, 352-358.
- Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*. 135(3), 1708-1717. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.096>
- Barros, A. I., Nunes, F. M., Goncalves, B., Bennett, R. N., & Silva, A. P. (2011). Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry*. 128(1), 165-172. doi:[10.1016/j.foodchem.2011.03.013](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.013)
- Benavides-Guerrero, R., Revelo-Cuarán., Y.A., Arango-Bedoya, O., Osorio-Mora, O., (2020). Extracción asistida con ultrasonido de compuestos fenólicos de dos variedades de papas (*Solanum phureja*) nativas andinas y evaluación de su actividad antioxidante. *Información Tecnológica*. 31, 43-50.
- Botta, S. (1979). Las especies argentinas del género *Aloysia* (Verbenaceae). *Darwiniana*, 22(1/3), 67-108.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 28(1), 25-30. doi:[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

- Brighente, I. M. C., Dias, M., Verdi, L. G., & Pizzolatti, M. G. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*. 45(2), 156-161. doi:<https://doi.org/10.1080/13880200601113131>
- Burton, G. W., & Traber, M. G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Reviews Nutrition*. 10, 357-382. doi:10.1146/annurev.nu.10.070190.002041
- Cabrera-Soto, M., Salinas-Moreno, Y., Velázquez-Cardelas, G., & Espinosa-Trujillo, E. (2009). Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas. *Agrociencia*. 43, 827-839.
- Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B., & Aguilar, L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 30(1), 55-73. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90017-N](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90017-N)
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 51, 15-25. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Carvajal-Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medicina Legal de Costa Rica*. 36, 91-100.
- Castillejo, N., Martínez-Hernández, G. B., Gómez, P. A., Aguayo, E., & ArtésHernández, F. (2018). Phenolic and antioxidant compounds changes of algae based smoothies during shelf life. 6th Workshop on Agri-food Research-WiA.17. Primera edición, pp. 24-25.
- Cheurfa, M., Allem, R. (2016). Evaluation of antioxidant activity of different extracts of *Aloysia triphylla* leaves (L'Herit.) from Algeria in vitro. *Phytothérapie*. 14(3), 181-187. doi:10.1007/s10298-015-0969-4
- Curifuta, M., Vidal, J., Sánchez-Venegas, J., Contreras, A., Salazar, L. A., & Alvear, M. (2012). The in vitro antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis

- against six fungi of agricultural importance. *Ciencia e Investigación Agraria*. 39(2), 347-359. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202012000200011>
- Corona-Jiménez, E. Martínez.-Navarrete, N., Ruiz-Espinosa, H., Carranza-Concha, J. (2016). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chia (*Salvia hispanica* L.) y su actividad antioxidante. *Agrociencia*. 50, 403-412.
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*. 42(2), 206-212.
- Corrales, L. C., & Muñoz, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Revista Nova*. 10(18), 213-225. doi:<https://doi.org/10.22490/24629448.1010>
- Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20(4), 1076-1080. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(10), 3010-3014. doi:doi: 10.1021 / jf0115589.
- Di Leo-Lira, P., van Baren, C. M., Retta, D., Bandoni, A. L., Gil, A., Gattuso, M., & Gattuso, S. (2016). Characterization of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau) from Argentina by the essential oil. *Journal of Essential Oil Research*. 20(4), 350-353. doi:<https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9700028>
- Estrada, E., Soto, B., M., G., Villareal, J., Jiménez, J., & M., P. (2013). Plantas útiles en el centro-sur del estado de Nuevo León. *Botanical Sciences*. 91(4), 537-538.
- Flores, E. (2017). Extracción de Antioxidantes de las Bayas del Sauco (*Sambucus nigra* L. subsp. peruviana) con ultrasonido, microondas, enzimas y maceración para la

obtención de zumos funcionales. *Información Tecnológica*, 28(1), 121-132.  
doi:10.4067/s0718-07642017000100012

Ganoza-Yupanqui, M., Cotilla, N., Velásquez, S., & Polo, M. (2015). Compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de extractos de especies vegetales de Cachicadán, la Libertad-Peru. *Revista Perspectiva*. 16, 203-308.

García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., & Valle-Guadarrama, S. (2012). Betalaínas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* H.). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35, 01-05.

García-Perez, M. E., Alfonso-Castillo, A., Lores, O. F., Batista-Duarte, A., & Lemus-Rodríguez, Z. (2018). Toxicological evaluation of an aqueous suspension from leaves and stems of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 211, 29-37. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.022>

Halliwell, B. (2013). The antioxidant paradox: less paradoxical now?. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 75(3), 637-644. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x>

Hashemi, S. M. B., Mousavi Khaneghah, A., Koubaa, M., Barba, F. J., Abedi, E., Niakousari, M., & Tavakoli, J. (2018). Extraction of essential oil from *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties. *Process Biochemistry*. 65, 197-204. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.020>

Hernández-Espinosa, D. R., Barrera Morín, V., Briz Tena, O., González Herrera, E. A., Laguna Maldonado, K. D., Jardínez Díaz, A. S., Matuz Mares, D. (2019). El papel de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. 62, 6-19.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*. 25, 726-732.

- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757-772. doi: <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Mesa-Vanegas, A. M., Zapata-Uribe, S., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalve, Z., & Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1), 1-10.
- Ordoñez-Gómez, E. S., Reátegui-Díaz, D., & Villanueva-Tiburcio, J. E. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Scientia Agropecuaria*, 9, 113-121 doi:<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.13>
- Palomino, L. R., García, C. M., Gil, G. Jesús, H., Rojano, B. A., & Durango, D. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3), 388-395.
- Phaniendra, A., Jestadi, D., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26. doi: 10.1007 / s12291-014-0446-0
- Qu, W., Shi, S., Li, P., Pan, Z., & Venkitasamy, C. (2014). Extraction kinetics and properties of proanthocyanidins from pomegranate peel. *International Journal of Food Engineering*, 10(4), 683-695. doi: 10.1515/ijfe-2014-0034
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Ramos, V., Bocalandro, C., Riquelme, S., Sanhueza, V., Aspé, E., Roeckel, M., & Fernández, K. (2013). Effect of the bench scale extraction conditions on *Pinus radiata* bark extract yield, antioxidant properties and composition. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 15(1), 31-44. doi 10.4067/S0718-221X2013005000003

- Ricco, R.A., Wagner, M.L., Gurni, A.Á. (2011). Dinámica de polifenoles de “Cedrón” (*Aloysia citrodora* Palau Verbenaceae) en relación al desarrollo foliar. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 10(1), 67-74.
- Ríos-Reyes, Á., Alanís-Flores, G., & Favela-Lara, S. (2017). Etnobotánica de los recursos vegetales, sus formas de uso y manejo, en Bustamante, Nuevo León. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 8(44), 89-111.
- Rodríguez-Chanfrau, J. E., & López-Armas, M. (2014). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from *Punica granatum* (Grenada) fruit. Revista Cubana de Farmacia. 48(2), 469-476.
- Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry. 92(2), 235-254. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>.
- Rojas, J., Palacios, O., & Ronceros, S. (2012). Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* britton (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 29(1), 61-68.
- Rojas, T., Fuentes-Campos, M. E., Contreras-López, E., Gómez, S., & Muñoz, A. M. (2019). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (*Corryocactus brevistylus*). Revista de la Sociedad Química del Perú. 85(2), 258-267.
- Salinas-Flores, A., Guevara-Aguilar, A., Natividad-Torres, E., Baeza-Jiménez, R., & Buenrostro Figueroa, J. (2019). Effect of the extraction conditions on the antioxidant capacity of phenolic compounds from pomegranate shell. Mexican Journal of Biotechnology. 4(2), 33-46. doi:[10.29267/mxjb.2019.4.2.33](https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.2.33)
- Sanchez-Gonzales, G., Castro-Rumiche, C., Alvarez-Guzman, G., Flores-García, J., & Barriga-Sánchez, M. (2019). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos de la hoja de chirimoya (*Annona cherimola* Mill). Revista Colombiana de Química. 48, 21-26.
- Santhakumar, A., Battino, M., & Alvarez-Suarez, J. (2018). Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. Food and Chemical Toxicology. 113, 49-65. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.022>

- Sierra-Sarmiento, M., Barros-Algarra, R., Gómez-Paternina, D., Mejía-Terán, A., & Suarez-Rivero, D. (2018). Productos Naturales: Metabolitos Secundarios y Aceites Esenciales. Flavonoides e Identificación. Fundación Universitaria Agraria de Colombia. Ed.1 (pp.56).
- Soto-García, M., & Rosales-Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. Maderas. Ciencia y Tecnología. 18(4), 701-714.
- Taga, M. S., Miller, E. E., & Pratt, D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. Journal of the American Oil Chemists Society, 61(5), 928-931. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02542169>
- Torres-Valenzuela, L., Serna-Jiménez, J., Pinto, V., & Vargas, D. (2020). Evaluación de condiciones de extracción asistida por ultrasonido de compuestos bioactivos de cáscara de pitahaya amarilla. Revista Lasallista de Investigación. 17(1), 70-83. doi:10.22507/rli.v17n1a6
- Vargas-Corrales, V. (2012). Elaboración de té aromático a base de cedrón (*Aloysia citrodora*) y toronjil (*Mellisa officinalis*) procesado con stevia (*steviarebaudiana Bertoni*) endulzante natural, utilizando el método de deshidratación. Tesis de Ingeniería industrial Universidad Técnica de Cotopaxi. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/720>
- Zgórka, G. (2009). Pressurized liquid extraction versus other extraction techniques in micropreparative isolation of pharmacologically active isoflavones from *Trifolium* L. species. Talanta. 79(1), 46-53. doi:doi:10.1016/j.talanta.2009.03.011