

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR
ULTRASONIDO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE
CEDRONCILLO (*Aloysia herreriae*) Y PAMPA MUÑA (*Hedeoma
mandoniana*)”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

MILAGROS KRISTELL LOPEZ CARRANZA

LIMA – PERÚ

2024

12%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	3%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	doczz.es Fuente de Internet	1%
4	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
5	ciencialatina.org Fuente de Internet	<1%
6	cathi.uacj.mx Fuente de Internet	<1%
7	www.tandfonline.com Fuente de Internet	<1%
8	patents.google.com Fuente de Internet	<1%
9	Submitted to unbosque Trabajo del estudiante	<1%

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**“OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR
ULTRASONIDO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE
CEDRONCILLO (*Aloysia herreriae*) Y PAMPA MUÑA (*Hedeoma
mandoniana*)”**

Presentado por:

MILAGROS KRISTELL LOPEZ CARRANZA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ritva Ann Mari Repo de Carrasco, PhD.
PRESIDENTE

Mg. Sc. Mirtha Patricia Martínez Tapia
MIEMBRO

Dr. Paulo César Torres Mayanga
MIEMBRO

Dra. Ana Consuelo Aguilar Galvez
ASESORA

Dr. David Carlos Campos Gutiérrez
CO-ASESOR

Lima – Perú

2024

DEDICATORIA

A mi mamita Gabriela Veramendi, por sus cuidados, dedicación y por hacer de mi alguien fuerte.

A mis papitos, Santos Lopez y Justo Carranza, que en paz descansen, por su genuina amabilidad, siempre los llevare en mi corazón.

A mis padres, Benjamín Lopez y Giovana Carranza, por enseñarme a no darme por vencida, por su apoyo incondicional y constantes muestras de aliento y cariño.

A mi familia, a mi enamorado Angel y a mi mejor amigo Zeus, quienes siempre estuvieron a mi lado para brindarme su cariño, apoyo, y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesora, la Dra. Ana Aguilar, por su comprensión y aliento, y el apoyo brindado durante la ejecución de esta tesis.
- A mi co-asesor, el Dr. David Campos, por su invaluable apoyo, recomendaciones y paciencia durante la elaboración de la tesis.
- A la Dra. Rosana Chirinos, por su gran disposición y orientación en ciertos puntos de la presente tesis.
- A los miembros del jurado: Ph. D. Ritva Repo de Carrasco, Dr. Paulo Torres Mayanga y Mg. Sc. Mirtha Martínez Tapia, por su tiempo y correcciones realizadas a la tesis.
- Al asistente de investigación Andrés Figueroa y la técnica Adelayda Pardo del área de Biotecnología Industrial & Bioprocesos del Instituto de Biotecnología por el apoyo brindado en las distintas etapas de la parte experimental.
- A todas las personas que conocí en el IBT por la amistad y por toda la ayuda brindada en algún momento.
- A cada amistad que estuvo presente en mis momentos felices como los más complicados, especialmente a Angel, Joel, Walter, José, Carlo y Claudia, quienes me brindaron un apoyo inquebrantable.
- Al Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados PROCIENCIA, por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación como parte del proyecto “Obtención y caracterización de compuestos fenólicos y terpenoides a partir de plantas utilizadas en medicina tradicional mediante tecnologías alternativas de extracción, y evaluación de su potencial antimicrobiano y antioxidante *in vitro*” (Contrato N° PE501077921-2022-PROCIENCIA).

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	PLANTAS MEDICINALES	3
2.1.1.	CEDRONCILLO	3
2.1.2.	PAMPA MUÑA	6
2.2.	COMPUESTOS FENÓLICOS.....	8
2.2.1.	CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	9
2.2.2.	FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS	14
2.2.3.	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	14
2.2.4.	ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	17
2.2.5.	APLICACIONES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	22
2.3.	EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO	24
2.3.1.	FUNDAMENTO	24
2.3.2.	FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	25
2.4.	METODOLOGÍA DE SUPERFICIE RESPUESTA	27
2.4.1.	ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN	27
2.4.2.	OPTIMIZACIÓN MULTI-RESPUESTA.....	29
III.	METODOLOGÍA	32
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN	32
3.2.	MATERIA PRIMA	32
3.3.	EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	32
3.3.1.	EQUIPOS	32
3.3.2.	MATERIALES	33
3.3.3.	REACTIVOS.....	34
3.4.	MÉTODOS DE ANÁLISIS	35

3.4.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....	35
3.4.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.....	36
3.4.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS LIBRES.....	37
3.4.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS LIGADOS.....	37
3.4.5. DETERMINACIÓN DE FLAVANOLES TOTALES.....	38
3.4.6. DETERMINACIÓN DE FLAVONOLES TOTALES.....	38
3.4.7. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	39
3.4.8. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UPLC®-PDA....	
.....	40
3.4.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE.....	40
3.4.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOLIPEMIANTE.....	42
3.4.11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA.....	43
3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	45
3.5.1. ACONDICIONAMIENTO DE LAS MATERIAS PRIMAS.....	45
3.5.2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO A PARTIR DE LAS	
MATERIAS PRIMAS ACONDICIONADAS.....	47
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	48
3.6.1. ETAPA 1: CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIA PRIMAS.....	50
3.6.2. ETAPA 2: EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO A PARTIR DE	
LAS HOJAS DE CEDRONCILLO Y PAMPA MUÑA.....	50
3.6.3. ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ÓPTIMOS.....	52
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	52
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
4.1. PAMPA MUÑA.....	53
4.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS HOJAS DE PAMPA MUÑA.....	53
4.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE	
PAMPA MUÑA.....	57
4.1.3. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UPLC®-PDA DEL	
EXTRACTO ÓPTIMO DE PAMPA MUÑA.....	72
4.1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO ÓPTIMO DE PAMPA	
MUÑA.....	74
4.2. CEDRONCILLO.....	80
4.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS HOJAS DE CEDRONCILLO.....	80

4.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE CEDRONCILLO	85
4.2.3. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UPLC®-PDA DEL EXTRACTO ÓPTIMO DE CEDRONCILLO	96
4.2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO ÓPTIMO DE CEDRONCILLO	100
V. CONCLUSIONES	107
VI. RECOMENDACIONES	108
VII. BIBLIOGRAFÍA	109
VIII. ANEXOS	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Variables Independientes y sus niveles evaluados en la optimización	51
Tabla 2: Arreglo del DBB generado de la subetapa de la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de cedroncillo y pampa muña.....	51
Tabla 3: Características de las hojas de pampa muña (<i>Hedeoma mandoniana</i>)	53
Tabla 4: Resultados* de las variables respuestas (CFT, ABTS y ORAC) utilizando la metodología de superficie respuesta basado en el diseño de Box-Behnken para la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de pampa muña.....	59
Tabla 5: Modelos matemáticos resultantes de la metodología de superficie respuesta para la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de pampa muña	61
Tabla 6: Variables respuestas estimadas en condiciones de optimización para el extracto de hojas de pampa muña	70
Tabla 7: Valores estimados y experimentales de las variables respuestas en condiciones de optimización para el extracto de hojas de pampa muña.....	70
Tabla 8: Identificación y contenido (mg/g bs) de los principales compuestos fenólicos del extracto de hojas de pampa muña por UPLC-PDA.....	73
Tabla 9: Actividad biológica del extracto de hojas de pampa muña.....	75
Tabla 10: Características de las hojas de cedroncillo (<i>Aloysia herreriae</i>)	80
Tabla 11: Resultados* de las variables respuestas (CFT, ABTS y ORAC) utilizando la metodología de superficie respuesta basado en el diseño de Box-Behnken para la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de cedroncillo	86
Tabla 12: Modelos matemáticos resultantes de la metodología de superficie respuesta para la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de cedroncillo	88
Tabla 13: Variables respuestas estimadas en condiciones de optimización para el extracto de hojas de cedroncillo	95
Tabla 14: Valores estimados y experimentales de las variables respuestas en condiciones de optimización para el extracto de hojas de cedroncillo.....	96
Tabla 15: Identificación y contenido (mg/g bs) de los principales compuestos fenólicos del extracto de hojas de cedroncillo por UPLC-PDA	97
Tabla 16: Actividad biológica del extracto de hojas de cedroncillo	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fotografía de muestra herborizada de <i>Aloysia herrerae</i> Moldenke.....	4
Figura 2: Fotografía de muestra herborizada de <i>Hedeoma mandoniana</i> Wedd.....	7
Figura 3: Estructura química de los sub-grupos de los compuestos fenólicos.....	13
Figura 4: Principio del método ABTS.....	16
Figura 5: Principio del método ORAC.....	17
Figura 6: Mecanismo de acción de la lipasa pancreática en la absorción de lípidos.....	21
Figura 7: Principio de la Extracción Asistida por Ultrasonido.....	25
Figura 8: Funciones con condición de deseables individuales para la optimización simultánea.....	31
Figura 9: Flujo de operaciones para el acondicionamiento de las materias primas.....	45
Figura 10: Flujo de operaciones para la extracción asistida por ultrasonido a partir de las hojas de cedroncillo y pampa muña.....	48
Figura 11: Esquema del diseño experimental de la investigación.....	49
Figura 12: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol, sobre el contenido de compuestos fenólicos.....	63
Figura 13: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol, sobre la capacidad antioxidante ABTS.....	64
Figura 14: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol (c), sobre la capacidad antioxidante ORAC.....	65
Figura 15: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol, sobre el contenido de compuestos fenólicos.....	90
Figura 16: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol, sobre la capacidad antioxidante ABTS.....	91
Figura 17: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol, sobre la capacidad antioxidante ORAC.....	92

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL MODELO CUADRÁTICO PARA EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (MG AGE/G BS) DURANTE LA EAU DE PAMPA MUÑA	135
ANEXO 2: ANOVA DEL MODELO CUADRÁTICO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS (μ MOL TE/G BS) DURANTE LA EAU DE PAMPA MUÑA	136
ANEXO 3: ANOVA DEL MODELO CUADRÁTICO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ORAC (μ MOL TE/G BS) DURANTE LA EAU DE PAMPA MUÑA	137
ANEXO 4: CROMATOGRAMA UPLC-PDA DE PAMPA MUÑA.....	138
ANEXO 5: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL MODELO CUADRÁTICO PARA EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (MG AGE/G BS) DURANTE LA EAU DE CEDRONCILLO.....	139
ANEXO 6: ANOVA DEL MODELO CUADRÁTICO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS (μ MOL TE/G BS) DURANTE LA EAU DE CEDRONCILLO	140
ANEXO 7: ANOVA DEL MODELO CUADRÁTICO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ORAC (μ MOL TE/G BS) DURANTE LA EAU DE CEDRONCILLO	141
ANEXO 8: CROMATOGRAMA UPLC-PDA DE CEDRONCILLO.....	142

RESUMEN

El cedroncillo (*Aloysia herreriae*) y la pampa muña (*Hedeoma mandoniana*) son plantas silvestres de los andes utilizadas en la medicina tradicional; sin embargo, no son valoradas como una buena fuente para obtener compuestos fenólicos. Dentro de las tecnologías verdes utilizadas para obtener los extractos se encuentra la extracción asistida por ultrasonido (EAU), la cual ofrece altos rendimientos de forma segura y económica. Por lo expuesto, la presente investigación tuvo como objetivo optimizar la extracción de compuestos fenólicos totales (CFT) y la capacidad antioxidante (ABTS y ORAC) de las hojas de cedroncillo y pampa muña mediante EAU, y caracterizar los extractos óptimos de cada planta a través de cromatografía UPLC-PDA y actividades biológicas. La optimización se llevó a cabo utilizando la metodología superficie de respuesta (MSR) basado en el diseño estadístico Box-Behnken. Se investigaron como variables independientes el tiempo (5-20 min), la temperatura (30-70 °C) y la concentración de etanol (30-80 por ciento). Los valores estimados para la pampa muña de CFT (51.4 mg AGE/g bs), ABTS (426.2 $\mu\text{mol TE/g bs}$) y ORAC (1,524.0 $\mu\text{mol TE/g bs}$) se determinaron en las condiciones óptimas de tiempo 5.1 min, temperatura 69.7 °C y concentración de etanol 44.9 por ciento; mientras los valores estimados para el cedroncillo de CFT (91.4 mg AGE/g bs), ABTS (632.4 $\mu\text{mol TE/g bs}$) y ORAC (2,643.1 $\mu\text{mol TE/g bs}$), se determinaron en las condiciones óptimas de tiempo 12.3 min, temperatura 61 °C y concentración de etanol 57.3 por ciento. Los resultados estimados coincidieron con los resultados experimentales obtenidos utilizando las condiciones de extracción óptimas, lo cual permitió validar los modelos matemáticos. Además, los extractos óptimos de hojas pampa muña y cedroncillo demostraron a través de la cromatografía UPLC-PDA que los compuestos principales fueron derivados de ácidos hidroxicinámicos así como flavonoides, y sugiriendo un buen potencial para inhibir enzimas como α -amilasa, α -glucosidasa, lipasa pancreática y enzima convertidora de angiotensina (ECA). Los extractos de pampa muña y cedroncillo se presentan como una alternativa viable para una variedad de aplicaciones en la industria alimentaria.

Palabras clave: compuestos fenólicos, ultrasonido, cedroncillo, pampa muña, optimización.

ABSTRACT

Cedroncillo (*Aloysia herrerae*) and pampa muña (*Hedeoma mandoniana*) are wild plants native to the Andes, which have been traditionally employed in traditional medicine. However, their potential as valuable sources of phenolic compounds has been underappreciated. This study explores the application of green technologies, specifically ultrasound-assisted extraction (UAE), known for its secure and economical high-yield extraction capabilities. The primary objective is to optimize the extraction of Total Phenolic Compounds (TPC) and antioxidant capacity (ABTS and ORAC) from cedroncillo and pampa muña leaves through UAE. Additionally, the optimal extracts are characterized using UPLC-PDA chromatography, and their biological activities are evaluated. The optimization process utilizes Response Surface Methodology (RSM) based on the Box-Behnken statistical design. Independent variables investigated include time (5-20 min), temperature (30-70 °C), and ethanol concentration (30-80 percent). Estimated values for pampa muña indicate TPC (51.4 mg GAE/g dw), ABTS (426.2 $\mu\text{mol TE/g dw}$), and ORAC (1,524.0 $\mu\text{mol TE/g dw}$) under optimal conditions of 5.1 min time, 69.7 °C temperature, and 44.9 percent ethanol concentration. Correspondingly, cedroncillo estimates are TPC (91.4 mg GAE/g dw), ABTS (632.4 $\mu\text{mol TE/g dw}$), and ORAC (2,643.1 $\mu\text{mol TE/g dw}$) under optimal conditions of 12.3 min time, 61 °C temperature, and 57.3 percent ethanol concentration. The estimated results align with experimental outcomes, validating the mathematical models. Furthermore, optimal extracts from pampa muña and cedroncillo leaves were demonstrated through UPLC-PDA chromatography to contain predominant compounds derived from hydroxycinnamic acids and flavonoids, suggesting a promising potential for inhibiting enzymes such as α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase, and angiotensin-converting enzyme (ACE). The pampa muña and cedroncillo extracts emerge as a promising alternative for various applications in the food industry.

Keywords: phenolic compounds, ultrasound, cedroncillo, pampa muña, optimization.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú las enfermedades crónicas han ido incrementando con el pasar de los años. Frente a esta problemática, la medicina tradicional se ha utilizado para prevenir y tratar estas enfermedades, mediante el uso de plantas medicinales y sus extractos. Según los informes de la Organización Mundial de la Salud (WHO, de sus siglas en inglés, *World Health Organization*), se estima que el 80 por ciento de la población mundial acude a la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de salud, y alrededor del 85 por ciento de la medicina tradicional involucra el uso de extractos a base de plantas medicinales (WHO, 2023; Gallegos, 2017).

En relación con ello, diversos estudios han reportado la presencia de numerosos compuestos bioactivos en las plantas medicinales, entre los cuales destacan los compuestos fenólicos. Estos han llamado la atención como agentes potentes en el control y tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, abarcando problemas cardiovasculares, inflamación, diabetes mellitus, cáncer y enfermedades de origen microbiano (Li *et al.*, 2014; Cereceres *et al.*, 2019).

Por otro lado, se han desarrollado diversas técnicas para obtener extractos de plantas medicinales, una tecnología innovadora es la extracción asistida por ultrasonido (EAU). Esta técnica se considera como una tecnología verde, ya que es de fácil manejo, segura, económica y sustentable. Además, la optimización de esta técnica permite encontrar las condiciones ideales, y así incrementar la liberación de compuestos bioactivos del material vegetal (Medina, 2017).

En la actualidad, se ha observado un creciente interés por la aplicación de la EAU, así como en la optimización de los parámetros de extracción (temperatura, tiempo y concentración de etanol), para obtener compuestos fenólicos de diversos vegetales y frutas, para su posterior encapsulación y uso como antioxidantes naturales para enriquecer y/o

aplicar en diversos productos (Mehta *et al.*, 2022). A pesar de esta tendencia, es importante destacar la notable escasez de investigaciones dirigidas a la extracción de compuestos fenólicos de plantas medicinales en Perú, a pesar de la abundante diversidad de especies medicinales en el país (Medina, 2017; Rojas, 2021). Por lo mencionado anteriormente, la presente investigación tuvo como objetivo principal optimizar el proceso de extracción asistida por ultrasonido de los compuestos fenólicos de las hojas de cedroncillo (*Aloysia herreriae*) y hojas de pampa muña (*Hedeoma mandoniana*), mediante la metodología de superficie respuesta (MSR) empleando el diseño Box-Behnken; y la caracterización de los extractos óptimos a través de las propiedades bioactivas.

Los objetivos específicos fueron determinar los compuestos fenólicos (fenólicos totales, fenólicos libres, fenólicos ligados, flavanoles y flavonoles) y capacidad antioxidante (ABTS y ORAC) presentes en hojas de cedroncillo y pampa muña. Además, optimizar el proceso de EAU de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante (ABTS y ORAC) de hojas de cedroncillo y pampa muña mediante la MSR basado en el diseño Box - Behnken. Por último, determinar en los extractos optimizados de hojas de cedroncillo y pampa muña los compuestos fenólicos, capacidad antioxidante (ABTS y ORAC), rendimiento de extracción, perfil de compuestos fenólicos mediante UPLC-PDA y actividades biológicas: hipoglucemiante, hipolipemiante y antihipertensiva.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. PLANTAS MEDICINALES

Una planta medicinal se define como un material vegetal que contiene ingredientes activos que pueden utilizarse para fines terapéuticos o que sirve como precursor para la creación de nuevos fármacos (Builders, 2019).

Las plantas medicinales son consideradas como uno de los componentes más importantes de la biodiversidad, y son utilizadas en diferentes partes del mundo. En los países en vías de desarrollo, la población utiliza las plantas medicinales, así como sus extractos para cubrir o complementar las necesidades básicas de salud. Por su parte, en los países de Europa y EEUU ha incrementado la utilización de las plantas medicinales para fines terapéuticos (Gallegos, 2017; Builders, 2019).

En el Perú se estima que hay más de 4000 especies de plantas de uso medicinal, las cuales son utilizadas en gran medida por la población de la región Andina (Bustamante *et al.*, 2021). A continuación, se detallan las plantas medicinales utilizadas en el presente estudio.

2.1.1. CEDRONCILLO

a. GENERALIDADES

El cedroncillo (*Aloysia herrerae* Moldenke también citado en la literatura bajo el nombre científico de *Aloysia herrerae* Mold) es una planta medicinal nativa de la Cordillera de los Andes, la cual crece entre los 2800-3000 m.s.n.m. (Mantilla y Olazábal, 2008). El cedroncillo es una planta arbustiva andina que puede alcanzar hasta 2 metros de altura, presenta tallos rectos de forma cuadrangular y es bastante ramosa. Además, se caracteriza

por tener hojas de color verde, duras y de forma oval-lanceolada; mientras que las flores presentan un color blanquecino (Mantilla y Olazábal, 2008). Se puede apreciar la morfología de la planta en la Figura 1.



Figura 1: Fotografía de muestra herborizada de *Aloysia herrerae* Moldenke

Con respecto al género *Aloysia*, existen alrededor de 30 especies que crecen en las regiones áridas, templadas y subtropicales de América del Norte y del Sur (Siedo, 2012). En América del Norte solo están presentes dos especies *A. macrostachya* (Torr.) Moldenke y *A. wrightii* A. Heller; mientras que en América del Sur se encuentra la mayoría de las especies, especialmente en Argentina, Bolivia, Brasil y Chile (Mohammadhosseini *et al.*, 2021).

En Perú se ha reportado la presencia de algunas especies del género *Aloysia*, tales como, *A. ayacuchensis* Moldenke, *A. herrerae* Moldenke, *A. minthiosa* Moldenke, *A. peruviana* Moldenke, *A. spathulata* (Hayek) Moldenke, *A. arequipensis* y *A. velutina* (León, 2006; Siedo, 2012).

Según la base de datos del Sistema Global de Información sobre Biodiversidad (GBIF, de sus siglas en inglés, *Global Biodiversity Information Facility*) se ha encontrado y recolectado la especie *A. herrerae* Moldenke en los siguientes departamentos del Perú:

Cusco, Ayacucho, Huancavelica y Ancash (GBIF, 2023). León (2006) también indicó la presencia de esta especie en el departamento de Apurímac.

b. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según la base de datos del Catálogo de la Vida (2023), conocido por su nombre en inglés *Catalogue of Life*, la clasificación taxonómica del cedroncillo es la siguiente:

Reino : Plantae
División : Tracheophyta
Clase : Magnoliopsida
Orden : Lamiales
Familia : Verbenaceae
Género : Aloysia Paláu
Especie : Aloysia herrerae Moldenke

c. PROPIEDADES ASOCIADAS A SU USO

La medicina local de muchos países ha utilizado las especies del género *Aloysia* como remedios herbales contra diversas dolencias y enfermedades. Existen diferentes formas de preparación para el consumo de esta planta medicinal; las formas más frecuentes son la decocción y la infusión (Mohammadhosseini *et al.*, 2021). La decocción, también llamada cocimiento, consiste en sumergir la planta en agua y calentarlo hasta ebullición; mientras que la infusión se hace reposar la planta en agua muy caliente (Gallegos, 2017).

El cedroncillo se sugiere que se prepare en forma de infusión utilizando las partes aéreas de la planta, es decir, las hojas. La infusión tiene propiedades antiespasmódicas, lo cual permite controlar o prevenir las contracciones musculares involuntarias que pueden causar dolor y malestar, como son el dolor de estómago y los cólicos menstruales. Además, esta

infusión permite combatir la digestión lenta, ya que alivia la acidez estomacal, dolor abdominal y permite la eliminación de gases (flatulencias) (Mantilla y Olazábal, 2008).

Por otro lado, el extracto de algunas especies del género *Aloysia* ha demostrado tener efectos antimicrobianos, anticonvulsivantes, anticolíticos, antioxidantes, citoprotectores, antinociceptivos, antiinflamatorios, estrogénicos y anticancerígenos (Mohammadhosseini *et al.*, 2021).

2.1.2. PAMPA MUÑA

a. GENERALIDADES

La pampa muña (*Hedeoma mandoniana* Wedd también citado en la literatura bajo el nombre científico de *Hedeoma mandonianum*) es una planta medicinal nativa de la Cordillera de los Andes, la cual crece entre los pajonales postrado al suelo a 3900 m.s.n.m (Mantilla y Olazábal, 2008). Además, Slanis y Del Valle (2005), indican que la pampa muña crece en las pasturas, debajo de los matorrales, entre roquedales o zonas con mayor nivel de humedad.

Bustamante *et al.* (2021), indican que la pampa muña es un arbusto de baja altura que ocupa amplios espacios de terreno. Se caracteriza por presentar abundantes ramificaciones con tallos de 20 a 30 cm de altura; hojas pequeñas de 4 mm de largo con un pedúnculo de hasta 3 mm; raíces adventicias y flores pequeñas de color blanco que se agrupan en racimos.

Por su parte, Slanis y Del Valle (2005) señalan que es una hierba perenne, la cual presenta ramas numerosas con pubescencia más densa (superficie vellosa, cubierta de pelos finos y suaves) hacia las partes jóvenes, y además indican que las hojas son ovaladas, obovadas o elípticas, sésiles o pecioladas, crenadas en el borde superior de la lámina no punteado-glandulosas. Se puede apreciar la morfología de la planta en la Figura 2.



Figura 2: Fotografía de muestra herborizada de *Hedeoma mandoniana* Wedd

Con respecto al género *Hedeoma*, existen alrededor de 43 especies que están distribuidas en toda América; sin embargo, en Perú solamente habita una especie nativa la cual es la *H. mandoniana* Wedd (Slanis y Del Valle, 2005).

Según la base de datos del Sistema Global de Información sobre Biodiversidad (GBIF) desde el año 1854 a la actualidad se ha encontrado y recolectado la especie *H. mandoniana* Wedd en los siguientes departamentos del Perú: Cusco, Ayacucho, Huancavelica, Ancash, Puno, Junín y Arequipa (GBIF, 2023). A su vez, existen investigaciones que indican el crecimiento de esta especie en Ayacucho (Roque y Ramírez, 2008), Huánuco (Bustamante *et al.*, 2021), Cusco (Serrano *et al.*, 2020) y Puno (Montesinos *et al.*, 2015).

b. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según la base de datos del Catálogo de la Vida (2023), conocido por su nombre en inglés *Catalogue of Life*, la clasificación taxonómica de la pampa muña es la siguiente:

Reino : Plantae
División : Tracheophyta
Clase : Magnoliopsida

Orden : Lamiales
Familia : Lamiaceae
Género : Hedeoma
Especie : Hedeoma mandoniana Wedd

c. PROPIEDADES ASOCIADAS A SU USO

La pampa muña se sugiere que se prepare en forma de infusión utilizando las partes aéreas de la planta, es decir, las hojas. La infusión ayuda a aliviar los problemas digestivos tales como acidez estomacal, cólicos, diarreas por infecciones bacterianas o parasitarias, halitosis e indigestión; además ayuda a prevenir y tratar las enfermedades respiratorias tales como gripe, bronquitis y asma (Mantilla y Olazábal, 2008; Bustamante *et al.*, 2021).

Por otro lado, el aceite esencial de pampa muña posee actividad antihistamínica, antiinflamatoria, antiespasmódica (relajante muscular) e incluso es capaz de inhibir el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en los ratones (Bustamante *et al.*, 2021). A su vez, Serrano (2022) indicó que el aceite esencial de pampa muña proveniente de Bolivia presenta actividad insecticida frente a ninfas de *Triatoma infestans* y *Rhodnius neglectus*; mientras que Bustamante *et al.* (2021) señalaron que el aceite esencial de pampa muña proveniente de Perú ejerce un efecto repelente sobre las larvas de la polilla de la papa (*Phthorimaea operculella*).

2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos, también llamados polifenoles o fenilpropanoides, parten de una molécula básica llamada fenol. El fenol se compone de un anillo aromático (fenil) unido a un grupo hidroxilo (OH). El anillo aromático representa un papel importante en las propiedades antioxidantes, esto se debe a que los pares de electrones conjugados permiten que haya deslocalización de electrones que tiene el potencial de estabilizar especies radicales haciéndolas menos reactivas. En adición, el anillo aromático brinda propiedades como la actividad antibiótica, antiparasitaria y citotóxica (Peñarrieta *et al.*, 2014; Tucker, 2023).

Los compuestos fenólicos se originan principalmente en las plantas, debido a que son sintetizados en su mayoría como productos de su metabolismo secundario, siendo algunos indispensables para su función fisiológica, tales como crecimiento, reproducción y protección contra patógenos externos y el estrés provocado por la radiación UV y los depredadores (Peñarrieta *et al.*, 2014).

2.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Según sus estructuras químicas, los compuestos fenólicos se pueden dividir en diferentes subgrupos, tales como fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, xantonas, estilbenos, benzofenonas, quinonas, lignanos, ligninas, flavonoides y taninos (Peñarrieta *et al.*, 2014). Esta clasificación se representa de manera esquemática en la Figura 3. A continuación, se describe brevemente cada subgrupo:

a. FENOLES SIMPLES

Los fenoles simples son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Presentan propiedades antioxidantes y tienen una actividad biológica importante tales como antibacteriana, antiparasitaria y citotóxicos (Peñarrieta *et al.*, 2014). Ejemplos representativos de fenoles simples se tiene fenol, catecol, resorcinol, hidroquinona y floroglucinol (Ecevit *et al.*, 2022).

b. ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos están conformados por dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Los ácidos hidroxibenzoicos son compuestos que presentan un grupo carboxílico (-COOH) y grupos hidroxilo (uno o más) en un anillo aromático; mientras que los ácidos hidroxicinámicos en lugar del grupo carboxílico presentan el grupo -CH = CH-COOH (Peñarrieta *et al.*, 2014).

Los ácidos fenólicos muestran un alto potencial como antioxidantes y anti-inflamatorios; sin embargo, los ácidos hidroxicinámicos son más efectivos en términos de la actividad antioxidante. Lo mencionado anteriormente, se debe a la presencia del doble enlace

carbono que aumenta la resonancia, es decir, hay una mayor deslocalización de los electrones que permite estabilizar los radicales libres (Medina, 2017).

Los ácidos hidroxibenzoicos más comunes son ácido benzoico, ácido galico, ácido protocatéquico. Por su parte, los ácidos hidroxicinámicos más comunes son el ácido cafeico, el ácido ferúlico, el ácido cumárico y el ácido clorogénico (Medina, 2017; Ecevit *et al.*, 2022).

c. CUMARINAS

Las cumarinas son compuestos que presentan un anillo de benceno fusionado con un anillo de pirona, estas se pueden clasificar en: cumarinas simples, piranocumarinas, furanocumarinas y bicumarinas. Entre las cumarinas más representativas se encuentran umbeliferon, osthol, peucedanina e imperatorina (Ecevit *et al.*, 2022). Las cumarinas presentan una amplia gama de actividades farmacológicas, tales como antitumorales, anticoagulantes, antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, antimicrobianas entre otras (Sinha *et al.*, 2022).

d. XANTONAS, ESTILBENOS, BENZOFENONAS

Las xantonas son compuestos que presentan dos anillos de benceno unidos a través de un grupo carbonilo y oxígeno que restringe la libre rotación alrededor de los enlaces carbono-carbono (Raut *et al.*, 2016). Las xantonas más representativas son la mangiferina e isomangiferina, y se caracterizan por tener propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antidiabéticas (Ares *et al.*, 2021).

Los estilbenos se caracterizan por tener como estructura química un núcleo de 1,2-difeniletileno con grupos hidroxilo sustituidos en los anillos aromáticos. Se puede clasificar en cuatro subclases, las cuales son: estilbenos monoméricos, diméricos, oligoméricos y diversos. Además, se caracterizan por tener una gama de actividades farmacológicas, destacando las actividades antitumorales, antiinflamatorias, antioxidantes, antihipertensivas y antimicrobianas (Medina, 2017; Ecevit *et al.*, 2022).

Las benzofenonas en su mayoría presentan una estructura central de biciclo [3.3.1]nonano-2,4,9-triona unida a un anillo de fenilo sustituido con 13,14-dihidroxi (Wu *et al.*, 2014). Las benzofenonas han exhibido actividades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirales, anti-VIH y citotóxicas (Ares *et al.*, 2021).

e. QUINONAS

Las quinonas se caracterizan por tener una estructura de ciclohexadieno que posee grupos carbonilo en las posiciones 1,2 ó 1,4. La mayor parte de las quinonas se encuentran en fuentes naturales como plantas, bacterias, hongos y organismos marinos; sin embargo, también se han identificado en ciertos animales como erizos de mar, pulgones, insectos y cochinillas (Ecevit *et al.*, 2022).

Las quinonas se pueden clasificar en cuatro subclases: benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y fenantraquinonas. Las quinonas se han caracterizado por mostrar actividad antibacteriana de modo bacteriostático y/o bactericida, así como propiedades antioxidantes (Ecevit *et al.*, 2022; Peñarrieta *et al.*, 2014).

f. LIGNANOS Y LIGNINAS

Los lignanos se forman a partir de la dimerización de dos unidades de fenilpropanoides (C₆-C₃) mediante reacciones de acoplamiento oxidativo. Los lignanos se pueden clasificar en tres subclases: lignanos, neolignanos y norlignanos (Ecevit *et al.*, 2022). Además, los lignanos presentan propiedades antioxidantes, hepatoprotectoras, antimitóticas, antivirales, antihipertensivas y citostáticas (Peñarrieta *et al.*, 2014; Medina, 2017).

Por otro lado, las ligninas son polímeros fenólicos que se caracterizan por estar compuestas por tres principales monómeros fenilpropanoides (monolignoles), los cuales son alcohol *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Maceda *et al.*, 2021). Además, las ligninas son el segundo biopolímero más abundante en el reino vegetal después de la celulosa y se caracterizan por poseer propiedades antioxidantes (Peñarrieta *et al.*, 2014).

g. FLAVONOIDES

Los flavonoides se caracterizan por ser de bajo peso molecular y tener una estructura de esqueleto denominada difenil-pirano (C₆-C₃-C₆), esta estructura está conformado por dos anillos fenilo (anillos A y B) unidos a través de una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno (anillo C) (Álvarez y Orallo, 2003). La mayoría de los flavonoides se encuentran en fuentes vegetales, así como en microalgas y hongos (Ecevit *et al.*, 2022).

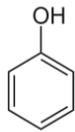
Según el grado de oxidación del heterociclo principal, este subgrupo puede clasificarse en varias subclases, las cuales son flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianidinas, flavanonas y flavanoles (Medina, 2017). En general, los flavonoides presentan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas y hepatoprotectoras (Álvarez y Orallo, 2003; Ecevit *et al.*, 2022).

h. TANINOS

Los taninos se encuentran naturalmente en plantas superiores y algas marinas; además se caracterizan por tener una función defensiva de la planta contra diversos factores ambientales, patógenos y herbívoros. Los taninos se pueden clasificar en cinco subclases: galotaninos, elagitaninos, taninos condensados, taninos complejos y florotaninos (Peñarrieta *et al.*, 2014; Ecevit *et al.*, 2022).

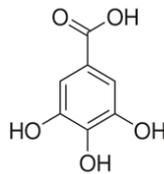
Los galotaninos y elagitaninos han demostrado tener propiedades antioxidantes y antibacterianas. Los taninos complejos han demostrado tener efectos anticancerígenos (Peñarrieta *et al.*, 2014). Los taninos condensados han demostrado tener propiedades antioxidantes, bacteriostáticas, antibacterianas, y anticancerígenas (Vázquez *et al.*, 2012). Los florotaninos han evidenciado tener potencial antimicrobiano frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) (Ecevit *et al.*, 2022).

FENÓLES SIMPLES

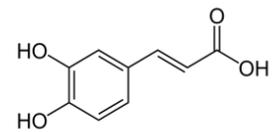


Fenol

ÁCIDOS FENÓLICOS

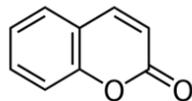


Ácidos hidroxibenzoicos
Ej: Ácido gálico



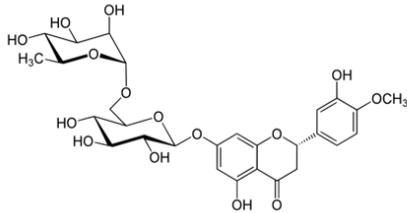
Ácidos hidroxicinámicos
Ej: Ácido cafeico

CUMARINAS

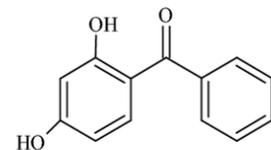


Cumarina simple

XANTONAS, ESTILBENOS, BENZOFENONAS

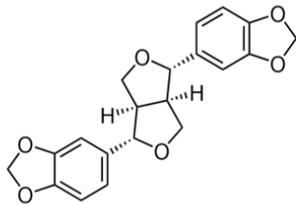


Estilbenos
Ej: Trans-Resveratrol



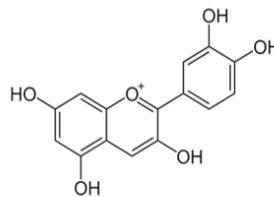
Benzofenonas
Ej: Benzofenona-1

LIGNANOS Y LIGNINAS

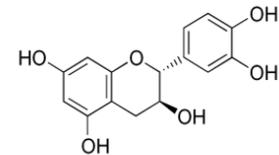


Lignan
Ej: Sesamina

FLAVONOIDES

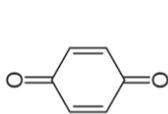


Antocianidinas
Ej: Cianidina

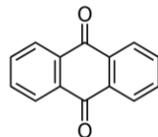


Flavanoles
Ej: Catequina

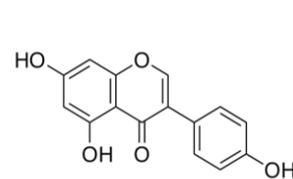
QUINONAS



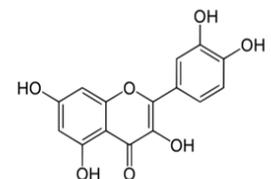
p-benzoquinona



Antraquinona

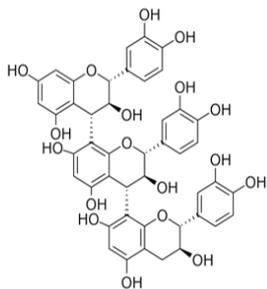


Isoflavonas
Ej: Genisteína

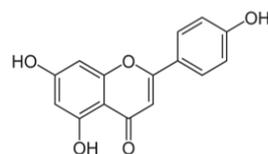


Flavonoles
Ej: Quercetina

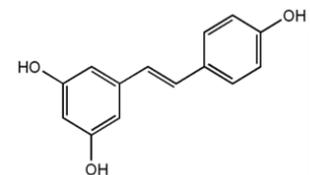
TANINOS



Taninos condensados
Ej: Prociandina C2



Flavonas
Ej: Apigenina



Flavanonas
Ej: Hesperidina

Figura 3: Estructura química de los sub-grupos de los compuestos fenólicos

2.2.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos tienen una gran importancia en la salud humana, por lo cual es fundamental definir cuáles son los factores intrínsecos y extrínsecos que influyen en su contenido en los productos vegetales (Lezama, 2017).

Los factores intrínsecos son aquellos factores propios del vegetal, aquí se puede resaltar la composición diferente que hay entre distintos géneros o especies; en cambio, los factores extrínsecos hacen referencia a las circunstancias de su cultivo (factores agroambientales) y a las condiciones de conservación tras la recolección del vegetal (Lezama, 2017). Con respecto al último punto, Rojas (2021) señala que estos compuestos fenólicos suelen ser inestables a condiciones ambientales tales como luz, temperatura, oxígeno y presión.

2.2.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes se pueden definir como sustancias que protegen al organismo contra los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno (ROS, según las siglas en inglés de *Reactive Oxygen Species*) (Saleh *et al.*, 2023). Los antioxidantes se encargan de atrapar y neutralizar las ROS, a través de la transferencia de átomos de hidrógeno o electrones (Platzer *et al.*, 2021). De esta manera, se evita que las ROS causen daños a estructuras celulares como el ADN, las proteínas y los lípidos. Uno de los grupos más importantes que se reconoce como antioxidantes naturales son los compuestos fenólicos (Kiran *et al.*, 2023).

Con respecto a la capacidad antioxidante, no se puede medir directamente, sino que está determinada por los efectos del antioxidante para controlar el grado de oxidación. Hay una variedad de métodos para evaluar la capacidad antioxidante, se puede clasificar en dos grupos según el mecanismo de reacción involucrado en el proceso de inactivación de radicales libres: Transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) y Transferencia de electrones (TE) (Platzer *et al.*, 2021).

Los métodos que aplican el mecanismo TAH miden la capacidad de un antioxidante para inactivar un radical libre mediante la liberación de un átomo de hidrógeno; mientras que los métodos que usan el mecanismo TE, miden la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir ciertos compuestos y moléculas. Este último muestra una disminución del color en la solución, lo que no solo indica el punto final de la reacción, sino que simultáneamente informa la concentración del antioxidante en la muestra. El método ORAC se basa en el mecanismo de TAH, el método FRAP se basa en el mecanismo de TE; mientras que los métodos DPPH y ABTS utilizan tanto TAH como TE (Santos *et al.*, 2018).

a. MÉTODO ABTS

El método de Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox, también conocido por sus siglas en inglés TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), de aquí en adelante referido como método ABTS, es utilizado para medir la capacidad de un compuesto para eliminar el catión radical $ABTS^{•+}$ [ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico], un cromóforo verde-azulado que absorbe a una longitud de onda máxima de 734 nm (Xu *et al.*, 2017).

En la Figura 4, se aprecia el principio del método ABTS, en el cual se utiliza la capacidad de un compuesto como el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) para hacer reaccionar la solución de ABTS, generando así los radicales libres $ABTS^{•+}$. En el caso que se agregue un compuesto que presente propiedades antioxidantes, este reacciona con los radicales, y los neutralizará por reducción directa a través de la donación de electrones o por radicales a través de la donación de átomos de hidrógeno. Lo mencionado anteriormente, genera que los radicales ABTS se estabilicen y disminuya la absorbancia, es decir, de un color verde-azulado por presencia de los radicales se vuelve incoloro. Además, este método se puede calibrar con un antioxidante estándar como es el Trolox (Borlinghaus *et al.*, 2020; Mejía *et al.*, 2021).

Es importante tener en cuenta que el radical $ABTS^{•+}$ podría reaccionar rápidamente con los antioxidantes, el ensayo posee las ventajas de la rapidez y la simplicidad. Además, el radical $ABTS^{•+}$ no se ve afectado por la fuerza iónica y es soluble en solventes orgánicos y

acuosos, siendo un método aplicable al estudio de antioxidantes solubles en agua y solubles en lípidos, compuestos puros y extractos de alimentos (Xu *et al.*, 2017).

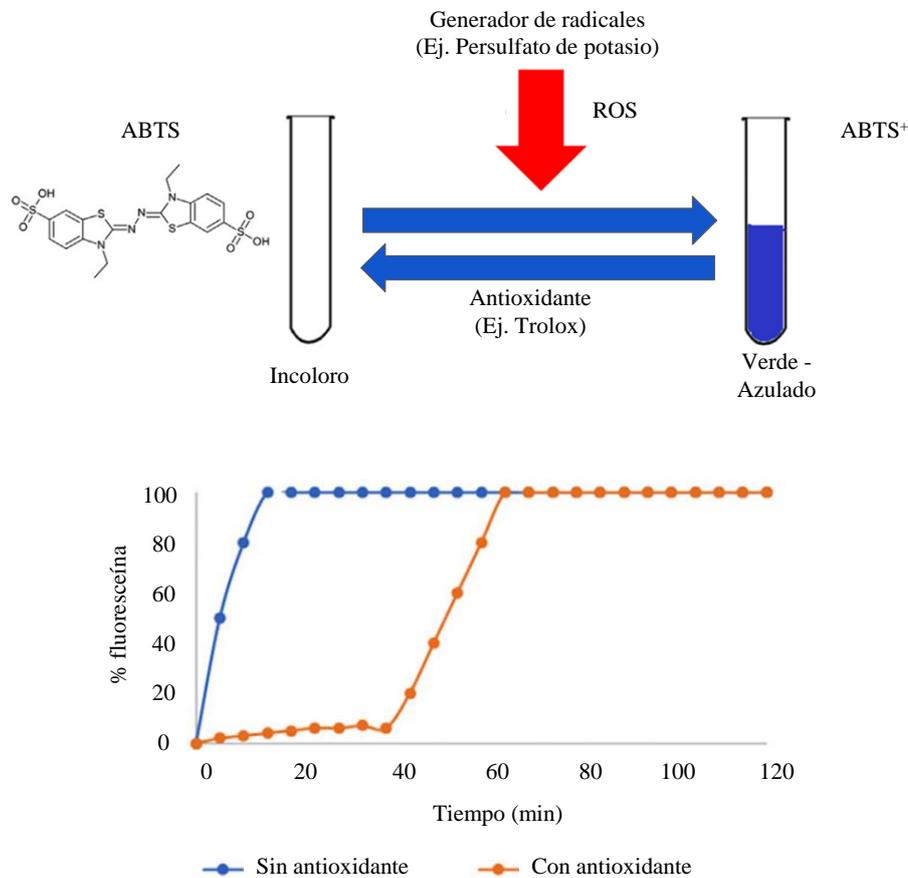


Figura 4: Principio del método ABTS

ROS: Especies reactivas de oxígeno
 FUENTE: Adaptado de Borlinghaus *et al.* (2020)

b. MÉTODO ORAC

El método de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno, más conocido por sus siglas en inglés ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), mide la capacidad de un compuesto para atrapar el radical peroxilo (ROO^{\bullet}), el cual es relevante en la oxidación de lípidos en los alimentos (Xu *et al.*, 2017).

En la Figura 5, se aprecia el principio del método ORAC, en el cual se utiliza la capacidad del azo-compuesto AAPH [diclorhidrato de 2,2'- azobis (2-amidinopropano)] para formar

radicales peroxilo cuando se calienta en presencia de suficiente oxígeno, aquellos radicales son capaces de oxidar a la fluoresceína, generando así la disminución de la fluorescencia. En el caso que se agregue un compuesto que presente propiedades antioxidantes al ensayo, este reacciona con el radical peroxilo formado, y genera un retraso en la reacción de oxidación de la fluoresceína (Borlinghaus *et al.*, 2020).

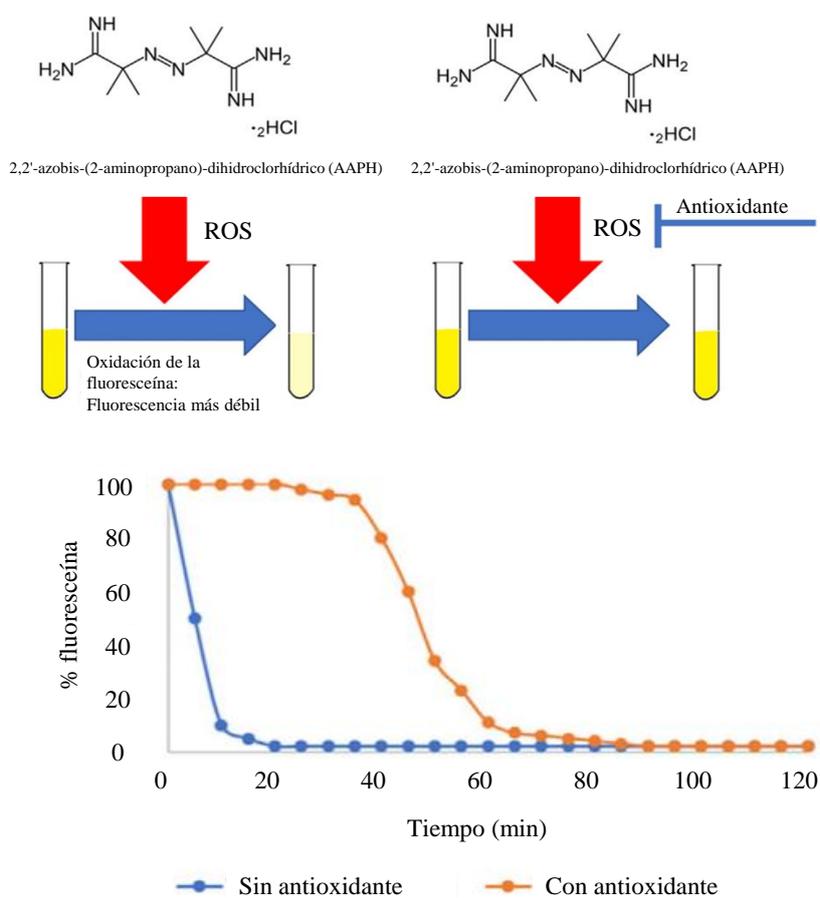


Figura 5: Principio del método ORAC

ROS: Especies reactivas de oxígeno

FUENTE: Adaptado de Borlinghaus *et al.* (2020)

2.2.4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos han atraído un creciente interés de numerosos estudios por poseer una amplia gama de actividades biológicas (Peñarrieta *et al.*, 2014; Ecevit *et al.*, 2022). A continuación, se describen algunas de las actividades atribuidas.

a. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica que afecta a una gran proporción de la población, siendo uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. La hipertensión puede controlarse mediante la vasodilatación, que consiste en que los vasos sanguíneos se dilatan, provocando una disminución de la resistencia periférica y un aumento del flujo sanguíneo. La vasodilatación se logra mediante la activación de compuestos vasoactivos endógenos o exógenos que actúan sobre los receptores, canales o enzimas ubicados en el endotelio vascular o el músculo liso vascular (López, 2006; Ahmed *et al.*, 2020).

Para el tratamiento de hipertensión resulta primordial inducir la vasodilatación. Esto se puede lograr a través de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), debido a que esta enzima es responsable de estrechar los vasos sanguíneos y, por lo tanto, incrementar la presión arterial. La medicina contemporánea ofrece una gran variedad de fármacos para el tratamiento de la HTA entre ellos se encuentran enalapril, captopril y lisinopril; sin embargo, estudios reportan efectos secundarios como toxicidad hepática, hipotensión e hiperpotasemia (Chakraborty y Roy, 2021; Vinothkumar *et al.*, 2019).

En los últimos años se ha intensificado la búsqueda de inhibidores de la ECA de origen natural. Hoy en día, estudios experimentales y clínicos (Vinothkumar *et al.*, 2019; Chakraborty y Roy, 2021) reportan que las plantas medicinales poseen actividad inhibidora de la ECA, debido a los compuestos bioactivos que se encuentran en ellos, tales como compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides y alcaloides. De tal manera, que las plantas medicinales se podrían usar terapéuticamente en el tratamiento de la HTA, para excluir los efectos secundarios de los fármacos contemporáneos.

b. ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que se caracteriza por presentar niveles anormalmente altos de glucosa en plasma. Existen dos tipos principales de DM: tipo 1 y tipo 2. La DM tipo 1 se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas con la posterior pérdida completa de la producción de insulina; mientras que

la DM tipo 2 se basa en una pérdida relativa de la producción insulina combinada con una resistencia a la insulina. Estos cambios metabólicos van acompañados de modificaciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (López, 2006; Stojkovic *et al.*, 2019).

La DM tipo 2 se caracteriza por ser más frecuente, representa aproximadamente el 90 por ciento de todos los casos de diabetes en todo el mundo. Según el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades del Ministerio de Salud (CDC – MINSA), hasta setiembre del año 2022 se registró 19,842 casos de diabetes en el Perú, los cuales el 96.5 por ciento corresponde a diabetes tipo 2 y el 1.4 por ciento diabetes tipo 1 (Ministerio de Salud, 2022).

Para el tratamiento de la DM tipo 2 resulta primordial disminuir la hiperglucemia. Esta disminución se puede lograr a través de la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, las cuales regulan la absorción de los hidratos de carbono. La α -amilasa participa en la degradación de cadenas largas de almidón y la α -glucosidasa en la descomposición de los oligosacáridos y disacáridos (Kajaria *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018).

La medicina contemporánea ofrece una gran variedad de fármacos para el tratamiento de la DM entre ellos se encuentran acarbosa, miglitol y voglibosa; sin embargo, genera efectos secundarios como distensión abdominal, meteorismo, hinchazón, flatulencia y posiblemente diarrea (Stojkovic *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018).

En la antigüedad la diabetes se trataba con diversas plantas medicinales en diversas culturas de todo el mundo (Marles y Farnsworth, 1995). Actualmente, se ha demostrado por estudios experimentales y clínicos (López, 2006; Kajaria *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018; Naveen *et al.*, 2021; Hinad *et al.*, 2022) que las plantas medicinales presentan actividad hipoglucemiante, y se podrían usar terapéuticamente en el tratamiento oral de la DM tipo 2, para excluir los efectos secundarios de los fármacos contemporáneos.

c. ACTIVIDAD HIPOLIPEMIANTE

La obesidad es una enfermedad crónica de alta prevalencia en la población, se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal y es considerado como un factor de riesgos para varias enfermedades asociadas como la diabetes, la hipertensión arterial y las dislipidemias (Rojas *et al.*, 2019; Ruiz *et al.*, 2020).

La obesidad contribuye al desarrollo de dislipidemia (hiperlipidemia) que es una enfermedad metabólica que se caracteriza por presentar altos niveles de colesterol total (CT), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) y triglicéridos (TG) o disminución de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL). Las altas concentraciones de CT o C-LDL aumenta significativamente el riesgo de padecer o morir a causa de una enfermedad cardiovascular. La forma más común es la aterosclerosis, la cual se caracteriza por la acumulación de grasas en el interior de las arterias que disminuye y obstruye el flujo sanguíneo (Ji *et al.*, 2019; Ntchapdaa *et al.*, 2015).

Para el tratamiento de la obesidad resulta primordial disminuir la absorción intestinal de la grasa. Esta disminución se puede lograr a través de la inhibición de la enzima lipasa pancreática, la cual participa en la hidrólisis de triglicéridos ingeridos por el ser humano, dado que al no ser catalizados los triglicéridos no podrán ser absorbidos por el epitelio intestinal para su posterior almacenamiento en el organismo, lo señalado es esquematizado en la Figura 6 (Rojas *et al.*, 2019).

El fármaco que ofrece la medicina contemporánea para la prevención de la obesidad es el Orlistat, el cual evita que algunas grasas de los alimentos consumidos se absorban en el intestino, pese a ello, estudios reportan efectos adversos como heces grasosas, incremento de la flatulencia, incontinencia fecal y trastornos en la absorción de vitaminas liposolubles (Rojas *et al.*, 2019).

En los últimos años se ha intensificado la búsqueda de medicina herbaria como tratamiento alternativo para mejorar el perfil lipídico. Hoy en día, estudios experimentales y clínicos (Ntchapdaa *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2019) reportan que las plantas medicinales poseen actividad hipolipemiante, debido a los compuestos bioactivos que se encuentran en ellos,

tales como compuestos fenólicos y flavonoides, además de que provocan menos efectos secundarios. De tal manera, que las plantas medicinales se podrían usar para el tratamiento y prevención de la obesidad.

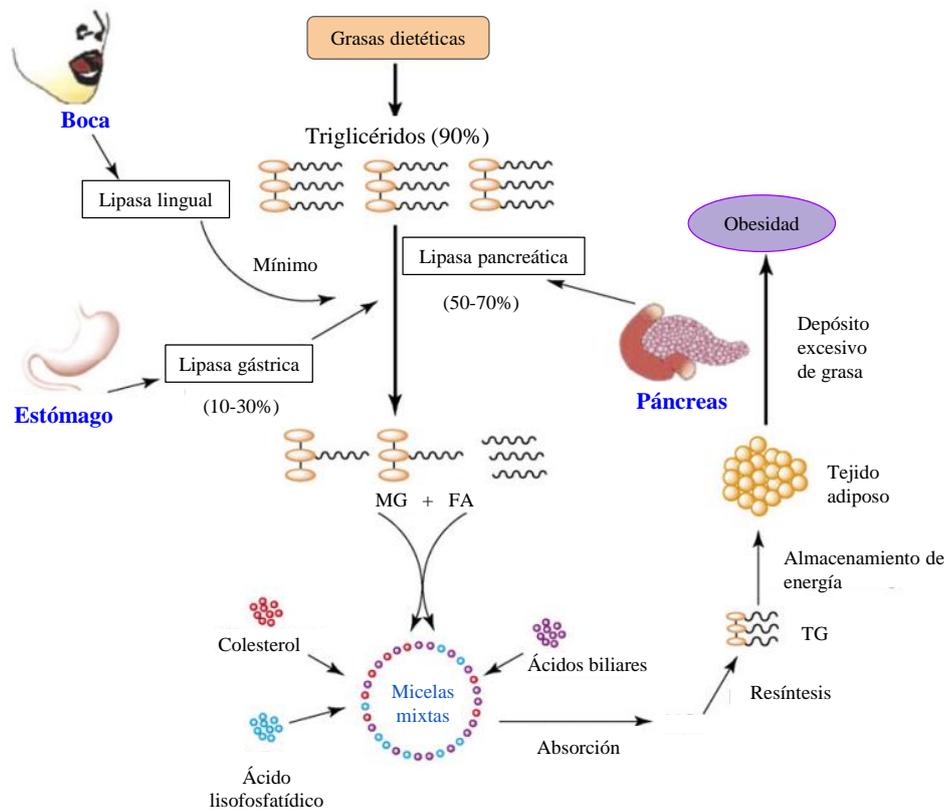


Figura 6: Mecanismo de acción de la lipasa pancreática en la absorción de lípidos

TG: Triglicéridos, MG: Monoacilgliceroles, FA: Ácidos grasos.
 FUENTE: Adaptado de Birari y Bhutani (2007)

d. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La resistencia antimicrobiana (RAM) se define como la capacidad que presentan los microbios (bacterias, virus, parásitos u hongos) de sobrevivir en presencia de un fármaco químico que anteriormente era eficaz para eliminar o inhibir su crecimiento. Actualmente, la RAM bacteriana es una de las mayores amenazas para la salud pública a nivel mundial, esto sucede por el uso excesivo y mala administración de antibióticos (Ecevit *et al.*, 2022). La RAM causa que los fármacos, así como los tratamientos pierdan su efectividad, dando

como resultado una mayor morbilidad y mortalidad de los pacientes, así como una menor atención hospitalaria y un aumento de los costos en el cuidado de la salud (Friedman *et al.*, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (WHO) notificó el incremento de los niveles de resistencia de bacterias causantes de septicemias (*Klebsiella pneumoniae* o *Acinetobacter spp.*), enfermedad de transmisión sexual (*Neisseria gonorrhoeae*), infección de las vías urinarias (*Escherichia coli*) entre otros (PAHO/WHO, 2022). En el Perú, se han observado elevados niveles de resistencia de bacterias responsables de infecciones tales como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus pneumoniae*). Asimismo, se ha registrado resistencia de bacterias causantes de enfermedades como la gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*) y la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) (Quino y Alvarado, 2021).

En los últimos años se ha incrementado la búsqueda de agentes antibióticos de origen natural. Diversos estudios reportan que los compuestos fenólicos extraídos de diversas fuentes naturales, principalmente de plantas, presentan una actividad antimicrobiana. Esto los posiciona en candidatos de gran interés para combatir las infecciones microbianas y prevenir la aparición de cepas resistentes a los fármacos (Ecevit *et al.*, 2022).

2.2.5. APLICACIONES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

A continuación, se detalla las aplicaciones que están presentando los compuestos fenólicos en la industria alimentaria:

a. PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Actualmente, se evidencia un interés creciente en desarrollar películas y recubrimientos comestibles para el envasado de alimentos, a partir de la incorporación de compuestos activos que puedan inhibir eficazmente la oxidación y el deterioro microbiano. Este interés surge a raíz del impacto negativo en la salud asociado al uso de aditivos sintéticos para la conservación de productos alimenticios (De Araújo *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2022).

Estudios han demostrado que los compuestos fenólicos pueden usarse como fuentes factibles y eficientes en películas y recubrimientos comestibles. Por ejemplo, Zhang *et al.* (2018) reportaron que el empleo de antocianinas extraídas de la flor de Jamaica junto con polímeros biodegradables del almidón permitió obtener una película inteligente que posee la capacidad de medir el pH, lo que facilita el monitoreo de la frescura de la carne de cerdo. De manera similar, Kanatt (2020) reportó que utilizando un extracto de hoja de *Amaranthus* rico en compuestos fenólicos junto con alcohol polivinílico y gelatina, permitió obtener una película que aumentó la vida útil y facilita el monitoreo de la frescura de la carne de pollo y del pescado.

b. COLORANTES NATURALES

En los últimos años, existe una mayor conciencia que el uso de colorantes sintéticos ocasiona efectos adversos sobre la salud. Como resultado de esta preocupación, se ha incrementado la búsqueda de colorantes naturales en la industria alimentaria, se encontraron que los compuestos fenólicos que presentan un gran potencial para ser utilizados como colorantes naturales, brindando tonalidades de rojo, amarillo-naranja, azul y verde. Además, estos compuestos brindan un alto valor agregado y tienen un costo relativamente bajo (De Araújo *et al.*, 2021).

Diversos estudios han demostrado que las antocianinas son utilizadas como colorantes naturales en la industria de bebidas, láctea (yogurt) y confitería (caramelos, chicles, gomitas). Por ejemplo, Luna *et al.* (2018) indicaron que el uso de las antocianinas extraídas a partir de la mazorca de maíz morado sirve como colorante natural en bebidas. Además, Matus *et al.* (2022) reportaron que las antocianinas extraídas del rábano funcionaron como un colorante natural en el yogurt, y además brindó un valor agregado al producto debido a que las antocianinas presentan propiedades antioxidantes. De manera similar, Saberian *et al.* (2021) señalaron que las antocianinas a partir de col lombarda pueden emplearse como colorante natural en gomitas bajas en calorías.

Si bien la mayoría de los estudios se han enfocado en el uso de las antocianinas, se debe tener en cuenta que existen otros compuestos fenólicos que presentan el mismo potencial

para usarse como colorantes naturales, tales como ácidos fenólicos y otras clases de flavonoides (De Araújo *et al.*, 2021).

c. INGREDIENTES PREBIÓTICOS

El efecto prebiótico se define como la estimulación del crecimiento de bacterias probióticas que equilibran la microflora intestinal y otorgan beneficios para la salud del huésped. Actualmente, estudios reconocen que los compuestos fenólicos sirven como prebióticos, debido a la capacidad que presentan para modificar la composición de la microflora intestinal del huésped (Aravind *et al.*, 2021; De Araújo *et al.*, 2021).

Por ejemplo, Jiao *et al.* (2019) indicaron que el extracto de polifenol a partir de arándano sirvió como un agente prebiótico para ratones de la cepa consanguínea C57BL/6J que fueron inducidos a obesidad a través de una dieta alta en grasas. Esto se debe a que el extracto influyó la composición de la microflora intestinal, aumentó el crecimiento y establecimiento de bacterias probióticas del género *Bifidobacterium*, y contribuyó a que mejore el metabolismo de los lípidos y una disminución de la obesidad. De manera similar, Moreno *et al.* (2016) indicaron que la ingesta de vino tinto rico en polifenoles aumentó el crecimiento de bacterias probióticas del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y bacterias productoras de butirato (*Faecalibacterium prausnitzii* y *Roseburia*) las cuales han sido asociados con la inhibición de enfermedades metabólicas como obesidad, diabetes e inflamación.

2.3. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO

2.3.1. FUNDAMENTO

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) es una tecnología que se caracteriza por generar energía mecánica a través de las ondas de ultrasonido. Estas ondas causan la ruptura de la pared celular, esto contribuye a que incremente la penetración del solvente y permita la liberación de los compuestos fenólicos (Medina, 2017).

En la Figura 7, se muestra el paso a paso de cómo se realiza la EAU. Donde: 1) La muestra se coloca en el recipiente. 2) Se añade solvente de extracción. 3) La sonda de ultrasonido se pone en contacto con la muestra. 4) La propagación e implosión de cavidades de ultrasonido conduce a altas temperaturas y presiones localizadas que dan como resultado una extracción mejorada. 5) Se obtiene la muestra extraída (Wegglar *et al.*, 2020).

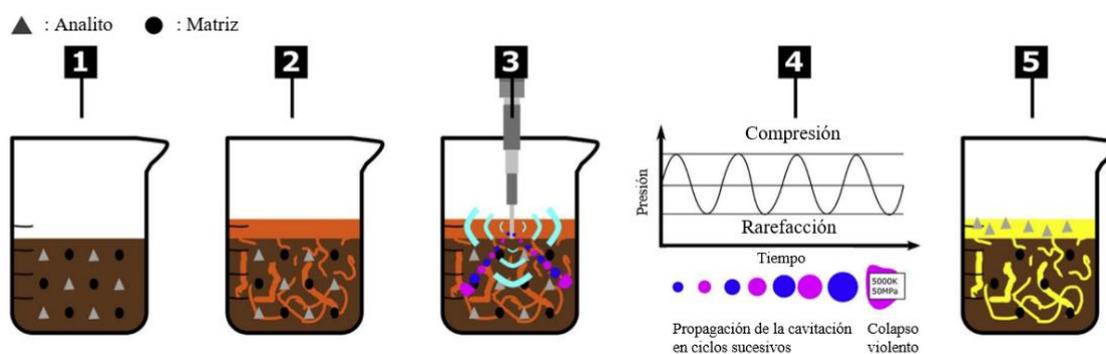


Figura 7: Principio de la Extracción Asistida por Ultrasonido

FUENTE: Adaptado de Wegglar *et al.* (2020)

Esta tecnología a diferencia de otras presenta como ventaja la reducción de los tiempos de extracción y los volúmenes de solventes de extracción. Asimismo, la capacidad de que el solvente de extracción penetre con facilidad mejora y con ello genera una mayor recuperación de los compuestos bioactivos (Kumar *et al.*, 2021).

2.3.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Entre los factores implicados en la EAU se encuentra principalmente la frecuencia, la potencia, el ciclo de trabajo, la temperatura, el tiempo, el tipo de solvente y la relación líquido-sólido. Estas deben evaluarse para conocer el efecto positivo o negativo sobre la muestra, y con ello poder realizar una optimización (Wegglar *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021). A continuación, se detalla los factores que se estudiarán en la presente investigación:

a. TEMPERATURA

El aumento de la temperatura en un inicio aumenta el rendimiento de la EAU, por incremento de la propiedad de desorción y la solubilidad del soluto en el solvente. Sin embargo, el aumento adicional de la temperatura disminuye el rendimiento debido al efecto de cavitación debilitado. Esto se debe a que las burbujas que se forman implosionan con menor intensidad y disminuye el daño a la ruptura de la pared celular, lo cual reduce el rendimiento (Kumar *et al.*, 2021).

Es fundamental seleccionar una temperatura de extracción acorde al compuesto objetivo de extracción, con el fin de evitar la degradación de compuestos termolábiles (Chemat *et al.*, 2016). En el caso de los compuestos fenólicos, se ha observado que temperaturas elevadas (>50 °C) afectan su integridad, y que aquellos compuestos fenólicos de bajo peso molecular son más sensibles ante la presencia de calor (Medina, 2017; Soto, 2022).

b. TIEMPO

El tiempo de extracción es un parámetro que puede influir positivamente o negativamente en el rendimiento de la EAU. Por lo general, el aumento inicial en el tiempo de extracción, hace que el efecto de cavitación del ultrasonido mejore el hinchamiento, la hidratación, la fragmentación y la formación de poros de la matriz de tejido vegetal de donde se extraerá el soluto. En cambio, la extracción por ultrasonido durante mucho tiempo causa daño estructural al soluto y disminuye el rendimiento de extracción. Además, un tiempo de extracción superior al necesario puede inducir el aumento de los costos energéticos y operativos del proceso (Kumar *et al.*, 2021; Tomšik *et al.*, 2016).

c. SOLVENTE

La selección del solvente apropiado para la EAU está determinada por la polaridad, el punto de fusión, el punto de ebullición, densidad, gravedad específica, la afinidad hacia el compuesto objetivo, así como la pureza y la actividad del compuesto extraído. Para la EAU de compuestos fenólicos se han utilizado diferentes solventes, tales como agua acidulada, etanol, alcoholes, acetona, agua entre otros (Chemat *et al.*, 2016; Dzah *et al.*, 2020).

Numerosos estudios señalan que el etanol posee la mayor afinidad para la extracción de compuestos fenólicos. Además, el etanol destaca como un solvente ideal por ser fácil de conseguir y ser una sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS, de sus siglas en inglés, *Generally Recognized as Safe*). La concentración de etanol es uno de los factores más importantes que afecta el rendimiento durante la EAU. El objetivo a largo plazo, es eliminar el uso de etanol al momento de realizar la extracción; sin embargo, hasta el momento solo ha sido posible reducir la cantidad de volumen que se utiliza (Kumar *et al.*, 2021).

2.4. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE RESPUESTA

La Metodología de Superficie Respuesta (MSR) se describe como un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que se utilizan para la construcción de modelos empíricos. Esta metodología fue descrita por primera vez por Box y Wilson en 1951 para mejorar y optimizar los procesos de producción en la industria química. Posteriormente, a raíz de la investigación llevada a cabo por Taguchi sobre el Método Taguchi, junto con los diversos diseños de experimentos desarrollados por Myers y Montgomery, la Metodología de Superficie de Respuesta ha evolucionado hasta alcanzar su forma actualmente reconocida (Sarabia *et al.*, 2019; Amago, 2001).

La MSR se puede utilizar para modelar y optimizar cualquier respuesta que esté influenciada por dos o más factores de carácter cuantitativo. En los últimos años, la MSR ha captado la atención de las diferentes industrias. Actualmente, la industria alimentaria está empleando esta metodología para modelar y optimizar el proceso de extracción de compuestos bioactivos, tales como extracción convencional, extracción asistida por microondas, extracción con fluido supercrítico y extracción asistida por ultrasonido (Sarabia *et al.*, 2019; Weremfo *et al.*, 2022).

2.4.1. ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN

Existen tres etapas para la búsqueda del punto óptimo, los cuales son: cribado, búsqueda I o de primer orden y búsqueda II o de segundo orden (Gutiérrez y De la Vara, 2008). A continuación, se describe brevemente cada una de estas etapas:

a. SCREENING o CRIBADO

La optimización de un proceso se inicia con esta etapa cuando tiene muchos factores que influyen en la variable de interés. En esta etapa es necesario realizar un experimento para identificar los pocos factores que tienen mayor influencia, dicho de otro modo, conocer que factores son significativos (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

b. BÚSQUEDA I O DE PRIMER ORDEN

Esta etapa se aplica cuando se tienen pocos factores, y se sabe que éstos influyen en la variable de respuesta. En esta etapa se corre un diseño de primer orden que permita caracterizar en forma preliminar el tipo de superficie de respuesta y detectar la presencia de curvatura. Los diseños experimentales que se ajustan a un modelo lineal o de primer orden son Diseño Factorial Completo o Fraccionado con repeticiones al centro (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

c. OPTIMIZACIÓN FINAL

Esta etapa comienza en el momento que se detecta la presencia de curvatura, o bien, cuando la superficie es más complicada que un hiperplano, de tal manera que se corre o se completa un diseño de segundo orden para caracterizar mejor la superficie y modelar la curvatura. Los diseños experimentales se ajustan a un modelo de segundo orden son los siguientes: Diseño Central Compuesto y Diseño Box-Behnken (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

El diseño Box-Behnken (DBB) se utiliza con frecuencia para mejorar los modelos después de haber determinado los factores importantes, a través de diseños de cribado o diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta. Además, el DBB genera una superficie de respuesta mayor utilizando un menor número de corridas experimentales, por consiguiente, su ejecución resulta menos costosa (Myers *et al.*, 2016; Ramón, 2019).

Myers *et al.* (2016) y Ramón (2019) indican que el DBB presenta las siguientes características:

- Requieren un número de experimentos (N), el cual se determina con la siguiente fórmula: $N = 2k(k - 1) + C_0$, donde k es el número de factores y C_0 es el número de puntos centrales.
- Cada factor (variable independiente) presenta 3 niveles, los cuales son valores igualmente espaciados y se codifican de la siguiente manera (-1, 0, +1).
- Es un diseño esférico, ya que todos los puntos están localizados en los bordes del cubo a una distancia de $\sqrt{2}$ del centro de diseño. De tal manera, no presenta puntos factoriales ni puntos axiales.

2.4.2. OPTIMIZACIÓN MULTI-RESPUESTA

La optimización multi-respuesta permite considerar diversas variables respuestas para obtener un resultado con mejores propiedades. En el caso que se realice la optimización con una característica resultaría inadecuado para las otras características. Por esta razón, es necesario primero construir un modelo de superficie para cada variable respuesta, y después encontrar un conjunto de condiciones que optimice todas las características de interés (variables respuestas) (Gutiérrez y De la Vara, 2008; Pandia, 2020).

Dentro de la metodología de optimización multi-respuesta, se han propuesto diversos enfoques por distintos investigadores. Gutiérrez y De la Vara (2008) lo clasifican en dos métodos: Método gráfico y Método de la función de deseabilidad.

a. MÉTODO GRÁFICO

Se caracteriza por emplear la superposición de gráficas de contornos para abordar problemas de optimización de múltiples respuestas. Este método es directo y sencillo; sin

embargo, cuenta con limitaciones en sistemas extensos, es decir, en aquellos que se utilizan numerosas variables independientes y variables respuestas (Rubio, 2019).

b. MÉTODO DE LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD

El método de la función de deseabilidad fue propuesto originalmente por Harrington, y después fue mejorado por Derringer y Suich en el año 1980. Este método consiste en convertir cada función de respuesta en una función de deseabilidad y luego se busca maximizar la media geométrica de estas funciones de deseabilidad para obtener el punto óptimo buscado, para esto se requiere que todas las Y estén en la misma escala (Cruz, 2011; Rubio, 2019).

Esto se realiza mediante la conversión de cada respuesta predicha (y_i) en un valor de deseabilidad individual (d_i) que se sitúa en el rango de 0 a 1. En este contexto, $d_i= 1$ indica que la respuesta y_i cumple con su valor deseado; mientras que $d_i= 0$ señala que la respuesta se encuentra fuera de una región aceptable. La transformación de los valores d_i se realiza en función de las especificaciones y del valor objetivo de cada Y. Posteriormente, se seleccionan las variables del diseño con el fin de maximizar la condición de deseable global:

$$D = (d_1 * d_2 * \dots * d_n)^{1/n}$$

Donde: n = Respuestas.

La forma de la función de deseabilidad puede especificarse con transformaciones unilaterales o bilaterales, su uso depende si la investigación busca maximizar o minimizar la respuesta, o si se pretende alcanzar un valor objetivo (Cruz, 2011).

En la Figura 8, se muestran las transformaciones unilaterales y bilaterales. Donde: (1) La función de deseabilidad unilateral a utilizar cuando su objetivo es maximizar una respuesta. (2) La función de deseabilidad unilateral a utilizar cuando su objetivo es minimizar una respuesta. (3) La función de deseabilidad bilateral a utilizar cuando su objetivo es que y esté tan cerca como sea posible de la especificación (Montgomery, 2011).

Además, en la Figura 8 se aprecia que en el eje de las abscisas las letras L, T y U; la letra “T” representa el objetivo de una variable respuesta; mientras que la letra “L” y “U” significa el mínimo y máximo valor aceptable, respectivamente (Cruz, 2011; Pandia, 2020).

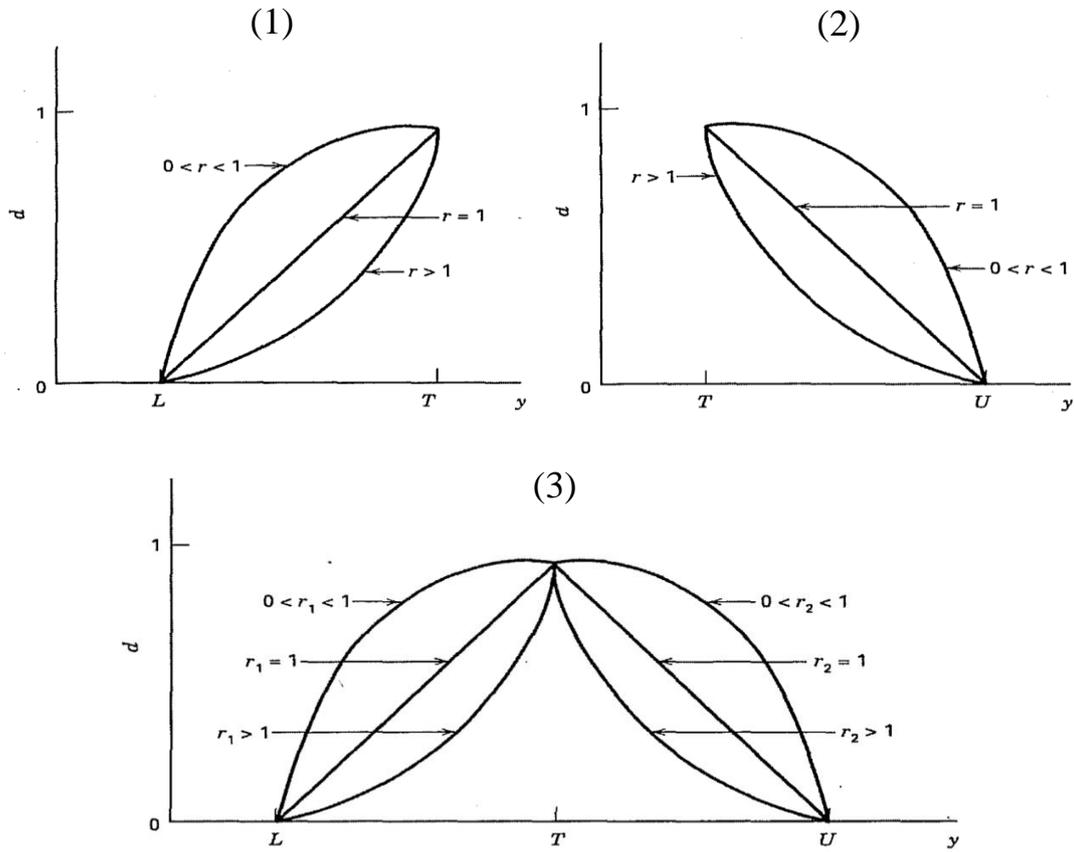


Figura 8: Funciones con condición de deseables individuales para la optimización simultánea

FUENTE: Adaptado de Montgomery (2011)

III. METODOLOGÍA

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se desarrolló en las instalaciones del área de Biotecnología Industrial & Bioprocesos del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.2. MATERIA PRIMA

- Hojas de las plantas de Cedroncillo (*Aloysia herrerae* Moldenke), provenientes del sector Tucsa, distrito de Pisac, provincia de Calca, región de Cusco.
- Hojas de las plantas de Pampa muña (*Hedeoma mandoniana* Wedd), provenientes de la Comunidad de Pampahuasi, distrito de Túpac Amaru, provincia de Canas, región de Cusco.

Las plantas fueron recolectadas durante la etapa de floración e identificadas en el Herbario Augusto Weberbauer de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.3. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

3.3.1. EQUIPOS

- Agitador magnético con placa calefactora (CAT, M6, Alemania)
- Agitador orbital (Heidolph, Polymax 2040, Alemania)
- Agitador vórtex (Heidolph, Reax control, Alemania)
- Balanza analítica (OHAUS, AR2140, EE. UU.)

- Baño de calentamiento recirculante (Julaba, ED-5M, Alemania)
- Bomba de vacío (Vacuumbrand, ME2C, Alemania)
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf, 5804R, Alemania)
- Congeladora (Electrolux, H300, Brasil)
- Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (Waters, 2695, EE. UU.) acoplado a detector de arreglo de diodos (PDA) (Waters, 2996, EE. UU.)
- Cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) (Waters, Acquity UPLC H-Class, Irlanda) acoplado a detector de arreglo de diodos (PDA) (Waters, Acquity UPLCH-Class, Irlanda)
- Equipo digital de baño seco (Benchmark Scientific, BSH 1004, EE. UU.)
- Estufa de vacío (VWR, 1400E-2, EE. UU.)
- Espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Genesys 10 UV/Vis, EE. UU.)
- Lector de microplacas de fluorescencia (BioTek, Synergy 2, EE. UU.)
- Lector de microplacas UV/Vis (BioTek, EON, EE. UU.)
- Microcentrífuga (Hettich, Mikro 120, Alemania)
- Molino de laboratorio (IKA, A11 basic, Alemania)
- Potenciómetro (Thermo Orion, Star A211, EE. UU.)
- Placa calefactora (Faithful, SH-4A, China)
- Refrigeradora (LG, GR-482BEF, Corea)
- Rotavapor (Heidolph, Laborotta 4000, Alemania)
- Secador de bandejas (E&H, Eurf. 200t, Perú)
- Sistema de purificación de agua (Merck, Simplicity UV, Alemania)
- Ultracongeladora (Panasonic, MDF-U5586SC-PA, Japón)
- Ultrasonido (Branson Ultrasonics Corporation, Branson SFX250, EE. UU.) con transductor (Branson Ultrasonics Corporation, 102C, México) y sonotrodo de ½” de diámetro (Branson Ultrasonics Corporation, 101-147-037, EE. UU.)

3.3.2. MATERIALES

- Material de plástico: tubos de reacción de 1, 2 y 5 mL, tubos cónicos para centrífuga de 15 y 50 mL, puntas para pipetas, microplaca de color blanco (Brand, 781605, Alemania) y microplaca de color transparente (Brand, 781602, Alemania) entre otros.

- Material de vidrio: matraces Erlenmeyer, probetas graduadas, tubos de ensayo, placas petri, vasos de precipitado, frascos color ámbar, bagueta entre otros.
- Micropipetas monocanal de 20-200 μL , 100-1000 μL y 500-5000 μL (Brand TransferpetteTM S, Alemania).
- Micropipeta multicanal de 30-300 μL (Brand TransferpetteTM S, Alemania).
- Columna cromatográfica Acquity UPLC® BEH C₁₈ (1.7 μm , 100 mm x 2.1 mm DI) (Waters, Irlanda) y precolumna VanGuard BEH C₁₈ (1.7 μm , 5 mm x 2.1 mm DI) (Waters, Irlanda).
- Columna cromatográfica Symmetry C₁₈ (5 μm , 150 mm x 4.6 mm DI) (Waters, Irlanda) y precolumna Symmetry C₁₈ (5 μm , 20 mm x 3.9 mm DI) (Waters, Irlanda).
- Filtro PTFE hidrófilo de 0.20 μm (Merck Millipore, SLLGR04NL, Japón).
- Tamices de malla de 106 μm y de 500 μm (WS Tyler, EE. UU.).
- Otros materiales: Termómetro, bolsas Ziploc, espátulas, gradillas, magnetos, papel aluminio.

3.3.3. REACTIVOS

- AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro) (Sigma Aldrich, EE. UU.)
- ABTS (Acido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) (Sigma Aldrich, EE. UU.)
- Acetato de etilo grado HPLC (J.T. Baker, EE. UU.)
- Acetona (J.T. Baker, EE. UU.)
- Acetonitrilo (J.T. Baker, EE. UU.)
- Ácido clorhídrico (J.T. Baker, México)
- Ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, EE. UU.)
- Alcohol etílico (J.T. Baker, EE. UU.)
- Almidón soluble (J.T. Baker, EE. UU.)
- Carbonato de sodio (J.T. Baker, EE. UU.)
- Cloruro de calcio dihidrato (Merck, Alemania)
- Cloruro de sodio (Merck, Alemania)
- DMACA (*p*-(dymethyl-amino) cinnamaldehyde) (Sigma Aldrich, EE. UU.)

- Enzimas: α -amilasa pancreática porcina VI-B (Sigma Aldrich, EE. UU.), α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* Tipo I (Sigma Aldrich, EE. UU.), enzima convertidora de la angiotensina-I de pulmón de conejo (Sigma Aldrich, EE. UU.) y lipasa pancreática de porcino (Sigma Aldrich, EE. UU.)
- Estándares de compuestos fenólicos: ácido gálico, catequina, quercetina, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, luteolina, apigenina, naringenina entre otros (Sigma Aldrich, EE. UU.)
- *p*- nitrofenil- α -D-glucopiranososa (Sigma Aldrich, EE. UU.)
- Folin- Ciocalteu 2 N (Merck, Alemania)
- Fosfato de potasio monobásico (Fermont, México)
- Fosfato de potasio dibásico (Fermont, México)
- Fosfato de sodio dibásico (Merck, Alemania)
- Fosfato de sodio monobásico (Merck, Alemania)
- Hidróxido de sodio en perlas (Fermont, México)
- Metanol (J.T. Baker, EE. UU.)
- N-Hipuril-histidil-leucina hidratada 95% (Sigma Aldrich, EE. UU.)
- Tartrato de sodio y potasio (Merck, Alemania)
- Tetraborato de sodio anhidro 99.99 por ciento (Sigma Aldrich, EE. UU.)
- Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico) (Sigma Aldrich, EE. UU.)
- 3,5-ácido dinitrosalicílico (Sigma Aldrich, EE. UU.)
- 4-Metilumbeliferil oleato (Sigma Aldrich, EE. UU.)

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

El contenido de humedad se determinó de acuerdo con el método 934.01 (AOAC, 2016). En una placa fueron pesados aproximadamente 1 gramo de muestra. Posteriormente, se colocó en una estufa a una presión de vacío 25 pulg de Hg y temperatura de 80 °C, hasta obtener peso constante. El contenido de humedad se determinó por triplicado para cada muestra y se expresaron en porcentaje. La expresión para estimar el contenido de humedad es:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{P_h - P_s}{P_h} \times 100$$

Donde: P_h : Peso de muestra húmeda (g). P_s : Peso de muestra seca (g)

3.4.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Para la preparación del extracto, se pesó 0.5 g de muestra en un tubo cónico para centrifuga de 50 mL y se mezcló con 12.5 mL de metanol al 80 por ciento. Posteriormente, se llevó a agitación durante 10 minutos. Se llevó a almacenamiento bajo refrigeración por 24 horas. El extracto obtenido se llevó a centrifugar a 6000 RPM (4951 g) por un tiempo de 10 minutos y se separó el sobrenadante. El sobrenadante obtenido se almacenó en envase ámbar y se guardó en refrigeración hasta su posterior análisis.

Los compuestos fenólicos totales se midieron por el método de Folin-Ciocalteu según lo descrito por Singleton y Rossi (1965). Este método se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, la cual se lleva a cabo a pH básico, y para ello se emplea una disolución de carbonato de sodio. La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra da lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 755 nm.

La cuantificación de los compuestos fenólicos totales se realizó en tubos de ensayo de 5 mL de capacidad y protegidos de la luz se colocaron 500 μ l de extracto de muestra diluida, 250 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y 1250 μ l de carbonato de sodio (75 g/L). Posteriormente, se procedió a homogeneizar la mezcla en un vórtex y se dejó reposar por un tiempo de 30 minutos en oscuridad. Después, se midió la absorbancia de la mezcla a 755 nm frente a un blanco (500 μ l de agua destilada en lugar de la muestra) en un espectrofotómetro UV/Vis. Los resultados se calcularon sobre la base de una curva de calibración de ácido gálico y se expresaron como ácido gálico equivalente por gramo de muestra en base seca (mg AGE/g bs). Las muestras se analizaron por triplicado y se calculó el valor promedio y la desviación estándar.

3.4.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS LIBRES

Para la obtención del extracto se siguió lo descrito por Gálvez *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Para esta etapa, se pesó una cantidad de 0.5 g de muestra en un tubo cónico para centrífuga de 50 mL y se mezcló con 2 mL de metanol/acetona/agua (45:45:10, v/v/v). Posteriormente, se llevó a agitación a 200 RPM durante 1 hora y a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada a 6000 RPM (4951 g) por 15 minutos, el sobrenadante fue recuperado y sobre el residuo se realizó una segunda extracción bajo las mismas condiciones, pero por 30 minutos. Luego, la mezcla homogeneizada se centrifugó a 6000 RPM (4951 g) por 15 minutos y se recuperó el segundo sobrenadante. Ambos sobrenadantes se juntaron, y se almacenó en un envase ámbar a una temperatura de -20 °C, hasta su posterior análisis.

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos libres se siguió el mismo procedimiento para la cuantificación de compuestos fenólicos totales (3.4.2). Los resultados se expresaron como ácido gálico equivalente por gramo de muestra en base seca (mg AGE/g bs). Las muestras se analizaron por triplicado y se calculó el valor promedio y la desviación estándar.

3.4.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS LIGADOS

Para la obtención del extracto se siguió lo descrito por Gálvez *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Para esta etapa, se pesó una cantidad de 0.5 g de muestra en un tubo cónico para centrífuga de 50 mL y se mezcló con 2 mL de metanol/acetona/agua (45:45:10, v/v/v). Posteriormente, se llevó a agitación a 200 RPM durante 1 hora y a temperatura de ambiente. La mezcla homogeneizada fue centrifugada a 6000 RPM (4951 g) por 15 minutos, el sobrenadante fue eliminado y sobre el residuo se realizó una segunda extracción bajo las mismas condiciones y por 30 minutos. Luego, la mezcla homogeneizada se centrifugó a 6000 RPM (4951 g) por 15 minutos y se eliminó el segundo sobrenadante. Al residuo obtenido se le adicionó 20 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 3N. La hidrólisis alcalina fue realizada bajo agitación a 200 RPM por 88 minutos y a temperatura ambiente. Luego, la mezcla obtenida fue neutralizada a un pH de 2.5-3.0 con ácido clorhídrico concentrado. Después, se realizó dos veces la partición con 10 mL de

acetato de etilo. Luego, se juntó las fracciones de acetato de etilo y se concentró al vacío a 45 °C hasta sequedad. Los compuestos fenólicos fueron reconstituidos en agua Milli-Q (5 mL). El extracto acuoso final fue almacenado en envases ámbar y se conservó a una temperatura de -20 °C, hasta su posterior análisis.

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos ligados se siguió el mismo procedimiento para la cuantificación de compuestos fenólicos totales (3.4.2). Los resultados se expresaron como ácido gálico equivalente por gramo de muestra en base seca (mg AGE/g bs). Las muestras se analizaron por triplicado y se calculó el valor promedio y la desviación estándar.

3.4.5. DETERMINACIÓN DE FLAVANOLES TOTALES

Se siguió el método propuesto por Delcour y Varebeke (1985) con algunas modificaciones. Se empleó el extracto obtenido para el análisis de compuestos fenólicos totales (3.4.2). En tubos de ensayo protegidos de la luz se colocó 200 µL de muestra diluida y 1000 µL del reactivo cromogénico (DMACA). Luego, se procedió a homogeneizar la mezcla en un vórtex y se midió la absorbancia de la mezcla a 640 nm frente a un blanco (200 µl de agua en lugar de la muestra) en un espectrofotómetro UV/Vis. Los resultados se calcularon sobre la base de la curva de calibración de catequina y se expresaron como mg catequina equivalente por gramo de muestra en base seca (mg catequina/g bs). Las muestras se analizaron por triplicado y se calculó el valor promedio y la desviación estándar.

3.4.6. DETERMINACIÓN DE FLAVONOLES TOTALES

Se siguió el método propuesto por Chang *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Se empleó el extracto obtenido para el análisis de compuestos fenólicos totales (3.4.2). En tubos de ensayo protegidos de la luz se colocó 250 µL de muestra diluida, 750 µL de etanol al 96 por ciento, 50 µL de cloruro de aluminio al 10 por ciento, 50 µL de acetato de potasio 1 M y 1400 µL de agua destilada. Luego, se procedió a homogeneizar la mezcla en un vórtex y se dejó reposar por 30 minutos en oscuridad. Después, se midió la absorbancia de la mezcla a 415 nm frente a un blanco (250 µl de agua en lugar de la muestra) en un espectrofotómetro UV/Vis. Los resultados se calcularon sobre la base de la curva de

calibración de quercetina y se expresaron como mg quercetina equivalente por gramo de muestra en base seca (mg quercetina/g bs). Las muestras se analizaron por triplicado y se calculó el valor promedio y la desviación estándar.

3.4.7. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó la capacidad antioxidante por los siguientes métodos:

a. MÉTODO ABTS

Se empleó el extracto obtenido para el análisis de compuestos fenólicos totales (3.4.2). El análisis ABTS se realizó de acuerdo con lo propuesto por Arnao *et al.* (2001). En tubos de ensayo protegidos de la luz se colocó 150 μ l de extracto de muestra diluida con 2850 μ l de la solución diluida de ABTS⁺⁺. Luego, se procedió a homogeneizar la mezcla en un vórtex y se dejó reposar por 1 hora y 30 minutos en oscuridad. Al concluir este tiempo, se midió la absorbancia de la mezcla a 734 nm frente a un blanco (150 μ l de metanol en lugar de la muestra) en un espectrofotómetro UV/Vis. Los resultados se calcularon a partir de una curva estándar elaborada con Trolox y se expresaron como μ mol de Trolox equivalente por gramo en base seca (μ mol TE/g bs). Las muestras se analizaron por triplicado y se calculó el valor promedio y la desviación estándar.

b. MÉTODO ORAC

Se empleó el extracto obtenido para el análisis de compuestos fenólicos totales (3.4.2). El análisis ORAC se realizó de acuerdo con lo propuesto por Ou *et al.* (2001) y Huang *et al.* (2005). Se empleó una microplaca donde se colocó 25 μ L del blanco que es el buffer fosfato (75 mM, pH 7.4), las muestras diluidas y las diluciones de la curva Trolox. Posteriormente, la microplaca ingreso al lector de microplacas de fluorescencia, aquí fue incubada durante 10 minutos a 37 °C con 250 μ L de fluoresceína (55 nM) hasta la inyección de 25 μ L de solución de AAPH (153 nM). La fluorescencia fue medida cada minuto durante un tiempo de 50 minutos. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de excitación de 485 nm y a una longitud de onda de emisión de 528 nm. Los resultados se calcularon a partir de una curva estándar elaborada con Trolox y se expresaron como μ mol

de Trolox equivalente por gramo en base seca ($\mu\text{mol TE/g bs}$). Las muestras se analizaron por triplicado y se calculó el valor promedio y la desviación estándar.

3.4.8. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UPLC®-PDA

El presente análisis se realizó de acuerdo con el método reportado por Campos *et al.* (2022). Se utilizó el extracto óptimo de compuestos fenólicos obtenido por ultrasonido. El análisis se realizó en un Cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) (Waters, Acquity UPLC H-Class, Irlanda) acoplado a detector de arreglo de diodos (PDA) (Waters, Acquity UPLCH-Class, Irlanda) y se empleó el software Empower. La separación cromatográfica se realizó en una columna Acquity UPLC® BEH C18 ($1.7 \mu\text{m}$, $100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm DI}$) (Waters, Irlanda) con precolumna VanGuard BEH C18 ($1.7 \mu\text{m}$, $5 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm DI}$) (Waters, Irlanda).

La fase móvil estuvo compuesta por dos solventes: agua con ácido fórmico al 0.1 por ciento (Solvente A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 por ciento (Solvente B). El gradiente fue el siguiente: se inició con 2% B por 2 min, se aumentó al 7% B a los 4 min, 12% B a los 15 min, 26% B a los 20 min, 55% B a los 25 min, 95% B a los 26 min, se mantuvo al 95% B hasta los 29 min, disminuyó de 95% a 2% B en 1 min, y finalmente se mantuvo al 2% B durante 3 min (para retomar las condiciones iniciales).

El análisis total se realizó en 30 min, la columna se mantuvo a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y el caudal fue de 0.2 ml/min y la muestra inyectada fue $2 \mu\text{L}$. La detección se monitoreó en el espectro UV-Vis ($200 \text{ a } 700 \text{ nm}$). Los compuestos fenólicos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención y espectros de absorción de estándares previamente inyectados.

3.4.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

Se evaluó midiendo el grado de inhibición de las enzimas digestivas α -amilasa y α -glucosidasa siguiendo la metodología del Manual Enzimático de Worthington (1993).

a. ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA α -AMILASA

La detección de la inhibición de la enzima α -amilasa se realizó de acuerdo con lo propuesto por Worthington (1993) con ligeras modificaciones. En tubos de ensayo con tapa rosca de 20 mL de capacidad se colocó 100 μ l de muestra (obtenido según ítem 3.4.2.). Posteriormente, se agregó 100 μ l de la enzima α -amilasa (0.5 mg/mL) en buffer fosfato de sodio 0.02 M (pH 6.9 con 0.006 M NaCl). Luego, se homogeneizó y pre-incubó durante 10 min a 25 °C. Después de la pre-incubación, se agregó 100 μ l de solución de almidón al 1 por ciento en buffer fosfato de sodio 0.02 M y se incubó la mezcla durante 10 min a 25 °C. Para detener la reacción se añadió 1 mL de DNS, esta solución se obtuvo mezclando 10 g de ácido dinitrosalicílico en 500 mL de agua destilada con 300 g de tartrato de sodio y potasio, y 200 mL de NaOH 2N, enrasando la mezcla hasta 1000 mL con agua destilada. Posteriormente, se colocaron las tapas roscas a los tubos para incubar en baño maría a 100 °C por 10 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y a la mezcla reactante se diluyó agregando 5 mL de agua destilada para medir la absorbancia a 540 nm. La absorbancia final de la muestra se obtuvo por sustracción de la lectura del blanco de muestra, que contiene 100 μ L de buffer en lugar de la solución enzimática. La muestra se comparó con un control que contiene 100 μ L de agua destilada en lugar de muestra. La actividad inhibitoria de la enzima α -amilasa se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Actividad inhibidora de } \alpha\text{-amilasa (\%)} = \frac{A_{(\text{control})} - ((A_{(\text{muestra})} - A_{(\text{blanco de muestra})})}{A_{(\text{control})}} \times 100$$

Donde: $A_{(\text{control})}$: Absorbancia del control, donde en lugar de muestra hay agua destilada.
 $A_{(\text{muestra})}$: Absorbancia de la muestra a evaluar. $A_{(\text{blanco de muestra})}$: Absorbancia del blanco de muestra, donde en lugar de solución enzimática hay una solución buffer.

La actividad inhibitoria de la enzima α -amilasa se determinó a cinco concentraciones de muestra. Las mediciones se realizaron por triplicado y se determinó el valor IC_{50} , que se define como la concentración del extracto que da como resultado una inhibición del 50 por ciento de la actividad máxima.

b. ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA α -GLUCOSIDASA

La detección de la inhibición de la enzima α -glucosidasa se realizó de acuerdo con lo propuesto por Worthington (1993) con ligeras modificaciones. En una microplaca se colocó 50 μ L de muestra (obtenido según ítem 3.4.2.), y se adicionó 100 μ L del buffer fosfato de potasio 0.1 M (pH 6.9). La reacción inició al agregar 100 μ L de la enzima α -glucosidasa (1 U/mL) en buffer fosfato de potasio 0.1 M y se mantuvo durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se agregó 50 μ L de la solución de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido en el mismo buffer fosfato de potasio. Posteriormente, la microplaca ingresó al lector de microplacas UV/Vis, aquí fue incubado durante 5 minutos a 25 °C. Se realizó la medición de absorbancia a 405 nm en el tiempo inicial (0 min) y final (5 min) de la incubación. La muestra se comparó con un control que contiene 50 μ L de buffer fosfato de potasio en lugar de muestra. La actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Actividad inhibidora de } \alpha\text{-glucosidasa (\%)} = \frac{\Delta A_{(\text{control})} - \Delta A_{(\text{muestra})}}{\Delta A_{(\text{control})}} \times 100$$

Donde: $\Delta A_{(\text{control})}$: La variación de absorbancia entre el tiempo inicial y final (0-5 min) del control. $\Delta A_{(\text{muestra})}$: La variación de absorbancia entre el tiempo inicial y final (0-5 min) de la muestra.

La actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa se determinó a cinco concentraciones de muestra. Las mediciones se realizaron por triplicado y se determinó el valor IC₅₀, que se define como la concentración del extracto que da como resultado una inhibición del 50 por ciento de la actividad máxima.

3.4.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOLIPEMIANTE

La detección de la inhibición de la enzima lipasa pancreática se realizó mediante el método de emisión de fluorescencia, según lo indicado por Nakai *et al.* (2005) con algunas modificaciones. En una microplaca se agregó 25 μ L de muestra (obtenido según ítem 3.4.2.), y se mezcló con 50 μ L del sustrato 4-metilumbeliferil oleato 0.1 mmol/L diluido en

buffer Tris pH 8. La microplaca ingresó al lector de microplacas de fluorescencia y se inyectó 25 μ L de la enzima lipasa pancreática de porcino 1 mg/mL diluido en buffer Tris, y se agitó a una intensidad rápida durante 15 segundos. Posteriormente, se midió durante un tiempo de 15 min la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 360 nm y a una longitud de onda de emisión de 460 nm. La muestra se comparó con un control que contiene 25 μ L de buffer en lugar de muestra. La actividad inhibitoria de la lipasa pancreática de porcino se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Actividad inhibidora de lipasa (\%)} = \frac{F_{(\text{control})} - F_{(\text{muestra})}}{F_{(\text{control})}} \times 100$$

Donde: $F_{(\text{control})}$: Fluorescencia del tiempo final (15 min) del control. $F_{(\text{muestra})}$: Fluorescencia del tiempo final (15 min) de la muestra.

La actividad inhibitoria de la enzima lipasa pancreática se determinó a cinco concentraciones de muestra. Las mediciones se realizaron por triplicado y se determinó el valor IC_{50} , que se define como la concentración del extracto que da como resultado una inhibición del 50 por ciento de la actividad máxima.

3.4.11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

La capacidad antihipertensiva se determinó a través de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) mediante el método descrito por Wu *et al.* (2002) y adaptado por Chirinos *et al.* (2018). Previamente, el sustrato hipuril-histidil-leucina (HHL) 2.17 mM se preparó en buffer borato salino (BBS) 0.2 M (pH 8.3), el cual contenía 300 mM de NaCl. Por su parte, la ECA que contenía 1 unidad (U) fue disuelta en 0.5 mL de BBS y se usó 2 mU (10 μ L). La reacción se realizó mezclando en tubos de reacción, 50 μ L de solución de HHL 2.17 mM, 10 μ L de muestra a analizar (obtenido según ítem 3.4.2.) y 10 μ L de 2 mU de ECA. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C. La reacción fue detenida con la adición de 85 μ L de HCl 1N. Las muestras fueron comparadas con un control y un blanco. El control consistió en la determinación de la actividad absoluta de la ECA sobre el sustrato HHL, que resulta en la formación de ácido hipúrico (AH), para lo cual se

reemplazó los 10 µL de muestra por 10 µL de BBS y la reacción se realizó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Para la preparación del blanco se usó la ECA previamente inactivada con HCl 1N y se continuó el mismo procedimiento usado para la muestra. Todas las muestras fueron filtradas utilizando filtro PTFE hidrófilo de 0.20 µm para el análisis por HPLC-PDA.

La detección y cuantificación del AH y HHL, se realizó empleando el cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (Waters, 2695, EE. UU.) con detector de arreglo de diodos (PDA) (Waters, 2996, EE. UU.) y el software Empower. Las muestras fueron analizadas en una columna Symmetry C₁₈ (5 µm, 150 mm x 4.6 mm DI) (Waters, Irlanda) con precolumna Symmetry C₁₈ (5 µm, 20 mm x 3.9 mm DI) (Waters, Irlanda). La fase móvil estuvo compuesta por dos solventes: agua con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.05 por ciento (Solvente A) y acetonitrilo con TFA al 0.05 por ciento (Solvente B). El gradiente fue el siguiente: se inició con 5% B por 1.5 min, se aumentó al 60% B a los 4 min, 90% B a los 4.5 min, se mantuvo al 90% B hasta los 6 min, disminuyó de 90% a 5% B en 0.5 min, y finalmente se mantuvo al 5% B durante 1.5 min (para retomar las condiciones iniciales). El análisis total se realizó en 8 min, a una temperatura de 30 °C y a un caudal de 0.5 mL/min, y la muestra inyectada fue 2 µL. La detección se monitoreó a una longitud de onda de 229 nm. La actividad inhibitoria de la ECA se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Actividad inhibitoria de la ECA (\%)} = \frac{C_{(\text{control})} - C_{(\text{muestra})}}{C_{(\text{control})} - C_{(\text{blanco})}} \times 100$$

Donde: C_(control): Concentración de ácido hipúrico del control. C_(muestra): Concentración de ácido hipúrico de la muestra. C_(blanco): Concentración de ácido hipúrico del blanco

La actividad inhibitoria de la ECA se determinó a cinco concentraciones de muestra. Las mediciones se realizaron por triplicado y se determinó el valor IC₅₀, que se define como la concentración del extracto que da como resultado una inhibición del 50 por ciento de la actividad máxima.

3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.5.1. ACONDICIONAMIENTO DE LAS MATERIAS PRIMAS

En la Figura 9, se muestra el procedimiento que se siguió para el acondicionamiento de las hojas frescas de cedroncillo y pampa muña a hojas secas y molidas. A partir de esta materia prima se obtuvo el extracto y se realizó la cuantificación de los compuestos bioactivos detallados en el ítem 3.4.

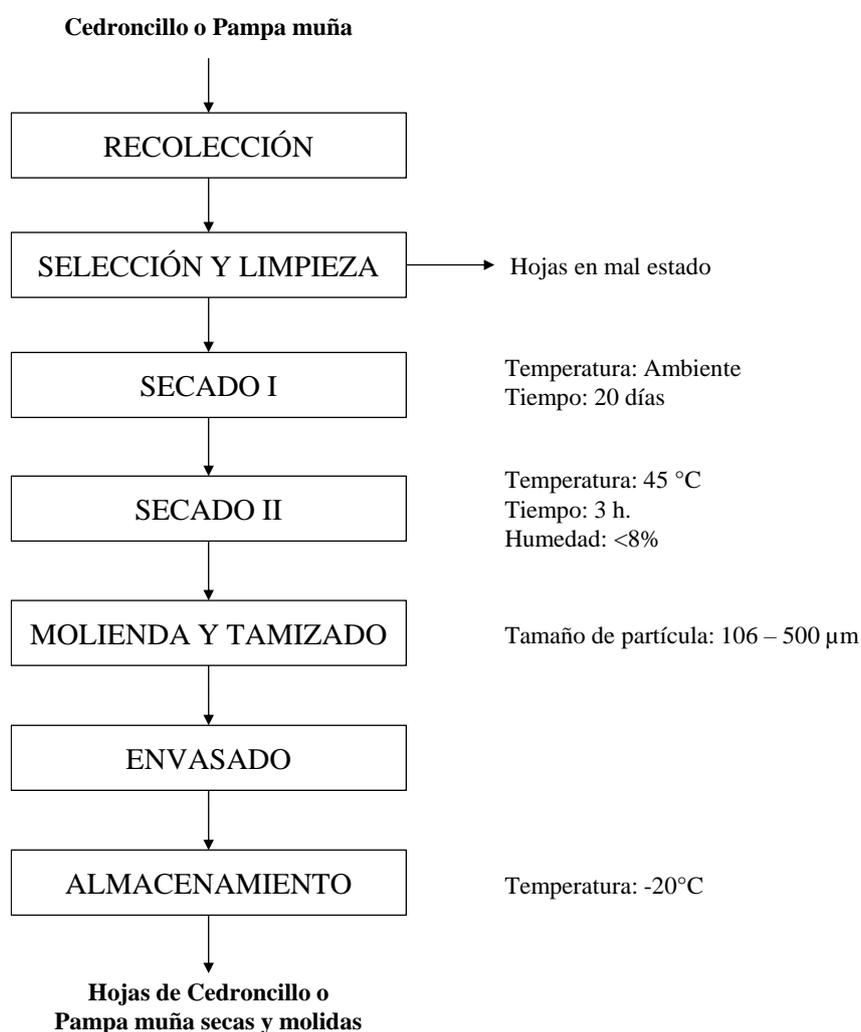


Figura 9: Flujo de operaciones para el acondicionamiento de las materias primas

A continuación, se describen las operaciones unitarias:

a. RECOLECCIÓN

La recolección de las hojas de cedroncillo y pampa muña se realizó de forma manual con apoyo de una tijera de podar. Luego, se coloraron en cajas de cartón y se intercaló con papel bulky para su transporte desde el lugar de colecta hasta el lugar donde se realizó el acondicionamiento. La recolección se realizó durante la etapa de floración de las plantas.

b. SELECCIÓN Y LIMPIEZA

Esta operación permitió obtener hojas de cedroncillo y pampa muña que no presenten daños físicos ni microbiológicos. También, se llevó a cabo una limpieza superficial, que consistió en pasar una tela para quitar el polvo de las hojas seleccionadas.

c. SECADO

Esta operación permitió evaporar el agua interna del tejido de las hojas de cedroncillo y pampa muña. Las hojas de cada planta fueron esparcidas sobre papel kraft y protegidas de la radiación directa a temperatura ambiente por 20 días (secado 1). Luego, las muestras fueron transportadas a los ambientes del IBT-UNALM, donde fueron secadas en estufa a 45 °C por 3 horas hasta alcanzar una humedad menor al 8 por ciento (secado 2).

d. MOLIENDA Y TAMIZADO

Para la operación de molienda se empleó un molino de laboratorio, el objetivo de esta operación fue reducir el tamaño de partícula de las hojas secas. Posteriormente, se utilizó tamices para obtener un tamaño de partícula entre 106 a 500 μm .

e. ENVASADO

Se utilizó bolsas de polietileno de alta densidad con cierre hermético para envasar cada muestra, el objetivo de esta operación fue proteger los compuestos bioactivos que presenta cada materia prima.

f. ALMACENAMIENTO

Las muestras ya envasadas se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta los respectivos análisis.

3.5.2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO A PARTIR DE LAS MATERIAS PRIMAS ACONDICIONADAS

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) de las hojas de cedroncillo y pampa muña secas y molidas se realizó de acuerdo con el procedimiento que se muestra en la Figura 10. A continuación, se describen las operaciones unitarias:

a. PESADO

En esta operación se pesó una cantidad determinada de 0.5 g de hojas secas y molidas de cedroncillo o pampa muña (tamaño de partícula, comprendido entre $106\text{-}500\text{ }\mu\text{m}$) en una balanza analítica.

b. EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO

Se colocó la muestra pesada en el recipiente de vidrio que presenta el equipo de ultrasonido, y se añadió 50 mL del solvente que se preparó previamente, obteniendo así la relación materia prima:solvente (MP:S) de 1:100 (g:mL). Luego, se ubicó el recipiente de forma adecuada para que el sonotrodo se encuentre en contacto con la muestra. El efecto de las variables independientes investigadas incluyó el tiempo (X_1 , 5-20 min, con duraciones de pulso de 5 s encendido y 5 s apagado), la temperatura (X_2 , 30-70 $^{\circ}\text{C}$) y concentración de etanol (X_3 , 30-80 por ciento). Estas variables se muestran en el diseño experimental (Figura 11). Además, se utilizó una amplitud de 40 por ciento. Una vez finalizado, el extracto se vertió a tubos cónicos para centrífuga de 50 mL para la siguiente operación.

c. CENTRIFUGACIÓN

En esta operación se centrifugó a 11000 RPM (16639 g) durante 10 minutos. Esta operación permitió acelerar el proceso de sedimentación de partículas y obtener dos fracciones: sobrenadante y sedimento. El sobrenadante se colocó en un nuevo tubo cónico para centrifuga de 50 mL, descartando el sedimento.

d. ALMACENAMIENTO

Los sobrenadantes obtenidos para cada tratamiento se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta los respectivos análisis.

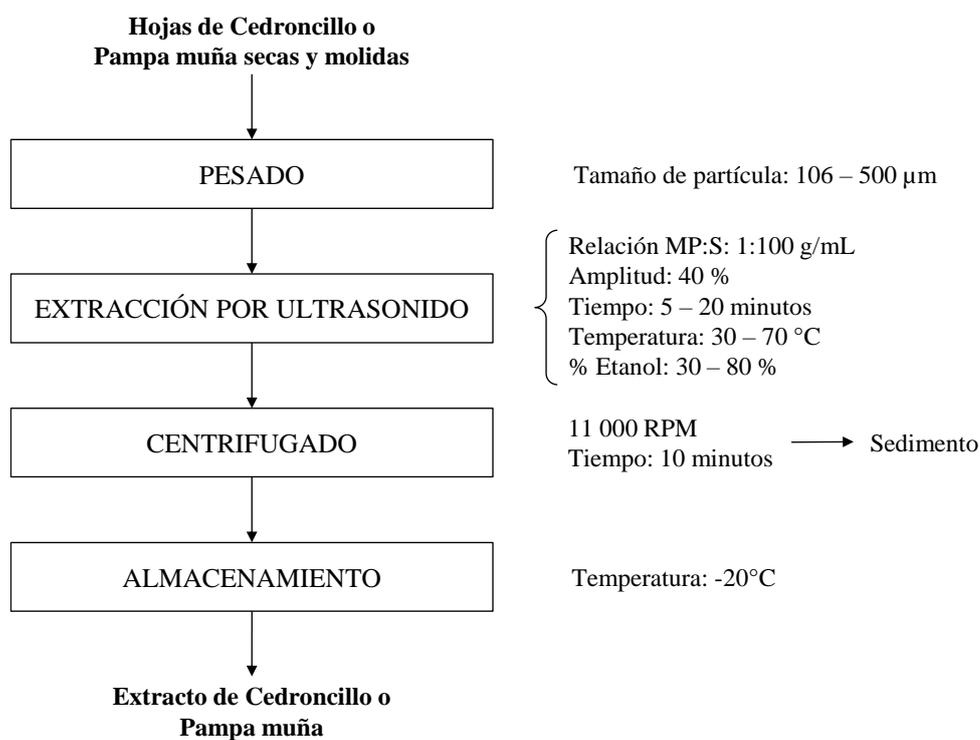


Figura 10: Flujo de operaciones para la extracción asistida por ultrasonido a partir de las hojas de cedroncillo y pampa muña

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

La presente investigación consta de tres etapas tal como se muestra en la Figura 11. A continuación, se describe cada etapa.

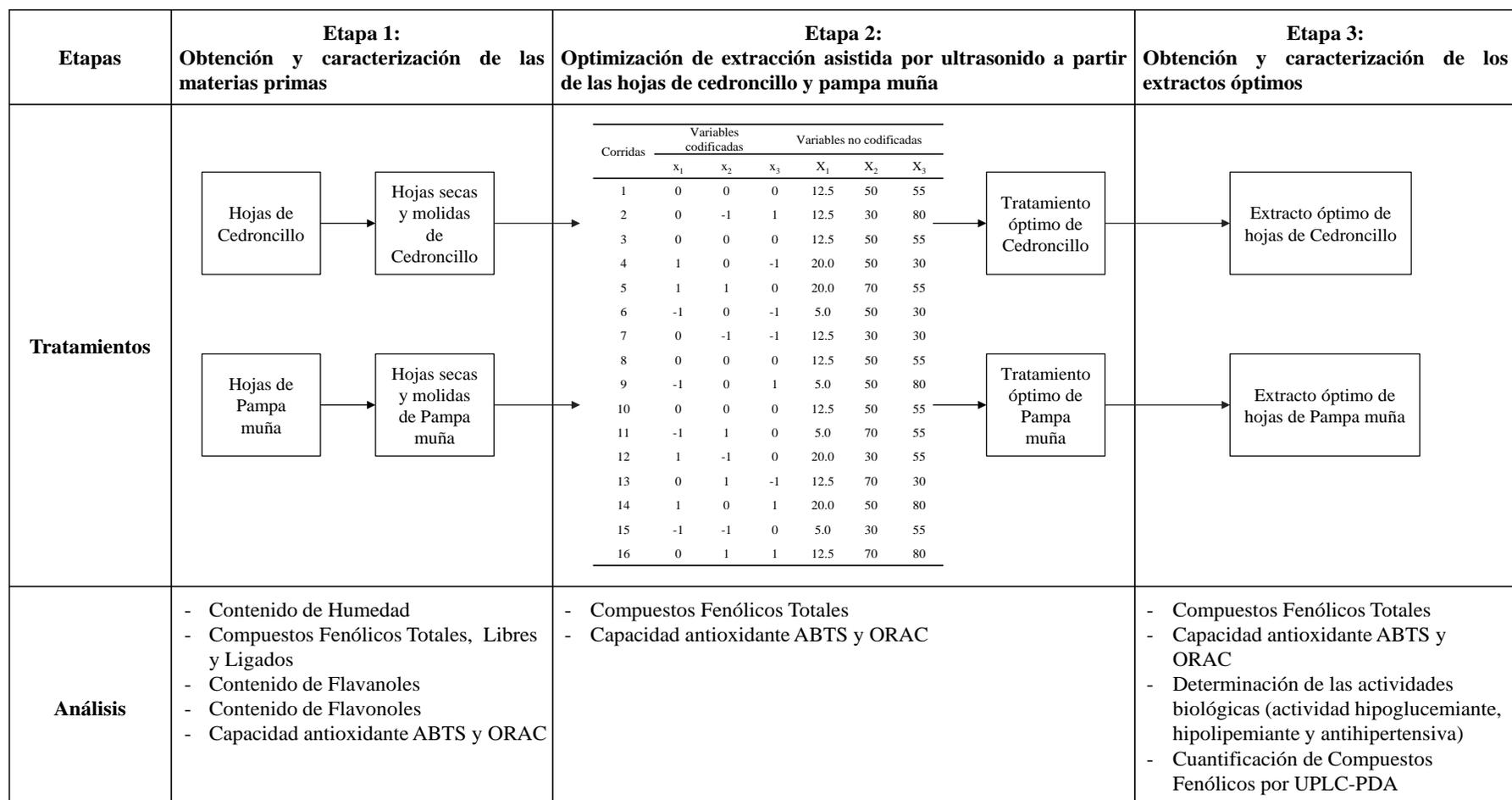


Figura 11: Esquema del diseño experimental de la investigación

Nota: X_1 : Tiempo. X_2 : Temperatura. X_3 : Concentración de etanol.

3.6.1. ETAPA 1: CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIA PRIMAS

Se utilizó las muestras obtenidas en el ítem 3.5.1. Se realizó los análisis fisicoquímicos tales como: humedad, compuestos fenólicos totales, fenólicos ligados, fenólicos libres, flavanoles, flavonoles y capacidad antioxidante ABTS y ORAC.

3.6.2. ETAPA 2: EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO A PARTIR DE LAS HOJAS DE CEDRONCILLO Y PAMPA MUÑA

Esta etapa parte de la investigación se dividió en tres subetapas, las cuales se describen a continuación:

a. SCREENING O CRIBADO

La primera subetapa consistió en realizar una identificación previa de las variables significativas para la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de cedroncillo y pampa muña. Las variables significativas y los rangos de estudio se establecieron a través de un análisis exhaustivo de investigaciones previas similares y la realización de pruebas preliminares.

b. OPTIMIZACIÓN

La segunda subetapa se utilizó la metodología de superficie respuesta (MSR) basado en un diseño de Box-Behnken. Se evaluaron tres variables independientes: tiempo (X_1), temperatura (X_2) y concentración de etanol (X_3), y se le asignaron tres niveles (-1,0,1) a cada variable. Se evaluó el efecto sobre tres variables respuestas: compuestos fenólicos totales (Y_1), capacidad antioxidante ABTS (Y_2) y capacidad antioxidante ORAC (Y_3). Las variables independientes consideradas y sus niveles se presentan en la Tabla 1. En este caso, para las tres variables independientes e incluyendo cuatro puntos centrales, se obtiene un total de 16 corridas experimentales, los cuales se presentan en la Tabla 2.

Tabla 1: Variables Independientes y sus niveles evaluados en la optimización

Variable independiente	Codificado	No Codificado	Niveles		
			-1	0	1
Tiempo (min)	x ₁	X ₁	5	12.5	20
Temperatura (°C)	x ₂	X ₂	30	50	70
Concentración de etanol (%)	x ₃	X ₃	30	55	80

Tabla 2: Arreglo del DBB generado de la subetapa de la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de cedroncillo y pampa muña

Corridas	Variables codificadas			Variables no codificadas		
	x ₁	x ₂	x ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	0	0	0	12.5	50	55
2	0	-1	1	12.5	30	80
3	0	0	0	12.5	50	55
4	1	0	-1	20.0	50	30
5	1	1	0	20.0	70	55
6	-1	0	-1	5.0	50	30
7	0	-1	-1	12.5	30	30
8	0	0	0	12.5	50	55
9	-1	0	1	5.0	50	80
10	0	0	0	12.5	50	55
11	-1	1	0	5.0	70	55
12	1	-1	0	20.0	30	55
13	0	1	-1	12.5	70	30
14	1	0	1	20.0	50	80
15	-1	-1	0	5.0	30	55
16	0	1	1	12.5	70	80

Nota: X₁: Tiempo, X₂: Temperatura, X₃: Concentración de etanol.

c. VALIDACIÓN DE MODELO

Esta etapa consistió en realizar la validación de las condiciones óptimas de las variables independientes, obtenidas mediante la MSR. Para ello se realizaron tres repeticiones experimentales con dichos valores y se compararon con los valores predichos por los modelos matemáticos.

3.6.3. ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ÓPTIMOS

En el extracto optimizado que se obtuvo de la etapa anterior, se evaluó el contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante ABTS y ORAC, identificación de compuestos fenólicos mediante UPLC-PDA y determinación de las actividades biológicas.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos correspondientes a la MSR basado en un diseño Box Behnken para optimizar la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de cedroncillo y pampa muña, se realizaron con el software estadístico *Statgraphics Centurion XVI* (StatPoint Technologies, EE. UU.).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PAMPA MUÑA

4.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS HOJAS DE PAMPA MUÑA

La Tabla 3 presenta los resultados de los análisis de compuestos bioactivos realizados en las hojas de pampa muña (*Hedeoma mandoniana*).

Tabla 3: Características de las hojas de pampa muña (*Hedeoma mandoniana*)

Análisis	Valor*
Humedad (%)	4.89 ± 0.04
Compuestos fenólicos totales (mg AGE/g bs)	30.48 ± 0.55
Fenólicos libres (mg AGE/g bs)	29.95 ± 3.19
Fracción de ligados (%)	9.82 ± 0.22
Flavonoides totales (mg quercetina/g bs)	24.82 ± 2.39
Flavanoles totales (mg catequina/g bs)	10.92 ± 0.44
Capacidad antioxidante ABTS (μmol TE/g bs)	0.24 ± 0.00
Capacidad antioxidante ABTS (μmol TE/g bs)	272.77 ± 7.74
Capacidad antioxidante ORAC (μmol TE/g bs)	1,190.67 ± 58.88
Capacidad antioxidante específica ABTS (μmol TE/mg AGE)	8.95 ± 0.12
Capacidad antioxidante específica ORAC (μmol TE/mg AGE)	39.07 ± 1.99

AGE: Ácido gálico equivalente, TE: Trolox equivalente.

*Los resultados corresponden al promedio ± desviación estándar de tres repeticiones.

Las hojas de pampa muña después de realizar el acondicionamiento presentaron una humedad del 4.89 por ciento, tal como se muestra en la Tabla 3. Al respecto, Van *et al.* (2010) reportaron que a las hojas de peperina de las lomas (*H. multiflora* Benth.) se les realizó un secado bajo sombra durante varios días hasta lograr un contenido de humedad entre el 12 y el 15 por ciento. La diferencia de resultados se debe a que las hojas de pampa

muña fueron sometidas a una mayor exposición de calor que genera una mayor evaporación del agua interna presente en los tejidos

Las hojas de pampa muña obtuvieron un contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de 30.48 mg AGE/g bs. Estos componentes son principalmente sintetizados por las plantas, y participan en la protección contra factores bióticos (patógenos y depredadores) como abióticos (radiación UV) (Peñarrieta *et al.*, 2014). Los datos en la literatura sobre esta especie son escasos; sin embargo, existe información sobre el contenido de CFT que presentan otras especies que pertenecen al mismo género *Hedeoma*. Gutiérrez *et al.* (2017) y Criollo *et al.* (2022) reportaron que las hojas de orégano (*H. patens*) recolectadas en México obtuvieron valores de 40.74 y 99.58 mg AGE/g bs, respectivamente. Se aprecia que el valor obtenido es menor que los valores reportados, esto puede deberse principalmente a que son diferentes especies. Por su parte, Moshari *et al.* (2023) indican que no solo la genética varía el contenido de CFT, también puede verse influenciado por las condiciones climáticas, factores ecológicos, ubicación de cultivo, etapa de desarrollo y métodos utilizados para la extracción.

Por otra parte, existe información acerca de plantas medicinales que pertenecen a géneros diferentes al de *Hedeoma*, que se encuentran incluidos dentro de la familia *Lamiaceae*, y que han presentado valores más elevados en el contenido de CFT. Ejemplos de esto incluyen la salvia (*Salvia officinalis*) con 31.32 mg AGE/g bs (Moshari *et al.*, 2023); la inca muña (*Clinopodium bolivianum*) con 80.6 mg AGE/g bs (Campos *et al.*, 2022); el orégano compacto (*Origanum compactum*) con 107.79 mg AGE/g bs (Chroho *et al.*, 2022) y el orégano vulgar (*Origanum vulgare*) con 430 mg AGE/g bs (Bower *et al.*, 2014).

En la Tabla 3, se observa que el contenido de compuestos fenólicos de la fracción libre y ligada presentaron valores de 29.95 y 9.82 mg AGE/g bs, respectivamente. Además, los compuestos fenólicos libres de las hojas de pampa muña se encontraron en mayor proporción (75.18 por ciento) que los compuestos fenólicos ligados (24.82 por ciento). Algunas otras plantas medicinales de la familia *Lamiaceae* han expuesto los siguientes valores de compuestos fenólicos de la fracción libre y ligada: perilla (*Perilla frutescens var. crispa f. viridis*) con 34.18 y 5.08 mg AGE/g bs (Suwannachot *et al.*, 2022) y clerodendron (*Clerodendrum volubile*) con 162.61 y 110.33 mg AGE/g bs (Obloh *et al.*,

2016), respectivamente. Se aprecia un comportamiento similar al tener un mayor contenido de fenólicos en forma libre. Esto concuerda con lo reportado por Galanakis (2018), quien indica que gran parte de los vegetales se caracterizan porque su contenido de fenólicos en forma libre representa el 50 por ciento o más del total de compuestos fenólicos.

Respecto al contenido de flavonoides totales, el presente estudio obtuvo un valor de 10.92 mg quercetina/g bs, tal como se muestra en la Tabla 3. Este tipo de compuestos fenólicos presentan varias funciones en la planta, especialmente, como respuesta defensiva ante enfermedades, plagas y estrés oxidativo (Álvarez y Orallo, 2003). Si bien el contenido de flavonoides de hojas de pampa muña no ha sido reportado en estudios previos, existen investigaciones, como la de Gutiérrez *et al.* (2017), quienes reportaron que el extracto metanólico al 80 por ciento de las hojas de orégano presentó un valor de 10.48 mg quercetina/g bs. Se aprecia que el resultado de la presente investigación obtuvo un mayor valor. Las diferencias observadas pueden atribuirse a diversos factores, tales como especies diferentes, origen geográfico, tipo de solvente utilizado, técnica de extracción, estado vegetativo de las hojas entre otros (Moshari *et al.*, 2023).

Algunas plantas medicinales de la familia *Lamiaceae* han exhibido valores menores en cuanto al contenido de flavonoides totales, tales como ortiga blanca (*Lamium album*) con 2.54 mg quercetina/g bs; menta de gato (*Nepeta cataria*) 3.24 mg quercetina/g bs; menta poleo (*Mentha pulegium*) con 7.30 mg quercetina/g bs; tomillo (*Thymus kotschyanus*) con 9.93 mg quercetina/g bs y salvia con 10.36 mg quercetina/g bs, donde se empleó como solvente de extracción metanol al 80 por ciento (Moshari *et al.*, 2023). El mayor contenido de flavonoides en la pampa muña podría atribuirse a una mayor exposición a factores que causen estrés oxidativo, de tal manera que la planta ha desarrollado esta adaptación para seguir protegiéndose ante dicho estrés (Santayana, 2018).

El contenido de flavanoles totales de las hojas de pampa muña presentó un valor de 0.24 mg catequina/g bs. Estos compuestos actúan como antioxidantes y tienen efectos protectores contra el estrés ambiental, exposición a la radiación UV y ataque de hongos (Álvarez y Orallo, 2003; Medina, 2017). En otras plantas medicinales pertenecientes a la familia *Lamiaceae* tales como el toronjil (*Melissa officinalis*) y la pachasalvia (*Lepechinia meyenii* Walp) no se detectó la presencia de flavanoles (Chirinos *et al.*, 2013).

En la Tabla 3 se aprecia que los valores de capacidad antioxidante medidos por los métodos, ABTS y ORAC, para las hojas de pampa muña son diferentes entre sí. Esto se debe a que presentan diferentes fundamentos, el método ABTS mide la capacidad que tiene los compuestos antioxidantes de la muestra para donar átomos de hidrógeno o electrones para atrapar el catión radical ABTS^{•+}; mientras que el método ORAC mide la capacidad de los compuestos para donar átomos de hidrógeno para atrapar radicales peroxilo (ROO[•]) (Xu *et al.*, 2017).

Se observa que la capacidad antioxidante ORAC (1,190.67 $\mu\text{mol TE/g bs}$) es superior a la capacidad antioxidante ABTS (272.77 $\mu\text{mol TE/g bs}$). Asimismo, se aprecia que la capacidad antioxidante específica ORAC (39.07 $\mu\text{mol TE/mg AGE}$) es mayor a la capacidad antioxidante específica ABTS (8.95 $\mu\text{mol TE/mg AGE}$). Esto podría deberse a que las hojas de pampa muña presentan un mayor contenido de compuestos antioxidantes capaces de neutralizar radicales peroxilo que radicales ABTS. Los compuestos que mayormente son capaces de neutralizar el radical ABTS son los compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y taninos) y algunos compuestos no fenólicos como la vitamina C; mientras que, el radical peroxilo puede ser neutralizado tanto por compuestos fenólicos y no fenólicos (carotenoides, vitamina E y vitamina C) (Mejía *et al.*, 2021).

Si bien las hojas de pampa muña presentan compuestos fenólicos (Tabla 3), no se conoce acerca de la presencia de compuestos no fenólicos. Al respecto, Dumbravă *et al.* (2012) señalan que plantas medicinales pertenecientes a la misma familia *Lamiaceae*, como son la albahaca (*Ocimum basilicum*) y el romero (*Rosmarinus officinalis*) si han presentado compuestos no fenólicos como carotenoides y vitamina C. De este modo, es probable que la pampa muña también presente este tipo de compuestos no fenólicos, los cuales podrían haber contribuido a neutralizar radicales peroxilo, obteniendo así una mayor capacidad antioxidante ORAC.

Además, para la determinación de las capacidades antioxidantes, se partió de un extracto que utilizó como solvente metanol al 80 por ciento. Este solvente demuestra ser eficaz para la extracción de compuestos fenólicos de menor peso molecular, así como de carotenoides, especialmente las xantofilas (Brglez *et al.*, 2016; Miękus *et al.*, 2019). Estos hallazgos

refuerzan lo mencionado anteriormente respecto a la presencia de compuestos no fenólicos en la muestra.

Como se mencionó la capacidad antioxidante ABTS registró un valor de 272.77 $\mu\text{mol TE/g}$ bs, este valor es menor a lo reportado por Gutiérrez *et al.* (2017), quienes señalaron que el extracto metanólico al 80 por ciento de las hojas de orégano presentó un valor de 351.55 $\mu\text{mol TE/g}$ bs. Asimismo, hay plantas medicinales pertenecientes a la misma familia *Lamiaceae* que han presentado valores mayores a los hallados en la presente investigación. Por ejemplo, la pachasalvia con 510.8 $\mu\text{mol TE/g}$ bs y la inca muña con 645.1 $\mu\text{mol TE/g}$ bs (Chirinos *et al.*, 2013). Por otro lado, hay plantas de la misma familia que han presentado valores menores, como la muña (*C. gilliesii*) con un valor de 19.84 $\mu\text{mol TE/g}$ bs (Trevizan *et al.*, 2020) y el toronjil con 156.8 $\mu\text{mol TE/g}$ bs (Chirinos *et al.*, 2013).

La capacidad antioxidante ORAC de las hojas de pampa muña alcanzó un valor de 1,190.67 $\mu\text{mol TE/g}$ bs. Aunque los datos de literatura sobre esta especie son escasos, se ha registrado valores menores en plantas medicinales del género *Hedeoma*. En este contexto, Gutiérrez *et al.* (2017) y Criollo *et al.* (2022) indicaron que el extracto metanólico al 80 por ciento de las hojas de orégano presentaron valores de 753.95 y 575.42 $\mu\text{mol TE/g}$ bs, respectivamente. Adicionalmente, Li *et al.* (2013) reportaron los valores de capacidad antioxidante ORAC de algunas plantas medicinales de la familia *Lamiaceae*, los cuales fueron menores en comparación al valor obtenido en la presente investigación. Por ejemplo, perilla (*Perilla frutescens* L. Britt.) con 57.17 $\mu\text{mol TE/g}$ bs; lila árabe (*Vitex rotundifolia* L.) con 78.23 $\mu\text{mol TE/g}$ bs; nepeta del Japón (*Schizonepeta ternnuifolia* (Benth) Briq) con 142.40 $\mu\text{mol TE/g}$ bs; menta (*M. haplocalyx* Briq) con 247.74 $\mu\text{mol TE/g}$ bs entre otras. Asimismo, se observó que la única planta que presentó una capacidad antioxidante ORAC superior a la pampa muña fue la salvia (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) con 1,544.38 $\mu\text{mol TE/g}$ bs.

4.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE PAMPA MUÑA

Para la etapa de optimización de la extracción asistida por ultrasonido (EAU) a partir de hojas de pampa muña, se empleó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

basado en el Diseño de Box-Behnken (DBB). Se utilizó tres variables independientes para evaluar la optimización: tiempo (X_1), temperatura (X_2) y concentración de etanol (X_3), y se incluyó cuatro puntos centrales, obteniendo un total de 16 corridas (tratamientos experimentales).

El criterio de optimización usado consistió en maximizar tres variables respuestas: contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) (mg AGE/g bs) (Y_1), capacidad antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/g bs}$) (Y_2) y capacidad antioxidante ORAC ($\mu\text{mol TE/g bs}$) (Y_3). En la Tabla 4 se muestran los valores obtenidos de las tres variables respuestas analizadas en los extractos etanólicos de las hojas de pampa muña.

En la Tabla 4 se observa que el contenido de compuestos fenólicos totales (mg AGE/g bs) osciló entre 41.3 y 51.4 mg AGE/g bs, la capacidad antioxidante ABTS varió entre 331 y 425.9 ($\mu\text{mol TE/g bs}$), y la capacidad antioxidante ORAC se encontró entre 1,015.3 y 1,523.9 ($\mu\text{mol TE/g bs}$).

También se aprecia que los valores mínimos del contenido de CFT (41.3 mg AGE/g bs) y de la capacidad antioxidante ABTS (331.0 $\mu\text{mol TE/g bs}$) correspondieron a la corrida que empleó un tiempo de 12.5 min, temperatura de 30 °C y concentración de etanol del 80 por ciento. En cambio, los valores máximos de CFT (51.4 mg AGE/g bs) y capacidad antioxidante ABTS (425.9 $\mu\text{mol TE/g bs}$) correspondieron a la corrida que utilizó un tiempo de 5 min, temperatura de 70 °C y concentración de etanol del 55 por ciento. Además, se determinó un coeficiente de correlación de Pearson positivo muy alto y estadísticamente significativo entre los valores de CFT y ABTS ($r = 0.9138$, $p < 0.05$). Esto concuerda con lo reportado por Garrido *et al.* (2013), quienes indicaron que el contenido de CFT en los extractos de plantas tiene una fuerte relación con la capacidad antioxidante determinada por el método ABTS, por lo que se espera que, si un extracto tiene mayor contenido de CFT, también sea mayor su capacidad antioxidante ABTS.

Tabla 4: Resultados* de las variables respuestas (CFT, ABTS y ORAC) utilizando la metodología de superficie respuesta basado en el diseño de Box-Behnken para la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de pampa muña

Corridas	Variables independientes			Variables respuestas		
	X ₁ Tiempo (min)	X ₂ Temperatura (°C)	X ₃ Etanol (%)	Y ₁ CFT (mg AGE/g bs)	Y ₂ ABTS (µmol TE/g bs)	Y ₃ ORAC (µmol TE/g bs)
1	12.5	50	55	47.4 ± 0.3	393.6 ± 9.6	1,351.2 ± 38.5
2	12.5	30	80	41.3 ± 0.8	331.0 ± 7.0	1,073.7 ± 39.9
3	12.5	50	55	48.1 ± 1.0	398.9 ± 7.5	1,271.2 ± 33.7
4	20.0	50	30	47.0 ± 0.8	395.2 ± 5.8	1,095.5 ± 26.5
5	20.0	70	55	48.1 ± 1.7	425.3 ± 8.0	1,523.9 ± 61.4
6	5.0	50	30	47.3 ± 0.4	382.0 ± 3.2	1,229.4 ± 21.8
7	12.5	30	30	45.1 ± 0.6	371.8 ± 2.7	1,015.3 ± 33.3
8	12.5	50	55	48.2 ± 0.9	392.0 ± 6.2	1,357.1 ± 29.7
9	5.0	50	80	43.7 ± 1.3	346.6 ± 7.2	1,068.5 ± 37.3
10	12.5	50	55	47.9 ± 0.8	398.0 ± 1.6	1,331.3 ± 24.7
11	5.0	70	55	51.4 ± 2.6	425.9 ± 8.8	1,423.5 ± 119.4
12	20.0	30	55	47.6 ± 1.3	381.3 ± 5.2	1,307.0 ± 11.6
13	12.5	70	30	48.3 ± 1.1	421.5 ± 7.3	1,505.3 ± 71.4
14	20.0	50	80	44.5 ± 0.8	368.8 ± 5.3	1,152.4 ± 14.2
15	5.0	30	55	46.8 ± 0.3	386.6 ± 4.7	1,119.8 ± 69.5
16	12.5	70	80	47.2 ± 2.4	387.3 ± 10.0	1,077.9 ± 14.7

CFT: Compuestos fenólicos totales, ABTS: Capacidad antioxidante método ABTS, ORAC: Capacidad antioxidante método ORAC.

*Los resultados corresponden al promedio ± desviación estándar de tres repeticiones.

Por su parte, el valor mínimo de la capacidad antioxidante ORAC (1,015.3 $\mu\text{mol TE/g bs}$) correspondió a la corrida que utilizó un tiempo de 12.5 min, temperatura de 30 °C y concentración de etanol del 30 por ciento; mientras que su valor máximo (1,523.9 $\mu\text{mol TE/g bs}$) correspondió a la corrida que empleó un tiempo de 20 min, temperatura de 70 °C y concentración de etanol del 55 por ciento. Se observa que las variables independientes que conducen a la obtención del valor mínimo y máximo de ORAC difieren de aquellos empleados para determinar los valores mínimos y máximos de los CFT y ABTS.

También, se determinó un coeficiente de correlación de Pearson positivo alto y estadísticamente significativo entre los valores de CFT y ORAC ($r = 0.6987$, $p < 0.05$). Se aprecia que la capacidad antioxidante ORAC tiene una correlación menor con el contenido de CFT que aquella entre los CFT y la capacidad antioxidante ABTS. Esto indica que la capacidad antioxidante ABTS esta influenciada por la presencia de CFT; mientras que la capacidad antioxidante ORAC no solo estaría atribuida por los CFT, sino también por la presencia de otros compuestos antioxidantes de naturaleza no fenólica (vitaminas y carotenoides) capaces de neutralizar los radicales peroxilo, tal como se señaló en el ítem 4.1.1 (Mejía *et al.*, 2021).

La capacidad antioxidante ABTS también mostró una correlación de Pearson positiva alta y estadísticamente significativa ($r = 0.7844$, $p < 0.05$) con la capacidad antioxidante ORAC. Se puede inferir de que existen compuestos que no contribuyeron a la capacidad antioxidante en ambas técnicas (Mejía *et al.*, 2021).

a. EVALUACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

La aplicación de la MSR generó las ecuaciones que representan los modelos matemáticos de segundo orden (cuadrático), los cuales establecen una relación empírica entre las variables respuestas CFT (Y_1), ABTS (Y_2) y ORAC (Y_3), y las variables independientes tiempo (X_1), temperatura (X_2) y concentración de etanol (X_3). Las ecuaciones de los modelos matemáticos son presentadas en la Tabla 5.

Tabla 5: Modelos matemáticos resultantes de la metodología de superficie respuesta para la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de pampa muña

Variables respuestas	Ecuaciones del modelo predictivo
CFT (mg AGE/g bs)	$36.9537 + 0.04445*X_2 + 0.32432*X_3 - 0.0068*X_1*X_2 + 0.00141*X_2*X_3 - 0.004252*X_3^2$ (1)
ABTS (μ mol TE/g bs)	$320.184 - 0.831142*X_2 + 3.34364*X_3 + 0.0173469*X_2^2 - 0.039494*X_3^2$ (2)
ORAC (μ mol TE/g bs)	$228.862 + 15.5781*X_2 + 38.4276*X_3 - 0.140067*X_1^2 - 0.242895*X_2*X_3 - 0.293434*X_3^2$ (3)

X₁: Tiempo, X₂: Temperatura, X₃: Concentración de etanol.

El análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de la Ecuación 1, se realizó para evaluar el efecto de las variables independientes y el efecto combinado de estas sobre el contenido de CFT (Anexo 1). Se muestra que las variables y sus interacciones resultaron significativas ($p < 0.05$), excepto el tiempo (X₁), interacción cuadrática tiempo (X₁²), interacción tiempo-concentración de etanol (X₁X₃) e interacción cuadrática temperatura (X₂²) que no fueron significativos ($p > 0.05$). La mayor influencia lineal significativa se observó para la variable temperatura (X₂) seguida por la variable concentración de etanol (X₃) (F-ratio: 204.61 y 121.99, respectivamente). La interacción cuadrática más significativa correspondió a la concentración de etanol (X₃²) seguido de la interacción tiempo-temperatura (X₁X₂) e interacción temperatura-concentración de etanol (X₂X₃) (F-ratio: 228.68, 33.69 y 16.09, respectivamente).

Respecto a la capacidad antioxidante ABTS, se realizó el ANOVA para evaluar el efecto de las variables independientes y sus interacciones (Anexo 2). Se aprecia que las variables y sus interacciones resultaron significativas ($p < 0.05$), excepto el tiempo (X₁), interacción cuadrática tiempo (X₁²), interacción tiempo-temperatura (X₁X₂), interacción tiempo-concentración de etanol (X₁X₃) e interacción temperatura-concentración de etanol (X₂X₃) que no fueron significativos ($p > 0.05$). La mayor influencia lineal significativa se observó para la variable temperatura (X₂) seguida de la variable concentración de etanol (X₃) (F-ratio: 397.99 y 207.55, respectivamente). La interacción cuadrática con mayor significancia fue la concentración de etanol (X₃²) seguido de la interacción cuadrática temperatura (X₂²) (F-ratio: 216.43 y 17.1, respectivamente).

Asimismo, para la capacidad antioxidante ORAC, se realizó el ANOVA para evaluar el efecto de las variables independientes y sus interacciones (Anexo 3). Se observa que las variables y sus interacciones resultaron significativas ($p < 0.05$), excepto el tiempo (X_1), interacción cuadrática tiempo (X_1^2), interacción tiempo-temperatura (X_1X_2), interacción tiempo-concentración de etanol (X_1X_3) e interacción cuadrática temperatura (X_2^2) que no fueron significativos ($p > 0.05$). La mayor influencia lineal significativa se observó para la variable temperatura (X_2) seguida de la variable concentración de etanol (X_3) (F-ratio: 83.65 y 18.18, respectivamente). Con respecto a las interacciones cuadráticas, el más significativo correspondió a la concentración de etanol (X_3^2) seguido de la interacción temperatura-concentración de etanol (X_2X_3) (F-ratio: 87.42 y 38.33, respectivamente).

Los modelos matemáticos determinados para las variables CFT, ABTS y ORAC (Tabla 5) se caracterizaron por tener una falta de ajuste no significativo ($p > 0.05$). Al respecto, Gutiérrez y De la Vara (2008) mencionan que una falta de ajuste no significativa indica que el modelo de segundo orden se ajusta de manera conveniente a los datos. También, los modelos matemáticos resultantes para las variables respuestas CFT, ABTS y ORAC generaron coeficientes de determinación (R^2) altos de 95.36, 96.66 y 93.09 por ciento; mientras que los valores R^2 ajustado fueron 88.39, 91.66 y 82.72, respectivamente. Los valores R^2 indican cuanto porcentaje de la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático. Asimismo, es un indicador confiable para evaluar la proximidad entre los valores predichos por el modelo y los valores experimentales.

b. ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE RESPUESTA

Las gráficas de superficie respuesta presentadas en las Figuras 12, 13 y 14 se realizaron a partir de los modelos matemáticos de segundo orden de la Tabla 5. Estas figuras muestran los efectos principales e interactivos de las variables independientes sobre las variables respuestas, con el fin de identificar así el valor óptimo de las variables independientes para maximizar cada variable respuesta. Dichas figuras se obtuvieron fijando una variable en el punto medio (nivel cero); mientras que las otras dos variables varían para predecir cada variable respuesta.

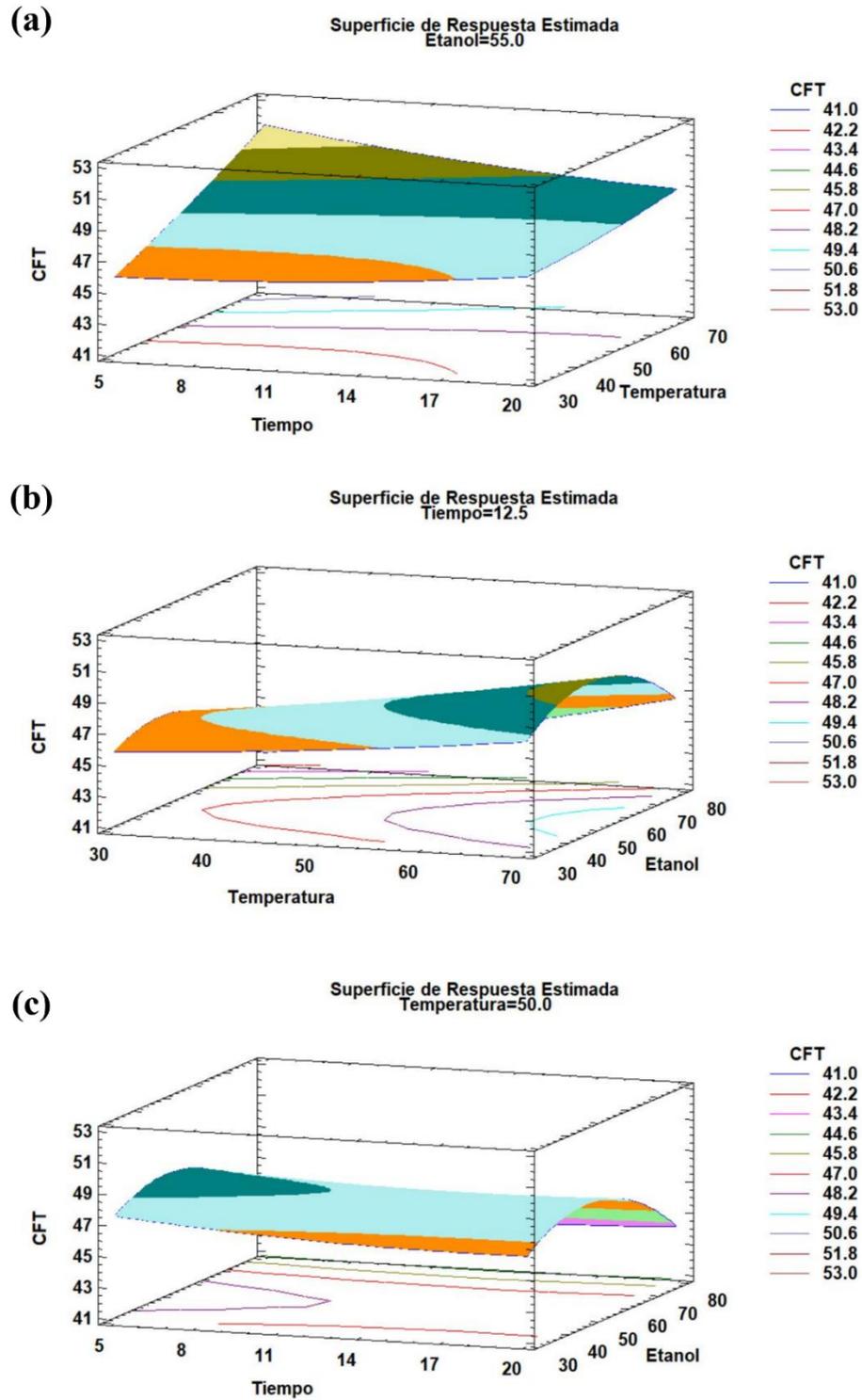


Figura 12: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol, sobre el contenido de compuestos fenólicos

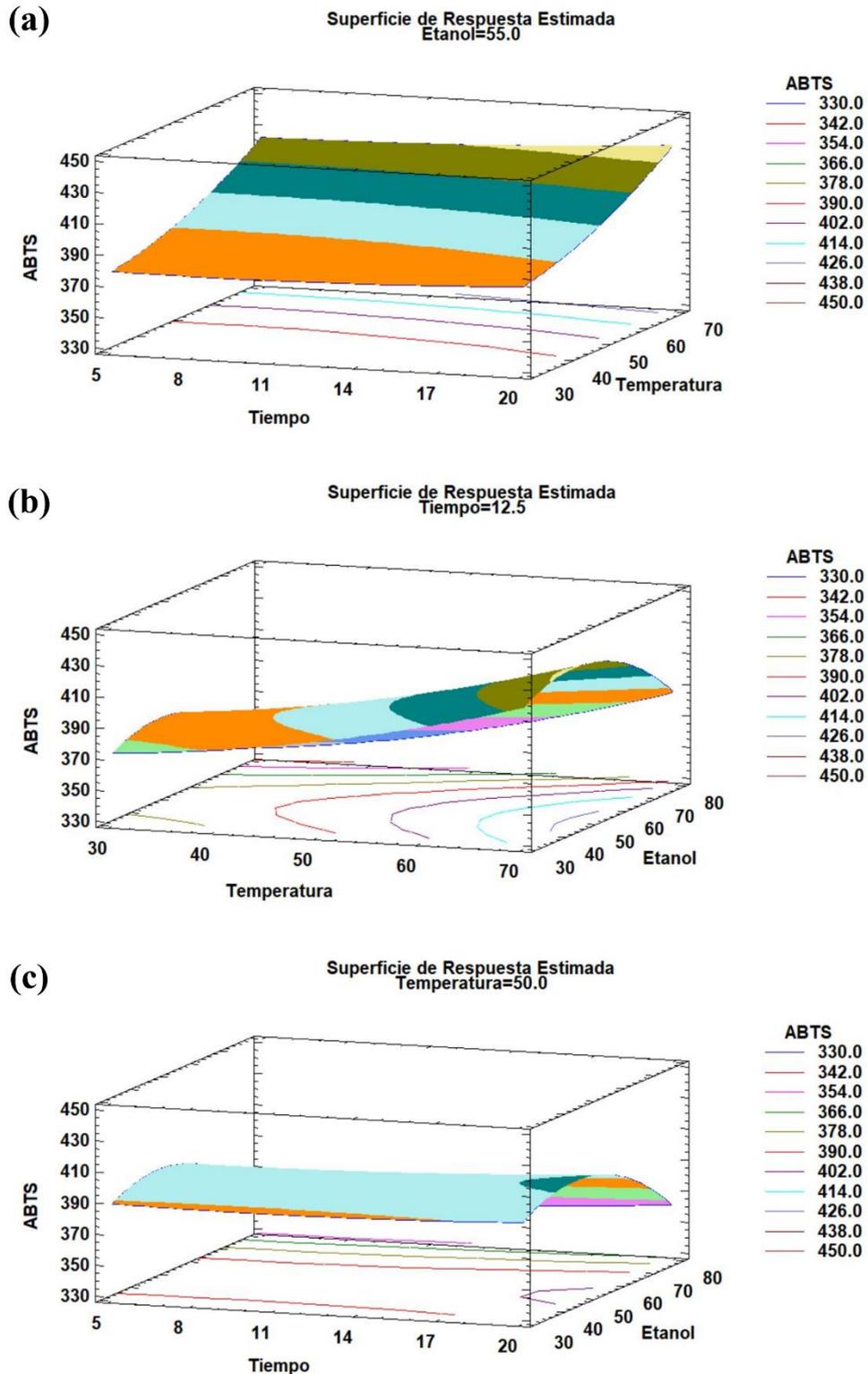


Figura 13: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol, sobre la capacidad antioxidante ABTS

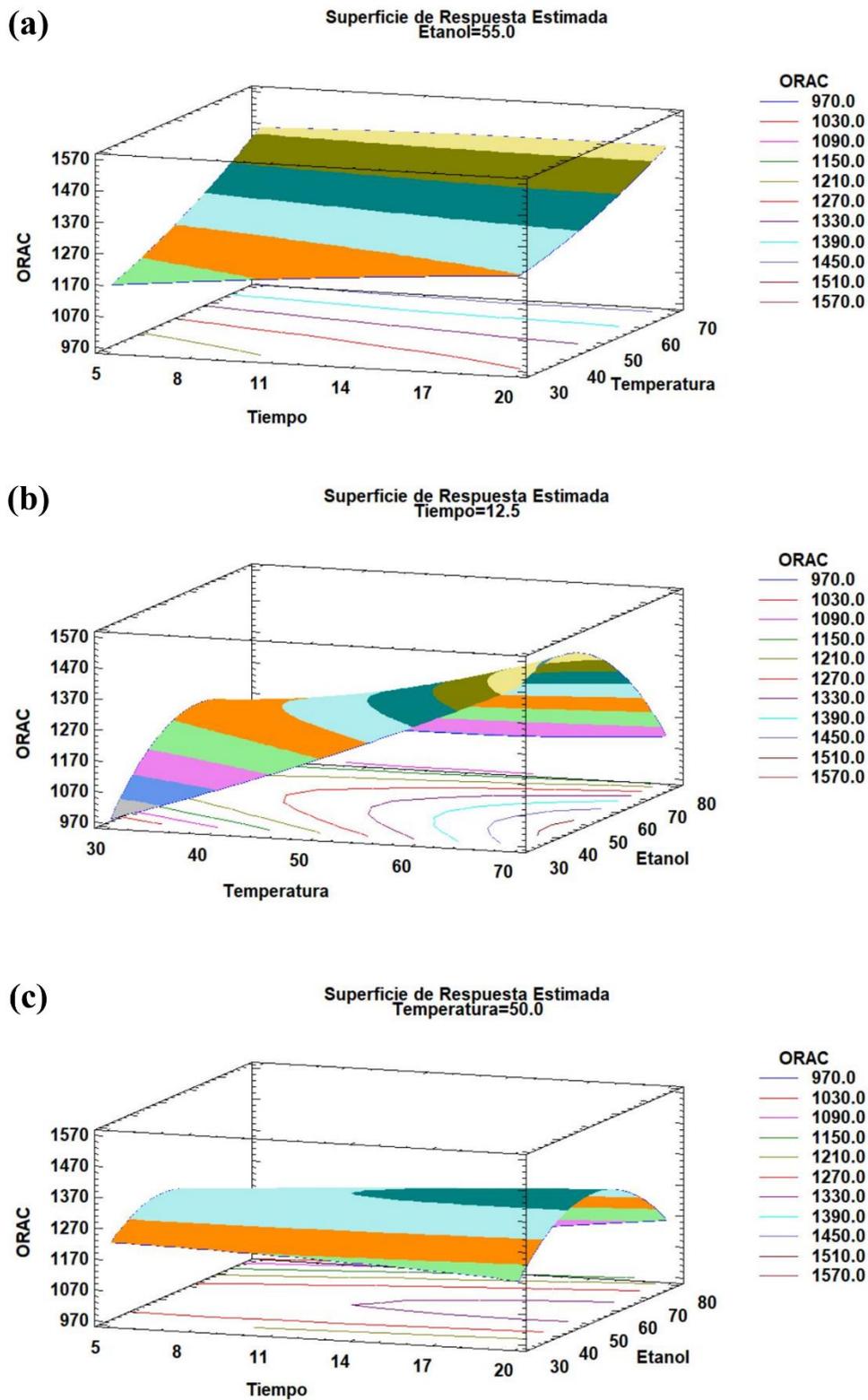


Figura 14: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol (c), sobre la capacidad antioxidante ORAC

En las Figuras 12, 13 y 14 se muestran los gráficos de superficie respuesta para el contenido de CFT, capacidad antioxidante ABTS y ORAC, respectivamente, que presenta el extracto de hojas de pampa muña. Se observa que el aumento de la temperatura hasta 70 °C incrementó las variables respuestas. Esto concuerda con lo mencionado por Kumar *et al.* (2021), quienes indican que el aumento de la temperatura aumenta el rendimiento de la extracción asistida por ultrasonido (EAU), por incremento de la propiedad de desorción y la solubilidad del soluto en el solvente. Asimismo, Michalaki *et al.* (2023) indica que el aumento de temperatura incrementa la difusividad, lo que a su vez mejora la transferencia de masa y facilita la transferencia de CFT desde la matriz vegetal al solvente. Además, Garrido *et al.* (2013) indica que un elevado contenido de CFT genera una mayor capacidad antioxidante ABTS, tendencia que se observa en los resultados.

Otros estudios reportan que el aumento adicional de la temperatura disminuye el rendimiento debido al efecto de cavitación debilitado. Esto se debe a que las burbujas que se forman implosionan con menor intensidad y disminuye el daño de la ruptura de la pared celular, lo cual reduce el rendimiento (Medina, 2017; Soto, 2022). Si bien este efecto no se observa en ninguna de las figuras, es probable que si se utiliza temperaturas mayores a 70 °C se pueda apreciar ello.

En las Figuras 12, 13 y 14 se observó que el aumento de la concentración de etanol hasta el 55 por ciento causó un incremento de las variables respuestas; sin embargo, el empleo de concentraciones mayores causó una disminución. Estudios previos señalan que el aumento de la concentración de etanol aumenta el rendimiento del contenido de compuestos fenólicos hasta una concentración máxima de etanol y luego tiene un efecto negativo sobre el rendimiento; lo observado se debería a que la polaridad de la solución disminuye y por tanto se reduce la solubilidad de los compuestos fenólicos (Khazaei *et al.*, 2016). Se observa que al aplicar una concentración de etanol mayor a 55 por ciento, se produce una disminución en la polaridad de la solución. Esta disminución conlleva una disminución de la solubilidad, reduciendo así la extracción de los compuestos fenólicos, y a su vez, los valores de capacidad antioxidante evaluados mediante los métodos ABTS y ORAC (Kumar *et al.*, 2021).

Con respecto a la concentración de etanol, en la literatura revisada no se encontró información sobre un valor óptimo para esta especie. Sin embargo, se han encontrado estudios sobre otras plantas medicinales de la familia *Lamiaceae* que reportan valores relevantes en este aspecto. Por ejemplo, Cui *et al.* (2017) reportaron que empleando etanol al 76.58 por ciento obtuvo una mayor recuperación de CFT a partir de hojas secas de perilla. Asimismo, Aloisio *et al.* (2023) señalaron que empleando una concentración de etanol al 50 por ciento obtuvo una mayor recuperación de CFT de las hojas secas de albahaca (*O. basilicum*). Además, Campos *et al.* (2022) indicaron que una concentración de etanol al 70 por ciento aumentó la extracción de CFT y capacidad antioxidante ABTS de las hojas secas de inca muña. Por último, Moussa *et al.* (2022) señalaron que empleando etanol al 52 por ciento obtuvieron un mayor contenido de CFT y capacidad antioxidante ABTS de las hojas de salvia. Se observa que la concentración de etanol al 55 por ciento, que generó los valores máximos de las variables respuestas, se sitúa dentro del rango de valores óptimos de concentración de etanol (50 a 76.58 por ciento) reportado para otras plantas de la familia *Lamiaceae*.

En la Figura 12, se aprecia que el incremento del tiempo de extracción de 5 a 20 min a temperaturas bajas (30 °C) aumentó el contenido de CFT. Sin embargo, la prolongación del tiempo a temperaturas altas (70 °C) disminuyó el contenido de CFT. Esto concuerda con lo mencionado por Cui *et al.* (2017), quienes indicaron que tiempos prolongados de extracción a temperaturas altas pueden degradar los compuestos fenólicos presentes en la muestra. Por esta razón, es importante controlar de forma cuidadosa la temperatura para evitar dicha degradación.

Por otro lado, en las Figuras 13 y 14 se observa que la capacidad antioxidante ABTS y capacidad antioxidante ORAC tendieron a aumentar ligeramente cuando incrementó el tiempo de 5 a 20 min; sin embargo, se mostró una disminución del valor ORAC cuando incrementó el tiempo de 5 a 20 min a una temperatura de 50 °C empleando como solvente una concentración de etanol al 30 por ciento (Figura 13c). Esto se puede deber a la gran influencia que presenta la concentración del solvente frente a las otras dos variables independientes utilizadas para la extracción. Estudios como el de Aloisio *et al.* (2023) demostraron que la aplicación de concentraciones de etanol por debajo del 40 por ciento en

hojas de albahaca otorgó un menor contenido de CFT, obteniendo así un menor rendimiento en la capacidad antioxidante ORAC.

Existen investigaciones sobre plantas medicinales de la familia *Lamiaceae* que han optimizado la técnica de EAU y evaluado las mismas variables independientes (tiempo, temperatura y concentración de etanol) que se utilizaron en este estudio. Por ejemplo, Michalaki *et al.* (2023) optimizaron el proceso de extracción de CFT de hojas de orégano vulgar (*O. vulgare ssp. Hirtum*) y determinaron que las condiciones óptimas fueron un tiempo de 40 min, una temperatura de 80 °C y una concentración de etanol del 60 por ciento. Sin embargo, comparar los resultados de este estudio con los hallazgos existentes en la literatura resulta complicado debido a las diferencias en los equipos utilizados, las variables y rangos utilizados, así como las diferencias en la matriz vegetal.

Es importante mencionar que en las pruebas preliminares de esta investigación se determinó que una relación MP:S de 1:100 g/mL ofreció mejores resultados de CFT, capacidad antioxidante ABTS y ORAC para la pampa muña. Este hallazgo se alinea con la literatura encontrada sobre la relación MP:S en plantas medicinales de la familia *Lamiaceae*. Por ejemplo, Campos *et al.* (2022) evaluaron esta variable en el proceso de extracción de inca muña, y observaron que al incrementar la relación MP:S de 1:10 hasta 1:40 g/mL generó una mayor extracción de CFT y capacidad antioxidante ABTS. Esto concuerda con lo mencionado por Taweekayujan *et al.* (2023), quienes señalaron que al incrementar la relación MP:S aumenta la gradiente de concentración, favoreciendo así la transferencia de masa y mejorando la extracción de compuestos fenólicos.

Durante las pruebas preliminares también se encontró que una amplitud del 40 por ciento proporcionó mejores resultados para la pampa muña. Investigaciones previas han abordado la amplitud durante la EAU de plantas medicinales de la familia *Lamiaceae*. Campos *et al.* (2022) evaluaron esta variable en un rango del 20 al 70 por ciento para la inca muña, concluyendo que una amplitud del 70 por ciento es óptima para obtener un mayor contenido de CFT y capacidad antioxidante ABTS. Por su parte, Aloisio *et al.* (2023) estudiaron la amplitud en un rango del 20 al 100 por ciento para la albahaca, encontrando que una amplitud del 50 por ciento es óptima para alcanzar un mayor contenido de CFT,

ácido rosmarínico y ácidos fenólicos. Se puede observar que el valor de la amplitud puede variar dependiendo la especie y las condiciones específicas del proceso de extracción.

Es relevante destacar que la amplitud desempeña un papel importante en la EAU, ya que puede influir en el incremento o disminución de los compuestos bioactivos. La selección de una amplitud adecuada es fundamental para mejorar el rendimiento de la EAU, ya que aumenta el número de ciclos de compresión y rarefacción de las ondas ultrasónicas. Este fenómeno favorece la ruptura de las estructuras celulares y facilita la difusión de los compuestos fenólicos hacia el solvente (Campos *et al.*, 2022). Por otro lado, el uso de una amplitud mayor y una exposición prolongada puede ocasionar la degradación de estos compuestos, lo que genera una reducción del contenido de CFT y la capacidad antioxidante. Esto se puede deber a que un aumento de la amplitud genera un aumento de la temperatura durante el proceso de EAU (Kumar *et al.*, 2021).

c. OPTIMIZACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS RESPUESTAS

Para realizar la optimización simultánea de las respuestas, primero se construyó los modelos matemáticos de segundo orden para cada variable respuesta que se evaluó, estos se muestran en la Tabla 5. Posteriormente, se determinó la función de deseabilidad para cada variable respuesta, en este caso como se desea que los valores de las variables sean máximos, se utilizó la escala $d = 1$. Luego, se combinó las deseabilidades de las variables respuestas para crear una sola función compuesta “D” de deseabilidad. Como las variables respuestas de CFT, ABTS y ORAC fueron igual de importantes, la función compuesta “D” se determinó como la media geométrica de las funciones de deseabilidades por separado.

En la Tabla 6 se muestra la combinación de variables independientes (tiempo, temperatura y concentración de etanol) que maximiza la función de deseabilidad compuesta “D”. Asimismo, se aprecian las variables respuestas estimadas (CFT, ABTS y ORAC) para el extracto de hojas de pampa muña. Los valores se obtuvieron partir del software estadístico *Statgraphics Centurion XVI*.

Tabla 6: Variables respuestas estimadas en condiciones de optimización para el extracto de hojas de pampa muña

Condiciones óptimas			Variables respuestas estimadas		
X ₁ Tiempo (min)	X ₂ Temperatura (°C)	X ₃ Etanol (%)	Y ₁ CFT (mg AGE/g bs)	Y ₂ ABTS (µmol TE/g bs)	Y ₃ ORAC (µmol TE/g bs)
5.1	69.7	44.9	51.4	426.2	1,524.0

CFT: Compuestos fenólicos totales, ABTS: Capacidad antioxidante método ABTS, ORAC: Capacidad antioxidante método ORAC.

d. VALIDACIÓN DEL MODELO

Para la validación del modelo matemático, se llevó a cabo pruebas experimentales para evaluar la cercanía que presentan con los valores estimados de las variables respuestas. Las pruebas se realizaron bajo las condiciones óptimas de extracción que se detallan en la Tabla 6. Asimismo, se mantuvieron constantes la relación MP:S de 1:100 g/mL, la amplitud al 40 por ciento y las duraciones de pulso de 5 s encendido y 5 s apagado. En la Tabla 7 se muestran los valores estimados y experimentales de las variables respuestas evaluadas en el extracto de hojas de pampa muña.

Tabla 7: Valores estimados y experimentales de las variables respuestas en condiciones de optimización para el extracto de hojas de pampa muña

Variables respuestas	Estimado	Experimental*
Compuestos fenólicos totales (mg AGE/g bs)	51.4	50.9 ± 0.5
Capacidad antioxidante ABTS (µmol TE/g bs)	426.2	405.5 ± 3.0
Capacidad antioxidante ORAC (µmol TE/g bs)	1,524.0	1,529.1 ± 46.8

En la Tabla 7 se aprecia que los valores estimados y experimentales no presentan diferencias importantes. Asimismo, es importante señalar que la condición óptima para esta optimización se determinó con una función compuesta de deseabilidad con un valor $d = 0.9501$, lo que significa que el 95 por ciento del objetivo estimado se encontró realizando

la extracción con las condiciones óptimas. Los valores experimentales de CFT, ABTS y ORAC se aproximaron a los valores estimados en un 99.03, 95.15 y 100.33 por ciento. Los datos experimentales se encontraban dentro del intervalo de confianza del 95 por ciento de los modelos de segundo orden. De tal forma, el modelo podría usarse para predecir los valores de las variables respuestas.

A continuación, se presentan algunos estudios que emplearon la misma técnica de EAU en plantas pertenecientes a la familia *Lamiaceae*, y que también optimizaron las mismas variables respuestas evaluadas en el presente estudio (CFT, ABTS y ORAC). Respecto al contenido de CFT, Cui *et al.* (2017) optimizaron esta variable en las hojas de perilla, y observaron que el valor experimental y estimado se aproximaron en un 99.93 por ciento. Asimismo, Campos *et al.* (2022) optimizaron el CFT de las hojas de inca muña y observaron una aproximación del 95.64 por ciento entre el valor experimental y el estimado. De manera similar, Michalaki *et al.* (2023) en su optimización de CFT de las hojas de orégano vulgar demostraron que el valor experimental y estimado se acercaron en un 99.75 por ciento.

Con respecto a las capacidades antioxidantes, Campos *et al.* (2022) optimizaron la variable ABTS en las hojas de inca muña y observaron que el valor experimental y estimado se aproximaron en un 95.18 por ciento. Por su parte, Zhou *et al.* (2013) optimizaron la misma variable en las hojas de clerodendrum (*Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz), y observaron que los valores se asemejaron en un 99.67 por ciento.

Por otra parte, cuando se evaluó inicialmente el contenido de CFT en las hojas de pampa muña se determinó un valor de 30.48 mg AGE/g bs (Tabla 3), y con la optimización de las condiciones de extracción incrementó a 50.90 mg AGE/g bs (Tabla 7), obteniendo así un incremento en la extracción de 66.99%. Este aumento del contenido de CFT se puede deber a la aplicación de temperatura durante la extracción, debido a que incrementa la solubilidad del soluto en el solvente y hay una mejor de extracción de estos compuestos de interés (Kumar *et al.*, 2021).

4.1.3. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UPLC®-PDA DEL EXTRACTO ÓPTIMO DE PAMPA MUÑA

Los resultados de la cuantificación de los compuestos fenólicos de las hojas de pampa muña por cromatografía líquida acoplado a detector de arreglo de diodos (PDA), se aprecian en la Tabla 8. Además, el cromatograma del presente extracto se encuentra en el Anexo 4.

En la Tabla 8, se observa que para el extracto etanólico de las hojas de pampa muña se detectaron un total de 14 picos, de los cuales 7 picos fueron identificados como compuestos pertenecientes a los ácidos fenólicos (derivados de ácidos hidroxicinámicos); mientras que los 7 picos restantes se identificaron como flavonoides (derivados de flavanona y flavona). Esto se asemeja a lo reportado por Molina *et al.* (2023), quienes indicaron que la extracción realizada al poleo (*H. drummondi*) con solventes polares como metanol otorgó una mayor extracción de compuestos bioactivos como ácidos hidroxicinámicos (ácido rosmarínico y ácido cafeico) y flavonoides. Es importante indicar, que tanto el metanol como el etanol permite extraer este tipo de compuestos fenólicos; sin embargo, el metanol se caracteriza por ser un solvente tóxico (Aloisio *et al.*, 2023).

La cuantificación total de los compuestos fenólicos obtuvo un valor de 18.58 mg/g bs, siendo el ácido rosmarínico el más abundante con 9.98 mg/g bs (~53.71 por ciento). Al respecto, Serrano *et al.* (2020) señalan que el ácido rosmarínico es uno de los compuestos fenólicos más predominantes en las plantas medicinales de la familia *Lamiaceae*. Esto se asemeja a lo reportado por Campos *et al.* (2022), quienes utilizando UPLC-PDA para analizar un extracto etanólico de inca muña obtenido mediante EAU en condiciones óptimas, reportaron que el ácido rosmarínico se identificó como el segundo compuesto mayoritario. Además, Serrano (2022) señala que, si bien el ácido rosmarínico es soluble en etanol, la mayor extracción de este compuesto fenólico se da en bajas concentraciones (aprox. 20-30 por ciento), debido a una mayor afinidad química con el solvente bajo esas condiciones.

Tabla 8: Identificación y contenido (mg/g bs) de los principales compuestos fenólicos del extracto de hojas de pampa muña por UPLC-PDA

^o N Picos	Tiempo retención (min)	λ_{max} (nm)	Fenólico asignado	Familia	Contenido (mg/g hoja bs)
1	7.39	323.9	Derivado de ácido cafeico	Ácido hidroxicinámico	Tr
2	9.17	310.8	Derivado de ácido p-cumárico	Ácido hidroxicinámico	Tr
3	10.81	325.1	Derivado de ácido cafeico	Ácido hidroxicinámico	3.65
4	11.27	313.1	Derivado de ácido p-cumárico	Ácido hidroxicinámico	Tr
5	13.73	311.9	Derivado de ácido p-cumárico	Ácido hidroxicinámico	2.08
6	18.99	275.0	Derivado de naringenina	Flavanona	2.28
7	20.16	254.9, 347.3	Derivado de luteolina	Flavona	Tr
8	20.33	266.7, 348.5	Derivado de luteolina	Flavona	Tr
9	21.29	282.2, 332.3	Derivado de apigenina	Flavona	Tr
10	22.21	328.7	Ácido rosmarínico	Ácido hidroxicinámico	9.98
11	23.81	267.9, 332.3	Derivado de apigenina	Flavona	0.48
12	23.97	321.5	Derivado de ácido cafeico	Ácido hidroxicinámico	Tr
13	24.03	283.3, 329.9	Derivado de naringenina	Flavanona	0.11
14	25.03	288.1, 347.3	Derivado de luteolina	Flavona	Tr
Total					18.58

Identificación basada en el espectro de absorción entre 280-700 nm. Tr: Trazas (compuesto identificado, pero no cuantificado)

En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos se cuantificó con un valor de 5.73 mg/g bs (~30.84 por ciento), y se encontró compuestos derivados de ácido cafeico y de ácido *p*-cumárico. Raya (2020) indicó una baja presencia de estos dos ácidos hidroxicinámicos en el perfil fenólico de los extractos acuosos a partir de hojas secas de tabaquillo (*H. piperita*). Asimismo, en los extractos metanólicos de poleo y orégano se identificó la presencia de ácido cafeico y ácido clorogénico (Viveros *et al.*, 2007; Criollo *et al.*, 2022). Otro compuesto derivado de los ácidos hidroxicinámicos que se han encontrado en el extracto de orégano con un disolvente compuesto por metanol/acetona/agua (50:40:10) es el ácido neoclorogénico (ácido-3-O-cafeoilquínico) (Leyva *et al.*, 2016).

Con respecto a los flavonoides, se cuantificó con un valor de 2.87 mg/g (~15.45 por ciento), y se detectó mayor presencia de flavonas derivadas de luteolina y apigenina que de flavanonas derivadas de naringenina. Esto se asemeja a lo reportado por Serrano (2022), quien menciona que para la pampa muña se detectó la presencia de los siguientes flavonoides: eriodictiol-7-O-rutinósido, naringenina-7-rhamnósido-glucósido, hesperidina, acetilglicitina y luteolina. Además, Criollo *et al.* (2022) indicaron que el perfil fenólico del extracto metanólico de orégano presentó mayores compuestos del tipo flavonas tales como luteolina-7-glucósido, apigenina-7-neohesperidosida, baicaleína, luteolina y apigenina; mientras que en las flavanonas se identificó eriodictiol y naringenina. Por su parte, Leyva *et al.* (2016) reportaron que a partir del extracto de poleo con un disolvente compuesto por metanol/acetona/agua (50:40:10) presentó dos flavonoides principales, luteolina-7-O-glucurónido y escutellareína-7-O-hexósido. Las diferencias entre los perfiles fenólicos pueden deberse a la genética que presenta cada especie de la familia *Lamiaceae*, en el estado vegetativo de la planta, así como el método y solvente utilizado para la extracción (Gutiérrez *et al.*, 2018).

4.1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO ÓPTIMO DE PAMPA MUÑA

En la Tabla 9 se muestran las actividades biológicas que se determinaron en el extracto óptimo de pampa muña. Se evaluó la actividad hipoglucemiante, hipolipemiante y antihipertensiva a diferentes concentraciones. Los resultados de IC₅₀ se expresaron como mg extracto seco de pampa muña por mililitro de solución (mg/mL), y en términos de

contenido fenólico, es decir, mg ácido gálico equivalente por mililitro de solución (mg AGE/mL).

Tabla 9: Actividad biológica del extracto de hojas de pampa muña

Actividad biológica	Concentración		Inhibición (%)*	IC50 (mg AGE/mL)*	IC50 (mg /mL)*
	(mg AGE/mL)	(mg/mL)			
α -amilasa	10.13	47.93	61.11 \pm 3.74	8.45 \pm 0.40	39.95 \pm 1.88
	6.76	31.95	36.88 \pm 1.23		
	5.07	23.96	25.21 \pm 0.77		
	4.05	19.17	19.95 \pm 2.18		
	3.38	15.98	13.49 \pm 1.60		
α -glucosidasa	5.07	23.96	59.88 \pm 2.56	3.52 \pm 0.28	16.63 \pm 1.34
	2.53	11.98	39.85 \pm 1.56		
	1.69	7.99	34.83 \pm 0.25		
	1.27	5.99	23.77 \pm 2.50		
	1.01	4.79	21.03 \pm 0.93		
Actividad hipolipemiente	1.01	4.79	81.50 \pm 0.35	0.32 \pm 0.01	1.51 \pm 0.03
	0.34	1.60	50.72 \pm 0.70		
	0.20	0.96	37.14 \pm 1.15		
	0.14	0.68	27.38 \pm 1.02		
	0.10	0.48	21.89 \pm 1.82		
Actividad antihipertensiva	3.50	16.55	58.94 \pm 1.68	3.06 \pm 0.08	14.48 \pm 0.38
	3.00	14.19	48.92 \pm 0.30		
	2.50	11.82	37.96 \pm 3.65		
	2.00	9.46	22.53 \pm 0.66		
	1.50	7.09	10.46 \pm 0.19		

AGE: Ácido gálico equivalente. *Los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar de tres repeticiones.

a. ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

La actividad hipoglucemiante del extracto de pampa muña se evaluó a través de la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, debido a que estas enzimas participan en la absorción de hidratos de carbono e incrementan la velocidad de absorción de glucosa en sangre (Stojkovic *et al.*, 2019). En la Tabla 9, se observa que a medida que se

incrementó la concentración del extracto de pampa muña (mg AGE/mL o mg /mL) aumento la actividad inhibitoria de ambas enzimas.

En el caso de la enzima α -amilasa, se llegó a inhibir el 61.11 por ciento al emplear una concentración de 47.93 mg/mL (~10.13 mg AGE/mL), y presentó un valor de IC₅₀ de 39.95 mg/mL (~8.45 mg AGE/mL). Si bien no hay información específica sobre esta especie, existen estudios que reportan el IC₅₀ en otras plantas medicinales pertenecientes a la familia *Lamiaceae*.

Por ejemplo, Safamansouri *et al.* (2014) señalaron los valores de IC₅₀ para los extractos metanólicos de diversas plantas, como salvia de Jerusalén (*Phlomis rígida*) con 4.4 mg/mL; oreja de conejo (*Stachys bizantina*) con 5.8 mg/mL; *P. bruguieri* con 9.2 mg/mL y escutelarria (*Scutellaria tournefortii*) con 13.5 mg/mL. Asimismo, Thengyai *et al.* (2019) señalaron que el extracto etanólico de hojas de grosella arbustiva (*Vitex glabrata*) presentó un valor de IC₅₀ de 14.54 μ g/mL (~0.014 mg/mL). Por último, Tundis *et al.* (2023) reportaron que los extractos etanólicos de lavanda (*Lavandula angustifolia*) recolectadas de dos lugares de Italia presentaron valores de IC₅₀ de 6.8 μ g/mL (~0.007 mg/mL) y 14.8 μ g/mL (~0.015 mg/mL). Se aprecia que existen diferencias entre los valores IC₅₀, al comparar los valores del extracto de pampa muña con otras especies de la misma familia *Lamiaceae*. Estas diferencias se deben a diversos factores, entre los cuales se encuentran la variabilidad genética, factores ambientales, el método de extracción, así como las condiciones experimentales de las pruebas enzimáticas (Lianza *et al.*, 2022).

Con respecto a la actividad bilógica de la enzima α -glucosidasa, al emplear una concentración de 23.96 mg/mL (~5.07 mg AGE/mL) se obtuvo un porcentaje de inhibición de 59.88 por ciento, y se calculó un valor IC₅₀ de 16.63 mg/mL (~3.52 mg AGE/mL). No se encontró información respecto a esta especie, sin embargo, hay estudios que determinan el IC₅₀ de los extractos de otras plantas medicinales de la familia *Lamiaceae*. Ali *et al.* (2014) indicaron que el extracto metanólico de romero presentó un valor de IC₅₀ de 30.39 μ g/mL (~0.030 mg/mL). Además, Thengyai *et al.* (2019) reportaron que el extracto etanólico de *Vitex glabrata* presentó un valor de IC₅₀ de 11.22 μ g/mL (~0.011 mg/mL). Por su parte, Tundis *et al.* (2023) señalaron que para los extractos etanólicos de lavanda recolectadas de dos zonas diferentes de Italia presentaron valores de IC₅₀ de 2.5 μ g/mL

(~0.0025 mg/mL) y 2.1 µg/mL (~0.0021 mg/mL). Se observa las diferencias entre los valores IC₅₀ del extracto etanólico de pampa muña con otras especies de la misma familia *Lamiaceae*. Estas diferencias pueden deberse a los mismos factores señalados en la actividad α-amilasa.

Por otro lado, el extracto etanólico de pampa muña, a una misma concentración, presenta mayor inhibición de la enzima α-glucosidasa que de la enzima α-amilasa. Esto guarda similitud con lo señalado por Eskandani *et al.* (2016), quienes indicaron que los extractos metanólicos de las 13 plantas pertenecientes a la familia *Lamiaceae* presentaron un mayor potencial de inhibición de la α-glucosidasa en comparación con la α-amilasa.

La capacidad de inhibir las enzimas α-amilasa y α-glucosidasa podría atribuirse a los compuestos bioactivos presentes en el extracto de pampa muña. Mediante el análisis de compuestos fenólicos (ítem 4.1.3) se detectó la presencia de los siguientes compuestos: ácidos hidroxicinámicos (ácido rosmarínico, derivados de ácido cafeico, derivados de ácido *p*-cumárico), flavonas (derivados de luteolina y apigenina) y flavanona (derivados de naringenina), tal como se mostró en la Tabla 8.

En relación con los ácidos hidroxicinámicos identificados, numerosos estudios *in vivo* evidencian su capacidad para inhibir la α-amilasa y la α-glucosidasa, lo que significa que poseen propiedades hipoglucemiantes. Cuando se administran estos compuestos a ratones con diabetes inducida por fármacos o por una dieta alta en grasas, ya sea por vía oral o intraperitoneal en un lapso determinado, se ha demostrado que aumentan los niveles de insulina, logrando así la reducción de los niveles elevados de glucosa en sangre (Nyandwi *et al.*, 2021; Akhlaghipour *et al.*, 2023; Mani *et al.*, 2002).

Como se mencionó anteriormente, los flavonoides presentan la capacidad de inhibir la α-amilasa y la α-glucosidasa. Sin embargo, Sun *et al.* (2019) indica que las flavonas y flavonoles presentan una mayor inhibición de la enzima α-amilasa que las flavanonas y flavanoles. Esto se debe a que las flavonas y flavonoles presentan un doble enlace C2-C3 que además de debilitar la conjugación enzima-sustrato, también transforma la estructura molecular casi plana a flexible, y disminuye la capacidad de que el sustrato alcance el sitio activo de la enzima α-amilasa debido al impedimento estérico. Con lo mencionado

anteriormente, es posible señalar que las flavonas derivado de la luteolina y derivado de la apigenina presentarían una mayor inhibición que la flavanona derivado de la naringenina. Por otro lado, Priscilla *et al.* (2014) en su estudio *in vitro* señalaron que la naringenina fue capaz de inhibir la actividad de la α - glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, y que permitió mejorar la sensibilidad a la insulina y disminuir los niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina. Es importante indicar que es difícil atribuir que un solo compuesto fenólico proporciona el efecto hipoglucemiante, ya que en el extracto de pampa muña se observa la presencia de diferentes compuestos bioactivos.

b. ACTIVIDAD HIPOLIPEMIANTE

El extracto de pampa muña a la concentración de 4.79 mg/mL (~1.01 mg AGE/mL) mostró una inhibición de la lipasa pancreática de 81.50 por ciento, y su valor de IC₅₀ fue de 1.51 mg/mL (~0.32 mg AGE/mL), tal como se aprecia en la Tabla 9. No se encontró información específica a partir del extracto de esta especie; sin embargo, Seyedan *et al.* (2015) recopiló la actividad inhibidora contra la lipasa pancreática (IC₅₀) para extractos de plantas medicinales pertenecientes a la familia *Lamiaceae*. Las plantas que presentaron valores mayores de IC₅₀ fueron menta (*M. spicata* L.) con 7.85 mg/mL; romero (*R. officinalis*) con 6.99 mg/mL y orégano vulgar con más de 10 mg/mL. Por otro lado, se reportaron valores inferiores en orégano de Siria (*O. syriaca* L.) con 234 μ g/mL (~0.23 mg/mL) y salvia (*S. spinosa* L.) con 156.2 μ g/mL (~0.16 mg/mL). Se aprecia que el valor IC₅₀ se encuentran dentro del rango de valores reportados previamente, lo cual permite indicar que el extracto de hojas de pampa muña si presenta un buen potencial para inhibir lipasa pancreática.

La capacidad que presentó el extracto etanólico de pampa muña para inhibir la enzima lipasa pancreática de porcino podría atribuirse a sus compuestos fenólicos principales (Tabla 8), tales como los ácidos hidroxicinámicos (ácido rosmarínico, derivados de ácido cafeico, derivados de ácido *p*-cumárico), las flavonas (derivados de luteolina y apigenina) y la flavanona (derivados de naringenina).

Estudios *in vivo* han demostrado la capacidad hipolipemiente que presentan estos compuestos fenólicos. Nyandwi *et al.* (2021) mostraron que el ácido rosmarínico tiene

actividad hipolipemiante, debido a que redujo la acumulación de lípidos en el tejido adiposo en ratones C57BL/6J hiperlipidémicos inducidos por una dieta rica en grasas. Por su parte, Liao *et al.* (2013) indicaron que el ácido cafeico exhibe un potencial significativo como agente antiobesidad mediante la supresión de las enzimas lipogénicas y la acumulación de lípidos hepáticos.

Con respecto a los flavonoides identificados en el extracto etanólico de pampa muña, estudios *in vivo* han demostrado que presentan capacidad hipolipemiante. Por ejemplo, según Yu *et al.* (2022) la naringina extraída de pomelo redujo el peso corporal, así como los niveles séricos de triglicéridos, colesterol total (CT) y colesterol LDL (C-LDL) en sangre de ratones hiperlipidémicos.

c. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

Respecto a la actividad antihipertensiva, en la Tabla 9 se observa que el extracto de hojas de pampa muña en la concentración de 16.55 mg/mL (~3.50 mg AGE/mL) mostró una moderada inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de 58.94 por ciento, y su valor de IC₅₀ fue de 14.48 mg/mL (~3.06 mg AGE/mL). Al igual que en las anteriores actividades no se obtuvo información específica de esta especie. Pese a ello, se comparó con otras plantas medicinales de la misma familia *Lamiaceae*. Por ejemplo, Irondi *et al.* (2016) indicaron que los extracto metanólicos de hojas de albahaca de clavo (*O. gratissimum*) y albahaca (*O. basilicum*) presentaron valores IC₅₀ de 29.44 µg/mL (~0.029 mg/mL) y 64.99 µg/mL (~0.065 mg/mL), respectivamente. Se aprecia que el extracto de hojas de pampa muña requirió una mayor concentración para inhibir el 50 por ciento de la ECA.

La capacidad que presentó el extracto etanólico de hojas de pampa muña para inhibir la ECA podría atribuirse a sus compuestos fenólicos, como los ácidos hidroxicinámicos (ácido rosmarínico, derivados de ácido cafeico, derivados de ácido *p*-cumárico), las flavonas (derivados de luteolina y apigenina) y la flavanona (derivados de naringenina), los cuales se cuantificaron mediante la técnica de UPLC-PDA.

Con respecto a los ácidos fenólicos, se consideran como inhibidores eficaces de la ECA gracias a los grupos funcionales que presenta, los cuales son carboxilo e hidroxilo. Esto se debe a que los ácidos fenólicos establecen interacciones carga-carga con el ion zinc presente en el sitio activo de ECA, utilizando el átomo de oxígeno de su fracción carboxilato. Además, se observa que estos compuestos interactúan con los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la ECA, lo que conduce a la formación de un complejo molecular estable entre la molécula de ácido fenólico y la ECA (Ironi *et al.*, 2016). Además, estudios *in vitro* señalan que el ácido cafeico, en su forma pura, demostró capacidad para inhibir la ECA. Sin embargo, al ser comparado con el fármaco captopril, se observó que este último continuó ofreciendo una mayor inhibición de la ECA (Zielińska *et al.*, 2021).

4.2. CEDRONCILLO

4.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS HOJAS DE CEDRONCILLO

Los resultados de los análisis de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante realizados a las hojas de cedroncillo (*Aloysia herrerae*) se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Características de las hojas de cedroncillo (*Aloysia herrerae*)

Análisis	Valor*
Humedad (%)	4.60 ± 0.07
Compuestos fenólicos totales (mg AGE/g bs)	56.03 ± 3.02
Fenólicos libres (mg AGE/g bs)	43.51 ± 2.63
Fenólicos ligados (mg AGE/g bs)	6.08 ± 0.43
Fracción de ligados (%)	12.27 ± 0.64
Flavonoides totales (mg quercetina/g bs)	23.10 ± 1.10
Flavanoles totales (mg catequina/g bs)	0.30 ± 0.02
Capacidad antioxidante ABTS (μmol TE/g bs)	393.38 ± 9.80
Capacidad antioxidante ORAC (μmol TE/g bs)	1949.47 ± 171.58
Capacidad antioxidante específica ABTS (μmol TE/mg AGE)	7.03 ± 0.44
Capacidad antioxidante específica ORAC (μmol TE/mg AGE)	34.75 ± 1.25

AGE: Ácido gálico equivalente; TE: Trolox equivalente.

*Los resultados corresponden al promedio ± desviación estándar de tres repeticiones.

Las hojas de cedroncillo después del acondicionamiento obtuvo una humedad del 4.60 por ciento, tal como se muestra en la Tabla 10. Alpaca (2018) al emplear dos métodos de secado a las hojas de cedrón (*A. triphylla*), secado bajo sombra (T_{\min} : 11 °C y T_{\max} : 22 °C) durante 40 h y secado en cámara caliente a 40 °C por 4 h y 30 min, obtuvo contenidos de humedad de 9.99 por ciento y 9.41 por ciento, respectivamente. Además, García (2017) señaló que el cedrón obtuvo una humedad entre 10-12 por ciento cuando se llevó a cabo el secado bajo sombra con los siguientes parámetros ambientales controlados: humedad relativa 21 por ciento, temperatura promedio 25 °C y velocidad de aire 4.4 m/s. Los resultados reportados presentaron un mayor contenido de humedad que en la presente investigación. Esto se debe a que las hojas de cedroncillo fueron sometidas inicialmente a un proceso de secado bajo sombra, seguido de un secado en bandejas, lo que resultó en una mayor evaporación del agua interna presente en el tejido. Además, existe diferencias entre los resultados que puede deberse a diferentes factores, tales como el origen del material vegetal, especie de la planta, condiciones de cosecha y post-cosecha entre otros.

Las hojas de cedroncillo presentaron un contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de 56.03 mg AGE/g bs. Si bien esta planta no ha sido reportada en estudios previos, hay estudios sobre las plantas que comparten el mismo género taxonómico. Por ejemplo, Tammar *et al.* (2021) indicaron que las hojas de verbena (*A. citrodora*) de cuatro localidades de Túnez varió entre 11.66 y 29.16 mg AGE/g bs; mientras que Álvarez *et al.* (2019) indicaron que la verbena recolectada de México presentó un contenido de 27.53 mg AGE/g bs. Asimismo, Ávila *et al.* (2018) reportaron que el cedrón del monte (*A. gratissima*) recolectado de México presentó un contenido de 15.04 mg AGE/g bs. Además, Rezig *et al.* (2019) señalaron que las hojas de cedrón de cuatro localidades de Túnez variaron de 14.25 a 26.58 mg AGE/g bs. Se aprecia que el contenido de CFT de cedroncillo presentó un mayor contenido al compararlo con otras especies del mismo género *Aloysia*. Además, las diferencias encontradas entre los valores de CFT no solo se deben a que son diferentes especies, también se ve influenciado por el origen del material vegetal, condiciones expuestas durante las etapas de crecimiento de la planta, condiciones post-cosecha, condiciones de extracción entre otros (Criollo *et al.*, 2022).

En la Tabla 10, también se puede observar que el contenido de compuestos fenólicos de la fracción libre y ligada presentaron valores de 43.51 y 6.08 mg AGE/g bs, respectivamente.

Los compuestos fenólicos libres de las hojas de cedroncillo se encontraron en mayor proporción (87.73 por ciento) que los compuestos fenólicos ligados (12.27 por ciento). Este comportamiento de presentar un mayor contenido de fenólicos libres es similar a los determinados por Yang *et al.* (2022), quienes indicaron que dos cultivares de hojas de rosa castaña (*Rosa roxburghii* Tratt), Seedles Cili y Gui Nong No. 5, mostraron fracciones libres y ligadas de 94.28 y 11.19 mg AGE/g bs, y 72.71 y 17.75 mg AGE/g bs, respectivamente. Según Zhang *et al.* (2020) la mayoría de las frutas y verduras tienen un mayor contenido de compuestos fenólicos en forma libre, a diferencia de los cereales y legumbres que presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos en forma ligada-insoluble. Asimismo, Shahidi y Hossain (2023) señalan que las fracciones de los compuestos fenólicos dependen principalmente del origen de la materia prima, los métodos de procesamiento y las técnicas de extracción.

Por otro lado, Velderrain (2013) indica que los compuestos fenólicos libres son más bioaccesibles y biodisponibles. En relación a lo mencionado anteriormente, esto sugeriría que si se consume hojas de cedroncillo, alrededor del 87.73 por ciento de los compuestos fenólicos podrían ser liberados y transformarse en compuestos de bajo peso molecular que puedan atravesar el intestino (bioaccesible), y al ser absorbidos podrían llegar a torrente sanguíneo y ejercer sus propiedades bioactivas (biodisponibilidad); mientras que el 12.27 por ciento de los compuestos fenólicos no se absorberían a nivel de intestino delgado, sino en el intestino grueso, específicamente en el colón. Además, Zhang *et al.* (2020) señala que los compuestos fenólicos ligados que están asociados con componentes de la pared celular pueden fermentarse por parte de la microbiota del colón produciendo una reducción del pH del medio que permite inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos.

En cuanto al contenido de flavonoides totales, las hojas de cedroncillo presentaron un valor de 23.10 mg quercetina/g bs, tal como se muestra en la Tabla 10. Como se mencionó anteriormente, esta especie no se ha observado en estudios previos; sin embargo, algunos estudios han reportado plantas del mismo género taxonómico. Hematian *et al.* (2021) reportaron que el extracto metanólico de hojas de verbena, las cuales fueron recolectadas de Irán, presento un valor 14.54 mg quercetina/g bs. Por su parte, Polumackanycz *et al.* (2022) señalaron que a partir del extracto hidrometanólico (80:20, v/v) de hojas de verbena recolectadas de Polonia se obtuvo 2.18 mg quercetina/g bs. Por otro lado, Aldeen *et al.*

(2015) indicaron que los extractos obtenidos con agua por infusión e infusión continua de hojas de verbena presentaron un contenido de flavonoides totales de 2.41 a 6.94 mg quercetina/g bs y 2.87 a 7.56 mg quercetina/g bs, respectivamente. Además, Yungán (2019) señaló que a partir del extracto etanólico al 70 por ciento de hojas de cedrón recolectadas de Ecuador se obtuvo 10.89 mg quercetina/g bs. Por último, Lasagni *et al.* (2014) reportaron que los extractos obtenidos con agua por infusión y decocción de las hojas de cedrón presentaron valores de 9.74 y 10.11 mg quercetina/g bs, respectivamente. Se aprecia que los resultados reportados son inferiores al valor obtenido en la presente investigación, lo cual podría indicar que las hojas de cedroncillo han desarrollado mayor presencia de estos compuestos por estar más expuestos a situaciones de estrés oxidativo (Santayana, 2018). Las diferencias presentadas pueden deberse a que son especies diferentes del mismo género *Aloysia*, el origen geográfico, el solvente utilizado, la técnica de extracción, el estado vegetativo de las hojas entre otros. En adición, el contenido de flavonoides representó aproximadamente el 41 por ciento de los compuestos fenólicos totales de las hojas de cedroncillo. Este resultado concuerda con lo mencionado por Bahramsoltani *et al.* (2018), quienes indican que los flavonoides son los compuestos fenólicos más abundantes en las hojas de las plantas.

El contenido de flavanoles totales de las hojas de las hojas de cedroncillo fue de 0.30 mg catequina/g bs. Al respecto, Chirinos *et al.* (2013) indicaron que no lograron detectar flavanoles para el extracto de cedrón. Por otro lado, las hojas de cedroncillo mostraron un valor superior de flavanoles en comparación con otras plantas medicinales, tales como mutuy (*Cassia hookeriana* Gill) y aliso (*Alnus acuminata*) que presentaron valores de 0.08 y 0.29 mg catequina/g bs, respectivamente (Chirinos *et al.*, 2013). Por su parte, Enkhtuya *et al.* (2014) reportaron valores entre 1 y 32 mg catequina/g bs en plantas medicinales que crecen de manera silvestre en Mongolia, los cuales superaron el valor obtenido en la presente investigación.

En la Tabla 10 se observa una gran diferencia entre los valores obtenidos mediante los métodos ABTS y ORAC para evaluar la capacidad antioxidante de las hojas de cedroncillo, esto se debe principalmente al mecanismo de reacción que presenta cada método (Santos *et al.*, 2018). Además, se aprecia que las hojas de cedroncillo exhibieron una alta capacidad antioxidante ORAC (1,949.47 $\mu\text{mol TE/g bs}$) en comparación con la

capacidad antioxidante ABTS (393.38 $\mu\text{mol TE/g bs}$). Asimismo, se muestra que la capacidad antioxidante específica ORAC (34.75 $\mu\text{mol TE/mg AGE}$) es superior a la capacidad específica ABTS (7.03 $\mu\text{mol TE/mg AGE}$). Lo mencionado anteriormente, indica que las hojas de cedroncillo presentan un mayor potencial de neutralización de radicales peroxilo que radicales ABTS^{•+}, y que los compuestos que otorgan una mayor capacidad antioxidante son los compuestos fenólicos (Xu *et al.*, 2017).

Con respecto al método ABTS, los datos de la literatura acerca de la capacidad antioxidante que presentan las hojas de cedroncillo son escasos; sin embargo, existen datos de plantas que pertenecen al género *Aloysia*. Por ejemplo, Trevizan *et al.* (2020) señalaron que a partir del extracto etanólico de las hojas de rika-rika (*A. tarapacana*) se obtuvo un valor de 29.89 $\mu\text{mol TE/g bs}$. También, Chirinos *et al.* (2013) reportaron que el extracto de cedrón presentó un valor de 448.7 $\mu\text{mol TE/g bs}$. Por otro lado, se dispone de información sobre plantas que pertenece a la familia *Verbenaceae*, que alberga otros géneros a parte del género *Aloysia*. Plaza *et al.* (2010) indicaron que los extractos obtenidos por extracción de agua subcrítica de las hojas de verbena común (*Verbena officinalis*) a una temperatura de 100 °C y 200 °C presentaron valores de 959 $\mu\text{mol TE/g bs}$ y 2,156 $\mu\text{mol TE/g bs}$, respectivamente. Se aprecia que los valores reportados y el valor obtenido de la presente investigación son diferentes entre sí. Esta diferencia se encuentra influenciado por la materia prima, estado fenológico, técnica de extracción, entre otros. Además, la técnica de extracción abarca las condiciones de temperatura, tiempo, solvente entre otros parámetros, los cuales pueden afectar la liberación de los compuestos bioactivos, y con ello variar de forma positiva o negativa el valor de la capacidad antioxidante (Polumackanycz *et al.*, 2022).

Por otro lado, se observó que la capacidad antioxidante ABTS de las hojas de cedroncillo (393.38 $\mu\text{mol TE/g bs}$) presento un valor superior en comparación con otras plantas medicinales. Por ejemplo, Trevizan *et al.* (2020) reportaron valores de 4.80 a 185.85 $\mu\text{mol TE/g bs}$ para plantas andinas seleccionadas del norte de Chile; mientras que Biswas *et al.* (2023) indicaron valores de 95.60 y 104.10 $\mu\text{mol TE/g bs}$ para dos plantas medicinales provenientes de China, yute (*Corchorus capsularis*) y mulujía (*C. olitorius*), respectivamente. A partir de estos resultados se podría indicar que las hojas de cedroncillo es un eliminador potente del radical ABTS^{•+}.

Como se indicó anteriormente, empleando el método ORAC a las hojas de cedroncillo se registró un valor de 1,949.47 $\mu\text{mol TE/g bs}$. Al respecto, Trevizan *et al.* (2020) señalaron que a partir del extracto etanólico de las hojas de rika-rika se obtuvo un valor de 130.31 $\mu\text{mol TE/g bs}$. Por otro lado, Chirinos *et al.* (2013) reportaron que el extracto de cedrón presentó un valor de 798.2 $\mu\text{mol TE/g bs}$. Así mismo, Plaza *et al.* (2010) reportaron que los extractos obtenidos por extracción de agua subcrítica de las hojas de verbena común a una temperatura de 100 °C y 200 °C presentaron valores de 1,757.4 $\mu\text{mol TE/g bs}$ y 4,214.2 $\mu\text{mol TE/g bs}$, respectivamente. Se aprecia que las hojas de cedroncillo presentó una mayor capacidad antioxidante ORAC que los valores de la literatura. Las diferencias observadas además de atribuirse a las diferentes especies, se pueden deber las diferencias que presente cada método.

Por otro lado, las hojas de cedroncillo demostraron tener mayor cantidad de compuestos bioactivos (CFT, fenólicos libres, flavonoides totales y flavanoles totales) y capacidad antioxidante ABTS y ORAC que las hojas de pampa muña (Tabla 3). Esto podría indicar que las hojas cedroncillo proporciona una mayor cantidad de efectos beneficiosos para la salud al tener un contenido más elevado de compuestos antioxidantes (Peñarrieta *et al.*, 2014).

4.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE CEDRONCILLO

En la etapa de optimización de la extracción asistida por ultrasonido a partir de hojas de cedroncillo, se aplicó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) basado en el Diseño de Box-Behnken (DBB). Se emplearon tres variables independientes para llevar a cabo la optimización: tiempo (X_1), temperatura (X_2) y concentración de etanol (X_3). Además, se incorporaron cuatro puntos centrales, resultando en un total de 16 corridas (tratamientos experimentales). El criterio de optimización usado fue maximizar las siguientes tres variables respuestas: contenido de compuestos fenólicos totales (mg AGE/g bs) (Y_1), capacidad antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/g bs}$) (Y_2) y capacidad antioxidante ORAC ($\mu\text{mol TE/g bs}$) (Y_3). La Tabla 11 presenta los valores obtenidos de las tres variables respuestas analizadas en los extractos etanólicos de las hojas de cedroncillo.

Tabla 11: Resultados* de las variables respuestas (CFT, ABTS y ORAC) utilizando la metodología de superficie respuesta basado en el diseño de Box-Behnken para la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de cedroncillo

Corridas	Variables independientes			Variables respuestas		
	X ₁ Tiempo (min)	X ₂ Temperatura (°C)	X ₃ Etanol (%)	Y ₁ CFT (mg AGE/g bs)	Y ₂ ABTS (μmol TE/g bs)	Y ₃ ORAC (μmol TE/g bs)
1	12.5	50	55	82.1 ± 2.5	603.5 ± 12.7	2,613.8 ± 58.1
2	12.5	30	80	71.3 ± 0.5	477.7 ± 7.9	2,139.4 ± 64.7
3	12.5	50	55	85.8 ± 0.6	605.0 ± 4.4	2,415.8 ± 135.9
4	20.0	50	30	63.3 ± 2.1	447.2 ± 2.7	1,628.4 ± 79.0
5	20.0	70	55	88.7 ± 0.3	618.2 ± 11.6	2,421.2 ± 119.4
6	5.0	50	30	64.9 ± 3.4	489.1 ± 28.5	1,437.4 ± 44.4
7	12.5	30	30	47.3 ± 1	382.3 ± 11.2	1,273.1 ± 60.3
8	12.5	50	55	88 ± 0.7	617.7 ± 7.0	2,546.8 ± 77.6
9	5.0	50	80	79.6 ± 0.1	528.6 ± 7.7	2,005.5 ± 74.6
10	12.5	50	55	87.4 ± 1.1	610.5 ± 8.2	2,476.6 ± 192.8
11	5.0	70	55	90.6 ± 0.5	626.7 ± 16.5	2,506.3 ± 139.4
12	20.0	30	55	77.7 ± 1	533.5 ± 11.9	2,021.7 ± 77.5
13	12.5	70	30	89.7 ± 1.6	544.3 ± 46.7	2,220.5 ± 121.4
14	20.0	50	80	83.4 ± 1.1	539.4 ± 18.4	2,408.9 ± 480.0
15	5.0	30	55	79 ± 0.3	548.7 ± 17.0	2,135.5 ± 100.1
16	12.5	70	80	86.5 ± 0.3	559.2 ± 7.7	2,368.7 ± 156.3

CFT: Compuestos fenólicos totales, ABTS: Capacidad antioxidante método ABTS, ORAC: Capacidad antioxidante método ORAC.

*Los resultados corresponden al promedio ± desviación estándar de tres repeticiones.

En la Tabla 11, se aprecia que el contenido de CFT osciló entre 47.3 y 90.6 mg AGE/g bs, la capacidad antioxidante ABTS varió entre 382.3 y 626.7 ($\mu\text{mol TE/g bs}$), y la capacidad antioxidante ORAC varió entre 1,273.1 y 2,613.8 ($\mu\text{mol TE/g bs}$).

Por otra parte, en la Tabla 11 se muestra que los valores mínimos de CFT, ABTS y ORAC correspondieron a la corrida que utilizó tiempo de 12.5 min, temperatura de 30 °C y concentración de etanol del 30 por ciento. Sin embargo, solo los valores máximos de CFT y ABTS correspondieron a la corrida que utilizó tiempo de 5 min, temperatura de 70 °C y concentración de etanol del 55 por ciento. Por su parte, el valor máximo de ORAC correspondió a la corrida que empleó tiempo de 12.5 min, temperatura de 50 °C y concentración de etanol del 55 por ciento.

Además, se calculó los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables respuestas. Se mostró que los CFT presentó una correlación significativa ($p < 0.05$) y positiva muy alta con la capacidad antioxidante ABTS ($r = 0.9231$) así como la capacidad antioxidante ORAC ($r = 0.9120$). También, se observó una correlación significativa ($p < 0.05$) y positiva muy alta ($r = 0.9022$) entre los métodos ABTS y ORAC que evalúan la capacidad antioxidante. Esto sugirió que los CFT así como la presencia de otros compuestos antioxidantes en el extracto de hojas de cedroncillo desempeñaron un papel importante para la actividad antioxidante de ambos métodos ABTS y ORAC.

a. EVALUACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

La aplicación de la MSR generó las ecuaciones que representan los modelos matemáticos de segundo orden (cuadrático), los cuales establecen una relación empírica entre las variables respuestas CFT (Y_1), ABTS (Y_2) y ORAC (Y_3), y las variables independientes tiempo (X_1), temperatura (X_2) y concentración de etanol (X_3). Las ecuaciones de los modelos matemáticos son presentadas en la Tabla 12.

El análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de la Ecuación 4, se realizó para evaluar el efecto de las variables independientes y el efecto combinado de estas sobre el contenido de CFT (Anexo 5). Se observó que las variables y sus interacciones resultaron no significativas ($p > 0.05$), excepto para la temperatura (X_2), concentración de etanol (X_3),

interacción temperatura-concentración de etanol (X_2X_3) e interacción cuadrática concentración de etanol (X_3^2) que si fueron significativas ($p < 0.05$). La mayor influencia lineal significativa se observó para la variable temperatura (X_2) seguida por la variable concentración de etanol (X_3) (F-ratio: 114.68 y 55.37, respectivamente). La interacción cuadrática más significativa correspondió a la concentración de etanol (X_3^2) seguido de la interacción temperatura-concentración de etanol (X_2X_3) (F-ratio: 77.6 y 26.38, respectivamente).

Tabla 12: Modelos matemáticos resultantes de la metodología de superficie respuesta para la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de las hojas de cedroncillo

Variables respuestas	Ecuaciones del modelo predictivo
CFT (mg AGE/g bs)	$-50.4028 + 1.37568*X_2 + 2.91906*X_3 - 0.01359*X_2*X_3 - 0.018648*X_3^2$ (4)
ABTS ($\mu\text{mol TE/g bs}$)	$-250.929 + 9.30838X_2 + 19.8478*X_3 + 0.07028*X_1*X_3 - 0.0469812*X_2^2 - 0.04021*X_2*X_3 - 0.159144*X_3^2$ (5)
ORAC ($\mu\text{mol TE/g bs}$)	$-2668.55 + 45.2836*X_2 + 106.66*X_3 - 3.31018*X_1^2 - 0.35909*X_2*X_3 - 0.731168*X_3^2$ (6)

X_1 : Tiempo, X_2 : Temperatura, X_3 : Concentración de etanol.

Respecto a la capacidad antioxidante ABTS, se realizó el ANOVA para evaluar el efecto de las variables y sus interacciones (Anexo 6). Se aprecia que las variables y sus interacciones resultaron significativas ($p < 0.05$), excepto el tiempo (X_1), interacción cuadrática tiempo (X_1^2) e interacción tiempo-temperatura (X_1X_2) que no fueron significativos ($p > 0.05$). La mayor influencia lineal significativa se observó para la variable temperatura (X_2) seguida de la variable concentración de etanol (X_3) (F-ratio: 497.88 y 176.82, respectivamente). La interacción cuadrática con mayor significancia fue la concentración de etanol (X_3^2), seguido de las interacciones temperatura-concentración de etanol (X_2X_3), interacción cuadrática temperatura (X_2^2) y tiempo-concentración de etanol (X_1X_3) (F-ratio: 955.95, 39.06, 34.12, y 16.78, respectivamente).

Asimismo, para la capacidad antioxidante ORAC, se realizó el ANOVA para evaluar el efecto de las variables y sus interacciones (Anexo 7). Se aprecia que las variables y sus interacciones resultaron significativas ($p < 0.05$), excepto el tiempo (X_1), interacción

tiempo-temperatura (X_1X_2), interacción tiempo-concentración de etanol (X_1X_3) e interacción cuadrática temperatura (X_2^2) que no fueron significativos ($p > 0.05$). La mayor influencia lineal significativa se observó para la variable concentración de etanol (X_3) seguida de la temperatura (X_2) (F-ratio: 94.88 y 64.4, respectivamente). Con respecto a las interacciones cuadráticas, el más significativo correspondió a la concentración de etanol (X_3^2), seguido de las interacciones cuadrática de tiempo (X_1^2) y temperatura-concentración de etanol (X_2X_3) (F-ratio: 113.53, 18.85 y 17.52, respectivamente).

Los modelos matemáticos determinados para las variables CFT, ABTS y ORAC (Tabla 12) se caracterizaron por tener una falta de ajuste no significativo ($p > 0.05$). Como se señaló previamente una falta de ajuste no significativa es indicativo que el modelo de segundo orden se ajusta de manera conveniente a los datos (Gutiérrez y De la Vara, 2008). Además, los modelos matemáticos resultantes para las variables respuestas CFT, ABTS y ORAC reportaron coeficientes de determinación (R^2) altos de 90.51, 98.62 y 94.48 por ciento; mientras que los valores R^2 ajustado fueron 76.27, 96.56 y 86.21, respectivamente. Con respecto al R^2 , estos valores indican cuanto porcentaje de la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático. Asimismo, el R^2 constituye un indicador confiable para evaluar la proximidad entre los valores predichos por el modelo y los valores experimentales.

b. ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE RESPUESTA

Las gráficas de superficie respuesta presentadas en las Figuras 15, 16 y 17 se realizaron a partir de los modelos cuadráticos para CFT, ABTS y ORAC (Tabla 12), respectivamente. Estas figuras permiten ilustrar los efectos principales e interactivos de las variables independientes sobre cada variable respuesta. El objetivo principal fue identificar el valor óptimo de las variables independientes para maximizar cada variable respuesta. Es importante indicar que las figuras se obtuvieron mediante la fijación de una variable en el punto medio (nivel cero); mientras que las otras dos variables varían para predecir cada variable respuesta.

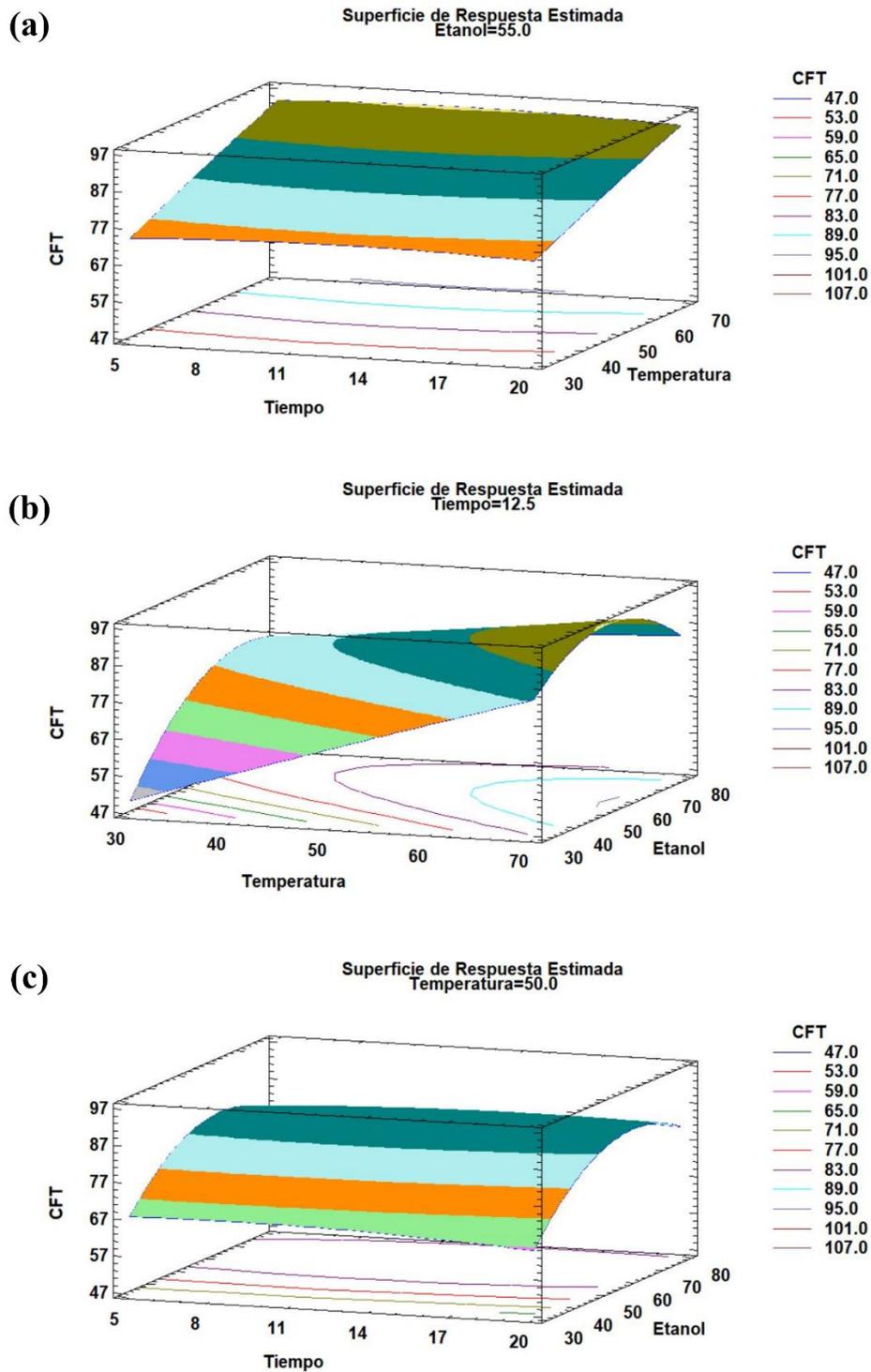


Figura 15: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol, sobre el contenido de compuestos fenólicos

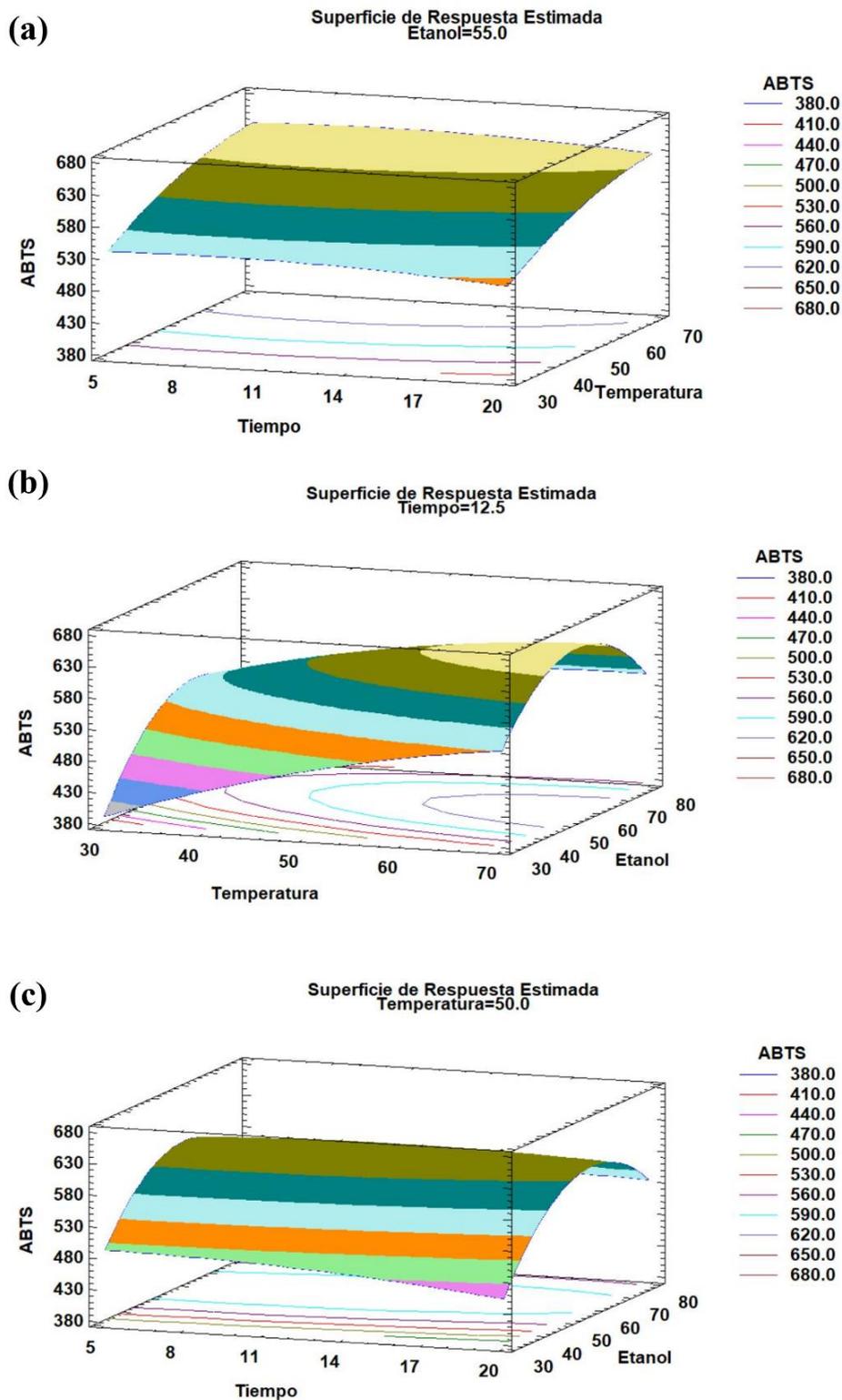


Figura 16: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol, sobre la capacidad antioxidante ABTS

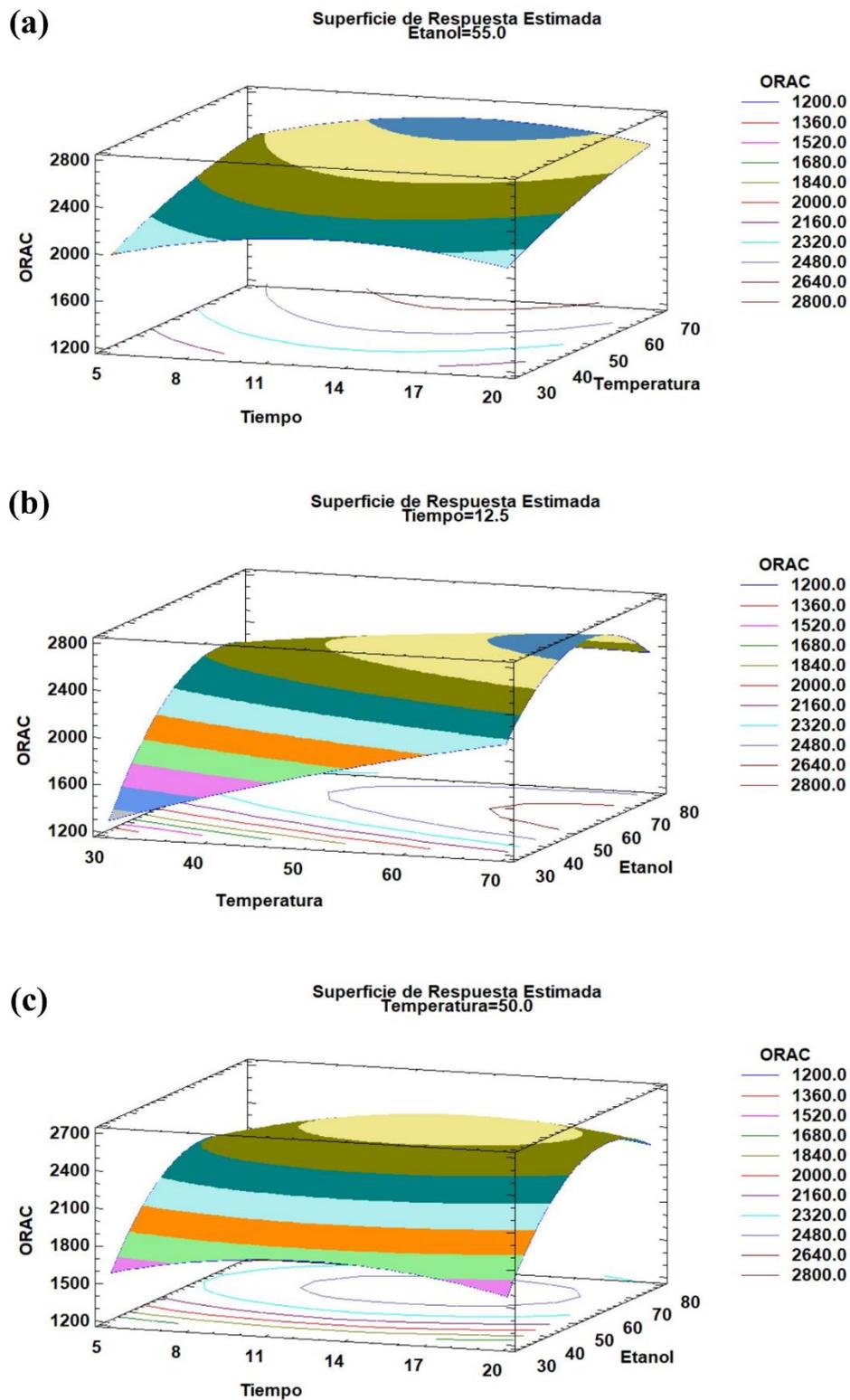


Figura 17: Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) Tiempo vs Temperatura; (b) Temperatura vs Concentración de etanol y (c) Tiempo vs Concentración de etanol, sobre la capacidad antioxidante ORAC

En las Figuras 15, 16 y 17 se muestran los gráficos de superficie respuesta correspondientes al contenido de CFT, la capacidad antioxidante ABTS y la capacidad antioxidante ORAC del extracto de hojas de cedroncillo, respectivamente. Se aprecia que al aumentar la temperatura hasta 70 °C ejerce un efecto positivo sobre las variables respuestas. Según Kumar *et al.* (2021) la temperatura es importante durante la extracción asistida por ultrasonido (EAU), indicando que el aumento de la temperatura incrementa la difusividad, lo cual facilita la transferencia de CFT desde la matriz vegetal al solvente. Esto se debe a que el calor provoca la expansión y ruptura de las estructuras celulares de la matriz vegetal. Además, como esta condición de temperatura (70 °C) demostró tener un mayor contenido de CFT, estos componentes generaron que el extracto de hojas de cedroncillo también presente una mayor capacidad antioxidante (Garrido *et al.*, 2013).

Asimismo, las Figuras 15, 16 y 17 revelan que el aumento de la concentración de etanol hasta aproximadamente el 55 por ciento mostró los mejores resultados para las variables respuestas. Sin embargo, se observó que el uso de concentraciones superiores al 55 por ciento provocó una disminución en todas estas variables. Este comportamiento al igual que en el caso de la pampa muña, se debe a que el aumento de la concentración del etanol reduce la polaridad de la solución, afectando la solubilidad de los compuestos fenólicos (Khazaei *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2021). Además, es lógico que la capacidad antioxidante ABTS y ORAC presenten valores altos cuando se emplea la concentración de etanol al 55 por ciento, ya que a esta concentración se está obteniendo un mayor contenido de CFT que permite obtener una mayor capacidad antioxidante (Garrido *et al.*, 2013).

Existen estudios acerca de plantas medicinales que han optimizado la técnica de EAU, y que han analizado las mismas variables independientes (tiempo, temperatura y concentración de etanol) que se emplearon en este estudio. En la investigación realizado por Mohamed *et al.* (2020), se optimizó el proceso de extracción de CFT de hojas de argel (*Solenostemma argel* Hayne) y determinaron que las condiciones ideales fueron un tiempo de 37.07 min, una temperatura de 60 °C y una concentración de etanol del 39.14 por ciento. Los resultados del presente estudio y los hallazgos existentes en la literatura resultan difíciles de compararlos, debido a las diferencias en los equipos utilizados, las variables y rangos utilizados, así como las diferencias en la matriz vegetal.

Además, durante las pruebas preliminares de este estudio se determinó que una relación MP:S de 1:100 g/mL produjo resultados superiores de CFT, capacidad antioxidante ABTS y ORAC para el cedroncillo. Investigaciones previas han abordado la relación MP:S para obtener extractos a partir de plantas medicinales de la familia *Verbenaceae*. Por ejemplo, Riguene *et al.* (2022) evaluaron esta variable en el proceso de EAU de verbena común, en un rango de 1:10 hasta 1:50 g/mL, y determinaron que valores superiores a 1:40 g/mL generaron una disminución del contenido de CFT. Por su parte, Jesus *et al.* (2024) estudiaron esta variable para la EAU de *Lantana camara Linn.*, y al realizar la optimización de esta técnica determinaron que la relación MP:S de 1:60 g/mL fue el valor óptimo para alcanzar un mayor contenido de CFT. Además, Touati *et al.* (2021) en el proceso de optimización de la extracción asistida por microondas (EAM) de hojas de cedrón (*Lemon verbena*) estudiaron la relación MP:S en un rango de 1:20 a 1:40 g/mL, encontrando que una relación MP:S de 1:40 g/mL fue el valor óptimo para obtener un mayor contenido de CFT. Se puede observar que el valor de la relación MP:S puede variar dependiendo de la matriz alimentaria que se está evaluando, la técnica de extracción y las condiciones que se utilizaron durante el proceso de extracción.

En las pruebas preliminares también se determinó que una amplitud del 40 por ciento proporciona mejores resultados para el cedroncillo. No se han encontrado investigaciones previas que hayan abordado la amplitud para obtener extractos a partir de plantas medicinales de la familia *Verbenaceae*, pero sí de otras familias como la *Asteraceae*. Por ejemplo, Yancheshmeh *et al.* (2022) evaluaron esta variable en un rango del 50 al 100 durante la EAU de *Achillea kellalensis*, y concluyeron que una amplitud del 89.73 por ciento es el valor óptimo para obtener un mayor contenido de CFT, flavonoides totales y capacidad antioxidante (DPPH). Se puede apreciar que el valor de la amplitud varía por diversos factores, tales como la genética que presenta cada planta medicinal, el estado en el que fue recolectado la planta medicinal, así como las condiciones utilizadas durante la EAU.

c. OPTIMIZACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS RESPUESTAS

La optimización simultánea de las respuestas se realizó para identificar las condiciones óptimas con los que se obtiene simultáneamente los valores máximos de CFT, ABTS y

ORAC. Este procedimiento se llevó a cabo luego de haber obtenido los modelos matemáticos de segundo orden correspondientes a cada variable respuesta que se evaluó, los cuales se observan en la Tabla 12. Luego, teniendo en cuenta el método de la función de deseabilidad ($d = 1.00$), se determinó dicha función para cada variable respuesta. Posteriormente, se fusionaron las deseabilidades asociadas a las variables respuestas para construir una función compuesta denominada “D” de deseabilidad. Esta función se determinó como la media geométrica de las funciones de deseabilidad de cada variable respuesta, debido a que las variables presentaron el mismo grado de importancia. La Tabla 13 muestra las condiciones óptimas de la extracción por ultrasonido (tiempo, temperatura y concentración de etanol) y las variables respuestas estimadas (CFT, ABTS y ORAC) para el extracto de hojas de cedroncillo. Los valores se obtuvieron a partir del software estadístico *Statgraphics Centurion XVI*.

Tabla 13: Variables respuestas estimadas en condiciones de optimización para el extracto de hojas de cedroncillo

Condiciones óptimas			Variables respuestas estimadas		
X ₁ Tiempo (min)	X ₂ Temperatura (°C)	X ₃ Etanol (%)	Y ₁ CFT (mg AGE/g bs)	Y ₂ ABTS (µmol TE/g bs)	Y ₃ ORAC (µmol TE/g bs)
12.3	61.0	57.3	91.4	632.4	2,643.1

CFT: Compuestos fenólicos totales, ABTS: Capacidad antioxidante método ABTS, ORAC: Capacidad antioxidante método ORAC.

d. VALIDACIÓN DEL MODELO

Para validar el modelo matemático, se llevaron a cabo pruebas experimentales destinadas a evaluar la proximidad de los resultados obtenidos con los valores estimados de las variables respuestas. Estas pruebas se realizaron bajo condiciones óptimas de extracción, las cuales se especifican en la Tabla 13. Además, se mantuvieron constantes la relación MP:S de 1:100 g/mL, la amplitud al 40 por ciento y las duraciones de pulso de 5 s encendido y 5 s apagado. En la Tabla 14 se detallan tanto los valores estimados como los experimentales de las variables evaluadas en el extracto de hojas de cedroncillo.

Tabla 14: Valores estimados y experimentales de las variables respuestas en condiciones de optimización para el extracto de hojas de cedroncillo

Variables respuestas	Estimado	Experimental*
Compuestos fenólicos totales (mg AGE/g bs)	91.4	89.6 ± 0.4
Capacidad antioxidante ABTS (µmol TE/g bs)	632.4	602.4 ± 6.5
Capacidad antioxidante ORAC (µmol TE/g bs)	2,643.1	2,873.8 ± 69.9

En la Tabla 14 se aprecia que los valores estimados y experimentales presentan semejanzas. Asimismo, es importante señalar que la condición óptima para esta optimización se determinó con una función compuesta de deseabilidad con un valor $d = 0.9893$, esto significa que el 98 por ciento del objetivo estimado se encontró realizando la extracción con las condiciones óptimas (Tabla 13). Los valores experimentales de CFT, ABTS y ORAC se aproximaron a los valores estimados en un 98.03, 95.25 y 108.73 por ciento. Todos los valores observados estuvieron dentro del intervalo previsto hasta un nivel del 95%. Por lo tanto, el modelo podría utilizarse para predecir los valores de respuesta.

Por otro lado, el contenido de CFT en las hojas de cedroncillo presentó un valor de 56.03 mg AGE/g bs (Tabla 10), y con las condiciones óptimas de extracción incrementó a 89.6 mg AGE/g bs (Tabla 14), lo cual representa un aumento de 62.53% en el rendimiento. Este incremento se puede deber al cambio de solvente como el etanol que es a fin a este tipo de compuestos, así como la aplicación de temperatura que incrementa la solubilidad del soluto en el solvente y permite una mejor de extracción (Kumar *et al.*, 2021).

4.2.3. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UPLC®-PDA DEL EXTRACTO ÓPTIMO DE CEDRONCILLO

En la Tabla 15, se aprecian los resultados de la cuantificación de los compuestos fenólicos de cedroncillo realizado en un cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) acoplado a detector de arreglo de diodos (PDA). El cromatograma del cedroncillo se muestra en el Anexo 8.

Tabla 15: Identificación y contenido (mg/g bs) de los principales compuestos fenólicos del extracto de hojas de cedroncillo por UPLC-PDA

°N Picos	Tiempo retención (min)	λ_{max} (nm)	Fenólico asignado	Familia	Contenido (mg/g hoja bs)
1	16.58	254.9, 347.3	Derivado de luteolina	Flavona	4.88
2	18.45	251.3, 342.7	Derivado de luteolina	Flavona	0.07
3	19.37	266.7, 335.8	Derivado de apigenina	Flavona	Tr
4	19.89	252.5, 347.3	Derivado de luteolina	Flavona	3.10
5	20.41	253.7, 347.3	Derivado de luteolina	Flavona	0.13
6	20.76	329.9	Derivado de ácido cafeico	Ácido hidroxicinámico	21.80
7	21.33	326.3	Derivado de ácido cafeico	Ácido hidroxicinámico	Tr
8	21.58	327.5	Derivado de ácido 4,5 dicafeoil quínico	Ácido hidroxicinámico	Tr
9	21.84	266.7, 337	Derivado de apigenina	Flavona	0.75
10	22.13	252.5, 347.3	Derivado de luteolina	Flavona	Tr
Total					30.73

Identificación basada en el espectro de absorción entre 280-700 nm. Tr: Trazas (compuesto identificado, pero no cuantificado).

En la Tabla 15 se observa que se detectaron un total de 10 picos, los cuales 3 fueron identificados como compuestos pertenecientes a los ácidos hidroxicinámicos (derivados de ácido cafeico y ácido 4,5 dicafeoil quínico) y 7 como flavonas (derivados de luteolina y apigenina). Esto se asemeja a lo reportado con Portmann *et al.* (2012) y Cadenillas *et al.* (2023), quienes indican que a partir de extractos acuosos y metanólicos de las hojas de verbena se ha detectado la presencia de varios ácidos hidroxicinámicos y flavonoides (flavonas), los cuales son responsables de otorgar la acción antioxidante. Asimismo, Ávila *et al.* (2018) señalaron que en los extractos etanólicos obtenidos a partir de 10 especies pertenecientes a la familia *Verbenaceae*, solo se detectaron las flavonas como los únicos flavonoides presentes.

En la Tabla 15 se aprecia que la cuantificación total de los compuestos fenólicos obtuvo un valor de 30.73 mg/g bs, presentando un mayor contenido los ácidos hidroxicinámicos con un valor de 21.80 mg/g bs (~70.9 por ciento). En relación con este aspecto, Zeni *et al.* (2013) reportaron que el extracto acuoso de las hojas de cedrón del monte obtuvo una mayor presencia de ácidos hidroxicinámicos en comparación con los ácidos hidroxibenzoicos, destacando el ácido ferúlico, el ácido transcinámico y el ácido *p*-cumárico como los principales ácidos hidroxicinámicos. Asimismo, Ávila *et al.* (2018) identificaron que en las hojas de cedrón del monte presentó ácido clorogénico. Por otro lado, Cheurfa *et al.* (2022) reportaron que no lograron detectar ácido cafeico en los extractos acuosos e hidroetanólicos de las hojas de cedrón; mientras que Cadenillas *et al.* (2023) identificaron en proporciones pequeñas ácido cafeico en el extracto etanólico de las hojas de verbena. A pesar de que la mayoría de las investigaciones sobre plantas medicinales pertenecientes al género *Aloysia* reporten una baja concentración del ácido cafeico, investigadores como Vendramin *et al.* (2021) han señalado su abundante presencia en otras plantas medicinales como equinácea (*Echinacea purpurea*), achicoria común (*Cichorium intybus*), escarola (*Cichorium endivia*), lechuga silvestre (*Lactuca virosa*) y eupatoria (*Eupatorium perfoliatum*).

En la Tabla 15 se observa que el extracto etanólico de cedroncillo presentó un contenido de las flavonas de 8.93 mg/g bs (~29.1 por ciento), detectando la presencia de flavonas derivadas de luteolina con 8.18 mg/g bs (~26.6 por ciento) y en menor medida de apigenina con 0.75 mg/g bs (~2.5 por ciento).

En relación a la presencia de flavonas, Ávila *et al.* (2018) indicaron que a partir del extracto etanólico (80 por ciento, v/v) de cedrón del monte identificaron un mayor contenido de luteolina-7-O-glucósido y en menor medida apigenina-7-O-glucósido. Asimismo, Cadenillas *et al.* (2023) indicaron que la flavona que encontraron en mayor abundancia en el extracto etanólico de verbena fue la luteolina-7-diglucurónido, y también detectaron en menor medida otras flavonas como crisoeriol-7-diglucurónido, acacetina-7-diglucurónido, apigenina-7-diglucurónido y diosmetina-7-diglucurónido. De igual manera, Fraisse *et al.* (2018) reportaron que el extracto acuoso de las hojas de cedrón presentó, de mayor a menor contenido, las siguientes flavonas: luteolina-7-O-diglucurónido, diosmetina-7-O-diglucurónido, apigenina-7-O-glucósido y apigenina-7-O-diglucurónido. Por lo tanto, es probable que los compuestos identificados en la presente investigación sea uno de los compuestos reportados por la literatura, y que las plantas hayan estado expuestas a altos niveles de radiación solar UV-B por presentar un elevado contenido de flavonas derivadas de luteolina (Gutiérrez *et al.*, 2018).

Por otro lado, diversos extractos a partir de plantas del género *Aloysia*, han reportado la presencia de compuestos fenilpropanoides glicosilados tales como verbascósido e isoverbascósido (Fraisse *et al.*, 2018; Sánchez *et al.*, 2019). Además, según Wu *et al.* (2023) el verbascósido y el isoverbascósido son derivados del ácido cafeico, de tal manera, queda la posibilidad de que los picos 6 y 7, que se muestran en la Tabla 15, correspondan a alguno de estos compuestos.

Además, es importante indicar que las diferencias en la composición entre el extracto de la presente investigación y lo reportado en la literatura para los extractos de otras plantas medicinales pueden deberse a que el tipo y cantidad de compuestos bioactivos que contiene cada planta se encuentran influenciados por diversos factores, tales como origen geográfico, condiciones ambientales, cosecha, post-cosecha, método de extracción, entre otros (Ávila *et al.*, 2018; Cadenillas *et al.*, 2023).

4.2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO ÓPTIMO DE CEDRONCILLO

En la Tabla 16 se muestran las actividades biológicas evaluadas, hipoglucemiante, hipolipemiante y antihipertensiva que se determinó para el extracto óptimo de cedroncillo en concentraciones variadas. Los resultados de IC₅₀ se expresaron como mg extracto seco de cedroncillo por mL de solución (mg/mL), y en términos de contenido fenólico, es decir, mg ácido gálico equivalente por mL de solución (mg AGE/mL).

Tabla 16: Actividad biológica del extracto de hojas de cedroncillo

Actividad biológica	Concentración		Inhibición (%)*	IC ₅₀ (mg AGE/mL)*	IC ₅₀ (mg /mL)*
	(mg AGE/mL)	(mg/mL)			
α-amilasa	10.12	42.37	68.54 ± 5.22	6.59 ± 0.11	27.60 ± 0.48
	6.75	28.25	47.48 ± 3.15		
	5.06	21.19	38.68 ± 1.43		
	4.05	16.95	34.30 ± 1.30		
	3.37	14.12	24.48 ± 2.08		
α-glucosidasa	5.06	21.19	70.85 ± 5.44	2.90 ± 0.34	12.15 ± 1.43
	2.53	10.59	40.91 ± 2.73		
	1.69	7.06	33.04 ± 3.88		
	1.27	5.30	22.92 ± 4.68		
	1.01	4.24	17.49 ± 4.98		
Actividad hipolipemiante	1.01	4.24	91.24 ± 0.24	0.19 ± 0.01	0.79 ± 0.04
	0.34	1.41	59.70 ± 1.53		
	0.20	0.85	52.42 ± 0.80		
	0.14	0.61	44.68 ± 1.30		
	0.10	0.42	35.91 ± 1.79		
Actividad antihipertensiva	1.50	6.28	52.12 ± 0.52	1.25 ± 0.04	5.25 ± 0.16
	1.25	5.23	50.37 ± 0.68		
	1.00	4.19	47.48 ± 1.03		
	0.75	3.14	43.15 ± 1.69		
	0.50	2.09	40.83 ± 2.22		

AGE: Ácido gálico equivalente. *Los resultados corresponden al promedio ± desviación estándar de tres repeticiones.

a. ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

La actividad hipoglucemiante del extracto de cedroncillo se determinó mediante la inhibición de las enzimas α -amilasa pancreática porcina y α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, dado que estas enzimas están involucradas en hidrolizar los carbohidratos y su inhibición permite retardar la absorción de glucosa en sangre (Jaramillo y Ojeda, 2018).

Con respecto a la inhibición de la enzima α -amilasa, en la Tabla 16 se aprecia que a medida que incrementa la concentración aumenta la actividad inhibitoria de α -amilasa, llegando a inhibir el 68.54 por ciento al emplear una concentración de 42.37 mg/mL (~10.12 mg AGE/mL). Se ha observado escasa literatura acerca de la actividad enzimática de α -amilasa que presentan las plantas del género *Aloysia*; sin embargo, existe una mayor información sobre plantas que pertenecen a la familia *Verbenaceae*, la cual engloba géneros adicionales a parte de *Aloysia*.

Ávila *et al.* (2018) informaron que los extractos etanólicos de 10 plantas medicinales pertenecientes a la familia *Verbenaceae* al utilizar una concentración de 10 mg/mL presentaron valores de inhibición en un rango de 26.37 a 58.47 por ciento. En este contexto, el extracto de hojas de cadillo (*Priva mexicana*) mostró la menor inhibición; mientras que el extracto de hojas de verbena (*V. menthifolia*) registró la mayor. Se aprecia que el extracto de hojas de cedroncillo requiere una concentración superior a 10 mg/mL para alcanzar los porcentajes de inhibición obtenidos por las plantas mencionadas previamente. Además, las diferencias encontradas se pueden deber a que son distintas especies, así como las variaciones entre los métodos de extracción y el análisis utilizado para la inhibición de la enzima α -amilasa (Lianza *et al.*, 2022).

Por otro lado, en la Tabla 16 se aprecia que el extracto de hojas de cedroncillo presentó un valor de IC₅₀ de 27.60 mg/mL (~6.59 mg AGE/mL), dicho de otro modo, el extracto requirió esa concentración para inhibir el 50 por ciento de la actividad α -amilasa evaluada. Al respecto, Ávila *et al.* (2018) indicaron en su estudio que las 10 plantas medicinales de la familia *Verbenaceae* presentaron una baja actividad para inhibir α -amilasa, por lo que no realizaron los cálculos de IC₅₀. Este mismo comportamiento lo reportó Jaramillo y Ojeda (2018) para el extracto metanólico de verbena (*V. litoralis*) recolectada de Ecuador. Por el

contrario, Khanal y Patil (2020) reportaron que el extracto hidroalcohólico (70 por ciento) de duranta (*Duranta repens*) recolectada de India presentó un valor de IC₅₀ de 704.99 µg/mL (~0.70 mg/mL), indicando una mejor inhibición que el extracto de hojas de cedroncillo.

En relación con la actividad α-glucosidasa, el extracto etanólico de hojas de cedroncillo presentó una inhibición de 70.85 por ciento empleando una concentración de 21.19 mg/mL (~5.06 mg AGE/mL), y obtuvo un valor de IC₅₀ de 12.15 mg/mL (~2.90 mg AGE/mL), tal como se muestra en la Tabla 16. Si bien no hay información específica acerca de la actividad que presenta esta especie, hay estudios de otras plantas medicinales pertenecientes a la familia *Verbenaceae* que reportan el valor IC₅₀.

Al respecto, Ávila *et al.* (2018) señalaron que los extractos etanólicos de plantas de la familia *Verbenaceae* presentaron valores de IC₅₀ entre 0.032 a 0.945 mg/mL. Asimismo, Jaramillo y Ojeda (2018) reportaron que el extracto metanólico de verbena (*V. litoralis*) presentó un valor de IC₅₀ de 337.9 µg/mL (~0.34 mg/mL). Por último, Lianza *et al.* (2022) indicaron que para los extractos etanólicos al 95 por ciento de hojas de orégano de monte (*Lippia origanoides* Kunt) recolectadas de dos lugares de Brasil presentaron valores de IC₅₀ de 48.4 µg/mL (~0.05 mg/mL) y 94.2 µg/mL (~0.09 mg/mL). Se observa que las hojas de cedroncillo presentaron menor eficacia de actividad inhibidora de α-glucosidasa comparando con otras especies de la misma familia, debido a que requiere una mayor concentración para poder inhibir el 50 por ciento de la enzima. Estas diferencias entre los valores de IC₅₀, se deben a diversos factores, entre los cuales se encuentran la variabilidad genética (diferentes especies de la misma familia *Verbenaceae*), las condiciones ambientales donde crecieron las plantas, las condiciones de extracción, así como las condiciones experimentales para realizar las pruebas enzimáticas (Lianza *et al.*, 2022).

Además, la capacidad que presenta el extracto etanólico de hojas de cedroncillo para inhibir las enzimas α-amilasa y α-glucosidasa podría atribuirse a los compuestos bioactivos. El análisis de compuestos fenólicos (ítem 4.2.3) identificó la mayor presencia de ácidos hidroxicinámicos (derivados de ácido cafeico y ácido 4,5 dicafeoil quínico), y flavonas (derivados de luteolina y apigenina), tal como se muestra en la Tabla 15.

Se ha reportado que los ácidos hidroxicinámicos son compuestos fenólicos que tienen el potencial de inhibir la actividad de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Este efecto inhibitorio se encuentra relacionado con su estructura molecular, donde los grupos hidroxilo de los anillos aromáticos contribuyen a sus distintas propiedades moleculares, como la polaridad, la estabilidad y la unión. Asimismo, en su estructura está presente el doble enlace carbono, que es responsable de la transferencia de electrones, y contribuye a la estabilización de los compuestos que interactúan con la enzima o el sustrato de la reacción (Sun *et al.*, 2019).

Con respecto al ácido cafeico, diversos estudios reportan que presenta la capacidad de inhibir a la α -amilasa y a la α -glucosidasa. Se ha demostrado que su administración, como compuesto puro, permitió mejorar la sensibilidad a la insulina y la función de las células β al tiempo que reduce el estrés oxidativo, así como disminuir la glucosa en sangre y la inflamación en ratas con diabetes inducida por la administración de fármacos (aloxano o estreptozotocina) (Akhlaghipour *et al.*, 2023). En cambio, para el ácido 4,5 dicafeoilquínico que es un derivado del ácido dicafeoil quínico, solo se ha reportado que presenta la propiedad de inhibir la α -glucosidasa (Tammam *et al.*, 2021).

Las flavonas identificadas como derivados de luteolina y apigenina, también tienen la habilidad de inhibir enzimas como la α -amilasa, ya que en su estructura molecular presentan grupos hidroxilo (-OH) que permiten donar electrones y estabilizar el sitio activo de la α -amilasa (Sun *et al.*, 2019). Esto concuerda con Tadera *et al.* (2006), quienes indicaron en su estudio *in vitro* que la luteolina, como compuesto puro, demostró ser un inhibidor potente de la enzima α -amilasa pancreática porcina. Por lo mencionado anteriormente, y teniendo en cuenta que estas flavonas se encontraron en bajo contenido en el extracto de hojas de cedroncillo, podría explicar porque se requirió una concentración elevada de dicho extracto para poder inhibir la enzima α -amilasa.

Además, al comparar los valores IC_{50} para la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, se observa que el cedroncillo registró valores 27.60 mg/mL y 12.15 mg/mL (Tabla 16), respectivamente; mientras que la pampa muña mostró valores de 39.95 mg/mL y 16.63 mg/mL (Tabla 9). Se aprecia que el extracto optimizado de hojas de cedroncillo presentó una mayor inhibición de ambas enzimas al requerir una menor concentración, por

lo que es posible indicar que el extracto de cedroncillo presentó una buena actividad hipoglucemiante.

b. ACTIVIDA HIPOLIPEMIANTE

El extracto de hojas de cedroncillo a la concentración de 4.24 mg/mL (~1.01 mg AGE/mL) mostró una inhibición de la lipasa pancreática de 91.24 por ciento, y su valor de IC₅₀ fue de 0.79 mg/mL (~0.19 mg AGE/mL), tal como se aprecia en la Tabla 16. A pesar de que no hay información específica del extracto de esta especie, se tiene información sobre extractos de otras plantas medicinales pertenecientes a la familia *Verbenaceae*, que presenta géneros adicionales además de *Aloysia*. Por ejemplo, Ong *et al.* (2014) reportaron que a una concentración de 100 µg/mL (0.1 mg/mL) el extracto de hierba del mosquito (*P. nodiflora*) presentó una inhibición de la lipasa pancreática de 18.26 por ciento; mientras que el extracto de verbena falsa (*Stachytarpheta australis*) no logró inhibir dicha enzima. Las diferencias entre los valores de IC₅₀ se deben a diversos factores, entre los cuales se incluyen la diferencia que hay entre especies de una misma familia, las condiciones de extracción que abarcan desde la selección de la parte de la planta hasta los parámetros y solventes empleados, así como las condiciones experimentales que presentaron las pruebas de inhibición de la lipasa pancreática (Lianza *et al.*, 2022).

La capacidad del extracto etanólico de hojas de cedroncillo para inhibir la enzima lipasa pancreática de porcino podría atribuirse a sus compuestos fenólicos. El análisis de identificación de compuestos fenólicos demostró la presencia mayoritaria de derivados del ácido cafeico (Tabla 15). Con respecto al ácido cafeico, Cao *et al.* (2019) señalan que presenta actividad hipolipemiante, ya que permite reducir la acumulación de lípidos en el cuerpo humano y tiene un efecto beneficioso en el tratamiento de la dislipidemia. Asimismo, Muhammad *et al.* (2021) reportaron que estudios *in vivo* han demostrado que este compuesto bioactivo puede reducir el peso corporal y la acumulación de grasa en ratones que fueron inducidos a obesidad a través de una dieta alta en grasas.

Además, el extracto de hojas de cedroncillo se caracterizó por presentar flavonas, las cuales fueron identificadas como derivados de apigenina. Según Zhang *et al.* (2017) la apigenina es un compuesto que ha demostrado a través de pruebas *in vivo* e *in vitro* tener la

capacidad de regular las grasas (colesterol y triglicéridos) en sangre, es decir, tiene acción hipolipemiente, de tal forma que ayuda a prevenir la aterosclerosis.

Por otro lado, al comparar los valores IC_{50} para la inhibición de la enzima lipasa, se evidenció que el cedroncillo registró un valor de 0.79 mg/mL (Tabla 16); mientras que la pampa muña presentó un valor de 1.51 mg/mL (Tabla 9). Se observó que el extracto optimizado de hojas de cedroncillo presentó una mayor inhibición de la enzima lipasa, ya que necesitó una menor concentración para inhibir el 50 por ciento de la actividad de dicha enzima.

c. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

En la Tabla 16, se aprecia que el extracto de hojas de cedroncillo a la concentración de 6.28 mg/mL (~1.50 mg AGE/mL) mostró una inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de 52.12 por ciento, y que presentó un valor IC_{50} de 5.25 mg/mL (~1.25 mg AGE/mL). La capacidad del extracto de hojas de cedroncillo para inhibir ECA podría atribuirse a sus principales compuestos fenólicos, los cuales son derivados del: ácido cafeico, ácido 4,5 dicafeoil quínico, luteolina y apigenina, tal como se muestra en la Tabla 15.

Con respecto a los compuestos fenólicos identificados en el extracto etanólico de hojas de cedroncillo, Zhang *et al.* (2017) indicaron que la apigenina es un compuesto fenólico que tiene potencial para la prevención de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, porque permite incrementar la vasodilatación sobre el anillo aórtico de ratas, esta contracción del músculo liso vascular fue inducida por el fármaco fenilefrina. Además, la capacidad para inhibir ECA también se puede atribuir a los flavonoides identificados como la luteolina. Irondi *et al.* (2016) informaron que, al comparar la actividad inhibidora de la ECA entre 16 flavonoides, determino que la luteolina exhibió la mayor capacidad de inhibición.

Por último, al comparar los valores IC_{50} para la inhibición de la enzima ECA, se evidenció que el cedroncillo registró un valor de 5.25 mg/mL (Tabla 16); mientras que la pampa muña presentó un valor de 14.48 mg/mL (Tabla 9). Se observó que el extracto optimizado

de hojas de cedroncillo presentó una mayor inhibición de la enzima ECA, ya que necesitó una menor concentración para inhibir el 50 por ciento de la actividad de dicha enzima. Esto podría deberse al contenido de compuestos bioactivos de naturaleza fenólica en el extracto de cedroncillo, especialmente, los derivados de ácido hidroxicinámico y flavonoides que tienen una mayor influencia sobre la propiedad antihipertensiva (Sun *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2019).

V. CONCLUSIONES

1. Las hojas de cedroncillo presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos totales, fenólicos libres, y también una mayor capacidad antioxidante ABTS y ORAC que las hojas de pampa muña.
2. Las condiciones óptimas para la extracción por ultrasonido de los compuestos fenólicos de pampa muña fueron: tiempo 5.1 min, temperatura 69.7 °C y concentración de etanol de 44.9 por ciento. En cambio, las condiciones óptimas en el caso de cedroncillo fueron: tiempo 12.3 min, temperatura 61 °C y concentración de etanol de 57.3 por ciento.
3. El análisis UPLC-PDA realizado a los extractos óptimos de cedroncillo y pampa muña permitió identificar y cuantificar los principales compuestos fenólicos, destacando en ambos casos los ácidos hidroxycinámicos y flavonoides. Se observó que en el extracto óptimo de cedroncillo, el compuesto más importante fue un derivado de ácido cafeico; mientras que en la pampa muña el fenólico predominante fue un ácido rosmarínico.
4. Se evidenció que el extracto óptimo de cedroncillo mostró mayor capacidad inhibitoria en todas las enzimas: α -amilasa, α -glucosidasa, lipasa pancreática de porcino y enzima convertidora de angiotensina; en comparación con el extracto óptimo de pampa muña. En particular, el extracto de cedroncillo se destacó por tener mayor potencial para inhibir la lipasa pancreática de porcino.
5. La extracción asistida por ultrasonido resultó ser una alternativa interesante para obtener los compuestos fenólicos de las hojas de pampa muña y cedroncillo. Esta técnica permitió utilizar un menor porcentaje de solvente y corto tiempo de extracción.

VI. RECOMENDACIONES

- Complementar la identificación de los compuestos fenólicos de los extractos óptimos de cedroncillo y pampa muña con otras técnicas como la espectrometría de masas (LC-MS/MS).
- Utilizar técnicas cromatográficas para aislar y purificar los compuestos fenólicos de los extractos óptimos de cedroncillo y pampa muña, para luego evaluar sus actividades biológicas.
- Realizar estudios *in vivo* de inhibición de las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa, lipasa pancreática y enzima convertidora de los extractos óptimos de cedroncillo y pampa muña.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, A., Fusi, F., & Valoti, M. (2022). Perivascular adipose tissue modulates the effects of flavonoids on rat aorta rings: Role of superoxide anion and β 3 receptors. *Pharmacological Research*, 180, 106231. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106231
- Akhlaghpour, I., Shad, A., Askari, V., Maharati, A., & Rahimi, V. (2023). How caffeic acid and its derivatives combat diabetes and its complications: A systematic review. *Journal of Functional Foods*, 110, 105862. doi: 10.1016/j.jff.2023.105862
- Aldeen, M., Mansoor, R., & Aljoubbeh, M. (2015). Fluctuations of phenols and flavonoids in infusion of lemon verbena (*Lippia citriodora*) dried leaves during growth stages. *Nutrition & Food Science*, 45(5), 766–773. doi: 10.1108/NFS-04-2015-0037
- Ali, M., Mnafigui, K., Feki, A., Damak, M., & Allouche, N. (2014). In vitro antidiabetic, antiobesity and antioxidant proprieties of rosemary extracts. *Journal of Advances in Chemistry*, 10(2), 2305-2316. doi: 10.24297/jac.v10i2.5497
- Aloisio, C., Razola, M., Aznar, M., Longhi, M., Andreatta, A., & Verardo, V. (2023). Optimization of the Extraction Conditions of Bioactive Compounds from *Ocimum basilicum* Leaves Using Ultrasound-Assisted Extraction via a Sonotrode. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(13), 5286. doi: 10.3390/molecules28135286
- Álvarez, E. & Orallo, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm*, 22(10), 130-140.

- Álvarez, J., Gaytán, D., Sosa, M., Baltazar, J., & Cerón, 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.
- Alpaca, S. (2018). Evaluación de la Capacidad Antioxidante del Extracto de Cedrón (*Aloysia Triphylla*) Para la Elaboración de Una Bebida Funcional – Ucsm, 2017 (Tesis de pregrado, Universidad Católica de Santa María). Recuperada de <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/7630>
- Amago, T. (2001). Sizing Optimization Using Response Surface Method in FOA. *Review of Toyota CRDL*, 27(1), 1-7. Recuperado de https://www.tytlabs.co.jp/en/english/review/rev371epdf/e371_031amago.pdf
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists International). (2016). *Official methods of analysis of AOAC International*. 20 Th edition. Washington DC.
- Aravind, S., Wichienchot, S., Tsao, R., Ramakrishnan, S., & Chakkaravarthi, S. (2021). Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. *Food Research International*, 142, 1-19. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110189
- Ares, A., Bernal, J., Nozal, M., & Bernal, J. (2021). Chapter 6 - Analysis of herbal bioactives. *Aromatic Herbs in Food: Bioactive Compounds, Processing, and Applications*, 201-232. doi: 10.1016/B978-0-12-822716-9.00006-8
- Arnao, M., Cano, A., & Acosta, M. (2001). Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239-244. doi: 10.1016/S0308-8146(00)00324-1
- Ávila, J., Almaraz, N., Chaidez, A., Ramírez, D., Delgado, E., Torres, R., Naranjo, N., & Alanís, R. (2018). Foliar phenolic compounds of ten wild species of Verbenacea as

antioxidants and specific chemomarkers. *Brazilian journal of biology*, 78(1), 98–107. doi: 10.1590/1519-6984.07516

Bahramsoltani, R., Rostamiasrabadi, P., Shahpiri, Z., Marques, A., Rahimi, R., & Farzaei, M. (2018). *Aloysia citrodora* Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, 222, 34-51. doi: 10.1016/j.jep.2018.04.021

Birari, R. & Bhutani, K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Elsevier*, 12(19-20), 879-889. doi: 10.1016/j.drudis.2007.07.024

Biswas, A., Dey, S., Xiao, A., Huang, S., Birhanie, Z., Deng, Y., Liu, L., & Li, D. (2023). Phytochemical content and antioxidant activity of different anatomical parts of *Corchorus olitorius* and *C. capsularis* during different phenological stages. *Heliyon*, 9(6), 1-10. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e16494

Borlinghaus, J., Reiter, J., Ries, M., & Gruhlke, M. (2020). Screening procedures and tests for antioxidants. *Pathology: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*, 389-395. doi: 10.1016/B978-0-12-815972-9.00037-8

Bower, A., Real, L., Berhow, M., & De Mejia, E. (2014). Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase IV. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(26), 6147–6158. doi: 10.1021/jf500639f

Brglez, E., Knez, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(7), 901. doi: 10.3390/molecules21070901

Builders, P. (2019). Herbal Medicine. En N. Z. Msomi y M. B. C. Simelane (Eds.), *Herbal Medicine* (pp. 215-227). doi: 10.5772/intechopen.72816

- Bustamante, N., Aliaga, R., & Guerra, T. (2021). La pacha-muña (*Hedeoma mandoniana* Wedd), medicina ancestral en pobladores. *Revista de Salud Pública*, 23(3), 1-7. doi: 10.15446/rsap.V23n3.88842
- Cadenillas, L., Hernandez, C., Bailly, S., Billerach, G., Durrieu, V., & Bailly, J. (2023). Role of Polyphenols from the Aqueous Extract of *Aloysia citrodora* in the Inhibition of Aflatoxin B1 Synthesis in *Aspergillus flavus*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(13), 5123. doi: 10.3390/molecules28135123
- Campos, C., García, D., Aguilar, A., Chirinos, R., & Pedreschi, R. (2022). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extractions of polyphenols from Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) and their characterization using UPLC–PDA-ESI–Q/TOF–MSn technique. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(3), 1-15. doi: 10.1111/jfpp.16310
- Cao, X., Xia, Y., Zeng, M., Wang, W., He, Y., & Liu, J. (2019). Caffeic Acid Inhibits the Formation of Advanced Glycation End Products (AGEs) and Mitigates the AGEs-Induced Oxidative Stress and Inflammation Reaction in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *Chemistry & biodiversity*, 16(10), e1900174. doi: 10.1002/cbdv.201900174
- Catalogue of Life (2023). *Aloysia herrerae* Moldenke. Recuperado de <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/C5SC>
- Catalogue of Life (2023). *Hedeoma mandoniana* Wedd. Recuperado de <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/3JYZ7>
- Cereceres, A., Rodrigo, J., Álvarez, E., & Rodríguez, A. (2019). Ingestión de compuestos fenólicos en población adulta mayor. *Nutrición Hospitalaria*, 36(2), 470-478. doi: 10.20960/nh.2171
- Chakraborty, R. & Roy, S. (2021). Angiotensin-converting enzyme inhibitors from plants: A review of their diversity, modes of action, prospects, and concerns in the

management of diabetes-centric complications. *Journal of Integrative Medicine*, 19(6), 478-492. doi: 10.1016/j.joim.2021.09.006

Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182. doi: 10.38212/2224-6614.2748

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A., Meullemiestre, A., Fabiano, A., & Abert, M. (2016). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications A Review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

Cheurfa, M., Allem, R., Sadeer, N., & Mahomoodally, M. (2022). In vivo hypocholesterolemic and anti-inflammatory effect of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton and *Trigonella foenum-græcum* L. seeds. *South African Journal of Botany*, 145, 213-217. doi: 10.1016/j.sajb.2021.01.023

Chirinos, R., Ochoa, K., Aguilar, A., Carpentier, S., Pedreschi, R. & Campos, D. (2018) Obtaining of peptides with in vitro antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities from cañihua protein (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Journal of Cereal Science*, 83, 139–146. doi: 10.1016/j.jcs.2018.07.004

Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*, 47, 145–152. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.02.025

Chroho, M., Bouymajane, A., Aazza, M., Oulad El Majdoub, Y., Cacciola, F., Mondello, L., Zair, T., & Bouissane, L. (2022). Determination of the Phenolic Profile, and Evaluation of Biological Activities of Hydroethanolic Extract from Aerial Parts of *Origanum compactum* from Morocco. *Molecules*, 27(16), 5189. doi: 10.3390/molecules27165189

- Criollo, M., Ramos, R., Contreras, L., Gutiérrez, E., León, J., Villicaña, C., Angulo, M., & Heredia, J. (2022). Cytotoxic Activity of Polyphenol Extracts from Three Oregano Species: *Hedeoma patens*, *Lippia graveolens* and *Lippia palmeri*, and Antiproliferative Potential of *Lippia graveolens* against Two Types of Breast Cancer Cell Lines (MDA-MB-231 and MCF-7). *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(16), 5240. doi: 10.3390/molecules27165240
- Cruz, J. (2011). Metodología de superficie de respuesta aplicado a la optimización de propiedades mecánicas de un compuesto de residuos de madera y plástico reciclado (Tesis de maestría, Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas). Recuperada de <http://ciatec.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1019/48>
- Cui, L., Zhang, Z., Li, H., Li, N., Li, X., & Chen, T. (2017). Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Anthocyanins from Perilla Leaves Using Response Surface Methodology. *Food Science and Technology Research*, 23(4), 535-543. doi: 10.3136/fstr.23.535
- De Araújo, F., De Paulo, D., Neri, I., & Pastore, G. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 1-15. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127535
- Delcour, J. & Varebeke, D. (1985). A new colorimetric assay for flavonoids in pilsner beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 91, 37-40. doi: 10.1002/j.2050-0416.1985.tb04303.x
- Dias, M., Pinto, D., & Silva, A. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(17), 5377. doi: 10.3390/molecules26175377
- Dumbravă, D., Moldovan, C., Raba, D., & Popa, M. (2012). Vitamin C, chlorophylls, carotenoids and xanthophylls content in some basil (*Ocimum basilicum* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves extracts. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 18(3), 253-258.

- Dzah, C., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G. & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 1-46. doi: 10.1016/j.fbio.2020.100547
- Ecevit, K., Barros, A., Silva, J., & Reis, L. (2022). Preventing Microbial Infections with Natural Phenolic Compounds. *Future Pharmacology*, 2(4), 460-498 doi: 10.3390/futurepharmacol2040030
- Enkhtuya, E., Kashiwagi, T., Shimamura, T., Ukeda, H., & Tseye, O. (2014). Screening Study on Antioxidant Activity of Plants Grown Wildly in Mongolia. *Food Science and Technology Research*, 20(4), 891-897.
- Eskandani, M., Babak M., Zengin, G., Dinparast, L., & Bahadori, S. (2016). Novel Natural Agents from *Lamiaceae* Family: An Evaluation on Toxicity and Enzyme Inhibitory Potential linked to Diabetes Mellitus. *Current Bioactive Compounds*, 12, 34-38.
- Fernández, M., Silva, P., Costa, M., Galli, L., & Bruno, E. (2019). Evaluación del poder inhibitorio de extractos obtenidos de plantas medicinales sobre enterobacterias patógenas de importancia en Salud Pública. *Analecta Veterinaria*, 39(2), 27-32. doi: 10.24215/15142590e040
- Fraisse, D., Degerine, A., Bred, A., Ndoye, S., Vivier, M., Felgines, C., & Senejoux, F. (2018). A Novel HPLC Method for Direct Detection of Nitric Oxide Scavengers from Complex Plant Matrices and Its Application to *Aloysia triphylla* Leaves. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(7), 1574. doi: 10.3390/molecules23071574
- Friedman, N., Temkin, E., & Carmeli, Y. (2015). The Negative Impact of Antibiotic Resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 22 (5), 416-422. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.002
- Galanakis, C. (2018). *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier. 140 p.

- Gallegos, M. (2017). Las plantas medicinales: usos y efectos en el estado de salud de la población rural de Babahoyo – Ecuador – 2015 (Tesis doctoral, Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Recuperada de <https://hdl.handle.net/20.500.12672/6415>
- Gálvez, L., Huamán, C., Flores, O., Aquino, E., Chirinos, R., Campos, D., Sevilla, R., Fuentealba, C., Pedreschi, R., Sarkar, D., & Shetty, K. (2019). Evaluation of phenolic antioxidant-linked in vitro bioactivity of Peruvian corn (*Zea mays* L.) diversity targeting for potential management of hyperglycemia and obesity. *Journal of Food Science and Technology*, 56(6), 2909-2924. doi: 10.1007/s13197-019-03748-z
- García, J. (2017). Extracción de aceite esencial por fluidos supercríticos y arrastre con vapor de cedrón (*Aloysia triphylla*) en la región Arequipa (Tesis de pregrado, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa). Recuperada de <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/3413>
- Garrido, G., Ortiz, M., & Pozo, P. (2013). Total phenols and flavonoids and antioxidant activity of *Lampaya medicinalis* F. Phil. leaf extracts. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 1(1), 30-38.
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF) (2023). *Aloysia herrerae* Moldenke. Recuperado de <https://www.gbif.org/species/5667457>
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF) (2023). *Hedeoma mandoniana* Wedd. Recuperado de <https://www.gbif.org/species/3888193>
- Gutiérrez, H. & De la Vara, R. (2008). Análisis y diseño de experimentos (2ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Gutiérrez, E., Angulo, M., León, J., & Heredia, J. (2017). Effect of In Vitro Digestion on the Total Antioxidant Capacity and Phenolic Content of 3 Species of Oregano

- (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*). Journal of food science, 82(12), 2832–2839. doi: 10.1111/1750-3841.13954
- Gutiérrez, E., Picos, M., Leyva, N., Criollo, M., Vazquez, G., & Heredia, J. (2018). Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. *Plants (Basel, Switzerland)*, 7(1), 2. doi:10.3390/plants7010002
- Hematian, A., Ghani, A., Kiani, F., & Alipour, A. (2021). Phytochemical profiles of lemon verbena (*Lippia citriodora* H.B.K.) and its potential application to cookie enrichment. *Food science & nutrition*, 9(6), 3100–3113. doi: 10.1002/fsn3.2268
- Hinad, I., S'hih, Y., Elhessni, A., Mesfioui, A., & Ouahidi, M. (2022). Medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Ksar Elkebir Region (North-Western Morocco). *The Pan African Medical Journal*, 42, 1-12. doi: 10.11604/pamj.2022.42.319.32572
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856. doi: 10.1021/jf030723c
- Irondi, E., Agboola, S., Oboh, G., & Boligon, A. (2016). Inhibitory effect of leaves extracts of *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* on two key enzymes involved in obesity and hypertension in vitro. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 5(4), 396-402. doi: 10.5455/jice.20160814112756
- Jaramillo, X. & Ojeda, S. (2018). In vitro hypoglycemic and antioxidant activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in southern Ecuador. *AXIOMA*, (18), 23-36. doi: 10.26621/XIV18.2018.06.A03.PUCESI.2550.6684
- Jesus, R., Silva, W., Wisniewski, A., Andrade, L., Fitzgerald, A., Souza, D., Andrade, E., Lima, P., & Souza, V. (2024). Microwave and ultrasound extraction of antioxidant phenolic compounds from *Lantana camara* Linn. leaves: Optimization,

- comparative study, and FT-Orbitrap MS analysis. *Phytochemical Analysis*. doi: 10.1002/pca.3335
- Jiao, X., Wang, Y., Lin, Y., Lang, Y., Li, E., Zhang, X., Zhang, Q., Feng, Y., Meng, X., & Li, B. (2019). Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6 J mice by modulating the gut microbiota. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 64, 1-40. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.07.008
- Ji, X., Shi, S., Liu, B., Shan, M., Tang, D., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, L., Zhang, H., Lu, C., & Wang, Y. (2019). Bioactive compounds from herbal medicines to manage dyslipidemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 1-11. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109338
- Kajaria, D., Tiwari, S., Tripathi, J., Tripathi, Y., & Ranjana (2013). In-vitro α amylase and glycosidase inhibitory effect of ethanolic extract of antiasthmatic drug – Shirishadi. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(4), 206-209. doi:10.4103/2231-4040.121415
- Kanatt, S. (2020). Development of active/intelligent food packaging film containing *Amaranthus* leaf extract for shelf life extension of chicken/fish during chilled storage. *pFood Packaging and Shelf Life*, 24, 1-9. doi: 10.1016/j.fpsl.2020.100506
- Khanal, P. & Patil, B. (2020). Gene ontology enrichment analysis of α -amylase inhibitors from *Duranta repens* in diabetes mellitus. *Journal of diabetes and metabolic disorders*, 19(2), 735–747. doi: 10.1007/s40200-020-00554-9
- Khazaei, K., Jafari, S., Ghorbani, M., Kakhki, A., & Sarfarazi, M. (2016). Optimization of Anthocyanin Extraction from Saffron Petals with Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*, 9(7), 1993–2001. doi: 10.1007/s12161-015-0375-4
- Kiran, T., Otlu, O., & Karabulut, A. (2023). Oxidative stress and antioxidants in health and disease. *Journal of Laboratory Medicine*, 47(1), 1-11. doi: 10.1515/labmed-2022-0108

- Kumar, A., Young, J., & Suk, Y. (2022). Phenolic Compounds in Active Packaging and Edible Films/Coatings: Natural Bioactive Molecules and Novel Packaging Ingredients. *Molecules*, 27(21), 7513. doi: 10.3390/molecules27217513
- Kumar, K., Srivastav, S., & Singh, V. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 1-11. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105325
- Lasagni, R., Reides, C., Ferreira, S., & Llesuy, S. (2014). The protective effect of *Aloysia triphylla* aqueous extracts against brain lipid-peroxidation. *Food & Function*, 5(3), 557-563. doi:10.1039/C3FO60392J
- León, B. (2006). Verbenaceae endémicas del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 13(2), 669-676. doi: 10.15381/rpb.v13i2.1930
- Leyva, N., Nair, V., Bang, W., Cisneros, L., & Heredia, J. (2016). Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of ethnopharmacology*, 187, 302-312. doi: 10.1016/j.jep.2016.04.051
- Lezama, K. (2017). Determinación de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del aceite de uva (*Vitis vinifera*) obtenido con y sin tratamiento enzimático (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperada de <https://hdl.handle.net/20.500.12996/3005>
- Li, A., Li, S., Zhang, Y., Xu, X., Chen, Y., & Li, H. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020–6047. doi: 10.3390/nu6126020
- Li, K., Yao, F., Xue, Q., Fan, H., Yang, L., Li, X., Sun, L., & Liu, Y. (2018). Inhibitory effects against α -glucosidase and α -amylase of the flavonoids-rich extract from *Scutellaria baicalensis* shoots and interpretation of structure–activity relationship

- of its eight flavonoids by a refined assign-score method. *Chemistry Central Journal*, 12, 1-11 doi:10.1186/s13065-018-0445-y
- Li, S., Li, S., Gan, R., Song, F., Kuang, L., & Li, H. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 51, 289-298. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.09.017
- Lianza, M., Poli, F., Nascimento, A., Soares da Silva, A., Da Fonseca, T., Toledo, M., Simas, R., Chaves, A., Leitão, G., & Leitão, S. (2022). In vitro α -glucosidase inhibition by Brazilian medicinal plant extracts characterised by ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 37(1), 554-562. doi: 10.1080/14756366.2021.2022658
- Liao, C., Ou, T., Wu, C., & Wang, C. (2013). Prevention of diet-induced hyperlipidemia and obesity by caffeic acid in C57BL/6 mice through regulation of hepatic lipogenesis gene expression. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(46), 11082-11088. doi: 10.1021/jf4026647
- López, M. (2006). Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante: Características, administración y efectos adversos. *Ámbito farmacéutico: Fitoterapia*, 25(5), 82-88. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13088633>
- Luna, D., Cortez, R., Ongkowijoyo, P., & De Mejia, Elvira (2017). Protection of color and chemical degradation of anthocyanin from purple corn (*Zea mays* L.) by zinc ions and alginate through chemical interaction in a beverage model. *Food Research International*, 105, 169-177. doi: 10.1016/j.foodres.2017.11.009
- Maceda, A., Soto, M., Peña, C., Trejo, C., & Terrazas, T. (2021). Lignina: composición, síntesis y evolución. *Madera y Bosques*, 27(2), 1-16. doi: 10.21829/myb.2021.2722137
- Mantilla, J. & Olazábal, O. (2008). *Las Plantas Medicinales de nuestra Madre Tierra*.

- Mani, A., Kushwaha, K., Khurana, N., & Gupta, J. (2022). p-Coumaric acid attenuates high-fat diet-induced oxidative stress and nephropathy in diabetic rats. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 106(4), 872–880. doi: 10.1111/jpn.13645
- Marles, R. & Farnsworth, N. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2(2), 137–189. doi: 10.1016/s0944-7113(11)80059-0
- Matus, D., Moya, J., Castillo, C., Cervantes, M., Arguelles, L., Aguilar, O. & Méndez, D. (2022). Extraction and Use of Anthocyanins from Radish (*Raphanus Sativus* L Var Crimson Gigant) as a Natural Colorant in Yogurt. *European Journal of Agriculture and Food Sciences*, 4(6), 26-33. doi: 10.24018/ejfood.2022.4.6.574
- Medina, N. (2017). Efecto del ultrasonido en la extracción y nanoencapsulación de polifenoles de limón persa (*Citrus latifolia*) (Tesis de maestría, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco). Recuperada de <http://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/447>
- Mehta, N., Jeyapriya, S., Kumar, P., Verma, A., Umaraw, P., Khatkar, S., Khatkar, A., Pathak, D., Kaka, U., Sazili, A. (2022). Ultrasound-Assisted Extraction and the Encapsulation of Bioactive Components for Food Applications. *Foods*, 11(19), 2973. doi: 10.3390/foods11192973
- Mejía, J., García, K., Velázquez, G., & Vázquez, A. (2021). Capacidad antioxidante: conceptos, métodos de cuantificación y su aplicación en la caracterización de frutos tropicales y productos derivados. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 9(1), 9-33. doi: 10.23850/24220582.4023
- Michalaki, A., Karantonis, H., Kritikou, A., Thomaidis, N., & Dasenaki, M. (2023). Ultrasound-Assisted Extraction of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity Evaluation from Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) Using Response Surface Methodology and Identification of Specific Phenolic Compounds with HPLC-PDA and Q-TOF-MS/MS. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(5), 2033. doi: 10.3390/molecules28052033

- Miękus, N., Iqbal, A., Marszałek, K., Puchalski, C., & Świergiel, A. (2019). Green Chemistry Extractions of Carotenoids from *Daucus carota* L.-Supercritical Carbon Dioxide and Enzyme-Assisted Methods. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(23), 4339. doi: 10.3390/molecules24234339
- Ministerio de Salud (MINSA) (03 de noviembre del 2022). CDC Perú: El 96,5% de la población diagnosticada con diabetes tiene diabetes tipo 2. Recuperado de <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/informativo/prensa/cdc-peru-el-965-de-la-poblacion-diagnosticada-con-diabetes-tiene-diabetes-tipo-2/#:~:text=El%20Centro%20Nacional%20de%20Epidemiolog%C3%ADa,seg%C3%BAAn%20el%20sistema%20de%20vigilancia>
- Mohamed, I., Al-Juhaimi, F., Adisa, A., Adiamo, O., Babiker, E., Osman, M., Gassem, M., Ghafoor, K., Alqah, H., & Elkareem, M. (2020). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from Argel (*Solenostemma argel* Hayne) leaves using response surface methodology (RSM). *Journal of food science and technology*, 57(8), 3071–3080. doi: 10.1007/s13197-020-04340-6
- Mohammadhosseini, M., Frezza, C., Venditti, A., & Mahdavi, B. (2021). An overview of the genus *Aloysia* Paláu (Verbenaceae): Essential oil composition, ethnobotany and biological activities. *Natural Product Research*, 36(19), 5091-5107. doi: 10.1080/14786419.2021.1907576
- Molina, C., Pedraza, C., Vera, L., Ocampo, J., Rivas, C., & Viveros, E. (2023). Antimycobacterial Activity of *Hedeoma drummondii* against *Mycobacterium tuberculosis* and Non-Tuberculous Mycobacteria. *Antibiotics*, 12(5), 833. doi: 10.3390/antibiotics12050833
- Montesinos, D., Pinto, A., Beltrán, D., & Galiano, W. (2015). Vegetación de un bosque de *Polylepis incarum* (Rosaceae) en el distrito de Lampa, Puno, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 22(1), 87-96. doi: 10.15381/rpb.v22i1.11125

- Montgomery, D. C. (2011). *Diseño y análisis de experimentos*. México, Editorial Limusa. 686 p.
- Moreno, I., Sánchez, L., Pérez, P., Andrés, C., Cardona, F., Tinahones, F., & Queipo, M. (2016). Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food & Function*, 7(4), 1775-1787. doi: 10.1039/C5FO00886G
- Moshari, A., Alirezalu, A., Alipour, H., & Amato, J. (2023). Screening of 20 species from *Lamiaceae* family based on phytochemical analysis, antioxidant activity and HPLC profiling. *Scientific Reports*, 13(1), 16987. doi: 10.1038/s41598-023-44337-7
- Moussa, H., Dahmoune, F., Mahdjoub, M., Kadri, N., & Remini, H. (2022). Definitive screening design and I-optimal design for optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic content and antioxidant capacity from *Salvia officinalis* L. leaves. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29, 100820. doi: 10.1016/j.scp.2022.100820
- Muhammad, N., Ahmad, F., Teoh, S., & Yahaya, M. (2021). Caffeic Acid on Metabolic Syndrome: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(18), 5490. doi: 10.3390/molecules26185490
- Myers, R., Montgomery, D., & Anderson, C. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using design experiments*. Ney Jersey, EEUU, Editorial Wiley S.A. 855 p.
- Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F., & Kiso, Y. (2005). Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4593-4598. doi: 10.1021/jf047814+

- Naveen, Y., Urooj, A., & Byrappa, K. (2021). A review on medicinal plants evaluated for anti-diabetic potential in clinical trials: Present status and future perspective. *Journal of Herbal Medicine*, 1-7. doi: 10.1016/j.hermed.2021.100436
- Ntchapda, F., Djedouboum, A., Talla, E., Sokeng, S., Nana, P., Adjia, H., Nguimbou, R., Bonabe, C., Gaimatakou, S., Njintang, N., & Dimo, T. (2015). Hypolipidemic and anti-atherogenic effect of aqueous extract leaves of *Ficus glumosa* (Moraceae) in rats. *Experimental Gerontology*, 62, 53–62. doi: 10.1016/j.exger.2014.12.015
- Nyandwi, J., Ko, Y., Jin, H., Yun, S., Park, S., & Kim, H. (2021). Rosmarinic Acid Exhibits a Lipid-Lowering Effect by Modulating the Expression of Reverse Cholesterol Transporters and Lipid Metabolism in High-Fat Diet-Fed Mice. *Biomolecules*, 11(10), 1470. doi: 10.3390/biom11101470
- Oboh, G., Ogunruku, O., Oyeleye, S., Olasehinde, T., Ademosun, A., & Boligon, A. (2016). Phenolic Extracts from *Clerodendrum volubile* Leaves Inhibit Cholinergic and Monoaminergic Enzymes Relevant to the Management of Some Neurodegenerative Diseases. *Journal of Dietary Supplements*, 14(3), 358-371. doi: 10.1080/19390211.2016.1237401
- Ong, S., Paneerchelvan, S., Lai, H., & Rao, N. (2014). In vitro lipase inhibitory effect of thirty two selected plants in Malaysia. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(2), 19-24.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626. doi: 10.1021/jf010586o
- Pan American Health Organization & World Health Organization (PAHO/WHO) (9 de diciembre de 2022). Report signals increasing resistance to antibiotics in bacterial infections in humans and need for better data. Recuperado de

<https://www.paho.org/en/news/9-12-2022-report-signals-increasing-resistance-antibiotics-bacterial-infections-humans-and>

Pandia, S. (2020). Obtención de películas comestibles empleando gelatina de pescado con extracto de orégano, y utilización como recubrimiento en filetes de trucha (Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperada de <https://hdl.handle.net/20.500.12996/4345>

Peñarrieta, J., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J., & Bravo, J. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.

Plaza, M., Benavent, M., Del Castillo, M., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2010). Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*, 43(10), 2341-2348. doi: 10.1016/j.foodres.2010.07.036

Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert, U., Miesbauer, O., & Eisner, P. (2021). Common Trends and Differences in Antioxidant Activity Analysis of Phenolic Substances Using Single Electron Transfer Based Assays. *Molecules*, 26(5), 1-17. doi: 10.3390/molecules26051244

Polumackanycz, M., Petropoulos, S., Añibarro, M., Pinela, J., Barros, L., Plenis, A., & Viapiana, A. (2022). Chemical Composition and Antioxidant Properties of *Common* and *Lemon Verbena*. *Antioxidants*, 11(11), 2247. doi: 10.3390/antiox11112247

Portmann, E., Nigro, M., Reides, C., Llesuy, S., Ricco, R., Wagner, M., Gurni, A., & Carballo, M. (2012). Aqueous extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae): assessment of antioxidant capacity and DNA damage. *International Journal of Toxicology*, 31(2), 192–202. doi: 10.1177/1091581812436726

Priscilla, D., Roy, D., Suresh, A., Kumar, V., & Thirumurugan, K. (2014). Naringenin inhibits α -glucosidase activity: A promising strategy for the regulation of

- postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 210, 77-85. doi: 10.1016/j.cbi.2013.12.014
- Quino, W. & Alvarado, J. (2021). La resistencia antimicrobiana en Perú: un problema de salud pública. *Alpha Centauri*, 2(3), 15-22. doi: 10.47422/ac.v2i3.38
- Ramón, A. (2019). Aplicación de técnicas de modelado para la optimización de la energía generada en pilas de combustible microbianas (Tesis de pregrado, Universidad Politécnica de Cartagena). Recuperada de <http://hdl.handle.net/10317/8285>
- Raut, N., Dhore, P., Saoji, S., & Kokare, D. (2016). Chapter 9 - Selected Bioactive Natural Products for Diabetes Mellitus. *Studies in Natural Products Chemistry*, 48, 287-322. doi: 10.1016/B978-0-444-63602-7.00009-6
- Raya, J. (2020). Efecto del secado y tiempo de almacén de hojas sobre la actividad antioxidante, antiinflamatoria y el contenido de compuestos fenólicos y terpénicos en infusiones de *Hedeoma piperita* (Tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). Recuperada de http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/2840
- Rezig, L., Sadaa, M., Trabelsi, N., Tammar, S., Limam, H., Bettaieb, I., Smaoui, A., Sghaier, G., Del Re, G., Ksouri, R., & Msaada, K. (2019). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Aloysia triphylla* L. essential oils and methanolic extract. *Italian Journal of Food Science*, 31(3), 556-572. doi: 10.14674/IJFS-1373
- Riguene, H., Dali, S., Ben Salem, R., & Rigane, G. (2022). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Verbena officinalis* L. leaves using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activities. *Revue Roumaine de Chimie*, 67(6-7), 393-406. doi: 10.33224/rch.2022.67.6-7.06

- Rojas, B., Castillo, M., & Moscoso, J. (2019). Inhibidores de la lipasa pancreática como alternativa de tratamiento frente a la obesidad. *Revista de Medicina e Investigación*, 7(2), 23-30.
- Rojas, F. (2021). Revisión bibliográfica de compuestos fenólicos, su efecto en la salud, métodos de encapsulación y digestión simulada in vitro (Tesis de pregrado, Universidad de Chile). Recuperada de <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/185432>
- Roque, J. & Ramírez, E. (2008). Flora vascular y vegetación de la Laguna de Parinacochas y alrededores (Ayacucho, Perú). *Revista Peruana de Biología*, 15(1), 61-72.
- Rubio, L. (2019). Optimización multirespuesta de la concentración de solución osmótica, temperatura y tiempo de inmersión sobre humedad final y ganancia de sólidos del espárrago verde deshidratado osmóticamente. *Revista Ciencia y Tecnología*, 15(1), 113-124.
- Ruiz, J., Letamendi, J., & Calderón, R. (2020). Prevalencia de dislipidemias en pacientes obesos. *Medisan*, 24(2), 211-222.
- Saberian, H., Esmailian, A., & Hosseini, F. (2021). Optimization of anthocyanin extraction from red cabbage and its application in low calorie Gummy candy. *Journal of Food Science and Technology*, 18(110), 129-140.
- Safamansouri, H., Nikan, M., Amin, G., Sarkhail, P., Gohari, A., Kurepaz, M., & Saeidnia, S. (2014). α -Amylase inhibitory activity of some traditionally used medicinal species of Labiatae. *Journal of diabetes and metabolic disorders*, 13(1), 114. doi: 10.1186/s40200-014-0114-1
- Saleh, E., Al-Dolaimy, F., Qasim, Y., Baymakov, S., Kader, M., Ullah, M., Abbas, A., Khlewee, I., Bisht, Y., & Alsaalamy, A. (2023). Oxidative stress affects the beginning of the growth of cancer cells through a variety of routes. *Pathology - Research and Practice*, 249, 1-6. doi: 10.1016/j.prp.2023.154664

- Sánchez, N., Lozano, J., Cádiz, M., Herranz, M., Micol, V., & Segura, A. (2019). Relationships Between Chemical Structure and Antioxidant Activity of Isolated Phytocompounds from *Lemon Verbena*. *Antioxidants*, 8(8), 324. doi: 10.3390/antiox8080324
- Santayana, M. (2018). Efecto del estrés abiótico post-cosecha en la síntesis de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante de mashua morada (*Tropaeolum tuberosum*) (Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperada de <https://hdl.handle.net/20.500.12996/3775>
- Santos, N., Salas, R., Villanueva, C., & Hernández, B. (2019). Antioxidants: Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.85270
- Sarabia, L., Ortiz, M., & Sánchez, M. (2019). Response Surface Methodology. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*, 1, 345-390. doi: 10.1016/b978-0-12-409547-2.14756-0
- Serrano, C., Villena, G., & Rodríguez, E. (2020). Algunos componentes fitoquímicos y actividad antioxidante en representantes de la tribu Mentheae (*Lamiaceae*) del Perú. *Arnaldoa*, 27(1), 169-180. doi: 10.22497/arnaldoa.271.27109
- Serrano, C. (2022). Perfil de metabolitos secundarios en representantes peruanos de la tribu *Mentheae* (*Nepetoideae*, *Lamiaceae*) y obtención de los componentes mayoritarios (Tesis doctoral, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperada de <https://hdl.handle.net/20.500.12996/5235>
- Seyedan, A., Alshawsh, M., Alshagga, M., Koosha, S., & Mohamed, Z. (2015). Medicinal Plants and Their Inhibitory Activities against Pancreatic Lipase: A Review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 973143. doi: 10.1155/2015/973143

- Shahidi, F. & Hossain, A. (2023). Importance of Insoluble-Bound Phenolics to the Antioxidant Potential Is Dictated by Source Material. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 12(1), 203. doi: 10.3390/antiox12010203
- Siedo, S. (2012). Four New Species of the Genus *Aloysia* (Verbenaceae). *Lundellia*, 15(1), 35-46. <http://hdl.handle.net/2152/32666>
- Singleton, V. & Rossi, J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sinha, S., Singh, K., Ved, A., Hasan, S., & Mujeeb, S. (2022). Therapeutic Journey and Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 22(9), 1314-1330. doi: 10.2174/1389557521666211116120823
- Slanis, A. & Del Valle, E. (2005). *Hedeoma mandonianum* (Lamiaceae) en Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 40(3-4), 285-287.
- Soto, M. (2022). Métodos de extracción de compuestos fenólicos presentes en el cáliz de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y su actividad antioxidante (Tesis de pregrado, Universidad Central de Ecuador). Recuperada de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/29105>
- Stojkovic, D., Smiljkovic, M., Ciric, A., Glamoclija, J., Van Griensven, L., Ferreira, I.C.F.R., & Sokovic, M. (2019). An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. *South African Journal of Botany*, 1-4. doi: 10.1016/j.sajb.2018.01.007
- Sun, L., Warren, F., & Gidley, M. (2019). Natural products for glycaemic control: Polyphenols as inhibitors of alpha-amylase. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 262-273. doi: 10.1016/j.tifs.2019.07.009

- Suwannachot, J., Reginio, F., Hamauzu, Y., & Ogawa, Y. (2022). Assessment of free, esterified, and insoluble-bound phenolics of green and red perilla leaves and changes during simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry Advances*, 1, 100018. doi: 10.1016/j.focha.2022.100018
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 52(2), 149–153. doi: 10.3177/jnsv.52.149
- Tammar, S., Salem, N., Aidi Wannes, W., Limam, H., Bourgou, S., Fares, N., Dakhlaoui, S., Hammami, M., Khammassi, S., Re, G., Hessini, K., & Msaada, K. (2021). Chemometric Profiling and Bioactivity of Verbena (*Aloysia citrodora*) Methanolic Extract from Four Localities in Tunisia. *Foods*, 10(12), 2912. doi: 10.3390/foods10122912
- Taweekayujan, S., Somngam, S., & Pinnarat, T. (2023). Optimization and kinetics modeling of phenolics extraction from coffee silverskin in deep eutectic solvent using ultrasound-assisted extraction. *Heliyon*, 9(7), e17942. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e17942
- Thengyai, S., Thiantongin, P., Sontimuang, C., Ovatlarnporn, C., & Puttarak, P. (2019). α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of medicinal plants in Thai antidiabetic recipes and bioactive compounds from *Vitex glabrata* R. Br. stem bark. *Journal of Herbal Medicine*, 19, 100302. doi: 10.1016/j.hermed.2019.100302
- Tomšik, A., Pavlić, B., Vladić, J., Ramić, M., Brindza, J., & Vidović, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 502-511. doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.11.005
- Touati, Z., Guemghar, M., Bedjaoui, K., Djerrada, N., Djaoud, K., Adjeroud, N., Madani, K., & Boulekbache-Makhlouf, L. (2021). Optimization of the microwave assisted extraction and biological activities of polyphenols from lemon verbena leaves. *The*

Annals of the University Dunarea De Jos of Galati. Fascicle VI - Food Technology, 45(1), 157-177. doi: 10.35219/foodtechnology.2021.1.11

Trevizan, J., Soto, E., Parra, F., Bustos, L., & Parra, C. (2020). Antioxidant activity of nine medicinal plants with commercial potential. *Idesia (Arica)*, 38(3), 53-58. doi: 10.4067/S0718-34292020000300053

Tucker, K. (2023). Evaluación nutracéutica de los extractos crudos de Ackee (*Blighia sapida*), colectado en la región caribeña de Costa Rica (Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Costa Rica). Recuperada de <http://hdl.handle.net/11056/25267>

Tundis, R., Grande, F., Occhiuzzi, M., Sicari, V., Loizzo, M., & Cappello, A. (2023). *Lavandula angustifolia* mill. (*Lamiaceae*) ethanol extract and its main constituents as promising agents for the treatment of metabolic disorders: chemical profile, in vitro biological studies, and molecular docking. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 38(1), 2269481. doi: 10.1080/14756366.2023.2269481

Van, C., Sanguinetti, S., Leo, P., Bandoni, A., Juárez, M., Elechosa, M., Molina, A., Fernández, E., & Martínez, E. (2010). El aceite esencial de *Hedeoma multiflora* Benth. (*Lamiaceae*) de poblaciones naturales en la provincia de San Luis, Argentina. *Estudio comparativo. Dominguezia*, 26(1), 13-20.

Vázquez, A., Álvarez, E., López, J., Wall, A., & De la Rosa, L.A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de consumo. *Tecnociencia Chihuahua*, 6(2): 84-93. doi: 10.54167/tch.v6i2.678

Velderrain, G. (2013). Efecto de la fibra dietaria en la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos de frutos tropicales durante un modelo de digestión In vitro (Tesis de maestría, Centro de Investigación en alimentación y Desarrollo, A. C.). Recuperada de <http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/290>

- Vendramin, V., Viel, A., & Vincenzi, S. (2021). Caftaric Acid Isolation from Unripe Grape: A “Green” Alternative for Hydroxycinnamic Acids Recovery. *Molecules*, 26(4), 1148. doi: 10.3390/molecules26041148
- Vinothkumar, G., Venkataraman, P., Vinodhini, V., Lavanya. R., & Sathishkumar, D. (2019). Effect of *Coccinia indica* leaf extract on angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor induced hepatotoxicity in wistar albino rats. *Clinical Nutritional Experimental*, 24, 24-33. doi: 10.1016/j.yclnex.2019.01.004
- Viveros, E., Rivas, C., Carranza, P., Mendoza, S., & Schmeda, G. (2008). Free Radical Scavengers from the Mexican Herbal Tea “Poleo” (*Hedeoma drummondii*). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63(5-6), 341-346. doi: 10.1515/znc-2008-5-60
- Weggler, B., Gruber, B., Teehan, P., Jaramillo, R., & Dorman, F. (2020). Chapter 5 - Inlets and sampling. *Separation Science and Technology*, 12, 141-203. doi: 10.1016/B978-0-12-813745-1.00005-2
- Weremfo, A., Abassah-Oppong, S., Adulley, F., Dabie, K., & Seidu-Larry, S. (2022). Response surface methodology as a tool to optimize the extraction of bioactive compounds from plant sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103, 26-36. doi: 10.1002/jsfa.12121
- World Health Organization (WHO) (30 de enero del 2023). Integrating Traditional Medicine in Health Care. Recuperado de <https://www.who.int/southeastasia/news/feature-stories/detail/integrating-traditional-medicine>
- Worthington, V. (1993) Alpha amylase. In: Worthington enzyme manual. Worthington Biochemical Corporation Freehold, 36-41.
- Wu, J., Aluko, R., & Muir, E. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography*, 950, 125-130. doi: 10.1016/S0021-9673(02)00052-3

- Wu, S., Long, C., & Kennelly, E. (2014). Structural diversity and bioactivities of natural benzophenones. *Natural Product Reports*, 31(9), 1158-1174. doi: 10.1039/c4np00027g
- Wu, Y., Chen, Y., Zhuang, A., & Chen, S. (2023). Natural Phenolic Acids and Their Derivatives against Human Viral Infections. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.112221
- Xu, D., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J., & Li, H. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 96. doi: 10.3390/ijms18010096
- Yancheshmeh, B., Panahi, Y., Allahdadc, Z., Abdolshahia, A., & Zamani, Z. (2022). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Achillea kellalensis* using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 28. doi: 10.1016/j.jarmap.2021.100355
- Yang, Y., Li, W., Xian, W., Huang, W., & Yang, R. (2022). Free and Bound Phenolic Profiles of *Rosa roxburghii* Tratt Leaves and Their Antioxidant and Inhibitory Effects on α -Glucosidase. *Frontiers in nutrition*, 9, 922496. doi: 10.3389/fnut.2022.922496
- Yu, X., Meng, X., Yan, Y., Wang, H., & Zhang, L. (2022). Extraction of Naringin from Pomelo and Its Therapeutic Potentials against Hyperlipidemia. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(24), 9033. doi: 10.3390/molecules27249033
- Yungán, D. (2019). Formulación y control de calidad de un fotoprotector a base de Cedrón (*Aloysia triphylla*) (Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Recuperada de <https://core.ac.uk/download/pdf/234593179.pdf>

- Zeni, A., Albuquerque, C., Gonçalves, F., Latini, A., Tasca, C., Podesta, R., Pagliosa, C., Duarte, F., Lima, T., & Maraschin, M. (2013). Phytochemical profile, toxicity and antioxidant activity of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae). *Química Nova*, 36(1), 69-73. doi: 10.1590/S0100-40422013000100013
- Zhang, B., Zhang, Y., Li, H., Deng, Z., & Tsao, R. (2020). A review on insoluble-bound phenolics in plant-based food matrix and their contribution to human health with future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 347-362. doi: 10.1016/j.tifs.2020.09.029
- Zhang, J., Zou, X., Zhai, X., Huang, X., Jiang, C., & Holmes, M. (2018). Preparation of an Intelligent pH Film Based on Biodegradable Polymers and Roselle Anthocyanins for Monitoring Pork Freshness. *Food Chemistry*, 272, 306-312. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.08.041
- Zhang, K., Song, W., Li, D., & Jin, X. (2017). Apigenin in the regulation of cholesterol metabolism and protection of blood vessels. *Experimental and therapeutic medicine*, 13(5), 1719-1724. doi: 10.3892/etm.2017.4165
- Zhou, J., Zheng, X., Yang, Q., Liang, Z., Li, D., Yang, X., & Xu, J. (2013) Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction and Radical-Scavenging Capacity of Phenols and Flavonoids from *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz Leaves. *PLOS ONE*, 8(7), e68392. doi: 10.1371/journal.pone.0068392
- Zielińska, D., Zieliński, H., Laparra, J., Szawara, D., Honke, J., & Giménez, J. (2021). Caffeic Acid Modulates Processes Associated with Intestinal Inflammation. *Nutrients*, 13(2), 554. doi: 10.3390/nu13020554

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL MODELO CUADRÁTICO PARA EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (MG AGE/G BS) DURANTE LA EAU DE PAMPA MUÑA

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F-ratio	Valor-P
X ₁ : Tiempo	0.605	1	0.605	4.9	0.1138
X ₂ : Temperatura	25.276	1	25.276	204.61	0.0007
X ₃ : Concentración de etanol	15.0701	1	15.0701	121.99	0.0016
X ₁ ²	0.455625	1	0.455625	3.69	0.1506
X ₁ X ₂	4.1616	1	4.1616	33.69	0.0102
X ₁ X ₃	0.2916	1	0.2916	2.36	0.222
X ₂ ²	0.172225	1	0.172225	1.39	0.3228
X ₂ X ₃	1.9881	1	1.9881	16.09	0.0278
X ₃ ²	28.2492	1	28.2492	228.68	0.0006
Falta de ajuste	3.3417	3	1.1139	9.02	0.0519
Error puro	0.3706	3	0.123533		
Total (corr.)	79.9818	15			
R ²	95.3586 por ciento				
R ² ajustado	88.3964 por ciento				

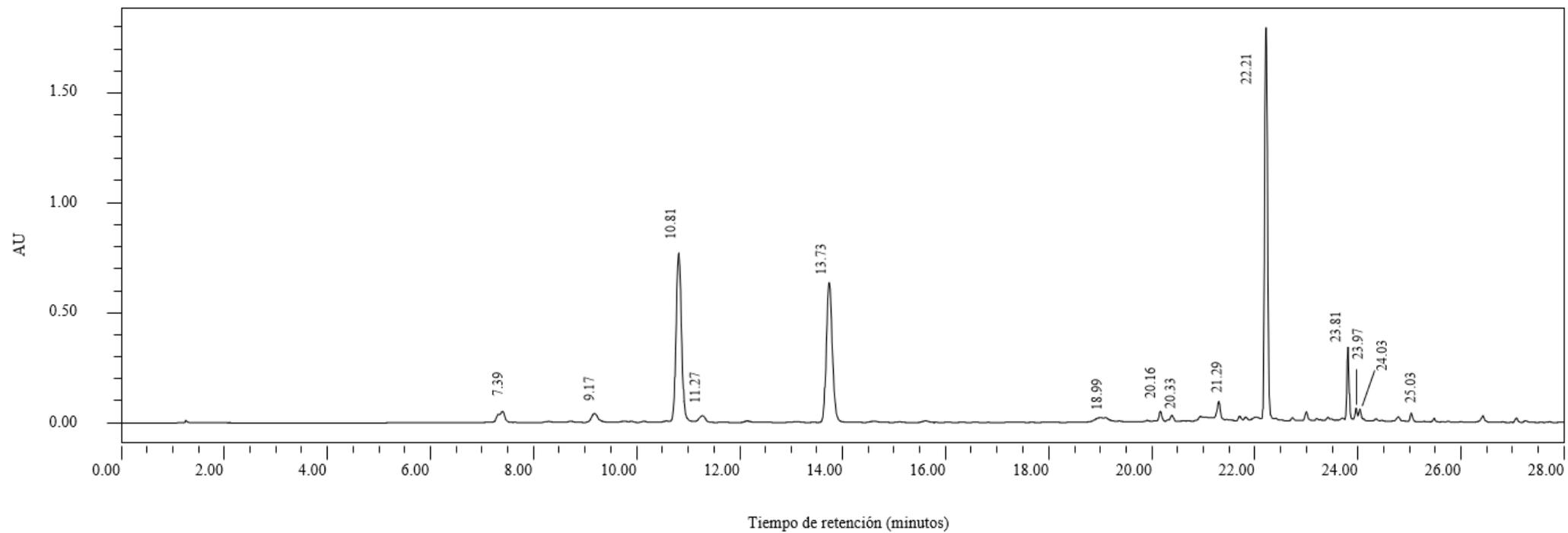
**ANEXO 2: ANOVA DEL MODELO CUADRÁTICO PARA LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE ABTS ($\mu\text{MOL TE/G BS}$) DURANTE LA EAU DE PAMPA
MUÑA**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F-ratio	Valor-P
X ₁ : Tiempo	109.446	1	109.446	9.72	0.0526
X ₂ : Temperatura	4481.68	1	4481.68	397.99	0.0003
X ₃ : Concentración de etanol	2337.23	1	2337.23	207.55	0.0007
X ₁ ²	19.1625	1	19.1625	1.7	0.2831
X ₁ X ₂	5.45223	1	5.45223	0.48	0.5366
X ₁ X ₃	20.5209	1	20.5209	1.82	0.2699
X ₂ ²	192.585	1	192.585	17.1	0.0257
X ₂ X ₃	11.0224	1	11.0224	0.98	0.3954
X ₃ ²	2437.15	1	2437.15	216.43	0.0007
Falta de ajuste	298.131	3	99.3772	8.83	0.0534
Error puro	33.7826	3	11.2609		
Total (corr.)	9946.16	15			
R ²	96.6629 por ciento				
R ² ajustado	91.6572 por ciento				

**ANEXO 3: ANOVA DEL MODELO CUADRÁTICO PARA LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE ORAC ($\mu\text{MOL TE/G BS}$) DURANTE LA EAU DE PAMPA
MUÑA**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F-ratio	Valor-P
X ₁ : Tiempo	7066.82	1	7066.82	4.59	0.1215
X ₂ : Temperatura	128745	1	128745	83.65	0.0028
X ₃ : Concentración de etanol	27975.6	1	27975.6	18.18	0.0237
X ₁ ²	248.299	1	248.299	0.16	0.7148
X ₁ X ₂	1884.43	1	1884.43	1.22	0.3493
X ₁ X ₃	11855.9	1	11855.9	7.7	0.0693
X ₂ ²	2252.69	1	2252.69	1.46	0.313
X ₂ X ₃	58998	1	58998	38.33	0.0085
X ₃ ²	134537	1	134537	87.42	0.0026
Falta de ajuste	23117.1	3	7705.71	5.01	0.1094
Error puro	4617.16	3	1539.05		
Total (corr.)	401298	15			
R ²	93.0888 por ciento				
R ² ajustado	82.7221 por ciento				

ANEXO 4: CROMATOGRAMA UPLC-PDA DE PAMPA MUÑA



**ANEXO 5: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL MODELO CUADRÁTICO
PARA EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (MG AGE/G
BS) DURANTE LA EAU DE CEDRONCILLO**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F-ratio	Valor-P
X ₁ : Tiempo	0.1682	1	0.1682	0.02	0.8867
X ₂ : Temperatura	803.003	1	803.003	114.68	0.0017
X ₃ : Concentración de etanol	387.672	1	387.672	55.37	0.005
X ₁ ²	7.42562	1	7.42562	1.06	0.3789
X ₁ X ₂	0.087025	1	0.087025	0.01	0.9183
X ₁ X ₃	7.31702	1	7.31702	1.04	0.3819
X ₂ ²	0.8464	1	0.8464	0.12	0.7510
X ₂ X ₃	184.688	1	184.688	26.38	0.0143
X ₃ ²	543.356	1	543.356	77.6	0.0031
Falta de ajuste	181.865	3	60.6217	8.66	0.0548
Error puro	21.0059	3	7.00197		
Total (corr.)	2137.43	15			
R ²	90.5087 por ciento				
R ² ajustado	76.2717 por ciento				

**ANEXO 6: ANOVA DEL MODELO CUADRÁTICO PARA LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE ABTS (μ MOL TE/G BS) DURANTE LA EAU DE
CEDRONCILLO**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F-ratio	Valor-P
X ₁ : Tiempo	375.517	1	375.517	9.07	0.0571
X ₂ : Temperatura	20610.6	1	20610.6	497.88	0.0002
X ₃ : Concentración de etanol	7319.9	1	7319.9	176.82	0.0009
X ₁ ²	295.84	1	295.84	7.15	0.0755
X ₁ X ₂	11.1556	1	11.1556	0.27	0.6395
X ₁ X ₃	694.586	1	694.586	16.78	0.0263
X ₂ ²	1412.63	1	1412.63	34.12	0.0100
X ₂ X ₃	1616.84	1	1616.84	39.06	0.0083
X ₃ ²	39573.1	1	39573.1	955.95	0.0001
Falta de ajuste	878.721	3	292.907	7.08	0.0712
Error puro	124.189	3	41.3965		
Total (corr.)	72913.1	15			
R ²	98.6245 por ciento				
R ² ajustado	96.5613 por ciento				

**ANEXO 7: ANOVA DEL MODELO CUADRÁTICO PARA LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE ORAC ($\mu\text{MOL TE/G BS}$) DURANTE LA EAU DE
CEDRONCILLO**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F-ratio	Valor-P
X ₁ : Tiempo	19556.5	1	19556.5	2.66	0.2015
X ₂ : Temperatura	473827	1	473827	64.4	0.0040
X ₃ : Concentración de etanol	698154	1	698154	94.88	0.0023
X ₁ ²	138678	1	138678	18.85	0.0226
X ₁ X ₂	204.633	1	204.633	0.03	0.8782
X ₁ X ₃	11275.3	1	11275.3	1.53	0.3038
X ₂ ²	12474.7	1	12474.7	1.7	0.2838
X ₂ X ₃	128946	1	128946	17.52	0.0248
X ₃ ²	835323	1	835323	113.53	0.0018
Falta de ajuste	113257	3	37752.5	5.13	0.1062
Error puro	22074	3	7357.99		
Total (corr.)	2.45E+06	15			
R ²	94.4848 por ciento				
R ² ajustado	86.2119 por ciento				

ANEXO 8: CROMATOGRAMA UPLC-PDA DE CEDRONCILLO

