



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

“OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE *CLINOPODIUM MEXICANUM* MEDIANTE UN DISEÑO FACTORIAL Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA

SEBASTIÁN SÁNCHEZ FAJARDO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LILIA ALEJANDRA CONDE HERNÁNDEZ

ASESOR DE TESIS

DRA. EVA AGUILA ALMANZA

FEBRERO 2025

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía en cada paso de este camino, por darme fuerzas en los momentos difíciles y por permitirme llegar hasta aquí con determinación y fe.

A mi mamá, por ser mi mayor ejemplo de amor, fortaleza y perseverancia. Su apoyo incondicional, por tus sacrificios, por cada palabra de aliento y por demostrarme que no hay obstáculo imposible de superar. Este logro es tan tuyo como mío.

A mi papá, por enseñarme con su ejemplo el valor del esfuerzo, la disciplina y la determinación. Su dedicación ha sido una inspiración constante en mi formación profesional y personal.

A mi novia, por ser mi compañera en este camino, por su amor, paciencia y por recordarme siempre lo lejos que puedo llegar. Su apoyo y motivación fueron una luz en los momentos más desafiantes.

A mis tías, por creer en mi potencial desde el inicio y por brindarme siempre su cariño y confianza inquebrantables.

A mis amigos, con quienes compartí desvelos, desafíos y logros. Más que compañeros de carrera, se convirtieron en una familia con la que crecí y aprendí a disfrutar cada etapa de este viaje.

A todos aquellos que, de una u otra manera, han sido parte de este proceso, dejando una huella en mi camino.

A quienes sueñan en grande, a quienes no se rinden, y a quienes, como yo, creen que el esfuerzo y la pasión pueden hacer posible lo imposible.

Este logro es por y para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al concluir esta etapa tan significativa en mi vida, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por ser mi segunda casa durante 5 años, brindarme la formación académica para desarrollar esta investigación. Esta institución no solo me permitió crecer profesionalmente, sino que también me dio la oportunidad de conocer a grandes maestros y compañeros que marcaron mi camino.

Extiendo mi más profundo agradecimiento a la Dra. Lilia Alejandra Conde Hernández, mi directora de tesis, por su invaluable guía, paciencia y apoyo incondicional. Su conocimiento y orientación fueron fundamentales para la culminación de este trabajo, y su compromiso con la ciencia, la investigación y la enseñanza han sido una fuente constante de inspiración para mí.

También quiero reconocer a todos mis profesores, quienes con su dedicación y pasión por la enseñanza me brindaron las herramientas necesarias para mi desarrollo profesional. De manera especial, agradezco a la Mtra. Tita, quien no solo fue una excelente docente, sino también una líder ejemplar como directora de la facultad. Su motivación y compromiso fueron claves en mi formación.

A mis compañeros de carrera, quienes a lo largo de los años se convirtieron en amigos y en una red de apoyo invaluable. Juntos compartimos desafíos, aprendizajes y momentos inolvidables que hicieron de esta etapa una experiencia enriquecedora.

A mi familia, cuyo amor y apoyo incondicional me dieron la fuerza para seguir adelante. A mi mamá, por ser mi pilar más fuerte y mi mayor motivación; a mi papá, por ser un ejemplo de esfuerzo, dedicación y perseverancia; y a mis tías, por creer siempre en mi potencial y brindarme su apoyo inquebrantable.

Finalmente, a todas las personas que, con su compañía, consejos y palabras de aliento, hicieron que este camino fuera más llevadero. Cada uno de ustedes ha sido parte esencial de este logro, y les estaré eternamente agradecido.

Este triunfo es el reflejo del esfuerzo conjunto, y lo comparto con cada uno de ustedes.

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
TABLAS	v
FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Plantas medicinales.....	3
2.2. <i>Clinopodium mexicanum</i>	4
2.3. Definición de aceites esenciales.....	6
2.4. Extracción de aceites esenciales	8
2.5. Técnicas de medición de actividad antioxidante	9
2.6. Diseño factorial	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4. JUSTIFICACIÓN.....	14
5. OBJETIVOS	15
5.1. Objetivo general.....	15
5.2. Objetivos particulares	15
6. HIPOTESIS.....	16
7. METODOLOGÍA.....	16
7.1. Selección e identificación del material vegetal.....	16
7.2. Selección del diseño factorial.....	17
7.3. Extracción del aceite esencial.	17
7.4. Rendimiento del aceite esencial (AE).....	19
7.5. Actividad antioxidante	19
7.5.1. Metodología con ABTS	19
7.5.2. Metodología con DPPH	21

7.6.	Análisis de datos.....	22
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
8.1.	Rendimiento y actividad antioxidante	23
8.2.	Análisis estadístico	24
8.2.1.	Rendimiento del AE de <i>Clinopodium mexicanum</i>	24
8.2.2.	Porcentaje de inhibición de DPPH del AE de <i>Clinopodium mexicanum</i>	30
8.2.3.	Porcentaje de inhibición de ABTS del AE de <i>Clinopodium mexicanum</i>	37
9.	CONCLUSIONES	40
10.	RECOMENDACIONES	42
11.	BIBLIOGRAFÍA	43
	ANEXO 1	52

TABLAS

Tabla 2.1. Matriz de diseño 2^3 orden estándar.....	12
Tabla 7.1. Matriz de diseño 2^3 no codificada.....	17
Tabla 8.1. Datos experimentales del diseño 2^3 para la extracción de <i>Clinopodium Mexicanum</i>	24
Tabla 8.2. Ajuste del modelo para rendimiento.....	25
Tabla 8.3. Análisis de varianza (ANOVA) para el rendimiento.....	26
Tabla 8.4. Ajuste del modelo para % de inhibición de DPPH.....	31
Tabla 8.5. Análisis de varianza (ANOVA) para DPPH.....	31
Tabla 8.6. Ajuste del modelo para % de inhibición de ABTS.....	37
Tabla 8.7. Análisis de varianza (ANOVA) para ABTS.....	38

FIGURAS

Figura 2.1. Partes aéreas de <i>Clinopodium Mexicanum</i> . Fuente: Alvarado et al., 2020.....	5
Figura 2.2. Representación geométrica diseño 2^3 . Fuente: Pulido et. al., 2008.....	12
Figura 7.1. Partes aéreas secas de <i>Clinopodium Mexicanum</i>	16
Figura 7.2. Destilador y recirculador utilizados durante la extracción de AE.....	18
Figura 7.3. Balanza analítica PIONEER(0.1mg) PX84	18
Figura 7.4. Equipo utilizado en la medición de la actividad antioxidante.....	20
Figura 8.1. Gráfica de efectos principales para Rendimiento.	26
Figura 8.2. Gráfica de interacción para Rendimiento.....	27
Figura 8.3. (a) Gráfica de Contorno y (b) de superficie del Rendimiento vs Sal, Relación L-S con la muestra entera como valor fijo.	29
Figura 8.4. (a) Gráfica de Contorno y (b) de superficie del Rendimiento vs Sal, Relación L-S con la muestra molida como valor fijo.....	30
Figura 8.5. Gráfica de efectos principales para DPPH.	33
Figura 8.6. Gráfica de interacción para DPPH.....	34
Figura 8.7. (a) Gráfica de Contorno y (b) de superficie del DPPH vs Sal, Relación L-S ..	36
Figura 8.8. (a) Gráfica de Contorno y (b) de superficie del DPPH vs Sal, Relación L-S ..	36

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo la obtención de aceite esencial de *Clinopodium mexicanum* mediante un diseño factorial 2^3 , evaluando el efecto de tres factores: presentación de la muestra (entera o molida), relación líquido-sólido (15 mL/g y 20 mL/g) y concentración de NaCl (3 % y 6 %). Se analizaron el rendimiento de extracción y la actividad antioxidante mediante los métodos de inhibición del radical DPPH y ABTS. Los resultados indicaron que la relación líquido-sólido y la concentración de NaCl tuvieron un impacto significativo en el rendimiento del aceite esencial, mientras que la presentación de la muestra no tuvo un efecto directo, aunque se observó una interacción relevante con la relación L-S. El uso de NaCl favoreció la extracción en concentraciones moderadas, pero en niveles altos generó efectos adversos. En cuanto a la actividad antioxidante medida por DPPH, se evidenció que tanto la presentación de la muestra como la relación L-S y la concentración de NaCl influyeron en la capacidad antioxidante del aceite esencial. Se observó que la molienda de la muestra mejora la actividad antioxidante, lo que concuerda con estudios previos. Además, la interacción entre la relación L-S y la sal evidenció combinaciones óptimas para maximizar la inhibición de DPPH. Por el contrario, el análisis de la actividad antioxidante mediante ABTS no mostró un ajuste adecuado del modelo estadístico. Los resultados obtenidos permiten concluir que el diseño factorial aplicado es una herramienta válida para optimizar la extracción de aceites esenciales, destacando la importancia de la relación L-S y la concentración de NaCl. Se recomienda la aplicación de metodologías de superficie de respuesta para una optimización más precisa y la evaluación de otros factores que puedan influir en la actividad antioxidante medida por ABTS.

ABSTRACT

This study aimed to obtain essential oil from *Clinopodium mexicanum* using a 2^3 factorial design, evaluating the effect of three factors: sample presentation (whole or ground), liquid-to-solid ratio (15 mL/g and 20 mL/g), and NaCl concentration (3% and 6%). The extraction yield and antioxidant activity were analyzed using the DPPH and ABTS radical inhibition methods.

The results showed that the liquid-to-solid ratio and NaCl concentration significantly influenced essential oil yield, while sample presentation did not have a direct effect. However, a relevant interaction between sample presentation and L-S ratio was observed. Moderate NaCl concentrations favored extraction, but higher levels had adverse effects.

Regarding antioxidant activity measured by DPPH, the sample presentation, L-S ratio, and NaCl concentration significantly influenced the oil's antioxidant capacity. Grinding the sample enhanced antioxidant activity, aligning with previous studies. Furthermore, the interaction between L-S ratio and salt concentration revealed optimal combinations to maximize DPPH inhibition. Conversely, the antioxidant activity measured by ABTS did not fit the statistical model adequately.

The findings confirm that the factorial design is a valid tool for optimizing essential oil extraction, highlighting the importance of L-S ratio and NaCl concentration. Further studies using response surface methodology are recommended for a more precise optimization and to evaluate additional factors affecting antioxidant activity measured by ABTS.

1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, la comunidad científica ha manifestado una creciente preocupación por los efectos adversos asociados al uso de antioxidantes sintéticos en la industria, como el BHT (butilhidroxitolueno) y el BHA (butilhidroxianisol). Esta inquietud ha impulsado la búsqueda de alternativas naturales y más seguras.

Los aceites esenciales (AE) son mezclas lipofílicas altamente volátiles compuestas por metabolitos secundarios de plantas. Gracias a sus diversos perfiles bioactivos, poseen potentes propiedades antimicrobianas y antioxidantes, lo que los convierte en una alternativa ideal para reemplazar aditivos sintéticos en productos alimenticios comerciales (Kanza et al., 2022).

La industria de aceites esenciales ha experimentado un crecimiento sostenido debido a la versatilidad de sus compuestos, utilizados en sectores como la agricultura, la farmacéutica, los cosméticos, la aromaterapia y los conservantes naturales de alimentos. Su alta comerciabilidad radica en su carácter natural. Por ejemplo, Bolouri et al. (2022) señaló que la industria agrícola ha transitado de sistemas de producción convencionales a sistemas orgánicos certificados, debido a la creciente preferencia de los consumidores por productos libres de residuos de pesticidas y herbicidas. Esta tendencia ha incrementado el valor de los productos orgánicos en el mercado.

La producción de aceites esenciales se basa en la extracción de compuestos volátiles a partir de plantas aromáticas. Países como México, con su vasta diversidad biológica y cultural, poseen un enorme potencial para el desarrollo de esta industria. México es fuente de numerosas plantas aromáticas, muchas de ellas endémicas, lo que representa una ventaja competitiva significativa (Calvo-Irabien, 2018).

Un ejemplo destacado es *Clinopodium mexicanum*, una planta aromática endémica de México utilizada en la medicina tradicional, que ofrece un recurso valioso y poco explotado para la obtención de aceites esenciales con actividad antioxidante. Además, Alvarado et. al. (2020) destacan su potencial como materia prima en la industria fitofarmacéutica, con aplicaciones en productos destinados al tratamiento del dolor y la ansiedad.

La extracción de aceites esenciales depende de diversos factores, como el método empleado (destilación, maceración, prensado, extracción con solventes, fluidos supercríticos, entre otros), el tiempo de extracción y la proporción líquido-sólido. Estos factores tienen un impacto significativo en el rendimiento y la calidad del producto final. Para abordar esta complejidad, se utiliza el diseño factorial, una herramienta estadística que permite evaluar simultáneamente los efectos e interacciones de múltiples variables, identificando las condiciones óptimas de extracción de manera eficiente y precisa.

El diseño factorial no solo facilita la identificación de las variables más importantes que afectan el rendimiento del aceite esencial, sino que según Montgomery (2005) también reduce significativamente el número de experimentos necesarios en comparación con métodos tradicionales de ensayo y error. Este enfoque es especialmente útil en la extracción de aceites esenciales, donde pequeñas variaciones en los parámetros del proceso pueden influir considerablemente en la composición química y las propiedades biológicas del producto.

En este estudio, se aplicará un diseño factorial para la extracción de aceite esencial de *Clinopodium mexicanum*, con el objetivo de maximizar su rendimiento y actividad antioxidante. Esto permitirá evaluar su potencial como antioxidante natural para diversas aplicaciones industriales.

2. ANTECEDENTES

2.1. Plantas medicinales

Se refieren a aquellas plantas que poseen propiedades farmacológicas que pueden generar un efecto beneficioso o perjudicial en organismos vivos, esto debido a que producen metabolitos secundarios conocidos como "principios activos". Su función principal, en ocasiones específica, radica en servir como medicina o remedio para aliviar enfermedades y restablecer la salud. Estos metabolitos son producidos en pequeñas cantidades por ciertas plantas como mecanismo de defensa frente a condiciones de estrés biótico y abiótico. Por ejemplo, intervienen en la protección contra daños causados por heridas, ataques de insectos, microorganismos patógenos o depredadores vertebrados. En otros casos, cumplen funciones como la atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas o frutos, así como en la competencia por recursos como el espacio del suelo, la luz y los nutrientes con otras especies vegetales, entre otros roles (Sepúlveda-Jiménez et. al., 2003; Ávalos y Pérez, 2009; Castellanos 2019).

Según Fretes (2010) Estas plantas representan aproximadamente la séptima parte de todas las especies existentes, por otro lado, hay un creciente demanda de plantas medicinales; de acuerdo a estimaciones del Banco Mundial, para 2050 el comercio mundial de plantas medicinales y productos derivados será de aproximadamente 5 mil millones de dólares (Kala, 2015).

La OMS estima que alrededor del 80% de la población mundial emplea plantas como medicina tradicional para el cuidado de la salud y su atención primaria (Akerlele, 1993). Según un estudio de CONABIO (1998), tan solo en México se han registrado cerca de 4,000 especies con propiedades medicinales. De este total, entre 3,500 y 4,000 son aprovechadas

por la población mexicana; 3,600 se obtienen directamente del medio silvestre; 1,500 son empleadas de forma habitual sin someterse a procesamiento; 370 se cultivan en huertos domésticos o con propósitos comerciales; y 35 se encuentran en riesgo debido a factores externos. No obstante, únicamente el 5% de estas especies ha sido evaluado mediante estudios químicos, farmacológicos y biomédicos, lo que representa una oportunidad significativa para investigaciones futuras (Loraine y Mendoza, 2010).

La planta oficial, se refiere a aquellas plantas cuyas propiedades farmacológicas están documentadas en la farmacopea o que forman parte de la composición de medicamentos preparados de acuerdo con sus normativas. Mientras que la hierba aromática, se trata de plantas medicinales cuyos principios activos están compuestos, ya sea total o parcialmente, por esencias. Estas plantas representan aproximadamente el 0,7% del total de plantas medicinales (Fretes, 2010).

2.2. *Clinopodium mexicanum*

Es una planta de la familia *Lamiaceae*, endémica de México, localizada en los estados de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí y Veracruz, según los informes de Villaseñor en 2016 y Cadena en 2017. Este tipo de planta se encuentra comúnmente en suelos de rocas calizas, a altitudes que varían entre los 1700 y los 2600 metros sobre el nivel del mar (Figura 2.1). Es conocida coloquialmente como "Toronjil de Menta" o "Toronjil del monte". La comunidad local emplea todas las partes de la planta para mitigar dolores de muelas y combatir el "nerviosismo" (Harley y Paucar 2000; Estrada et al. 2010) debido a sus propiedades analgésicas también se ocupa para inducir el sueño y como auxiliar en dolores musculares.

Según lo relatado por Estrada et. al. (2010), diversos estudios fitoquímicos realizados en especies del género *Clinopodium* han identificado la presencia de flavonoides en sus formas libres y como glucósidos flavonoides (Opalchenova y Obreshkova, 1999). Los flavonoides, reconocidos como pigmentos fenólicos de las plantas, poseen una amplia gama de actividades biológicas. Entre estas se destacan sus propiedades antiinflamatorias (Martínez-Vázquez et al., 1996), su acción citostática (Hirano et. al., 1994), su actividad citotóxica (Woerdenbag et. al., 1994) y sus propiedades antivirales (Kaul et al., 1985). Recientemente Pérez-Ochoa (2024) menciona que también se utilizan para tratar el dolor de estómago, calambres intestinales, indigestión e infecciones gastrointestinales y para reducir los efectos del exceso de alcohol, según un estudio de la UNAM (2009).



Figura 2.1. Partes aéreas de *Clinopodium Mexicanum*. Fuente: Alvarado et al., 2020

Considerada de alto valor biocultural, la elevada demanda de *Clinopodium mexicanum* en los mercados nacionales y estatales refleja su importancia. Sin embargo, este nivel de demanda ha generado un significativo índice de riesgo para la especie en ciertas regiones

del centro del país, como lo señalan Arellanes et. al. (2013). Es importante mencionar que, a pesar de este riesgo, *C. mexicanum* no ha sido incluida en la lista de especies en peligro según la NOM-059-SEMARNAT-2010, tal como lo reportó la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) en 2010. (Alvarado et al., 2020)

2.3. Definición de aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE), también llamados aceites volátiles o etéreos, se distinguen por su capacidad para evaporarse al ser sometidos a altas temperaturas. Según Djilani y Dicko (2012), estos aceites están compuestos por sustancias fragantes y volátiles que se encuentran únicamente en alrededor del 10% de las plantas del reino vegetal. Su localización se limita a estructuras especializadas de las plantas, como células oleíferas, conductos o cavidades secretoras, y pelos glandulares, las cuales suelen situarse en o cerca de la superficie de estas (Liolios et al., 2010; Sangwan et al., 2001). Aunque también se conoce que los aceites esenciales son sintetizados en diferentes órganos vegetales como flores, brotes, hojas, ramas, tallos, semillas, frutos, maderas, raíces, etc. (Bolouri et. al., 2022; Jain et. al., 2022).

Aunque pocas plantas producen aceites esenciales, la cantidad presente en ellas raras veces excede el 1% de su peso. Solo algunas especies, como la nuez moscada (*Myristica fragrans*) y el clavo (*Syzygium aromaticum*), presentan concentraciones superiores al 10%.

De acuerdo con Andrade et al. (2011) y Almeida et. al. (2011), los principales compuestos volátiles de los AE se agrupan en dos categorías fundamentales: terpenoides y fenilpropanoides, los cuales son responsables de gran parte de las propiedades terapéuticas que se les atribuyen. Además de estos compuestos Asgari et. al., (2017);

Amirifar et. al., (2022), mencionan que también contienen muchos compuestos activos, como alcaloides, taninos, esteroides, glucósidos, resinas, fenoles, aceites volátiles y flavonoides. A su vez Feifei et. al., (2020) encontró que los factores que influyen en la distribución del contenido de aceite esencial en las plantas no se limitan únicamente a las diferencias entre especies, sino que también se ven modificados por cambios en la ubicación, las condiciones de almacenamiento y la ubicación geográfica.

Históricamente, los aceites esenciales han encontrado aplicaciones en diversas industrias, como la alimentaria, farmacéutica, cosmética y agrícola, gracias a sus destacadas propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Hammer y Carson, 1999). Además, investigaciones realizadas por Can Baser y Buchbauer (2015) han explorado actividades biológicas menos convencionales de los AE, como sus propiedades anticancerígenas, efectos antinociceptivos, actividades antivirales, propiedades antiflogísticas y su capacidad para mejorar la penetración de sustancias, lo que sugiere un amplio potencial de aplicación.

Por otro lado, los antioxidantes se definen como compuestos capaces de, en concentraciones reducidas, prevenir o retrasar el daño oxidativo en las células provocado por especies reactivas de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1990). Los aceites esenciales contienen diversas moléculas orgánicas, como enlaces dobles de carbono conjugados y grupos hidroxilo, que tienen la capacidad de donar átomos de hidrógeno, inhibiendo así los radicales libres y reduciendo el estrés oxidativo (Diniz et. al., 2020).

Asimismo, Conde Hernández y Guerrero Beltrán (2014) atribuyen la capacidad antioxidante de los AE a la presencia de compuestos fenólicos, debido a su habilidad para participar en reacciones redox con especies oxidantes. Aunado a esto, Domínguez et. al. (2005) han identificado una correlación entre la concentración de compuestos fenólicos y la inhibición de la polimerización iniciada por radicales libres, así como otros procesos consecutivos en reacciones oxidativas.

2.4. Extracción de aceites esenciales

Las técnicas más utilizadas para la extracción de aceites esenciales incluyen la hidrodestilación, la destilación por arrastre de vapor y la destilación combinada de vapor y agua (Bowles, 2003; Surburg y Panten, 2006). Además, existen otros métodos como la extracción con solventes, el enfleurage y el prensado en frío o caliente (Álvarez et. al., 2017). En años recientes, también se han explorado técnicas avanzadas, como la extracción con fluidos supercríticos, el uso de microondas, ultrasonido y el proceso fitónico (Da Porto et. al., 2009; Hunter, 2009). Por otro lado, Asbahani et. al., (2015) incluye a la hidrodestilación salina como un método emergente de extracción.

La hidrodestilación (HD) o destilación simple: Hace referencia al método de extracción en el cual el material vegetal se sumerge por completo en agua en ebullición, entre las aplicaciones de este procedimiento de extracción está que posibilita la obtención de aceites esenciales a partir de material vegetal, especialmente de plantas aromáticas. Dichos aceites esenciales constituyen las fracciones líquidas volátiles que contienen los compuestos responsables del aroma de las plantas, y también pueden albergar otras sustancias de interés farmacéutico o químico (Casado, 2018).

Hidrodestilación salina: Según Tran et al. (2019) y Botello (2023), la adición de cloruro de sodio durante el proceso de hidrodestilación (HD) ayuda a prevenir la pérdida de aceite esencial en forma de emulsión, además de reducir la solubilidad de ciertos compuestos no polares del aceite esencial en el medio acuoso. El cloruro de sodio podría jugar un papel importante como electrolito, ya que, al aumentar la densidad y polarización del agua, facilita la separación del aceite esencial del agua. Asimismo, una concentración adecuada de *NaCl* podría generar una diferencia en la presión osmótica, lo que dificultaría la separación de los aceites esenciales del material vegetal.

A su vez, Suryanti et. al. (2023) reportan que la incorporación de *NaCl* acelera los procesos de transferencia de masa y calor, ya que al agregar *NaCl*, el punto de ebullición del agua aumenta. Este incremento puede llevar a la degradación de los componentes y generar una reacción de hidrólisis, lo que acelera el proceso de extracción. El *NaCl* actúa como un electrolito, permitiendo que la solución de *NaCl* genere movimientos iónicos y rozamientos entre las partículas, influenciados por las ondas electromagnéticas de las microondas, facilitando así la separación del aceite esencial del agua.

Chen et al. (2021) investigaron el impacto de la adición de *NaCl* en el rendimiento de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. y encontraron que el rendimiento máximo fue de 0.61% al agregar un 3% de sal, en comparación con solo un 0.02% de rendimiento cuando no se añadió *NaCl*.

2.5. Técnicas de medición de actividad antioxidante

Para evaluar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales (AE), sus compuestos naturales o derivados sintéticos, se han desarrollado diversos métodos in vitro, entre los cuales destacan el DPPH, ABTS y ensayos de hidroxilo, diseñados para medir la capacidad de captura de radicales por compuestos orgánicos. Estos métodos se aplican generalmente a extractos, AE y sustancias orgánicas aisladas.

El DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) es un radical libre estable que se utiliza como simulador de la actividad antioxidante de los componentes presentes en los AE, extractos y otras sustancias de origen natural (Kulisic et al., 2004). Los compuestos antioxidantes en los AE interactúan con el DPPH, transformándolo en 1-difenil-2-picrilhidrazina. Se considera que la reacción de estabilización transcurre principalmente mediante un mecanismo de

transferencia de electrones, con una contribución marginal de transferencia de átomos de hidrógeno (Rashidi, Eikani y Ardjmand, 2018).

En el ensayo ABTS, también conocido como ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), se genera un cromóforo radical catiónico verde-azul estable, el 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) ($ABTS^+$), mediante un proceso de oxidación. Este radical presenta picos de absorción en 414, 645, 734 y 815 nm (Prior et al., 2005). Entre las estrategias más recientes para generar $ABTS^{•+}$, se incluyen reacciones con dióxido de manganeso (Miller et al., 1996), diclorhidrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH) o persulfato de potasio (Van Den Berg et al., 1999).

Los aceites esenciales son sustancias no polares, lo que significa que son hidrófobos e insolubles en agua, pero sí solubles en compuestos no polares como el alcohol o solventes orgánicos. La mayoría de ellos son líquidos con una densidad menor a la del agua, incoloros o con una tonalidad amarillenta clara. Para evaluar la actividad antioxidante, es necesario realizar diluciones de los aceites esenciales, y generalmente se emplean alcoholes como el metanol o etanol como solventes (Casado, 2018)

2.6. Diseño factorial

De acuerdo con Pulido et. al. (2008), el diseño factorial trata de un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para desarrollar, mejorar y optimizar procesos, así como modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es potencialmente influenciada por varias variables. Esta metodología permite, describir la influencia de las interacciones de las variables de proceso, todo esto con unos cuantos ensayos, lo que se traduce en una menor cantidad de tiempo y mano de obra.

En numerosos experimentos, es fundamental analizar los efectos de dos o más factores de manera simultánea. Los diseños factoriales son, en general, los más eficientes para este propósito. Un diseño factorial implica que, en cada ensayo o réplica completa del experimento, se evalúan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores. Por ejemplo, si el factor A tiene a niveles y el factor B tiene b niveles, cada réplica incluirá las $a * b$ combinaciones de tratamientos. Cuando los factores se organizan bajo un diseño factorial, se dice que están cruzados (Montgomery, 2005).

Montgomery (2005) señala que el diseño factorial 2^k es especialmente útil en las etapas iniciales de la experimentación, cuando se busca evaluar múltiples factores. Este tipo de diseño permite estudiar k factores en un diseño factorial completo con el menor número de corridas posible, lo que lo convierte en una herramienta eficaz para experimentos de tamizado o selección de factores. Además, al considerar únicamente dos niveles por factor, se asume que la respuesta varía de manera aproximadamente lineal dentro del rango seleccionado para dichos niveles.

Diseño factorial 2^3 : Permite analizar tres factores, cada uno con dos niveles. Este diseño consta de $2^3 = 2 * 2 * 2 = 8$ tratamientos distintos. La representación geométrica de este diseño corresponde a un cubo regular centrado en el origen (0,0,0), cuyos vértices representan los ocho tratamientos experimentales (Figura 2.2). Para construir la matriz de diseño, se alterna el signo negativo y positivo en la primera columna, se agrupan dos valores negativos y dos positivos en la segunda columna, y en la tercera se agrupan cuatro negativos y cuatro positivos. Este procedimiento sigue el orden estándar o de Yates, facilitando la disposición sistemática de los tratamientos (Tabla 2.1).

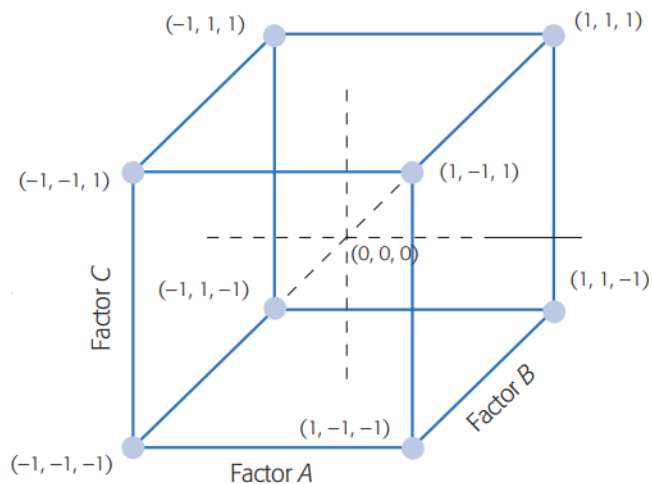


Figura 2.2. Representación geométrica diseño 2^3 . Fuente: Pulido et. al., 2008.

Tabla 2.1. Matriz de diseño 2^3 orden estándar.

Etiqueta	A	B	C
(1)	-	-	-
<i>a</i>	+	-	-
<i>b</i>	-	+	-
<i>ab</i>	+	+	-
<i>c</i>	-	-	+
<i>ac</i>	+	-	+
<i>bc</i>	-	+	+
<i>abc</i>	+	+	+

En este diseño factorial es posible evaluar un total de $2^3 - 1 = 7$ efectos, los cuales incluyen tres efectos principales (A, B, C), tres interacciones de segundo orden (AB, AC, BC) y una interacción de tercer orden (ABC). Generalmente, el interés principal radica en el análisis

de los efectos principales y las interacciones dobles. No obstante, aunque la interacción triple (ABC) suele considerarse despreciable, es recomendable verificar que su impacto sea mínimo. Además, su inclusión en el análisis puede contribuir a una mejor interpretación de los resultados y a una mayor claridad en la representación gráfica de los efectos (Pulido et. al., 2008).

El análisis de varianza (ANOVA) para un diseño 2^3 mostrado en la figura 2.3 permite identificar los efectos significativos en el proceso experimental. En este análisis, los efectos con valores de p inferiores a $\alpha = 0.05$ se consideran activos, lo que indica que influyen en la variable de respuesta y deben ser interpretados para comprender mejor el comportamiento del proceso y definir el tratamiento óptimo. Además, un menor valor de p sugiere una mayor influencia del efecto en la variable analizada. Es importante destacar que, para calcular el cuadrado medio del error, se requieren al menos dos repeticiones ($n \geq 2$), ya que cuando ($n = 1$), la suma de cuadrados del error (SC_E) tiene cero grados de libertad. Por ello, se recomienda realizar al menos dos réplicas del experimento para garantizar suficientes grados de libertad en la estimación del error.

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>F₀</i>	<i>Valor-p</i>
<i>A</i>	SC_A	1	CM_A	CM_A/CM_E	$P(F > F_0)$
<i>B</i>	SC_B	1	CM_B	CM_B/CM_E	$P(F > F_0)$
<i>C</i>	SC_C	1	CM_C	CM_C/CM_E	$P(F > F_0)$
<i>AB</i>	SC_{AB}	1	CM_{AB}	CM_{AB}/CM_E	$P(F > F_0)$
<i>AC</i>	SC_{AC}	1	CM_{AC}	CM_{AC}/CM_E	$P(F > F_0)$
<i>BC</i>	SC_{BC}	1	CM_{BC}	CM_{BC}/CM_E	$P(F > F_0)$
<i>ABC</i>	SC_{ABC}	1	CM_{ABC}	CM_{ABC}/CM_E	$P(F > F_0)$
Error	SC_E	$2^3(n - 1)$	CM_E		
Total	SC_T	$n2^3 - 1$			

Figura 2.3. Análisis de varianza (ANOVA) para diseño 2^3 . Fuente: Pulido et. al., 2008.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día, la búsqueda de compuestos naturales con propiedades antioxidantes ha adquirido una gran relevancia debido a sus efectos beneficiosos para la salud humana y su amplio potencial de aplicación en las industrias alimentaria y farmacéutica.

Clinopodium mexicanum, conocida comúnmente como “Toronjil del monte” o “Toronjil de menta”, contiene compuestos bioactivos, entre ellos aceites esenciales con capacidad antioxidante. Sin embargo, la composición química y el rendimiento de estos aceites se ve influenciado por diversos factores, como las condiciones de extracción. Ante este desafío, surge la necesidad de analizar los procedimientos para la obtención del aceite esencial de *Clinopodium mexicanum* utilizando un enfoque basado en diseño factorial de experimentos.

El análisis de los factores y sus interacciones, no solo permitirá maximizar el rendimiento del aceite esencial, sino también mejorar la concentración de componentes responsables de su actividad antioxidante.

4. JUSTIFICACIÓN

Este estudio se fundamenta en la importancia de aprovechar los recursos naturales, como las plantas medicinales, para obtener compuestos que promuevan la salud.

Clinopodium mexicanum ha sido empleada tradicionalmente en la medicina popular (Estrada et al., 2010; Alvarado et al., 2020), y su potencial antioxidante la posiciona como un recurso prometedor para el desarrollo de compuestos naturales con estas propiedades. Esta relevancia se enmarca en la creciente demanda de antioxidantes naturales, motivada por los riesgos asociados a los antioxidantes sintéticos. Estudios toxicológicos han vinculado compuestos como el BHT y el BHA con efectos adversos, incluyendo su relación

con el cáncer (Ito et al., 1985; Zhang et al., 2023), entre otros impactos negativos sobre la salud.

La aplicación de un diseño factorial en el proceso de extracción de aceites esenciales permitirá identificar las condiciones óptimas para maximizar la concentración de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes. Además, la evaluación de la actividad antioxidante mediante la inhibición de radicales libres, utilizando los métodos DPPH y ABTS, aportará información clave sobre el potencial beneficioso de este aceite esencial en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Obtener aceite esencial de *Clinopodium Mexicanum* mediante un diseño factorial y posteriormente determinar su actividad antioxidante.

5.2. Objetivos particulares

Realizar el diseño factorial 2^3 , seleccionando los factores adecuados.

Obtener el aceite esencial mediante el diseño factorial seleccionado.

Realizar el análisis de experimentos de acuerdo con los resultados obtenidos, teniendo como respuestas el rendimiento y la actividad antioxidante por dos métodos.

Determinar el factor y nivel que más tuvo influencia (de manera individual y la interacción de dos factores) en el rendimiento y actividad antioxidante.

6. HIPOTESIS

La obtención de aceite esencial de *Clinopodium mexicanum* mediante un diseño factorial permitirá analizar el rendimiento y la capacidad antioxidante de los aceites esenciales y los resultados obtenidos serán comparables con otras plantas mexicanas.

7. METODOLOGIA

7.1. Selección e identificación del material vegetal

En agosto de 2022, se adquirieron en la tienda naturista local "Curamex" de Cholula, Puebla, México, las partes aéreas secas de *Clinopodium mexicanum*, previamente sometidas a secado a la sombra (Figura 7.1). La identificación de la especie fue realizada con el apoyo del Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), confirmando que la planta había sido recolectada en la localidad de Tzicatlayocan, Puebla (18° 52' 12.8" de latitud norte, a una altitud de 2095 m). Posteriormente, un ejemplar fue depositado en el herbario del Jardín Botánico de la BUAP (Anexo 1)



Figura 7.1. Partes aéreas secas de *Clinopodium mexicanum*

7.2. Selección del diseño factorial

Para la extracción del aceite esencial, se empleó un diseño factorial 2^3 con dos réplicas, lo que resultó en un total de 16 experimentos (8 combinaciones factoriales por duplicado).

Pulido et al. (2008) remarca la necesidad en un diseño factorial 2^3 de contar con al menos dos réplicas del experimento para calcular la suma de cuadrados del error (SC_E) y completar la tabla de ANOVA

En este diseño, se evaluaron tres factores clave: presentación de la muestra (PM) como Factor A, relación líquido-sólido L-S (B) y cantidad de *NaCl* como Factor C, tal como se detalla en la Tabla 7.1. La selección de estos factores se basó en pruebas preliminares que permitieron identificar su impacto en el proceso de extracción.

Tabla 7.1. Matriz de diseño 2^3 no codificada

Experimento	Variables no codificadas		
	Muestra	L-S [mL/g]	Cantidad de NaCl [%p/v]
1	Entero	15	3
2	Molido	15	3
3	Entero	20	3
4	Molido	20	3
5	Entero	15	6
6	Molido	15	6
7	Entero	20	6
8	Molido	20	6

7.3. Extracción del aceite esencial.

Para la molienda de la muestra vegetal se ocupó una procesadora de la marca Oster. La Extracción del aceite esencial se llevó a cabo mediante hidrodestilación en un destilador simple que cuenta con un matraz de destilación de fondo redondo de 2L y un

condensador conectado a un baño recirculador de precisión (marca Prendo), así como una chaqueta de calentamiento (Figura 7.2).

Para este procedimiento, una parte de la muestra vegetal fue sometida a molienda utilizando la procesadora X durante 2 minutos. Luego, se pesaron 50 g de muestra en una balanza analítica PIONEER PX84 (0.1 mg) (Figura 7.3), de acuerdo con la presentación definida en el diseño experimental (entera o molida) según la Tabla 7.1. Posteriormente, la muestra se transfirió al matraz de destilación. Por otro lado, se midió el volumen de agua destilada necesario para cumplir con la relación líquido-sólido establecida en el diseño y se añadió la cantidad de *NaCl* correspondiente para garantizar las condiciones experimentales definidas en la Tabla 7.1. Una vez agitada, la solución salina se agregó al matraz de destilación, se armó el equipo y se energizó la chaqueta de calentamiento para comenzar con la extracción.

En las 16 corridas experimentales se controló el tiempo de destilación el cual fue de 1 hora tomando como tiempo de inicio la caída de la primera gota de destilado dentro del embudo de recolección.



Figura 7.2. Destilador y recirculador utilizados durante la extracción de AE



Figura 7.3. Balanza analítica PIONEER(0.1mg) PX84

7.4. Rendimiento del aceite esencial (AE)

Una vez recolectado y etiquetado, el AE se pesó en la balanza analítica PIONEER PX84 (0.1 mg) mostrada en la figura 7.3. El rendimiento de aceite esencial se calculó mediante la ecuación 7.1

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Masa de aceite esencial obtenido [g]}}{\text{masa de materia prima seca [g]}} * 100 \quad (\text{Ec. 7.1})$$

7.5. Actividad antioxidante

De acuerdo con Abedi et al. (2017) y Botello, (2023), la compleja composición de los aceites esenciales hace que su capacidad antioxidante no deba evaluarse mediante un único método. Por ello, se recomienda emplear al menos dos técnicas experimentales para garantizar la fiabilidad de los resultados. En este estudio, se utilizarán los métodos ABTS y DPPH, ambos radicales libres ampliamente empleados en la medición de la actividad antioxidante de los aceites esenciales.

7.5.1. Metodología con ABTS

El procedimiento para la preparación del radical $ABTS^+$, desarrollado por Re et al. (1999) y posteriormente modificado por Kuskoski et al. (2004), se llevó a cabo de la siguiente manera:

Inicialmente, se pesaron 0.0033 g de persulfato de potasio y 0.0194 g del reactivo $ABTS$ en un frasco de vidrio ámbar. A continuación, se adicionaron 5 mL de agua destilada y la mezcla se agitó hasta su completa disolución. Posteriormente, la solución se dejó reposar en un lugar fresco y oscuro durante un periodo de 16 a 19 horas para permitir la formación del radical $ABTS^+$.

Transcurrido este tiempo, se preparó una disolución del radical $ABTS^+$ en etanol, ajustando su absorbancia a un valor de 0.7 ± 0.02 a 754 nm , correspondiente a su máxima longitud de absorción. Una vez alcanzado este valor, la solución estuvo lista para evaluar la capacidad antioxidante del aceite esencial.

Las mediciones se realizaron empleando un espectrofotómetro Jenway 730501 - 7305 UV/Visible, como se ilustra en la Figura 7.4.



Figura 7.4. Equipo utilizado en la medición de la actividad antioxidante.

Una vez preparado el radical $ABTS^+$, se realizó una dilución 1:60 del aceite esencial en etanol con el propósito de evaluar su capacidad antioxidante.

El procedimiento de medición se llevó a cabo de la siguiente manera: inicialmente, se transfirieron $3920 \mu\text{L}$ de la solución de $ABTS^+$ en etanol absoluto a una celda de cuarzo del espectrofotómetro, registrando su absorbancia inicial (Abs_0). Posteriormente, se adicionaron $80 \mu\text{L}$ de la solución diluida 1:60 de aceite esencial en etanol, iniciando en ese momento el conteo del tiempo de reacción, establecido en 7 minutos.

Transcurrido este período, se realizó la lectura de la absorbancia final (Abs_f). Con estos valores, se determinó el porcentaje de inhibición del radical $ABTS^+$ tras la adición del aceite esencial, empleando la ecuación 7.2.

$$Inhibición(\%) = \frac{Abs_0 - Abs_f}{Abs_0} * 100 \quad (\text{Ec. 7.2})$$

Para cada una de las 16 extracciones se realizó la réplica de la medición del porcentaje de inhibición. Por lo que en total se obtuvieron 32 valores de porcentaje de inhibición de $ABTS^+$.

7.5.2. Metodología con DPPH

La metodología utilizada para evaluar la actividad antioxidante mediante la inhibición del radical $DPPH^+$ se basó en el protocolo descrito por Rashidi, Eikani y Ardjmand (2018), con algunas modificaciones.

Este ensayo mide la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical $DPPH^+$, lo que puede determinarse espectrofotométricamente a partir de la disminución de su absorbancia a 517 nm.

Para la preparación del radical, se pesaron 0.0012 g de $DPPH^+$ en un vidrio de reloj y se transfirieron a un matraz aforado de 50 mL con la ayuda de un embudo. Posteriormente, se aforó con metanol, se agitó la solución hasta su homogenización y se protegió de la luz envolviendo el matraz con papel aluminio. La solución se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Antes de proceder con el análisis, la solución de $DPPH^+$ se agitó adecuadamente. Para la medición, se transfirieron 3900 μL de la solución de $DPPH^+$ – metanol absoluto a una celda de cuarzo del espectrofotómetro y se añadieron 100 μL de metanol, estableciendo así la

solución de control. En una segunda celda, se dispusieron nuevamente 3900 μL de la solución de DPPH^+ – metanol absoluto y se incorporaron 100 μL de una solución metanólica del aceite esencial, iniciando en ese momento el tiempo de reacción (Tiempo cero).

Durante el proceso, las celdas se mantuvieron en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurridos 30 minutos, se registró la absorbancia de la muestra ($Abs_{muestra}$) y de la solución de control ($Abs_{control}$). A partir de estos valores, se calculó el porcentaje de inhibición del radical DPPH^+ utilizando la ecuación 7.3.

$$Inhibicion(\%) = \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} * 100 \quad (\text{Ec. 7.3})$$

7.6. Análisis de datos

Los datos experimentales obtenidos a partir de las 16 corridas experimentales (8 tratamientos con 2 réplicas cada uno) fueron procesados y analizados utilizando el software estadístico Minitab versión 21.3. Este programa permitió realizar un análisis estadístico detallado, incluyendo el Análisis de Varianza (ANOVA), lo que facilita la interpretación de los efectos principales y las interacciones entre los factores considerados en el diseño experimental.

El nivel de significancia utilizado para evaluar los efectos fue de $\alpha = 0.05$. Aquellos factores o interacciones con valores de p inferiores a este umbral se consideran significativos en la influencia sobre las variable de respuesta.

Minitab también permitió la generación de gráficos de efectos principales e interacciones, así como la validación del modelo estadístico ajustado a los datos experimentales.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Rendimiento y actividad antioxidante

En la presente investigación se aplicó un diseño factorial 2^3 con tres factores (Presentación de la muestra: A, relación líquido-sólido: B y cantidad de sal añadida: C) con dos replicas, dando un total de 16 experimentos, esto con el fin de analizar su efecto sobre las variables dependientes (rendimiento, % de inhibición de DPPH y % de inhibición de ABTS). Los datos experimentales obtenidos se muestran en la Tabla 8.1. Los rendimientos de aceite esencial (AE) de *Clinopodium mexicanum* obtenidos en el presente estudio son significativamente inferiores a los reportados por Botello (2023). Esta diferencia puede atribuirse al método de extracción empleado, ya que en su estudio se utilizó hidrodestilación asistida con ultrasonido, considerando el tiempo de sonicación como un factor de diseño en un rango de 9 a 25 minutos. Dicho estudio demostró que la aplicación de ultrasonido previa a la hidrodestilación influye positivamente en el rendimiento del AE, probablemente debido a la disrupción de las estructuras celulares, lo que facilita la liberación de los compuestos volátiles.

Tabla 8.1. Datos experimentales del diseño 2³ para la extracción de *Clinopodium mexicanum*.

Experimento	Variables no codificadas			Respuestas		
	Muestra	L-S [mL/g]	Cantidad de NaCl [%p/v]	Rendimiento %	% inhibición (DPPH)	% inhibición (ABTS)
1	Entero	15	3	0.43	58.31	71.955
2	Molido	15	3	0.53	56.15	72.37
3	Entero	20	3	0.488	56.07	76.42
4	Molido	20	3	0.356	56.95	76.56
5	Entero	15	6	0.459	50.86	75.94
6	Molido	15	6	0.406	54.09	73.73
7	Entero	20	6	0.372	56.57	76.725
8	Molido	20	6	0.432	57.45	69.87
9	Entero	15	3	0.45	56.56	73.465
10	Molido	15	3	0.55	59.05	71.915
11	Entero	20	3	0.458	57.81	76.985
12	Molido	20	3	0.351	56.89	76.49
13	Entero	15	6	0.453	47.64	55.705
14	Molido	15	6	0.392	57.32	68.015
15	Entero	20	6	0.344	57.81	75.54
16	Molido	20	6	0.434	57.45	77.215

Nota: los experimentos se llevaron a cabo de manera aleatoria

8.2. Análisis estadístico

8.2.1. Rendimiento del AE de *Clinopodium mexicanum*

El análisis estadístico mostrado en la Tabla 8.2 indica un ajuste adecuado del modelo, con un R^2 de 97.48%, lo que concuerda con el R^2 ajustado de 95.27%, y el R^2 predictivo (89.91%) sugiere una buena capacidad de predicción.

El error estándar ($S = 0.0131$) indica baja dispersión de los residuos, respaldando la precisión del modelo. Por lo que, el diseño factorial aplicado es adecuado para describir y optimizar el rendimiento en extracción del aceite esencial.

Tabla 8.2. Ajuste del modelo para rendimiento

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
0.0131371	97.48 %	95.27 %	89.91 %

El análisis de varianza (ANOVA) mostrado en la Tabla 8.3 confirma la significancia del modelo factorial ($p < 0.05$), evidenciando cuales factores evaluados influyen en el rendimiento de extracción del aceite esencial. En la Figura 8.1.se identificó que la relación líquido-sólido ($L - S$) y la cantidad de $NaCl$ tienen un impacto significativo, mientras que la presentación de la muestra (entera o molida) no mostró un efecto estadísticamente relevante, a diferencia de Conde-Hernández et. al., (2021) que si encontraron significancia en la presentación de la muestra (entera o molida) durante la extracción de aceite esencial de *Salvia officinalis*.

Tabla 8.3. Análisis de varianza (ANOVA) para el rendimiento.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	0.053353	0.007622	44.16	0.000
Lineal	3	0.018207	0.006069	35.17	0.000
Muestra	1	0.000000	0.000000	0.00	0.963
Relación L-S	1	0.011843	0.011843	68.62	0.000
Sal	1	0.006364	0.006364	36.88	0.000
Interacciones de 2 términos	3	0.004302	0.001434	8.31	0.008
Muestra*Relación L-S	1	0.001938	0.001938	11.23	0.010
Muestra*Sal	1	0.000354	0.000354	2.05	0.190
Relación L-S*Sal	1	0.002009	0.002009	11.64	0.009
Interacciones de 3 términos	1	0.030844	0.030844	178.72	0.000
Muestra*Relación L-S*Sal	1	0.030844	0.030844	178.72	0.000
Error	8	0.001381	0.000173		
Total	15	0.054734			

El modelo matemático con las variables no codificadas se muestra en la ecuación 8.1. remarcando en **negrita** los factores e interacciones significativas.

(Ec.8.1)

$$\begin{aligned}
 \text{Rendimiento} = & 1.4734 + 1.5412 \text{ Muestra} - 0.0614 \text{ **Relacion L - S**} - 0.1583 \text{ **Sal**} \\
 & - 0.09418 \text{ **Muestra * Relacion L - S**} - 0.2945 \text{ **Muestra * Sal**} \\
 & + 0.009170 \text{ **Relacion L - S * Sal**} + 0.017890 \text{ **Muestra * Relacion L - S * Sal**}
 \end{aligned}$$

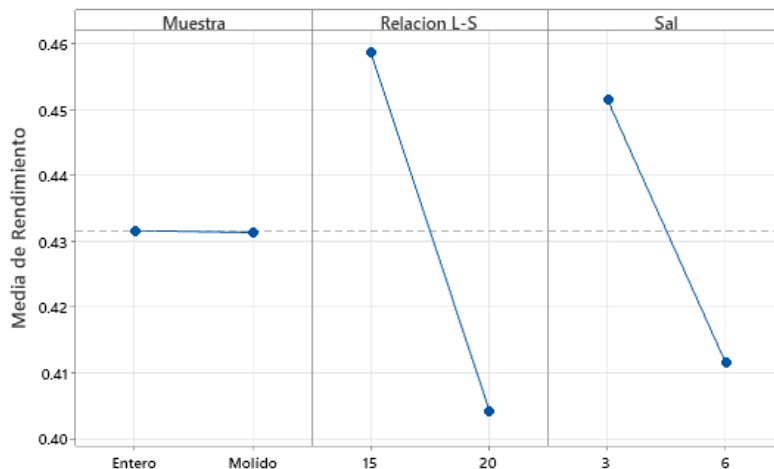


Figura 8.1. Gráfica de efectos principales para Rendimiento.

Aunque el efecto principal de la presentación de la muestra no fue significativo, Azmir et. al., (2013); Dai y Mumper, (2010) y Rojas-Villarubia (2019) han demostrado que la molienda reduce el tamaño de partícula, aumentando la superficie de contacto y, en consecuencia, favoreciendo la extracción, Según Fu et. al. (2022), la trituración de las materias primas favorece la penetración del agua, lo que facilita la evaporación de los aceites esenciales. Asi mismo Suryanti et. al., (2023) demostraron que el rendimiento del AE de *Cymbopogon nardus* se incrementó hasta en un 60% al reducir el tamaño de sus hojas a la mitad mediante hidrodestilación asistida por microondas.

La relevancia de la interacción *muestra * relación L – S* mostrada en la Figura 8.2 respalda la idea de que la presentación de la muestra puede influir en el proceso cuando se ajustan otros parámetros.

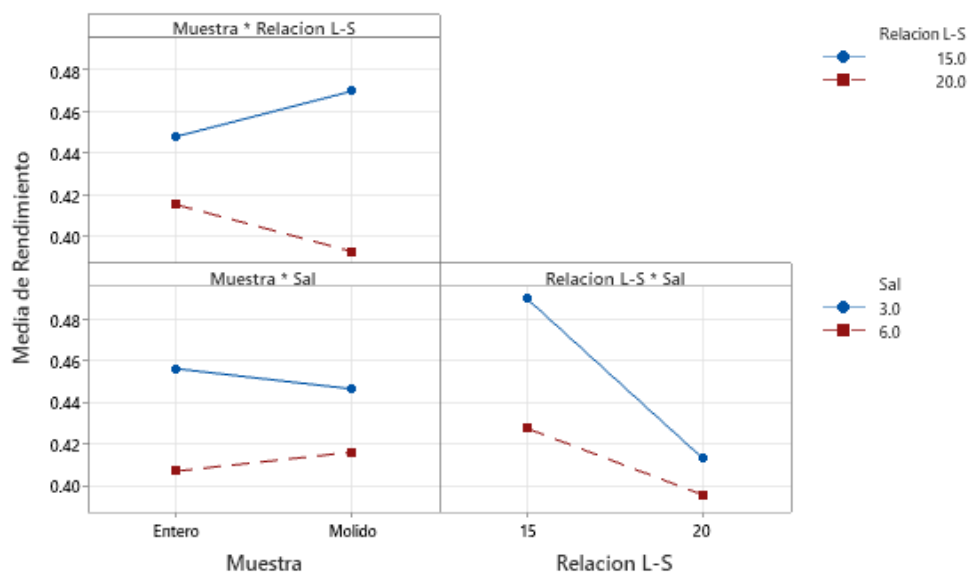


Figura 8.2. Gráfica de interacción para Rendimiento.

Estudios como el de Wu et. al. (2020) y Chen et. al. (2021) corroboran la influencia positiva de la sal en el rendimiento del AE la cual es atribuida a la alta presión osmótica de la

solución de *NaCl*, la cual favorece la plasmólisis en las células vegetales lo que aumenta el rendimiento (Kazaz et. al., 2009). Sin embargo, la interacción *Relacion L – S * Sal* muestra que, aunque una relación *L – S* alta es beneficiosa, su efecto puede ser anulado cuando se utilizan concentraciones elevadas de sal (6 %) (Figura 8.2). Esto se podría deber a que una alta concentración de sal puede generar una interferencia en la transferencia de masa, limitando la solubilidad de los compuestos esenciales en el disolvente, lo cual se corrobora en los resultados obtenidos por Askary et al. (2016) y Chen et al. (2021) en los que el rendimiento alcanza un máximo con una concentración de 3% de *NaCl* mientras que concentraciones mayores muestran efectos adversos sobre el rendimiento de aceite esencial.

Por otro lado, el efecto negativo de una mayor cantidad de sal (6 %) en todas las combinaciones puede ser explicado por la competencia osmótica y la modificación de la polaridad del sistema de extracción. La sal en concentraciones adecuadas, puede ser utilizada para mejorar el rendimiento en algunos sistemas; sin embargo, el exceso podría provocar precipitación de ciertos compuestos o cambios no deseados en el equilibrio del sistema al provocar el aumento de sustancias solubles en el extracto, que aumenta su punto de ebullición y reduce su tasa de extracción (Fu et. al., 2022).

En cuanto a la relación líquido-sólido, una relación más baja (15 *mL/g*) cuando la muestra esta molida (Figura 8.3), maximiza el rendimiento, lo que es consistente con los resultados obtenidos por Liu et al., (2019) que analizaron la influencia de la relación líquido-sólido en la extracción de *Helichrysum arenarium* mediante hidroddestilación asistida por microondas. Sin embargo, la Figura 8.4 sugiere que para la muestra entera, la relación *L – S* adecuada para maximizar el rendimiento, sería el valor alto (20 *ml/g*). Esta interacción de tipo antagonista entre la presentación de la muestra y la relación *L – S* mostrada en la Figura 8.2 se debe posiblemente a que en el caso de la muestra molida, la reducción del tamaño

de partícula aumenta la superficie de contacto, favoreciendo la transferencia de masa, esto permite que, incluso con una relación $L - S$ baja, el solvente sea suficiente para extraer los compuestos deseados de manera eficiente, mientras que para la muestra entera al tener menor superficie de contacto durante la extracción se requiera una mayor cantidad de solvente presente en la destilación para alcanzar el rendimiento deseado.

Asimismo, la interacción entre $L - S$ y $NaCl$ resultó significativa, indicando que su combinación afecta la eficiencia del proceso. La interacción triple ($Muestra * L - S * NaCl$) también fue altamente significativa ($p = 0.000$), lo que sugiere que la optimización del rendimiento requiere considerar estos tres factores en conjunto y se debe ser estudiado más a fondo.

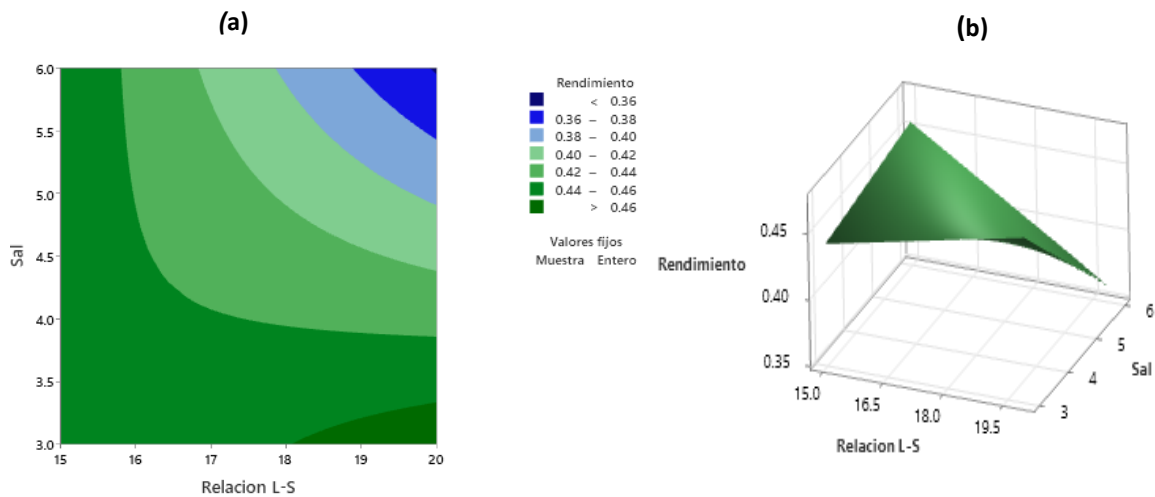


Figura 8.3. (a) Gráfica de Contorno y (b) de superficie del Rendimiento vs Sal, Relación L-S con la muestra entera como valor fijo.

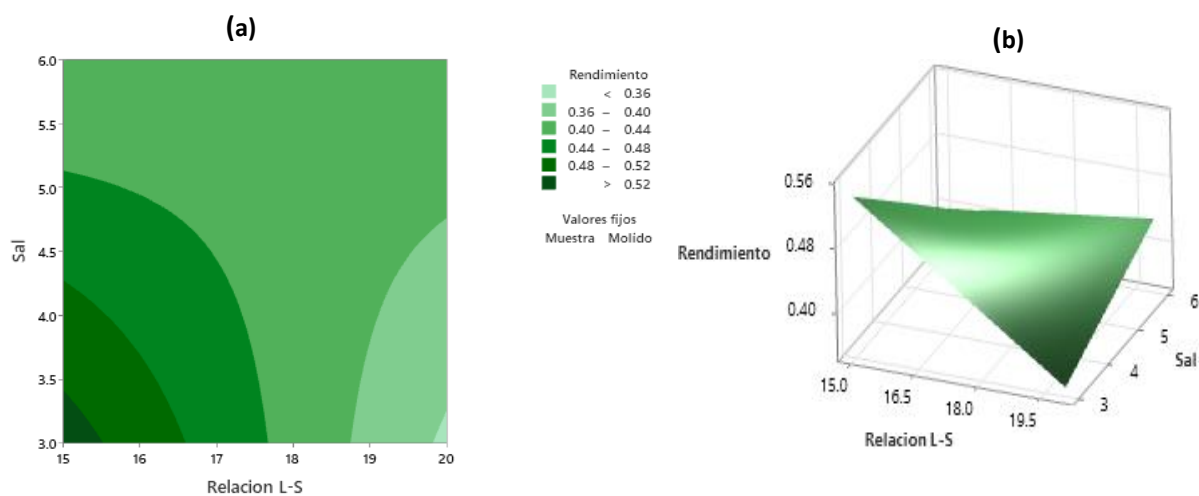


Figura 8.4. (a) Gráfica de Contorno y (b) de superficie del Rendimiento vs Sal, Relación L-S con la muestra molida como valor fijo.

Estos resultados subrayan la importancia de ajustar la relación $L - S$ y la concentración de $NaCl$ para maximizar la extracción del aceite esencial, considerando además su interacción con la presentación de la muestra para una optimización integral del proceso.

8.2.2. Porcentaje de inhibición de DPPH del AE de *Clinopodium mexicanum*

El ajuste del modelo aplicado para evaluar el porcentaje de inhibición de DPPH como indicador de la actividad antioxidante se muestra en la Tabla 8.4.

Por un lado, el R^2 del 85.76% indica que una gran proporción de la variabilidad en la respuesta está explicada por el modelo. Sin embargo, el R^2 ajustado, que reduce ligeramente a 73.31% al considerar el número de predictores, sugiere que algunos de los factores o interacciones incluidos podrían no aportar una contribución tan robusta al

modelo. Esta diferencia señala la posibilidad de que la inclusión de variables adicionales o la reconsideración de los términos de interacción pudiera mejorar el ajuste.

Lo más crítico es el valor del R^2 predictivo, que se sitúa en 43.05%. Este valor relativamente bajo indica que, aunque el modelo se ajusta bien a los datos experimentales disponibles, su capacidad para predecir nuevos datos es limitada. Esta limitación en la capacidad predictiva puede deberse a la alta variabilidad intrínseca en el proceso de extracción, a posibles efectos no capturados en el modelo actual, o incluso a la presencia de sobreajuste, donde el modelo se adapta demasiado a las condiciones específicas de la muestra experimental (Pulido et. al., 2008).

Tabla 8.4. Ajuste del modelo para % de inhibición de DPPH

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
1.51745	85.76 %	73.31 %	43.05 %

Tabla 8.5. Análisis de varianza (ANOVA) para DPPH

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	110.975	15.854	6.88	0.007
Lineal	3	51.492	17.164	7.45	0.011
Muestra	1	11.765	11.765	5.11	0.054
Relación L-S	1	18.105	18.105	7.86	0.023
Sal	1	21.622	21.622	9.39	0.015
Interacciones de 2 términos	3	50.452	16.817	7.30	0.011
Muestra*Relación L-S	1	10.176	10.176	4.42	0.069
Muestra*Sal	1	10.791	10.791	4.69	0.062
Relación L-S*Sal	1	29.485	29.485	12.80	0.007
Interacciones de 3 términos	1	9.030	9.030	3.92	0.083
Muestra*Relación L-S*Sal	1	9.030	9.030	3.92	0.083
Error	8	18.421	2.303		
Total	15	129.396			

El modelo matemático con las variables no codificadas se muestra en la ecuación 8.2. remarcando en negrita los factores e interacciones significativas.

(Ec.8.2)

$$\begin{aligned} DPPH = & 210.57 + 118.16 \textit{ Muestra} - 9.867 \textit{ Relacion L - S} - 28.77 \textit{ Sal} - 8.082 \textit{ Muestra} \\ & * \textit{ Relacion L - S} - 17.61 \textit{ Muestra} * \textit{ Sal} + 1.806 \textit{ Relacion L - S} * \textit{ Sal} \\ & + 1.244 \textit{ Muestra} * \textit{ Relación L - S} * \textit{ Sal} \end{aligned}$$

El efecto positivo de una mayor Relación *L – S* sobre la actividad antioxidante observada en las gráficas de la figura 8.5 es consistente con los estudios realizados por Conde-Hernández et. al., (2021) durante la extracción de aceite esencial de *Salvia officinalis* mediante hidrodestilación. A su vez también el comportamiento del porcentaje de inhibición relacionado con la molienda de la muestra evidencia que este proceso favorece la actividad antioxidante.

El efecto de la concentración de sal sobre la actividad antioxidante coincide con lo demostrado por Kailaje et al. (2025) al demostrar que aumentar la concentración de NaCl resulta en una reducción significativa de los niveles de compuestos amargos en extractos de *Citrus limetta*. La reducción máxima se alcanzó con una solución de NaCl al 5 %, provocando una disminución del 42.09 % y del 22.66 % en los niveles de naringina y limonina, respectivamente. Por el contrario, esta reducción también condujo a una disminución del 65.4 % en el contenido fenólico retenido y 70.9% en la capacidad antioxidante.

El análisis de varianza (Tabla 8.5) y las gráficas de efectos principales mostradas en la Figura 8.5 confirman la influencia conjunta de los factores en el porcentaje de inhibición de DPPH, pero la interpretación de las gráficas de interacción (Figura 8.6), permite comprender

de manera más precisa que combinación de los factores maximizan la actividad antioxidante.

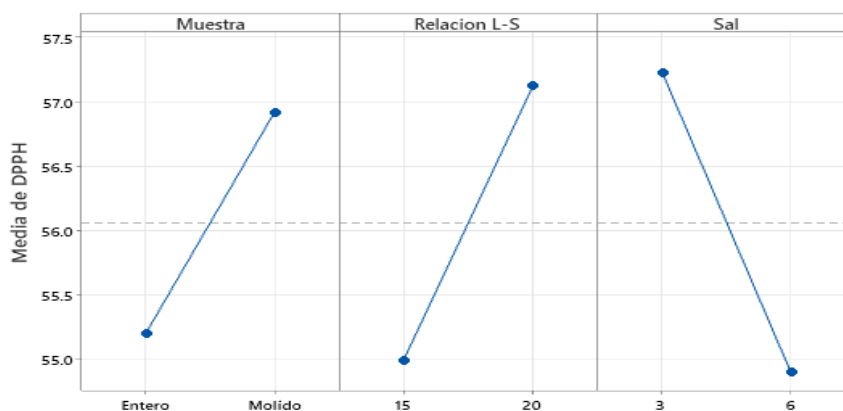


Figura 8.5. Gráfica de efectos principales para DPPH.

A partir de las gráficas de interacción, se pueden sacar las siguientes deducciones: en la interacción *Muestra * Relación L – S*, se observa que en el valor alto de la Relación *L – S* (20 mL/g), se experimenta una variación insignificante en la capacidad antioxidante al modificar la presentación de la muestra, en contraste con el valor bajo de la relación *L – S* (15 mL/g) donde se exhibe que la molienda de la muestra beneficia de manera significativa a la actividad antioxidante, esto sugiere que la muestra entera, al contar con el material vegetal intacto, se beneficia de un mayor volumen de solvente para extraer los compuestos antioxidantes. En cambio, la muestra molida, debido a su superficie de contacto ampliada, es menos sensible a cambios en la relación *L – S*.

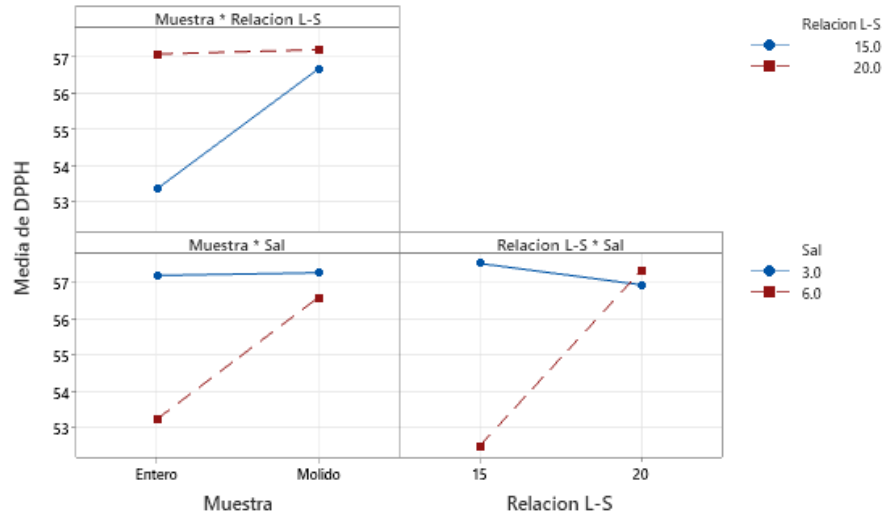


Figura 8.6. Gráfica de interacción para DPPH.

Al examinar la interacción *Muestra * Sal*, se evidencia un comportamiento muy parecido a la interacción *muestra * relación L – S*. Solo que, en este caso, se observa que en el valor bajo de la sal (3%), la presentación de la muestra (entera o molida) no produce un cambio significativo en la actividad antioxidante. En cambio, en el valor alto de la sal (6%), la molienda de la muestra parece incrementar el porcentaje de inhibición de DPPH.

En la muestra entera, el incremento de sal de 3 % a 6 % disminuye la capacidad antioxidante medida por DPPH, posiblemente debido a que la mayor concentración de sal altera la polaridad del medio o dificulta la liberación de compuestos bioactivos. Sin embargo, en la muestra molida, ese mismo incremento en la concentración de sal, afecta relativamente poco a la actividad antioxidante, lo que sugiere que, bajo ciertas condiciones, la sal puede favorecer la separación de metabolitos antioxidantes cuando la matriz vegetal está más expuesta.

Por último, la interacción sinérgica observada entre la relación *L – S* y el porcentaje de sal confirma la complejidad del sistema. En $L - S = 15 \text{ mL/g}$, el aumento de sal de 3 % a

6 % reduce la inhibición de DPPH, mientras que en $L - S = 20 \text{ mL/g}$ ocurre lo contrario, incrementándose de manera pronunciada el porcentaje de inhibición. Este hallazgo indica que la efectividad de la sal depende no solo de la forma de la muestra, sino también de la cantidad de solvente disponible para extraer y disolver los compuestos antioxidantes.

La influencia de la sal en la actividad antioxidante medida por DPPH en Aceites esenciales extraídos mediante hidrodestilación fue estudiada por Wu et. al., (2020) los cuales demostraron una influencia significativa en el aumento de compuestos fenólicos y terpenoides después de añadir sal durante la extracción de aceite esencial de Rosa. Lo cual respalda los resultados obtenidos en el presente estudio.

En conjunto, las gráficas de interacción muestran que el rendimiento antioxidante, medido por la inhibición de DPPH, no se explica únicamente por efectos principales. Las interacciones más significativas fue la relación $L - S$ y la sal, siendo la interacción triple (presentación de la muestra, la relación $L - S$ y la sal) irrelevante debido a su bajo nivel de significancia ya que $p = 0.083 > \alpha = 0.05$.

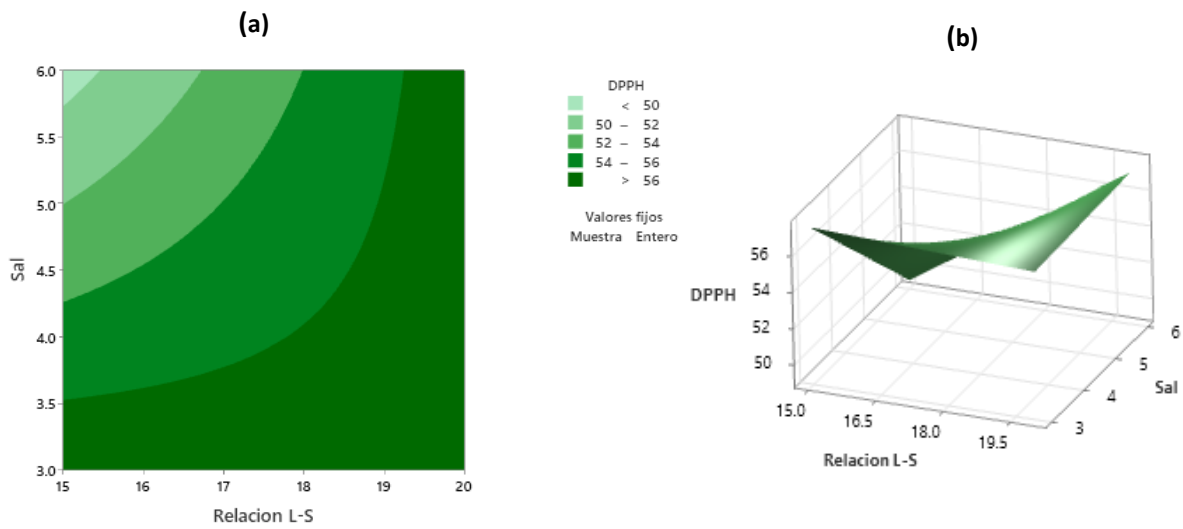


Figura 8.7. (a) Gráfica de Contorno y (b) de superficie del DPPH vs Sal, Relación L-S con la muestra Entero como valor fijo.

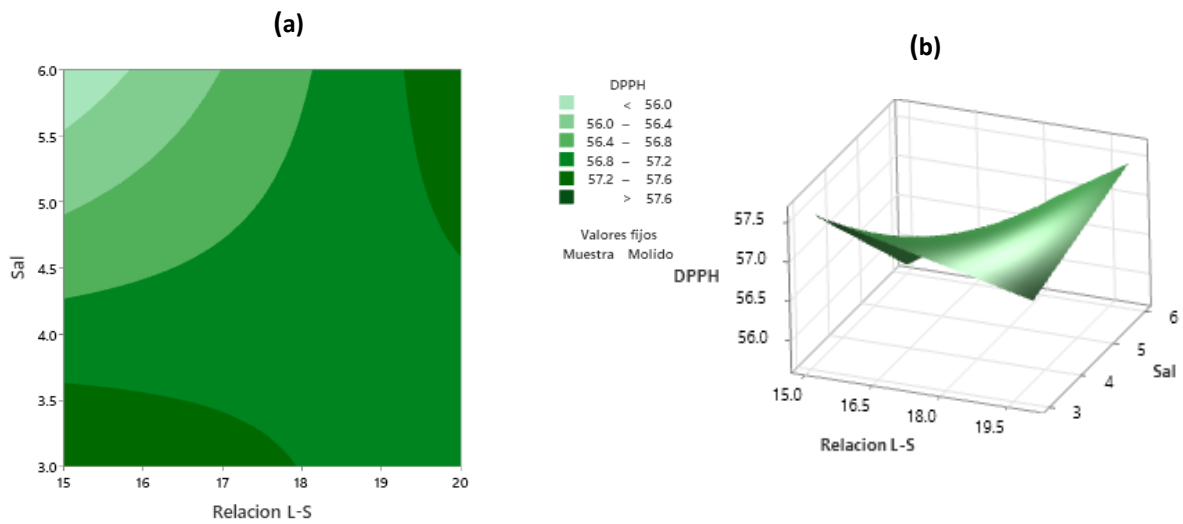


Figura 8.8. (a) Gráfica de Contorno y (b) de superficie del DPPH vs Sal, Relación L-S con la muestra Molida como valor fijo.

En las Figuras 8.7 y 8.8, podemos determinar las combinaciones que maximizan el porcentaje de inhibición de DPPH del aceite esencial.

Para la muestra entera (Figura 8.7), manteniendo una relación líquido sólido baja (15 mL/g) la cantidad de sal que maximiza la actividad antioxidante es de 3% – 3.5%, mientras que al tener relaciones L-S altas (Cercanas a 20 mL/g) la concentración de sal no afecta en lo absoluto a la actividad antioxidante por lo que para maximizar la misma, se recomienda mantener una relación L-S alta (20 mL/g) con una concentración de sal cercana a 3% lo que permite maximizar la extracción y disponibilidad de los compuestos bioactivos responsables de la actividad antioxidante.

Por otro lado, la Figura 8.8 exhibe un comportamiento distinto para la muestra molida, ya que las combinaciones de factores que maximizan la capacidad antioxidante se encuentran en los extremos opuestos de la interacción $L - S * Sal$ siendo la combinación de una relación $L - S$ baja (15 – 17 mL/g) con un porcentaje de sal bajo (3% – 3.5%) y la combinación de una relación $L - S$ alta (19.5 – 20 mL/g) con un porcentaje de sal alto (4.5% – 6%) las que maximizan la actividad antioxidante medida por inhibición del radical $DPPH^+$

8.2.3. Porcentaje de inhibición de ABTS del AE de *Clinopodium mexicanum*

Tabla 8.6. Ajuste del modelo para % de inhibición de ABTS

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
5.59174	42.67%	0.00%	0.00%

Tabla 8.7. Análisis de varianza (ANOVA) para ABTS

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	186.156	26.594	0.85	0.578
Lineal	3	149.025	49.675	1.59	0.267
Muestra	1	0.735	0.735	0.02	0.882
Relación L-S	1	114.009	114.009	3.65	0.093
Sal	1	34.281	34.281	1.10	0.326
Interacciones de 2 términos	3	21.010	7.003	0.22	0.877
Muestra*Relación L-S	1	13.141	13.141	0.42	0.535
Muestra*Sal	1	2.568	2.568	0.08	0.782
Relación L-S*Sal	1	5.302	5.302	0.17	0.691
Interacciones de 3 términos	1	16.120	16.120	0.52	0.493
Muestra*Relación L-S*Sal	1	16.120	16.120	0.52	0.493
Error	8	250.140	31.268		
Total	15	436.296			

El análisis del ajuste del modelo y la varianza para la actividad antioxidante medida mediante ABTS en el diseño factorial revela que el modelo no es adecuado para describir la variabilidad de la respuesta. El coeficiente de determinación R^2 es de 42.67 %, lo que indica que menos de la mitad de la variabilidad observada en los datos es explicada por los factores evaluados. Además, el R^2 ajustado y el R^2 predictivo son 0.00 %, lo que sugiere que el modelo no tiene capacidad predictiva ni ajusta bien a los datos experimentales (Tabla 8.6).

En el análisis de varianza, el valor de p global del modelo es 0.578, superior al umbral de 0.05, lo que implica que el modelo en su conjunto no es significativo. Ninguno de los factores principales muestra una influencia estadísticamente significativa sobre la actividad antioxidante por ABTS, ya que todos presentan valores de p superiores a 0.05. La relación $L - S$ tiene un valor de p de 0.093, lo que sugiere una tendencia hacia la significancia, pero

sin alcanzar un nivel de confianza suficiente. Las interacciones entre los factores tampoco presentan efectos significativos (Tabla 8.7).

Estos resultados indican que la actividad antioxidante medida por ABTS no sigue una tendencia clara con respecto a los factores evaluados en el diseño factorial. Esto puede deberse a la naturaleza de la técnica de ABTS, el cual es un radical altamente sensible a las condiciones de luz y temperatura. Es posible que los factores seleccionados no tengan un impacto directo en la disponibilidad o estabilidad de los compuestos responsables de la actividad antioxidante en la muestra de aceite esencial.

9. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se concluye que:

- La aplicación de un diseño factorial 2^3 ha permitido analizar de manera efectiva los factores que influyen en el rendimiento y en la actividad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium mexicanum*.
- Entre los parámetros evaluados, la relación líquido-sólido y la concentración de sal desempeñan un papel crucial en la optimización del proceso de extracción.
- La presentación de la muestra, es decir, si se utiliza el material en forma entera o molida, no mostró un efecto significativo de forma individual, sus interacciones con los demás factores revelaron que, en combinación, pueden modular el rendimiento y la actividad antioxidante del aceite.
- El análisis experimental evidenció que, mediante la adecuación de los niveles de la relación líquido-sólido y la cantidad de sal, es posible optimizar tanto el rendimiento de extracción como la capacidad antioxidante, medido a través de técnicas como DPPH.
- Se observó que los factores elegidos no afectaron la actividad antioxidante por ABTS.
- El uso de un diseño factorial no solo permite analizar de manera detallada el rendimiento y la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium mexicanum*, sino que también posibilita obtener datos comparables con los reportados para otras plantas mexicanas.
- Se logró el objetivo general de obtener el aceite esencial mediante un diseño factorial y determinar su actividad antioxidante.

- Los objetivos particulares también fueron cumplidos: se seleccionaron adecuadamente los factores, se realizó la extracción, se efectuó el análisis experimental y se identificaron los factores y niveles con mayor influencia en las respuestas evaluadas.

En conclusión, este estudio aporta evidencia de que el proceso de extracción del aceite esencial de *Clinopodium mexicanum* depende fundamentalmente del ajuste adecuado de la relación líquido-sólido y la concentración de sal, y de la consideración integral de las interacciones entre los factores. Estos hallazgos no solo fortalecen la metodología empleada, sino que también ofrecen directrices importantes para futuras investigaciones en el campo de la extracción y evaluación de compuestos bioactivos en plantas mexicanas.

10. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos, se proponen las siguientes recomendaciones para futuras investigaciones:

En primer lugar, se sugiere profundizar en la optimización de la relación líquido-sólido y la concentración de NaCl, dado que estos factores demostraron tener un impacto significativo en el rendimiento y en la actividad antioxidante. Para afinar aún más estos parámetros, se recomienda implementar una metodología de superficie de respuesta (RSM), que permita evaluar de manera continua y precisa la interacción entre las variables, identificando las condiciones óptimas del proceso de extracción.

Asimismo, se aconseja complementar el análisis de la actividad antioxidante utilizando métodos adicionales a la metodología ABTS. Esto contribuirá a reducir la variabilidad experimental y a mejorar la confiabilidad y capacidad predictiva del modelo.

Adicionalmente, es pertinente realizar una comparación directa entre el método de extracción empleado en el presente estudio y técnicas alternativas, como la hidrodestilación asistida con ultrasonido, para determinar cuál ofrece mayores rendimientos y una mejor conservación de los compuestos bioactivos.

Finalmente, se sugiere ampliar la investigación a la comparación con otras especies de plantas mexicanas, con el fin de validar la aplicabilidad de los hallazgos y explorar el potencial del aceite esencial de *Clinopodium mexicanum* en el desarrollo de productos con propiedades antioxidantes. Estas estrategias futuras contribuirán a perfeccionar el proceso de extracción y a maximizar la calidad y el rendimiento del aceite esencial, promoviendo un aprovechamiento más eficiente de los recursos naturales.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abedi, A. S., Rismanchi, M., Shahdoostkhany, M., Mohammadi, A. & Mortazavian, A. M. (2017). Microwave-assisted extraction of *Nigella sativa* L. essential oil and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 3779-3790. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2718-1>

Akerele, O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro mundial de la salud 1993*; 14 (4): 390-395. <https://iris.who.int/handle/10665/47707>

Almeida, M. M. B., de Sousa, P. H. M., Arriaga, Â. M. C., do Prado, G. M., de Carvalho Magalhães, C. E., Maia, G. A., & de Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44(7), 2155-2159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.051>

Alvarado, A. M., García-Trejo, F., Cardador-Martínez, A., & Magallán-Hernández, F. (2020). *Clinopodium mexicanum*: potential and difficulties for the sustainable use of a Mexican medicinal plant. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 19(2). <https://doi.org/10.37360/blacpma.20.19.2.8>

Álvarez, M. R., Meléndez, L. A., & Cosío, S. M. R. (2017). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1402>

Amirifar, A.; Hemati, A.; Asgari Lajayer, B.; Pandey, J.; Astatkie, T. Impact of various environmental factors on the biosynthesis of alkaloids in medicinal plants. In *Environmental Challenges and Medicinal Plants*; Aftab, T., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2022; pp. 229–248. https://doi.org/10.1007/978-3-030-92050-0_9

Andrade, M. a., Cardoso, M. G., Batista, L. R., Freire, J. M., y Nelson, D. L. (2011). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil of *Pelargonium odoratissimum*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(1), 47–52. <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000009>

Arellanes, Y., Casas, A., Arellanes, A., Vega, E., Blancas, J., Vallejo, M., ... & Pérez-Negrón, E. (2013). Influence of traditional markets on plant management in the Tehuacán Valley. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 9, 1-16. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-38>

Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. el, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R. & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1–2), 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>

Asgari Lajayer, B.; Ghorbanpour, M.; Nikabadi, S. Heavy metals in contaminated environment: Destiny of secondary metabolite biosynthesis, oxidative status and phytoextraction in medicinal plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2017, 145, 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.035>

Askary, M., Talebi, S. M., Amini, F., & Bangan, A. D. B. (2016). Effect of NaCl and iron oxide nanoparticles on *Mentha piperita* essential oil composition. *Environmental and Experimental Biology*, 14(1), 27-32. DOI: 10.22364/eeb.14.05

Ávalos-García, A. y Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2: 119 – 145. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/50406>

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

Bolouri, P.; Salami, R.; Kouhi, S.; Kordi, M.; Asgari Lajayer, B.; Hadian, J.; Astatkie, T. Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. *Molecules* 2022, 27, 8999. <https://doi.org/10.3390/molecules27248999>

Botello, G. (2023). *Caracterización y optimización de la obtención de aceite esencial de plantas mexicanas endémicas* [Tesis para obtener el grado de doctor en Ingeniería Química], Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Bowles, E.J. (2003). *The Chemistry of Aromatherapeutic Oils*; 3rd Edition Griffin Press. Bronaugh, R.L.; Wester, R.C.; Bucks, D.; Maibach, H.I.; & Sarason, R. (1990). In vivo percutaneous absorption of fragrance ingredients. ISBN: 9781003115151

Cadena Elizarrarás, Gabriela Itzel. (2017). "Revisión taxonómica del género *Clinopodium* I. (Lamiaceae) en México". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/152016>

Calvo-Irabien, L. M. (2018). Native Mexican aromatic flora and essential oils: Current research status, gaps in knowledge and agro-industrial potential. In *Industrial Crops and Products*, 111, 807–822. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.044>

Casado Villaverde, I. (2018). *Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor*. [Tesis de ingeniería en tecnologías industriales]. Universidad politécnica de Madrid. Recuperado de Archivo digital UPM <https://oa.upm.es/49669/>

Castellanos A. P. S., (2019). *Protocolo de germinación de Clinopodium mexicanum (Benth.) Govaerts (Poleo verde)*. [Tesis Individual para obtener el grado de Licenciado en Horticultura Ambiental]. Universidad Autónoma de Querétaro. Recuperado de <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/8222>

Chen, H., Gu, Z., Yang, L., Yang, R., Ji, Y., Zeng, Q., Xiao, F. & Huang, P. (2021). Optimization extraction of rosemary essential oils using hydrodistillation with extraction kinetics analysis. *Food Science & Nutrition*, 9(11), 6069-6077. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2549>

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>

CONABIO (1998). *Diversidad Biológica de México: estudio de país*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Conde-Hernández, L. A., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2014). Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *Food chemistry*, 142, 455-460. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.078>

Conde-Hernández, L. A., Luna-Guevara, M. L., Luna-Guevara, J. J., Pérez-Vázquez, J., & Aranda-García, R. J. (2021). Mexican sage (*Salvia officinalis*) extraction using factorial design and its effect on chemical and antibacterial properties. *Journal of Chemistry*, 2021(1). <https://doi.org/10.1155/2021/5594278>

Da Porto, C.; Decorti, D. & Kikic, I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction

methods. Food Chemistry, Vol.112, pp. 1072-1078.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.015>

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

Diniz do Nascimento, L., Barbosa de Moraes, A. A., Santana da Costa, K., Pereira Galúcio, J. M., Taube, P. S., Leal Costa, C. M., ... & Guerreiro de Faria, L. J. (2020). Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: New findings and potential applications. *Biomolecules*, 10(7), 988. <https://doi.org/10.3390/biom10070988>

Djilani, A., & Dicko, A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition, well-being and health*, 7, 155-179. DOI: <https://doi.org/10.5772/25344>

Domínguez, M., Nieto, A., Marin, J. C., Keck, A. S., Jeffery, E., & Céspedes, C. L. (2005). Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5889-5895. <https://doi.org/10.1021/jf0504972>

Estrada-Reyes, R., Martínez-Vázquez, M., Gallegos-Solís, A., Heinze, G., & Moreno, J. (2010). Depressant effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.03.012>

Feifei, W., Shuting, Y., Yuqin, S., Weixin, F., Ruijie, H., 2020. Aromatic characteristics of 'Feng Hua' rose flower in different parts. *Journal of Northwest Forestry University* 35, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106435>

Fretes, F. (2010). Plantas medicinales y aromáticas. Una alternativa de producción comercial. *Agencia del gobierno de los estados unidos para el desarrollo internacional (USAID)*. 1-59

Fu, C., Lan, X., Yuan, J., Li, C., Li, L., Yu, Z., Tan, T., Yuan, M. & Du, F. (2022). Research on the optimization, key chemical constituents and antibacterial activity of the essential oil extraction process of *Thuja koraiensis* Nakai. *Journal of Microbiological Methods*, 194, 106435. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106435>

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, 1-85. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B)

Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>

Harley, R. M., Paucar, A. G. (2000). List of species of tropical American Clinopodium (Labiatae), with new combinations. *Kew Bulletin*, 917-927. <https://doi.org/10.2307/4113638>

Hirano, T., Gotoh, M., & Oka, K. (1994). Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life sciences*, 55(13), 1061-1069. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00641-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00641-5)

Hunter, M. (2009). *Essential oils: Art, Agriculture, Science, Industry and Entrepreneurship*. Nova Science Publishers, Inc., New York.

Hüsnü Can Başer, K., & Buchbauer, G. (2015). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications.*, (Ed. 2).

Ito, N., Fukushima, S., & Tsuda, H. (1985). Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response by bha, Bht, and Other Antioxidants. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 15(2), 109–150. <https://doi.org/10.3109/10408448509029322>

Jain, P. L., Patel, S. R., & Desai, M. A. (2022). Patchouli oil: An overview on extraction method, composition and biological activities. *Journal of Essential Oil Research*, 34(1), 1-11. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1955761>

Kailaje, J., Chavan, R., & Annapure, U. (2025). Ultrasound assisted osmotic dehydration of sweet lime (Citrus limetta) slices: Process optimization and mass transfer kinetics. *Food Chemistry*, 467, 142350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142350>

Kala, C. P. (2015). Medicinal and aromatic plants: Boon for enterprise development. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.05.002>

Kanza Saeed, Imran Pasha, Muhammad Farhan Jahangir Chughtai, Zaryab Ali, Hina Bukhari & Muhammad Zuhair (2022): Application of essential oils in food industry:

challenges and innovation, *Journal of Essential Oil Research*, DOI: 10.1080/10412905.2022.2029776

Kaul, T. N., Middleton Jr, E., & Ogra, P. L. (1985). Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of medical virology*, 15(1), 71-79. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890150110>

Kazaz, S., Erbas, S., Baydar, H., 2009. The effects of storage temperature and duration on essential oil content and composition oil rose (*Rosa damascena* Mill.). *Turk. J. Field Crops* 14, 89–96.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*, 85(4), 633-640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024>

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology*, 24, 691-693. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400036>

Liolios, C. C., Graikou, K., Skaltsa, E., & Chinou, I. (2010). Dittany of Crete: a botanical and ethnopharmacological review. *Journal of ethnopharmacology*, 131(2), 229-241. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.005>

Liu, X., Jing, X., & Li, G. (2019). A process to acquire essential oil by distillation concatenated liquid-liquid extraction and flavonoids by solid-liquid extraction simultaneously from *Helichrysum arenarium* (L.) Moench inflorescences under ionic liquid-microwave mediated. *Separation and Purification Technology*, 209, 164-174. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.07.028>

Loraine, S., Mendoza-Espinoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18-27.

Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *J. Nat. Prod*, Universidad de Antioquia. 59(1), 77-79.

Martínez-Vázquez, M., Apan, T. O. R., Aguilar, H., & Bye, R. (1996). Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract and of the flavone linarin of *Buddleia cordata*. *Planta medica*, 62(02), 137-140. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957836>

Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1996). Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox report*, 2(3), 161-171. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

Montgomery, D. C. (2005). *Diseño y análisis de experimentos*, 2ª edición, México Limusa Wiley.

Organización Mundial de la Salud. The selection and use of traditional remedies in primary health care. Informe de un taller interregional (documento inédito, TRM/86.1, 1986).

Opalchenova, G., Obreshkova, D. (1999). Antibacterial action of extracts of *Clinopodium vulgare* L. curative plant. *Drug development and industrial pharmacy*, 25(3), 323-328. <https://doi.org/10.1081/DDC-100102177>

Pérez-Ochoa, M. L., Vera-Guzmán, A. M., & Chávez-Servia, J. L. (2024). Antioxidant Compounds and Activity of the Medicinal Plants *Tagetes* sp. and *Clinopodium* sp. from Indigenous Communities in Mexico. *Journal of Medicinal plants and By-Products*, 13(2), 417-428. DOI: <https://doi.org/10.22034/jmpb.2023.358021.1460>

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

Pulido, H. G., De la Vara Salazar, R., Carrasco, A. C., & Sánchez, M. O. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. McGraw-Hill Interamericana.

Rashidi, S., Eikani, M. H., & Ardjmand, M. (2018). Extraction of *Hyssopus officinalis* L. essential oil using instant controlled pressure drop process. *Journal of Chromatography A*, 1579, 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.020>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Rojas Villarrubia, a. a. (2019). Extracción y caracterización del aceite esencial de laurel (*Laurus nobilis* L.) a través del método de arrastre de vapor: proyecto de grado:

Modalidad investigación aplicada. *repositorio uajms*. recuperado a partir de <https://dicyt.uajms.edu.bo/investigacion/index.php/quimica/article/view/181>

Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., & Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant growth regulation*, 34, 3-21. <https://doi.org/10.1023/A:1013386921596>

SEMARNAT. (2010). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.

Sepúlveda-Jiménez, G., Ducoing, P., Rocha, H. y Sosa, M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21: 355 – 363.

Silva Castellanos, A. P., Magallán Hernández, F., Vergara Pineda, S., Ramírez Segura, O. & Queijeiro Bolaños, M. (2021). Protocolo de propagación por semilla de *Clinopodium mexicanum*, una planta medicinal nativa de México. *Agrociencia*, 55(5), 433-450. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i5.2519>

Surburg, H. & Panten J. (2006). Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses. 5th Ed. WILEY-VCH, Weinheim <https://doi.org/10.1002/3527608214>

Suryanti, F., Qadariyah, L., & Mahfud, M. (2023). Effect of addition of NaCl salt on extraction of essential oil from lemongrass leaves by microwave hydro-distillation method. *Indonesian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.22146/ijc.78919>

Tran, T. H., Ha, L. K., Nguyen, D. C., Dao, T. P., Nhan, L. T. H., Nguyen, D. H., Nguyen, T. D., Vo, D.-V. N., Tran, Q. T. & Bach, L. G. (2019). The study on extraction process and analysis of components in essential oils of black pepper (*Piper nigrum* L.) seeds harvested in Gia Lai province, Vietnam. *Processes*, 7(2), 56. <https://doi.org/10.3390/pr7020056>

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 2009. Ciudad de México, México.

Van den Berg, R., Haenen, G. R., van den Berg, H., & Bast, A. A. L. T. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food chemistry*, 66(4), 511-517. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00089-8)

Villaseñor, J. L. 2016. Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87: 559–902.

Woerdenbag, H. J., Merfort, I., Paßreiter, C. M., Schmidt, T. J., Willuhn, G., van Uden, W., ... & Konings, A. W. (1994). Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. *Planta Medica*, 60(05), 434-437. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959526>

Wu, Y., Han, X., Yuan, W., Wang, X., Meng, D., Hu, J., & Lv, Z. (2020). Salt intervention for the diversities of essential oil composition, aroma and antioxidant activities of Kushui rose (*R. setatex* *R. rugosa*). *Industrial crops and products*, 150, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112417>.

Zhang, X. J., Diao, M. N., & Zhang, Y. F. (2023). A review of the occurrence, metabolites and health risks of butylated hydroxyanisole (BHA). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(13), 6150-6166. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12676>

ANEXO 1



M.I.C. Ma. Gpe. Tita Vázquez Espinosa de los Monteros
Directora
Facultad de Ingeniería Química
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Por este medio reciba un cordial saludo y así mismo aprovecho la presente para entregarle la identificación taxonómica del material herborizado recibido, cuya identificación fue realizada por el curador MPhil Allen J. Coombes, siendo la siguiente:

Nombre Científico	Familia	Colector / Num. Colecta.
<i>Clinopodium mexicanum</i> (Benth.) Govaerts	LAMIACEAE	(1)

Sin más por el momento me despido de usted.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 4 de marzo de 2022


Dr. Jesús Francisco López Ochoa
Director



C.c.p. Archivo.

Benemérita
Universidad

Profronteral 24 sur y Av. San Claudio,
Calle 1408, Ciudad Universitaria,
Caf. San Marcos, Puebla, Pue. C.P. 72000
01 (222) 229-05-00 Ext. 7832 y 7034