



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

“CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA
OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE
PLANTAS MEXICANAS ENDÉMICAS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA
ANETTE GISELA BOTELLO OJEDA

DIRECTOR DE TESIS
LILIA ALEJANDRA CONDE HERNÁNDEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS
MA. AUXILIO OSORIO LAMA

No. de CVU: 41046

JUNIO 2023



BUAP

Oficio: FIQ/SIEP/032/2023

Mtro. Alfredo Avendaño Arenaza
Director General de Bibliotecas
Presenta

A través de este medio me dirijo a usted para informarle que la tesis con título: **Caracterización y optimización de la obtención de aceite esencial de plantas mexicanas endémicas** ha sido avalada bajo los preceptos de integridad académica; por lo tanto, se autoriza la impresión de tesis del alumno:

Nombre del alumno	Matrícula	Facultad	Posgrado	Programa Educativo
Anette Gisela Botello Ojeda	219570098	Ingeniería Química	Ingeniería Química	Doctorado en Ingeniería Química

Sin más por el momento, agradezco la atención al presente.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z. a 21 de junio de 2023


Dra. Esméralda Vidal Robles
Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrados




Dra. Lilia Alejandra Conde Hernández
Directora de Tesis

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C. P. 72590
01 (222) 229 55 00
Exts. 7250 y 7251

DEDICATORIA

Después de agradecer a Dios por los “talentos” que me ha confiado y que no han sido enterrados, ¿a quién tendría que dedicar primero este logro? ¿A mis abuelitos, a quienes ofrendo hoy con el más alto grado académico? ¿A mis papás, a quienes agradezco infinitamente por su amor, su apoyo, su paciencia, en fin, por ser los mejores padres que pudiera haber deseado? ¿A mi hermano, mi gran amigo, mi compañero, mi cómplice y el mejor regalo de Reyes que he tenido? ¿A Joaquín, el hombre amoroso, comprensivo y por sobre todas las cosas, “apoyo incondicional” que ha sido casi desde el inicio de esta travesía? ¿A la larga lista de profesores que creyeron en mí? ¿A mis amigos, primos y tíos, quienes siempre creyeron en mí y cada vez que me vieron cansada o agotada me dieron una palabra de aliento para seguir adelante?

No he logrado establecer un orden de prioridad porque todos ustedes han hecho que esta travesía llamada "el doctorado" sea más liviana, disfrutable gran parte del tiempo. Gracias, hermosos seres humanos, por acompañarme en este camino. Gracias porque todos ustedes han sido apoyo y hoy cuatro años de investigación han quedado plasmados en una tesis doctoral. Gracias porque a su lado he crecido aún más, porque la mujer que era en 2018 ha madurado, se ha llenado de experiencias y ahora está lista para ser llamada Doctora en Ingeniería Química.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Conahcyt por la beca otorgada (CVU: 41046) para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

Mi gratitud a la Facultad de Ingeniería Química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, mi alma máter, por brindarme la oportunidad de desarrollarme académicamente.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Eje IV. Modelo de Investigación abierta y compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrolladora de la transformación. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2021-2025.

Me gustaría también, extender mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han sido parte fundamental de mi trayectoria y de la realización de este trabajo. En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a la Dra. Lilia Alejandra Conde Hernández, quien no solo fue mi directora de tesis, sino también una amiga invaluable. Reconozco y agradezco profundamente el conocimiento que me transmitió, así como su infinita paciencia y guía durante cada etapa del proceso de investigación.

Agradezco también a la Dra. María Auxilio Osorio Lama, co-directora de este trabajo doctoral por su apoyo incondicional. A la Dra. Beatriz Bernabé Loranca quiero agradecerle por su orientación y apoyo. A la Dra. Zaida Nelly García le agradezco su disponibilidad y apoyo para llevar a cabo la determinación de la toxicidad de los aceites esenciales obtenidos.

También quiero agradecer al Dr. José Antonio Rivera-Márquez y a la Dra. María Elena Ramos Cassellis por brindarme las facilidades para utilizar sus equipos en el desarrollo de la investigación. Donde quiera que esté el Dr. Alejandro Augusto Alonso-Calderón, le agradezco su total disposición para prestarnos sus equipos.

Agradezco al Dr. Irving Israel Ruíz López por su exigencia y sus observaciones siempre acertadas. Finalmente, quiero reconocer la amabilidad y disponibilidad de la Dra. Claudia Santacruz Vázquez y la Dra. María Elena Sosa Morales, quienes contribuyeron en gran medida a la culminación exitosa de este trabajo de investigación.

ÍNDICE

	Página
Tablas	i
Figuras	iii
Lista de Abreviaturas	v
Resumen	vii
1. Introducción	
2. Antecedentes	1
2.1. Definición de aceites esenciales	1
2.2. Métodos de obtención de los aceites esenciales	2
2.2.1. Métodos tradicionales para extraer aceites esenciales	3
2.2.2. Técnicas no convencionales o emergentes para la extracción de aceites esenciales	5
2.3. Plantas medicinales y aromáticas	10
2.3.1. <i>Clinopodium mexicanum</i>	10
2.3.2. <i>Agastache mexicana subsp. mexicana</i>	13
2.3.3. <i>Agastache mexicana subsp. xolocotziana</i>	15
2.4. Optimización de condiciones de proceso mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM)	17
2.5. Métodos de medición de actividad antioxidante de los aceites esenciales	24
2.6. Composición química de los aceites esenciales	28
3. Justificación	34
4. Hipótesis	36
5. Objetivos	36
6. Metodología	37
6.1. Selección y caracterización del material vegetal	37
6.1.1. Identificación del material vegetal	37
6.1.2. Preparación del material vegetal	37

6.1.3. Determinación de la humedad del material vegetal	37
6.2. Selección del diseño de experimentos	38
6.3. Extracción del aceite esencial	40
6.4. Determinación de la masa de materia de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca (% w/w)	42
6.5. Medición de la actividad antioxidante	42
6.6. Determinación de la composición química del aceite esencial	43
6.7. Medición de la toxicidad del aceite esencial	44
7. Resultados y discusión	46
7.1. <i>Clinopodium mexicanum</i>	46
7.1.1. Masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca	46
7.1.2. Actividad antioxidante del CMEO	50
7.1.3. Composición química del aceite esencial	54
7.1.4. Comparación de hidrodestilación tradicional con hidrodestilación asistida con ultrasonido	55
7.1.5. Toxicidad del aceite esencial	55
7.2. <i>Agastache mexicana subsp. mexicana</i>	56
7.2.1. Masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca	58
7.2.2. Actividad antioxidante del AMMEO	58
7.2.3. Optimización global de la extracción de AMXEO	64
7.2.4. Composición química del aceite esencial	65
7.2.5. Comparación de hidrodestilación salina con hidrodestilación tradicional	67
7.2.6. Toxicidad del aceite esencial	67
7.3. <i>Agastache mexicana subsp. xolocotziana</i>	68
7.3.1 Masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca	68
7.3.2 Actividad antioxidante del AMXEO	73
7.3.3 Optimización global de la extracción de AMXEO	77
7.3.4 Composición química del aceite esencial	79
7.3.5 Comparación de la hidrodestilación asistida por surfactante con la hidrodestilación tradicional	81
7.4 Actividad antioxidante de antioxidantes sintéticos considerados y comparación con los aceites esenciales obtenidos sintéticos	81

8 Conclusiones	85
9 Recomendaciones	87
10 Referencias bibliográficas	88

ANEXOS

Anexo 1. Carta de identificación de las plantas <i>Agastache mexicana</i> subsp. <i>xolocotziana</i> y <i>Agastache mexicana</i> subsp. <i>mexicana</i>	100
Anexo 2. Carta de identificación de la planta <i>Clinopodium mexicanum</i>	101

TABLAS

Número de tabla	Título de la tabla	Página
2.1	Clasificación de los métodos de extracción de aceites esenciales de acuerdo con Asbahani <i>et al.</i> (2015).	3
2.2	Publicaciones seleccionadas acerca de optimización a través de RSM mediante métodos de extracción por hidrodestilación, hidrodestilación salina e hidrodestilación asistida por ultrasonido.	21
2.3	Algunos componentes de los aceites esenciales estudiados con algunas de sus propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas.	32
6.1	Niveles codificados y no codificados de las variables independientes utilizadas en el diseño RSM para la extracción del EO de <i>Clinopodium mexicanum</i> .	38
6.2	Niveles codificados y no codificados de las variables independientes utilizadas en el diseño RSM para la extracción del EO de <i>Agastache mexicana</i> subsp. <i>mexicana</i> .	39
6.3	Niveles codificados y no codificados de las variables independientes utilizadas en el diseño RSM para la extracción del EO de <i>Agastache mexicana</i> subsp. <i>xolocotziana</i> .	39
7.1	Puntos experimentales del diseño central compuesto y datos experimentales para la extracción de CMEO.	46
7.2	Niveles recomendados para obtener la mejor actividad antioxidante en la extracción de CMEO dentro del rango de los estudios experimentales.	54
7.3	Compuestos identificados en el CMEO mediante GC-MS.	54
7.4	Puntos experimentales del diseño central compuesto y datos experimentales para la extracción de AMMEO.	57
7.5	Compuestos identificados en el AMMEO mediante GC-MS.	66

7.6	Puntos experimentales del diseño central compuesto centrado en las caras y datos experimentales.	69
7.7	Compuestos identificados en el AMXEO mediante GC-MS	80
7.8	Ecuaciones de regresión y valores de IC_{50} determinados mediante los ensayos DPPH y ABTS para antioxidantes sintéticos considerados como referencia.	82
7.9	Comparación del IC_{50} de antioxidantes sintéticos y aceites esenciales obtenidos en esta investigación.	82

FIGURAS

Número de figura	Título de la figura	Página
2.1	<i>Clinopodium mexicanum</i> .	12
2.2	<i>Agastache mexicana</i> subsp. <i>mexicana</i> .	14
2.3	<i>Agastache mexicana</i> subsp. <i>xolocotziana</i> .	17
2.4	Tipo de diseño de experimentos de acuerdo al método de obtención de EO utilizado (Conde-Hernández <i>et al.</i> , 2021).	23
2.5.	Número de factores optimizados mediante RSM de acuerdo al método de obtención de EO utilizado (Conde-Hernández <i>et al.</i> , 2021).	24
2.6	Frecuencia de la variable de respuesta a optimizar mediante RSM (Conde-Hernández <i>et al.</i> , 2021).	24
6.1	Procedimiento de extracción y medición del CMEO	40
6.2	Procedimiento de extracción y medición del AMMEO	41
6.3	Procedimiento de extracción y medición del AMXEO	41
7.1	Gráficas de contorno para el efecto de (a) concentración de NaCl y tiempo de remojo (b) concentración de NaCl y relación líquido – sólido (c) tiempo de remojo y relación líquido – sólido sobre la actividad antioxidante (IC ₅₀ DPPH) del AMMEO.	62
7.2	Gráficas de contorno para el efecto de (a) concentración de NaCl y tiempo de remojo (b) concentración de NaCl y relación líquido – sólido (c) tiempo de remojo y relación líquido – sólido sobre la actividad antioxidante (IC ₅₀ ABTS) del AMMEO.	64
7.3	Perfiles de la función de deseabilidad y valores de la respuesta predicha para la optimización de la obtención de AMMEO.	65
7.4	Gráficas de contorno para el efecto de (a) concentración de Tween 20 y relación sólido – líquido (b) concentración de Tween 20 y tiempo de extracción, y (c) relación sólido – líquido y tiempo de extracción sobre sobre la masa de AMXEO por masa de materia prima seca.	73

7.5	Gráficas de contorno para el efecto de (a) concentración de Tween 20 y relación sólido – líquido (b) concentración de Tween 20 y tiempo de extracción (c) relación sólido – líquido y tiempo de extracción sobre la actividad antioxidante (IC_{50} DPPH) de AMXEO.	76
7.6	Frente de Pareto para minimizar el IC_{50} DPPH y maximizar la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca. En rojo, la mejor solución comprometida (1.82%, 53.6 mg/mL).	79
7.7	Reacción de antioxidante con (a) DPPH (b) ABTS (c) principales antioxidantes presentes en AMXEO, AMMEO y CMEO.	84

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo- tiazolina-6-acido sulfónico
AMMEO	Aceite esencial de Agastache mexicana subsp. Mexicana
AMXEO	Aceite esencial de Agastache mexicana subsp. xolocotziana
ANOVA	Análisis de varianza
BBD	Diseño Box-Behnken
BHT	Butilhidroxitolueno
CCD	Diseño central compuesto
CCF	Diseño central compuesto centrado en las caras
CMEO	Aceite esencial de Clinopodium mexicanum
CUPRAC	Pruebas de capacidad antioxidante de reducción del cobre
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EO	Aceite esencial
FC	Prueba de Folin – Ciocalteu
FRAP	Prueba de capacidad para reducir el hierro férrico
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HD	Hidrodestilación
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IC ₅₀ ABTS	Concentración de aceite esencial necesaria para inhibir la oxidación del 50% de los radicales ABTS
IC ₅₀ DPPPH	Concentración de aceite esencial necesaria para inhibir la oxidación del 50% de los radicales DPPH
LC ₅₀	Concentración letal media
ORAC	Prueba de capacidad de absorción de radicales de oxígeno
RSM	Metodología de superficie de respuesta
SD	Destilación por vapor
TAH	Transferencia de átomos de hidrógeno

TE	Transferencia de electrones
TOSC	Prueba de capacidad total de eliminación de oxidantes
US	Ultrasonido

RESUMEN

Clinopodium mexicanum, *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* y *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* son plantas endémicas de México conocidas como toronjil rojo, morado y blanco, respectivamente. Estas plantas son utilizadas con fines ornamentales y/o medicinales en la cultura mexicana. En esta investigación, se utilizó la metodología de superficie de respuesta para optimizar el proceso de extracción del aceite esencial de partes aéreas de *Clinopodium mexicanum*, de hojas de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* y de partes aéreas de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*. Se obtuvieron los aceites esenciales mediante hidrodestilación asistida por ultrasonido, hidrodestilación salina e hidrodestilación asistida por surfactante, respectivamente. Las variables de respuesta evaluadas fueron la masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca y la actividad antioxidante expresada por el valor IC₅₀, determinada por los métodos ABTS y DPPH. Además, se comparó la actividad antioxidante de los aceites esenciales obtenidos con tres antioxidantes sintéticos considerados estándar (BHT, trolox y ácido ascórbico), se analizó la composición química mediante GC-MS (cromatografía de gases – espectrometría de masas) y se evaluó la toxicidad mediante el modelo de *Artemia* salina. Los resultados obtenidos muestran que los aceites esenciales obtenidos presentan una moderada actividad antioxidante, lo que sugiere una potencial aplicación en la industria alimentaria y/o cosmética.

ABSTRACT

Clinopodium mexicanum, *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*, and *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* are endemic plants of Mexico known as red, purple, and white Toronjil, respectively. These plants are used for ornamental and/or medicinal purposes in Mexican culture. In this research, the response surface methodology was used to optimize the extraction process of the essential oil from the aerial parts of *Clinopodium mexicanum*, leaves of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*, and aerial parts of *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*. The essential oils were obtained by ultrasound-assisted hydrodistillation, saline hydrodistillation, and surfactant-assisted

hydrodistillation, respectively. The response variables evaluated were the mass of essential oil obtained per dry raw material mass and the antioxidant activity expressed by the IC₅₀ value, determined by ABTS and DPPH methods. In addition, the antioxidant activity of the obtained essential oils was compared with three synthetic antioxidants considered standards (BHT, trolox, and ascorbic acid), the chemical composition was analyzed by GC-MS (gas chromatography - mass spectrometry), and the toxicity was evaluated using the *Artemia salina* model. The results obtained show that the essential oils obtained have moderate antioxidant activity, suggesting potential application in the food and/or cosmetic industry.

1. INTRODUCCIÓN

Se han encontrado sólidas evidencias de que los antioxidantes artificiales utilizados en la actualidad, como el BHT (butilhidroxitolueno) y el BHA (butilhidroxianisol), pueden tener efectos negativos en la salud. Esto ha llevado a la industria a buscar alternativas más saludables y naturales (Chivandi *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2019; Wongsrangsap & Chukiatsiri, 2021). Los aceites esenciales (EO) han surgido como una opción prometedora, ya que se ha demostrado que poseen propiedades antioxidantes (Giacometti *et al.*, 2018; León-Méndez *et al.*, 2019; Kumari *et al.*, 2019; Ferrentino *et al.*, 2020).

En la actualidad, la demanda de aceites esenciales está en constante crecimiento debido a la necesidad de extraer los valiosos metabolitos secundarios que contienen y fabricar una amplia variedad de productos en todo el mundo. Esta industria genera ingresos anuales que se estiman en miles de millones de dólares, gracias a su amplio espectro de aplicaciones en la industria farmacéutica, la aromaterapia, el cuidado de la salud, la cosmética, la aromatización y conservación de alimentos, así como la perfumería (Calvo-Irabién, 2018). Los aceites esenciales se obtienen principalmente de plantas aromáticas, y países como México, que albergan cerca de 450 especies diferentes de plantas aromáticas, muchas de ellas endémicas, son ricos en recursos para esta industria en crecimiento (Shelepova *et al.*, 2022). Con el debido reconocimiento y atención, este sector productivo tiene un gran potencial para generar divisas significativas en el mercado mundial para los países productores.

Además, el mercado de aceites esenciales sigue en expansión, se proyecta que el mercado global de los aceites esenciales alcance las 403.06 kilotoneladas para el año 2025 (Godlewska *et al.*, 2021) y las características particulares de este sector demandan constantemente nuevos productos y nuevas fuentes de aceites esenciales (Silva-Castellanos *et al.*, 2021; Shelepova *et al.*, 2022). Es preferible que estos sean obtenidos de cultivos de plantas endémicas de la región donde se extraerá el aceite esencial, buscando así la sostenibilidad ambiental y evitando los costos de transporte, al mismo tiempo que se impulsan las economías regionales (Guzmán & Lucía, 2021).

Existen varios métodos para obtener aceites esenciales, entre los más económicos se encuentran aquellos cuyo principio básico es la destilación. No obstante, varios factores afectan el rendimiento, por lo que es necesario optimizarlos con el fin de obtener el máximo rendimiento a un costo mínimo y con la mejor calidad posible.

La presente investigación se desarrolló en varias etapas que se describen en este documento. En primer lugar, se llevó a cabo un estudio del estado del arte, resumido en el Capítulo 2, donde se describen brevemente las características de la materia prima utilizada, los principios básicos de los métodos de obtención de los aceites esenciales y los métodos de medición de la actividad antioxidante utilizados en esta investigación así como las bases teóricas de la metodología de superficie de respuesta.

En el siguiente capítulo (Capítulo 3), se presenta la justificación de la investigación, seguida de la formulación de la hipótesis (Capítulo 4) y los objetivos (Capítulo 5) de dicho estudio.

En el Capítulo 6 se describe la metodología empleada para llevar a cabo esta investigación. Se detallan los pasos y procedimientos utilizados.

En el Capítulo 7 se presentan los resultados obtenidos en los experimentos realizados, así como el análisis y la discusión correspondientes.

Por último, en el Capítulo 8 se exponen las conclusiones obtenidas, seguidas de las recomendaciones (Capítulo 9) para futuros trabajos de investigación.

Finalmente, se proporciona una lista detallada de las referencias bibliográficas utilizadas al final de esta tesis.

2. ANTECEDENTES

2.1. Definición de aceites esenciales

Los aceites esenciales (EO), también conocidos como aceites aromáticos volátiles, son mezclas líquidas y oleosas de sustancias que se evaporan fácilmente. Son compuestos naturales con un aroma intenso que se producen como metabolitos secundarios en diferentes plantas aromáticas. Estos aceites pueden extraerse de diversas partes de las plantas, como las hojas, la cáscara, las flores, las semillas, la corteza y los brotes (Dao *et al.*, 2019; Konfo *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2023).

Los aceites esenciales presentan dos características principales que les confieren beneficios: actividad antioxidante y antimicrobiana, lo que los hace útiles en diversas industrias, incluyendo la farmacéutica, sanitaria, cosmética, agrícola y alimentaria. Además, se ha observado que poseen otras actividades beneficiosas, como propiedades fungicidas y anticancerígenas (Liu *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2023).

Se atribuye principalmente la actividad antioxidante de los aceites esenciales a los compuestos fenólicos que estos contienen, ya que dichos compuestos detienen o retrasan la oxidación aerobia de la materia orgánica aunque algunos compuestos terpenoides también hacen su contribución a dicha característica (Conde-Hernández & Guerrero-Beltrán, 2014). En general, es posible anticipar una buena actividad antioxidante en un aceite esencial que posea una gran cantidad de compuestos fenólicos y una baja concentración de terpenos insaturados (Amiri *et al.*, 2021; Chen, 2023). Aunque es importante aclarar que hasta ahora no ha sido posible explicar completamente las propiedades medicinales de los aceites esenciales a través de sus propiedades antioxidantes (Liu *et al.*, 2023; Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

La actividad antimicrobiana de los EO, que se define como la habilidad del aceite esencial para proteger a los alimentos de agentes patógenos y microorganismos responsables de la putrefacción, se atribuye al grupo hidroxil presente en la estructura de los compuestos fenólicos del aceite esencial, siendo la posición relativa de éste,

crucial para la efectividad de los aceites esenciales; esto último podría explicar la actividad antimicrobiana superior de algunos componentes de los propios aceites esenciales contra otros (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

2.2 Métodos de obtención de los aceites esenciales

A pesar de que la hidrodestilación (HD) y la destilación por arrastre de vapor (SD) son los métodos comúnmente utilizados en la extracción de aceites esenciales a nivel comercial, en los últimos años se han desarrollado una serie de nuevas técnicas para extraer dichos aceites esenciales, por lo que, cuando se planea extraer el aceite esencial de una planta, es necesario definir de manera adecuada el método a usarse ya que cada uno influye en la actividad antioxidante del aceite esencial (Lim *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2023). La elección del método de extracción debe basarse en el estado y forma del material vegetal así como la parte de la planta de la que se va a extraer el aceite ya que una extracción inapropiada podría conducir a la pérdida de la bioactividad del aceite esencial o incluso decoloración y/o pérdida de sabor así como un incremento en la viscosidad (Konfo *et al.*, 2023; Asbahani *et al.*, 2015; Hashemi *et al.*, 2018a).

Los métodos de extracción de aceites esenciales pueden clasificarse, de acuerdo con Asbahani *et al.* (2015), en dos categorías (Tabla 2.1): métodos convencionales o clásicos y métodos avanzados o no convencionales (también llamados emergentes), donde los métodos convencionales son aquellos basados en la destilación con agua, recuperando con calor el aceite esencial de las plantas y los métodos emergentes se caracterizan porque a menudo reducen los tiempos de extracción, el consumo de energía, el uso de solventes y las emisiones de dióxido de carbono. A continuación se presenta una breve descripción de cada uno.

Tabla 2.1. Clasificación de los métodos de extracción de aceites esenciales de acuerdo con Asbahani *et al.* (2015).

Convencionales o clásicos	Técnicas no convencionales o emergentes
<ul style="list-style-type: none"> • Hidrodestilación • Destilación con vapor • Extracción con solventes orgánicos • Prensado en frío 	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción con fluidos supercríticos • Extracción con líquidos subcríticos • Extracción asistida por microondas • Descompresión instantánea controlada • Hidrodestilación asistida por surfactante • Hidrodestilación salina • Extracción asistida por ultrasonido

2.2.1 Métodos tradicionales para extraer aceites esenciales

Hidrodestilación: es el método más simple y común, además se destaca por su bajo costo y amigabilidad con el medio ambiente (Cui *et al.*, 2018). Es recomendado por la tercera edición de la Farmacopea Europea para determinar el rendimiento de los aceites esenciales. A menudo se usa para aislar los productos naturales insolubles en agua con alto punto de ebullición (Asbahani *et al.*, 2015). El proceso consiste en la inmersión total del material vegetal en agua, seguido por la ebullición de dicha mezcla a presión atmosférica. Gracias a la barrera que hace el agua circundante, este método protege el aceite extraído del sobrecalentamiento hasta cierto grado. El vapor de agua y el vapor del aceite esencial son condensados a una fracción acuosa. La duración del proceso suele encontrarse entre dos y seis horas dependiendo de la naturaleza del material vegetal, lo que podría afectar tanto el rendimiento como la composición del EO. Las desventajas que presenta esta técnica son: que pueden presentarse alteraciones químicas en las moléculas como la hidrólisis de compuestos insaturados o ésteres, polimerización de aldehídos o descomposición térmica de algunos compuestos sensibles del EO debido al contacto prolongado con agua ebullendo, también que se pueden perder moléculas polares producto del sobrecalentamiento, además de que los tiempos de extracción son largos. Este método presenta diversas ventajas, entre las cuales se incluyen la destilación del material a temperaturas inferiores a los 100°C, su sencillez tanto en la instalación como en la implementación. Es especialmente recomendado cuando los aceites esenciales de la planta resultan difíciles de aislar y contienen componentes insolubles en agua, termoestables y con un alto punto de

ebullición. Además, esta técnica no requiere el uso de solventes químicos. (Hashemi *et al.*, 2018a). La hidrodestilación es una técnica tradicional ampliamente utilizada en la industria para extraer aceites esenciales (Ngan *et al.*, 2022), pero su proceso puede diferir de aquel utilizado en estudios de investigación, siendo más complejo y especializado. El procedimiento de destilación utilizado en la industria puede diferir del utilizado en estudios de investigación. Por ejemplo, en la industria se pueden emplear procesos de destilación especializados como la destilación extractiva, la destilación con sal o la destilación de ebullición cercana (Tunç & Koca, 2020).

Destilación con vapor: este es otro de los métodos ancestrales usados para la obtención de EO, que además permite obtener aceites esenciales de alta calidad. La destilación con vapor está basada en el mismo principio de la hidrodestilación con la diferencia de que se hace pasar vapor de agua a través del material vegetal que se coloca y sostiene sobre una rejilla perforada sobre el agua en el destilado, teniendo muchas veces como consecuencia una reducción en el tiempo de extracción y una menor pérdida de moléculas polares (Antunes Filho *et al.*, 2023), este método muchas veces es preferido para extraer aceites esenciales debido a su bajo costo, flexibilidad, versatilidad y su capacidad para preservar la integridad del aceite esencial (Lim *et al.*, 2017). En este método, el calor aplicado causa la ruptura de la estructura celular y la liberación de los compuestos aromáticos o aceites esenciales de la planta teniendo como consecuencia el acarreo de dichos compuestos volátiles con el vapor para posteriormente condensar dicha mezcla y entonces separar por decantación el aceite esencial (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Dependiendo de la forma en que es aplicado el vapor al material vegetal, se distingue entre *destilación por arrastre con vapor-DAV* (el vapor es introducido desde la parte inferior) o *hidrodifusión-HDiff* (el vapor es aplicado desde la parte superior de la planta) (Asbahani *et al.*, 2015).

Extracción con solventes orgánicos: Este proceso se utiliza para extraer aceites esenciales sensibles al calor, utilizando solventes como petróleo, acetona, éter, metanol, etanol y hexano. El solvente se mezcla con el material vegetal y luego se calienta para extraer el aceite esencial. Después de la extracción, se filtra la mezcla

líquida que contiene el aceite esencial. El filtrado, que consiste en una combinación de cera, fragancia y aceite esencial, se mezcla luego con alcohol puro para disolver el aceite esencial en él. Al destilar el alcohol a baja temperatura, se obtiene el aceite absoluto (Antunes Filho *et al.*, 2023). A pesar de que la extracción con solventes puede lograr una mayor producción de aceites esenciales, los procesos de concentración de la muestra (mediante la evaporación del solvente) y su posterior disolución son tediosos y pueden resultar en la introducción de impurezas químicas adicionales, como componentes no volátiles presentes simultáneamente y residuos de solvente durante el paso de extracción con solventes (Zhang & Guo, 2020). Así que en ocasiones la seguridad del producto se encuentra comprometida, motivo por el cual no es recomendable usar dichos aceites esenciales en alimentos o productos farmacéuticos (Hashemi *et al.*, 2018a).

Prensado en frío: es el método tradicional usado para extraer aceites esenciales de cítricos. En este método de extracción los sacos oleosos de la materia prima se rompen y los aceites esenciales son liberados. El aceite es removido en forma mecánica por prensado en frío obteniéndose una emulsión acuosa para posteriormente ser recuperado por centrifugación (Asbahani *et al.*, 2015). De acuerdo con Yi *et al.* (2018), la extracción por prensado en frío presenta grandes ventajas como lo son su simplicidad y economía de operación, además de lograrse una extracción de aceites esenciales de alta calidad sin utilizar solventes químicos, aunque su rendimiento muchas veces resulta menor.

2.2.2 Técnicas no convencionales o emergentes para la extracción de aceites esenciales

Una desventaja de la extracción convencional de aceites esenciales es aquella relacionada con la termolabilidad de los componentes de los aceites esenciales ya que muchas veces se observa la alteración química de los compuestos debido a las altas temperaturas a las que son sometidos. Además, los tiempos de extracción en los métodos tradicionales son bastante largos. Es por estas razones que las técnicas no convencionales suelen tener como objetivo la reducción del tiempo de extracción, del

consumo de energía, del uso de solventes y de las emisiones de dióxido de carbono (Asbahani *et al.*, 2015).

Extracción con fluidos supercríticos: el principio de este método se basa en el uso y reciclaje del fluido en pasos repetidos de compresión-descompresión. Al comprimir y aumentar la temperatura, el fluido alcanza el estado supercrítico, momento en el que se hace pasar a través del material vegetal en bruto llevando consigo material volátil y extractos de la planta para posteriormente descomprimir y enviar el extracto a uno o más separadores donde el fluido se descomprime gradualmente (perdiendo así su poder de solvente) para entonces separar el extracto obtenido de dicho fluido (Asbahani *et al.*, 2015). Este método permite llevar a cabo una extracción rápida y eficiente además de minimizar la pérdida de algunos compuestos volátiles, mejorar la baja eficiencia de extracción por otros métodos, disminuir la degradación de compuestos insaturados y eliminar los residuos de solventes tóxicos en el extracto. Se usa principalmente dióxido de carbono como solvente debido a que no es tóxico, ni explosivo y se elimina fácilmente del producto extraído mejorando su calidad en comparación con métodos de extracción que utilizan solventes o agua para extraerlos (Sodeifian *et al.*, 2016). El mayor obstáculo para su desarrollo dentro de la industria es el alto costo de los equipos, así como su instalación, operación y mantenimiento (Asbahani *et al.*, 2015).

Extracción con líquidos subcríticos: se usan principalmente fluidos como el agua y el dióxido de carbono. En el caso del agua, esta se usa a temperaturas entre 100 °C y 374 °C, y presión lo suficientemente alta como para mantener el estado líquido. Esta técnica es también llamada extracción de agua caliente a presión o extracción de agua de baja polaridad a presión. En estas condiciones el agua es mucho menos polar y los compuestos orgánicos son mucho más solubles que a temperatura ambiente lo que facilita su extracción (Zeković *et al.*, 2014). El proceso generalmente se lleva a cabo en cinco pasos que consisten en la preparación de la muestra moliéndola o triturándola para aumentar su superficie de exposición y mejorar la eficiencia de la extracción. Después se lleva el fluido hasta sus condiciones subcríticas para mezclarlo con la muestra y llevar a cabo la extracción de los compuestos solubles en el fluido de

extracción. Para finalmente separar la fase acuosa de los restos de la mezcla y efectuar la purificación del aceite esencial (Asbahani *et al.*, 2015).

Extracción asistida por microondas: este método de extracción utiliza la energía de las microondas para obtener los aceites esenciales de las plantas. En este proceso, el material vegetal se coloca dentro de un extractor junto con un disolvente adecuado, como puede ser el agua o un disolvente orgánico. Luego, se expone a la radiación de microondas, que calienta el material y facilita la extracción de los componentes volátiles. El calor generado por las microondas permite que los compuestos se evaporen más rápidamente, acelerando el proceso de extracción. Este método de extracción ofrece varias ventajas en comparación con otros métodos tradicionales, como la destilación por arrastre de vapor o la extracción con disolventes. Algunas de estas ventajas incluyen tiempos de extracción más cortos, mayor selectividad en la extracción de componentes deseados, menor consumo de energía y mayor eficiencia en la extracción de aceites esenciales. La aplicación de la tecnología de extracción asistida por microondas ha dado lugar a diversas variantes, que incluyen la hidrodestilación asistida por microondas, la extracción sin solventes por microondas, la destilación al vapor acelerada por microondas, la destilación al vapor por microondas, la hidrodifusión y gravedad por microondas y la extracción asistida por microondas portátil (Tongnuanchan & Benjakul, 2014; Asbahani *et al.*, 2015).

Decompresión instantánea controlada: este método consiste en una reducción brusca de la presión al vacío después de someter el material a altas temperaturas y presiones durante un corto período de tiempo. Esto provoca varias autovaporizaciones abruptas que permiten la evaporación de una mayor cantidad de moléculas volátiles en comparación con la autovaporización progresiva. Además, esta técnica permite alcanzar rápidamente niveles más bajos de temperatura. Los aceites esenciales resultantes se recuperan en forma de emulsiones acuosas estables. Una ventaja adicional es que la materia prima de la planta puede recuperarse y secarse a temperatura ambiente para su posterior almacenamiento y uso en extracciones futuras (Asbahani *et al.*, 2015). La ausencia de uso de solventes en este método lo convierte en una opción

respetuosa con el medio ambiente a escala industrial. Además, se destaca por su alta velocidad de operación, selectividad y capacidad de funcionamiento automático (Rashidi *et al.*, 2018).

Hidrodestilación asistida por surfactante: este proceso consiste en añadir polisorbatos como surfactantes y emulsificadores al agua usada en la extracción del EO con el objetivo de formar micelas que de manera simultánea reduzcan la tensión superficial entre la fase acuosa y la superficie hidrófoba de los tejidos vegetales y, por otro lado, entre la fase acuosa y oleosa. Para de esta forma, eliminar la barrera física para la difusión del agua dentro de la célula, ayudando a humedecer el material vegetal y evitando el depósito de aceite sobre la superficie (Charchari & Abdelli, 2014; Tongnuanchan y Benjakul, 2014). Acerca del uso de Tween 20 ($C_{62}H_{122}O_{26}$) como surfactante en la extracción de aceites esenciales, autores como Filly *et al.* (2016) en la extracción de EO de *Lavandula hybrida* L., reportan que la adición de dicho surfactante provocó un aumento en el rendimiento del aceite esencial. Por otro lado, Solanki *et al.*, (2020) reportan que el uso de compuestos anfifílicos no provocaron cambios en la composición del aceite esencial obtenido.

Hidrodestilación salina: este proceso consiste en agregar una sal a la mezcla de extracción. Según Tran *et al.* (2019), esta adición evita la pérdida de aceite esencial en forma de emulsión y reduce la solubilidad de algunos componentes no polares del aceite esencial en el medio acuoso. El cloruro de sodio podría jugar un papel importante como electrolito, aumentando la densidad y polarización del agua, lo que facilitaría la separación del aceite esencial del agua. Además, una concentración adecuada de NaCl provocaría una diferencia de presión osmótica que dificultaría la separación de los aceites esenciales del material.

Diferentes investigaciones han demostrado la eficacia de la hidrodestilación salina. Por ejemplo, Wu, Chen *et al.* (2020) reportaron un aumento en el rendimiento en la extracción de aceite esencial de *Tribute citrus* al utilizar una solución al 3% de NaCl en el agua de destilación. Fu *et al.* (2022) encontraron una fuerte influencia de la concentración de cloruro de sodio en la velocidad de extracción de aceite esencial de

Thuja koraiensis Nakai. Además, Wu, Han *et al.* (2020) lograron casi duplicar el rendimiento de aceite esencial de rosa Kushui (*R. setata* × *R. Rugosa*) usando NaCl en el agua de destilación, mejorando la actividad antioxidante sin cambiar el aroma de dicho aceite esencial. Por su parte, Chen *et al.* (2021) optimizaron el rendimiento del aceite esencial de hojas de romero (*Rosmarinus officinales* L.) utilizando una concentración al 5% de cloruro de sodio en el agua de destilación. Asimismo, Liu *et al.* (2019) extrajeron aceite esencial de *Citrus sinensis* (Gannanzao) y encontraron que a una concentración de 5.3% de NaCl se obtuvo el mejor rendimiento. Tran *et al.* (2019) utilizaron la hidrodestilación salina para extraer aceite esencial de *Pipper nigrum* L., logrando mejorar el rendimiento hasta un 2.45%. Aunque Huzar *et al.* (2018) agregaron NaCl en el agua de destilación al extraer aceite esencial de frutos de *Coriandrum sativum* L., no observaron un cambio en el rendimiento, pero sí un incremento en el contenido de alcanfor del aceite esencial obtenido. Finalmente, Filly *et al.* (2016) utilizaron hidrodestilación salina para obtener aceite esencial de *Lavandula hybrida* L., logrando un aumento en el rendimiento y un mejoramiento en la recuperación de algunos compuestos volátiles de los hidrolatos. Fazlali *et al.* (2015) reportaron que, cuando se agregó NaCl al agua en la extracción de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, disminuyó el tiempo de extracción aunque no la eficiencia.

Técnicas asistidas por ultrasonido (US): en los últimos años ha habido un aumento en el uso del ultrasonido como pretratamiento en combinación con otras técnicas de extracción, como la hidrodestilación o la destilación con solvente, con el fin de acelerar y mejorar la intensidad y selectividad de la extracción del aceite esencial. Este pretratamiento implica sumergir el material vegetal en agua u otro solvente mientras se somete a ondas ultrasónicas, que provocan vibraciones mecánicas en las paredes y membranas de las plantas para aumentar la velocidad de extracción. La extracción se produce a través de la difusión en las paredes celulares y el lavado del contenido celular una vez que las paredes se rompen debido a la formación de burbujas de cavitación en la solución en la que se sumerge el material vegetal (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Este método es relativamente simple y económico en comparación con otros métodos de extracción y es beneficioso para las plantas que son sensibles a la temperatura.

Además, la intensificación de la transferencia de masa, la disrupción celular y la mejora de la penetración de solvente y el efecto capilar son ventajas adicionales (Asbahani *et al.*, 2015).

Algunos estudios han utilizado la hidrodestilación asistida por ultrasonido para extraer aceites esenciales. Por ejemplo, de Li *et al.* (2022) extrajeron el aceite esencial de las cáscaras de *Tribute citrus*, Mollaei *et al.* (2021) extrajeron EO de las flores de *Oliveria decumbens* y encontraron que el tratamiento con ultrasonido antes de la hidrodestilación aumentó el rendimiento del aceite esencial. Además, Balti *et al.* (2018) mejoraron el rendimiento del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* y Solanki *et al.* (2018) mejoraron el rendimiento del aceite esencial de *Cymbopogon winterianus* utilizando esta técnica de pretratamiento.

2.3 Plantas medicinales y aromáticas

Las plantas medicinales son aquellas plantas que contienen sustancias químicas que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial sobre un organismo vivo gracias a su llamado principio activo, dichos principios activos son producto del metabolismo secundario de las plantas. Se les llama plantas aromáticas a aquellas plantas medicinales cuyos principios activos están constituidos total o parcialmente por aceites esenciales. Se sabe que, de las plantas medicinales, aproximadamente el 0.66% son plantas aromáticas. Como se mencionó anteriormente, México es un país rico en plantas aromáticas, a continuación, se presenta una descripción de tres plantas endémicas mexicanas con un gran potencial como fuentes de aceites esenciales.

2.3.1 *Clinopodium mexicanum*

Clinopodium mexicanum (Benth.) Govaerts (Syn. *Gardoquia mexicana* Benth, *Satureja mexicana* (Benth) Brinq.) de la familia *Lamiaceae* es una especie endémica mexicana que se encuentra distribuida en la provincia fisiográfica de la Sierra Madre Oriental en los estados de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, San Luis Potosí y Veracruz. Se trata de un arbusto

aromático cuyo tallo está cubierto de tricomas; tiene hojas ovadas con hojas de margen dentadas o serruladas y márgenes que giran y miden hasta 1 cm. Tiene flores solitarias en las axilas de las hojas superiores con un cáliz con forma de tubo que mide hasta 6 mm de largo, 13 venas evidentes, un anillo de pelo en su interior y un ápice dividido en cinco. La corola es de color rojo o naranja con forma tubular ligeramente arqueada y mide de 2.2 a 3.4 cm de longitud, esta corola se extiende hacia el ápice y se divide en dos labios; el labio superior está erecto y el labio inferior está dividido en tres lóbulos. Tiene cuatro estambres, dos de los cuales son más largos. Es conocida como poleo, poleo verde, toronjil de menta, toronjil rojo o toronjil de monte (Figura 2.1). *Clinopodium mexicanum* es considerada una especie de alto valor biocultural, y su recolección y almacenamiento es común en las áreas donde crece en forma silvestre, no está incluida en el Listado de plantas mexicanas en riesgo (NOM-059-SEMARNAT-2010) y su manejo es rudimentario (SEMARNAT, 2010; Alvarado *et al.*, 2020; Silva Castellanos *et al.*, 2021).

A *Clinopodium mexicanum* se le atribuyen propiedades tranquilizantes por lo que la población suele consumirla en preparaciones acuosas como remedio para dolencias nerviosas, inducir el sueño y como agente sedante y analgésico, también es usado para aliviar dolores de muelas, problemas digestivos y gastrointestinales y dolencias reproductivas femeninas. Asimismo, se usa en la preparación de aperitivos y bebidas digestivas debido a su agradable sabor (Estrada-Reyes *et al.*, 2014; Alvarado *et al.*, 2020; Silva Castellanos *et al.*, 2021).



Figura 2.1. *Clinopodium mexicanum*. Fuente: Biol. Lucio Caamaño Onofre.

A pesar del uso intensivo de *Clinopodium mexicanum* en la medicina tradicional mexicana y que estudios fitoquímicos arrojan la presencia de flavonoides libres y glicósidos, existe poca información acerca de su actividad biológica o de la composición de las partes aéreas de dicha planta y ninguna de su aceite esencial y/o de su actividad antioxidante, incluso esta planta no es mencionada en la farmacopea mexicana de hierbas (Estrada-Reyes *et al.*, 2014; Silva Castellanos *et al.*, 2021)

Acerca del extracto acuoso de *Clinopodium mexicanum* existen distintos reportes: referente al análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución, Alvarado *et al.* (2020) reportan la presencia de once metabolitos del tipo flavonoide del que solo se aislaron e identificaron estructuralmente cinco de ellos (8-hidroxi-salvigenina, 5-demetoxibicilina, neoponcirina, naringenina y hesperidina). Se reporta también, con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas, la presencia de glucósidos de flavanona (poncirina, isonaringina y neoponcirina) identificándose las flavonas 8-hidroxi-salvigenina y gardenina B, así como las flavononas naringenina y 4-O-metilnaringenina. Tepe & Cilkiz, (2016) reportan también haber aislado los compuestos neoponcirina, poncirina, isonaringenina, hesperidina, 8-hidroxisalvigenina, naringenina, b-sitosterol, ácido ursólico y daucosterol. Acerca de neoponciria, se sabe que es una sustancia con efectos sedantes,

anticonvulsivos, ansiolíticos similares al Diazepam, y antinociceptivos mayores que el ibuprofeno, similares al ketorolaco (Silva Castellanos *et al.*, 2021).

Se ha informado también que el extracto acuoso de *Clinopodium mexicanum* presenta cierta toxicidad. En estudios con ratones, se observó que la dosis letal media (LD₅₀) fue de 2154 mg/kg, y dosis superiores a 1600 mg/kg causaron efectos adversos, llegando a provocar la muerte de los ratones a una concentración de 2900 mg/kg. Se han investigado además otras propiedades y se ha encontrado que el extracto acuoso de *Clinopodium mexicanum* posee actividad anticonvulsivante, además se ha utilizado en estudios preclínicos para tratar trastornos relacionados con la ansiedad y la depresión. Se ha observado que este extracto tiene un efecto depresor en el sistema nervioso central, ya que prolonga el tiempo de sueño inducido por el pentobarbital sódico. También se ha evaluado su efecto analgésico utilizando el modelo de dolor agudo de placa caliente, mostrando un efecto antinociceptivo en animales de prueba. Se ha sugerido que esta actividad farmacológica podría estar relacionada con dos compuestos presentes en dicho extracto, la hesperidina y la neoponcirina, que han demostrado tener propiedades analgésicas (Alvarado *et al.*, 2020).

2.3.2 *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*

El género *Agastache* pertenece a la subfamilia de *Lamiaceae*, subfamilia *Nepetoideae* que consta de unas 22 especies distribuidas en Asia y América del Norte; en México, 12 de ellas son endémicas. Este género produce varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, principalmente fenilpropanoides y terpenoides. Hay dos subespecies de *Agastache mexicana*: *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* y *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*, estas difieren en el tamaño, la forma de las hojas, las inflorescencias, así como en su composición química. En comparación con otras especies de *Agastache* y/o miembros de la familia *Lamiaceae*, las inflorescencias de *Agastache mexicana* tienen un mayor contenido de polifenoles y flavonoides, así como mayores propiedades antioxidantes. Los resultados de la investigación sobre los efectos medicinales de *A. mexicana* subsp. *mexicana* y subsp. *xolocotziana* apoyan su

uso en la medicina tradicional para aliviar trastornos gastrointestinales, dolor de estómago, asma, ansiedad e insomnio (Figura 2.2) (Palma-Tenango *et al.*, 2021).



Figura 2.2. *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*. Fuente: propia.

Agastache mexicana subsp. *mexicana* Linton & Epling es comúnmente llamada toronjil rojo o toronjil morado. A pesar de que esta planta crece en el eje volcánico del centro de México (Guanajuato, Michoacán, Puebla, Querétaro, Hidalgo, Veracruz, Chihuahua, Morelos, Tlaxcala y Ciudad de México) se conoce y utiliza más allá de su rango geográfico natural; se cultiva bajo siembra y se comercializan los manojos de inflorescencias o plantas secas a través del territorio nacional e incluso de forma internacional. De acuerdo con Palma-Tenango *et al.* (2021), esta especie es candidata para el cultivo estructurado como fuente de principios activos, extractos, aceites esenciales y productos farmacéuticos. El típico toronjil rojo presenta un olor a anís y florece de junio a noviembre. Su tallo es erecto, ramificado y de cuatro ángulos; la parte basal y media de este es de color púrpura y la forma de sus hojas es ovado-lanceolada con medidas entre 4.4 a 6.3 cm de largo y de 2.1 a 2.5 cm de ancho. El pecíolo mide 1 cm de largo y la corola es de color rojo púrpura a rojo (Figura 2.2). La medicina tradicional mexicana ha utilizado *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* para tratar diversos padecimientos como el susto, dolor de estómago, exceso de bilis, tos, vómito, escalofríos y ansiedad. Los resultados de la investigación científica respaldan su uso

medicinal como ansiolítico, tranquilizante y sedante, además de ser efectivo en el alivio del “nerviosismo” (Carrillo Galván *et al.*, 2020; Palma-Tenango *et al.*, 2021).

Diferentes investigaciones realizadas acerca de esta planta reportan la actividad vasoactiva y antioxidante del extracto. Acerca del extracto metanólico también se ha reportado un efecto ansiolítico. En cuanto al extracto hidrosoluble, este se probó en ratones en los que se observó que en dosis bajas tuvo un efecto ansiogénico y ansiolítico y en dosis altas un efecto sedante. Acerca de la tilianina extraída de esta planta, se han reportado efectos antihipertensivos y vasorelajantes *in vitro* (Palma-Tenango *et al.*, 2021). También, en ratas macho, se observó la actividad antihipertensiva del extracto de diclorometano de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*, así como de su compuesto aislado, el ácido ursólico (Michel *et al.*, 2020). Con respecto a su aceite esencial, Navarrete *et al.* (2016) observaron que este provocó la relajación del tejido traqueal de cuyos.

Aunque se afirma que los métodos de extracción influyen en la variabilidad de las características físicas y químicas de los aceites esenciales, de acuerdo con Palma-Tenango *et al.* (2021), los diferentes aparatos de destilación no parecen afectar la calidad del aceite esencial de *A. mexicana* subsp. *mexicana*. Algunos reportes sobre la composición química de este aceite esencial (Zielińska & Matkowski, 2014; Navarrete *et al.*, 2016; Najjar *et al.*, 2019; Carrillo-Galván *et al.*, 2020) llevan a concluir que dicha composición se ha visto influenciada por las condiciones ambientales del cultivo y el tiempo de cosecha lo que hace difícil establecer un perfil químico definido. Los compuestos comúnmente reportados son el estragol y limoneno (Carrillo Galván *et al.*, 2020; Palma-Tenango *et al.*, 2021).

2.3.2 *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*

Agastache mexicana subsp. *xolocotziana* Bye, Linares & Ramamoorthy, tiene olor y sabor a mentolado, corola blanca con tricomas en su labio inferior, hojas verde oliva lanceoladas y margen crenado además de un rizoma robusto (Figura 2.3); esta subespecie solo se encuentra en un estado cultivado en el centro de México. La

ausencia de poblaciones silvestres con flores blancas, polen y frutos estériles y la reproducción vegetativa a través de los rizomas sugieren que este taxón puede ser producto de la hibridación entre *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* y *Agastache palmeri* (Carrillo-Galván *et al.*, 2020).

Se ha reportado que *Agastache mexicana* contiene compuestos terpenoides como monoterpenos (limoneno, pulegona), sesquiterpenos (β -cariofileno), diterpenos (breviflorina), triterpenos (ácidos ursólico, corosólico, maslínico); compuestos fenólicos y fenilpropanoides como flavonas (acacetina) y flavonoides (tilianina, hesperitina); ácidos carboxílicos (ácido 9-hexadecenoico, ácido butanoico); y azúcares solubles (glucosa, sacarosa) y aunque las subespecies *mexicana* y *xolocotziana* comparten compuestos comunes, estas presentan perfiles químicos distintos (Palma-Tenango *et al.*, 2021).

Agastache mexicana subsp. *xolocotziana* se conoce en la medicina tradicional mexicana como “toronjil blanco” y se usa junto con *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* (Kunth) Lint & Epling en infusiones para tratar dolores gastrointestinales, cardiovasculares, menstruales y nerviosos; también se utilizan para combatir el insomnio, como sedante y en el tratamiento de dolencias de filiación cultural como el “susto” o el “espanto”. En particular, *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* se utiliza para tratar enfermedades del corazón y debido a sus propiedades terapéuticas es comercializada internacionalmente (Zielinska & Matkowski, 2014; Najjar *et al.*, 2019; Palma-Tenango *et al.*, 2021).

Acerca de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*, existen estudios fitoquímicos y farmacológicos recientes que se correlacionan con sus usos etnomedicinales; se ha informado del efecto espasmolítico, analgésico y antiinflamatorio del extracto orgánico, así como la observación de que *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* provocó la contracción de la aorta, la vejiga, el corazón y los músculos intestinales y uterinos en experimentos con ranas. Se ha reportado también que los extractos orgánicos de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* contienen acacetina y ácido ursólico que

produjeron efectos ansiolíticos, espasmolíticos y antinociceptivos en experimentos *in vitro* e *in vivo* en ratones (Palma-Tenango *et al.*, 2021).



Figura 2.3. *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*. Fuente: propia.

Acerca de su aceite esencial se ha reportado que posee 38 compuestos siendo los más abundantes estragol y metil eugenol. Respecto de la actividad antioxidante de su aceite esencial no existen reportes a pesar de que se considera que este posee un gran valor económico e interés científico (Estrada-Reyes *et al.*, 2014; Juárez *et al.*, 2015).

2.4 Optimización de condiciones de proceso mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM)

El término optimizar se refiere a mejorar el funcionamiento de un sistema, un proceso o un producto con el objetivo de obtener el máximo beneficio de este; la optimización de las condiciones de proceso es una de las fases más críticas en el desarrollo de un bioproceso eficiente y económico (Kasemiire *et al.*, 2021). Con respecto a la extracción de aceites esenciales, una vez que se ha elegido el método de extracción apropiado a la materia prima, los parámetros adecuados (temperatura, presión, tiempo de extracción, cantidad de producto, tamaño de partícula de la materia prima, etc.) deben determinarse para obtener el máximo rendimiento con la mejor calidad puesto que dicho rendimiento suele estar por debajo del 1%. Para lograrlo, se requiere de una herramienta matemática poderosa, de acuerdo con Montgomery (2006) el método de superficie de respuesta

(RSM) puede ser el adecuado, ya que se 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, además de optimizar la respuesta, 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. Esta metodología comprende tres pasos, incluido el diseño experimental que utiliza diseños experimentales estadísticos bien establecidos; modelado de superficie de respuesta usando análisis de regresión; y optimización del proceso a través de los modelos de superficie de respuesta. En comparación con otros métodos (como la experimentación de factor uno a la vez y factores completos) la RSM resulta ser un método más rápido y económico para recopilar resultados de investigación (Myers *et al.*, 2016; Medina *et al.*, 2021).

El método de optimización de superficie de respuesta parece ser bastante usado en los últimos años, quizás debido a que se trata de un método económico y que muchas aplicaciones de esta metodología involucran el ajuste y la verificación de la idoneidad de un modelo de segundo orden. De acuerdo con Medina *et al.* (2021), los principales diseños de experimentos utilizados suelen ser el diseño central compuesto (CCD), el diseño factorial y el diseño de Box-Behnken (BBD).

El diseño central compuesto (CCD) evoluciona a partir de su uso en la experimentación secuencial. Implica el uso de un diseño factorial completo o fraccionado de dos niveles (resolución V) combinado con los siguientes puntos axiales o de estrella de 2^k , de tal forma que un diseño de dos factores consiste de cuatro corridas que corresponden a los vértices de un cuadrado (representan un diseño de variación óptima para un modelo de primer orden o un modelo de interacción de primer orden más dos factores) más cuatro corridas en el centro de dicho cuadrado (proporcionan información clara sobre la existencia de curvatura en el sistema), más cuatro corridas que corresponden a puntos axiales del cuadrado (permiten una estimación eficiente de los términos cuadráticos puros en caso de que se encuentre curvatura en el sistema. Este diseño resulta muy

eficiente en situaciones que requieren un experimento de superficie de respuesta de lotes no secuencial (Myers *et al.*, 2016).

Una variante del CCD es el diseño compuesto central centrado en las caras (CCF), este tipo de diseño de experimentos se usa cuando la región de interés y la región de operabilidad del fenómeno a estudiar tiene forma cuadrada, cúbica o hipercúbica, estableciéndose así la distancia axial con un valor de 1, lo que significa situar los puntos axiales en los centros de las caras de un cubo, se suele emplear esta variante debido a que requiere solo tres niveles de cada factor, sin embargo este tipo de diseños presenta la característica de no ser rotable lo que se considera una seria desventaja puesto que limita la capacidad de explorar y evaluar de manera eficiente el espacio de diseño. Esto es, que no se pueden intercambiar ni rotar los puntos experimentales sin afectar la capacidad de ajustar y estimar adecuadamente los efectos de las variables independientes.

El diseño Box-Behnken consiste en la selección de puntos de un arreglo factorial de tres niveles que permite la estimación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden de un modelo matemático; en este diseño, los puntos experimentales se localizan en una hiperesfera equidistante del punto central por lo que se requiere que todos los niveles de los factores se ajusten a tres niveles con intervalos espaciados de manera equidistante. Debido a su capacidad para simplificar la ejecución de experimentos, reducir el número de experimentos requeridos y evitar condiciones extremas que puedan conducir a resultados insatisfactorios, de los tres diseños mencionados, el diseño de Box-Behnken es considerado el diseño más económico y eficiente (Yu & He, 2017).

Una revisión exhaustiva de publicaciones del tipo JCR del año 2014 a 2022, arroja que la optimización del proceso de extracción de aceites esenciales mediante RSM ha sido utilizadas en varias ocasiones, algunas de estas orientadas hacia procesos de extracción tradicionales como la hidrodestilación y técnicas emergentes como lo son la hidrodestilación asistida por ultrasonido, la hidrodestilación salina, etc. dichas publicaciones se han resumido en la Tabla 2.2. Como puede observarse en esta tabla,

solo se encontraron dos publicaciones del tipo JCR orientadas hacia la optimización en la extracción de EO mediante hidrodestilación (Yingngam & Brantner, 2015; Cui *et al.*, 2018). Estas dos publicaciones coincidieron en la variable de respuesta rendimiento y los factores: tiempo de extracción y relación sólido – líquido. En la extracción de aceite esencial de *Fagraea fragrans* (Yingngam & Brantner, 2015) se usó un diseño central compuesto y en la extracción de aceite esencial de *Carex meyeriana* Kunth se utilizó un diseño Box-Behnken.

Yingngam & Brantner, (2015) reportaron además de las condiciones óptimas, la actividad antioxidante, efectos citotóxicos y propiedades aromáticas del aceite esencial de *Fagraea fragrans* y Cui *et al.* (2018) reportaron también la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de *Carex meyeriana* Kunth. Respecto a la hidrodestilación asistida por ultrasonido, se observa que se usa de manera más frecuente el diseño Box-Behnken, la variable de respuesta más común es, de nuevo el rendimiento; los parámetros más comunes a optimizar fueron el tiempo, la potencia de sonicación y la temperatura de extracción. Cabe mencionar que Li *et al.* (2022) utilizaron sales en la extracción de EO de *Tribute citrus*. En las extracciones de aceite esencial de *Pistacia lentiscus* (Belhachat *et al.*, 2018), *Cymbopogon winterianus* (Solanki *et al.*, 2018) e *Iberis amara* (Liu *et al.*, 2019), también se reportó la actividad antioxidante del aceite esencial obtenido. Con respecto a la hidrodestilación salina, de 2014 a la fecha solo existe una publicación dedicada a la optimización de dicho método de extracción (Fu *et al.*, 2022), dicha publicación se orienta a la optimización del rendimiento de EO analizando los factores tiempo de destilación, relación material – líquido y concentración de cloruro de sodio. También reportan la composición química del aceite esencial y su actividad antibacteriana.

Tabla 2.2. Publicaciones seleccionadas acerca de optimización a través de RSM mediante métodos de extracción por hidrodestilación, hidrodestilación salina e hidrodestilación asistida por ultrasonido.

Planta (nombre científico)	Método de extracción	Diseño de experimentos	Parámetros de optimización (niveles)	Respuesta optimizada	Otros análisis	Fuente
<i>Carex meyeriana</i> Kunth	HD	BBD	Tiempo de extracción (7-11 h) Relación material-líquido (30-50 mL/g) Tamaño de partícula (malla 0, 10, 20)	Rendimiento de EO (0.13%, w/w)	Composición química, actividad antibacteriana actividad antioxidante.	Cui <i>et al.</i> (2018)
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	US-HD	CCD	Tiempo (10 – 30 min) Potencia (70 – 250 W) Temperatura (30 – 50 °C)	Rendimiento de EO (3.093 g/materia seca)	Composición química.	Balti <i>et al.</i> (2018)
<i>Cymbopogon winterianus</i>	US-HD	CCD	Tiempo de extracción (5 – 21 min) Carga sólida (5 – 21 g) Amplitud de US (30 – 70 %) Intervalo de pulso (20:40 – 40:20 s)	Rendimiento de EO (4.118% w/w)	Composición química, microscopía electrónica de barrido, actividad antioxidante, conservación de energía.	Solanki, <i>et al.</i> (2018)
<i>Fagraea fragrans</i> Roxb	HD	CCD	Relación flor-agua (2.34-13.66 mL/100g) Tiempo de destilación (95.2-264.8 min)	Rendimiento de EO (0.35 %, v/w)	Composición química, actividad antioxidante, análisis de citotoxicidad evaluación olfativa.	Yingngam & Brantner (2015)
<i>Iberis amara</i>	US-HD	BBD	Tiempo de extracción (120-240 min) Potencia US (30-90 W) Relación solvente-muestra (5-7 mL/g)	Rendimiento de EO (0.42 %)	Composición química, microscopía electrónica de barrido, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, actividad citotóxica, actividad antibacteriana, actividad antialimentaria.	Liu <i>et al.</i> (2019)
<i>Oliveria decumbens</i>	US-HD	BBD	Temperatura US (25-55°C) Tiempo US (10-30 min) Potencia US (50-250W)	Rendimiento de EO (5.87%)	Microscopia electronica de barrido, citotoxicidad, actividad insecticida.	Mollaei <i>et al.</i> (2021)
<i>Paeonia lactiflora</i> Pall	US-HD	BBD	Tiempo US (10 – 20 min) Temperatura US (25 – 35 °C) Potencia US (300 – 500 W)	Rendimiento de EO (28.85%)	Análisis de composición de ácidos grasos, propiedades físicoquímicas, identificación de la estructura de glicósidos monoterpenos aislados.	Liu <i>et al.</i> (2017)
<i>Pistacia lentiscus</i>	US-HD	BBD	Tiempo de extracción (30 – 90 min) Potencia US (20 – 60 W) Relación material vegetal -agua (1/4 – 1/12 g/mL)	Rendimiento de EO (0.66 ± 0.03%)	Actividad antioxidante.	Belhachat <i>et al.</i> (2018)

Tabla 2.2. Continuación...

<i>Thuja koraiensis</i> Nakai	HD-salina	CCF	Tiempo de destilación (1 – 3h) Relación material – líquido (50g/350mL – 50g/450 mL) Concentración de NaCl (4.0 – 8.0%)	Rendimiento de EO (1.1712%)	Composición química, actividad antibacteriana.	Fu <i>et al.</i> (2022)
<i>Tribute citrus</i>	US-HD	BBD	Relación solvente-sólido (18-22 mL/g) Tiempo de US (15-25 min) Tiempo de extracción (30-90 min) Concentración de NaCl (1-2%)	Rendimiento de EO (114.02 mg/g)		Li <i>et al.</i> (2022)

Diseño Box-Behnken (BBD), diseño central compuesto centrado en las caras (CCF), diseño central compuesto (CCD), hidrodestilación (HD), ultrasonido (US)

En la optimización de la obtención de aceites esenciales se utilizan con frecuencia tanto el diseño Box-Behnken (BBD) como el diseño central compuesto (CCD), mientras que el diseño central compuesto centrado en las caras (CCF) se utiliza mucho menos (Figura 2.4). En cuanto al número de parámetros a optimizar (Figura 2.5), se observa que lo más común es optimizar tres parámetros, aunque el tipo de parámetros a optimizar depende en gran medida del tipo de extracción utilizado, siendo el tiempo de extracción un parámetro común debido a su relación directa con la eficiencia del proceso. Además, en algunas publicaciones recientes se ha sumado la variable de respuesta de la concentración de algún compuesto químico de interés y/o la actividad antioxidante del aceite esencial a la variable de respuesta del rendimiento (Figura 2.6).

Todo lo anterior refleja que, en la actualidad, no solo es deseable obtener un alto rendimiento del aceite esencial, sino también obtener un aceite esencial de calidad con las características requeridas para su aplicación específica.

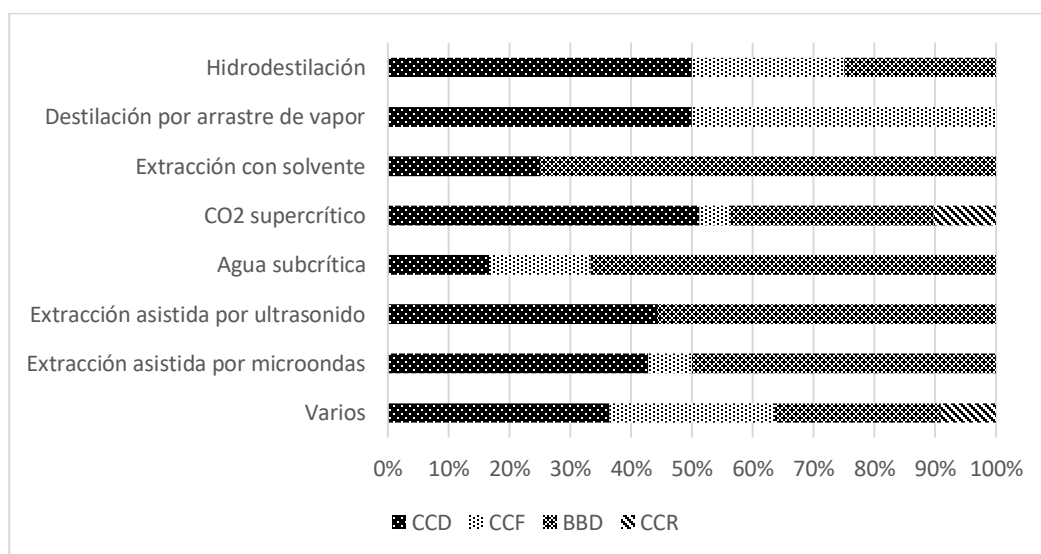


Figura 2.4. Tipo de diseño de experimentos de acuerdo al método de obtención de EO utilizado. Fuente: Conde-Hernández *et al.*, 2021.

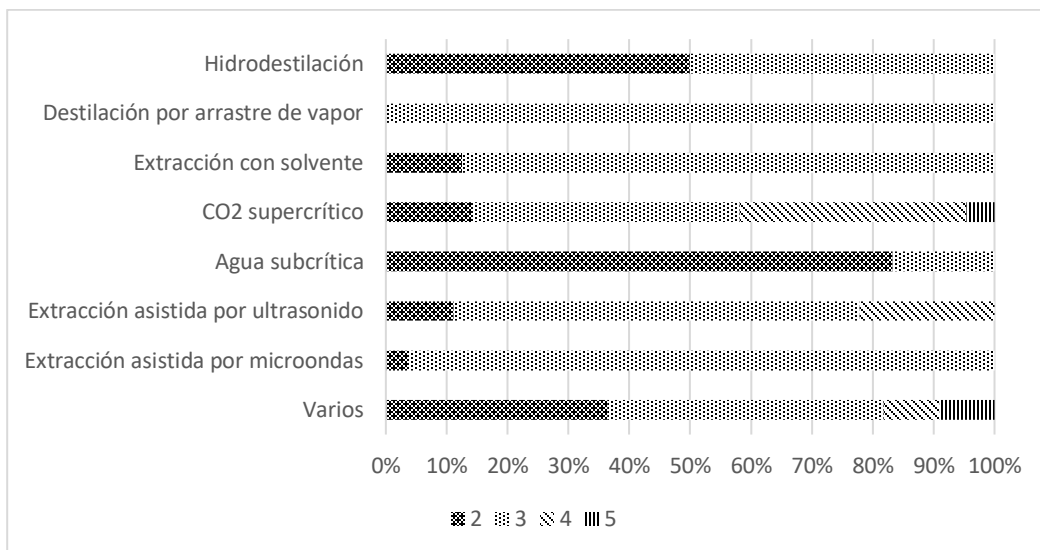


Figura 2.5. Número de factores optimizados mediante RSM de acuerdo al método de obtención de EO utilizado. Fuente: Conde-Hernández *et al.*, 2021.

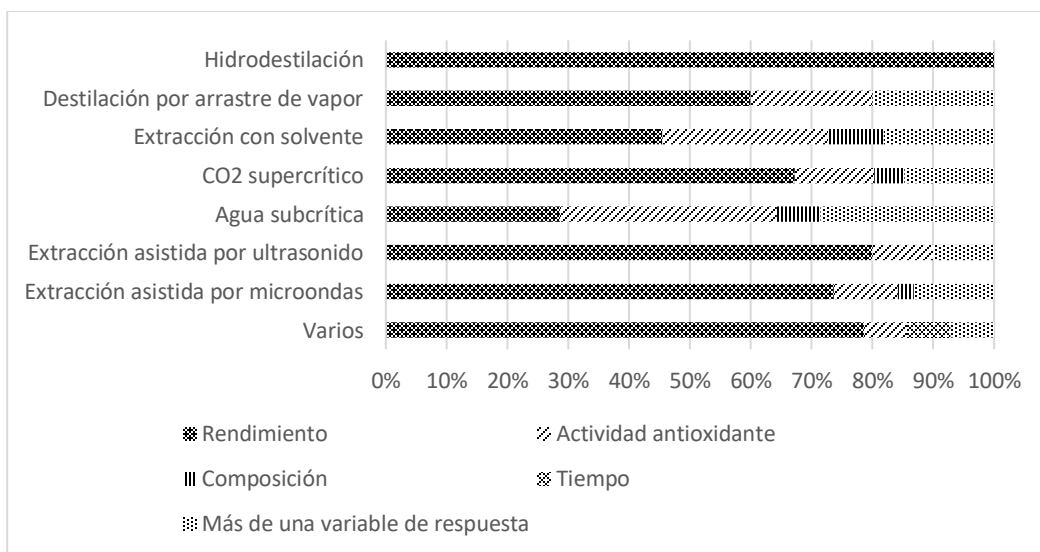


Figura 2.6. Frecuencia de la variable de respuesta a optimizar mediante RSM. Fuente: Conde-Hernández *et al.*, 2021.

2.5 Métodos de medición de actividad antioxidante de los aceites esenciales

El procedimiento de destilación utilizado para obtener el aceite esencial puede limitar el contenido de compuestos fenólicos en el producto final. Esto se debe a que algunos de estos compuestos no son volátiles y, por lo tanto, no se evaporan durante la

destilación. Además, muchos compuestos fenólicos son hidrosolubles, lo que significa que tienen una alta afinidad por el agua y tienden a disolverse en el hidrolato, que es el subproducto acuoso obtenido después de la extracción. Como resultado, estos compuestos pueden perderse durante el proceso de destilación y no estar presentes en concentraciones significativas en el aceite esencial final. Estas pérdidas de compuestos fenólicos hidrosolubles pueden afectar la actividad antioxidante y otras propiedades biológicas del aceite esencial obtenido (Calvo-Irabien, 2018; Hashemi *et al.*, 2018b; Gaspar-Pintilieșcu *et al.*, 2022).

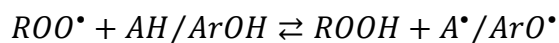
La actividad antioxidante se refiere a la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, desacelerándola o incluso retardándola. Un antioxidante actúa gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres y se le llama antioxidante terminador de cadena. Algunos compuestos fenólicos, como aquellos presentes en los aceites esenciales, presentan alta reactividad frente a radicales libres pero moderada actividad antioxidante debido a la alta reactividad de los compuestos derivados formados después de la estabilización de los radicales libres (Calvo-Irabien, 2018).

La capacidad antioxidante total de una muestra no puede determinarse con un solo método de medición, ya que este debería reflejar la capacidad de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, diferenciar los diferentes mecanismos antioxidantes y evaluar la reactividad del antioxidante frente a diversas especies reactivas. Los métodos de evaluación de la actividad antioxidante deben ser rápidos, reproducibles y requerir pequeñas cantidades de los compuestos químicos a analizar, además de no verse influenciados por las propiedades físicas de dichos (Munteanu & Apetrei, 2021).

Según Munteanu & Apetrei (2021), de acuerdo con las reacciones químicas involucradas, los métodos para medir la actividad antioxidante se dividen en dos grupos principales: el primer grupo se basa en reacciones de Transferencia de un solo Electrón (TE), mientras que el segundo grupo se basa en reacciones de Transferencia de Átomos de Hidrógeno (TAH). Aunque ambos grupos tienen como objetivo la inactivación de los radicales libres, difieren en su cinética y las reacciones secundarias involucradas. Las pruebas químicas que miden la capacidad antioxidante se utilizan principalmente

en el análisis inicial y evaluación de nuevos compuestos antioxidantes o extractos de productos finales o subproductos.

Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno: estos métodos evalúan la capacidad de un compuesto antioxidante para eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), mediante la donación de átomos de hidrógeno. En estos ensayos, el átomo de hidrógeno (H) de un compuesto fenólico (ArOH) se transfiere a un radical peroxilo; el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) se estabiliza mediante resonancia, en la siguiente reacción, AH representa las biomoléculas protegidas en la siguiente reacción.



Se espera que el antioxidante fenólico reaccione más rápidamente que las biomoléculas frente a los radicales libres para considerar que su acción es protectora contra la oxidación. Entre los ensayos basados en TAH se encuentran el ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), el ensayo TRAP (Total Radical–Trapping Antioxidant Parameter) y el ensayo TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity).

Métodos basados en la transferencia de un solo electrón: estos métodos se utilizan para detectar la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir iones metálicos, grupos carbonilo y radicales libres. Describen reacciones más lentas que las TAH y dependen del pH. En estas pruebas, la acción antioxidante se simula a menudo utilizando una muestra fluorescente o coloreada adecuada en lugar de radicales peroxilo. El método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) sigue un mecanismo típicamente TE lo mismo que el ensayo de Folin Ciocalteu (FC), y las pruebas de CUPRAC (Cupric Antioxidant Capacity).

Métodos que combinan TAH y TE: se basan en la estabilización de radicales libres sintéticos estables y cromóforos. Dado que los radicales pueden ser estabilizados tanto por mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) como por transferencia de electrones (TE), la interpretación de los patrones de reactividad y el

mecanismo subyacente resulta complicada cuando no se conoce la estructura química del antioxidante evaluado. Los métodos ABTS y DPPH son ejemplos de estos enfoques (Munteanu & Apetrei, 2021).

MÉTODO ABTS: Los ensayos ABTS/TEAC utilizan el radical catión $ABTS^{\bullet+}$ como sonda colorimétrica para medir la capacidad antioxidante de compuestos. Los antioxidantes aceptan átomos de hidrógeno o electrones del radical $ABTS^{\bullet+}$, lo que resulta en la disminución de su color. El ensayo puede seguir dos estrategias: tiempo de retardo y tiempo fijo. En el tiempo de retardo, se retarda la formación del radical $ABTS^{\bullet+}$ mediante antioxidantes, mientras que en el tiempo fijo se genera primero un radical estable y luego se mide su decoloración después de agregar antioxidantes. El TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) se calcula comparando la capacidad de eliminación de $ABTS^{\bullet+}$ de un compuesto de prueba con la de Trolox, un compuesto de referencia. El TEAC es adimensional y refleja la proporción de la capacidad de eliminación de $ABTS^{\bullet+}$ de los compuestos de prueba en comparación con la de Trolox.

El ensayo ABTS/TEAC es ampliamente utilizado en el cribado de antioxidantes en alimentos y fluidos biológicos debido a su simplicidad, rapidez y versatilidad. Sin embargo, ha recibido críticas debido a que el $ABTS^{\bullet+}$ puede no representar las reacciones de radicales que ocurren en sistemas biológicos, y la accesibilidad estérica de los antioxidantes puede afectar los resultados. Además, el $ABTS^{\bullet+}$ no selecciona específicamente grupos fenólicos (Apak *et al.*, 2016).

MÉTODO DPPH: El ensayo DPPH es ampliamente utilizado en laboratorios convencionales debido a su bajo costo y simplicidad. En este método, los cristales de DPPH se disuelven en etanol o metanol para obtener una absorbancia inicial. Luego, se agrega una cantidad de antioxidante a la solución, se incuba durante 30 minutos y se registra la absorbancia final. La solución inicialmente púrpura se vuelve amarilla debido a la reducción del $DPPH^{\bullet}$ a DPPH mediante la abstracción de átomos de hidrógeno por parte de los antioxidantes. La capacidad antioxidante se suele expresar como IC_{50} , que es la concentración de antioxidante necesaria para reducir la absorbancia inicial de $DPPH^{\bullet}$ en un 50%, o como la concentración de equivalente de

Trolox (TE), que se compara con la decoloración proporcionada por el compuesto de referencia.

El ensayo DPPH• ha sido objeto de críticas y se han proporcionado recomendaciones para investigaciones adicionales. Estas críticas se centran en que el DPPH• es un radical de larga duración, lo cual dificulta modelar la actividad antioxidante *in vivo* utilizando ensayos de DPPH *in vitro*, ya que la mayoría de los antioxidantes fisiológicos actúan contra especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, la accesibilidad estérica al sitio radical del DPPH• puede ser más determinante de la velocidad de reacción que las características estructurales químicas de los antioxidantes. También se ha observado que existe una dependencia fuerte del solvente y del pH en las reacciones del DPPH• en modo mixto (transferencia de átomos de hidrógeno y transferencia electrónica) y algunos antioxidantes reaccionan rápidamente, otros de manera intermedia y otros lentamente en el sistema. Por lo que, para obtener resultados confiables, es necesario realizar el ensayo en un rango completo de concentraciones de antioxidantes. Finalmente, la interpretación de la disminución de la absorbancia del DPPH• debe realizarse cuidadosamente, ya que otros factores como el pH, el oxígeno, la luz y el tipo de solvente pueden afectarla también se debe tomar en cuenta que los ensayos de tiempo fijo pueden subestimar las actividades de eliminación de radicales de los antioxidantes que tienen una reacción más lenta (Apak *et al.*, 2016).

2.6 Composición química de los aceites esenciales

La mayoría de las plantas aromáticas contienen entre un 1% y un 2% de aceites esenciales, que se caracterizan por tener hasta tres compuestos principales presentes en concentraciones relativamente altas en comparación con otros compuestos presentes en cantidades mínimas. Los aceites esenciales forman una amplia familia de sustancias con perfiles químicos únicos definidos por sus componentes individuales. Los principales componentes de los aceites esenciales son terpenoides lipofílicos, fenilpropanoides y derivados de hidrocarburos alifáticos de cadena corta (Godlewska *et al.*, 2021; Guzmán & Lucia, 2021). Las propiedades biológicas de los aceites esenciales pueden ser el resultado de la sinergia o el antagonismo entre los

componentes, y pueden atribuirse tanto a los componentes principales como a los secundarios. La proporción en la que se encuentran estas sustancias en los aceites esenciales se ve influida por diversos factores, como la ubicación geográfica, las condiciones climáticas, el tipo de suelo y los fertilizantes utilizados durante el cultivo de las plantas, así como la edad de la planta, la hora del día o la temporada en la que se cosechó (Asbahani *et al.*, 2015; Sadgrove & Jones, 2015; Božovic *et al.*, 2017).

En general, los aceites esenciales están compuestos principalmente por terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos) y compuestos oxigenados (aldehídos, alcoholes, fenoles, derivados de metoxi, etc.), mientras que el resto de los compuestos aromáticos suelen ser de bajo peso molecular (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

Es importante conocer la composición química de los aceites esenciales, ya que esto nos proporciona una base para comprender y explicar sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, etc. En el contexto de esta investigación, se identificaron los siguientes componentes principales en los aceites esenciales estudiados. A continuación se presenta una breve descripción de sus características distintivas.

La pulegona es una cetona monoterpénica presente en varios aceites esenciales de plantas de la familia de las Lamiaceae, como la *Mentha pulegium*, *Mentha spicata* y la *Mentha x piperita*. Tiene un aroma característico entre la menta y el alcanfor. Ha sido clasificada como segura (GRAS) por la FDA y se utiliza en alimentos, perfumería y aromaterapia. Se han estudiado sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes aunque también se ha encontrado que altas concentraciones pueden ser perjudiciales para el hígado por lo que se recomienda un uso controlado y moderado de aceites esenciales que contengan pulegona (Božovic *et al.*, 2017).

La mentona es otra una cetona monoterpénica que se encuentra en varios aceites esenciales de plantas, especialmente en las mentas, el poleo y las salvias. Tiene un aroma refrescante y mentolado que se asocia comúnmente con la menta. En la naturaleza, la mentona se presenta en forma de dos isómeros, siendo el isómero *l* el

más abundante en los aceites esenciales. La mentona ha sido ampliamente estudiada debido a sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas, analgésicas y antiinflamatorias, lo que la hace útil en la industria farmacéutica, la conservación de alimentos, la medicina natural y la aromaterapia. Sin embargo, se debe tener precaución en su uso, ya que altas concentraciones pueden ser irritantes para la piel y las mucosas, y su uso excesivo puede tener efectos adversos (Baser & Buchbauer, 2015).

El nerol es un alcohol monoterpénico acíclico que se encuentra en varios aceites esenciales de plantas. Se ha identificado en especies como *Agastache mexicana* y *Citrus aurantium*. El nerol tiene un aroma floral dulce y fresco, similar al de las rosas y las flores de naranjo. Es conocido por sus propiedades terapéuticas, especialmente en lo que respecta al alivio del dolor y la inflamación. Se ha demostrado que el extracto de *Agastache mexicana*, rico en nerol, posee efectos antinociceptivos. Además, el nerol ha mostrado propiedades antiinflamatorias y de protección a la mucosa gástrica contra el daño inducido por el etanol. Estas características hacen que el nerol sea un componente valioso en la industria de los aceites esenciales y en la formulación de productos farmacéuticos y cosméticos (de Cássia da Silveira e Sá *et al.*, 2017).

El acetato de nerilo es un éster de acetato presente en varios aceites esenciales de plantas. Se encuentra en plantas como *Citrus aurantium* y *Jasminum grandiflorum*. El acetato de nerilo tiene un aroma floral dulce y suave, con notas frutales y frescas. Se ha demostrado que posee propiedades relajantes y sedantes, lo que lo convierte en un ingrediente valioso en la aromaterapia y en la industria de los cosméticos. Además, se ha investigado su potencial efecto antibacterial y antifúngico (Celuppi *et al.*, 2023).

El término "cital" se utiliza para describir una mezcla de los dos isómeros geométricos geranial y neral sin especificar sus proporciones relativas. Esta combinación de isómeros se encuentra ampliamente en la naturaleza, y su presencia es común en una variedad de plantas. Algunas de las fuentes naturales más destacadas de cital son el aceite de hierba de limón y el fruto de *Litsea cubeba*. El cital es responsable del aroma característico de los limones, aunque el aceite de limón generalmente contiene solo un pequeño porcentaje de este compuesto (Baser & Buchbauer, 2015).

El carvacrol es un compuesto fenólico que se encuentra naturalmente en varios aceites esenciales, como el *Origanum vulgare* L. y el *Thymus vulgaris*. Es un monoterpenoide y se caracteriza por su aroma distintivo, que se describe como picante y ligeramente agradable. El carvacrol ha demostrado tener propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes, lo que lo hace valioso en la industria alimentaria y en la conservación de alimentos. Además, se ha investigado su potencial efecto antiinflamatorio y analgésico. El carvacrol también ha sido estudiado por sus propiedades terapéuticas potenciales en el tratamiento de enfermedades respiratorias y digestivas. Se considera un compuesto seguro (GRAS) y se utiliza ampliamente como aditivo alimentario, en productos de cuidado personal y en la aromaterapia (Mączka, 2023).

La Tabla 2.3 muestra algunos de los componentes de interés de los aceites esenciales en esta investigación, junto con algunas de sus propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas.

Tabla 2.3. Algunos componentes de los aceites esenciales estudiados con algunas de sus propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas.


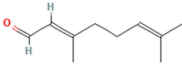
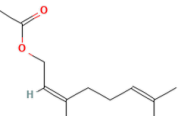
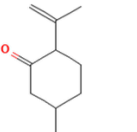
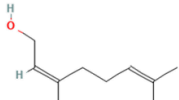
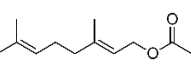
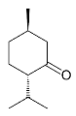
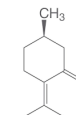
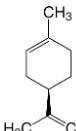
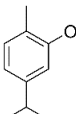
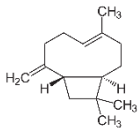
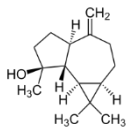
Componente de EO	CAS RN	Estructura molecular	Tipo de compuesto	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)	Punto de ebullición (°C, 1013 hPa)	Densidad relativa	Características organolépticas	LD ₅₀ (ratas, oral) (mg/kg)	Fuente vegetal
D Germacreno	23986-74-5		Sesquiterpeno	C ₁₅ H ₂₄	204.35	308	900	Líquido transparente incoloro a amarillo pálido.	280	<i>Cardiopetalum calophyllum</i> Schltld
Citral	5392-40-5		Monoterpenoide	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23	229	891-897	Líquido de color amarillo claro con olor a limón.	500-4960	<i>Cymbopogon flexuosus</i>
Acetato de nerilo	141-12-8		Monoterpenoide	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196.29	133-135 (25mmHg)	905-914	Líquido incoloro a amarillo pálido/olor floral dulce.	>5	<i>Pelargonium graveolens</i>
Isopulegona	29606-79-9		Monoterpenoide	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23	101.00-102.00 (17.00 mm Hg)	0.925-0.932	Líquido incoloro a amarillo, olor a menta y madera, levemente verde.	150-819	<i>Mentha Piperita</i> L
Nerol	106-24-1		Monoterpenoide	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	225	0.875-0.880	Líquido incoloro; aroma fresco, dulce, a rosa.	4500	<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don
Acetato de geranilo	2623-23-6		Monoterpenoide	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196.29	907	240-245	Líquido incoloro con aroma floral afrutado.	6330 mg/kg	<i>Cymbopogon winterianus</i>

Tabla 2.3. Continuación ...

Mentona	14073-97-3		Monoterpenoide	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	207	895	Ligero olor a menta, sabor amargo.	5003	<i>Mentha pulegium</i>
Pulegona	89-82-7		Monoterpenoide	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23	224	935	Olor agradable, entre menta y alcanfor.	330 (perro)	<i>Mentha pulegium</i>
Limoneno	5989-27-5		Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆	136.23	176	841.1	Olor característico a cáscara de naranja.	5300	<i>Mentha piperita</i>
Carvacrol	499-75-2		Monoterpenoide	C ₁₀ H ₁₄ O	150.217	237-238	976	Líquido incoloro a amarillo pálido, olor picante y especiado.	810 mg/kg	<i>Origanum vulgare</i>
Cariofileno	87-44-5		Sesquiterpeno	C ₁₅ H ₂₄	204.35	256-259	899-908	Líquido incoloro a amarillo pálido con un aroma suave y especiado.	>5 g/kg	<i>Syzygium aromaticum</i>
Espatulanol	6750-60-3		Sesquiterpeno	C ₁₅ H ₂₄	220.35	296-298		Líquido incoloro a amarillo pálido con un aroma suave, amaderado y especiado.		<i>Chrysopogon zizanioides</i>

Fuente: Base de datos PubChem National Center for Biotechnology Information (2022).

3. JUSTIFICACIÓN

La oxidación es uno de los factores más importantes en el deterioro de productos procesados. La prevención de dicha oxidación generalmente se logra mediante antioxidantes sintéticos, pero estos muchas veces resultan perjudiciales para la salud humana, por lo que existe un creciente interés en el desarrollo de antioxidantes naturales seguros y efectivos, es por esto por lo que últimamente se ha enfocado la atención hacia los EO que son llamados bioconservadores o químicos verdes pues se presentan como alternativas potenciales a los antioxidantes químicos. Así que la sustitución de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturales podría proveer algunos beneficios debido a los efectos en la salud y en la percepción del consumidor (Bag & Chattopadhyay, 2015; Ghadermazi *et al.*, 2017)

Por otro lado, a pesar del vasto capital natural que tiene México en cuanto a plantas endémicas, el EO de estas ha recibido sorprendentemente poca atención. De las aproximadamente 23,000 especies de plantas nativas descritas hasta la fecha en México (Villaseñor & Ortiz, 2014), solo unas 450 han sido reportadas como aromáticas y de estas, apenas se ha caracterizado el aceite esencial de 76. *Asteraceae* es la familia con el mayor número de registros (27%), seguida de *Burseraceae*, *Lamiaceae* y *Lauraceae*, que representan cada una el 11% del número total de especies. Con respecto a la investigación de EO, los estudios de caracterización de EO representan el 25%. Sobresale en este sentido que acerca del aceite esencial de *Clinopodium mexicanum* la información es nula y con respecto de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*, apenas se encuentra descrita la composición de su aceite esencial, no así su actividad antioxidante; en el caso de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*, su actividad antioxidante solo se encuentra reportada mediante el método DPPH (Calvo-Irabién, 2018).

Finalmente, al tratarse de un proceso cuyo rendimiento suele estar por debajo del 1%, se hace necesario optimizar dicho proceso, el RSM resulta una buena opción ya que permite no solo observar la influencia de cada uno de los factores sino también los

efectos de la interacción entre estos además de modelar dicho comportamiento (Montgomery, 2006; Guzmán & Lucía, 2021)

Por lo que el presente proyecto de investigación plantea optimizar el proceso de obtención del aceite esencial de tres plantas mexicanas endémicas y además poco estudiadas mediante el método de superficie de respuesta, cubriéndose así un hueco importante en esta área de investigación.

4. HIPÓTESIS

La optimización de la obtención de aceite esencial de tres plantas mexicanas endémicas permitirá aumentar su rendimiento a más del 1% (masa de aceite esencial/masa de materia prima seca).

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar y optimizar la obtención de aceite esencial de tres plantas mexicanas endémicas (*Clinopodium mexicanum*, *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* y *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*).

Objetivos específicos

- Determinar la composición química del aceite esencial de tres plantas mexicanas (*Clinopodium mexicanum*, *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* y *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*).
- Determinar el efecto del tiempo de extracción, el tipo de aditivo del agua de destilación y la relación sólido – líquido en el rendimiento de EO de plantas mexicanas mediante un diseño factorial.
- Determinar el efecto del tiempo de extracción, el tipo de aditivo del agua de destilación y la relación sólido – líquido en la actividad antioxidante de EO de plantas mexicanas mediante la metodología de superficie de respuesta.

6. METODOLOGÍA

6.1 Selección y caracterización del material vegetal

6.1.1 Identificación del material vegetal

Las partes aéreas de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* y subsp. *mexicana* fueron adquiridas en la Central de Abastos de la ciudad de Puebla durante los meses de marzo-abril de 2021 y septiembre-octubre de 2021, respectivamente. Con el apoyo del jardín etnobotánico Francisco Peláez Roldán y el Dr. Cristóbal Sánchez Sánchez, se identificó dicho material vegetal que fue colectado en la población de San Buenaventura Tecaltzingo, Puebla (19°14'50.9"N 98°28'00.1"O); un ejemplar de cada planta fue depositado en el Herbario Ortorio CHAPA con números de acceso 155 907 y 155 906, respectivamente (Anexo 1).

En el caso de *Clinopodium mexicanum*, las partes aéreas secadas a la sombra fueron adquiridas en “Curamex”, tienda naturista local de Cholula, Puebla, México en agosto de 2022. Con el apoyo del jardín botánico de la BUAP, se identificó la planta *Clinopodium mexicanum* que fue colectada en la población de Tzicatlayocan, Puebla (18° 52' 12.8" Latitud Norte 2095 m) y fue depositada en el jardín botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Anexo 2).

6.1.2 Preparación del material vegetal

Las partes aéreas de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* y subsp. *mexicana*, fueron secadas a la sombra durante 10 días para la posterior extracción de su aceite esencial. Todo el material vegetal fue empaquetado en bolsas de papel celofán (para evitar contaminación por humedad) hasta ser utilizadas.

6.1.3 Determinación del porcentaje de humedad del material vegetal

De acuerdo con el método 934.06 AOAC (2000), se determinó que las partes aéreas de *Clinopodium mexicanum* usadas en la presente investigación contenían un porcentaje de humedad de 8.18 ± 0.0516 (% w/w). Asimismo, las hojas secadas a la sombra de

Agastache mexicana subsp. *mexicana* presentaron un porcentaje de humedad de 7.06 ± 0.02 (%w/w), según el mismo método. Por otro lado, las partes aéreas de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* utilizadas en el estudio mostraron un porcentaje de humedad de 6.93 ± 0.12 (%w/w), también determinado mediante el método 934.06 AOAC (2000).

6.2 Selección del diseño de experimentos

Emplear el diseño de experimentos adecuado podría ayudar a disminuir el número de experimentos y por tanto los costos y tiempo empleado. Para el caso de *Clinopodium mexicanum*, se empleó una configuración de diseño compuesto central de tres factores con $8 (2^3)$ puntos factoriales, 6 puntos axiales y 4 puntos centrales para evaluar los efectos de las variables independientes del proceso: tiempo de sonicación, relación líquido – sólido y tiempo de extracción sobre la masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca y actividad antioxidante medida mediante los métodos DPPH y ABTS y expresada mediante su IC_{50} (IC_{50} DPPH, IC_{50} ABTS) según se indica en la Tabla 6.1

Tabla 6.1. Niveles codificados y no codificados de las variables independientes utilizadas en el diseño RSM para la extracción del EO de *Clinopodium mexicanum*.

Variables independientes	Código	Rango y niveles				
		- α	-1	0	1	α
Tiempo de sonicación (min)	A	4.7	8.8	15	21.1	25.3
Relación líquido–sólido (mL/g)	B	23.6	28.7	36	43.3	48.4
Tiempo de extracción (min)	C	9.1	21.6	40	58.4	70.9

Para el caso de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* se empleó una configuración de diseño central compuesto con $8 (2^3)$ puntos factoriales, 6 puntos axiales y 3 puntos centrales para evaluar los efectos de las variables independientes del proceso: concentración de cloruro de sodio, tiempo de remojo y relación líquido – sólido sobre la masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca y la actividad antioxidante medida mediante los métodos DPPH y ABTS (IC_{50} DPPH e IC_{50} ABTS), según se indica en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Niveles codificados y no codificados de las variables independientes utilizadas en el diseño RSM para la extracción del EO de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*.

Variables independientes	Código	Rango y niveles				
		- α	-1	0	1	α
Concentración de NaCl (%w/w)	A	0	1.53	3.77	6.00	7.52
Tiempo de remojo (min)	B	0	31.2	75.6	120	150
Relación líquido – sólido (mL/g)	C	18.1	25.2	35.6	46.0	53.1

Para el caso de la extracción de aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*, se empleó una configuración de diseño compuesto central centrado en las caras de tres factores con 8 (2^3) puntos factoriales, 6 puntos axiales y 4 puntos centrales para evaluar los efectos de las variables independientes del proceso (factores): concentración de Tween 20, relación líquido – sólido y tiempo de extracción sobre la masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca (rendimiento) y la actividad antioxidante medida mediante los métodos DPPH y ABTS (IC_{50} DPPH e IC_{50} ABTS), según se indica en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Niveles codificados y no codificados de las variables independientes utilizadas en el diseño RSM para la extracción del EO de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*.

Variables independientes	Código	Rango y niveles		
		-1	0	1
Concentración de Tween 20 (g/mL)	A	0.001	0.004	0.007
Relación sólido–líquido (g/L)	B	15.8	30.8	45.8
Tiempo de extracción (min)	C	30	105	180

En todos los casos, los experimentos se realizaron al azar para minimizar el efecto de la variabilidad inexplicable en las respuestas observadas debido a factores externos. Las réplicas en el centro del diseño se utilizaron para estimar la suma de cuadrados del error puro. Se midieron tres respuestas: masa de EO obtenido por masa de materia prima seca, actividad antioxidante del EO determinado mediante el método DPPH y mediante el método ABTS. Se utilizó una ecuación polinomial de segundo orden (ecuación 6.1) para expresar la respuesta en función de las variables independientes,

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i<j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (6.1)$$

donde Y representa la variable de respuesta, β_0 es una constante, β_i el coeficiente lineal, β_{ii} el coeficiente cuadrático y β_{ij} el coeficiente del producto cruzado. X_i y X_j son niveles de las variables independientes. El modelo fue construido a partir de las variables con niveles de confianza del 95%. Los coeficientes de las ecuaciones de superficie de respuesta fueron estimados por Minitab Versión 21.3.

6.3 Extracción del aceite esencial

La extracción del aceite esencial de *Clinopodium mexicanum* (CMEO), se llevó a cabo mediante hidrodestilación asistida por ultrasonido, para tal fin, 25 g de partes aéreas del material vegetal se sumergieron en 500 mL de agua y se sometieron a sonicación durante el tiempo determinado por el diseño de experimentos (ver Tabla 6.1). Una vez transcurrido este tiempo, se agregó la cantidad de agua necesaria para satisfacer la relación líquido – sólido establecida por el diseño de experimentos, según se indica en la tabla 6.1. A continuación, la muestra fue sometida a hidrodestilación durante el tiempo especificado por el diseño de experimentos. El tiempo de destilación se midió a partir del momento en que apareció la primera gota de destilado. El equipo de ultrasonido consistió en un baño ultrasónico 030S (SAT Group, Catania, Italia) con una potencia ultrasónica de 180 W y frecuencia de 40 kHz (Figura 6.1).

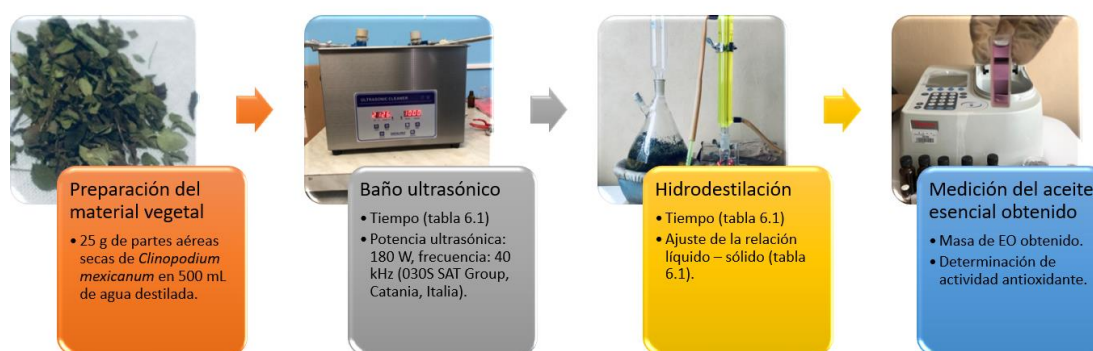


Figura 6.1 Procedimiento de extracción y medición del CMEO

La extracción del aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* (AMMEO) se llevó a cabo utilizando el método de hidrodestilación salina. Se tomaron 25 g de hojas de la planta y se sumergieron en un volumen de agua (relación líquido – sólido)

y concentración de sal ajustada de acuerdo al diseño de experimentos detallado en la tabla 6.2. La sal empleada fue NaCl de grado reactivo. Una vez sumergido el material vegetal, se dejó en remojo a temperatura ambiente durante el tiempo especificado en la tabla 6.2. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción del aceite mediante el equipo de hidrodestilación durante un período de dos horas, comenzando a medir el tiempo a partir de la aparición de la primera gota de destilado (Figura 6.2).



Figura 6.2 Procedimiento de extracción y medición del AMMEO

Finalmente, la extracción del aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* (AMXEO) se realizó mediante hidrodestilación asistida por surfactante. Para ello, se utilizaron 30 g de partes aéreas de material vegetal. En todos los experimentos, antes de la extracción, se sumergió durante 2 h a la materia prima en un volumen de agua con una relación líquido – sólido y una concentración de Tween 20 ajustada de acuerdo al diseño de experimentos detallado en la Tabla 6.3 (Figura 6.3).



Figura 6.3 Procedimiento de extracción y medición del AMXEO

6.4 Determinación de la masa de materia de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca (% w/w)

Se determinó la masa de materia de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca (% w/w) del aceite esencial obtenido con la siguiente ecuación:

$$\text{masa de EO/masa de materia prima seca (\%)} = \frac{\text{masa de aceite esencial extraído}}{\text{masa de material vegetal seco}} \times 100$$

6.5 Medición de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante del aceite esencial fue determinada por el método de barrido DPPH como ha sido descrito por Rashidi *et al.* (2018). Esto es, una porción de 100 μL de una mezcla metanólica de aceite de concentración adecuada se mezcló con 3.9 mL de una solución metanólica de DPPH 0.06 mM recién preparada. La mezcla fue agitada vigorosamente para después reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente con el objetivo de que tuviera lugar cualquier reacción. Los valores de absorbancia de las soluciones se midieron a 517 nm con un espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10 Series (Wisconsin, USA) con metanol como blanco. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición del radical DPPH (% inhibición) calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \times 100$$

donde A_{blanco} es el valor de la absorbancia de la reacción de control y A_{muestra} es el valor de la absorbancia después de la reacción del aceite esencial.

Otra de las técnicas más utilizadas para evaluar la actividad antioxidante de alimentos y plantas medicinales es la que emplea el radical libre ABTS⁺, por lo que la habilidad de los aceites esenciales extraídos para atrapar dichos radicales fue medida de acuerdo con Re *et al.* (1999). El radical ABTS⁺ se formó después de la reacción de 7 mM ABTS con persulfato de potasio 2.45 mM (concentración final) durante 16 h de incubación a temperatura ambiente. Una vez formado el radical ABTS⁺, se realizaron diluciones

con etanol (etanol-radical ABTS) para obtener un valor de absorbancia de aproximadamente 0.700 ± 0.020 (A_i) a 754 nm. Para medir la actividad antioxidante, se agregaron 80 μL de aceite esencial (disuelto en etanol) a 3920 μL de solución ABTS-radical-etanol; la mezcla se dejó reaccionar durante 7 minutos antes de medir la absorbancia final (A_f). Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%inhibición = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100.$$

Los valores de absorbancia de las soluciones se midieron a 754 nm con un espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10 Series (Wisconsin, USA) con etanol como blanco.

La actividad antioxidante determinada por ambos métodos (DPPH y ABTS) se expresó como IC_{50} que es definido como la concentración de antioxidante que causa el 50% de inhibición. El IC_{50} fue expresado en mg de antioxidante/mL de solución y fue calculado mediante la interpolación de un análisis de regresión lineal.

Se determinó también la actividad antioxidante de antioxidantes sintéticos considerados como referencia, esto es, ácido ascórbico, Trolox y BHT y se expresó dicha actividad antioxidante también mediante su IC_{50} .

6.6 Determinación de la composición química del aceite esencial

La caracterización de compuestos químicos volátiles del aceite esencial se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se utilizó un cromatógrafo de gases, equipado con un detector de masa cuadrupolo selectivo 5975 (Agilent Technologies 6850N GC, Santa Clara, CA, EE. UU.). Para la separación de los compuestos, se utilizó una columna HP5-MS (30 m de largo \times 0.25 mm de diámetro), cubierta con una película (0.25 μm) de 5% de fenilo y 95% de dimetilpolisiloxano.

Un μL de muestra fue inyectado al equipo, la separación de volátiles se llevó a cabo usando una columna de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro revestida con una película de 0.25 μm de espesor. Las condiciones del análisis fueron las siguientes: helio como gas portador (1.1 mL/min), temperatura de inyección de 250 °C, volumen de inyección de 1 μL , relación de división 10:1, temperatura inicial de 60 °C incrementándose a una velocidad de 4 °C/min hasta alcanzar 250 °C. Energía de ionización de 70 eV y rango de masa de exploración de 43-350 m/z. La identificación de los compuestos se basó en la comparación de su espectro de masas con la base de datos NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) (Adams, 1989).

6.7 Medición de la toxicidad del aceite esencial

El ensayo de letalidad de *Artemia salina* se considera una herramienta útil para la evaluación preliminar de la toxicidad. Este ensayo tiene las ventajas de ser rápido (24 h), económico y sencillo. De acuerdo con Bag & Chattopadhyay (2015), es válido el uso de nauplios de *Artemia salina* como modelo para evaluaciones preliminares de actividades farmacológicas y ecotoxicológicas de compuestos o extractos de mayor complejidad.

La toxicidad del aceite esencial de *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* se determinó a través del ensayo de *Artemia salina* de acuerdo con el método descrito por Juárez *et al.* (2015). Esto es, quistes de *Artemia* spp. (Azul, México) se cultivaron en agua de mar artificial preparada a partir de sal marina comercial (30 g de sal marina/L de agua destilada). Los quistes se incubaron a temperatura ambiente durante un fotoperíodo de luz: oscuridad de 12 h. Para el bioensayo se utilizaron nauplios de 24 h de edad ($n = 10$) después de su transferencia a tubos de ensayo de vidrio de borosilicato de 10 mL (KIMAX) utilizando una pipeta Pasteur.

Debido a la pobre solubilidad de los aceites esenciales en agua, se usaron 15 μL de Tween-80 en los 5 mL de la solución final. Los nauplios se incubaron por separado con ambos aceites esenciales a concentraciones finales de 10, 50, 100 y 250 g/mL durante

24 h. Se utilizó Tween-80 como control negativo y agua de mar como blanco y $K_2Cr_2O_4$ como control positivo. La toxicidad se estimó calculando la LC_{50} (concentración letal media) determinada después del período de incubación de 24 h. Los nauplios se consideraron muertos cuando no se detectó movimiento después de 10 segundos de observación. Se clasificó el valor de toxicidad obtenido según la definición de Juárez *et al.* (2015): concentraciones mayores a 1500 $\mu\text{g/mL}$ se consideraron inocuas, de 1000 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ se consideraron no tóxicas, de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ se consideraron ligeramente tóxicas, de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ se consideraron moderadamente tóxicas, de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ se consideraron altamente tóxicas, y de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ se consideraron extremadamente tóxicas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La LC_{50} se calculó utilizando el análisis Probit con un 95% de confianza utilizando el software Statgraphics 19.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 *Clinopodium mexicanum*

En la presente investigación, se aplicó la metodología de superficie de respuesta con tres variables independientes (tiempo de sonicación: A, relación líquido – sólido: B y tiempo de extracción: C) para investigar su efecto sobre las variables dependientes (masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca, actividad antioxidante determinada mediante los ensayos DPPH y ABTS y expresada mediante su IC₅₀). Esto a través de un diseño central compuesto que consistió en 18 puntos (8 puntos factoriales, 6 puntos axiales y 4 puntos centrales); los datos experimentales obtenidos se presentan en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Puntos experimentales del diseño central compuesto y datos experimentales para la extracción de CMEO.

Experimento ^a	Variables codificadas			Variables sin codificar			Respuestas		
	A	B	C	Tiempo de sonicación (min)	Relación líquido-sólido (mL/g)	Tiempo de extracción (min)	Masa CMEO/masa MP seca (%)	IC ₅₀ DPPH (mg/mL)	IC ₅₀ ABTS (mg/mL)
1	-1	-1	-1	9	29	22	0.74±0.03	225±0	17.7±0.0
2	1	-1	-1	21	29	22	0.88±0.01	287±6	17.4±0.4
3	-1	1	-1	9	43	22	0.85±0.07	214±1	17.2±0.3
4	1	1	-1	21	43	22	0.78±0.07	189±8	16.4±0.2
5	-1	-1	1	9	29	58	0.99±0.04	203±0	16.8±0.1
6	1	-1	1	21	29	58	0.90±0.01	189±0	16.9±0.2
7	-1	1	1	9	43	58	0.88±0.03	202±0	17.5±0.2
8	1	1	1	21	43	58	0.81±0.04	188±2	18.2±1.1
9	-1.68	0	0	5	36	40	0.85±0.09	203±1	18.2±0.3
10	1.68	0	0	25	36	40	0.87±0.00	219±1	17.8±0.4
11	0	-1.68	0	15	24	40	0.99±0.26	192±1	17.4±0.0
12	0	1.68	0	15	48	40	0.88±0.11	235±3	15.2±0.1
13	0	0	-1.68	15	36	10	0.95±0.02	247±2	19.9±0.4
14	0	0	1.68	15	36	70	0.84±0.16	292±15	15.9±0.1
15	0	0	0	15	36	40	0.92±0.05	182±1	16.7±0.0
16	0	0	0	15	36	40	1.30±0.16	185±4	16.4±0.1
17	0	0	0	15	36	40	0.93±0.07	186±4	16.5±0.2
18	0	0	0	15	36	40	1.17±0.09	190±1	16.0±0.0

^a los experimentos fueron llevados a cabo de manera aleatoria.

7.1.1 Masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca (% w/w)

En la Tabla 7.1 se puede observar que la masa de CMEO obtenido por masa de materia prima seca varió de 0.74 ± 0.03 a 1.08 ± 0.19 % (promedio de los cuatro puntos centrales). A la fecha, no se tiene noticia de que se haya reportado el rendimiento de CMEO. Se ha reportado el rendimiento del aceite esencial de hojas de *Clinopodium*

macrostemum var. *laevigatum* en 1.04% (w/v) (Villa-Ruano *et al.*, 2015), de partes aéreas de *Clinopodium gilliesii* en 1.2% (Barbieri *et al.*, 2016) y de hojas y tallos de *Clinopodium sericeum* en 0.25% (Benites *et al.*, 2021); todos obtenidos mediante hidrodestilación.

Se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple utilizando la RSM para estudiar la relación entre tres variables de extracción y la masa de CMEO obtenido por masa de materia prima seca. Esto con el objetivo de identificar las constantes y coeficientes de las variables, así como para investigar el efecto lineal de las variables y los efectos cuadráticos y de interacción. La adecuación al modelo CCD se estimó mediante estadística descriptiva y la prueba de Fisher para el modelo. Sin embargo, de acuerdo con las estadísticas descriptivas, R^2 (0.5536) no resultó del todo aceptable además de discordante con R^2 ajustado (0.0515), asimismo la falta de ajuste resultó significativa por lo que no se considera un modelo confiable por lo que se procedió a analizar el correspondiente diseño factorial 2^3 .

El efecto de cada factor en la masa de CMEO obtenido por masa de materia prima seca mediante los distintos tratamientos definidos por el diseño experimental descrito en la sección 6.3 fue evaluado con base en un Análisis de Varianza. Todas las evaluaciones se realizaron considerando un nivel de significancia del 5%. Además, se presenta el modelo ajustado, en el que los efectos que resultaron significativos se señalan en negrita.

$$Y = 0.8534 - 0.0095A - 0.0238B + 0.0406C - 0.0251\mathbf{AB} - 0.0277\mathbf{AC} - 0.0260\mathbf{BC} + 0.0286\mathbf{ABC} \quad (7.1)$$

La ecuación 7.1 revela que, con excepción de los factores lineales "tiempo de sonicación" y "relación líquido-sólido", todos los demás factores presentaron una influencia estadísticamente significativa, con un nivel de confianza del 95%, sobre la variable de respuesta: la masa de CMEO obtenido por masa de materia prima seca. La secuencia de los términos significativos, considerando los efectos principales y de

interacción en relación a su influencia decreciente en la masa de CMEO obtenido por masa de materia prima seca, fue la siguiente: C (tiempo de extracción) > ABC (tiempo de sonicación - relación líquido-sólido - tiempo de extracción) > AC (tiempo de sonicación - tiempo de extracción) > BC (relación líquido-sólido - tiempo de extracción) > AB (tiempo de sonicación - relación líquido-sólido). Una relación positiva en el tiempo de extracción indica que a medida que se prolonga el tiempo de extracción, el solvente tiene más tiempo para penetrar en el material vegetal y extraer las moléculas de aceite esencial. En relación a la interacción entre el tiempo de sonicación y el tiempo de extracción, esto puede explicarse debido a que las ondas ultrasónicas aplicadas antes de la extracción generan cavitación acústica, que es una agitación intensa a pequeña escala que afecta la integridad de las paredes celulares del material vegetal y facilita la penetración del solvente en la matriz vegetal (Martínez Ramos *et al.*, 2020). Esto mejora la liberación del contenido intracelular al solvente de extracción y facilita la transferencia de masa de los aceites esenciales desde el interior de las matrices vegetales. Conforme transcurre más tiempo, se obtiene una mayor cantidad de aceite esencial. Por otro lado, los resultados sugieren que la duración del proceso de extracción es un factor crítico para determinar el rendimiento del aceite esencial, mientras que los otros factores pueden variar según las condiciones experimentales, el material vegetal, el método de extracción y otras condiciones experimentales. En todo caso, son necesarios más estudios para comprender completamente las interacciones complejas entre los diferentes factores en la extracción de aceite esencial y para optimizar el proceso de extracción para diferentes materiales vegetales y aplicaciones.

En cuanto a la interacción entre el tiempo de sonicación y el tiempo de extracción, esto puede explicarse debido a que las ondas ultrasónicas aplicadas antes de la extracción generan una agitación intensa a pequeña escala debido al fenómeno de cavitación acústica, lo cual facilita la penetración del solvente en la matriz natural y afecta su integridad a través de las paredes celulares. Esto mejora la liberación del contenido intracelular al solvente de extracción y facilita la transferencia de masa de los aceites

esenciales desde el interior de las matrices vegetales, lo que permite un acceso más sencillo al aceite esencial. A medida que transcurre más tiempo, se obtiene una mayor cantidad de aceite esencial.

Nuestros resultados coinciden con la investigación realizada por Li *et al.* (2022), quienes reportaron que la interacción entre el tiempo de sonicación y el tiempo de extracción fue significativa en el rendimiento de extracción de aceite esencial de cáscaras de *Tribute citrus* mediante hidrodestilación asistida por ultrasonido. Sin embargo, no encontraron significancia ni en el tiempo de extracción ni en la interacción entre la relación líquido-sólido y el tiempo de extracción, a diferencia de lo observado en nuestra investigación. Este comportamiento también fue observado Tekin *et al.* (2015) quienes informaron que la concentración de la planta (masa de la planta/volumen de etanol) no tuvo influencia en la extracción de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* mediante hidrodestilación asistida por ultrasonido. Del mismo modo, Liu *et al.* (2019) también reportaron la falta de influencia de la relación solvente/muestra en el rendimiento de aceite esencial de semillas de *Iberis amara* y también Mollaei *et al.* (2021), reportaron que, en la extracción de aceite esencial de flores de *Oliveria decumbens* mediante hidrodestilación asistida por ultrasonido, no observaron un efecto significativo en la relación agua/planta, pero sí observaron significancia en el tiempo de sonicación.

Según Balti *et al.* (2018), la significancia del tiempo de extracción se atribuye al mecanismo específico del ultrasonido. La propagación de ondas ultrasónicas en el medio líquido genera burbujas de cavitación debido a las variaciones de presión, lo cual provoca la ruptura de las paredes celulares y facilita el lavado del contenido celular, logrando así mejores rendimientos. Este resultado también es observado por Liu *et al.* (2019) en su estudio sobre el rendimiento de aceite esencial de semillas de *Iberis amara*.

Las discrepancias entre nuestros resultados y los de otros investigadores pueden atribuirse, en primer lugar, a las propiedades físicas y químicas de los componentes de

la materia prima, que pueden influir en la eficiencia de la extracción. Algunos compuestos pueden ser más fácilmente solubles en el solvente de extracción, mientras que otros pueden requerir condiciones específicas, como la aplicación de ultrasonido, para lograr una extracción óptima. Esta variabilidad en la respuesta de extracción puede explicar por qué algunos factores, como el tiempo de sonicación, pueden mostrar una influencia significativa en ciertos estudios, mientras que en otros no. Otro aspecto a considerar es la diversidad de las matrices de materia prima utilizadas en los estudios de extracción. Diferentes plantas, partes de plantas o productos naturales pueden presentar composiciones químicas y estructuras celulares distintas, lo que puede afectar la forma en que responden a los parámetros de extracción. Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestro estudio pueden no ser directamente extrapolables a otras matrices de materia prima. Además, las condiciones experimentales, como la potencia del ultrasonido, el tipo de solvente, la temperatura y la relación líquido-sólido, pueden variar entre los diferentes estudios, lo que también puede influir en los resultados. Estas diferencias en las condiciones experimentales pueden explicar las discrepancias observadas en los efectos de los factores en los diferentes estudios (Nora & Borges, 2017).

7.1.2 Actividad antioxidante del CMEO

Según Abedi *et al.* (2017), debido a la complejidad de los aceites esenciales, no es adecuado evaluar su actividad antioxidante con una sola técnica, se deben proponer al menos dos métodos experimentales para verificar la autenticidad de la medición, y, de acuerdo con Barbieri *et al.*, (2016), ABTS y DPPH son radicales libres estables, que son ampliamente aceptados en la comunidad científica como una herramienta para estimar las actividades de eliminación de radicales libres de los antioxidantes. Por lo que, en esta investigación se decidió analizar la influencia de las condiciones de extracción sobre la actividad antioxidante de CMEO utilizando dos técnicas de evaluación de actividad antioxidante: ensayo DPPH y ABTS. Ambas técnicas se basan en la capacidad del antioxidante para reaccionar o neutralizar los radicales libres generados en los sistemas de ensayo. La actividad antioxidante se expresó como el

valor de IC₅₀, que se calculó por regresión lineal de la gráfica del porcentaje de absorción del radical DPPH o ABTS, según correspondiera. El valor IC₅₀ representa la concentración de aceite esencial que causa el 50% de inhibición. Cuanto menor sea dicho valor, mejor será la actividad antioxidante del aceite esencial.

En la Tabla 7.1 se puede observar que la actividad antioxidante del CMEO medida a través del método DPPH y expresada mediante el valor de IC₅₀, varía de 185 ± 4 a 292 ± 15 mg/mL (promedio de los cuatro puntos centrales). A la fecha, no se tiene noticia de que se haya reportado anteriormente la actividad antioxidante medida mediante el método DPPH del CMEO. Se ha reportado el IC₅₀ DPPH del aceite esencial de *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* (planta mexicana) como 0.92±0.05 g/L (Villa-Ruano *et al.*, 2015), también se ha reportado el IC₅₀ DPPH del aceite esencial de *Clinopodium gilliesii* (Benth.) Kuntze como 5.80 ± 0.14 mg/mL (Barbieri *et al.*, 2016) y el IC₅₀ DPPH del aceite esencial de *Clinopodium sericeum* como 106.06 ± 7.92 mg/mL (Benites *et al.*, 2021).

El análisis de regresión mostró que de los tres parámetros probados y sus interacciones solo el factor cuadrático de tiempo de extracción presentó un efecto significativo sobre el IC₅₀ DPPH por parte del CMEO. La adecuación al modelo CCD se estimó mediante estadística descriptiva y la prueba de Fisher para el modelo, no obstante, según las estadísticas descriptivas, R² (0.5246) resultó bajo y discordante con el valor de R² ajustado (0.3600), lo que deja claro que no es posible representar una aproximación de los resultados experimentales a través de un modelo polinomial de segundo orden de tal forma que se procedió a analizar el correspondiente diseño factorial 2³. Se presenta el modelo ajustado, para la variable de respuesta IC₅₀ DPPH en el que los efectos que resultaron significativos, de acuerdo con un Análisis de Varianza, se señalan en negrita.

$$IC_{50}DPPH = 346.4 - 8.06A - 2.361B - 2.269C + 0.1265AB + 0.1203AC + 0.0399BC - 0.00223ABC \quad (7.2)$$

Como se observa en la ecuación 7.2, algunos de los factores, así como algunas de sus interacciones resultaron significativos para un nivel de confianza del 95%, sobre la

variable dependiente IC_{50} DPPH. La secuencia de los términos significativos considerando los efectos principales y de interacción con respecto a una influencia decreciente en el IC_{50} DPPH fue A (tiempo de sonicación) > AC (tiempo de sonicación – tiempo de extracción) > C (tiempo de extracción), siendo una relación positiva la del tiempo de sonicación y tiempo de extracción, en este caso, la relación líquido – sólido no parece tener influencia.

Una relación negativa en el tiempo de sonicación parece indicar que este tratamiento previo a la extracción podría mejorar la actividad antioxidante del aceite esencial obtenido. Esto podría explicarse debido a que la cavitación (colapso violento e implosión de burbujas de gas en el solvente líquido) y la microagitación debilitan los tejidos celulares mejorando así la eficiencia de la transferencia de masa en la extracción de compuestos bioactivos (de Oliveira Reis *et al.*, 2019; Martínez Ramos *et al.*, 2020). Que la actividad antioxidante se vea mejorada a medida que se prolonga el tiempo de extracción es un fenómeno que también han reportado Sodeifian & Sajadian, (2017). Con respecto al tiempo de sonicación, Hashemi *et al.* (2020) también reportan su influencia significativa en la actividad antioxidante (determinada mediante el método DPPH) del aceite esencial de pétalos de *Crocus sativus* obtenido mediante ultrasonido y lo atribuyen al hecho de que, a tiempos más prologados, la sonicación puede facilitar la ruptura de más células y, por lo tanto, acelerar la difusión y disolución de los componentes fenólicos en el solvente. Rashed *et al.* (2017) coinciden también en que el pretratamiento con ultrasonido mejora la actividad antioxidante del aceite esencial obtenido.

De tal forma que, para obtener la mejor actividad antioxidante medida por DPPH, sería deseable un largo tiempo de sonicación, en el caso del tiempo de extracción parece obtenerse la misma actividad antioxidante tanto si se extrae durante poco o mucho tiempo. Respecto al factor relación líquido – sólido como efecto principal no tiene significancia.

En la Tabla 7.1 se puede observar que la actividad antioxidante del CMEO medida a través del método ABTS y expresada mediante el valor de IC_{50} , varía de 15.2 ± 0.1 a 19.9 ± 0.4 mg/mL. A la fecha, no se tiene noticia de que se haya reportado anteriormente la actividad antioxidante medida mediante el método ABTS del CMEO. Se ha reportado el IC_{50} ABTS del aceite esencial de *Clinopodium gilliesii* (Benth.) Kuntze como 2.42 ± 0.30 mg/mL (Barbieri *et al.*, 2016) y también se ha reportado el IC_{50} ABTS del aceite esencial de *Clinopodium sericeum* como 473.03 ± 14.11 mg/mL (Benites *et al.*, 2021).

Se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple utilizando la metodología de superficie de respuesta. Sin embargo, de acuerdo con datos estadísticos descriptivos, R^2 (0.5793) no resultó del todo aceptable además de discordante con R^2 ajustado (0.4336), de la misma forma, la falta de ajuste resultó significativa por lo que no se considera un modelo confiable de tal forma que se procedió a analizar el correspondiente diseño factorial 2^3 . El Análisis de Varianza para la variable de respuesta IC_{50} ABTS, así como los estadísticos descriptivos, R^2 (0.7562) y R^2 ajustado (0.5429) no resultaron del todo aceptables además de discordantes entre sí, por lo que no se considera un modelo confiable.

Como se puede observar, los resultados anteriormente planteados no concuerdan del todo con los de la capacidad de eliminación de DPPH del CMEO. Esta correspondencia limitada entre los resultados de eliminación de radicales libres ABTS y DPPH se debe a que algunos compuestos antioxidantes que tienen capacidad de eliminación de radicales ABTS pueden no mostrar capacidad de eliminación de radicales DPPH ya que el método ABTS mide la actividad antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos, mientras que el método DPPH podría estar midiendo solo los compuestos lipofílicos (Martínez Ramos *et al.*, 2020).

Por todo lo anterior, para obtener la mejor actividad antioxidante del CMEO, se recomienda que la extracción se lleve a cabo de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2. Niveles recomendados para obtener la mejor actividad antioxidante en la extracción de CMEO dentro del rango de los estudios experimentales.

Símbolo	Factor	Nivel
A	Tiempo de sonicación (min)	(1) 21 min
B	Relación líquido – sólido (mL/g)	(1) 29 mL/g
C	Tiempo de extracción (min)	(-1) 22 min

7.1.2 Composición química del aceite esencial

Se llevó a cabo un análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas al CMEO obtenido mediante hidrodestilación para identificar los compuestos presentes en dicho aceite. En la Tabla 7.3 se presentan los 12 compuestos principales (que representan más del 90% del total de los componentes). A la fecha, no se tiene noticia de que se haya reportado la composición química del CMEO.

Tabla 7.3. Compuestos identificados en el CMEO mediante GC-MS.

No.	Compuesto químico	Área de pico ^a	Fórmula molecular	No.	Compuesto químico	Área de pico ^a	Fórmula molecular
1	Pulegona	36.48	C ₁₀ H ₁₆ O	7	Piperitona	1.14	C ₁₀ H ₁₆ O
2	B-citronelal	1.41	C ₁₀ H ₁₈ O	8	Carvacrol	4.47	C ₁₀ H ₁₄ O
3	Biciclo(3.1.0) hexano-6-memetol,(2-hidroxi 1,4,4-trimetil)	0.55	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	9	γ-Elemeno	1.37	C ₁₅ H ₂₄
4	Mentona	28.68	C ₁₀ H ₁₈ O	10	Verbenona	1.24	C ₁₀ H ₁₄ O
5	p-Mentona	4.38	C ₁₀ H ₁₈ O	11	Cariofileno	7.18	C ₁₅ H ₂₄
6	5,9-dimetil-4,8-Decadienal	0.9	C ₁₂ H ₂₀ O	12	Espatuleno	4.13	C ₁₅ H ₂₄ O

^a Área de pico: porcentaje de componentes. Son presentados los componentes con un porcentaje $\geq 5\%$.

Pulegona, el componente principal en la composición química de CMEO, presenta diversas propiedades biológicas, como actividad antimicrobiana, antihistamínica, antipirética, convulsiva, hepatotóxica e hipercolesterolémica, así como también es un potente abortivo. Además, se ha demostrado que posee propiedades antialimentarias, pesticidas y repelentes de insectos, y que los aceites esenciales ricos en pulegona presentan actividades antiparasitarias y de inhibición de la brotación de la papa. Comercialmente, se utiliza como agente saborizante en pastas dentales y enjuagues bucales, y como ingrediente valioso en perfumes y diversos productos farmacéuticos (Božovic *et al.*, 2017). De acuerdo con Farouk *et al.* (2021), los aceites esenciales ricos

en pulegona, presentan una baja actividad de eliminación de radicales libres, sin embargo, parece haber un consenso general de que los efectos antioxidantes de los aceites esenciales no pueden explicarse simplemente por la acción de sus componentes principales (Kasrati *et al.*, 2017).

A mentona, segundo compuesto mayoritario del CMEO, también se le atribuyen propiedades antifúngicas y antibacterianas así como insecticidas y repelentes (Saad *et al.*, 2019). Acerca de los principales componentes del CMEO, pulegona y mentona, también se ha reportado su presencia en el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum*, *Clinopodium odorum*, *Clinopodium macrostemum* var. *Laevigatum*, (Villa-Ruano *et al.*, 2015) y *Clinopodium gilliesii* (Barbieri *et al.*, 2016).

7.1.3 Comparación de hidrodestilación tradicional con hidrodestilación asistida con ultrasonido

En la extracción de CMEO bajo hidrodestilación tradicional, sin previo ultrasonido, a una relación líquido – sólido de 80 g/L durante 120 min se obtuvo una masa de CMEO por masa de materia prima seca de $0.87 \pm 0.06\%$, con valores de IC_{50} DPPH = 221 ± 1 mg/mL e IC_{50} ABTS = 16.6 ± 1.8 mg/mL. Cabe destacar que, si bien la masa de CMEO obtenida fue mayor en comparación con las condiciones óptimas obtenidas a través del análisis de diseño factorial 2^3 , los resultados de actividad antioxidante fueron superiores en estas condiciones (masa de CMEO por masa de materia prima seca de $0.78 \pm 0.07\%$, un IC_{50} DPPH = 189 ± 8 mg/mL e IC_{50} ABTS = 16.4 ± 0.2 mg/mL).

7.1.4 Toxicidad del aceite esencial

Se evaluó la toxicidad del CMEO mediante el modelo *in vivo* *Artemia salina*, y se obtuvo una LC_{50} de 32 μ g/mL, valor comparable con el de aceites esenciales de otras plantas como *Thymus mastichina* (32 μ g/mL) (Arantes *et al.*, 2019). Aunque la LC_{50} del CMEO podría interpretarse como la de un aceite esencial altamente tóxico (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2022), este podría ser utilizado con seguridad como antioxidante, ya que los aceites esenciales son compuestos volátiles que se descomponen fácilmente y los residuos del aceite deberían ser inofensivos si se permite

suficiente tiempo entre la aplicación y el consumo del producto impregnado con aceite esencial (Juárez *et al.*, 2015). En comparación, el aceite esencial de *Myristica fragrans* presenta una LC₅₀ de 31.05 µg/mL (Zheng & Bossier, 2023) y es considerado GRAS (sustancia generalmente reconocida como segura) por la FDA, lo mismo que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. (LC₅₀ = 60.38 µg/mL) (Niksic *et al.*, 2021). Hay que agregar también que, los aceites esenciales que presentan valores de LC₅₀ por debajo de 1000 µg/mL son considerados como buenos agentes bioactivos. Específicamente, cuando un aceite esencial y/o extracto vegetal demuestra actividad a 100 µg/mL o menos se afirma que posee una fuerte actividad citotóxica (da Silva Ramos *et al.*, 2017). A la fecha, no se tiene noticia de que la toxicidad del CMEO haya sido reportada y serían necesarios más estudios o pruebas en otros modelos para conocer mejor su comportamiento en humanos.

7.2 *Agastache mexicana subsp. mexicana*

Para la extracción de AMMEO mediante hidrodestilación salina, se aplicó la metodología de superficie de respuesta con tres variables independientes (concentración de NaCl: A, tiempo de remojo: B y relación líquido –sólido: C) para investigar su efecto sobre las variables dependientes (masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca, IC₅₀ DPPH, IC₅₀ ABTS). Esto a través de un diseño central compuesto (CCD) que consistió de 18 puntos (8 puntos factoriales, 6 puntos axiales y 3 puntos centrales). Los datos experimentales obtenidos se presentan en la Tabla 7.4.

Tabla 7.4. Puntos experimentales del diseño central compuesto y datos experimentales para la extracción de AMMEO.

Experimento ^a	Variables codificadas			Variables sin codificar			Respuestas experimentales			Respuestas predichas por RSM	
	A	B	C	Concentración de NaCl (%w/w)	Tiempo de remojo (min)	Relación líquido – sólido (mL/g)	Masa AMMEO/ masa MP seca (%)	IC ₅₀ DPPH (mg/mL)	IC ₅₀ ABTS (mg/mL)	IC ₅₀ DPPH (mg/mL)	IC ₅₀ ABTS (mg/mL)
1	-1	-1	-1	1.53	31.2	25.2	1.88	65±1	26.6±0.2	65	27
2	1	-1	-1	6.00	31.2	25.2	2.00	70±1	28.4±0.1	71	28
3	-1	1	-1	1.53	120	25.2	2.09	43±1	21.5±0.1	48	22
4	1	1	-1	6.00	120	25.2	2.11	57±3	23.2±0.1	55	23
5	-1	-1	1	1.53	31.2	46.0	2.20	80±1	31.9±0.7	84	34
6	1	-1	1	6.00	31.2	46.0	2.20	70±0	28.5±0.4	71	31
7	-1	1	1	1.53	120	46.0	1.89	71±1	28.9±0.0	75	30
8	1	1	1	6.00	120	46.0	2.04	60±1	26.5±0.0	61	26
9	-1.68	0	0	0	75.6	35.6	2.10	67±1	27.2±0.2	61	25
10	1.68	0	0	7.52	75.6	35.6	2.09	55±1	23.6±0.1	55	23
11	0	-1.68	0	3.77	0	35.6	2.14	78±1	32.1±0.7	76	30
12	0	1.68	0	3.77	150	35.6	2.34	57±0	23.5±0.3	54	23
13	0	0	-1.68	3.77	75.6	18.1	2.06	64±1	26.6±0.3	63	27
14	0	0	1.68	3.77	75.6	53.1	2.41	89±0	38.4±0.2	85	36
15	0	0	0	3.77	75.6	35.6	2.00	56±0	23.4±0.0	58	24
16	0	0	0	3.77	75.6	35.6	1.86	56±1	23.0±0.2	58	24
17	0	0	0	3.77	75.6	35.6	2.18	59±1	25.5±0.5	58	24

^a los experimentos fueron llevados a cabo de manera aleatoria.

7.2.1.1 Masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca (% w/w)

La masa de AMMEO obtenido por masa de materia prima seca experimental para diferentes combinaciones (según el diseño de experimentos CCD) se encuentra presentado en la Tabla 7.4. Como puede observarse, se obtuvo un porcentaje de masa de AMMEO obtenido por masa de materia prima seca entre 1.86 y 2.34% (%w/w). Como se puede apreciar, esta cantidad es similar y ligeramente superior a la reportada por Palma-Tenango *et al.* (2021) (2.26%) lo que podría atribuirse al lugar donde ha crecido la planta y/o a la época de cosecha. Otros investigadores han informado del uso de hidrodestilación salina para aumentar el rendimiento del aceite esencial como lo es el caso de Chen *et al.* (2021) quienes reportaron un rendimiento de 2.67% en la extracción de aceite esencial de *Rosmarinus officinales* L. obtenido por hidrodestilación en presencia de NaCl al 5% y una relación agua – material 1:3. Por otro lado, en la extracción del aceite esencial de *Thuja koraiensis* Nakai obtenido por hidrodestilación salina (utilizando NaCl al 6.56% y una relación sólido – líquido de 50 g/400 mL), se obtuvo un rendimiento máximo de 1.1712% (Fu *et al.*,2022). En nuestro estudio, la cantidad más alta de masa de AMMEO por masa de materia prima seca obtenida fue 2.34% con 3.77% de concentración de NaCl, 150 min de tiempo de remojo y una relación líquido – sólido de 35.6 g/mL.

El Análisis de Varianza, para la variable de respuesta masa de AMMEO/masa de materia prima seca, así como los estadísticos descriptivos, R^2 (0.5137) y R^2 ajustado (0.000), indicaron que no es posible representar una aproximación de los resultados experimentales a través de un modelo polinomial de segundo orden.

7.2.1.2 Actividad antioxidante del AMMEO

En la Tabla 7.4, se puede observar que, la actividad antioxidante medida a través del método DPPH y expresada mediante el valor de IC_{50} , varía de 43 ± 1 a 89 ± 0 mg/mL. A la fecha, no se tiene noticia de que se haya reportado la actividad antioxidante del AMMEO. En todo caso, Ibarra-Alvarado *et al.* (2010) reportaron el IC_{50} DPPH del extracto acuoso de *Agastache mexicana* (Kunth) Lint & Epling como 0.5023 ± 0.001

mg/mL y Najar *et al.* (2019) reportaron el IC₅₀ DPPH de las flores comestibles de *Agastache mexicana* (Kunth) Lint & Epling (sin especificar la subespecie) como 1.40 ± 0.05 mg/mL.

De acuerdo con Najar *et al.* (2019), la variabilidad en los resultados entre las especies de *Agastache* podría estar relacionada con el tiempo de cosecha así como con las condiciones medioambientales o métodos de cultivo utilizados aunque también podría atribuirse dicha variación a la subespecie a la que pertenecen las plantas y/o la parte de la planta de la que se extrajo el aceite esencial.

Se aplicó un Análisis de Varianza para el modelo de superficie de respuesta en el que se obtuvo un valor alto en el coeficiente de determinación ($R^2 = 92.92\%$) y concordante con el coeficiente de determinación ajustado (adj. $R^2 = 87.41\%$) lo que demuestra que el modelo es factible, por lo que podemos afirmar que existe un buen grado de correlación entre los valores actuales y predichos (Chen *et al.*, 2017). Además del coeficiente de determinación, la prueba F fue usada para determinar la existencia de significancia estadística así como los coeficientes de regresión de cada uno de los parámetros. En este análisis, los valores F y P de 7.56 y 0.122 para falta de ajuste sugieren que esta no es significativa, esto es, existe una muy buena concordancia entre los datos experimentales y los valores predichos. Otro indicador más que se tomó en cuenta fue el error puro, que en este caso fue muy bajo, lo que sugiere una buena reproducibilidad de los datos obtenidos. En resumen, todo lo anterior confirmó la validez del modelo. Además, el Análisis de Varianza para el IC₅₀ DPPH del AMMEO indicó que resultaron significativos los parámetros tiempo de remojo (B) y relación líquido – sólido (C) en su forma lineal y cuadrática (B^2 , C^2) así como la interacción concentración de NaCl con relación líquido – sólido (AC).

Se efectuó un análisis de regresión a los datos experimentales de la actividad antioxidante del AMMEO donde las variables examinadas y las respuestas fueron ajustadas a un modelo polinomial de segundo orden obteniéndose la siguiente ecuación de acuerdo con los valores codificados:

$$IC_{50}DPPH = 57.88 - 1.64A - 6.48B + 6.43C + 2.56B^2 + 5.68C^2 - 4.94AC + 1.89BC \quad (7.3)$$

Donde IC_{50} DPPH se refiere a la actividad antioxidante del AMMEO expresada mediante el IC_{50} (mg/mL) y determinada por el método DPPH; A, se refiere a la concentración de NaCl; B, al tiempo de remojo y C, a la relación líquido – sólido.

Como se puede observar en la ecuación 7.3, el factor relación líquido – sólido ejerció un efecto positivo en la respuesta, al contrario que el factor tiempo de remojo que ejerció un efecto negativo, esto es, una disminución en la relación líquido – sólido llevaría a una disminución en el valor del IC_{50} DPPH del AMMEO lo mismo que un aumento en el tiempo de remojo, lo que podría indicar que un largo periodo de remojo favorecería la extracción de compuestos antioxidantes que de otra forma no podrían ser extraídos (Fu *et al.*, 2022). De acuerdo con Zhang *et al.* (2020) remojar la planta en la cantidad adecuada de agua (relación líquido – sólido) contribuye a la expansión de la célula y la absorción de energía, promoviéndose así la ruptura de la pared celular sin embargo, si la relación líquido – sólido se vuelve muy grande, ciertos componentes del aceite esencial podrían sufrir hidrólisis al sobrecalentarse; el remojo también podría disminuir la resistencia a la transferencia de masa y la liberación del aceite esencial de manera más sencilla. Como se mencionó anteriormente, en un exceso de agua, los compuestos de los aceites esenciales podrían disolverse y/o transformarse químicamente, en cambio, un volumen más pequeño de agua en el matraz permitiría más espacio para el movimiento del vapor de agua y el aceite esencial durante la destilación, lo que favorecería la extracción de compuestos antioxidantes del aceite esencial. Sin embargo, si la relación líquido – sólido se aumenta demasiado, el material vegetal podría sobrecalentarse afectando la composición química del aceite esencial obtenido (Cui *et al.*, 2018; Nizio *et al.*, 2018).

De acuerdo con Madhumita *et al.* (2019) un gráfico de superficie de respuesta tridimensional es capaz de expresar de una forma excelente tanto los efectos lineales como de interacción y cuadráticos de los parámetros de extracción sobre la respuesta manteniendo la tercera variable en el nivel cero, lo que puede ayudar al investigador a determinar la dirección a seguir para aumentar o disminuir una respuesta deseada. Por

otro lado, ya que muchas veces no resulta sencillo determinar los niveles de los parámetros, se construyen también gráficos de contorno de las mismas variables. En la gráfica de contorno, se dibujan curvas con valores de respuesta iguales en un plano cuyas coordenadas muestran los niveles de las variables independientes (Sodeifian *et al.*, 2016).

Las gráficas de contorno del IC₅₀ DPPH del AMMEO en función de las variables independientes dentro del rango experimental se muestran en la Figura 7.1, estas gráficas fueron generadas utilizando el modelo empírico presentado en la ecuación 7.3. Se muestra el efecto de la concentración de NaCl (A), el tiempo de remojo (B) y la relación líquido – sólido (C) en la respuesta a una masa de materia prima fija (25 g).

La Figura 7.1a muestra la interacción de la concentración de NaCl y tiempo de remojo en el IC₅₀ DPPH del AMXEO en una relación líquido – sólido fija (35.6 mL/g), la Figura 7.1b indica la interacción de la concentración de NaCl y relación líquido – sólido en el IC₅₀ DPPH del AMXEO en un tiempo de remojo fijo (75.6 min), y la Figura 7.1c presenta la interacción entre el tiempo de remojo y la relación líquido – sólido en el IC₅₀ DPPH del AMXEO a una concentración de NaCl fija (3.77%).

Como se puede observar en la Figura 7.1, es posible obtener valores bajos de IC₅₀ DPPH tanto en el nivel bajo como alto de la concentración de NaCl, por lo que es posible llevar a cabo la extracción en ambas regiones de la superficie sin embargo se observa que se puede obtener un IC₅₀ bajo pudiendo aumentar la relación líquido – sólido aumentando la concentración de NaCl. Esto resulta útil ya que en niveles bajos de la relación líquido – sólido existe el peligro de sobrecalentar el material vegetal y afectar la composición química del aceite esencial como lo reportan Cui *et al.* (2018) y Nizio *et al.* (2018).

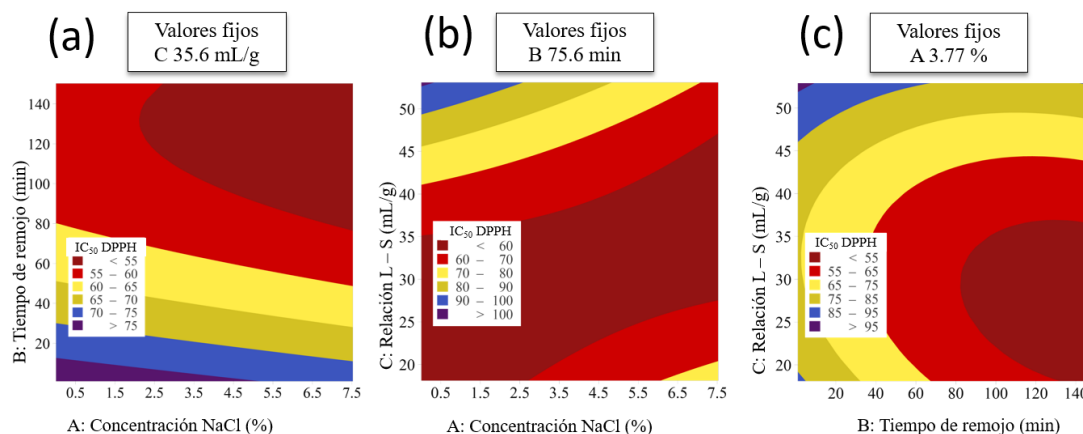


Figura 7.1. Gráficas de contorno para el efecto de (a) concentración de NaCl y tiempo de remojo (b) concentración de NaCl y relación líquido – sólido (c) tiempo de remojo y relación líquido – sólido sobre la actividad antioxidante (IC₅₀ DPPH) del AMMEO.

En la Tabla 7.4 se observa que la actividad antioxidante del AMMEO, medida mediante el método ABTS y expresada como IC₅₀, varía de 21.5 ± 0.1 a 38.4 ± 0.2 mg/mL. Hasta ahora, no se ha informado sobre la actividad antioxidante del AMMEO determinada mediante el método ABTS. Aunque el género *Agastache* es importante en la fitoterapia tradicional y la botánica económica en diversas regiones, sorprendentemente, hay pocos artículos que describan específicamente su actividad antioxidante, a diferencia de muchas otras plantas alimenticias y medicinales relacionadas (Zielińska *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha informado que el extracto hidrometanólico de *Agastache foeniculum* tiene una actividad antioxidante de 67.3 ± 1.9 μ molTE/g según el método ABTS (Skrypnik *et al.*, 2022). Asimismo, se ha reportado que los extractos etanólicos de *Agastache foeniculum*, *Agastache rugosa* y *Agastache urticifolia* tienen una actividad antioxidante de 398.52 ± 4.32 , 268.36 ± 4.59 y 398.73 ± 2.77 mg de ácido ascórbico equivalentes por gramo de peso seco, respectivamente, según el método ABTS (Heo *et al.*, 2022). Además, se ha observado que la actividad antioxidante del AMMEO es comparable a la del aceite esencial de las partes aéreas de *Thymus algeriensis* Boiss (10.840 mg/mL) (Ouakouak *et al.* 2021).

Se realizó un Análisis de Varianza para el modelo de superficie de respuesta de la variable IC₅₀ DPPH, cuyos resultados indicaron que el modelo es significativo y

representa adecuadamente los datos ($R^2 = 89.63\%$, R^2 ajustado = 83.41%). Además, no se observó una falta de ajuste significativa al nivel de confianza del 95% para el modelo reducido final y el valor del error puro fue bajo, lo que sugiere buena reproducibilidad de los datos. El análisis de regresión a los datos experimentales de la actividad antioxidante del AMMEO ajustado a un modelo polinomial de segundo orden arrojó la siguiente ecuación de acuerdo con los valores codificados en la que se indican con negrita los parámetros que resultaron significativos según el Análisis de Varianza:

$$IC_{50}ABTS = 24.196 - 0.612 A - 2.179 \mathbf{B} + 2.632 \mathbf{C} + 0.907 B^2 + 2.569 C^2 - 1.163 AC \quad (7.4)$$

Donde IC_{50} ABTS se refiere a la actividad antioxidante del AMMEO representada por el IC_{50} (expresado en mg/mL) y determinada por el método ABTS. A, concentración de NaCl; B, tiempo de remojo y C, relación líquido – sólido.

La ecuación 7.3 muestra que el factor relación líquido-sólido tuvo un efecto positivo en la respuesta, a diferencia del factor tiempo de remojo que tuvo un efecto negativo. Esto significa que una disminución en la relación líquido-sólido resultará en una disminución en el valor del IC_{50} ABTS del AMMEO, al igual que un aumento en el tiempo de remojo. Estas condiciones son consistentes con los resultados obtenidos al analizar el IC_{50} DPPH. Por lo tanto, podemos concluir que un periodo de remojo prolongado o una menor relación líquido-sólido favorecen la extracción de compuestos antioxidantes que de otro modo no podrían ser obtenidos (Fu *et al.*, 2022).

Nuevamente, se recomienda no reducir demasiado la relación líquido-sólido debido a que esto podría provocar un sobrecalentamiento del material vegetal y afectar la composición química del aceite esencial obtenido (Cui *et al.*, 2018; Nizio *et al.*, 2018).

También se construyeron las gráficas de contorno con el objetivo de expresar los efectos de interacción de los parámetros de extracción sobre la respuesta manteniendo la tercera variable en el nivel cero. Estas gráficas se generaron utilizando el modelo empírico presentado en la ecuación 7.4. En la Figura 7.2 se muestra el efecto de la concentración de NaCl (A), el tiempo de remojo (B) y la relación líquido – sólido (C)

en la respuesta IC₅₀ ABTS del AMMEO a una masa de materia prima fija (25 g), sin embargo, de acuerdo con el análisis de varianza, ninguna de las interacciones es significativa.

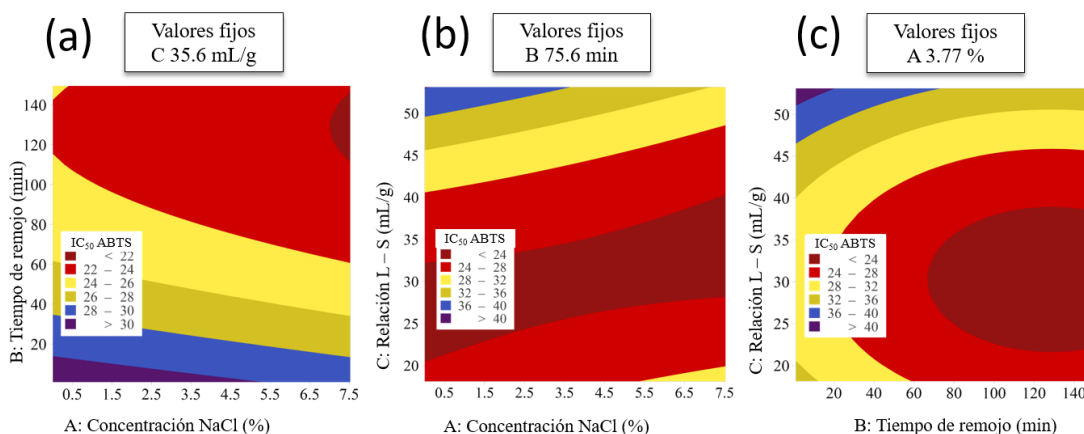


Figura 7.2. Gráficas de contorno para el efecto de (a) concentración de NaCl y tiempo de remojo (b) concentración de NaCl y relación líquido – sólido (c) tiempo de remojo y relación líquido – sólido sobre la actividad antioxidante (IC₅₀ ABTS) del AMMEO.

7.2.3 Optimización global de la extracción de AMMEO

Con la ayuda del software Minitab Versión 21.3, se utilizó el método de función de deseabilidad para determinar las condiciones en las que las variables de respuesta resultaran mínimas dentro de los rangos estudiados de concentración de NaCl, tiempo de remojo y relación líquido – sólido. Los resultados de la optimización indicaron que las condiciones a las que se obtendría la mejor actividad antioxidante predicha serían 6.00% de concentración de NaCl, 125 min de tiempo de remojo y 31.2 mL/g de relación líquido – sólido. Bajo estas condiciones óptimas, el valor correspondiente de IC₅₀ DPPH sería 51.8 mg/mL y el valor correspondiente de IC₅₀ ABTS sería 22.1 mg/mL, con una deseabilidad compuesta de 0.8856 lo que apunta hacia una gran posibilidad de lograr el objetivo de optimización (Figura 7.3).

Una vez que fueron determinadas las condiciones óptimas de extracción, se llevaron a cabo experimentos en dichas condiciones (por triplicado) para comprobar la veracidad del modelo empírico desarrollado encontrándose un IC₅₀ DPPH de 46.7±0.378 mg/mL

e IC₅₀ ABTS de 18.0±0.0955 mg/mL, como puede observarse, ambos valores se encuentran bastante cercanos a los predichos lo que confirma la buena compatibilidad con el modelo propuesto además de mostrar potencial en implicaciones prácticas.

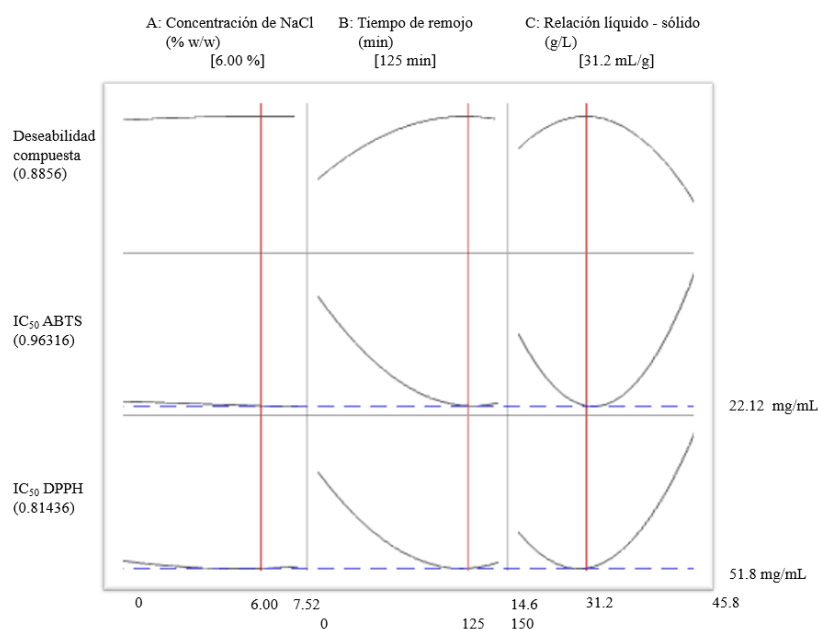


Figura 7.3. Perfiles de la función de deseabilidad y valores de la respuesta predicha para la optimización de la obtención de AMMEO

7.2.4 Composición química del aceite esencial

Se llevó a cabo un análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas al AMMEO obtenido mediante hidrodestilación para identificar los compuestos presentes en dicho aceite. En la Tabla 7.5 se presentan los 18 compuestos principales (que representan más del 95% del total de los componentes). Como se mencionó anteriormente, existen otras publicaciones que mencionan los componentes del aceite esencial de dicha planta. Se observa que coinciden en la presencia de ciertos compuestos químicos como nerol (Najar *et al.*, 2019; Carrillo-Galván *et al.*, 2020), citral (Najar *et al.*, 2019), acetato de nerilo (Najar *et al.*, 2019), D-limoneno (González-Ramírez *et al.*, 2021; Navarrete *et al.*, 2016). Las diferencias entre los componentes del

aceite esencial de la misma planta se pueden atribuir al origen geográfico de esta (Rhimi *et al.*, 2022) o a la existencia de diferentes quimiotipos (Barbieri *et al.*, 2016).

Acerca del nerol, que es el principal componente del AMMEO, también se ha reportado su presencia en extractos de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* (Palma-Tenango *et al.*, 2021) y en el aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* presentado en la sección 7.2.4, a este compuesto se le atribuyen las propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias del extracto hexanoico de AMM (de Cássia da Silveira e Sá *et al.*, 2017). Como se mencionó anteriormente, el nerol también se encuentra dentro de los componentes del aceite esencial de *Citrus aurantium* (de Cássia da Silveira e Sá *et al.*, 2017), *Artemisia jacutica* (Dylenova *et al.*, 2021), *Paeonia x suffruticosa* Andr (Lei *et al.*, 2022), así como en el de *Amomum tsaoko* Crevost et Lemarie (Liao *et al.*, 2022).

Tabla 7.5. Compuestos identificados en el AMMEO mediante GC-MS.

No.	Compuesto químico	Área de pico ^a	Fórmula molecular	No.	Compuesto químico	Área de pico ^a	Fórmula molecular
1	β-pineno	1.2	C ₁₀ H ₁₆	10	γ-Elemeno	1.39	C ₁₅ H ₂₄
2	D-Limoneno	5.7	C ₁₀ H ₁₆	11	δ-Cadineno	0.6	C ₁₅ H ₂₄
3	trans-Isopulegona	15.19	C ₁₀ H ₁₆ O	12	Espatuleno	1.04	C ₁₅ H ₂₄ O
4	Citral	10.03	C ₁₀ H ₁₆ O	13	Epoxido isoaromadendreno	0.66	C ₁₅ H ₂₄ O
5	Nerol	31.42	C ₁₀ H ₁₈ O	14	τ-Muurolo	0.57	C ₁₅ H ₂₆ O
6	Acetato de nerilo	13.65	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	15	1-Heptatriacotanol	6.12	C ₃₇ H ₇₆ O
7	Verbenona	0.84	C ₁₀ H ₁₄ O	16	Diepoxi triciclo (20.8.0.0 (7,16) triacotano, 1(2), 7(16)	0.57	C ₃₀ H ₅₂ O ₂
8	β-Farneseno	1.51	C ₁₅ H ₂₄	17	Rhodopina	1.45	C ₄₀ H ₅₈ O
9	Germacreno D	3.9	C ₁₅ H ₂₄	18	Etil-iso-alocolato	0.59	C ₂₆ H ₄₄ O ₅

^a Área de pico: porcentaje de componentes. Son presentados los componentes con un porcentaje ≥ 5%

De acuerdo con (Yin *et al.*, 2022) el nerol y el citral otorgan una fragancia floral al aroma del aceite esencial. Por otro lado, el citral suele ser uno de los principales componentes del aceite esencial de *Zingiber officinale* al que se le atribuyen sus propiedades antifúngicas y antibacteriales (Kalhor *et al.*, 2022). La capacidad del AMMEO para atrapar radicales libres podría atribuirse al nerol y D-Limoneno presentes en dicho aceite esencial, Sanchez-Martínez *et al.* (2021) han reportado una

clara correlación entre la acción protectora frente al daño oxidativo y el contenido de C10 del limoneno y nerol. Acerca del D-limoneno se sabe que sus múltiples enlaces dobles insaturados le confieren una fuerte capacidad de suministro de hidrógeno y efectos antioxidantes (Yu *et al.*, 2021).

7.2.5 Comparación de hidrodestilación salina con hidrodestilación tradicional

El AMMEO se extrajo mediante hidrodestilación tradicional, sin adición de NaCl ni remojo, utilizando una relación líquido – sólido de 72 mL/g durante 120 minutos. Se obtuvo una actividad antioxidante con IC₅₀ DPPH de 91.3±1.4 mg/mL y un valor de IC₅₀ ABTS de 39.0±0.6 mg/mL. En comparación con los valores obtenidos mediante hidrodestilación salina bajo las condiciones óptimas (IC₅₀ DPPH de 46.7±0.4 mg/mL e IC₅₀ ABTS de 18.0±0.1 mg/mL), queda claro que el tratamiento utilizado en esta investigación fue efectivo para mejorar la actividad antioxidante del AMMEO.

7.2.6 Toxicidad del aceite esencial

Mediante el estudio *in vivo* (*Artemia salina*) se determinó la toxicidad del AMMEO, se encontró una LC₅₀ de 23 µg/mL. Este valor es comparable con el de otros aceites esenciales como el de *Origanum vulgare* L. (14.91 µg/mL) y *Laurus nobilis* L. (89.88 µg/mL), según Leite *et al.* (2009). Aunque se podría interpretar que esta LC₅₀ indica una alta toxicidad, algunos investigadores sugieren que el aceite esencial podría utilizarse de manera segura como antioxidante, ya estos son compuestos volátiles que se degradan fácilmente y, por lo tanto, sus residuos deberían ser inofensivos si se permite suficiente tiempo entre la aplicación y el consumo del producto impregnado con el aceite esencial (Juárez *et al.*, 2015). Y es importante también tomar en cuenta que, debido a su bajo valor de LC₅₀, el aceite esencial podría presentar una cierta actividad citotóxica (da Silva Ramos *et al.*, 2017). Aunque no se ha informado previamente sobre la toxicidad del AMMEO, sí se ha reportado que la LC₅₀ de los extractos acuosos de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* en ratones fue inferior a 5000 mg/kg cuando se administraron por vía oral. De la misma forma que se señaló

para el caso del CMEO, se sugiere llevar a cabo más investigaciones para comprender mejor su comportamiento en humanos.

7.3 *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*

En la extracción de AMXEO mediante hidrodestilación asistida por surfactante, se utilizó la metodología de superficie de respuesta con tres variables independientes: concentración de Tween 20 (A), relación sólido-líquido (B) y tiempo de extracción (C), para investigar su efecto en las variables dependientes: masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca, IC₅₀ DPPH e IC₅₀ ABTS. Se evaluaron los coeficientes de correlación (R^2), R^2 ajustado, falta de ajuste y valor P, así como se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para seleccionar el modelo adecuado. Los datos experimentales obtenidos se presentan en la Tabla 7.6, utilizando un diseño central compuesto centrado en las caras (CCF).

7.3.1 Masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca (% w/w)

En la Tabla 7.6, se puede observar que la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca varió entre el 1.19 y 2.63% (% w/w). Es importante destacar que esta cantidad es mayor que la reportada por Palma-Tenango *et al.* (2021) (1.2%), lo cual podría atribuirse al lugar de crecimiento de la planta y/o a la época de cosecha. Otros estudios han informado sobre el uso de tensioactivos para aumentar el rendimiento del aceite esencial. Por ejemplo, Charchari & Abdelli (2014) reportaron un rendimiento del 1.83% en la extracción de aceite esencial de *Salvia officinalis* L. utilizando hidrodestilación en presencia de una solución de Tween 20 al 0.5%. En nuestro estudio, la mayor cantidad de masa de aceite esencial obtenido por masa de materia prima seca obtenida fue del 2.63% utilizando una concentración de Tween 20 de 0.001 g/mL, una relación sólido – líquido de 21.8 mL/g y un tiempo de extracción de 30 min.

Tabla 7.6. Puntos experimentales del diseño central compuesto centrado en las caras y datos experimentales.

Experimento ^a	Variables codificadas			Variables sin codificar			Respuestas experimentales			Respuestas predichas por RSM	
	A	B	C	Concentración de Tween 20 (g/mL)	Relación sólido-líquido (mL/g)	Tiempo de extracción (min)	Masa AMXEO/masa MP seca (%)	IC ₅₀ DPPH (mg/mL)	IC ₅₀ ABTS (mg/mL)	Masa AMXEO/masa MP seca (%)	IC ₅₀ DPPH (mg/mL)
1	-1	-1	-1	0.001	15.8	30	1.35	83	34.8	1.47	88
2	1	-1	-1	0.007	15.8	30	1.61	167	50.1	1.60	167
3	-1	1	-1	0.001	45.8	30	2.63	101	28.0	2.62	102
4	1	1	-1	0.007	45.8	30	2.16	125	26.3	2.24	133
5	-1	-1	1	0.001	15.8	180	2.09	90	28.1	2.04	83
6	1	-1	1	0.007	15.8	180	1.68	132	29.1	1.72	133
7	-1	1	1	0.001	45.8	180	2.40	66	27.4	2.44	67
8	1	1	1	0.007	45.8	180	1.71	74	22.3	1.62	69
9	-1	0	0	0.001	30.8	105	1.93	63	38.2	1.83	44
10	1	0	0	0.007	30.8	105	1.51	88	31.6	1.48	84
11	0	-1	0	0.004	15.8	105	1.38	102	27.4	1.27	102
12	0	1	0	0.004	45.8	105	1.81	82	33.7	1.70	77
13	0	0	-1	0.004	30.8	30	1.71	122	53.8	1.52	108
14	0	0	1	0.004	30.8	180	1.43	64	19.7	1.49	73
15	0	0	0	0.004	30.8	105	1.19	68	22.0	1.36	70
16	0	0	0	0.004	30.8	105	1.22	62	21.1	1.36	70
17	0	0	0	0.004	30.8	105	1.33	70	24.4	1.36	70
18	0	0	0	0.004	30.8	105	1.42	71	31.7	1.36	70

^a Los experimentos fueron llevados a cabo de manera aleatoria.

El Análisis de Varianza para el modelo de superficie de respuesta de la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca indica que, de los tres factores lineales evaluados, tanto la concentración de Tween 20 ($P < 0.05$) como la relación sólido-líquido ($P < 0.05$) tuvieron efectos significativos en el rendimiento de extracción. Sin embargo, el factor de tiempo de extracción no mostró un efecto significativo en el rendimiento. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos realizados por Cui *et al.* (2018), quienes también encontraron que la relación sólido-líquido era un factor relevante en el rendimiento de extracción, mientras que el tiempo de extracción no lo era. En cuanto a los factores cuadráticos, solo la concentración de Tween (A^2) mostró un efecto significativo ($P < 0.05$). Además, aunque el tiempo de extracción (C) no tuvo un efecto lineal o cuadrático significativo, se observó una interacción significativa entre la relación sólido-líquido y el tiempo de extracción (BC) ($P = 0.005$).

El valor R^2 (0.9459) indica una buena concordancia entre los valores experimentales y predichos, y está razonablemente de acuerdo con el R^2 ajustado, lo que demuestra que el modelo predicho representa de manera adecuada los valores observados. La falta de ajuste, resultó insignificante en comparación con el error puro, lo que confirma que el modelo fue lo suficientemente preciso para predecir la respuesta relevante. Es importante tener en cuenta que, según Montgomery (2006), el modelo estadístico empírico y la región óptima recomendada solo son válidos dentro de los rangos de la variable independiente estudiada. Por lo tanto, no es posible extrapolar más allá de estos rangos y se deben tener precauciones al interpretar los resultados fuera de dichos límites.

Se realizó un análisis de regresión sobre los datos experimentales para la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca presentados en la Tabla 7.6. Las respuestas se ajustaron a la siguiente ecuación polinomial de segundo orden de acuerdo con los valores codificados:

$$Y = 1.3569 - 0.1730A + 0.2600B - 0.0150C + 0.2962A^2 + 0.1712B^2 + 0.1462C^2 - 0.1262AB - 0.1113AC - 0.1862BC \quad (7.5)$$

donde Y representa la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca (%), A: concentración de Tween 20, B: relación sólido – líquido y C: tiempo de extracción.

El modelo cuadrático reveló que las variables A² (cuadrática) y B (lineal) tuvieron un efecto positivo en la masa de aceite esencial (EO) obtenido por masa de materia prima seca mientras que la variable A (lineal) y las interacciones AB y BC mostraron efectos negativos. Estos resultados indican que reducir la concentración de Tween 20 y aumentar la relación sólido-líquido conducirían a un mayor rendimiento de extracción.

En relación con la concentración de Tween 20, estos hallazgos parecen contradecir investigaciones previas (Charchari & Abdelli, 2014; Solanki *et al.*, 2020), donde se ha reportado que agregar este surfactante al agua de destilación mejora el rendimiento de extracción, lo que podríamos atribuir a las diferencias en las glándulas de las plantas entre una especie y otra.

En cuanto a la influencia de la relación sólido-líquido, se explica que, al tener un volumen de agua más reducido en el matraz, se crea un mayor espacio para el movimiento del vapor de agua y el aceite esencial durante la destilación, lo que facilita la condensación del aceite esencial. No obstante, es crucial tener en cuenta que un aumento excesivo en la relación sólido-líquido puede provocar un sobrecalentamiento de los materiales vegetales, lo que se traduciría en un rendimiento más bajo en la extracción del aceite esencial (Cui *et al.*, 2018; Nizio *et al.*, 2018).

Las gráficas de contorno de la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca, en función de las variables independientes (dentro del rango experimental), se presentan en la Figura 7.4. Estas gráficas se generaron usando el modelo empírico descrito en la ecuación 7.5. Los gráficos de contorno muestran el efecto de la concentración de Tween 20 (A), la relación sólido – líquido (B) y el tiempo de extracción (C) en la respuesta (masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca).

La Figura 7.4a muestra la interacción de la concentración de Tween 20 y la relación sólido – líquido en la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca, manteniendo un tiempo de extracción constante (1.75 h). En la Figura 7.4b se ilustra la interacción de la concentración de Tween 20 y el tiempo de extracción en la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca, con una relación sólido – líquido fija de 32.5 mL/g. Por último, la Figura 7.4c presenta la interacción entre la relación sólido – líquido y el tiempo de extracción en la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca, con una concentración fija de Tween 20 de 0.004 g/mL. Estas interacciones entre variables resultaron significativas, como evidencia en los contornos elípticos de las Figuras 7.4a y 7.4c de acuerdo con Belhachat *et al.* (2018).

En términos de resultados, se observó que la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca aumentó conforme a medida que se incrementó la relación sólido – líquido. Esto implica que, al utilizar una menor cantidad de líquido en la extracción, se obtendrá una mayor cantidad de aceite esencial con relación a la masa de materia prima seca. Este fenómeno podría explicarse por el exceso de agua, según Nizio *et al.* (2018). Además, al reducir el volumen de agua en el matraz, se brinda más espacio para el movimiento del vapor de agua y el aceite esencial durante la destilación, lo que favorece una mayor condensación del aceite esencial. Sin embargo, es relevante destacar que un aumento excesivo en la relación sólido – líquido puede provocar un sobrecalentamiento de los materiales vegetales, lo cual resulta en un rendimiento más bajo de aceite esencial como señalan Cui *et al.* (2018). Por otro lado, la interacción entre la concentración de Tween 20 y el tiempo de extracción no mostró significativa según el ANOVA.

Con base en los resultados de la metodología de superficie de respuesta, utilizando el modelo presentado en la ecuación 7.5, la cantidad máxima de masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca se logró a una concentración de 0.001 g/mL de Tween 20, una relación sólido – líquido de 21.8 g/L y un tiempo de extracción de 30 min. En estas condiciones óptimas de extracción, el valor del rendimiento de extracción fue del 2.63%.

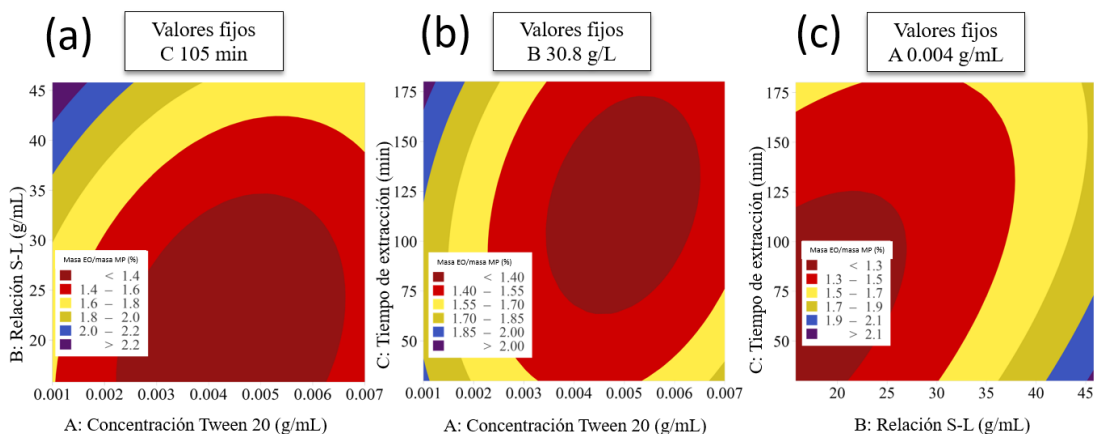


Figura 7.4. Gráficas de contorno para el efecto de (a) concentración de Tween 20 y relación sólido – líquido, (b) concentración de Tween 20 y tiempo de extracción, y (c) relación sólido – líquido y tiempo de extracción en la masa de AXMEO obtenido por masa de materia prima seca.

7.3.2 Actividad antioxidante del AMXEO

En la Tabla 7.6 se observa que el IC_{50} DPPH varió en un rango de 61.6 y 167 mg/mL. Investigaciones previas sobre plantas del mismo género, como *Agastache foeniculum* (IC_{50} DPPH de 1.61 ± 0.011 mg/mL) (Duda *et al.*, 2015) o *Agastache rugosa* Kuntze (IC_{50} DPPH de 0.00879 mg/mL) (Sun *et al.*, 2022), han informado valores diferentes. Según Najjar *et al.* (2019), estas discrepancias podrían atribuirse a la época de recolección, las condiciones ambientales o los métodos de cultivo empleados en las diferentes especies de *Agastache*.

Los resultados del ANOVA para el IC_{50} DPPH indican que el modelo polinomial fue estadísticamente significativo. Además, se obtuvieron valores favorables para el coeficiente de determinación ($R^2 = 0.9496$) y el coeficiente de determinación ajustado (adj. $R^2 = 0.8929$), lo cual indica un buen grado de correlación entre las variables. Asimismo, se encontró que la falta de ajuste del modelo no fue estadísticamente significativa, lo que respalda la validez del modelo. Es importante destacar que el error puro obtenido fue bajo, lo que sugiere una buena reproducibilidad de los datos. Es importante tener en cuenta que el modelo reducido final y la región óptima recomendada solo son válidos dentro de los rangos de variables independientes

estudiados, por lo que no es posible extrapolarlos más allá de estos rangos (Montgomery, 2006).

Con la ayuda de un análisis de regresión, utilizando los datos experimentales de la actividad antioxidante, la variable de respuesta IC_{50} DPPH fue ajustada a la siguiente ecuación polinomial de segundo grado de acuerdo con los valores codificados donde los parámetros que resultaron significativos se resaltan en negrita:

$$IC_{50}DPPH = 71.49 + 18.38\mathbf{A} - 12.56\mathbf{B} - 17.14\mathbf{C} + 0.15A^2 + 16.75\mathbf{B}^2 + 17.25\mathbf{C}^2 - 11.84\mathbf{AB} - 7.36AC - 7.36BC \quad (7.6)$$

Donde IC_{50} DPPH se refiere a la actividad antioxidante del AMXEO representada por el IC_{50} (expresado en mg/mL) y determinada por el método DPPH, A es la concentración de Tween 20, B la relación sólido – líquido y C el tiempo de extracción.

La ecuación 7.6 revela que el valor IC_{50} DPPH está positivamente relacionado con el efecto lineal de la concentración de Tween 20 (A) y los efectos cuadráticos de las variables (A^2 , B^2 y C^2). En cambio, es afectado negativamente por los efectos lineales de la relación líquido – sólido (B) y el tiempo de extracción (C), así como la interacción entre la concentración de Tween 20 y la relación sólido – líquido (AB). Es sabido que un menor valor de IC_{50} indica una mejor actividad antioxidante del aceite esencial. Por lo tanto, una mayor relación sólido – líquido o un tiempo de extracción más prolongado (dentro de los rangos estudiados) contribuirían a una mejor actividad antioxidante del aceite esencial, a diferencia de la concentración de Tween 20. En relación al tiempo de extracción, prolongarlo parece favorecer una mejor actividad antioxidante debido a que los compuestos antioxidantes podrían encontrarse en el centro de las células vegetales, lo que retrasaría la llegada del agua a través de la matriz de la planta para disolverlos. También podría suceder que estos compuestos podrían no ser fácilmente solubles en el agua de destilación, lo que requeriría más tiempo para su extracción. Sin embargo, prolongar demasiado el tiempo de extracción podría favorecer la descomposición de compuestos volátiles, especialmente los insaturados, esterificados y fenólicos (Heydari *et al.*, 2021).

La Figura 7.5 muestra los gráficos de contorno para los tres parámetros independientes. En la figura 7.5a, se observa la interacción entre la concentración de Tween 20 y la relación sólido – líquido en el IC₅₀ DPPH, con un tiempo de extracción fijo de 105 min. En la Figura 7.5b se muestra la interacción entre la concentración de Tween 20 y el tiempo de extracción en el IC₅₀ DPPH, con una relación sólido – líquido fija de 30.8 g/L. Finalmente la Figura 7.5c presenta la interacción entre la relación sólido – líquido y el tiempo de extracción en IC₅₀ DPPH con una concentración fija de Tween 20 de 0.004 g/mL.

En la Figura 7.5a se puede apreciar que una disminución en la concentración de Tween 20 se correlaciona con una disminución en el valor de IC₅₀ DPPH de AMXEO, lo que sugiere un posible cambio en la composición química del aceite esencial debido al uso de este aditivo. Según lo indicado por el Análisis de Varianza, las interacciones AB y BC no resultaron significativas ($P > 0.05$). Además, se observa que el valor mínimo de IC₅₀ se obtiene en los puntos centrales de los parámetros la relación sólido – líquido y el tiempo de extracción. Esto podría atribuirse al hecho de que un mayor tiempo de extracción facilita la extracción de compuestos antioxidantes que son más difíciles de extraer del material vegetal, como sugieren Nabet *et al.* (2019) y Heydari *et al.* (2021). Sin embargo, prolongar demasiado el tiempo de extracción podría alterar notablemente los compuestos obtenidos debido a la exposición prolongada a altas temperaturas (Bagheri *et al.*, 2014; Zeković *et al.*, 2014; Ferrentino *et al.*, 2020), lo que podría explicar por qué las condiciones óptimas para obtener un valor mínimo de IC₅₀ DPPH se encuentran en los puntos centrales.

Los resultados de la optimización indicaron que, en los rangos probados de las variables independientes, el IC₅₀ DPPH mínimo predicho utilizando el modelo presentado en la ecuación 7.6 fue de 51.87 mg/mL a una concentración de Tween 20 de 0.001 g/mL, una relación sólido – líquido de 32.16 g/L, y un tiempo de extracción de 127 min.

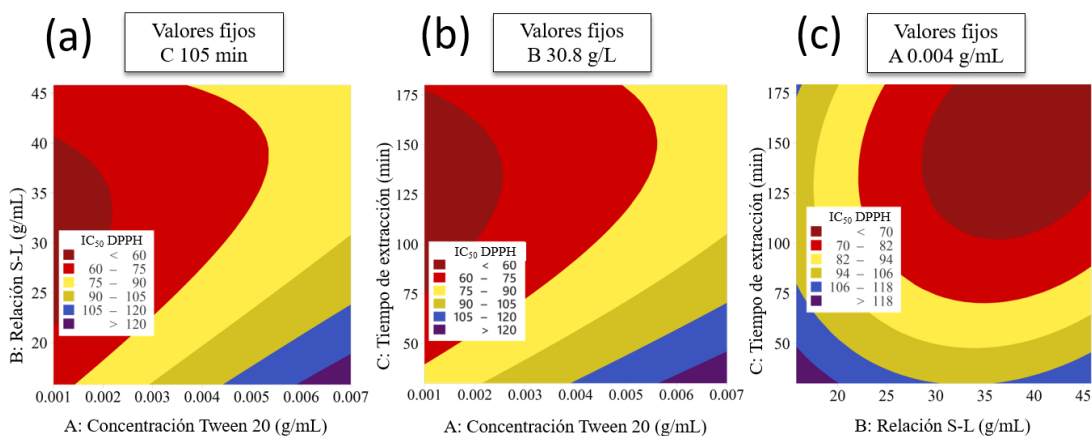


Figura 7.5. Gráficas de contorno para el efecto de (a) concentración de Tween 20 y relación sólido – líquido (b) concentración de Tween 20 y tiempo de extracción (c) relación sólido – líquido y tiempo de extracción sobre la actividad antioxidante (IC₅₀ DPPH) de AMXEO.

También se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple para investigar la relación entre las variables de extracción y el IC₅₀ determinado mediante el método ABTS. Sin embargo, el ANOVA reveló que ninguna de las tres variables independientes lineales probadas, ni sus interacciones ni efectos cuadráticos, tuvieron un efecto significativo en la capacidad de eliminación del radical ABTS•. Se evaluó la adecuación del modelo mediante estadísticas descriptivas y la prueba de Fisher. Sin embargo, se observó que el valor de R² (0.5396) era bajo y discordante con el valor ajustado de R² (0.217), lo que indica que no es posible representar de manera precisa los resultados experimentales del IC₅₀ ABTS mediante un modelo polinomial de segundo orden.

Como puede observarse, los resultados experimentales no se correlacionan con el modelo polinomial de segundo orden obtenido para el IC₅₀ ABTS. Sin embargo, sí se encuentran correlacionados con el método IC₅₀ DPPH. Como se mencionó previamente, la diferencia en los resultados de eliminación de radicales libres entre los métodos ABTS y DPPH se debe a que el método ABTS evalúa la actividad antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos, mientras que el método DPPH podría estar enfocándose únicamente en los compuestos lipofílicos. Esto significa que algunos compuestos antioxidantes que muestran capacidad para eliminar radicales ABTS

podrían no demostrar la misma capacidad para eliminar radicales DPPH (Martínez-Ramos *et al.*, 2020).

7.3.3 Optimización global de la extracción de AMXEO

La optimización global de la extracción del AMXEO plantea un problema multiobjetivo discreto. A diferencia de los problemas continuos, en este tipo de problemas no es posible utilizar un gradiente para determinar la dirección de las soluciones finales. En lugar de ello, en los problemas discretos, se requiere emplear métodos de búsqueda aleatorios para explorar el espacio de soluciones, mientras que los objetivos pueden ser identificados mediante estrategias para construir el frente de Pareto. Estos problemas son particularmente difíciles debido a las características del espacio de soluciones discreto, lo que los convierte en problemas NP-hard, es decir, con un costo computacional no polinomial. Aunque en este trabajo no se ha utilizado una metaheurística para encontrar las mejores soluciones y el espacio de búsqueda no es muy amplio, resulta necesario explorar de manera estratégica dicho espacio considerando la necesidad de alcanzar ambos objetivos de forma simultánea (Bernabé-Loranca *et al.*, 2012). Para identificar los objetivos en estos problemas, se emplean estrategias para construir el frente de Pareto.

Un frente de Pareto representa el conjunto de todas las soluciones tales que ninguna solución puede mejorarse en un objetivo sin empeorar otro objetivo, es decir el conjunto de pares de soluciones no dominadas y no comparables en un problema de optimización multiobjetivo, llamado también conjunto eficiente. Cada solución en el frente de Pareto se considera no dominada, lo que significa que no puede ser mejorada en un objetivo sin empeorar otro, lo que las hace óptimas en términos de equilibrio entre los objetivos. Además, las soluciones en el frente de Pareto son no comparables entre sí. Estas soluciones no comparables representan diferentes compromisos entre los objetivos y muestran las diversas posibilidades óptimas que existen. El frente de Pareto proporciona una visión completa de las soluciones óptimas disponibles, permitiendo a los decisores evaluar y seleccionar la solución que mejor se ajuste a sus preferencias y restricciones.

En el caso de la presente investigación, el objetivo consistió en determinar las condiciones de extracción que permitieran obtener la máxima cantidad de masa de AMXEO por masa de materia prima fresca y el mínimo valor de IC_{50} DPPH (la mejor actividad antioxidante). Esto implicó buscar una solución óptima global compuesta por los objetivos de maximizar la masa de AMXEO por masa de materia prima fresca y minimizar el IC_{50} DPPH.

Realizar este tipo de optimización no es una tarea sencilla, por lo que se utilizó un método apoyado en la teoría del orden para identificar las soluciones no dominadas. Esto permitió encontrar un conjunto de pares de soluciones no dominadas y no comparables, que conformaron el conjunto no dominado utilizado para construir el frente de Pareto (Figura 7.6) (Bernabé-Loranca *et al.*, 2012).

La eficiencia (optimalidad de Pareto) resulta fundamental, ya que cualquier solución ineficiente no representa una alternativa preferida para la toma de decisiones. Los datos utilizados para construir el frente de Pareto se obtuvieron mediante análisis de regresión realizados con el software Minitab Versión 21.3, tal como se presentó anteriormente (ecuaciones 7.5 y 7.6) y se utilizó la aplicación llamada NODOM para encontrar el conjunto de pares de soluciones no dominadas y no comparables, que conforman el conjunto no dominado utilizado para construir el frente de Pareto (Figura 7.6). NODOM funciona de la siguiente manera: acepta como archivo de entrada un conjunto de vectores (documento en formato txt). NODOM también necesita como entrada el número de objetivos. La salida es un archivo que contiene el conjunto de soluciones no dominadas y no comparables (Bernabé-Loranca *et al.*, 2012).

En la figura 7.6 se representa el conjunto de soluciones del problema y los valores de las funciones objetivo, restringidos a los vectores no dominados, es decir, la frontera de Pareto. Las funciones objetivo corresponden a la maximización de la masa de AMXEO por masa de materia prima seca (objetivo 1) y la minimización del IC_{50} DPPH (objetivo 2). Los niveles óptimos de los parámetros operativos se observan como 1.83% de masa de AMXEO por masa de materia prima seca y un IC_{50} DPPH de 52.9 mg/mL, correspondientes a las siguientes condiciones de proceso: 0.001 g/mL de concentración

de Tween 20, 30.8 g/L de relación sólido-líquido y 105 min de tiempo de extracción. La optimización se realizó asignando pesos iguales a cada función.

Una vez que fueron determinadas las condiciones óptimas de extracción, se llevaron a cabo experimentos en dichas condiciones (por triplicado) para comprobar la veracidad del modelo empírico desarrollándose un porcentaje de masa de AMXEO por masa de materia prima seca de 1.97 ± 0.39 % y un IC_{50} DPPH de 51.3 ± 6.6 mg/mL, como puede observarse, ambos valores se encuentran bastante cercanos a los predichos lo que confirma la buena compatibilidad con el modelo propuesto además de mostrar potencial en implicaciones prácticas.

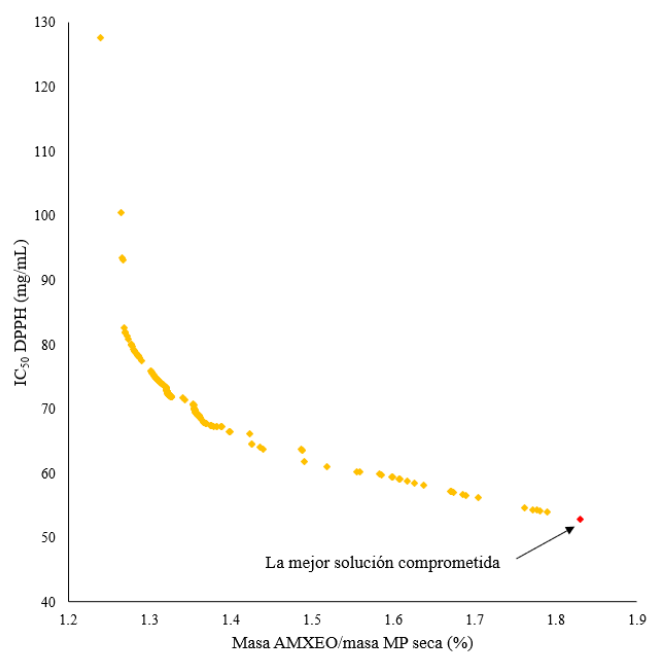


Figura 7.6 Frente de Pareto para minimizar el IC_{50} DPPH y maximizar la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca. En rojo, la mejor solución comprometida (1.83%, 52.9 mg/mL).

7.3.4 Composición química del aceite esencial

La Tabla 7.7 muestra los principales compuestos identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) del AMXEO, como puede observarse, el componente principal es nerol. El nerol es un constituyente común en

aceites esenciales como el de *Citrus aurantium* (De Cássia da Silveira e Sá *et al.*, 2017), *Artemisia jacutica* (Dylenova *et al.*, 2021), *Paeonia x suffruticosa* Andr (Lei *et al.*, 2022) y *Amomum tsaoko* Crevost et Lemarie (Liao *et al.*, 2022). Este componente también fue identificado en el extracto de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* (Palma-Tenango *et al.*, 2021) y dicho componente se relacionó con actividades antinociceptivas y antiinflamatorias (De Cássia da Silveira e Sá *et al.*, 2017) que se atribuyen a la planta.

González-Ramírez *et al.* (2021) han reportado también la presencia de isopulegona, pulegona y limoneno en la composición de aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*. Se piensa que el nerol, el acetato de nerilo y la trans-isopulegona son compuestos oxigenados que contribuyen a su fragancia. Liu *et al.* (2018) afirman que un mayor porcentaje de compuestos oxigenados es mucho más valioso en comparación con hidrocarburos monoterpénicos.

Tabla 7.7. Compuestos identificados en el AMXEO mediante GC-MS

No.	Compuesto químico	Área de pico ^a	Fórmula molecular	No.	Compuesto químico	Área de pico ^a	Fórmula molecular
1	B-Pineno	0.62	C ₁₀ H ₁₆	8	Acetato de geranilo	15.39	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
2	D-Limoneno	4.67	C ₁₀ H ₁₆	9	Cariofileno	4.96	C ₁₅ H ₂₄
3	Limoneno	5.77	C ₁₀ H ₁₆	10	(2)- β -Farneseno	2.5	C ₁₅ H ₂₄
4	Linalool	0.6	C ₁₀ H ₁₈ O	11	α-Caryofileno	0.72	C ₁₅ H ₂₄
5	Isopulegona	18.39	C ₁₀ H ₁₆ O	12	β-Cubebeno	3.68	C ₁₅ H ₂₄
6	Pulegona	1.85	C ₁₀ H ₁₆ O	13	γ-Elemeno	0.73	C ₁₅ H ₂₄
7	Nerol	36.83	C ₁₀ H ₁₈ O	14	Ácido dodecanoico	0.56	C ₁₂ H ₂₄ O ₂

^a Área de pico: porcentaje de componentes. Son presentados los componentes con un porcentaje ≥ 5%

Aunque tradicionalmente se ha atribuido la actividad antioxidante de los aceites esenciales a los compuestos fenólicos, también se menciona que otro tipo de compuestos como los terpenoides podrían tener ciertas características antioxidantes. En particular, la actividad antioxidante de AMXEO podría atribuirse al compuesto mayoritario nerol, ya que, según Baschieri *et al.* (2017) y Sánchez-Martínez *et al.* (2021) este compuesto podría tener cierta capacidad para atrapar radicales libres de manera similar al linalool. Asimismo, se sabe que el acetato de nerilo presenta cierta

capacidad para atrapar radicales de la misma manera que lo hace el citral. También se atribuye cierta actividad antioxidante al D-limoneno.

7.3.5 Comparación de la hidrodestilación asistida por surfactante con la hidrodestilación tradicional

Finalmente, se realizaron experimentos utilizando el método de hidrodestilación convencional, en los que se encontró que la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca, el IC₅₀ DPPH y el IC₅₀ ABTS del aceite esencial fueron 1.82 ± 0.14 (% w/w), 129 ± 3 mg/mL y 568 ± 1 mg/mL respectivamente. Como se puede observar, la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca y la actividad antioxidante fueron mejores en el aceite esencial obtenido mediante hidrodestilación asistida por surfactante en la condición óptima (masa de AMXEO por masa de materia prima seca de 1.97 ± 0.39 %, IC₅₀ DPPH = 51.3 ± 6.6 mg/mL).

7. 4. Actividad antioxidante de antioxidantes sintéticos considerados como referencia y comparación con los aceites esenciales obtenidos

Se evaluó la actividad antioxidante de antioxidantes sintéticos considerados como referencia (BHT, Trolox y ácido ascórbico) y se determinó su IC₅₀ con el objetivo de poder compararlos con la de los aceites esenciales estudiados en esta investigación.

La ecuación de regresión, así como el valor del IC₅₀ de los antioxidantes sintéticos se encuentran resumidos en la Tabla 7.8. Los valores aquí especificados son comparables con los de otras publicaciones como el IC₅₀ DPPH del BHT reportado por Amina (2016) (0.788 mg/mL) o el que reportan Memarzadeh *et al.* (2020) (0.91622 mg/mL). De la misma forma que reportan IC₅₀ DPPH del ácido ascórbico Madhumita *et al.* (2019) (0.085 mg/mL) y Memarzadeh *et al.* (2020) (0.07124 mg/mL) y el IC₅₀ ABTS reportado por Ud-Daula *et al.* (2016) (0.14737 mg/mL). En esta investigación, se determinaron valores de IC₅₀ ABTS del ácido ascórbico y BHT de 0.0983 y 0.216 (mg/mL), respectivamente. Para Trolox, los valores de IC₅₀ DPPH e IC₅₀ ABTS determinados fueron análogos a los reportados por Ak *et al.* (2021) (0.06 mg/mL y 0.13 mg/mL, respectivamente).

Tabla 7.8. Ecuaciones de regresión y valores de IC₅₀ determinados mediante los ensayos DPPH y ABTS para antioxidantes sintéticos considerados como referencia.

Antioxidante sintético	DPPH			ABTS		
	IC ₅₀ (mg/mL)	Ecuación de regresión	R ²	IC ₅₀ (mg/mL)	Ecuación de regresión	R ²
Ácido ascórbico	0.0920	y = 541.77x + 0.1346	0.9956	0.0983	y = 491.28x + 1.7287	0.9962
BHT	0.358	y = 137.28x + 0.798	0.9301	0.261	y = 158.85x + 8.5513	0.957
Trolox	0.225	y = 218.38x + 0.7975	0.9922	0.121	y = 390.91x + 2.8197	0.9949

NOTA: Se usaron tres cifras significativas de acuerdo con los datos arrojados por el espectrofotómetro utilizado (Genesys 10)

Como se puede observar en la Tabla 7.9, AMXEO, AMMEO y CMEO presentan un IC₅₀ que corresponde a una actividad antioxidante moderada en comparación con los antioxidantes sintéticos. Los aceites esenciales son mezclas bastante complejas compuestas por una gran variedad de compuestos, esta complejidad dificulta la explicación de sus actividades, es por esto por lo que en muchos informes sobre el potencial antioxidante de los aceites esenciales a menudo se refieren a conceptos como sinergismo, antagonismo y aditividad. Nuestros resultados son similares a los de EO de partes aéreas de *Clinopodium sericeum* (473.030 mg/mL y 106.060 mg/mL para DPPH y ABTS, respectivamente) informados por Benites *et al.* (2021). También se encontró actividad antioxidante moderada para EO de partes aéreas de *Thymus algeriensis* Boiss (41.090 mg/mL y 10.840 mg/mL para DPPH y ABTS, respectivamente), lo que podría atribuirse a un largo tiempo de extracción (Ouakouak *et al.*, 2021) ya que según Cui *et al.* (2018), los compuestos bioactivos y los componentes termolábiles que confieren la característica antioxidante a los aceites esenciales pueden descomponerse, hidrolizarse y disolverse en agua durante un largo período de extracción y alta temperatura de ebullición del agua en el proceso de hidrodestilación.

Tabla 7.9. Comparación del IC₅₀ de antioxidantes sintéticos y aceites esenciales obtenidos en esta investigación.

	IC ₅₀ (mg/mL)	
	DPPH ⁺	ABTS ⁺
Ácido ascórbico	0.0914±0.00346	0.0978±0.0000140
BHT	0.346±0.0690	0.251±0.00180
Trolox	0.224±0.00698	0.121±0.00841
AMXEO	51.3±6.60	--
AMMEO	46.7±0.378	18.0±0.0955
CMEO	189±8.49	16.4±0.212

IC₅₀ = concentración inhibitoria media ⁺ media ± desviación estándar

Es de destacarse también que en esta investigación se observaron diferencias entre los resultados de los ensayos llevados a cabo por el método DPPH y ABTS, dichas diferencias pueden explicarse por el mecanismo de la reacción involucrada, esto es, la reacción de radicales ABTS implica la transferencia de electrones y tiene lugar a un ritmo mucho más rápido en comparación con los radicales DPPH, cuyo grado de decoloración se atribuye a la capacidad de donación de hidrógeno de los compuestos probados (Barbieri *et al.*, 2016).

Para concluir, en la Figura 7.7 se representa la reacción posible entre el antioxidante y el radical DPPH (a) y ABTS (b) así como los compuestos químicos que se conoce tienen potencial antioxidante y que se encuentran presentes en los aceites esenciales estudiados en esta investigación. Según Sánchez-Martínez *et al.* (2021) existe una clara correlación entre la acción protectora contra el daño oxidativo (ABTS) y el contenido de limoneno, nerol y citral del aceite esencial. Acerca del carvacrol, Yildiz *et al.* (2021) encontraron que posee propiedades antioxidantes en ensayos DPPH y Farouk *et al.* (2021) mencionan que el cariofileno en combinación con el limoneno parecen mejorar la actividad antioxidante del aceite esencial de *Mentha spicata* L.

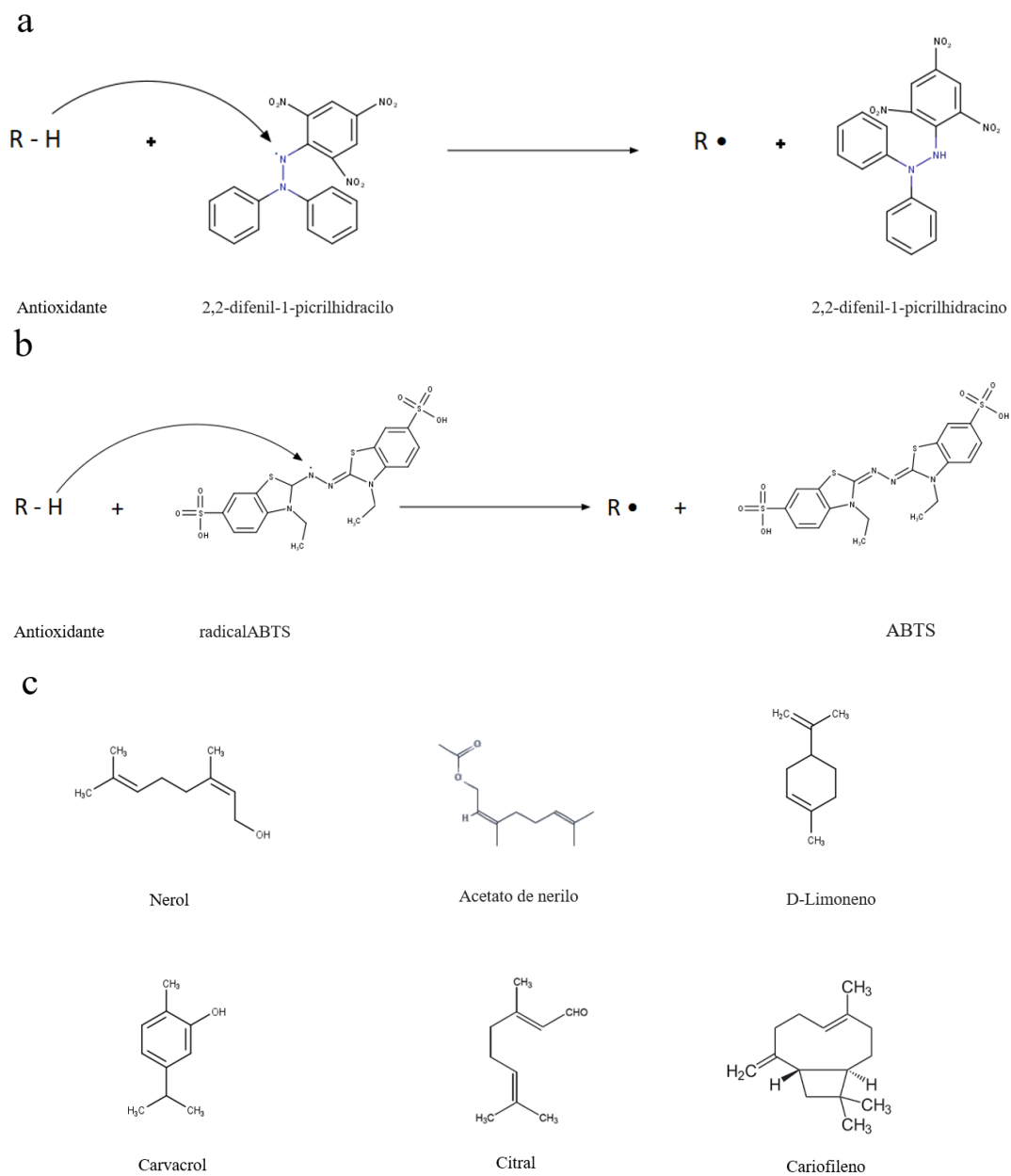


Figura 7.7. Reacción de antioxidante con (a) DPPH (b) ABTS (c) principales antioxidantes presentes en AMXEO, AMMEO y CMEO.

8. CONCLUSIONES

Después de estudiar la influencia de diferentes parámetros en la extracción de aceite esencial de tres plantas endémicas mexicanas (*Clinopodium mexicanum*, *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* y *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*), se han obtenido varias conclusiones significativas. En primer lugar, este estudio demostró que la hidrodestilación salina permitió mejorar la actividad antioxidante y la masa del AMMEO en comparación con la hidrodestilación tradicional. Además, las condiciones de optimización reportadas en esta investigación mejoraron tanto la masa de AMXEO obtenido por masa de materia prima seca como la actividad antioxidante del aceite esencial en comparación con la hidrodestilación tradicional. En cuanto a la composición química de los aceites esenciales obtenidos, se identificaron doce compuestos principales en el aceite esencial de *Clinopodium mexicanum*, siendo la pulegona y la mentona los componentes más destacados. Por otro lado, en el aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* se encontraron dieciocho compuestos principales, destacando el nerol, la trans-isopulegona y el acetato de nerilo. Por último, en el aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* se identificaron catorce compuestos principales, siendo el nerol, la isopulegona y el acetato de geranilo los más relevantes. Como puede observarse, los resultados de esta investigación llenan un vacío en el conocimiento científico existente sobre los aceites esenciales de estas plantas mexicanas, y son de gran importancia para el desarrollo de tecnologías apropiadas en este campo. Asimismo, estos hallazgos pueden ser relevantes para el avance en la industria agroindustrial y la producción de aceites esenciales.

Por último, es importante destacar que parte de esta investigación ha sido publicada en el Journal of Essential Oil Bearing Plants bajo el título "Optimization of extraction of essential oils using response surface methodology: a review".

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un análisis del impacto del proceso de extracción en la composición química del aceite esencial obtenido. Además, es importante explorar el potencial antimicrobiano, antifúngico y repelente del CMEO, considerando los compuestos químicos presentes, como la pulegona y la mentona, que ya han sido reportados con dicho potencial.

Asimismo, se sugiere investigar el potencial citotóxico de AMXEO y AMMEO teniendo en cuenta su valor de LC_{50} y la presencia de nerol, un compuesto químico reportado con cierta actividad citotóxica.

Para evaluar la estabilidad de los aceites esenciales obtenidos en diferentes condiciones, se recomienda llevar a cabo pruebas de estabilidad a distintas temperaturas y tiempos.

Es importante realizar estudios a largo plazo sobre la toxicidad del aceite esencial en diversos sistemas biológicos con el objetivo de evaluar su seguridad para posibles usos terapéuticos o cosméticos.

Por último, se recomienda la implementación de un diseño de experimentos multiobjetivo que permita realizar un análisis de Duncan-Tukey. Esto facilitará la comparación de medias múltiples tanto en el diseño biobjetivo como en el diseño multiobjetivo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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>
- Adams, R. (1989). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. San Diego, California: Academic Press.
- Ak, G., Zengin, G., Ceylan, R., Fawzi Mahomoodally, M., Jugreet, S., Mollica, A. & Stefanucci, A. (2021). Chemical composition and biological activities of essential oils from *Calendula officinalis* L. flowers and leaves. *Flavour and Fragrance Journal*, 36(5), 554-563. <https://doi.org/10.1002/ffj.3661>
- 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), 149–160. <https://doi.org/10.37360/blacpma.20.19.2.8>
- Amina, B. (2016). Toxicity and antioxidant activity of the essential oil of *Nigella sativa*. *Der Pharmacia Lettre*, 8(15), 245-249.
- Amiri, S., Moghanjoui, Z. & Bari, M. (2021). Natural protective agents and their applications as bio-preservatives in the food industry. *Italian Journal of Food Science, SPI(33)*, 55-68. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v33isp1.2045>
- Antunes Filho, S., Dos Santos, M. S., Dos Santos, O. A. L., Backx, B. P., Soran, M.-L., Opriş, O., Lung, I., Stegarescu, A. & Bououdina, M. (2023). Biosynthesis of nanoparticles using plant extracts and essential oils. *Molecules*, 28(7), 3060. <https://doi.org/10.3390/molecules28073060>
- AOAC International. (2000). *Official methods of analysis of AOAC International* (17.^a ed.).
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. II. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 1028–1045. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04743>
- Arantes, S. M., Piçarra, A., Guerreiro, M., Salvador, C., Candeias, F., Caldeira, A. T. & Martins, M. R. (2019). Toxicological and pharmacological properties of essential oils of *Calamintha nepeta*, *Origanum virens* and *Thymus mastichina* of Alentejo (Portugal). *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110747. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110747>
- 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>
- Bag, A. & Chattopadhyay, R. (2015). Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. *PLoS ONE*, 10(7), e0131321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131321>

- Bagheri, H., Abdul Manap, M. Y. B. & Solati, Z. (2014). Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. *Talanta*, *121*, 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.007>
- Balti, M. A., Hadrich, B., Kriaa, K. & Kechaou, N. (2018). Lab-scale extraction of essential oils from Tunisian lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, *124*, 164-173. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.12.012>
- Barbieri, N., Costamagna, M., Gilabert, M., Perotti, M., Schuff, C., Isla, M. I. & Benavente, A. (2016). Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of three aromatic plants from La Rioja province. *Pharmaceutical Biology*, *54*(1), 168-173. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1028077>
- Baschieri, A., Ajvazi, M. D., Tonfack, J. L. F., Valgimigli, L. & Amorati, R. (2017). Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. *Food Chemistry*, *232*, 656-663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.036>
- Baser, K. H. C. & Buchbauer, G. (2015). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19393>
- Belhachat, D., Mekimene, L., Belhachat, M., Ferradji, A. & Aid, F. (2018). Application of response surface methodology to optimize the extraction of essential oil from ripe berries of *Pistacia lentiscus* using ultrasonic pretreatment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *9*, 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.04.003>
- Benites, J., Rios, D., Guerrero-Castilla, A., Enríquez, C., Zavala, E., Ybañez-Julca, R.O., Quispe-Diaz, I., Jara-Aguilar, R. & Calderon, P. B. (2021). Chemical composition and assessment of antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities of essential oil from *Clinopodium sericeum*, a Peruvian Medicinal Plant. *Records of Natural Products*, *15*, 175-186. <https://doi.org/10.25135/rnp.213.20.10.1845>
- Bernabé-Loranca, B., Coello-Coello, C. A. & Osorio-Lama, M. A. (2012). A multiobjective approach for the heuristic optimization of compactness and homogeneity in the optimal zoning. *Journal of applied research and technology*, (10)3, 447-457.
- Božovic, M. & Ragno, R. (2017). *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its main essential oil constituent pulegone: Biological activities and chemistry. *Molecules*, *22*, 290. <https://doi.org/10.3390/molecules22020290>
- 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>
- Carrillo-Galván, G., Bye, R., Eguiarte, L. E., Cristians, S., Pérez-López, P., Vergara-Silva, F. & Luna-Cavazos, M. (2020). Domestication of aromatic medicinal plants in Mexico: *Agastache* (*Lamiaceae*)—an ethnobotanical, morpho-physiological, and phytochemical analysis. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *16*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13002-020-00368-2>
- Celuppi, L. C. M., Capelezzo, A. P., Cima, L.B., Zeferino, R. C. F., Carniel, T. A., Zanetti, M., de Mello J. M. M., Fiori, M. A. & Riella, H. G. (2023) Microbiological, thermal and mechanical performance of cellulose acetate films with geranyl acetate. *International Journal of Biological Macromolecules*, *228*, 517-527. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.170>

- Charchari, S. & Abdelli, M. (2014). Enhanced extraction by hydrodistillation of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil using water solutions of non-ionic surfactants. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *17*, 1094-1099. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935041>
- Chen, X. (2023). Antioxidant activities of essential oils and their major components in scavenging free radicals, inhibiting lipid oxidation and reducing cellular oxidative stress. *Molecules*, *11*(28), 4559. <https://doi.org/10.3390/molecules28114559>
- 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>
- Chen, F., Jia, J., Zhang, Q., Gu, H. & Yang, L. (2017). A modified approach for isolation of essential oil from fruit of *Amorpha fruticosa* Linn using microwave-assisted hydrodistillation concatenated liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography*, *1524*, 254-265. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.008>
- Chivandi, E., Dangarembizi, R., Nyakudya, T. & Erlwanger, K. (2016). Use of essential oils as a preservative of meat. En *Essential Oils in Food Preservation: Flavor and Safety* (pp. 85-91). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00008-0>
- Conde-Hernández, L. A., Botello-Ojeda, A. G., Alonso-Calderón, A. A., Osorio-Lama, M. A., Bernabé-Loranca, M. B. & Chávez-Bravo, E. (2021). Optimization of extraction of essential oils using response surface methodology: a review. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *24*, 937-982. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1976286>
- 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>
- Cui, H., Pan, H. W., Wang, P. H., Yang, X. D., Zhai, W. C., Dong, Y. & Zhou, H. L. (2018). Essential oils from *Carex meyeriana* Kunth: Optimization of hydrodistillation extraction by response surface methodology and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities. *Industrial Crops and Products*, *124*, 669-676. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.041>
- da Silva Ramos, R., Rodrigues, A. B. L., Farias, A. L. F., Simões, R. C., Pinheiro, M. T., Ferreira, R. M. dos A., Costa Barbosa, L. M., Picanço Souto, R. N., Fernandes, J. B., Santos, L. da S. & de Almeida, S. S. M. da S. (2017). Chemical composition and *in vitro* antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. (*Lamiaceae*). *The Scientific World Journal*, *2017*, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2017/4927214>
- de Cássia da Silveira e Sá, R., Lima, T., da Nóbrega, F., de Brito, A. & de Sousa, D. (2017). Analgesic-like activity of essential oil constituents: An update. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(12), 2392. <https://doi.org/10.3390/ijms18122392>
- de Oliveira Reis, J.H., de Abreu Barreto, G., Cerqueira, J.C., Pereira dos Anjos, J., Nalane Andrade, L., Ferreira Padilha, F., Druzian, J.I. & Machado, B.A.S. (2019) Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PLoS ONE*, *14*(7): e0219063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219063>
- Dao, T. P., Tran, T. H., Quyen Ngo, T. C., Kieu Linh, H. T., Yen Trung, L. N., Danh, V. T., Le Ngoc, T. T., Yen Pham, N. D., Quan, P. M. & Toan, T. Q. (2019). Extraction of essential oils from

- Vietnam's orange (*Citrus sinensis*) peels by hydrodistillation: Modeling and process optimization. *Asian Journal of Chemistry*, 31(12), 2827-2833. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.22178>
- Duda, S. C., Mărghitaș, L. A., Dezmirean, D., Duda, M., Mărgăoan, R. & Bobiș, O. (2015). Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species. *Industrial Crops and Products*, 77, 499-507. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.045>
- Dylenova, E. P., Zhigzhitzhapova, S. V., Randalova, T. E. & Radnaeva, L. D. (2021). The essential oil composition of *Artemisia jacutica* Drob. From the flora of Buryatia, Russia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 908(1), 012031. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/908/1/012031>
- Estrada-Reyes, R., López-Rubalcava, C., Ferreyra-Cruz, O. A., Dorantes-Barrón, A. M., Heinze, G., Moreno Aguilar, J., & Martínez-Vázquez, M. (2014). Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; An ethnomedicine of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 153(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.057>
- Farouk, A., Mohsen, M., Ali, H., Shaaban, H. & Albaridi, N. (2021). Antioxidant activity and molecular docking study of volatile constituents from different aromatic Lamiaceous plants cultivated in Madinah Monawara, Saudi Arabia. *Molecules*, 26(14), 4145. <https://doi.org/10.3390/molecules26144145>
- Fazlali, A., Moradi, S. & Hamed, H. (2015). Studying of optimization condition of rosemary essence extraction with microwave assisted hydro-distillation method. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 3(1), 46-50.
- Ferrentino, G., Morozova, K., Horn, C. & Scampicchio, M. (2020). Extraction of essential oils from medicinal plants and their utilization as food antioxidants. *Current Pharmaceutical Design*, 26, 519-541. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200121092018>
- Filly, A., Fabiano-Tixier, A. S., Louis, C., Fernandez, X. & Chemat, F. (2016). Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers. *Comptes Rendus Chimie*, 19(6), 707-717. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.01.018>
- 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>
- Gaspar-Pintilieșcu, A., Mihai, E., Ciucan, T., Florina-Popescu, A., Luntraru, C., Tomescu, J. & Craciunescu, O. (2022). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition capacity of hydrosols from Lamiaceae plants for biopesticide use: role of phenolics. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 996-1008. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2071289>
- Ghadermazi, R., Keramat, J. & Goli, S.A.H. (2017). Antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb), oregano (*Origanum vulgare* L.) and sage (*Salvia officinalis* L) essential oils in various model systems. *International Food Research Journal*, 24(4), 1628-1635.
- Giacometti, J., Bursac Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., Stulić, V., Barba, F. J., Chemat, F., Barbosa-Cánovas, G. & Režek Jambrak, A. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*, 113, 245-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.036>

- Godlewska, K., Ronga, D. & Michalak, I. (2021). Plant extracts-importance in sustainable agriculture. *Italian Journal of Agronomy*, 16(2), 1851. <https://doi.org/10.4081/ija.2021.1851>
- González-Ramírez, A. E., González-Trujano, M. E., Hernandez-Leon, A., Valle-Dorado, M. G., Carballo-Villalobos, Orozco-Suárez, S., Alvarado-Vásquez, N. & López-Muñoz, F. J. (2021). Limonene from *Agastache mexicana* essential oil produces antinociceptive effects, gastrointestinal protection and improves experimental ulcerative colitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 280, 114462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114462>
- Guzmán, E. & Lucia, A. (2021). Essential oils and their individual components in cosmetic products. *Cosmetics*, 8(4), 114. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040114>
- Hashemi, S. M. B., Khorram, S. B. & Sohrabi, M. (2018a). Extraction methods of essential oils from herbs and spices. En *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications* (Segunda edición, pp. 21–55). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119149392.ch2>
- Hashemi, S. M. B., Khorram, S. B. & Sohrabi, M. (2018b). Antioxidant activity of essential oils in foods. En *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications* (2ª ed., pp. 247–265). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119149392.ch8>
- Hashemi G. H., Parastouei, K., Mokhtarian, M., Rostami, H., Niakousari, M. & Mohsenpour, Z. (2020). Application of innovative processing methods for the extraction of bioactive compounds from saffron (*Crocus sativus*) petals. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 19,100264. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100264>
- Heydari, M., Rostami, O., Mohammadi, R., Banavi, P., Farhoodi, M., Sarlak, Z. & Rouhi, M. (2021). Hydrodistillation ultrasound-assisted green extraction of essential oil from bitter orange peel wastes: Optimization for quantitative, phenolic, and antioxidant properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(7). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15585>
- Heo, H., Shin, H.-R., Chung, J.-W. & Lee, J. (2022). Comparison of antioxidant activities in *Agastache* Species. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 51(4), 389-394. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2022.51.4.389>
- Hu, M., Feng, G., Xie, L., Shi, X., Lu, B., Li, Y., Shi, S. & Zhang, J. (2023). Green and efficient extraction of wormwood essential oil using natural deep eutectic solvent: Process optimization and compositional analysis. *Journal of Molecular Liquids*, 382, 121977. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121977>
- Huzar, E., Dzięcioł, M., Wodnicka, A., Örün, H., İçöz, A. & Çiçek, E. (2018). Influence of hydrodistillation conditions on yield and composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 68(3), 243-249. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2018-0003>
- Ibarra-Alvarado, C., Rojas, A., Mendoza, S., Bah, M., Gutiérrez, D. M., Hernández-Sandoval, L. & Martínez, M. (2010). Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceutical Biology*, 48, 732-739. <https://doi.org/10.3109/13880200903271280>
- Juárez, Z. N., Hernández, L. R., Bach, H., Sánchez-Arreola, E. & Bach, H. (2015). Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* and *Porophyllum linaria* against post-harvest pathogens. *Industrial Crops and Products*, 74, 178-182. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.058>

- Kalhor, M. T., Zhang, H., Kalhor, G. M., Wang, F., Chen, T., Faqir, Y. & Nabi, F. (2022). Fungicidal properties of ginger (*Zingiber officinale*) essential oils against *Phytophthora colocasiae*. *Scientific Reports*, 12(1), 2191. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06321-5>
- Kasemiire, A., Avohou, H. T., De Bleye, C., Sacre, P. Y., Dumont, E., Hubert, P. & Ziemons, E. (2021). Design of experiments and design space approaches in the pharmaceutical bioprocess optimization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 166, 144-154. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.06.004>
- Kasrati, A., Alaoui Jamali, C., Spooner-Hart, R., Legendre, L., Leach, D. & Abbad, A. (2017). Chemical characterization and biological activities of essential oil obtained from mint timija cultivated under mineral and biological fertilizers. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/6354532>
- Kemzūraitė, A., Venskutonis, P. R., Baranauskienė, R. & Navikienė, D. (2014). Optimization of supercritical CO₂ extraction of different anatomical parts of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) using response surface methodology and evaluation of extracts composition. *The Journal of Supercritical Fluids*, 87, 93-103. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.01.007>
- Konfo, T. R. C., Djouhou, F. M. C., Koudoro, Y. A., Dahouenon-Ahoussi, E., Avlessi, F. & Simal-Gandara, J. (2023). Essential oils as natural antioxidants for the control of food preservation. *Food Chemistry Advances*, 2, 100312. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100312>
- Kumari, P. K., Akhila, S., Rao, Y. S. & Devi, B. R. (2019). Alternative to artificial preservatives. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 10(1).
- Lei, G., Song, C., Wen, X., Gao, G. & Qi, Y. (2022). Chemical diversity and potential target network of woody peony flower essential oil from eleven representative cultivars (*Paeonia × suffruticosa* Andr.). *Molecules*, 27(9), 2829. <https://doi.org/10.3390/molecules27092829>
- Leite, A. M., Lima, E. D. O., Souza, E. L. D., Diniz, M. D. F. F. M., Leite, S. P., Xavier, A. L. & Medeiros, I. A. D. (2009). Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(4). <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000600008>
- León-Méndez, G., Pájaro-Castro, N., Pájaro-Castro, E., Torrenegra-Alarcón, M. & Herrera-Barros, A. (2019). Essential oils as a source of bioactive molecules. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(1), 80-93. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n1.80067>
- Liao, L., Yang, S., Li, R., Zhou, W., Xiao, Y., Yuan, Y., Cha, Y., He, G. & Li, J. (2022). Anti-inflammatory effect of essential oil from *Amomum Tsaoko* Crevost et Lemarie. *Journal of Functional Foods*, 93, 105087. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105087>
- Li, G., Liu, S., Zhou, Q., Han, J., Qian, C., Li, Y., Meng, X., Gao, X., Zhou, T., Li, P. & Gu, Q. (2022). Effect of response surface methodology-optimized ultrasound-assisted pretreatment extraction on the composition of essential oil released from *Tribute citrus* peels. *Frontiers in Nutrition*, 9, 840780. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.840780>
- Lim, S. F., Pah, P. Y. L., Chua, S. N. D. & Kuan, H. T. N. (2017). Optimisation of water soluble essential oil from lemongrass leaves using steam distillation. *Pertanika Journal of Science & Technology*, 25(S5), 137-144
- Liu, P., Xu, Y., Gao, X., Zhu, X., Du, M., Wang, Y., Deng, R. & Gao, J. (2017). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of oil from the seed kernels and isolation of monoterpene glycosides

- from the oil residue of *Paeonia lactiflora* Pall. *Industrial Crops and Products*, 107, 260-270. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.013>
- Liu, X.-Y., Ou, H., Xiang, Z.-B. & Gregersen, H. (2019). Optimization, chemical constituents and bioactivity of essential oil from *Iberis amara* seeds extracted by ultrasound-assisted hydro-distillation compared to conventional techniques. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 13, 100204. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2019.100204>
- Liu, Z., Deng, B., Li, S. & Zou, Z. (2018). Optimization of solvent-free microwave assisted extraction of essential oil from *Cinnamomum camphora* leaves. *Industrial Crops and Products*, 124, 353-362. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.016>
- Madhumita, M., Guha, P. & Nag, A. (2019). Optimization of the exhaustive hydrodistillation method in the recovery of essential oil from fresh and cured betel leaves (*Piper betle* L.) using the Box–Behnken design. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(11). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14196>
- Mączka, W., Twardawska, M., Grabarczyk, M. & Wińska, K. (2023). Carvacrol—A natural phenolic compound with antimicrobial properties. *Antibiotics*, 12(5), 824. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050824>
- Martínez-Ramos, T., Benedito-Fort, J., Watson, N. J., Ruiz-López, I. I., Che-Galicia, G. & Corona-Jiménez, E. (2020). Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food and Bioproducts Processing*, 122, 41-54. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.03.011>
- Medina, M. B., Resnik, S. L. & Munitz, M. S. (2021). Optimization of a rice cooking method using response surface methodology with desirability function approach to minimize pesticide concentration. *Food Chemistry*, 352, 129364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129364>
- Memarzadeh, S. M., Gholami, A., Pirbalouti, A. G. & Masoum, S. (2020). Bakhtiari savory (*Satureja bachtiarica* Bunge.) essential oil and its chemical profile, antioxidant activities, and leaf micromorphology under green and conventional extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 154, 112719. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112719>
- Michel, J., Abd Rani, N. Z. & Husain, K. (2020). A Review on the potential use of medicinal plants from *Asteraceae* and *Lamiaceae* plant family in cardiovascular diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 852. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00852>
- Mollaei, S., Mamizadeh, Z., Hazrati, S. & Hashempour, H. (2021). The effect of ultrasonic pre-treatment on the yield, chemical composition and biological activity of essential oil in *Oliveria decumbens* flowers. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 24, 100313. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100313>
- Munteanu, I.G. & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Science*, 22, 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Myers, R. H., Montgomery, D. C. & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. (4^a ed.). Wiley, Ed., New Jersey.
- Montgomery, D. C. (2006). *Diseño y análisis de experimentos*. (2^a ed.). Limusa.
- Nabet, N., Gilbert-López, B., Madani, K., Herrero, M., Ibáñez, E. & Mendiola, J. A. (2019). Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from *Origanum*

- glandulosum* and *Thymus fontanesii*. *Industrial Crops and Products*, 129, 395-404. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.032>
- Najar, B., Marchioni, I., Ruffoni, B., Copetta, A., Pistelli, L. & Pistelli, L. (2019). Volatilomic analysis of four edible flowers from *Agastache* genus. *Molecules*, 24(24), 4480. <https://doi.org/10.3390/molecules24244480>
- Navarrete, A., Ávila-Rosas, N., Majín-León, M., Balderas-López, J. L., Alfaro-Romero, A. & Tavares-Carvalho, J. C. (2016). Mechanism of action of relaxant effect of *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* essential oil in guinea-pig trachea smooth muscle. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 96-100. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1230140>
- Ngan, T. T. K., Hien, T. T., Phat, D. T., Long, H. B. & Le, X. T. (2022). Pomelo (*Citrus grandis* L.) Essential oil extraction: A comparison between hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation. *Materials Science Forum*, 1048, 485-492. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.1048.485>
- Niksic, H., Becic, F., Koric, E., Gusic, I., Omeragic, E., Muratovic, S., Miladinovic, B. & Duric, K. (2021). Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines. *Scientific Reports*, 11(1), 13178. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92679-x>
- Nizio, D. A. de C., Blank, A. F., Sampaio, T. S., Brito, F. de A., Andrade, T. M., Arrigoni-Blank, M. de F. & Maria, A. N. (2018). Distillation methods affect the chemical composition of *Varronia curassavica* Jacq. essential oil? *Bioscience Journal*, 34, 629-639. <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n3a2018-39372>
- NODOM <http://www.cs.cinvestav.mx/~emoobook/nodom/nondominated.html>
- Nora, F. M. D. & Borges, C. D. (2017). Ultrasound pretreatment as an alternative to improve essential oils extraction. *Ciencia Rural*, 47(9). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170173>
- Ouakouak, H., Benarfa, A., Messaoudi, M., Begaa, S., Sawicka, B., Benchikha, N. & Simal-Gandara, J. (2021). Biological properties of essential oils from *Thymus algeriensis* Boiss. *Plants*, 10(4), 786. <https://doi.org/10.3390/plants10040786>
- Palma-Tenango, M., Sánchez-Fernández, R.E. & Soto-Hernández, M. A. (2021). Systematic approach to *Agastache mexicana* research: biology, agronomy, phytochemistry, and bioactivity. *Molecules*, 26, 3751. <https://doi.org/10.3390/molecules26123751>
- Rashed, M. M. A., Tong, Q., Nagi, A., Li, J., Khan, N. U., Chen, L., Rotail, A. & Bakry, A. M. (2017). Isolation of essential oil from *Lavandula angustifolia* by using ultrasonic-microwave assisted method preceded by enzymolysis treatment, and assessment of its biological activities. *Industrial Crops and Products*, 100, 236-245. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.033>
- Rashidi, S., Eikani, M. H. & Ardjmand, M. (2018). Extraction of *Hyssopus officinalis* L. essential oil using instant controlled pressure drop process. *Journal of Chromatography*, 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, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Rhimi, W., Mohammed, M. A., Zarea, A. A. K., Greco, G., Tempesta, M., Otranto, D. & Cafarchia, C. (2022). Antifungal, antioxidant and antibiofilm activities of essential oils of *Cymbopogon* spp. *Antibiotics*, 11(6), 829. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060829>
- Rodríguez-Mendoza, C. A., González Campos, R. E., Lorenzo-Leal, A. C., Bautista Rodríguez, E., Paredes Juárez, G. A., El Kassis, E. G., Hernández, L. R., Juárez, Z. N. & Bach, H. (2022). Phytochemical screening and bioactivities of Cactaceae family members Endemic to Mexico. *Plants*, 11(21), 2856. <https://doi.org/10.3390/plants11212856>
- Saad, M. M. G., El-Deeb, D. A. & Abdelgaleil, S. A. M. (2019). Insecticidal potential and repellent and biochemical effects of phenylpropenes and monoterpenes on the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(7), 6801-6810. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04151-z>
- Sadgrove, N. & Jones, G. (2015). A contemporary introduction to essential oils: Chemistry, bioactivity and prospects for Australian agriculture. *Agriculture*, 5(1), 48–102. <https://doi.org/10.3390/agriculture5010048>
- Sánchez-Martínez, J. D., Bueno, M., Alvarez-Rivera, G., Tudela, J., Ibañez, E. & Cifuentes, A. (2021). *In vitro* neuroprotective potential of terpenes from industrial orange juice by-products. *Food & Function*, 12(1), 302-314. <https://doi.org/10.1039/D0FO02809F>
- Santiago, J. A., Cardoso, M. D. G., Batista, L. R., Castro, E. M. de, Teixeira, M. L. & Pires, M. F. (2016). Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 38(2), 139. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v38i2.30656>
- 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.*
- Shelepova, O. V., Baranova, E. N., Tkacheva, E. V., Evdokimenkova, Y. B., Ivanovskii, A. A., Konovalova, L. N. & Gulevich, A. A. (2022). Aromatic plants metabolic engineering: A review. *Agronomy*, 12(12), 3131. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123131>
- 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>
- Skrypnik, L., Golovin, A. & Savina, T. (2022). Effect of salicylic acid on phenolic compounds, antioxidant and antihyperglycemic activity of *Lamiaceae* plants grown in a temperate climate. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 14(1), 3. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1401003>
- Sodeifian, G., Saadati Ardestani, N., Sajadian, S. A. & Ghorbandoost, S. (2016). Application of supercritical carbon dioxide to extract essential oil from *Cleome coluteoides* Boiss: Experimental, response surface and grey wolf optimization methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 114, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.04.006>
- Sodeifian, G. & Sajadian, S. A. (2017). Investigation of essential oil extraction and antioxidant activity of *Echinophora platyloba* DC. using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 121, 52-62. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.11.014>

- Solanki, K. P., Desai, M. A. & Parikh, J. K. (2020). Improved hydrodistillation process using amphiphilic compounds for extraction of essential oil from *Java citronella* grass. *Chemical Papers*, *74*, 145-156. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00861-3>
- Solanki, K. P., Desai, M. A. & Parikh, J. K. (2018). Sono hydrodistillation for isolation of citronella oil: A symbiotic effect of sonication and hydrodistillation towards energy efficiency and environment friendliness. *Ultrasonics Sonochemistry*, *49*, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.038>
- Sun, J., Sun, P., Kang, C., Zhang, L., Guo, L. & Kou, Y. (2022). Chemical composition and biological activities of essential oils from six *Lamiaceae* folk medicinal plants. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 919294. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.919294>
- Tekin, K., Akalın, M. K. & Şeker, M. G. (2015). Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design. *Industrial Crops and Products*, *77*, 954-960. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.071>
- Tepe, B. & Cilkiz, M. (2016). A pharmacological and phytochemical overview on *Satureja*. *Pharmaceutical Biology*, *54*(3), 375-412. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1043560>
- Tisserand, R. & Young, R. (2014). Essential oil composition. En *Essential Oil Safety* (2a ed., pp. 5–22). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-06241-4.00002-3>
- Tongnuanchan, P. & Benjakul, S. (2014). Essential oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, *79*(7), 1231–1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Tunç, M. T. & Koca, İ. (2020). Optimization of ohmic heating assisted hydrodistillation of cinnamon and bay leaf essential oil. *Journal of Food Process Engineering*, *44*(3). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13635>
- 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>
- Ud-Daula, A. F. M. S., Demirci, F., Salim, K. A., Demirci, B., Lim, L. B. L., Baser, K. H. C. & Ahmad, N. (2016). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from leaves, aerial stems, basal stems, and rhizomes of *Etilingera fimbriobracteata* (K. Schum.) R. M. Sm. *Industrial Crops and Products*, *84*, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.034>
- Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernández, Y., Cruz-Durán, R. & Lozoya-Gloria, E. (2015). Volatiles and seasonal variation of the essential oil composition from the leaves of *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* and its biological activities. *Industrial Crops and Products*, *77*, 741-747. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.050>
- Villaseñor, J.L. & Ortiz, E. (2014). Biodiversidad de las plantas con flores (División *Magnoliophyta*) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *85*, 134–142. <https://doi.org/10.7550/rmb.31987>
- Wongsrangsap, N. & Chukiatsiri, S. (2021). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatically hydrolysed *Samia ricini* Pupae. *Molecules*, *26*(9) 2588. <https://doi.org/10.3390/molecules26092588>

- Wu, Y., Chen, G., Liu, B. & Zhao, X. (2020). The study on extraction technology of essential oil from *Tribute citrus*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 474(3), 032044. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/474/3/032044>
- 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. setata*×*R. rugosa*). *Industrial Crops and Products*, 150, 112417. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112417>
- Yi, F., Jin, R., Sun, J., Ma, B. & Bao, X. (2018). Evaluation of mechanical-pressed essential oil from Nanfeng mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Kinokuni) as a food preservative based on antimicrobial and antioxidant activities. *LWT*, 95, 346-353. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.01>
- Yildiz, S., Turan, S., Kiralan, M. & Ramadan, M. F. (2021). Antioxidant properties of thymol, carvacrol, and thymoquinone and its efficiencies on the stabilization of refined and stripped corn oils. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 621-632. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00665-0>
- Yin, X., Huang, J., Huang, J., Wu, W., Tong, T., Liu, S., Zhou, L., Liu, Z. & Zhang, S. (2022). Identification of volatile and odor-active compounds in Hunan black tea by SPME/GC-MS and multivariate analysis. *LWT*, 164, 113656. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113656>
- Yingngam, B. & Brantner, A. H. (2015). Factorial design of essential oil extraction from *Fagraea fragrans* Roxb. flowers and evaluation of its biological activities for perfumery and cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(3), 272–281. <https://doi.org/10.1111/ics.12192>
- Yu, F., Wan, N., Zheng, Q., Li, Y., Yang, M. & Wu, Z. (2021). Effects of ultrasound and microwave pretreatments on hydrodistillation extraction of essential oils from Kumquat peel. *Food Science & Nutrition*, 9(5), 2372-2380. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2073>
- Yu, X. & He, Y. (2017). Application of Box-Behnken designs in parameters optimization of differential pulse anodic stripping voltammetry for lead(ii) determination in two electrolytes. *Scientific Reports*, 7(1), 2789. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03030-2>
- Zeković, Z., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cvejin, A., Elgndi, M. A. & Pavlić, B. (2014). Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 560-566. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.09.004>
- Zhang, Q., Huo, R., Ma, Y., Yan, S., Yang, L. & Chen, F. (2020). A novel microwave-assisted steam distillation approach for separation of essential oil from tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andrews) petals: Optimization, kinetic, chemical composition and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 154, 112669. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112669>
- Zhao, Q., Zhu, L., Wang, S., Gao, Y. & Jin, F. (2023). Molecular mechanism of the anti-inflammatory effects of plant essential oils: A systematic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 301, 115829. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115829>
- Zhang, C.-Y. & Guo, M. (2020). Comparing three different extraction techniques on essential oil profiles of cultivated and wild lotus (*Nelumbo nucifera*) flower. *Life*, 10(9), 209. <https://doi.org/10.3390/life10090209>

Zheng, X. & Bossier, P. (2023). Toxicity assessment and anti- vibrio activity of essential oils: Potential for application in shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12795, 1-20. <https://doi.org/10.1111/raq.12795>

Zielinska, S. & Matkowski, A. (2014). Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (*Lamiaceae*). *Phytochemistry Reviews*, 13, 391-416. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9349-1>

ANEXO 1

Carta de identificación de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*
Carta de identificación de *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*

	COLEGIO DE POSTGRADUADOS Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Campeche-Córdoba-Montecillo-Puebla-San Luis Potosí-Tabasco-Veracruz "2022: Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"	SADER SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL 
---	--	--

ASUNTO: CONSTANCIA

A QUIEN CORRESPONDA

PRESENTE

Los que suscriben, **DRA. MIREYA BURGOS HERNÁNDEZ**, Responsable, y el **M.C. RICARDO VEGA MUÑOZ**, Técnico, del Herbario-Hortorio CHAPA, Área de Taxonomía del Posgrado en Botánica, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

HACEMOS CONSTAR

Que el **DR. CRISTÓBAL D. SÁNCHEZ SÁNCHEZ**, Coordinador del Área de Investigación de Jardín Etnobotánico Francisco Peláez R., de San Andrés Cholula Puebla; donó 4 duplicados correspondientes a dos recolectas botánicas las cuales fueron: ***Agastache mexicana* Linton & Epling subsp. mexicana** (Lamiaceae) con número de accesión **155 906** y ***Agastache mexicana* subsp. xolocotziana** Bye, E.L. Linares & Ramamoorthy (Lamiaceae) con número de accesión **155 907**. Estas recolectas serán parte de la colección general del herbario y estamos seguros que incrementará el acervo científico de la colección y contribuirá al conocimiento y divulgación de estas especies.

Se extiende la presente constancia a petición de la parte interesada y para los usos y fines legales que le convengan, a los once días del mes de marzo del año dos mil veintidós, en Montecillo, Municipio de Texcoco, Estado de México.

ATENTAMENTE
HERBARIO-HORTORIO CHAPA
POSGRADO EN BOTÁNICA

 DRA. MIREYA BURGOS HERNÁNDEZ RESPONSABLE	 M.C. RICARDO VEGA MUÑOZ TÉCNICO
---	---

Ccp.: Archivo.

Km. 36.5 Carretera Federal México-Tezcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México C.P. 56230, Tel. Texcoco (595) 952 0200, Tel. CDMX (55) 5804 5900, Ext: 1322 ó 1300, Correo electrónico: herbario.hortorio@gmail.com, rvega@colpos.mx
<https://herbario-hortorio.wixsite.com/chapa>

ANEXO 2

Carta de identificación de *Clinopodium mexicanum*



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 Ojeda
Director



c.c.p. Archivo.

Jardín Botánico
Universitario

Prolongación 24 sur y Av. San Claudio,
Edif. HJB, Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7032 y 7034