



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

---

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

LICENCIATURA DE QUÍMICA EN ALIMENTOS

**Evaluación de la actividad antioxidante e  
identificación de compuestos presentes en extractos  
acuosos de *Melissa officinalis* por HPLC-MS**

**Tesis**

Que para obtener el Título de:

**Químico en Alimentos**

P R E S E N T A:

JESSICA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

D I R E C T O R E S:

DRA. ELIZABETH CONTRERAS LÓPEZ

DR. JUAN RAMÍREZ GODÍNEZ

MINERAL DE LA REFORMA, HGO., AGOSTO 2017

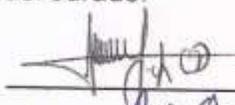
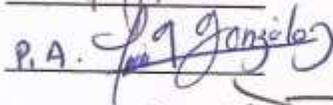
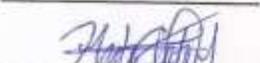


**M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO**  
**DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR**  
**DE LA U.A.E.H.**  
**Presente:**

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a la pasante de la Licenciatura de Química en Alimentos **Jessica Hernández Martínez**, quien presenta el trabajo de investigación "**Evaluación de la actividad antioxidante e identificación de compuestos presentes en extractos acuosos de Melissa officinalis por HPLC-MS**", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales, estos han decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

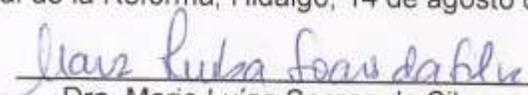
A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

Presidente **Dra. Judith Jaimez Ordaz**  
Secretario **Dr. Gian Arturo Álvarez Romero**  
Primer vocal **Dra. Elizabeth Contreras López**  
Segundo vocal **M. en C. Juan Ramírez Godínez**  
Tercer vocal **Dra. Esmeralda Rangel Vargas**  
Primer suplente **Mtra. María Elena Martínez Román**  
Segundo suplente **Mtra. Martha Teresa Acosta Mejía**

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Amor, Orden y Progreso"  
Mineral de la Reforma, Hidalgo, 14 de agosto de 2017

  
**Dra. Maria Luisa Soares da Silva**  
Coordinadora Adjunta  
Licenciatura en Química de Alimentos



Ciudad del Conocimiento  
Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5  
Colonia Carboneras  
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184  
Tel. +52 771 7172000 exts. 2200 y 2201, Fax 6502  
aaq\_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

## *Agradecimientos*

Antes que nada le doy gracias a Dios por todas las bendiciones que me ha dado, por rodearme de personas maravillosas que me han enseñado e instruido durante toda mi vida, y que gracias a ello he podido cumplir una meta más en vida.

Gracias a mis padres por ser mis guías y ejemplo de superación, les agradezco muy infinitamente por los sacrificios que han hecho por mí. A mi mamá por ser un gran ejemplo de trabajo y esfuerzo constante y ser una mujer de buen ánimo aun a pesar de las adversidades, a mi padre por la protección, cariño, consejos y confianza que me ha brindado.

Gracias a mi hermana Carmen por motivarme y aconsejarme cuando más lo he necesitado, a Laura por ser un ejemplo de superación en mi vida, a mi hermano Juan por su apoyo incondicional, a mi hermana Rosi por dedicar parte de su tiempo para escucharme y darme ánimos para seguir adelante. A mis sobrinos Geovanni, Melanie y Amy porque han llenado mi vida de alegría.

A Raybel por ser una parte esencial en mi vida y ser la persona que me aconsejado y apoyado incondicionalmente en mi vida profesional y personal.

Les agradezco a la Dra Elizabeth y al Dr. Juan por la confianza, apoyo y el tiempo que me brindaron para el desarrollo de este proyecto.

A mis sinodales por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis.

Gracias a todos a mis amigos por su cariño, amistad y los grandes momentos de alegría y diversión que me han regalado, sobre todo gracias querida Gina porque tus consejos, observaciones, buen criterio y los buenos momentos que pasamos juntan en la Universidad.

*No hay secretos para el éxito.  
Este se alcanza preparándose  
trabajando arduamente y  
aprendiendo del fracaso*

*Colin Powell*

## Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción.....  | 1  |
| 2. Antecedentes .....   | 3  |
| 2.1 Origen de <i>Melissa officinalis</i> .....  | 3  |
| • Usos y aplicaciones .....   | 4  |
| 2.2 Compuestos presentes en <i>Melissa officinalis</i> .....  | 5  |
| • <i>Triterpenos</i> .....  | 5  |
| • <i>Ácidos fenólicos</i> .....   | 6  |
| • <i>Flavonoides</i> .....  | 7  |
| 2.3 Antioxidantes naturales y sintéticos .....  | 7  |
| 2.4 Métodos para evaluar la actividad antioxidante en alimentos .....   | 10 |
| 2.4.1 Fundamento de los métodos DPPH, FRAP y Fenoles Totales .....  | 10 |
| 2.5 Diseño de experimentos Box Behnken.....   | 13 |
| 3. Objetivos.....   | 14 |
| 4. Metodología.....   | 15 |
| 3.1 Recolección de la muestra y acondicionamiento.....  | 15 |
| 3.2 Evaluación de la actividad antioxidante y de la estabilidad de los extractos acuosos de la hoja, tallo y tallo con hoja de <i>Melissa officinalis</i> .....                     | 16 |
| 3.2.2 Actividad antioxidante y estabilidad mediante el método de DPPH .....   | 16 |
| 3.3 Aplicación del diseño Box-Behnken para la determinación de las condiciones físicas de extracción de antioxidantes en las hojas <i>Melissa officinalis</i> en medio acuoso. .... | 18 |
| 3.3.1 Método del radical DPPH*.....   | 19 |
| 3.3.2 Método de Capacidad Reductora (FRAP).....   | 19 |
| 3.3.3 Método de Folin-Ciocalteu para Fenoles Totales.....   | 20 |
| 3.3.4 Análisis estadístico.....   | 21 |
| 3.4 Determinación de compuestos antioxidantes presentes en el extracto acuoso de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> por HPLC-MS.....   | 22 |
| 5. Resultados y discusión .....   | 23 |
| 4.1 Evaluación de la actividad antioxidante y de la estabilidad de los extractos acuosos de la hoja, tallo y tallo con hoja de <i>Melissa officinalis</i> .....                     | 23 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2 Aplicación del diseño Box Behnken para la determinación de las condiciones físicas de extracción de antioxidantes en las hojas de <i>Melissa officinalis</i> en medio acuoso..... | 31 |
| 4.2.1 Análisis de datos del diseño de experimentos Box Behnken.....   | 35 |
| 4.2.2 Relación DPPH* (o FRAP) vs Fenoles totales .....  | 39 |
| 4.3 Identificación de compuestos en el extracto acuoso de <i>Melissa officinalis</i> con mayor actividad antioxidante por HPLC-MS.....  | 41 |
| 6. Conclusiones .....   | 45 |
| 7. Referencias.....   | 46 |

## 1. Introducción

Los efectos terapéuticos que ofrecen las plantas son muy importantes para la salud humana, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud cerca del 60% de la población humana sigue tratando los problemas de salud con remedios tradicionales (Lobo et al., 2015). Al respecto, más de 20,000 de plantas han sido investigadas y son utilizadas por un lado en la medicina tradicional para el tratamiento de varios dolores o enfermedades, mientras que por el otro se utilizan como aromatizantes o condimentos para la conservación y almacenamiento de diversos alimentos (Kogiannou et al. 2013).

Las infusiones de hierbas y el té verde son bebidas ampliamente consumidas en el mundo, y son consideradas como los principales reservorios de antioxidantes naturales. Estas son preparadas a partir de las hojas, flores, frutos y/o cortezas mediante un proceso de extracción con agua caliente o fría durante cierto tiempo (Sentkowsk et al., 2016).

La capacidad antioxidante de las infusiones a base de hierbas se atribuye principalmente a la presencia de compuestos fenólicos (Sentkowsk et al., 2016), los cuales son considerados como compuestos bioactivos debido a las propiedades benéficas que ofrecen como: antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, analgésico, neuroprotector, entre otras (Damiani, et al., 2013). Dichos compuestos tienen la capacidad de actuar como agentes reductores, donadores de hidrogeno o atenuadores del oxígeno singlete (Fotakis et al., 2016).

Es importante mencionar que la capacidad antioxidante varía de una planta a otra, debido a que los compuestos que proporcionan dicha actividad pueden verse afectados por el método de extracción, la variedad de la planta, condiciones

ambientales, condiciones estacionales y su origen geográfico (Fotakis et al., 2016, Lantano et al., 2015).

Entre las diferentes plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana se encuentra *Melissa officinalis* también conocida como bálsamo de limón, la cual pertenece a la familia de las *Lamiaceae*. Desde hace más de 2000 años ha sido utilizada en la medicina tradicional europea, en la medicina popular de Austria se utiliza para tratar problemas gastrointestinales y dolencias biliares y hepáticas, en Croacia, se utiliza para el tratamiento en enfermedades respiratorias, en México es utilizada para tratar problemas de gastritis, epilepsia, trastornos nerviosos, así como molestias estomacales. La planta también ha sido utilizada para el tratamiento de trastornos mentales, enfermedades del sistema nervioso central, problemas respiratorios, cardiovasculares, diversos tipos de cáncer, potenciador de memoria y antidepresivo (Shakeri et al., 2016).

Teniendo como base la importancia que representan las plantas y sus diferentes propiedades medicinales, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antioxidante y su estabilidad con respecto al tiempo en extractos acuosos de la hoja, tallo y tallo con hoja de *Melissa officinalis*, por la técnica del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), a su vez mediante un diseño de experimentos Box Behnken se evaluaron las variables de estudio (tiempo, temperatura y porcentaje de muestra) para optimizar las condiciones en las que se tiene mayor actividad antioxidante en la hoja. Una vez definidas las condiciones óptimas se realizó la identificación de compuestos antioxidantes de la hoja de *Melissa officinalis* por HPLC-MS

## 2. Antecedentes

### 2.1 Origen de *Melissa officinalis*

*Melissa officinalis* es una planta perenne, herbácea, pertenece a la familia de las *Lamiaceae* (Tabla 1), originaria del Mediterráneo y Asia (Adinee, Piri, Karami 2008). Se adapta muy bien a diferentes tipos de suelo y clima, por lo que puede crecer de forma silvestre en prados, riberas, zonas boscosas y zonas de cultivo, dicha propiedad le ha permitido vivir en diferentes lugares del mundo, por ejemplo en estado de Hidalgo crece en los municipios de Acaxochitlán, Pacula y Valle del Mezquital (Pérez, Villavicencio y Ramírez, 2006).

*Melissa officinalis* reconocida por su agradable aroma a limón es una planta perenne, herbácea, florece durante la primavera y verano, crece una altura entre 70 y 150 cm, sus tallos son lampiños y cuadrangulares, sus hojas son pecioladas, ovadas de 6 cm de largo y 3 cm de ancho. Sus flores crecen desde las axilas de las hojas y se presentan en color blanco y rosa (Figura 1) (Fonnegra, 2007).

|                   |                               |
|-------------------|-------------------------------|
| <b>Reino</b>      | <i>Plantae</i>                |
| <b>Sub-genero</b> | <i>Tracheobionta</i>          |
| <b>Orden</b>      | <i>Lamiales</i>               |
| <b>Familia</b>    | <i>Lamiaceae</i>              |
| <b>Genero</b>     | <i>Melissa</i>                |
| <b>Especie</b>    | <i>Melissa Officinalis L.</i> |

Goetz, 2012



Figura 1: Variedad de *Melissa officinalis*: a) blanco y b) rosa

- **Usos y aplicaciones**

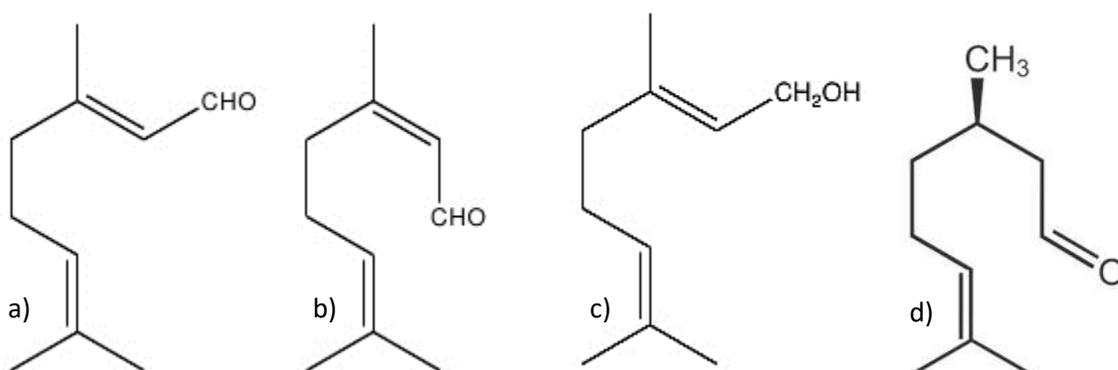
En la medicina tradicional mexicana las hojas de *Melissa officinalis* es utilizadas como infusión para tratar afecciones nerviosas (insomnio, palpitaciones, depresión, nerviosismo), dolor de cabeza, molestias estomacales y respiratorias. Algunas otras propiedades de la planta son: sedante, carminativo, antibacteriano, antiinflamatorio, antioxidante y neuroprotector (Kamdem et al., 2013).

También es muy utilizada en procedimientos culinarios para aromatizar vinagres, salsas, vinos y como ingrediente de licores; sus hojas se consumen en ensaladas y sopas. Por otra parte, el aceite esencial es empleado en la preparación de jabones, cosméticos y lociones. Shakeri et al. (2016) reportaron que el aceite esencial es el responsable de la actividad antibacteriana y antifúngica.

## 2.2 Compuestos presentes en *Melissa officinalis*

De acuerdo al perfil fitoquímico de la planta se ha demostrado la presencia de diferentes compuestos, incluyendo terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos y triterpenos) así como, compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides y taninos) (Calderon, 2011).

Se ha considerado que la actividad medicinal que posee la planta puede atribuirse a compuestos presentes en el aceite esencial, principalmente aldehídos monóterpenicos entre los cuales se encuentran isómeros del citral (neral y geranial), citronelal y geraniol (Shakeri et al.,2016); en la Figura 2 se muestra la estructura química de dichos compuestos.



**Figura 2:** Estructura química de: algunos compuestos presentes en el aceite a) geranial, b) neral, c) geraniol y d) citronelal

- **Triterpenos**

Los terpenoides son hidrocarburos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, cuya unidad estructural básica es el isopreno, constituido por cinco átomos de carbono. Su unión sucesiva da lugar a distintos tipos de terpenos en los que se encuentran monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos (Palá, 2002).

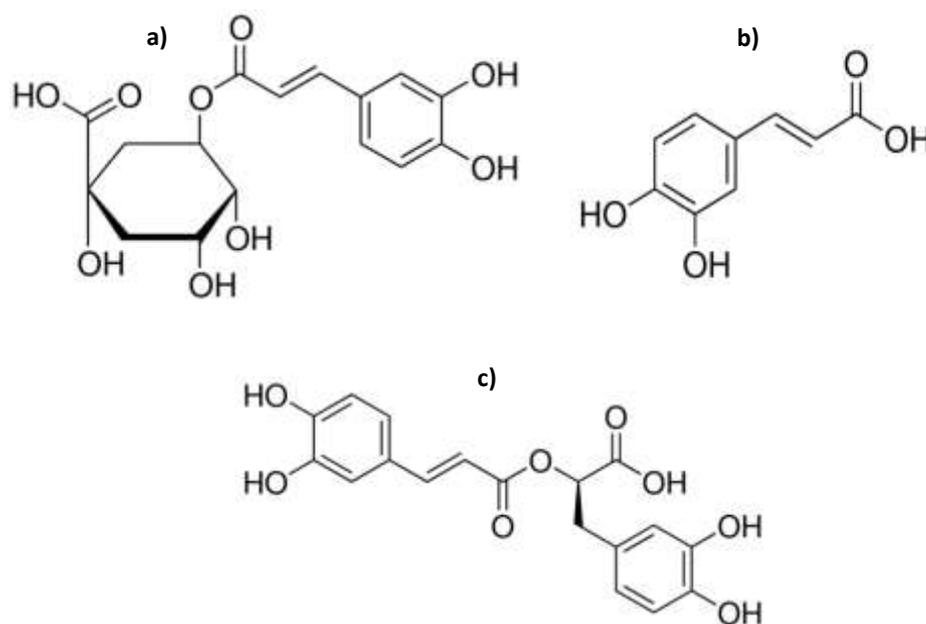
Los triterpenos tienen 30 carbonos, los cuales son sintetizados por la mayoría de las plantas, hasta ahora más de 20,000 triterpenos diferentes se han identificado

en diversas plantas. Los principales triterpenos que han sido aislados e identificados en *Melissa officinalis* son el ácido ursólico y oleanólico, que de acuerdo a algunas investigaciones son los responsables de la actividad antifúngica, citotóxica y hemolítica de la planta (Shakeri, Sahebkar y Javadi, 2016).

- **Ácidos fenólicos**

Los ácidos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, derivados del ácido benzoico y ácido cinámico, de acuerdo a su estructura química poseen al menos un anillo aromático, un grupo hidroxilo y un grupo carboxílico. Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal.

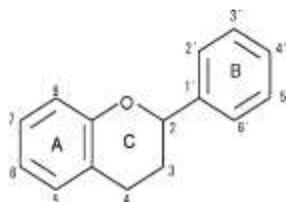
La actividad antioxidante que presenta *Melissa officinalis* se ha atribuido a la presencia del ácido rosmarínico, tal como lo demuestran los estudios de Ziaková et al. (2002) quienes reportaron que entre los principales componentes antioxidantes de *Melissa Officinalis* procedente de Eslovaquia, la presencia de este compuesto, así como el ácido cafeico y ácido clorogénico (Figura 3)



**Figura 3.** Estructura de algunos ácidos fenólicos: a) ácido clorogénico, b) ácido cafeico y c) ácido rosmarínico

- **Flavonoides**

Los flavonoides son metabolitos secundarios de bajo peso molecular. De acuerdo a su estructura química (Figura 4), poseen dos anillos de fenilos unidos mediante un anillo pirano (heterocíclico).



**Figura 4.** Estructura básica de los flavonoides

Investigaciones científicas sugieren que estos compuestos poseen actividad biológica y farmacológica; incluyendo actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, y anticoagulante (Shakeri, Sahebkar y Javadi 2016).

Los flavonoides que se han identificado en *Melissa officinalis* se clasifican en cuatro grupos: flavonas (9 compuestos) flavanonas (5 compuestos), flavonoles (3 compuestos), y flavonoides (2 compuestos) (Heitz et al., 2000).

### 2.3 Antioxidantes naturales y sintéticos

Los antioxidantes son sustancias que, al estar presentes a una concentración menor en comparación del sustrato oxidable, son capaces de prevenir la oxidación del sustrato, estos se dividen en naturales y sintéticos (Embuscado, 2015).

Los sintéticos retardan específicamente el deterioro, rancidez o decoloración, ocasionada por la oxidación lipídica. Los antioxidantes sintéticos más utilizados en alimentos son butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), Propilgalato (PG) y ter-butilhidroxi-quinona (TBHQ). Sin embargo, el uso inapropiado de estos compuestos puede causar efectos adversos en la salud, por ejemplo, estudios científicos afirman que el BHA es responsable de causar cierta toxicidad en el organismo de animales (Caleja et al., 2016).

Por otra parte, los antioxidantes naturales (Tabla 2) como la vitamina C, E, flavonoides, ácidos fenólicos y taninos, tienen diversas propiedades bioquímicas y medicinales, como antiinflamatorio, antimicrobiano, efectos anticancerígenos, reducción de la incidencia de enfermedades coronarias, entre otros (Oroian y Escriche, 2014).

**Tabla 2: Antioxidantes naturales y sus beneficios**

| <b>Antioxidante natural</b> | <b>Fuente</b>  | <b>Beneficios la salud</b>  |
|-----------------------------|--|---|
| <b>Vitamina C</b>           | Manzana, plátano, brócoli, ajo, jugo de naranja, pera, fresa, mandarina, menta   | La vitamina C es de gran interés debido a la posibilidad de incrementar la resistencia del plasma a la peroxidación lipídica<br><br>En la reducción de los niveles séricos de ácido úrico, disminuye significativamente el riesgo de sufrir un derrame cerebral, enfermedades degenerativas |
| <b>Vitamina E</b>           | Granos té verde, aceitunas, aceite de oliva, girasol y palma, semillas de calabaza y girasol   | La vitamina E es el principal protector de la membrana contra las especies reactivas del oxígeno y la peroxidación lipídica   |
| <b>Carotenoides</b>         | Granos, perejil, apio, albahaca, menta y jugo de naranja   | Los carotenoides han demostrado que desempeñan una serie de funciones en la prevención contra diversos trastornos de salud, incluyendo cáncer, enfermedades metabólicas y cardiovasculares  |
| <b>β-carotene</b>           | Amaranto, aceite de oliva, zanahorias  | Se ha informado que el β-caroteno se asocia con influencia positiva en ciertos tipos de cáncer y las enfermedades cardiovasculares  |
| <b>xantofila</b>            | Espinaca, zanahoria  | La luteína y la zeaxantina están fuertemente asociados con la salud visual y también reducen el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares   |
| <b>Flavonoides</b>          | Granos, jugo de naranja, palillo, hojas de stevia  | La ingesta de flavonoides se asocia inversamente con el cáncer subsecuente  |
| <b>Flavonoles</b>           | Piel de bayas de uva, té verde, vino, pimienta, hinojo, cebolla  | Los estudios han demostrado que la quercetina, es el principal flavonol presente en las cebollas, exhibe las siguientes propiedades, anticancerígeno, antiinflamatorio, la actividad anti-viral, y también puede prevenir enfermedades cardiovasculares                                     |
| <b>Ácidos fenólicos</b>     | Jengibre, hinojo, granos de café verde, mostaza, jugo de naranja, pimienta y especias (tomillo, salvia, romero, orégano, albahaca, mejorana), vino | Los ácidos fenólicos son potentes antioxidantes y se ha informado de demostrar antibacteriano, antiviral, anticancerígeno, antiinflamatorio y las acciones vasodilatadoras  |
| <b>Antocianinas</b>         | Uvas, tomates, granadas y zanahorias moradas, granos de café verde, col roja, vino   | Las antocianinas ejercen efectos beneficiosos sobre los seres humanos; exhiben antioxidante, y actividad anticancerígena (Hui et al., 2010), juega un papel vital en la prevención de enfermedades neuronales, cardiovasculares, cáncer y diabetes.   |

Oroian y Escriche, 2014

- **Antioxidantes en plantas**

Otros reservorios de antioxidantes naturales son las plantas. Varios estudios han evaluado la actividad antioxidante en algunas plantas que son utilizadas en la preparación de infusiones (Li et al., 2014) por ejemplo, romero (*Rosmarinus officinalis*) tomillo (*Thymus vulgaris L.*), jengibre (*Zingiber officinale*) té verde (*Camellia sinensis*), salvia (*Salvia officinalis*) y mejorana (*Majorana hortensis*). Algunos de los compuestos antioxidantes aislados en dichas plantas se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Antioxidantes aislados de algunas plantas

| Nombre científico             | Planta   | Compuestos antioxidantes   |
|-------------------------------|----------|--|
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | Romero   | carosol, ácido carnósico, rosmanol, diterpenos (epirosmanol, isorosmanol, rosmaridifenol, rosmariquinona, ácido rosmarínico)   |
| <i>Salvia officinalis L</i>   | Salvia   | carosol, ácido carnósico, rosmanol, ésteres metílico y etílico de carosol, ácido rosmarínico   |
| <i>Thymus vulgaris L.</i>     | Tomillo  | timol, cavacrol, p-cumeno-2,3-diol, ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido rosmarínico), diterpenos fenólicos, flavonoides   |
| <i>Camellia sinensis</i>      | Té verde | ácido gálico, ácido 3-galoyl-quinico, teobromina, (-) - galocatequina, (-) - epigalocatequina, cafeína, dímero de procianidina, (-) - epicatequina, -) - galato de epigalocatequina, |
| <i>Zingiber officinale</i>    | Jengibre | gingerol y shogaol,  |
| <i>Majorana hortensis</i>     | Mejorana | betacaroteno, beta-sitosterol, ácido cafeico, carvacrol, eugenol, hidroquinona, ácido rosmarínico, terpinen-4-ol   |

Embucado, 2015

## 2.4 Métodos para evaluar la actividad antioxidante en alimentos

Existen diferentes ensayos para evaluar la actividad antioxidante en alimentos, algunos autores (Karadag, Ozcelik y Saner, 2009), los clasifican en base al mecanismo de reacción que tienen los antioxidantes para estabilizar a los radicales libres. Estos mecanismos se conocen como transferencia de átomos de hidrogeno (HAT) y transferencia de electrones (ET), ambos pueden ocurrir de forma paralela. Sin embargo, el mecanismo predominante está determinado por la estructura química del antioxidante, su solubilidad, coeficiente de partición, energía de ionización de enlace, entre otros (Londoño, 2012). Los métodos por transferencia de átomos de hidrogeno miden la capacidad de un antioxidante para estabilizar un radical libre, mediante la transferencia de átomos de hidrogeno, un ejemplo de ello es el método ORAC. Las reacciones por este mecanismo son generalmente rápidas e independientes del pH y del solvente, pero son sensibles a la presencia de metales y agentes reductores los cuales pueden generar variabilidad en los resultados.

Por otro parte los métodos basados por transferencia de electrones determinan la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto, estas reacciones suelen ser más lentas que las de transferencia de átomos de hidrogeno. La reactividad relativa de un antioxidante bajo este mecanismo está basada en la desprotonación y el potencial de ionización del grupo funcional, por lo tanto este tipo de reacciones depende del pH. Los métodos FRAP, DPPH y CUPRAC siguen este mecanismo (Shahidi y Zhong, 2015).

### 2.4.1 Fundamento de los métodos DPPH, FRAP y Fenoles Totales

#### ➤ **Ensayo DPPH (2,2 -difeníl-1-picrilhidracil)**

El radical DPPH es ampliamente utilizado para medir la actividad antioxidante debido a su practicidad, fue propuesto por Brand–Williams en 1995. Este ensayo se basa en la donación electrónica del antioxidante para neutralizar radical

DPPH, provocando un cambio de color debido a la reducción del compuesto, dicho cambio se mide a 517 nm.

Los resultados se suelen expresar como  $EC_{50}$  el cual se define como la concentración del antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial del radical al 50%. Algunas de sus ventajas son simplicidad y baja instrumentación. Sin embargo, presenta algunas desventajas, como disminución en la absorbancia provocados por la luz y oxígeno. La similitud de la molécula del DPPH en comparación con los radicales peroxilo es baja (Karadag, Ozcelik y Saner, 2009). Otra limitación importante es la interpretación de resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el DPPH por ejemplo, las antocianinas tienen una fuerte absorción en el mismo intervalo de longitud de onda que DPPH (500-550 nm), por lo que pueden interferir en la interpretación de resultados (Shahidi y Zhong, 2015).

➤ **FRAP (Poder antioxidante reductor del hierro)**

El método de FRAP se basa en la capacidad que tienen los compuestos antioxidantes para reducir el  $Fe^{3+}$ -TPTZ (2,4,6-tripiridiltriazina férrica) al complejo ferroso azul ( $Fe^{2+}$ -TPTZ) en medio ácido (Benzie et al. 1999), siguiendo un mecanismo de transferencia de electrones (Zhong y Shahidi, 2015). Se cree que el poder reductor está correlacionado con el grado de hidroxilación y conjugación en polifenoles. La actividad antioxidante se determina como un aumento en la absorbancia a 593 nm y los resultados se expresan equivalentes de micromoles de  $Fe^{2+}$ .

A diferencia de otros métodos basados en transferencia de electrones, el ensayo FRAP se lleva a cabo en condiciones de pH ácido (pH 3,6) para mantener la solubilidad del hierro y, lo que es más importante, impulsar la transferencia de electrones. Entre sus ventajas se encuentra que es un método simple, rápido, rentable y no requiere equipo especializado; Sin embargo, al igual que otros métodos presenta desventajas, por ejemplo, cualquier sustancia donadora de

electrones incluso sin propiedades antioxidantes con potencial redox inferior al del par redox  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  puede contribuir en los resultados de FRAP e indicar valores erróneos. Además, un antioxidante que puede reducir eficazmente los prooxidantes puede no ser capaz de reducir eficientemente el  $\text{Fe}^{3+}$ . Por ejemplo, el ensayo de FRAP no mide GSH (glutación), un antioxidante importante in vivo (Karadag, Ozcelik y Saner, 2009).

### ➤ Fenoles Totales

El método de Folin-Ciocalteu es utilizado para medir el contenido fenólico total, fue propuesto por Singleton et al. (1999). El ensayo se basa en la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu por compuestos fenólicos en condiciones alcalinas. El reactivo de Folin-Ciocalteu tiene complejos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico, el cual se reduce, dando un cromóforo de color azul con absorción máxima a 765 nm. La reacción se da mediante un mecanismo de transferencia de electrones y se asocia con el poder reductor de los compuestos fenólicos, dónde el  $\text{Mo}^{6+}$  se reduce a  $\text{Mo}^{5+}$  aceptando un electrón del antioxidante fenólico (Shahidi y Zhong, 2015). Los resultados se expresan generalmente como equivalentes de ácido gálico.

Este ensayo es muy utilizado debido su simplicidad y reproducibilidad; sin embargo, tiene algunos inconvenientes como su sensibilidad al pH, temperatura y tiempo de reacción, es un método no estandarizado y no es específico para compuestos fenólicos ya que también puede ser reducido por otros compuestos no fenólicos, como los azúcares reductores y algunos aminoácidos. Además, no considera la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos lipófilos debido a que la determinación se lleva en medio acuoso (Karadag, Ozcelik y Saner, 2009).

## 2.5 Diseño de experimentos Box Behnken

Box-Behnken es un diseño de experimentos factorial fraccionado a tres niveles, consiste en 15 experimentos al azar. El diseño considera los puntos medios de cada borde del cubo multidimensional y un punto central replicado ( $n=3$ ), derivándose el número de experimentos de la siguiente fórmula  $N=2k(k-1) + C_0$  (donde  $k$  es el número de factores y  $C_0$  el número de repetición de puntos centrales (Ying y Dang, 2008). Para cada factor se emplean tres niveles codificados como: -1(bajo), 0 (medio) y +1 (alto).

El diseño Box Behnken permite optimizar el número de experimentos a realizar y determina las posibles interacciones entre las variables de estudio y sus efectos. Esta relación se expresa matemáticamente mediante la siguiente ecuación polinomial de segundo orden (Benerjee et al., 2012)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{33} X_{32} + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Donde:

Y= Respuesta

$B_0$ = Constante

$B_1$ ,  $B_2$  y  $B_3$ = Coeficientes lineales

$B_{11}$ ,  $B_{22}$  y  $B_{33}$ = Coeficientes cuadráticos

$X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ = Factores a estudiar

Al graficar la ecuación de segundo orden se puede observar la interacción entre dos variables y su respuesta.

### 3. Objetivos

#### Objetivo general

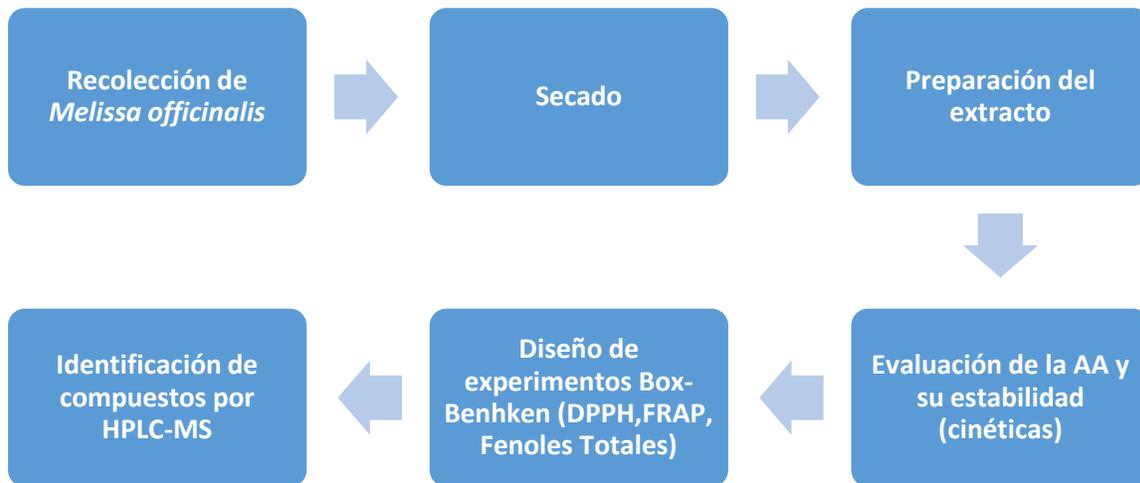
Evaluar la actividad antioxidante e identificar los compuestos bioactivos de extractos acuosos de *Melissa officinalis* a través de técnicas analíticas para proponer su uso como fuente alternativa de antioxidantes naturales

#### Objetivos específicos

1. Analizar la actividad antioxidante de extractos acuosos de hoja, tallo y tallo c/hoja de *Melissa officinalis*, utilizando el método DPPH\* a fin de determinar su estabilidad en el tiempo.
2. Evaluar el efecto del tiempo, temperatura y cantidad de muestra mediante la aplicación del diseño de experimentos Box-Benhken, para seleccionar las condiciones óptimas de extracción de antioxidantes de *Melissa officinalis*.
3. Determinar la actividad antioxidante de los diferentes extractos acuosos de *Melissa officinalis* mediante DPPH\*, FRAP y Fenoles Totales con la finalidad de identificar aquellos con mayor contenido de compuestos bioactivos.
4. Establecer la relación entre la actividad antioxidante y el contenido de Fenoles Totales mediante el análisis estadístico de los datos obtenidos por DPPH\* y FRAP para determinar su posible origen fenólico.
5. Identificar los compuestos con propiedades antioxidantes presentes en los extractos acuosos de *Melissa officinalis* a través de su análisis por HPLC-MS para proponer su uso como fuente alternativa de antioxidantes naturales.

## 4. Metodología

En la Figura 5 se muestra el diagrama general de estudio de extractos acuosos de *Melissa officinalis*.



**Figura 5:** Diagrama general empleado para la evaluación de la actividad antioxidante, su estabilidad y la optimización de las condiciones físicas de extracción de compuestos con actividad antioxidante (AA) en extractos acuosos de *Melissa officinalis*, así como la identificación de los mismos mediante HPLC-MS.

### 3.1 Recolección de la muestra y acondicionamiento

La muestra de *Melissa officinalis* fue adquirida en el mercado Benito Juárez ubicado en Pachuca, Hidalgo. La planta se secó por exposición al sol, a temperatura ambiente y con aireación, durante un periodo de 15 días. Este proceso tuvo la finalidad de remover la humedad para evitar la presencia de hongos. Una vez seca, se separaron las hojas del tallo, para su posterior análisis mediante diferentes métodos analíticos.

## 3.2 Evaluación de la actividad antioxidante y de la estabilidad de los extractos acuosos de la hoja, tallo y tallo con hoja de *Melissa officinalis*

### 3.2.1 Preparación de los extractos acuosos

Se pesaron tres muestras cada una de un gramo de hoja seca, por separado se adicionaron 100 mL de agua desionizada en un vaso con doble chaqueta de 250 mL a reflujo. En la primera muestra el agua circulaba a 25 °C, la segunda 55°C y la tercera 90°C; la extracción se mantuvo durante 5, 10 ó 20 minutos con agitación constante (Tabla 5). Este procedimiento se repitió para el tallo y tallo con hoja de *Melissa officinalis*

**Tabla 5:**

Preparación de extractos acuosos de la hoja, tallo y tallo con hoja de *Melissa officinalis*, bajo diferentes condiciones de tiempo y temperatura

| Muestra        | Temperatura °C |    |    | Tiempo de extracción (minutos) |    |    |
|----------------|----------------|----|----|--------------------------------|----|----|
|                | 25             | 55 | 90 | 5                              | 10 | 20 |
| Hoja           | 25             | 55 | 90 | 5                              | 10 | 20 |
| Tallo          | 25             | 55 | 90 | 5                              | 10 | 20 |
| Tallo con hoja | 25             | 55 | 90 | 5                              | 10 | 20 |

### 3.2.2 Actividad antioxidante y estabilidad mediante el método de DPPH

Para evaluar la actividad antioxidante y su estabilidad; de cada extracto acuoso de *Melissa officinalis* obtenido en diferentes condiciones de temperatura y tiempo (Tabla 5) se utilizó el método del radical de DPPH\*.

Para realizar esta determinación, se utilizó la técnica propuesta por Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Se preparó una curva de calibración, [0 a 33 µM], a partir de una solución patrón de Trolox 1mM en MeOH. A cada solución estándar de la curva se añadieron 2.9 mL de DPPH\* (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) 0.1 mM en MeOH. Todas las soluciones estándar se llevaron a un volumen final de 3 mL con MeOH. A la par de los estándares se

preparó una muestra control que únicamente contenía 0.1 mL de MeOH y 2.9 mL de DPPH\*. Los estándares se dejaron reaccionar durante 50 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a 515 nm, utilizando como blanco metanol.

La AA (actividad antioxidante) de los extractos acuosos se midió utilizando el mismo procedimiento que para la curva de calibración, reemplazando la solución de Trolox por 100 µL de cada extracto. Finalmente se construyó la curva de calibración de [Trolox] vs % DPPH\*<sub>remanente</sub>, a partir de los valores obtenidos de absorbancia para el control y para cada uno de los estándares. El % de DPPH\*<sub>remanente</sub> se calculó a partir de la Ecuación 1.

$$\% \text{ DPPH } *_{\text{remanente}} = \left[ \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100 \quad \text{Ec (1)}$$

Donde A

$A_{\text{muestra}}$  = Absorbancia obtenida para la muestra

$A_{\text{blanco}}$  = Absorbancia obtenida para el metanol

$A_{\text{control}}$  = Absorbancia obtenida para el control

La estabilidad se realizó midiendo la absorbancia de los diferentes extractos cada 60 minutos por 5 horas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 3.3 Aplicación del diseño Box-Behnken para la determinación de las condiciones físicas de extracción de antioxidantes en las hojas *Melissa officinalis* en medio acuoso.

Para optimizar las condiciones de extracción se realizó un diseño de experimentos Box Behnken de tipo factorial fraccional centrado, para este diseño solo se optó por trabajar únicamente con las hojas de *Melissa officinalis* debido a que tuvo mayor actividad antioxidante comparada con el tallo y el tallo con la hoja

Los factores de control y niveles seleccionados en el diseño (Tabla 6) se eligieron considerando las condiciones normales de preparación de una infusión.

**Tabla 6:** Factores de control y niveles seleccionadas para la obtención de extractos acuosos con actividad antioxidante de las hojas de *Melissa officinalis*

|          | Factores de control | Niveles seleccionados |    |    |
|----------|---------------------|-----------------------|----|----|
|          |                     | -1                    | 0  | 1  |
| <b>A</b> | Temperatura (°C)    | 20                    | 55 | 90 |
| <b>B</b> | Tiempo (min)        | 5                     | 15 | 25 |
| <b>C</b> | % Muestra           | 2                     | 6  | 10 |

A partir del diseño de experimentos efectuado, se realizaron 15 experimentos por triplicado, los diferentes extractos acuosos de las hojas de *Melissa officinalis* se prepararon de acuerdo a las condiciones físicas de temperatura, tiempo y porcentaje de muestra de cada experimento (Tabla 7), empleando para ello un vaso de doble chaqueta y un baño con recirculación.

**Tabla 7:** Diseño de experimentos Box Behnken

| Experimento | Temperatura(°C) | Tiempo(min) | Muestra (%) |
|-------------|-----------------|-------------|-------------|
| 1           | 20              | 25          | 6           |
| 2           | 55              | 25          | 2           |
| 3           | 90              | 25          | 6           |
| 4           | 20              | 5           | 6           |
| 5           | 55              | 15          | 6           |
| 6           | 55              | 5           | 10          |
| 7           | 55              | 25          | 10          |
| 8           | 20              | 15          | 10          |
| 9           | 90              | 15          | 2           |
| 10          | 20              | 15          | 2           |
| 11          | 55              | 15          | 6           |
| 12          | 55              | 5           | 2           |
| 13          | 90              | 15          | 10          |
| 14          | 90              | 5           | 6           |
| 15          | 55              | 15          | 6           |

Para cada experimento se evaluó la actividad antioxidante mediante las técnicas del radical DPPH\*, FRAP y el contenido de Fenoles Totales por el método de Folin-Ciocalteu.

### ***3.3.1 Método del radical DPPH\****

Para realizar esta determinación, se utilizó la técnica propuesta por Brand-Williams *et al.* (1995) descrita anteriormente en el apartado 3.2.2.

### ***3.3.2 Método de Capacidad Reductora (FRAP)***

Este análisis se realizó utilizando la técnica FRAP de Benzie y Strain (1996) modificada. El reactivo FRAP se preparó a partir de un buffer de acetatos (300 mM a pH 3.6), cloruro férrico hexahidratado (20 mM) y TPTZ (4,6-tripiryridyl-s-triazina) 10 mM, preparada en HCl 40 mM. Las tres soluciones se mezclaron en proporciones 10:1:1 (v/v/v).

Se preparó una curva de calibración, [0 a 100 mM], a partir de una solución patrón de cloruro ferroso tetrahidratado en HCl 40 mM. A cada solución estándar de la curva se añadió 1 mL de reactivo de FRAP y se llevó a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Todas las soluciones se incubaron a 37 °C por 10 minutos y se midió su absorbancia a 593 nm utilizando un blanco que contenía únicamente reactivo de FRAP. La AA de los extractos acuosos se midió utilizando el mismo procedimiento que para la curva de calibración, reemplazando la solución de cloruro ferroso tetrahidratado por 250 µL de cada extracto. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Para cuantificar la AA se utilizó la Ecuación 2.

$$A = a X [\text{Fe}^{2+}] + b \quad \text{Ec (2)}$$

### ***3.3.3 Método de Folin-Ciocalteu para Fenoles Totales***

Para la cuantificación de Fenoles Totales se empleó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton, y col., 1999). Se construyó una curva de calibración en un intervalo de concentración de 0 a 15 mg/L, a partir de una solución estándar de ácido gálico (AG) 1000 mg/L. Se tomó el volumen correspondiente de cada estándar, se adicionaron 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5%, 2 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se aforó a 10 mL con agua destilada. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 760 nm. Para la determinación de fenoles en los extractos acuosos de *Melissa officinalis*, se siguió el mismo procedimiento que para la curva de calibración, estándar, sustituyendo el AG por 1 mL de cada muestra. Las determinaciones se realizaron por triplicado. La concentración de fenoles totales se calculó a través de la Ecuación 3.

$$A = a X [\text{Fenoles totales}] + b \quad \text{Ec (3)}$$

### *3.3.4 Análisis estadístico*

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Minitab 17. A partir de los datos obtenidos, se realizó el ANOVA, se construyeron los diagramas de contorno y se determinó la correlación entre la concentración de compuestos antioxidantes y el contenido de fenoles totales presente en los extractos acuosos de *Melissa officinalis*.

### 3.4 Determinación de compuestos antioxidantes presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Melissa officinalis* por HPLC-MS

Los resultados del Diseño de experimentos Box-Benhken arrojaron las mejores condiciones físicas de extracción (tiempo, temperatura y porcentaje de muestra) de antioxidantes de *Melissa officinalis* en medio acuoso. Los extractos acuosos de las hojas con la mayor actividad antioxidante fueron preparados de acuerdo con las condiciones identificadas y liofilizados en una Liofilizadora LABCONCO. Posteriormente, la muestra se fraccionó en un cartucho de extracción en fase sólida de C18. Se obtuvieron 3 fracciones, la primera agua 100%, la segunda agua/MeOH 50/50 y la tercera MeOH 100%.

Para la identificación de los compuestos antioxidantes presentes en el extracto acuoso de *Melissa officinalis* se utilizó un cromatógrafo de líquidos (Agilent 1200 Series Binary SL), un detector (Espectrómetro de Masas Bruker Esquire 6000). La separación se realizó en una columna (Synergi 4u Polar-RP 80A 150 x 2.0 mm). Se trabajó con un flujo de 2 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 µL y la detección fue llevada a cabo entre 400 m/z. Después de pasar a través del flujo, el eluato se dividió y 0.20 mL/min se dirigió a un espectrómetro de masas de trampas de iones equipado con un interfaz de electrospray en modos de iones negativos y positivos. El rango de exploración fue de 100-1000 a una velocidad de 1 scan/seg. La temperatura de solvatación fue de 300 °C. Se utilizó nitrógeno como gas de secado a un caudal de 7 L/ min. Los constituyentes se identificaron por comparación del espectro de masas con los de los compuestos de referencia en la biblioteca NIST 05.

## 5. Resultados y discusión

### 4.1 Evaluación de la actividad antioxidante y de la estabilidad de los extractos acuosos de la hoja, tallo y tallo con hoja de *Melissa officinalis*

La actividad antioxidante y la estabilidad de cada uno de los extractos de *Melissa officinalis* (hoja, tallo y tallo con hoja) analizados a diferentes condiciones de temperatura y tiempo (Tabla 5) se muestran en los Gráficos 1, 2 y 3.

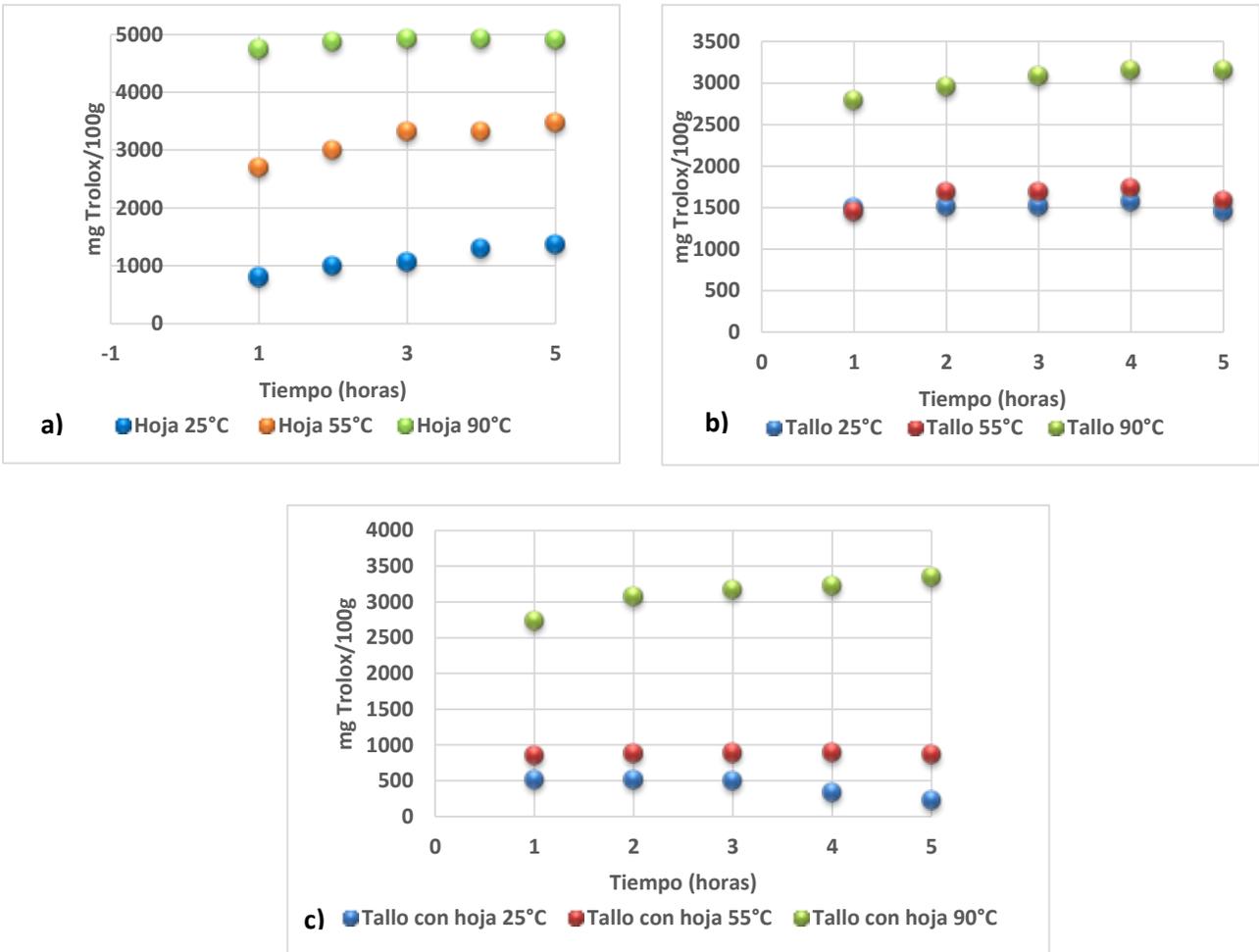
En el Gráfico 1 (a y b) correspondiente a la hoja y el tallo, se observa que la actividad antioxidante se incrementa durante las primeras cuatro horas y posteriormente disminuye. Por otra parte, la actividad antioxidante de los extractos acuosos de la hoja con tallo obtenidos a 25 y 55°C, aumentó durante las primeras dos horas para después disminuir. Sin embargo, a 90°C la actividad antioxidante fue aumentando gradualmente. De igual manera Jeszka y Zgola (2014) reportaron una tendencia similar en muestras de té verde, en dicho estudio observaron que la actividad antioxidante disminuía después de los 15 minutos de extracción, y a su vez que la actividad antioxidante era menor cuando se utilizaba una temperatura de extracción baja. Al respecto Tusék et al. (2016) observaron el mismo comportamiento en la actividad antioxidante de cuatro plantas (manzanilla, diente de león, caléndula y milenrama), la actividad antioxidante era mayor en extractos preparados a 80°C comparados con los de 40°C, y dicha actividad era mayor durante los primeros 10 minutos y disminuía después de los 60 minutos.

En el estudio realizado por Pasrija y Anandharamakrishnan (2015) mencionan el efecto que tiene la temperatura y el tiempo de extracción en la composición de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante. Los autores observaron que el tratamiento térmico a 100°C durante dos horas en extractos de té verde conduce a un cambio en la configuración de las catequinas, provocando que algunos compuestos como el epigallocatecol (EGCG) y epicatequina galato sufran un

proceso parcial de epimerización convirtiéndose en epigallocatequina galato(EGCG) y catequina galato( CG).

Se ha considerado que la disminución en la actividad antioxidante se debe a que la concentración de compuestos fenólicos disponibles para reaccionar con el DPPH es baja cuando se combina el tallo con la hoja, algunos autores mencionan que para alcanzar un equilibrio en la reacción entre compuestos fenólicos responsables de la actividad antioxidante y el DPPH dependerá de la concentración del antioxidante.

También se observó que conforme la temperatura de extracción se incrementa, la actividad antioxidante también lo hace, es decir, a mayor temperatura mayor actividad antioxidante observada; esta tendencia se presentó en cada uno de los componentes (hojas, tallo y tallo con hoja) de *Melissa officinalis* analizados. Así, el extracto preparado con la hoja a 90°C presentó una actividad antioxidante entre 4747-4917 mg Trolox/100 g, mientras que el tallo a esa misma temperatura de extracción presentó valores de 2516-2806 mg de Trolox/100g, y finalmente en la hoja con tallo se determinó una actividad antioxidante de 2717-3272mg trolox/100g. Varios estudios sugieren que la hoja es el componente principal de la planta con mayor capacidad antioxidante (Muniyandi et al. 2017, Mahmoudi et al., 2016) lo cual coincide con los resultados obtenidos.



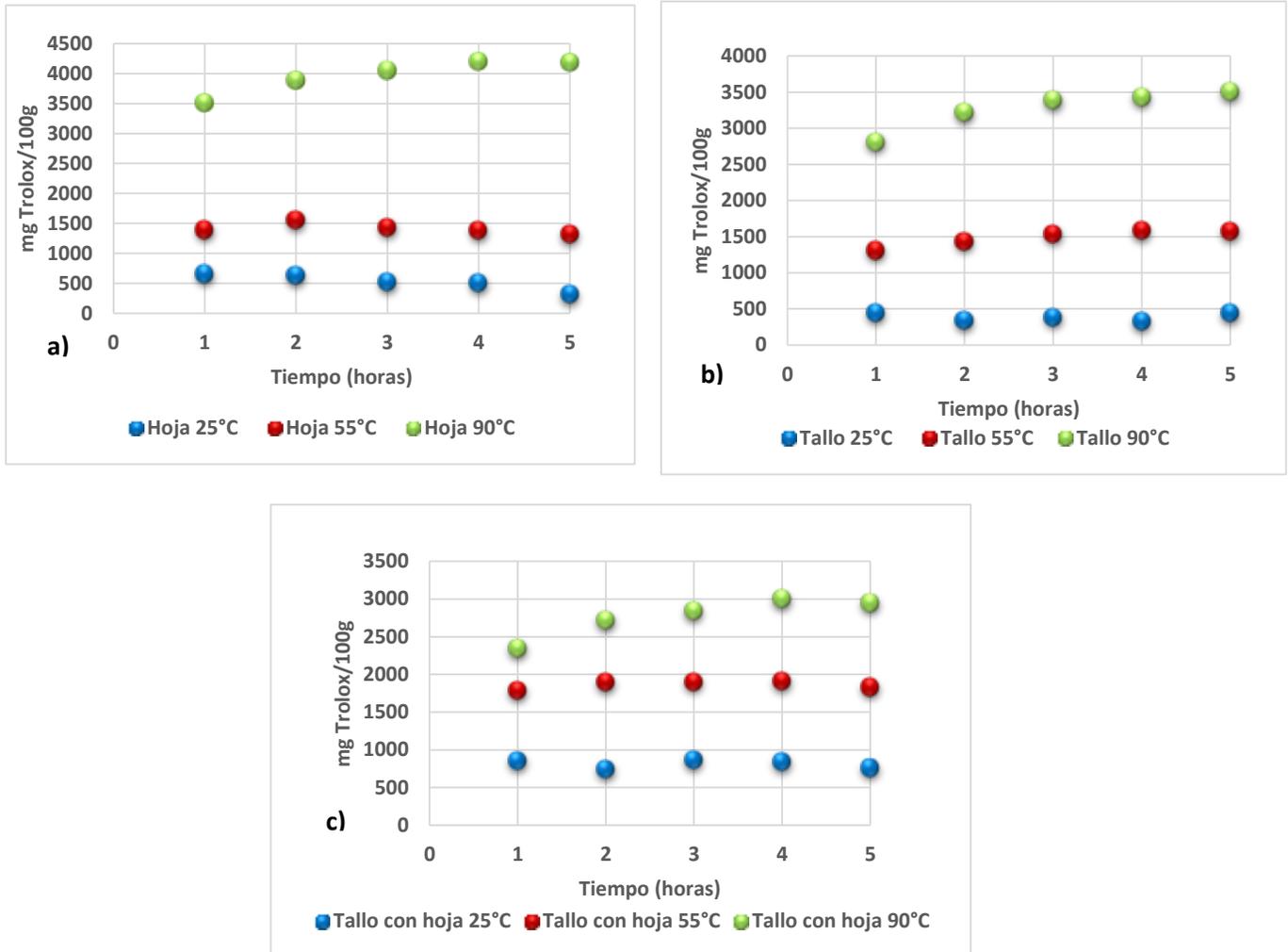
**Gráfico 1:** Actividad antioxidante de la hoja(a), tallo (b) y tallo con hoja (c); durante un tiempo de extracción de 5 minutos

La temperatura fue un factor fundamental en la liberación de compuestos antioxidantes presentes en *Melissa officinalis*, ya que a 90°C se obtuvieron los extractos con las mayores actividades antioxidantes determinadas por el método del DPPH\*. Estos resultados concuerdan con el estudio de Ramírez et al. (2016) en el cual se determinó que la temperatura de 90°C favorece la solubilización de compuestos antioxidantes en jengibre, principalmente de tipo fenólico. En otro estudio se encontró que los extractos acuosos de *Melissa officinalis* (32.0 mgTrolox/100g) posee mayor actividad antioxidante comparado con los extractos

etanólicos (28.2mgTrolox/100g) y metanólicos (24.3mgTrolox/100g) (Pereira et al., 2008).

Las cinéticas analizadas durante un tiempo de extracción de 10 min se muestran en el Gráfico 2. Al igual que en el Gráfico 1, se observó que la actividad antioxidante se favorece con el incremento de la temperatura y esta se mantiene durante las primeras cuatro horas para enseguida disminuir. Los extractos preparados con la hoja durante un tiempo de extracción de 10 min a 90°C mostraron valores de 3520-4193 mg Trolox/100 g, estos fueron menores comparados con los obtenidos a un tiempo de extracción de 5 min (Gráfico 1a). Sin embargo, estos resultados fueron superiores a los reportados por Koksál et al. (2010) y Mihaylova et al. (2015) cuya actividad antioxidante en infusiones preparadas con las hojas de *Melissa officinalis* durante 10 minutos de extracción fue de 31.4 y 942.25 mg Trolox/100g respectivamente. Estas diferencias se pueden atribuir a que las hojas empleadas para en el análisis eran frescas. Estudios recientes han demostrado que las plantas secas exhiben mayor actividad antioxidante comparada con las plantas frescas (Martínez et al., 2014 y Barros et al., 2012), esto puede deberse al estrés que se produce en la matriz vegetal de la planta durante el secado, lo cual provoca que mayor cantidad de compuestos fenólicos se han liberados con facilidad durante la extracción.

Por otra parte, el tallo presentó una actividad antioxidante de 3221-3512mg Trolox/100g, dichos valores son altos comparados con los obtenidos en la extracción de 5 min (Gráfico 1b). Se ha considerado que este efecto se debe a que el tejido epidérmico del tallo suele ser un poco más grueso provocando que se requiera más tiempo para la liberación de compuestos fenólicos con actividad antioxidante. Tal es el caso del estudio reportado por Fotakis et al. (2016), en donde se encontró una mayor cantidad de compuestos fenólicos en infusiones preparadas durante 15 minutos comparadas con las de 2 minutos, lo cual indica que en algunos casos el tratamiento térmico prolongado mejora la liberación de compuestos.



**Gráfico 2.** Actividad antioxidante de la hoja (a), tallo (b) y tallo con hoja (c), durante un tiempo de extracción de 10 minutos

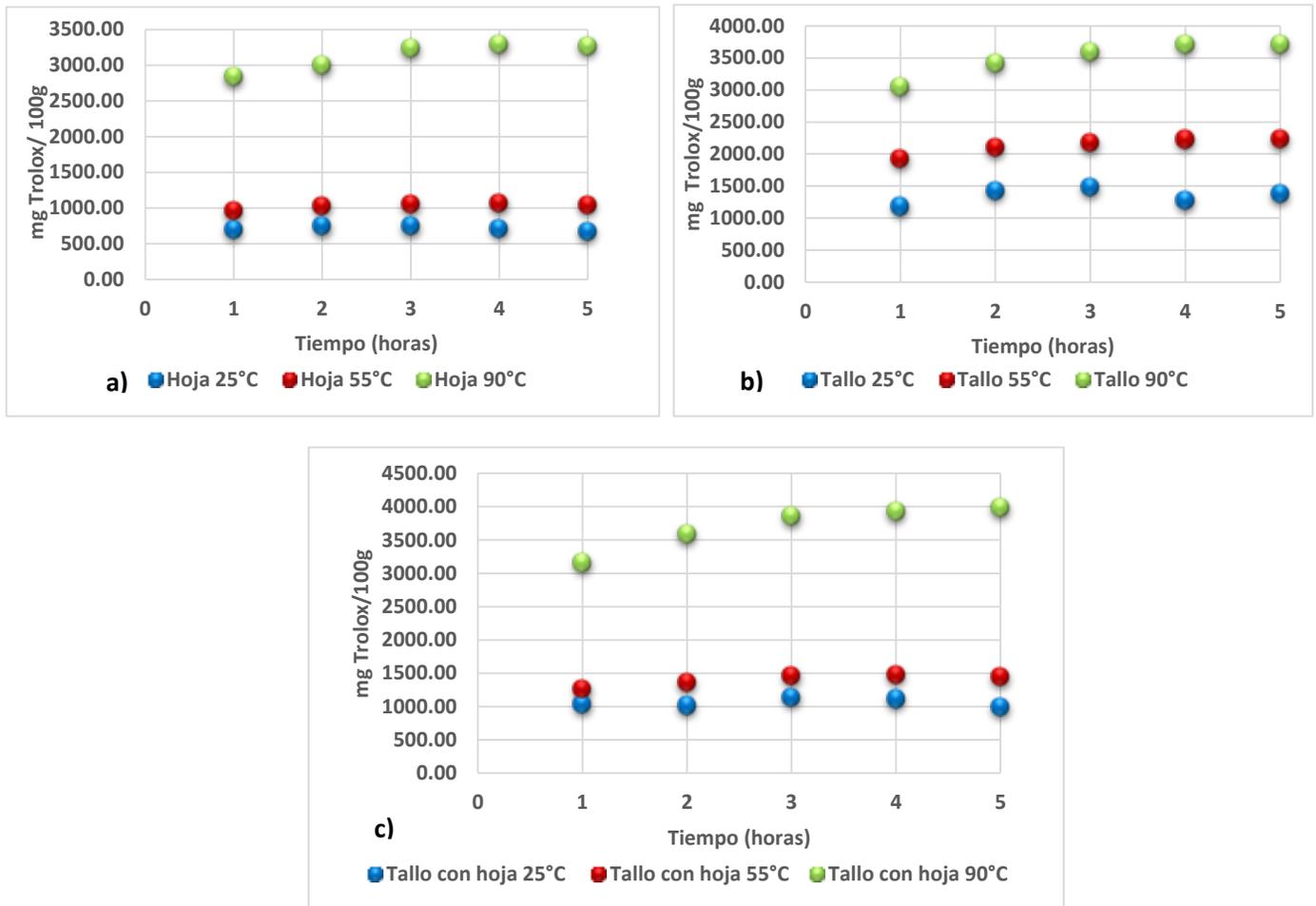
La actividad antioxidante de los extractos preparados con la hoja, tallo y tallo con hoja durante 20 minutos de extracción (Gráfico 3), presentaron un comportamiento similar a las muestras extraídas durante 5 min (Gráfico 1) y 10 minutos (Gráfico 2). Sin embargo, se observó que la actividad antioxidante disminuye en el extracto de la hoja a 90°C comparada con las extracciones de 5 y 10 minutos. Al respecto, Pasrija et al. (2015) señalan que la exposición a una temperatura alta durante un periodo prolongado de tiempo puede conducir a la

degradación enzimática y oxidación de los compuestos fenólicos. La temperatura es una variable que afecta considerablemente la liberación de compuestos, tal como se ha observado en este estudio. Sin embargo, la temperatura no se puede aumentar indefinidamente, ya que algunos compuestos pueden degradarse y perder sus propiedades antioxidantes (Conde et al., 2010).

Los resultados obtenidos fueron menores comparados con Papova et al. (2016) quienes reportaron una actividad antioxidante de 9738 mgTrolox/100g en infusiones de *Melissa officinalis* preparadas durante 30 minutos de extracción. Este comportamiento es similar al reportado por Katalinic et al., (2006), en donde evaluaron el efecto que tiene la temperatura (20-90°C) y el tiempo (30 min) de extracción sobre la actividad antioxidante de 70 infusiones. En ese estudio encontraron que *Melissa officinalis* obtuvo la mayor capacidad antioxidante comparada con las otras 69 plantas y se observó que la actividad antioxidante aumentaba conforme la temperatura de extracción se incrementaba.

Asimismo, Duda et al. (2015) y Tusevski et al. (2014) han reportado una actividad antioxidante elevada en extractos etanólicos y metanólicos de *Melissa officinales* de 12225 mgTrolox/100g y 10150 mgTrolox/100g.

En lo que respecta a la actividad antioxidante del tallo y tallo con hoja, estos presentaron valores de 3052-3715 y 3162-3990 mg Trolox/100g respectivamente. Estos valores fueron superiores a los obtenidos en las cinéticas de extracción de 5 y 10 minutos. Al respecto Mokrani y Madani (2016) mencionan que la temperatura mejora la eficiencia en la extracción de compuestos fenólicos y aumenta la actividad antioxidante de los extractos, esto se debe a que el calentamiento suaviza el tejido de la planta y debilita las interacciones fenol-polisacárido, provocando que existe una mayor solubilidad de este tipo de compuestos.



**Gráfico 3:** Actividad antioxidante de la hoja(a), tallo (b) y tallo con hoja (c), durante un tiempo de extracción de 20 minutos

Existen pocos estudios en infusiones reportados que permitan comparar los resultados obtenidos para esta planta. Sin embargo, algunos reportes sugieren que la temperatura en algunos casos puede ser un factor primordial para la extracción de dichos compuestos. Al respecto Skotti et al. (2014) reportaron que la actividad antioxidante de *Melissa officinalis* era mayor cuando se extraía con agua caliente en comparación con el agua fría. De igual manera señalaron que esta planta exhibía una mayor actividad antioxidante, así como una concentración superior de fenoles totales comparada con el orégano y la salvia. Por otra parte, Yang Hwang y Lin, (2007) investigaron el efecto de la

temperatura y el tiempo de remojo en cinco tipos de té comerciales. Ellos observaron que las catequinas, la cafeína y el ácido gálico eran liberados cuando la temperatura del medio acuoso aumentaba, así como el tiempo de contacto. Al mismo tiempo reportaron que la epigalocatequina (EGC) fue la catequina más abundante en infusiones de agua fría, mientras que epigalocatecato (EGCG) lo fue en agua caliente.

En el estudio realizado por Capecka et al. (2005) se analizó la actividad antioxidante y la concentración de fenoles totales en muestras frescas y secas de diferentes plantas perteneciente a la familia *Lamiceaea* (*Melissa officinalis*, *Origanum vulgare* y *Mentha piperita*). Se encontró que la mayor actividad antioxidante así como la mayor concentración de fenoles totales se obtuvieron en las muestras secas de *Melissa officinalis* comparadas con las otras dos muestras. Los extractos de *Melissa officinalis* analizados en el estudio de Capecka et al. (2005) presentaron un porcentaje de inhibición del 94%, valor que coincide con el determinado en el estudio de Katalinic et al. (2006) en el cual se empleó una temperatura de extracción de 98°C y se observó un porcentaje de inhibición de 85.55%. Finalmente, Capecka et al. (2005) sugiere que dicha actividad antioxidante en *Melissa officinalis* se atribuye a la presencia de compuestos de tipo fenólico, ya que la concentración de fenoles totales fue de 2150 m gAG/100g.

## 4.2 Aplicación del diseño Box Behnken para la determinación de las condiciones físicas de extracción de antioxidantes en las hojas de *Melissa officinalis* en medio acuoso

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos del diseño de experimentos Box-Benhken para la determinación de las condiciones físicas de extracción de compuestos con actividad antioxidante en extractos acuosos de *Melissa officinalis*, la cual fue determinada mediante las técnicas DPPH\*, FRAP y Fenoles Totales.

Los extractos acuosos medidos por la técnica del DPPH\* mostraron valores variables de actividad antioxidante desde 2.22 hasta 140.91  $\mu\text{M}$  Trolox/g. Los extractos preparados con 2 y 6 gramos de muestra a una temperatura de 90°C durante un tiempo de extracción de 15 y 25 minutos, fueron los que obtuvieron una mayor actividad antioxidante. Se observó que el aumento de temperatura favorece la extracción de dichos compuestos; no obstante, estos valores no coinciden por los reportados por Tusevsky et al. (2015) y Papova et al. (2016) quienes encontraron una actividad antioxidante de 406  $\mu\text{M}$  Trolox/g y 389.52  $\mu\text{M}$  Trolox/g, para el primer estudio el solvente de extracción fue el metanol y el segundo fue con agua hirviendo, en ambos estudios la extracción se realizó durante 30 minutos. En los estudios reportados por Wojdylo et al. (2007) la actividad antioxidante de *Melissa officinalis* fue de 36.01  $\mu\text{M}$  Trolox/g utilizando como solvente de extracción acetona, agua y ácido acético glacial (70:28:2). Dichas diferencias podrían atribuirse al solvente y la temperatura de extracción empleada, así como a la estructura química del antioxidante presente. Al respecto, Bondet et al. (1997) señalan que el mecanismo de reacción entre el antioxidante y el DPPH\* depende de la conformación estructural del antioxidante, por lo que algunos compuestos reaccionan muy rápidamente con DPPH\*, reduciendo un número de moléculas de DPPH\* igual a su número de grupos hidroxilo disponibles, mientras que para otros el mecanismo suele ser más lento.

**Tabla 7.** Diseño de experimento Box Benhken (n=3)

| Experimento | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Muestra (%) | DPPH* (µM Trolox/g) |       | FRAP (µM Fe <sup>2+</sup> /g) |      | Fenoles totales (mg AG/g) |      |
|-------------|------------------|--------------|-------------|---------------------|-------|-------------------------------|------|---------------------------|------|
|             |                  |              |             | Media               | SD    | Media                         | SD   | Media                     | SD   |
| 1           | 20               | 25           | 6           | 2.58                | 0.26  | 60.76                         | 1.31 | 9.35                      | 0.67 |
| 2           | 55               | 25           | 2           | 38.36               | 0.78  | 130.50                        | 0.54 | 13.84                     | 1.85 |
| 3           | 90               | 25           | 6           | 140.91              | 9.39  | 71.86                         | 0.48 | 32.40                     | 2.09 |
| 4           | 20               | 5            | 6           | 2.22                | 0.31  | 57.57                         | 1.43 | 7.94                      | 0.63 |
| 5           | 55               | 15           | 6           | 14.34               | 1.49  | 83.95                         | 7.60 | 8.45                      | 0.30 |
| 6           | 55               | 5            | 10          | 11.46               | 0.70  | 31.77                         | 0.70 | 5.58                      | 0.38 |
| 7           | 55               | 25           | 10          | 12.31               | 0.32  | 32.54                         | 0.49 | 7.13                      | 0.03 |
| 8           | 20               | 15           | 10          | 2.28                | 0.64  | 38.04                         | 0.40 | 6.76                      | 0.35 |
| 9           | 90               | 15           | 2           | 126.65              | 16.13 | 352.87                        | 3.77 | 49.19                     | 2.40 |
| 10          | 20               | 15           | 2           | 2.88                | 0.23  | 150.45                        | 0.00 | 7.95                      | 0.00 |
| 11          | 55               | 15           | 6           | 14.98               | 0.00  | 48.89                         | 0.10 | 8.32                      | 0.10 |
| 12          | 55               | 5            | 2           | 31.52               | 0.10  | 116.58                        | 7.91 | 11.86                     | 0.28 |
| 13          | 90               | 15           | 10          | 73.67               | 2.09  | 72.92                         | 1.79 | 19.63                     | 0.99 |
| 14          | 90               | 5            | 6           | 85.95               | 0.65  | 115.65                        | 4.65 | 24.96                     | 1.08 |
| 15          | 55               | 15           | 6           | 14.25               | 0.4   | 49.45                         | 0.33 | 8.12                      | 0.07 |

Respecto a la capacidad antioxidante determinada por el método FRAP se obtuvieron valores de 31.77 a 352.87 µM Fe<sup>2+</sup>/g. Este último valor correspondió al extracto preparado con 2 gramos de muestra, extraído a 90°C durante 15 minutos. Estos resultados fueron menores comparados con los obtenidos por Katalinic et al. (2004) quienes obtuvieron un poder reductor de 1682.26 µM/g en infusiones de *Melissa officinalis* preparadas con agua hirviendo durante 30 minutos.

Mihaylava et al. (2015) reportó el mismo comportamiento en los extractos acuosos de *Melissa officinalis* en donde se obtuvo mayor poder reductor en las infusiones preparadas durante 30 minutos (116.58µM Trolox/g) comparadas con las de 10 minutos (70.02µMTrolox/g). De igual manera Messaoud et al. (2012) evaluaron la actividad antioxidante de las infusiones de *Myrtus communis L*, preparadas a 95°C durante 5,10 y 15 minutos de extracción, en dicho trabajo se

observó que a medida que el tiempo de contacto aumenta, el poder reductor de la planta era favorecido. Varios estudios coinciden con el hecho de que un aumento en el tiempo de infusión favorece la extracción potenciando tanto la solubilidad como la difusión de compuestos.

En los estudios realizados por Duda et al. (2015) y Alimpic et al. (2015) obtuvieron un poder reductor de 42.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  y 274.85  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  en extractos etanólicos y metanólicos de *Melissa officinalis*, respectivamente. Dichos valores son similares a los obtenidos en nuestro estudio.

Los resultados del presente estudio fueron mayores en comparación con la infusión de *Teucrium arduini L* otra planta de la familia *Lamiaceae*, cuyo poder reductor fue de 136.83  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  (Samec et al. 2010). En otra investigación realizada por Alimpic et al. (2015) reportaron 274.85  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  de actividad antioxidante en extractos metanólicos de *Salvia Ringens L*. este valor es inferior al obtenido en este trabajo para *Melissa officinalis*, lo que podría atribuirse a la presencia de otro tipo de compuestos extraídos por el metanol y que puede llevar a cabo reacciones de óxido-reducción.

En relación con el contenido de fenoles en los extractos de *Melissa officinalis* (Tabla 7), estos presentaron valores desde 5.58 hasta 49.16 mg AG/g. La concentración más alta de fenoles totales correspondió al extracto preparado a 90°C con 2 gramos de muestra durante 15 minutos. Estos valores resultan similares a los reportados por Papova et al. (2016) quienes obtuvieron una concentración de 43.51 mg AG/g en infusiones de *Melissa officinalis*, así como a los resultados obtenidos por Saeb et al. (2011) y Fernandes et al. (2016) quienes reportaron una concentración de compuestos fenólicos de 38.77 y 42.86 mg AG/g en extractos metanólicos y etanólicos de *Melissa officinalis*.

En el estudio realizados por Mihaylova et al. (2015) reportaron una concentración de 3.19 mgAG/g en infusiones preparadas con hojas frescas de *Melissa officinalis*; valor que resulta inferior al encontrado en nuestro estudio.

En relación al contenido de Fenoles totales en extractos acuosos de *Melissa officinalis*, los valores encontrados fueron mayores en comparación con *Agastache foeniculum* (hisopo de anís 27.19 mg AG/g), *Lavandula angustifolia* (lavanda 12.44 mg AG/g) y *Nepeta cataria* (menta de gato 14.66 mg AG/g) (Duda et al. 2015).

En otros estudios realizados por Kamdem et al. (2013) y Duda et al. (2015) en hojas de *Melissa officinalis* maceradas con 70% de metanol, obtuvieron una concentración de fenoles totales de 342 mg AG/g y 76.43 mg AG/g respectivamente. Estos valores resultan superiores comparados con los de este estudio; sin embargo, es importante señalar que el tiempo de extracción para el primer estudio fue de una semana y el otro de cuatro días. Al respecto, Soto et al. (2014) señalan que la extracción de compuestos antioxidantes además de depender de la temperatura y el tiempo de extracción también depende de la polaridad del disolvente. Por ejemplo, disolventes no polares, tales como hexano y éter de petróleo son utilizados para extraer tocoferoles y algunos terpenoides fenólicos, mientras que el éter etílico y el acetato de etilo son efectivos en la extracción de agliconas y fenoles de bajo peso molecular. Los disolventes con mayor polaridad tales como el etanol y metanol pueden extraer flavonoides y fenoles de mayor peso molecular. Otro factor que afecta la actividad antioxidante en infusiones es el tipo de proceso al que han sido sometidas las plantas, por ejemplo, si se utilizan frescas o deshidratadas, la parte de la planta utilizada, el tamaño de partícula, etc. (Kopjar, Tadić, y Piližota, 2015).

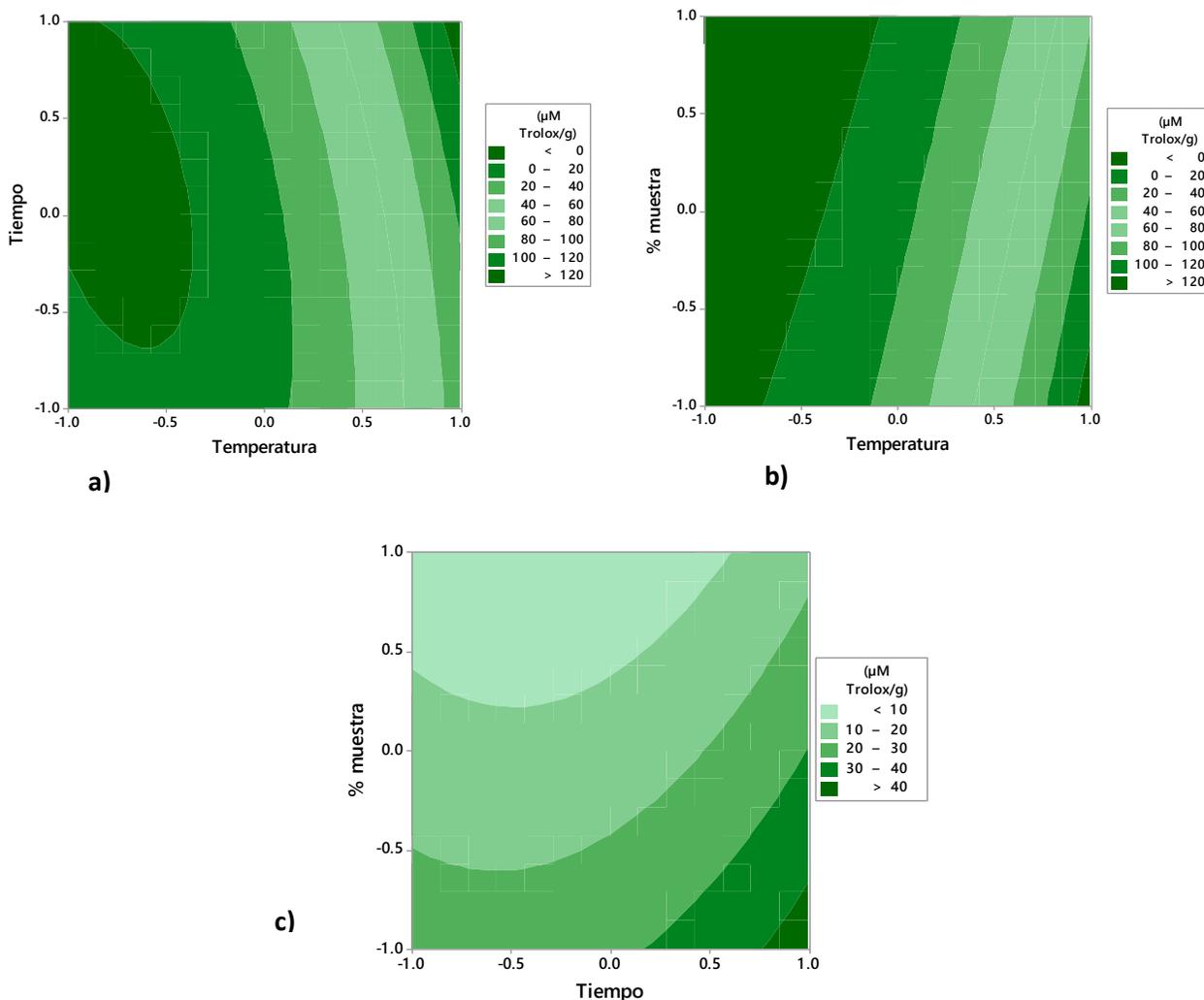
#### 4.2.1 Análisis de datos del diseño de experimentos Box Behnken

Los resultados obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken fueron analizados con el programa Minitab 1.7. Los polinomios obtenidos para la actividad antioxidante determinada por DPPH\*, FRAP y Fenoles totales se presentan en la Tabla 8, estos indicaron que la interacción temperatura-tiempo tiene una influencia importante en la liberación de compuestos con actividad antioxidante en *Melissa officinalis*.

**Tabla 8.** Polinomios y coeficiente de correlación para los extractos acuosos de *Melissa officinalis* obtenidos mediante el diseño Box Behnken.

| AA                     | Polinomio   | R <sup>2</sup>    |
|------------------------|---|-------------------|
| <b>DPPH*</b>           | $\begin{aligned} \text{uM Trolox/g} = & 45.7 - 1.752 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) - 3.45 \text{ Tiempo (min)} \\ & + 1.80 \text{ Muestra (\%)} + 0.02930 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Temperatura } (^{\circ}\text{C}) \\ & + 0.0765 \text{ Tiempo (min)} * \text{Tiempo (min)} + 0.060 \text{ Muestra (\%)} * \text{Muestra (\%)} \\ & + 0.0386 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Tiempo (min)} \\ & - 0.0935 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Muestra (\%)} \\ & - 0.030 \text{ Tiempo (min)} * \text{Muestra (\%)} \end{aligned}$ | <b>98.67</b><br>% |
| <b>FRAP</b>            | $\begin{aligned} \text{uM Fe}^{2+}/\text{g} = & 140.9 + 4.44 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) + 5.78 \text{ Tiempo (min)} \\ & - 55.3 \text{ Muestra (\%)} - 0.0094 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Temperatura } (^{\circ}\text{C}) \\ & - 0.111 \text{ Tiempo (min)} * \text{Tiempo (min)} + 4.185 \text{ Muestra (\%)} * \text{Muestra (\%)} \\ & - 0.0350 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Tiempo (min)} \\ & - 0.299 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Muestra (\%)} - 0.127 \text{ Tiempo (min)} * \text{Muestra (\%)} \end{aligned}$ | <b>96.14</b><br>% |
| <b>Fenoles totales</b> | $\begin{aligned} \text{mg AG/g} = & 4.0 - 0.449 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) + 0.601 \text{ Tiempo (min)} \\ & + 1.56 \text{ Muestra (\%)} + 0.00932 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Temperatura } (^{\circ}\text{C}) \\ & - 0.0105 \text{ Tiempo (min)} * \text{Tiempo (min)} + 0.073 \text{ Muestra (\%)} * \text{Muestra (\%)} \\ & + 0.00431 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Tiempo (min)} \\ & - 0.0507 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Muestra (\%)} \\ & - 0.0516 \text{ Tiempo (min)} * \text{Muestra (\%)} \end{aligned}$   | <b>95.01</b><br>% |

Los Gráficos 5, 6 y 7 permiten visualizar el efecto de cada una de las respuestas en función de las variables analizadas (tiempo, temperatura, % de muestra).

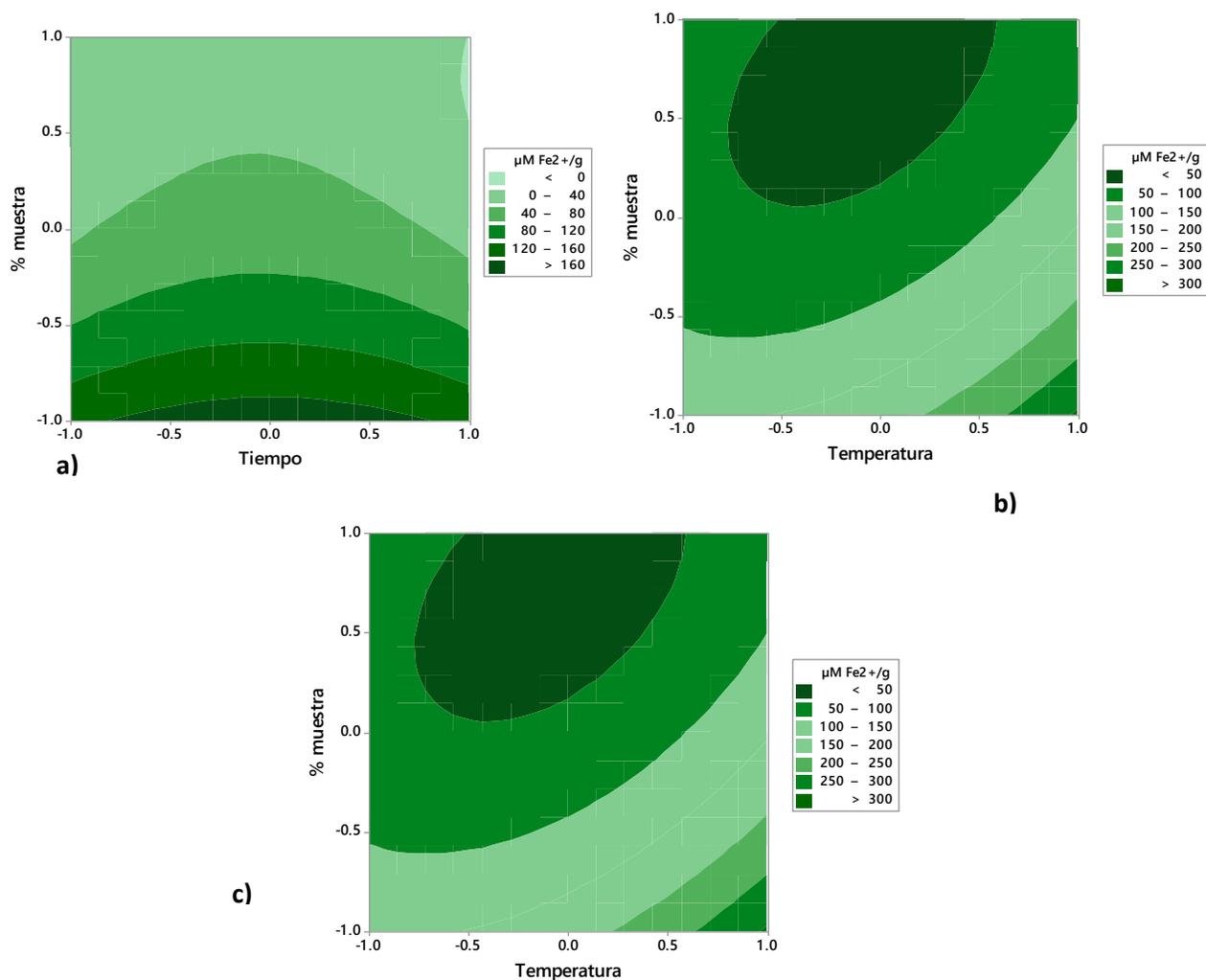


**Gráfico 5:** Gráfico de contornos, efecto de las variables tiempo-temperatura (a), % muestra-temperatura (b) y % muestra-tiempo (c), sobre la actividad antioxidante medida por DPPH

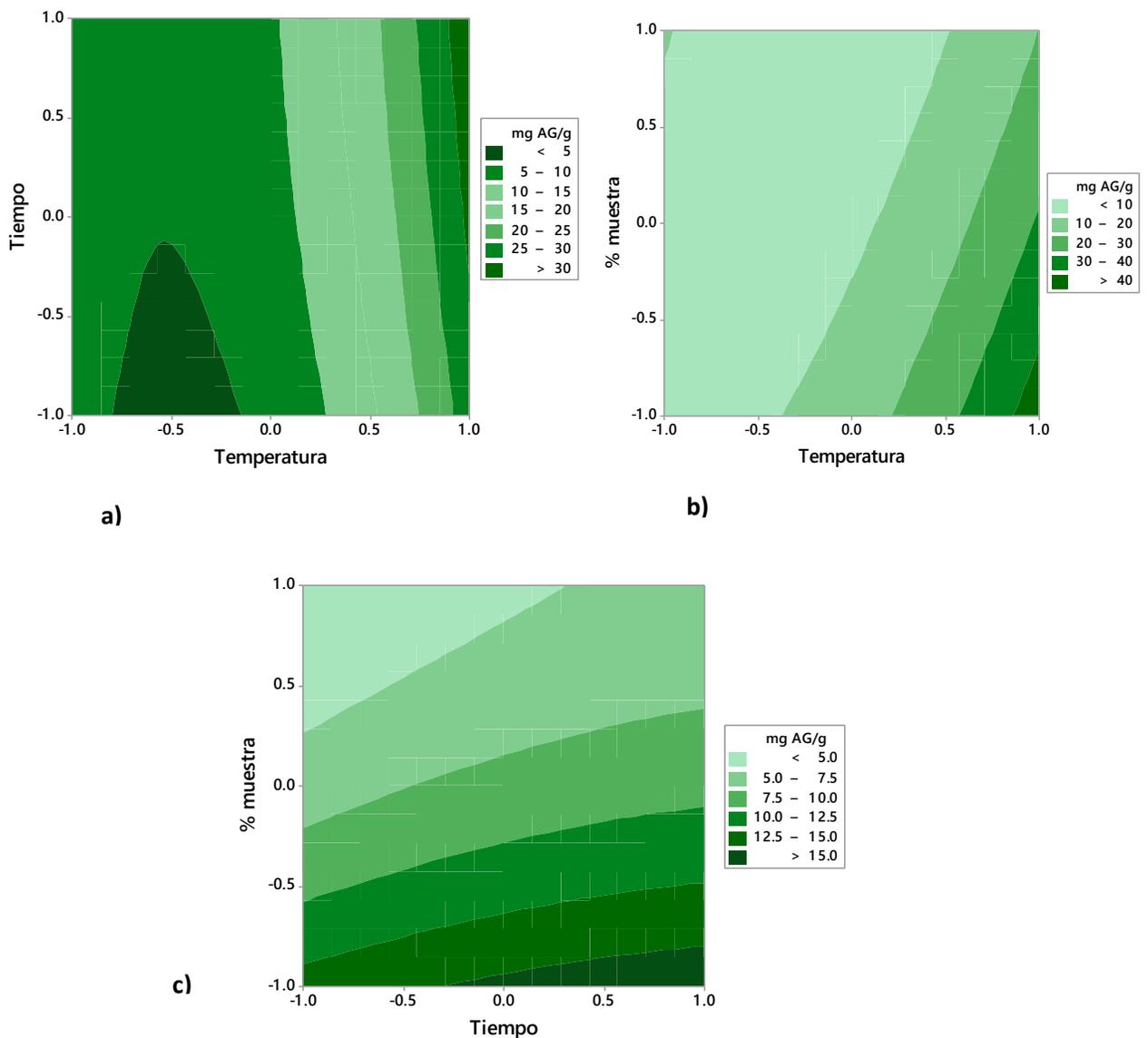
En el gráfico 5 se observa la interacción entre las variables analizadas (temperatura y el tiempo; porcentaje de muestra y temperatura; porcentaje de muestra y tiempo) y el efecto sobre la actividad antioxidante medida por DPPH. En general, se observa que la temperatura tiene más influencia en la extracción

de antioxidantes, determinada por el método de DPPH\*, que el tiempo y la cantidad de muestra.

Por otra parte, el efecto que tienen las variables sobre la capacidad antioxidante medida por el método FRAP (Gráfico 6) demostró que la temperatura y bajas cantidades de muestra favorecen la extracción de compuestos con actividad antioxidante.



**Gráfico 6:** Gráfico de contornos, efecto de las variables % muestra-tiempo (a), % muestra-temperatura (b) y % muestra-temperatura (c), sobre la actividad antioxidante medida por FRAP



**Gráfico 7:** Gráfico de contornos, efecto de las variables tiempo-temperatura (a), % muestra-temperatura (b) y % muestra-tiempo (c), sobre la extracción de fenoles totales

En cuanto fenoles totales, la temperatura fue el factor más influyente en la extracción de compuestos fenólicos en *Melissa officinalis*, independientemente del tiempo y la cantidad de muestra.

#### 4.2.2 Relación DPPH\* (o FRAP) vs Fenoles totales

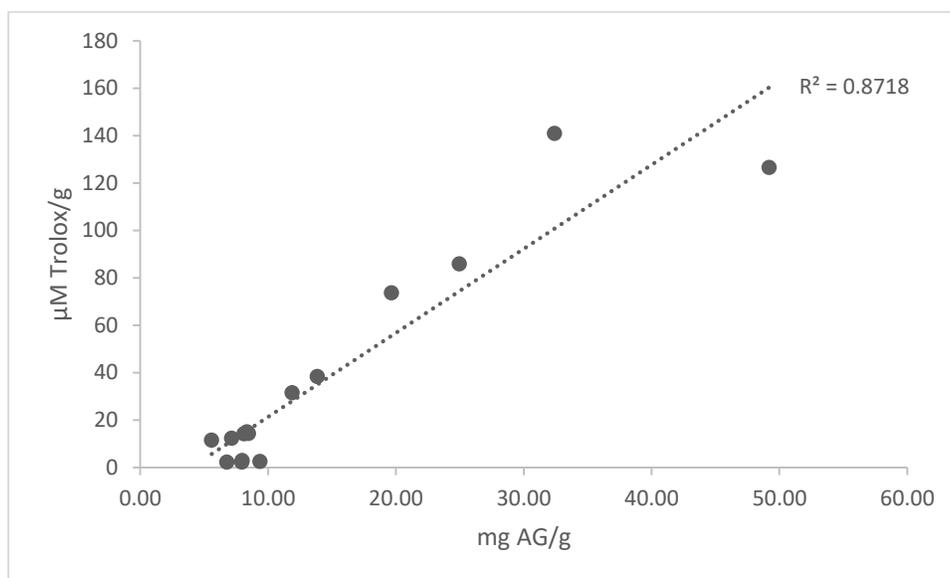
A fin de conocer si la actividad antioxidante observada mediante las técnicas de DPPH\* y FRAP se debía a la presencia de compuestos fenólicos se estableció una relación entre ambos datos, para ello se graficó la actividad antioxidante medida por el DPPH y FRAP respecto a la concentración de fenoles totales. Los resultados obtenidos se presentan en los Gráficos 8 y 9.

En las determinaciones del DPPH (ó Frap) y el contenido de fenoles totales se obtuvo una relación de 0.8718 y 0.6067. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Vaquero et al. (2010) en el cual obtuvieron una relación entre la capacidad antioxidante obtenida por DPPH y el contenido fenólico de 0.8566, en las hojas de *Melissa officinalis*. Por otra parte, Papova et al. (2016), obtuvieron una buena relación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico en infusiones de *Melissa officinalis*, de 0.9514 para DPPH y 0.9997 para FRAP. En otro estudio realizado por Mahaylova et al. (2015) se obtuvo el mismo comportamiento entre contenido fenólico y la actividad antioxidante de 0.9798 para DPPH y 0.9959 para FRAP. Al respecto Papova et al (2016), mencionan que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, lo que les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrogeno y secuestradores del oxígeno singlete.

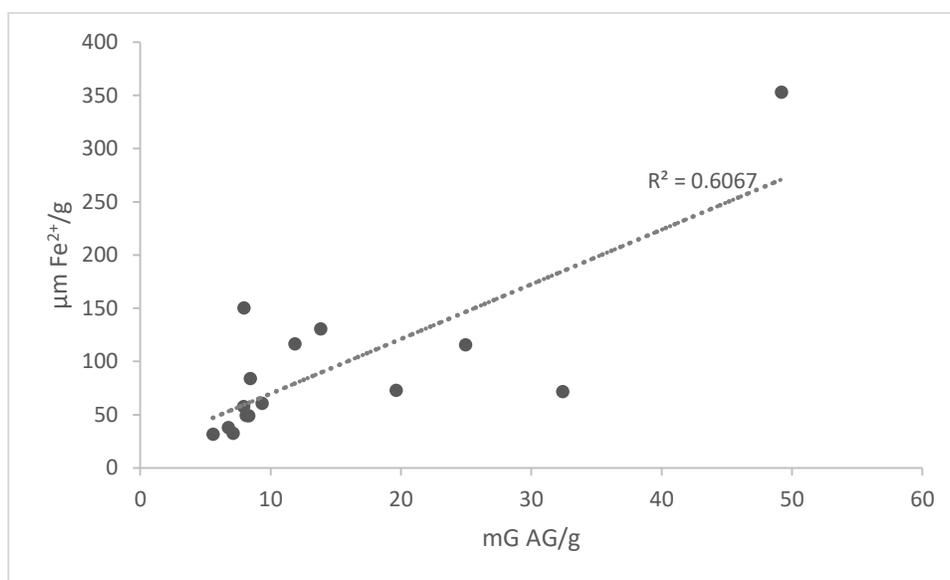
Fernanes et al. (2016) y Wojdylo et al. (2007) han reportado que algunas plantas de la familia *Lamiaceae* poseen una fuerte relación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico, obteniendo valores de 0.9706 para DPPH y fenoles totales y 0.8866 entre FRAP y fenoles totales.

En base a los resultados obtenidos en este estudio y a los reportados en la literatura, se considera que la actividad antioxidante que tiene *Melissa officinalis* se debe a la presencia de compuestos fenólicos. Sin embargo, como lo señala Fernandes et al (2016) la actividad antioxidante de los extractos en plantas no se limita exclusivamente a compuestos fenólicos, sino que también

pueden contribuir otros metabolitos secundarios como los aceites volátiles, vitaminas o carotenoides.



**Gráfico 8:** Relación entre la actividad antioxidante determinada por DPPH\* y la concentración de fenoles totales.



**Gráfico 9:** Relación entre la actividad antioxidante determinada por el método de FRAP y la concentración de fenoles totales.

### 4.3 Identificación de compuestos en el extracto acuoso de *Melissa officinalis* con mayor actividad antioxidante por HPLC-MS

Una vez optimizadas las condiciones físicas, tiempo, temperatura y % de muestra, para la extracción de compuestos con actividad antioxidante en las infusiones de *Melissa officinalis*, se procedió a realizar la identificación de los compuestos por HPLC-MS.

El cromatograma del extracto acuoso de las hojas de *Melissa officinalis* reveló la presencia de diferentes compuestos (Tabla 10), en su mayoría ácidos fenólicos y flavonoides. Algunos de ellos fueron: el ácido vanílico, ácido 1-cafeoilquínico, 3,4-dihidroxibenzaldehído, ácido 2-cafeoilquínico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, luteolina-3'-O-glucurónido y el ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) láctico.

Caniova y Brandsteterova (2001) sugieren que la actividad antioxidante en *Melissa officinalis* se atribuye a la presencia de ácidos fenólicos, principalmente derivados del ácido hidroxicinámico como el ácido rosmarínico. Al respecto Kim et al. (2010) señalan que este es uno de los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante en esta planta, es por ello que para optimizar la extracción de este compuesto emplearon un diseño de experimentos en donde observaron que, al aumentar la temperatura, así como el tiempo de contacto, el rendimiento de este compuesto aumentaba. Estos autores señalaron que la propiedad antioxidante de los extractos de *Melissa officinalis* se debe a la presencia de compuestos fenólicos como el ácido cafeico y sus ésteres metílicos

**Tabla 10.** Identificación de compuestos presentes en los extractos acuosos de las hojas de *Melissa officinalis* por HPLC-MS

| Compuesto                                   | Formula   | Área     | % Abundancia |
|---|---|----------|--------------|
| Ácido vanílico                              | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>    | 2144265  | 2.54348701   |
| Ácido 1 - cafeoilquínico                    | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>  | 981553   | 1.1642998    |
| 3,4-dihidroxibenzaldehído                   | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>    | 488902   | 0.5799264    |
| Ácido 2 - cafeoilquínico                    | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>  | 2085357  | 2.47361144   |
| Ácido clorogénico                           | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>  | 774734   | 0.91897497   |
| Kaempferol diglucósido                      | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 143260   | 0.16993233   |
| Ácido ferúlico                              | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>  | 419907   | 0.49808582   |
| Astragalina (kaempferol-3-glucósido)        | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 7312015  | 8.67337533   |
| Luteolina - 3'-O - glucurónido              | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub> | 384436   | 0.45601079   |
| Ácido 3- (3,4 - dihidroxifenil) láctico     | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>   | 133246   | 0.15805391   |
| Ácido rosmarínico                           | C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>  | 3939523  | 4.67298844   |
| Ácido cafeico                               | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>    | 4212167  | 4.99639365   |
| Ácido sagerinico                            | C <sub>36</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub> | 363610   | 0.43130738   |
| Flavonoide, aglicona metilada               | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 3045581  | 3.61261118   |
| Flavonoide-hexosido-O-3-ácido oxopropanoico | C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>14</sub> | 1631893  | 1.93572093   |
| Kaempferol                                  | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | 1886072  | 2.2372233    |
| Apigenina                                   | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | 4413033  | 5.23465714   |
| Flavonoide, aglicona metilada               | C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> | 8639437  | 10.2479385   |
| Derivado de acetina                         | C <sub>50</sub> H <sub>40</sub> O <sub>18</sub> | 3505900  | 4.15863296   |
| Derivado de acetina                         | C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub> | 26818965 | 31.8121543   |
| Derivado de acetina                         | C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 721836   | 0.85622835   |
| 3,7- Dihidroxi -3', 4'- dimetoxiflavona     | C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>  | 3799973  | 4.50745685   |
| Derivado de acetina                         | C <sub>30</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>  | 170273   | 0.20197465   |
| Trimetoxi-hidroxiflavona                    | C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>  | 4372253  | 5.18628467   |
| Compuesto policíclico, grupo carboxílico    | C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>  | 1488718  | 1.76588943   |
| Derivado de acetina, grupo carboxílico      | C <sub>29</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>  | 427237   | 0.50678053   |

Por otra parte, Barros et al. (2013) indicaron la presencia del ácido litospérmico, ácido salvanióico A y C, así como el ácido rosmarínico y su dímero el ácido sagerínico en infusiones de *Melissa officinalis*. Dichos compuestos coinciden con los encontrados en el presente estudio, al igual que los identificados por Caniova y Brandsteterova (2001) quienes encontraron al ácido vinílico, cafeico, siríngico y rosmarínico. Arceusz y Wesolowski (2013) identificaron la presencia de seis ácidos fenólicos en los que se encontró al ácido gálico, cafeico, clorogénico ferúlico y el ácido rosmarínico. Pereira et al. (2013) mencionan que los principales compuestos con actividad antioxidante presentes en *Melissa officinalis* son el ácido gálico, clorogénico, cafeico, elálgico, catequina, epicatequina, quercetina y rutina.

Se ha demostrado que el contenido fenólico de *Melissa officinalis* varía en diferentes regiones. Por ejemplo, las muestras provenientes de Bosnia y Herzegovina presentaban una mayor concentración del ácido rosmarínico y clorogénico, en comparación con los obtenidos de Turquía. Otros compuestos identificados en muestras provenientes de Irán y extraídos con metanol son el ácido cafeico, eriodictilol -7-O-glucósido, ácido m-cumárico, naringina, 5, hesperidina, ácido rosmarínico, naringenina y hesperetina (Dastmalchi et al. 2008)

También es importante considerar que la variabilidad de compuestos fenólicos depende de la polaridad del disolvente utilizado. De ahí que en el trabajo realizado por Duda et al. (2015) encontraron en mayor proporción al ácido ferúlico en las muestras extraídas con metanol, mientras que Kamdem et al. (2013) encontraron al compuesto rutina en extractos etanólicos de *Melissa officinalis* Vaquero et al. (2010), mencionan que existe una estrecha relación entre el contenido fenólico y su actividad antioxidante en plantas utilizadas en la preparación de infusiones. Sin embargo, estos autores atribuyen que dicha actividad se debe particularmente a flavonoides. Al respecto, Heitz et al. (2000)

indicaron que el principal flavonoide presente en las infusiones de *Melissa Officinalis*, es luteolina-3-O-glucurónido, dicho compuesto también se encontró en este trabajo. Ahora bien, se ha demostrado que la apigenina y la luteolina, comúnmente encontradas en diferentes frutas, vegetales y hierbas, poseen una alta capacidad antioxidante, por medio de la eliminación de radicales libres (Galati, Moridani, Chan y O'Brien, 2001).

Algunos antioxidantes que se han encontrado frecuentemente en las plantas se muestran en la Tabla 9 (Pokorny, 2007)

**Tabla 9:** Los antioxidantes naturales más frecuentes en las plantas

| <b>Antioxidantes</b>                | <b>Compuestos</b>   |
|-------------------------------------|---|
| Derivados del ácido hidroxibenzoico | Ácido vanílico, gálico  |
| Derivados del ácido hidroxicinámico | Ácido ferúlico, ácido clorogénico, cafeico, sinápico, rosmarínico |
| Flavonoides                         | Quercetina, catequina, rutina                                     |
| Antocianinas                        | Delfinidina   |
| Lignananos                          | Sesamol   |
| Stilbenos                           | Resveratrol   |
| Coumarinas                          | Orto cumarina   |

Pokorny, 2007

El ácido rosmarínico es considerado como un compuesto con fuerte actividad antioxidante, el cual también ha sido identificado en otras plantas como el romero, salvia, tomillo, orégano, mejorana, albahaca y hierbabuena (Yanishlieva et al., 2006). La quercitina, ácido gálico, ácido cafeico, también se ha encontrado en infusiones de menta y manzanilla. La actividad antioxidante que posee el té verde y negro está relacionada a la presencia de flavonoides como las catequinas y algunos flavonoles como el kaempferol y quercetina los cuales también se encuentran en las infusiones de eucalipto y té de tila así como la procianidina, (tanino) otro compuesto con poder antioxidante.

Mientras que la manzanilla contiene varios compuestos derivados del ácido hidroxicinámico como el ácido ferúlico, clorogénico y cafeico con propiedades antioxidantes, así como la apigenina y luteonina (Atoui et al., 2002)

## 6. Conclusiones

- La hoja es el componente que exhibió la mayor actividad antioxidante en *Melissa officinalis*.
- El estudio cinético permitió determinar la estabilidad de la actividad antioxidante de los extractos acuosos de *Melissa officinalis*.
- El diseño de experimentos Box-Behnken permitió identificar las condiciones físicas de extracción de compuestos antioxidantes en medio acuoso de *Melissa officinalis*.
- Las correlaciones establecidas entre las determinaciones de actividad antioxidante por DPPH\* (o FRAP) vs fenoles totales indicaron la presencia de compuestos de tipo fenólico, los cuales fueron corroborados mediante el análisis por HPLC-MS que reveló compuestos tales como el ácido rosmarínico, uno de los principales compuestos antioxidantes de *Melissa officinalis*

## 7. Referencias

- Adinee, J., Piri, K., y Karami, O. (2008). Essential oil component in flower of lemon balm (*Melissa officinalis L.*). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(3), 277-278.
- Alam, M., Bristi, N., y Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Alimpić, A., Pljevljakušić, D., Šavikin, K., Knežević, A., Ćurčić, M., Veličković, D. y Marković, S. (2015). Composition and biological effects of *Salvia ringens (Lamiaceae)* essential oil and extracts. *Industrial Crops and Products*, 76, 702-709
- Arceusz, A., y Wesolowski, M. (2013). Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis L.* commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 83, 215-220.
- Atoui, A., Mansouri, A., Boskou, G., y Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry*, 89(1), 27-36.
- Banerjee, S., Joshi, M., y Ghosh, A. (2012). Optimization of polypropylene/clay nanocomposite processing using Box-Behnken statistical design. *Journal of Applied Polymer Science*, 123(4), 2042-2051.
- Barros, L., Dueñas, M., Días, M. I., Sousa, M. J., Santos, C. y Ferreira, I. (2013). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis L.* infusions. *Food chemistry*, 136(1), 1-8.
- Bondet, V., Brand, W., y Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- Calderón, J. A. (2011). *Caracterización fotoquímica, actividad antibacteriana y antioxidante de extractos de plantas medicinales utilizadas en Pereira y Santa Rosa de Cabal*. (Tesis de maestría) Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. y Ferreira, I. C. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food chemistry*, 216, 342-346.

- Caniova, A., y Brandsteterova, E. (2001). HPLC analysis of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24(17), 2647-2659.
- Capecka, E., Mareczek, A., y Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food chemistry*, 93(2), 223-226.
- Conde, E., Moure, A., Domínguez, H., y Parajó, J. C. (2010). Extraction of natural antioxidants from plant foods. *Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries*, 506-594.
- Damiani, E., Bacchetti, T., Padella, L., Tiano, L. y Carloni, P. (2013). Antioxidant activity of different white teas: Comparison of hot and cold tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33, 59–66.
- Dastmalchi, K., Dorman, H., Oinonen, P., Darwis, Y., Laakso, I., y Hiltunen, R. (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *Food Science and Technology*, 41(3), 391-400.
- Duda, S. C., Marghitaş, L. A., Dezmirean, D., Duda, M., Margaoan, R. y Bobiş, 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.
- Embuscado, M. E. (2015). Spices and herbs: natural sources of antioxidants; A mini review. *Journal of Functional Foods*, 18, 811-819.
- Fernandes, R., Trindade, M., Tonin, F., Lima, C., Pugine, S., Munekata, P. y de Melo, M. (2016). Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 451-460.
- Fonnegra, R. y Jiménez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Colombia: Universidad de Antioquia.
- Fotakis, C., Tsigrimani, D., Tsiaka, T., Lantzouraki, D., Strati, I., Makris, C., Tagkouli, D., Proestos, C., Sinanoglou, V. y Zoumpoulakis, P. (2016). Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. *Food Chemistry* 211, 963–971.
- Goetz, P. y Ghedira, K. (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse*. Paris, Francia: Springer Science & Business Media.

- Heitz, A., Carnat, A., Fraisse, D., Carnat, A., Lamaison, J. (2000). Luteolin 3'-glucuronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis*. *Fitoterapia*, *70*, 201-202.
- Jeszka M. y Zgoła, A. (2014). Analysis of antioxidant activity, chlorogenic acid, and rutin content of *Camellia sinensis* infusions using response surface methodology optimization. *Food Analytical Methods*, *7*(10), 2033-2041.
- Kamdem, J. P., Adeniran, A., Boligon, A. A., Klimaczewski, C. V., Elekofehinti, O. O., Hassan, W. y Athayde, M. L. (2013). Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. *Industrial Crops and Products*, *51*, 26-34.
- Kaneria, M. J., Bapodara, M. B., y Chanda, S. V. (2012). Effect of extraction techniques and solvents on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) leaf and stem. *Food Analytical Methods*, *5*(3), 396-404.
- Karadag, A., Ozcelik, B., y Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food analytical methods*, *2*(1), 41-60.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T. y Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*, *94*(4), 550-557
- Kim, S., Yun, E. J., Bak, J. S., Lee, H., Lee, S. J., Kim, C. T. y Kim, K. H. (2010). Response surface optimised extraction and chromatographic purification of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* leaves. *Food chemistry*, *121*(2), 521-526.
- Kogiannou, D., Kalogeropoulos, N., Kefalas, P., Polissiou, M. y Kaliora, A. (2013). Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food and Chemical Toxicology*, *61*, 152-159.
- Koksall, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoglu, F., y Gulcin, I. (2011). Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(2), 217-222.
- Kopjar, M., Tadić, M. y Piližota, V. (2015). Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *2*(1),
- Lantano, C., Rinaldi, M., Cavazza, A., Barbanti, D. y Corradini, C. (2015). Effects of alternative steeping methods on composition, antioxidant property and colour of green, black and oolong tea infusions. *Food Sciencei Technology*, *52*, 8276-8283. doi 10.1007/s13197-015-1971-4.

- Lobo, R. C., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos, C. y Ferreira, I. (2015). Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation. *Food Chemistry*, *185*, 16-24.
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: Importancia biológica y métodos para medir su actividad. Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia. Bogota, Colombia: Corporación Universitaria Lasallista
- Mahmoudi, S., Khali, M., Benkhaled, A., Benamirouche, K., y Baiti, I. (2016). Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian *Ficus carica L.* varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *6*(3), 239-245.
- Martínez, R., Heredia, A., Castelló, M. y Andrés, A. (2014). Influence of drying method and extraction variables on the antioxidant properties of persimmon leaves. *Food Bioscience*, *6*, 1-8.
- Messaoud, C., Laabidi, A. y Boussaid, M. (2012). *Myrtus communis L.* infusions: the effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities. *Journal of food science*, *77*(9).
- Mihaylova, D., Popova, A., y Alexieva, I. (2015). The effect of extraction time on the antioxidant activity of fresh Bulgarian *Melissa officinalis L.* *Journal of BioScience & Biotechnology*.
- Mokrani, A., y Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica L.*) fruit. *Separation and Purification Technology*, *162*, 68-76.
- Muniyandi, K., George, E., Mudili, V., Kalagatur, N. K., Anthuvan, A. J., Krishna, K. y Natarajan, G. (2017). Antioxidant and anticancer activities of *Plectranthus stocksii* Hook. f. leaf and stem extracts. *Agriculture and Natural Resources*, *51*(2), 63-73.
- Oroian, M. y Escriche, I. (2014). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International* *74*,10–36
- Palá, P., J. (2002). *Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género Eryngium, en la península ibérica.* (Tesis de doctorado). Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Pasrija, D., y Anandharamakrishnan, C. (2015). Techniques for extraction of green tea polyphenols: A review. *Food and Bioprocess Technology*, *8*(5), 935-950.

- Pereira, R. P., Fachinetto, R., Puntel, R. L., da Silva, G., Heinzmann, B. M. y Morsch, V. M. (2009). Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemical research*, 34(5), 973-983.
- Pérez, B., Villavicencio, M. y Ramírez, A. (2003). *Lista de plantas útiles en el Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Biológicas*. Pachuca, Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
- Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 629-642
- Popova, A., Dalemska, Z., Mihaylova, D., Hristova, I., y Alexieva, I. (2016). *Melissa officinalis* L.-GC Profile and Antioxidant Activity. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(4), 634-638.
- Šamec, D., Gruz, J., Strnad, M., Kremer, D., Kosalec, I., Grubešić, R. J. y Piljac, J. (2010). Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L.(*Lamiaceae*) flower and leaf infusions (*Teucrium arduini* L. antioxidant capacity). *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 113-119.
- Sentkowsk A., Biesaga, M., Pyrzynsk, K., (2016). Effects of brewing process on phenolic compounds and antioxidant activity of herbs. *Food Science Biotechnology*, 25, 965-970. doi: 10.1007/s10068-016-0157-9.
- Shahidi, F., y Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
- Shakeri, A., Sahebkar, A. y Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L., a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 204–228.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., y Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46-54
- Soto, C., Caballero, E., Pérez, E., y Zúñiga, M. E. (2014). Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. *Food and Bioproducts Processing*, 92(3), 328-333.
- Tušek, A. J., Benković, M., Cvitanović, A. B., Valinger, D., Jurina, T. y Kljusurić, J. G. (2016). Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols, antioxidants and extraction yield from *Asteraceae* plants. *Industrial Crops and Products*, 91, 205-214.

- Tusevski, O., Kostovska, A., Iloska, A., Trajkovska, L. y Simic, S. (2014). Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Central European Journal of Biology*, 9(9), 888-900.
- Vaquero, M. R., Serravalle, L. T., De Nadra, M. M. y Saad, A. S. (2010). Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control*, 21(5), 779-785.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J. y Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.
- Yang, D. J., Hwang, L. S. y Lin, J. T. (2007). Effects of different steeping methods and storage on caffeine, catechins and gallic acid in bag tea infusions. *Journal of Chromatography A*, 1156(1), 312-320.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. y Pokorný, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(9), 776-793.
- Yin, G. y Dang, Y. (2008). Optimization of extraction technology of the *Lycium barbarum* polysaccharides by Box–Behnken statistical design. *Carbohydrate Polymers*, 74(3), 603-610.
- Zhong, Y. y Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of a antioxidant activity in foods. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, 287.
- Ziakova, A. y Brandsteterova, E. (2002). Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, 25, 3017–3032