

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES A PARTIR DEL ORÉGANO MEXICANO (*Lippia graveolens* HBK) UTILIZANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR)

PROCESS OPTIMIZATION FOR THE EXTRACTION OF ANTIOXIDANTS FROM MEXICAN OREGANO (*Lippia graveolens* HBK) BY THE RESPONSE SURFACE METHODOLOGY (RSM) APPROACH

H. Flores-Martínez¹, C. León-Campos¹, M. Estarrón-Espinosa², I. Orozco-Ávila^{2*}

¹Laboratorio de Alimentos y Productos Naturales, Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Km.10 carr. a San Miguel Cuyutlán, C.P. 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.

²Unidad de Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC., Camino el Arenero 1227, El Bajío del Arenal, C.P. 45019, Zapopan, Jalisco, México.

Recibido 16 de febrero de 2016; Aceptado 26 de mayo de 2016

Resumen

Se optimizaron las condiciones de extracción de antioxidantes a partir del orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK). La extracción fue hecha por maceración agitada usando mezclas hidro-etanólicas como solvente. Las condiciones óptimas fueron identificadas aplicando la metodología de superficie de respuesta (MSR) con un diseño factorial 3^3 . Las variables de proceso evaluadas fueron la temperatura, la concentración de solvente y el tamaño promedio de la partícula. Las variables de respuesta fueron la concentración de fenoles totales y la capacidad antioxidante. El efecto de las variables de proceso en ambas variables de respuesta fue estadísticamente significativo. La concentración de fenoles totales, medidos bajo condiciones óptimas, fue usada para determinar el mejor tiempo de procesamiento. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo cinético de segundo orden. Por comparación con *Rosmarinus officinalis*, el contenido relativo del extracto de orégano, en fenoles totales (143.8%) y en capacidad antioxidante (90.6 %), obtenidos mediante maceración hidro-etanólica a condiciones óptimas, muestran que el orégano mexicano es una fuente alternativa de sustancias fenólicas con gran capacidad antioxidante.

Palabras clave: orégano mexicano, extracción, antioxidantes, modelo cinético de extracción, metodología de superficie de respuesta.

Abstract

The extraction conditions of antioxidants from Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) were optimized. The extraction was done by agitated maceration using hydro-ethanolic mixtures as solvent. Optimal conditions were identified by a response surface method (RSM) approach with a 3^3 factorial design. The process variables evaluated were the temperature, solvent concentration and average particle size. The response variables were the concentration of total phenols and antioxidant capacity. The effect of process variables for both response variables was statistically significant. The total concentration of phenols, measured under optimum conditions, was used to determine the best processing time. The experimental data for phenol concentration fitted to a second order kinetics model. By comparison, to *Rosmarinus officinalis*, the relative contents of oregano extracts, on total phenols (143.8%) and on antioxidant capacity (90.6 %) obtained by hydro-ethanolic maceration at optimal conditions show that Mexican oregano is an alternative source for phenolic substances with high antioxidant capacity.

Keywords: Mexican oregano, extraction, antioxidants, extraction kinetic model, response surface methodology.

1 Introducción

Actualmente la industria de los alimentos ha mostrado un importante cambio en sus tendencias de desarrollo hacia la generación de nuevos

productos, siendo algunos de ellos los llamados alimentos funcionales, los productos nutraceuticos, los productos fitoquímicos y los alimentos prebióticos. El creciente interés en los productos fitoquímicos se ha dado principalmente por la cada vez mayor

* Autor para la correspondencia. E-mail: iorozco@ciatej.mx
Tel: 52 33 33 45 52 00, fax: 52 33 45 52 00

desaprobación y desuso de aditivos y conservadores sintéticos en los alimentos y en los procesos alimenticios (Svoboda y col., 2006). Asimismo, se ha incrementado el interés de utilizar productos fitoquímicos en dietas para consumo humano por su reconocido efecto benéfico en la salud (Nash, 2004).

Los polifenoles son los compuestos fitoquímicos de mayor incidencia en el reino vegetal. Diversos polifenoles tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante, misma que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer (Block, 2009).

La concentración de los antioxidantes presentes de manera natural en los alimentos disminuye en gran medida por efecto del procesamiento. Por ello, generalmente es necesario suplementarlas en los procesos de transformación. Los antioxidantes más utilizados en la actualidad en la industria alimentaria son sintéticos, tales como el butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), terbutilhidroxiquinona (TBHQ) y propilgalato (PG), a los que se les ha asociado con una dudosa seguridad en su uso. Datos toxicológicos aconsejan mantener precaución en su uso por indicios de daños hepáticos asociados a periodos prolongados de ingesta (Engin y col., 2011). Por ello, en la actualidad, se ha incrementado notablemente el interés de encontrar fuentes adecuadas de antioxidantes naturales, siendo el *Rosmarinus officinalis* una especie que ha tenido fuertes implicaciones comerciales a este respecto.

Numerosos estudios han demostrado que las especias aromáticas presentan potentes actividades antioxidantes, principalmente debido a la cantidad y calidad de sus compuestos polifenólicos (Hossain y col., 2011; Svoboda y col., 2006). Los compuestos polifenólicos de diversas especias han mostrado tener propiedades antimicrobianas, anticarcinogénicas, antivirales, hipolipídicas, antimutagénicas, antiinflamatorias y protectoras de enfermedades vasculares (Lampe, 2003; Srinivasan, 2005). Estos efectos son de gran potencial benéfico e interés para el hombre por sus aplicaciones biotecnológicas (Babu y Savithramma, 2013; Odhiambo y col., 2014). La amplia variedad de propiedades biológicas que presentan los compuestos fenólicos de las especias, los hace un interesante objetivo para optimizar su extracción a partir de sus fuentes naturales.

El orégano mexicano (*Lippia graveolens*, HBK) es una especie vegetal perteneciente a la familia de las verbenaceas con amplia distribución en diferentes estados de la República Mexicana. Esta especie es

ampliamente utilizada en México y Norteamérica como parte de diversos platillos regionales, bebidas alcohólicas y alimentos procesados. Las hojas han sido también utilizadas como remedios herbales con propósitos analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos y antiespasmódicos (Pascual y col., 2001). Las hojas, raíces y partes aéreas de esta planta han sido reportadas por contener aceites esenciales, una decena de iridoides, dos flavanonas (pinocembrina y naringenina) y un naftoquinoido (lapachenol) (Rastrelli y col., 1998). Lin y col. (2007), enfocaron su trabajo en la caracterización de compuestos flavonoides, encontrando la presencia mayoritaria de los siguientes compuestos: Pentahydroxiflavanona-A-Hexosido, 6-hidroxiluteonin 7-O-hexosido, scutalarein 7-O-hexosido, luteolin 7-O- glucosido, 6-hidroxiluteolin 7-O-ramnosido. 6-metilscutelareina, pinocembrina y galangina. Por su parte, González y col., (2007) reportaron la presencia de los siguientes flavonoides: flavonol, kaempferol, pilosina, cirsimaritina, hexosido de quercetina y naringenina.

A través del tiempo, se ha encontrado mayor interés en investigaciones sistemáticas referentes a la influencia de los parámetros de proceso en la preparación de extractos a partir de productos que contienen sustancias fenólicas (Cacace y Mazza, 2003; Gironi y Piemonte, 2011; Zhang y col., 2012). Sin embargo, pocos estudios existen dirigidos hacia la optimización de tecnologías extractivas para sustancias antioxidantes naturales y más aún, enfocadas al aprovechamiento de plantas de la familia de las verbenaceas (Hossain y col., 2011).

La temperatura, el tamaño de partícula y el tiempo de extracción se perfilan como los factores más importantes que influyen la eficiencia de extracción en términos de la calidad y rendimiento del producto a obtener (Bucic-Kojic y col., 2007; Oreopoulou, 2003; Vázquez-Cárdenas y col., 2015). Esta eficiencia también se ve significativamente afectada por la composición del solvente (Gironi & Piemonte, 2011). Vági y col. (2005), han demostrado la superioridad del uso de solventes polares (etanol) sobre solventes no polares (n-hexano) en la extracción de sustancias antioxidantes, aún por encima de la metodología de extracción por fluidos supercríticos con CO₂ a diferentes condiciones para *Origanum majorana*, una especie vegetal también rica en antioxidantes polares. Asimismo, diversos estudios se han enfocado hacia la utilización de sistemas de extracción acelerada por solventes (ASE) para extraer compuestos específicos a partir de especias obteniendo buenos resultados (Herrero y col., 2005; Okuda y col., 2009; Zaibunnisa

y col., 2009), sin embargo este método presenta aún serias dificultades para su aplicación comercial.

Gironi y Piemonte (2011) y García-Marquez y col. (2012) han demostrado una mejor eficiencia de extracción de polifenoles provenientes de la corteza del árbol de nuez (*Castanea* sp) y hojas del muile (*Justicia spicigera*) respectivamente, con mezclas binarias etanol-agua como medio de extracción con respecto a los solventes puros. Este tipo de mezclas, igualmente han sido seleccionadas por permitir la extracción de componentes de diferente polaridad de materias vegetales complejas y estar constituidas de solventes no contaminantes al ambiente y de buena seguridad en su uso, en concordancia con las buenas prácticas de manufactura en alimentos.

Recientemente, el modelado de procesos extractivos de principios activos presentes en materias primas vegetales, ha cobrado especial interés como una herramienta de cálculo y optimización para diferentes procesos de extracción comerciales y de investigación, tales como la percolación, la extracción mediante fluidos supercríticos y la extracción sólido-líquido convencional, siendo esta última la de mayor aplicación industrial (Oliveira y col., 2011; Simeonov y Koleva, 2012)

Con el fin de determinar las condiciones óptimas de proceso, en el presente trabajo se generó el modelo experimental del proceso de extracción de polifenoles presentes en el orégano mexicano mediante la optimización de las variables de proceso en la eficiencia de extracción y su efecto en la capacidad antioxidante de los extractos mediante el método de superficie de respuesta (MSR) por ser una técnica de modelamiento estadístico que ha sido útil para evaluar efectos simultáneos de diferentes variables de proceso (Corona-González y col., 2013; Hernández-Díaz y col., 2013; Rodríguez-Bernal y col., 2014). Asimismo, para conocer el tiempo de extracción que permita obtener el 95 % del rendimiento máximo esperado, se definió el modelo cinético de extracción mediante la determinación de los principales parámetros cinéticos de extracción bajo las condiciones óptimas halladas. Los parámetros cinéticos calculados fueron: la velocidad de extracción inicial, la constante de velocidad de extracción y la concentración del soluto en el equilibrio, comparando su representatividad con respecto al modelo de segundo orden propuesto para un sistema de extracción mediante maceración agitada por lote.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo reportado en referencia al estudio sistemático del proceso extractivo para esta especie por lo que

los resultados obtenidos sientan las bases para el desarrollo de nuevos procesos que permitan un mejor aprovechamiento de este recurso vegetal.

2 Materiales y métodos

2.1 Materia prima y reactivos

La hoja de orégano seco (*Lippia graveolens* HBK) se obtuvo de la localidad de Huejuquilla, Jal., tras un proceso tradicional de vareo y secado al sol durante 3 días después del corte. Las muestras de *Rosmarinus officinalis* fueron adquiridas en las empresas Especias y Condimentos de México S.A. de C.V. (muestra 1) y Bioextract S.A. de C.V. (muestra 2). Las muestras vegetales procesadas mantuvieron un contenido de humedad menor al 10.0 %, determinándose en cada ensayo realizado. El reactivo de Folin-Ciocalteu, trolox, ácido gálico y di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium (DPPH) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

2.2 Metodología de extracción

Para la obtención de extractos se utilizó el método de maceración con agitación a temperatura controlada. El sistema contó con reflujo para evitar pérdidas por evaporación. Se utilizaron 450 mL de solvente para cada tratamiento, conservando una relación soluto:solvente de 1:20 (w/v). El tiempo de extracción se mantuvo constante en 60 minutos con agitación controlada de 300 rpm.

Se evaluaron 3 tamaños de partícula promedio de posible uso común a nivel industrial: Hoja entera (1.808 mm), quebrada (1.018 mm) y molida (0.423 mm). Estos tamaños corresponden al tamaño de partícula promedio y fueron obtenidos mediante molienda en molino de martillos con cribas intercambiables.

Se evaluaron 3 temperaturas de extracción: 25, 55 y 75°C, las cuales fueron mantenidas durante el proceso de extracción en intervalos de $\pm 2^\circ\text{C}$.

Las soluciones hidroetanólicas ensayadas fueron al 30, 60 y 96% v/v, en contenido de alcohol y fueron preparadas mezclando agua destilada y etanol (Merck) grado reactivo.

2.2.1 Optimización de los parámetros del proceso extractivo

Las condiciones óptimas de extracción se determinaron mediante el Método de Superficie de

Respuesta (MSR) utilizando el programa Statgraphics 4.0 para un modelo factorial 3^3 , analizando el efecto de las variables temperatura (T), tamaño de partícula (Tp) y concentración de alcohol (Cr) en tres niveles (-1.0, 0.0 y +1.0) sobre las variables respuesta: concentración de fenoles totales (FT) y capacidad antioxidante (DPPH). El diseño completo consistió de 27 corridas experimentales realizadas por duplicado completamente al azar.

Los promedios de los datos obtenidos fueron analizados ajustándose al modelo cuadrático siguiente:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Donde y es la variable respuesta; X_i y X_j son las variables independientes, β_0 es el coeficiente de intersección; β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes para los términos lineales, cuadráticos y de interacciones o productos cruzados, respectivamente y ε es el error experimental aleatorio.

Los modelos se generaron a partir del análisis de regresión por mínimos cuadrados. Los gráficos tridimensionales de superficie de respuesta fueron generados por el software manteniendo una variable en un valor fijo y variando las otras dos. La significancia del modelo se evaluó a través del valor P y la determinación del coeficiente de regresión (R^2) generado por el análisis de varianza (ANOVA). La significancia de los términos del modelo se estableció con un nivel de confianza del 95 %.

2.2.2 Cinética de extracción

La extracción sólido-líquido fue llevada a cabo en un sistema de extracción por lotes en un reactor de vidrio de 500 ml equipado con un sistema de reflujo y agitación magnética a 300 rpm, bajo las mejores condiciones de operación determinadas (tamaño de partícula: 0.42 mm, temperatura: 75 °C y concentración de alcohol: 57.7 % v/v). La cantidad requerida de solvente se adicionó y se llevó a la temperatura deseada. La cantidad de orégano seco se colocó en el reactor y la mezcla se agitó durante 120 min. Las muestras fueron tomadas a intervalos de 10 minutos durante los primeros 30 minutos y de media hora hasta completar el tiempo final de extracción. Dichas muestras se analizaron en su contenido de FT, previa filtración sobre papel Whatman No. 40. El experimento fue llevado a cabo por duplicado.

2.2.3 Determinación del tiempo óptimo de proceso

En el presente trabajo se consideró que la velocidad de extracción de sólidos solubles fue dependiente del gradiente de concentración ($C_s - C_t$), donde C_s y C_t fueron las concentraciones de FT (mgAG/g) provenientes del orégano mexicano a condiciones de equilibrio y a cualquier tiempo "t", respectivamente. Las constantes cinéticas se determinaron experimentalmente aplicando el modelo de extracción de segundo orden descrito por Ho y col. (2005) y Qiu y col. (2009). Conforme este modelo, la ecuación cinética de segundo orden para la velocidad de extracción se describe por la Ec. (1):

$$\frac{dC_t}{dt} = k_2(C_s - C_t)^2 \quad (1)$$

donde k_2 (g mgAG⁻¹ min⁻¹) es la constante de velocidad de extracción de segundo orden. Separando las variables e integrando la ecuación aplicando las condiciones frontera $C_t = 0$ cuando $t = 0$ y $C_t = C_t$ para $t = t$ se obtiene la Ec. (2):

$$C_t = \frac{C_s^2 k_2 t}{(1 + C_s k_2 t)} \quad (2)$$

Esta ecuación corresponde a la expresión de velocidad integrada para reacciones de extracción de segundo orden y puede expresarse en su forma lineal conforme a la Ec. (3):

$$\frac{t}{C_t} = (k_2 C_s^2)^{-1} + \frac{t}{C_s} \quad (3)$$

La velocidad de extracción (C_t/t) puede ser obtenida mediante el inverso de la ecuación anterior y la velocidad de extracción inicial h (equivalente a C_t/t cuando t se aproxima a 0) puede ser definida como $h = k_2 C_s^2$ de tal manera que la ecuación anterior puede ser expresada de acuerdo a la Ec. (4)

$$\frac{t}{C_t} = \frac{1}{h} + \frac{t}{C_s} \quad (4)$$

De esta forma, la velocidad de extracción inicial h , la capacidad de extracción C_s y la constante de velocidad de extracción de segundo orden pueden ser determinadas experimentalmente a partir de la pendiente y el intercepto al origen graficando t/C_t en contra de t .

El tiempo de extracción óptimo se determinó mediante un arreglo de la Ec. 4, despejando el tiempo y considerando una $C_t = 0.95C_s$.

2.3 Métodos analíticos

2.3.1 Determinación del contenido de fenoles totales (FT)

Esta determinación fue realizada mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como estándar de referencia. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro uv-vis a 750 nm (Liu y col., 2009).

2.3.2 Determinación de capacidad antioxidante (DPPH)

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó con base en la técnica del 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), expresado en porcentaje de inhibición y/o miliequivalentes trolox (Molyneux, 2004).

3 Resultados y discusión

3.1 Optimización de las condiciones de extracción

Una vez realizadas las corridas experimentales correspondientes a la etapa de extracción, se determinó para cada una de las muestras obtenidas el contenido de FT en mg de ácido gálico por gramo de orégano seco (mgAG/g), así como el DPPH como porcentaje de inhibición (% Inhib). Los resultados obtenidos mostraron importantes variaciones en el contenido de FT con valores mínimos cercanos a 25 mgAG/g hasta valores superiores a 100 mgAG/g. Para el caso del DPPH, se obtuvieron porcentajes de inhibición variantes del 12 hasta el 55 % (Tabla 1). Se considera que estas variaciones son producto del efecto de las variables de proceso ensayadas sobre el sistema de extracción a través de los diversos fenómenos involucrados en ésta, tales como:

Tabla 1. Comparación entre los resultados estimados mediante el modelo de extracción y los obtenidos experimentalmente.

Corrida	Variables de Proceso			Fenoles Totales (FT)			Capacidad Antioxidante (DPPH)		
	Tam. Part (mm)	Temp. (°C)	% EtOH (v/v)	FT (mg/g) exp	FT (mg/g) calc	% Desv	DPPH (% Inhib) exp	DPPH (% Inhib) calc	% Desv
1	(+1) 1.808	(+1) 75	(0) 60	81.4	96.4	-15.5	44.7	46.5	-3.9
2	(0) 1.018	(0) 55	(+1) 96	57.7	57.5	0.2	27.0	27.4	-1.2
3	(-1) 0.423	(0) 55	(0) 60	86.4	87.8	-1.5	54.9	52.6	4.4
4	(0) 1.018	(0) 55	(0) 60	81.7	81.9	-0.3	45.8	46.3	-1.0
5	(0) 1.018	(-1) 25	(-1) 30	53.8	50.9	5.7	29.3	27.9	5.1
6	(0) 1.018	(0) 55	(-1) 30	67.9	70.0	-2.9	40.8	39.4	3.4
7	(0) 1.018	(+1) 75	(-1) 30	91.0	86.4	5.4	41.8	40.5	3.1
8	(+1) 1.808	(-1) 25	(0) 60	62.9	56.8	10.7	26.6	28.3	-6.3
9	(+1) 1.808	(-1) 25	(-1) 30	42.0	45.2	-7.0	18.1	19.7	-9.3
10	(-1) 0.423	(0) 55	(+1) 96	69.8	65.1	7.3	33.2	33.1	0.4
11	(-1) 0.423	(-1) 25	(-1) 30	56.1	58.4	-3.9	35.5	38.0	-6.5
12	(-1) 0.423	(-1) 25	(0) 60	77.6	73.3	5.9	45.8	45.3	1.1
13	(0) 1.018	(-1) 25	(+1) 96	39.9	41.9	-4.7	18.9	18.0	4.7
14	(-1) 0.423	(+1) 75	(0) 60	104.0	101.1	2.8	54.1	50.8	6.5
15	(+1) 1.808	(0) 55	(+1) 96	57.8	51.8	11.7	23.1	25.1	-8.0
16	(+1) 1.808	(+1) 75	(+1) 96	76.4	68.6	11.5	33.5	27.6	21.6
17	(+1) 1.808	(-1) 25	(+1) 96	25.3	32.1	-21.1	12.5	11.4	9.1
18	(+1) 1.808	(0) 55	(0) 60	76.9	78.4	-1.9	37.7	43.2	-12.7
19	(-1) 0.423	(+1) 75	(+1) 96	69.9	77.2	-9.3	31.3	30.6	2.5
20	(+1) 1.808	(+1) 75	(-1) 30	89.7	87.4	2.7	39.6	39.7	-0.3
21	(-1) 0.423	(0) 55	(-1) 30	64.5	74.4	-13.4	43.7	46.3	-5.6
22	(0) 1.018	(+1) 75	(0) 60	95.2	97.3	-2.1	42.8	46.7	-8.2
23	(0) 1.018	(-1) 25	(0) 60	65.6	64.4	1.8	39.9	35.7	11.8
24	(-1) 0.423	(+1) 75	(-1) 30	91.8	88.8	3.4	43.0	45.2	-4.8
25	(-1) 0.423	(-1) 25	(+1) 96	52.6	52.4	0.3	23.8	27.0	-11.9
26	(+1) 1.808	(0) 55	(-1) 30	72.8	68.3	6.6	40.6	35.7	13.6
27	(0) 1.018	(+1) 75	(+1) 96	69.6	71.7	-2.7	21.4	27.0	-20.8

estabilidad y/o degradación de compuestos activos, difusión interna y externa, solubilización y selectividad de los compuestos fenólicos, así como sobre los fenómenos de adhesión líquido/sólido, cuyos efectos combinados determinan la concentración final de los compuestos fenólicos presentes en los extractos, así como su capacidad antioxidante.

El análisis de resultados mediante la aplicación del método de superficie de respuesta mostró, en su análisis de varianza, la significancia estadística del efecto de los tres parámetros de proceso ensayados, así como de la concentración de alcohol en un nivel cuadrático, con un grado de confianza del 95 % ($p < 0.05$) para ambas variables-respuesta (FT y DPPH). Para FT, la temperatura resultó ser el factor con mayor efecto positivo sin evidencia de degradación térmica dentro de los niveles ensayados, resultado acorde a lo obtenido por Santoyo y col. (2009) y Zaibunnisa y col. (2009), quienes reportaron este comportamiento para rendimientos de extracción de compuestos fenólicos en diferentes variedades vegetales mediante extracción por solvente acelerada. Asimismo, Zgorka (2009) y Qu y col. (2014), reportaron que la temperatura constituye el principal efecto positivo en el rendimiento de extracción para las concentraciones de isoflavonas obtenidas del trébol (*Trifolium* L.) y las proantocianidinas obtenidas de la cáscara de granada (*Punica granatum*), respectivamente. Este hecho está principalmente asociado al incremento de la solubilidad y las velocidades de difusión de los compuestos por efecto de esta variable. Para el caso de DPPH, se encontró una contribución significativa de todos los factores de manera lineal, así como del efecto cuadrático de la concentración de alcohol en la variable respuesta y en menor medida, de los efectos combinados de la temperatura (en su forma cuadrática) y de ésta con el tamaño de partícula.

El análisis de regresión proporcionó las ecs. (5) y (6) correspondientes al modelo ajustado para sus efectos principales para las variables FT y DPPH respectivamente. Estas ecuaciones corresponden a modelos cuadráticos con un buen nivel de ajuste considerando el diseño experimental aplicado ($R^2=91.42\%$ y 92.85% respectivamente), ambos con una R^2 ajustada mayor al 86.9 %. Asimismo, las pruebas de falta de ajuste realizadas a los modelos cuadráticos indican su adecuación hacia las observaciones experimentales obtenidas con valores de P mayores a 0.21 para un nivel de significancia del 5%.

$$FT = 12.3194 - 19.9671T_p + 0.2185T + 2.03996C_r - 0.0163C_r^2 \quad (5)$$

$$DPPH = 4.8669 - 29.4072T_p + 0.7608T + 1.2866C_r + 0.1824T_pT - 0.0111C_r^2 \quad (6)$$

En donde: T_p = Tamaño de partícula (mm), C_r = Concentración de etanol (% v/v), T = Temperatura (°C), FT = Contenido de fenoles totales (mg ac. gálico/g orégano seco), DPPH = Porcentaje de inhibición (%).

En las Figuras 1a y 1b se muestra la gráfica de efectos principales para la variable FT y DPPH respectivamente, con un factor de inflación de varianza para las variables y sus combinaciones menores a 1.018 para ambos casos, lo que indica una prácticamente nula posible confusión seria entre los efectos. Como puede observarse, el contenido de FT de los extractos obtenidos por maceración agitada sólido-líquido se incrementó con la disminución del tamaño de partícula y el aumento de la temperatura, así como a concentraciones de etanol cercanas al nivel medio ensayado. Estas condiciones permitieron, en su conjunto, obtener los mejores niveles de solubilidad, selectividad, estabilidad y accesibilidad del solvente hacia los compuestos fenólicos de interés, redundando en la mayor eficiencia de extracción.

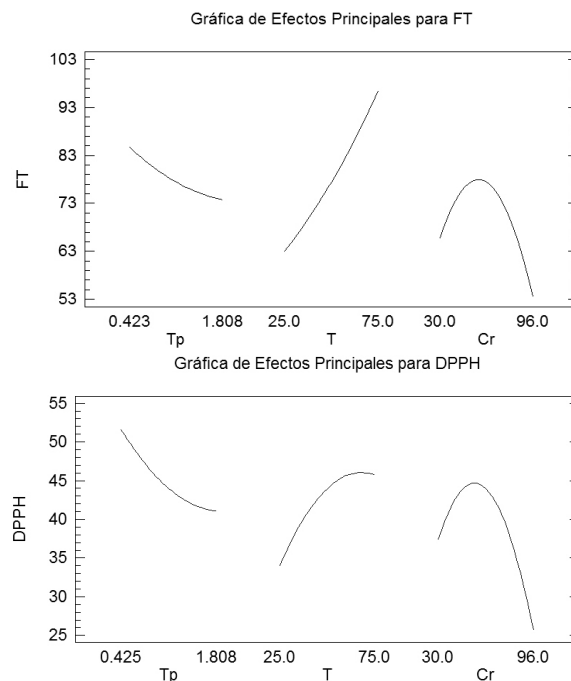


Fig. 1. Gráfico de efectos principales para las variables fenoles totales FT (a) y capacidad antioxidante DPPH (b).

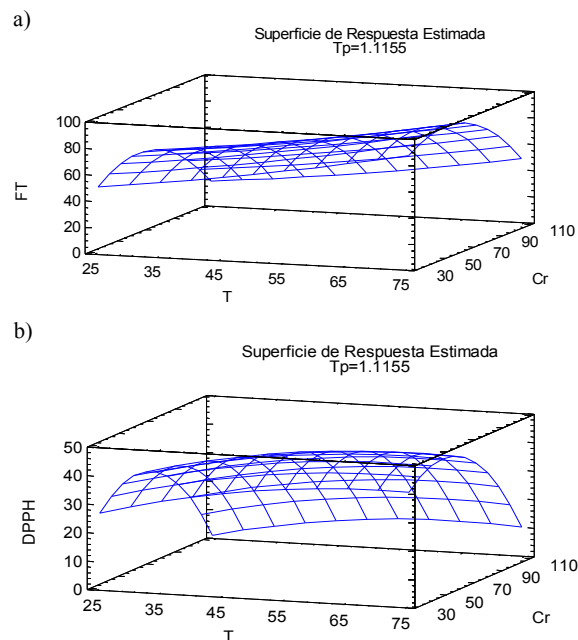


Fig. 2. Gráfica de superficie de respuesta para orégano mexicano que muestra el efecto de la temperatura y la concentración de etanol sobre los Fenoles Totales FT (a) y la capacidad antioxidante DPPH (b).

Los resultados obtenidos con respecto al efecto de la temperatura y la concentración de alcohol fueron similares a los obtenidos por Hossain y col. (2011), quienes aplicaron el método de extracción ASE para el romero (*Rosmarinus officinalis*) a elevadas presiones (3000 psi) y temperaturas (200°C) utilizando una mezcla metanol-agua, a una concentración de metanol de 56% y temperatura de 129°C, no probando el efecto del tamaño de partícula a este respecto.

Resultados similares se observaron para la variable DPPH con respecto al efecto de las variables tamaño de partícula y concentración de alcohol. Sin embargo, el efecto de la variable temperatura difirió sensiblemente, no mostrándose valores mayores a temperaturas elevadas. Este hecho indica que, aun cuando existe un incremento del contenido de FT, éstos presentan similar capacidad antioxidante quizás debido a su posible conversión parcial a especies de menor potencial antioxidante, como sucede con

el ácido carnósico que, al sufrir una hidroxilación oxidativa, genera al carnosol, importante especie química con aún considerable actividad antioxidante, pero menor a la mostrada por su predecesor (Gray y col., 1988). Por su parte, Kuzma y col. (2014) reportaron que, en medios acuosos, algunos compuestos polifenólicos y otros antioxidantes pueden sufrir algunos cambios físico-químicos que inducen la degradación parcial de los mismos, lo cual provoca diferentes grados de supresión en su capacidad antioxidante.

En la Figura 2 se muestran las gráficas de superficie de respuesta que permiten observar el efecto de la concentración de etanol y la temperatura sobre la concentración de FT (Fig. 2a) y DPPH (Fig. 2b) obtenidos para un tamaño de partícula fijo. En estos gráficos pueden verificarse comportamientos similares para ambas variables respuesta (FT y DPPH) principalmente en el efecto cuadrático obtenido con un máximo para concentraciones de alcohol cercanas a los 60 % v/v. En lo que se refiere al efecto de la temperatura, cabe hacer notar que las temperaturas elevadas, aun cuando permiten obtener mayores concentraciones de FT, éstos no muestran en su conjunto mayores valores de capacidad antioxidante.

En la Tabla 2 se muestran los valores óptimos correspondientes a las variables de proceso ensayadas para las variables de respuesta FT y DPPH, así como los valores óptimos generados para las variables respuesta: FT de 101.23 mg/g y DPPH de 52.95 % de inhibición (equivalente a la producida por una concentración de 135.0 mg trolox/g de hoja seca). Los modelos generados fueron validados experimentalmente por triplicado, obteniendo valores para las variables de respuesta con variaciones menores al 2.7%.

Los resultados estimados mediante el modelo contra los obtenidos en forma experimental para el total de corridas realizadas y para ambas variables respuesta son muy semejantes a los calculados, con desviaciones promedio de 6.02 % y 6.93 % para FT y DPPH respectivamente, con respecto a los valores estimados por el modelo (Tabla 1).

Tabla 2. Condiciones de proceso óptimas obtenidas mediante metodología de superficie de respuesta MSR.

Parámetro	Fenoles Totales FT	Cap. Antiox DPPH
Temperatura (°C)	75	58.9
Contenido de etanol (% v/v)	57.7	53.9
Tamaño de partícula promedio (mm)	0.42	0.43
Valor óptimo (mgAG/g, % Inhibición)	101.2	52.9

De manera general, puede observarse que la concentración de FT tiende a incrementarse por efecto del incremento de la temperatura y de la disminución del tamaño de partícula, así como a concentraciones de etanol cercanas al 60%. Cabe hacer notar que concentraciones de alcohol del 30% v/v generan mayor concentración de FT que las logradas con etanol al 96% v/v. En referencia al DPPH, en general se observan mejores capacidades antioxidantes a temperaturas cercanas a los 55°C, bajos tamaños de partícula y concentración de alcohol intermedias.

Se considera que las condiciones óptimas de proceso son aquellas encontradas para la variable FT dado que estas condiciones generan valores de DPPH equivalentes al 96.3 % del máximo esperado (52.9 %). Por el contrario, las condiciones óptimas para la variable DPPH sólo generan el 88.7% de la concentración de FT máxima encontrada.

En referencia a los valores óptimos encontrados, el valor de FT obtenido es muy similar al valor optimizado (101.70 mg/g) reportado por Hossain y col. (2011) para el *Rosmarinus officinalis* obtenidos a las condiciones óptimas por ellos reportadas mediante extracción ASE y considerablemente mayor a los reportados para esa especie por otros autores con diferentes métodos y medios de extracción, incluyendo extracción con etanol en multietapa asistido con ultrasonido (29.9 mg AG/g) y mediante extracción por fluidos supercríticos (Irmak y col., 2010; Mulinacci y col., 2011). Para el caso del orégano mexicano, un informe no indizado reporta una concentración de FT equivalente a 31.92 mgAG/g para extractos obtenidos mediante la utilización de un equipo Soxhlet con mezcla 1:1 hexano:acetato de etilo como medio de extracción.

La capacidad antioxidante obtenida bajo condiciones óptimas, fue 58 % superior a la reportada por Tsimogiannis y col. (2006) para extractos de orégano griego (*Origanum heracleoticum*) obtenidos mediante extracción tipo Soxhlet con etanol como medio disolvente; así como 2.5 veces superior con respecto a la reportada por Cavero y col. (2006) para el *Origanum vulgare* extraído mediante tecnología de fluidos supercríticos (250 bar, 40°C), aplicando esta misma técnica de detección (DPPH), pero utilizando ácido ascórbico como antioxidante de referencia.

Hossain y col. (2011) reportó una capacidad antioxidante para el extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* (obtenido bajo condiciones óptimas) equivalente a 253.5 mg de trolox/g de hoja seca, medido mediante la técnica de FRAP (*ferric reducing antioxidant power*). Cabe mencionar que,

una misma muestra analizada puede mostrar valores de capacidad antioxidante muy disímiles en función de la técnica utilizada dado que en cada caso se determinan propiedades o mecanismos antioxidantes diferentes del metabolito de interés (Fernández-Pachón y col., 2006). Asimismo, puede haber variación de resultados en función del antioxidante de referencia utilizado, así como de las condiciones y tiempos de reacción aplicados.

Con el fin de contar con un mejor marco de referencia, muestras secas de *Rosmarinus officinalis* provenientes de 2 diferentes casas comerciales, extraídas y analizadas en nuestro laboratorio bajo las condiciones óptimas para obtención de FT, mostraron concentraciones de FT de 33.15 y 70.36 mg AG/g y capacidades antioxidantes de 40.23 y 149.29 mg trolox/g, correspondientes a porcentajes de inhibición de 15.8 y 58.6 %, respectivamente. Aun cuando estos resultados fueron muy diferentes entre sí, indicándonos el posible impacto del control en las condiciones de cultivo y de secado a la que se haya sometido el material vegetal (Mulinacci y col., 2011; Rochín-Wong y col., 2013; Morales-Delgado y col., 2014), nos permiten perfilar al orégano mexicano como una promisorio fuente de sustancias polifenólicas con considerable capacidad antioxidante (Shekarchi y col., 2012) con un contenido del 144 % y 91 % con respecto a los valores de FT y DPPH obtenidos para *Rosmarinus officinalis*, respectivamente.

3.1.1 Determinación del tiempo óptimo de proceso

La cinética de extracción de fenoles totales (FT) del orégano mexicano a las condiciones óptimas ensayadas, mostró un rápido incremento inicial en la concentración de estos compuestos en el extracto, produciéndose posteriormente una disminución en la velocidad de acumulación tendiendo hacia su estabilización con respecto al tiempo (Fig. 3). Los datos obtenidos de la extracción de FT se ajustaron a un modelo cinético de segundo orden ($R^2 = 0.998$). La figura 4 muestra los resultados de t/C_t contra el tiempo en su forma lineal (Ec. 4), donde C_t es la concentración de FT correspondiente a cada tiempo t .

El modelo de segundo orden se ajustó adecuadamente al proceso de extracción experimental. A través del análisis de la pendiente y ordenada al origen (Ec. 4) se obtuvo un valor de C_s equivalente a 103.09 mgAG/g, (valor acorde al valor experimental obtenido), una velocidad inicial de extracción (h) de 56.18 mgAG/g min y una constante de velocidad

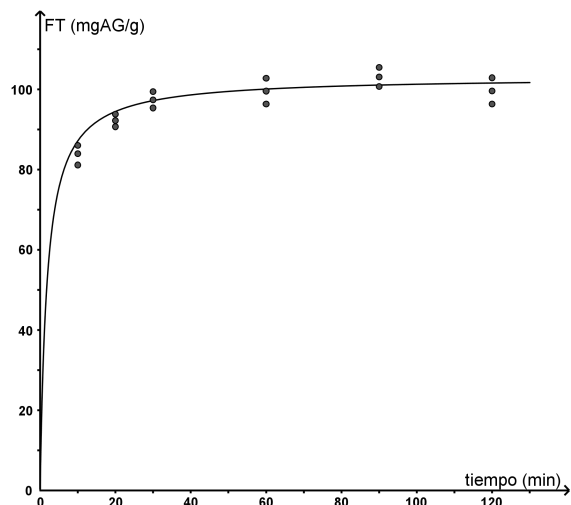


Fig. 3. Cinética de extracción de fenoles totales FT para orégano mexicano a condiciones óptimas.

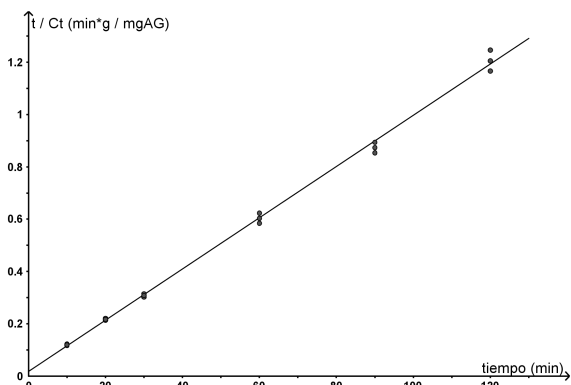


Fig. 4. Modelo de segundo orden aplicado a la cinética de extracción de fenoles totales FT a partir del orégano mexicano a condiciones óptimas.

de extracción de segundo orden (k_2) equivalente a 5.3×10^{-3} (g/mgAG min), con un buen coeficiente de correlación ($R^2=0.998$), lo que nos permitió considerar que este modelo puede ser utilizado para expresar adecuadamente el proceso fisicoquímico de extracción.

El tiempo óptimo de extracción se calculó considerando como tiempo óptimo a aquel que nos permita obtener el 95 % del rendimiento máximo esperado (C_s), siendo éste de 34.7 minutos, mismo que fue validado mediante corridas por triplicado obteniendo desviaciones menores al 3.4%.

El tipo de modelo determinado es acorde al reportado por Chan y col. (2014) quienes indican que el modelado mediante leyes de velocidad química es adecuado para representar extracciones con solvente por lote convencional y asistido con ultrasonido.

A este respecto, Harouna-Oumarou y col. (2007) indicaron que la cinética de extracción sólido-líquido acuosa de *Tilia platyphyllos*, aun cuando podía ser representada por un modelo cinético de pseudo primer orden en dos etapas, el proceso global quedaba mejor representado por un modelo cinético de segundo orden.

Modelos de extracción de segundo orden también han sido reportados como representativos para procesos de extracción de compuestos fenólicos mediante técnicas de extracción convencionales y asistidas por ultrasonido a partir de la cáscara de granada (Pan y col., 2011; Qu y col., 2010), así como para el proceso de extracción de alcaloides (protopina) a partir de la especie vegetal *Fumaria officinalis* (Rakotondramasy-Rabesiaka y col., 2009).

Cuando un modelo de segundo orden representa a un proceso de extracción, sugiere que dicho proceso involucra la consecución de dos diferentes etapas: 1) Existe una remoción inicial rápida de las moléculas más solubles que son desprendidas de la superficie con una posterior reorganización en la superficie sólida y 2) Existe una disminución en la velocidad de extracción controlada por un mecanismo de difusión por película, así como por un mecanismo de difusión del soluto entre las partículas sólidas. Harouna-Oumarou y col. (2007) mencionan que en esta etapa también puede existir la remoción de moléculas menos solubles y/o la hidrólisis parcial de los compuestos orgánicos extraídos. Adicionalmente, Covelo y col. (2004) también observaron que en esta segunda etapa, la velocidad de extracción fue más baja dado que existe una posible modificación de la estructura sólida, provocando cambios negativos en la transferencia de masa y la velocidad de extracción de los solutos.

El modelo obtenido muestra gran similitud con la ecuación utilizada para representar las cinéticas de adsorción, por lo que la extracción sólido-líquido puede ser considerada como la operación opuesta al fenómeno de adsorción (Ho y col., 2005) cuya interpretación, asimismo, involucra la consideración de dos o más diferentes mecanismos de transferencia.

Conclusiones

El orégano mexicano, con referencia al *Rosmarinus officinalis*, constituye una adecuada fuente de sustancias polifenólicas con elevada capacidad antioxidante. La extracción mediante maceración agitada bajo condiciones óptimas, utilizando mezclas hidro-etanólicas como medio disolvente, permite

obtener una alta concentración de dichos compuestos fenólicos asociada a una alta capacidad antioxidante. Los parámetros de proceso con mayor efecto en el rendimiento de extracción fueron la temperatura, la concentración de alcohol y el tamaño de partícula. El efecto de estas variables sobre la eficiencia de extracción pudo representarse mediante un modelo cuadrático validado que permitió optimizar el proceso extractivo para obtener extractos con un contenido de FT cercanos a los 101 mg AG/g de orégano seco, siendo los valores optimizados de las variables de proceso las siguientes: temperatura: 75°C, tamaño de partícula: 0.42 mm y concentración de etanol: 57.7 %.

El tiempo óptimo de extracción, determinado mediante la cinética de extracción de fenoles totales, utilizando un sistema de extracción por lote bajo condiciones óptimas, fue de 34.7 min. La cinética de extracción se representó adecuadamente por un modelo cinético de segundo orden, similar a los modelos obtenidos para el proceso de quimio-adsorción en su forma opuesta, en donde frecuentemente se involucran fuerzas de valencia entre el soluto y el solvente.

Nomenclatura

FT	concentración de fenoles totales (mgAG/g)
DPPH	capacidad antioxidante (% inhib, mg Tx/g)
T	temperatura (°C)
Tp	tamaño de partícula (mm)
Cr	concentración de etanol (% v/v)
Cs	concentración de fenoles totales en equilibrio (mgAG/g)
Ct	concentración de fenoles totales para cada tiempo t
k_2	constante de velocidad de extracción de segundo orden ($\text{g mgAG}^{-1} \text{min}^{-1}$)
h	velocidad de extracción inicial (mgAG/g min)

Referencias

- Babu, R. H., & Savithamma, N. (2013). Phytochemical screening of underutilized species of Poaceae. *Journal of Pharmacy Research* 1, 947-951.
- Block, G. (2009). The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutrition Reviews* 50, 207-213.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., & Velić, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81, 236-242. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027>
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. *Journal of Food Science* 68, 240-248. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb14146.x
- Cavero, S., García-Risco, M. R., Marín, F. R., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F. J., Reglero, G., Ibañez, E. (2006). Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano: Chemical and functional characterization via LC-MS and *in vitro* assays. *The Journal of Supercritical Fluids* 38, 62-69. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2005.01.003>
- Corona-González, R.I., Ramos-Ibarra, J.R., Gutiérrez-González, P., Pelayo-Ortiz, C., Guatemala-Morales, G.M. & Arriola-Guevara, E. (2013). The use of response surface methodology to evaluate the fermentation conditions in the production of Tepache. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 19-28.
- Chan, C.-H., Yusoff, R., & Ngoh, G.-C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design* 92, 1169-1186. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2013.10.001>
- Covelo, E. F., Andrade, M. L., & Vega, F. A. (2004). Heavy metal adsorption by humic umbrisols: selectivity sequences and competitive sorption kinetics. *Journal of Colloid and Interface Science* 280, 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2004.07.024>
- Engin, A. B., Bukan, N., Kurukahvecioglu, O. & Memis, L. (2011). Effect of butylated hydroxytoluene (E321) pretreatment versus l-arginine on liver injury after sub-lethal dose of endotoxin administration. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32, 457-464. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2011.08.014>
- Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2006). Revisión

de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 56, 110-122.

- Gironi, F., & Piemonte, V. (2011). Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design* 89, 857-862. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2010.11.003>
- García-Marquez E., Román-Guerrero A., Pérez-Alonso C., Cruz-Sosa F., Jiménez-Alvarado R., & Vernon-Carter E.J. (2012). Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muilt extracts and their decay upon storage al different pH. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 1-10.
- González Güereca, M. C., Soto Hernández, M., Kite, G., & Martínez Vázquez, M. (2007). Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. berlandieri Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*.
- Gray, J.-L., Crackel, R., Cook, R., & Gastel, A. (1988). Observations on the antioxidant properties and thermal stability of an oleoresin Rosmary. Paper presented at the 3rd. *Int. Exhibition and Conference on Ingredients and Additives*.
- Harouna-Oumarou, H. A., Fauduet, H., Porte, C., & Ho, Y.-S. (2007). Comparison of kinetic models for the aqueous solid-liquid extraction of *Tilia sapwood* in a continuous stirred tank reactor. *Chemical Engineering Communications* 194, 537-552. doi: 10.1080/00986440600992511
- Hernández-Díaz, W.N., Hernández-Campos, F. J., Vargas-Galarze, Z., Rodríguez-Jiménez, G.C. & García-Alvarado, M.A. (2013). Coffee grain rotary drying optimization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 315-325.
- Herrero, M., Arraez-Roman, D., Segura, A., Kenndler, E., Gius, B., Raggid, M. A., Ibañez, E., & Cifuentes, A. (2005). Pressurized liquid extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts. *Journal of Chromatography* 1084, 54-62.
- Ho, Y.-S., Harouna-Oumarou, H. A., Fauduet, H., & Porte, C. (2005). Kinetics and model building of leaching of water-soluble compounds of *Tilia sapwood*. *Separation and Purification Technology* 45, 169-173. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2005.03.007>
- Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., & Brunton, N. P. (2011). Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chemistry* 126, 339-346. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.076>
- Irmak, S., Solakyildirim, K., Hesenov, A., & Erbatur, O. (2010). Study on the stability of supercritical fluid extracted rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil. *Journal of Analytical Chemistry* 65, 899-906. doi: 10.1134/S1061934810090030
- Kuzma, P., Druzynska, B., & Obiedzinski, M. (2014). Optimization of extraction conditions of some polyphenolic compounds from parsley leaves (*Petroselinum crispum*). *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 13, 145-154.
- Lampe, J. W. (2003). Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition* 78, 579S-583S.
- Lin, L.-Z., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. J., & Harnly, J. M. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 361-369. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2006.09.005>
- Liu, L., Sun, Y., Laura, T., Liang, X., Ye, H., & Zeng, X. (2009). Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. *Food Chemistry* 112, 35-41. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.038>
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín Journal of Science and Technology* 26, 211-219.

- Morales-Delgado, D.Y., Téllez-Medina, D.I., Rivero-Ramírez, N.L., Arellano-Cárdenas, S., López-Cortez, S., Hernández-Sánchez, S., Gutiérrez-López, G. & Cornejo-Mazón, M. (2014). Effect of convective drying on total anthocyanin content, antioxidant activity and cell morphometric parameters of strawberry parenchymal tissue (*Fragaria x ananassa* Dutch). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 179-187.
- Mulinacci, N., Innocenti, M., Bellumori, M., Giaccherini, C., Martini, V., & Michelozzi, M. (2011). Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. *Talanta* 85, 167-176. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.050>
- Nash, R. (2004). Remedies from nature. *Chemistry World* 7, 20-23.
- Odhiambo, J., Dossaji, S., Lukhoba, C., & Yenesew, A. (2014). Phytochemical screening of *Dierama cupuliflorum* Klatt. (Iridaceae). *Journal of Pharmacy Research* 8, 589-592.
- Okuda, T., Yamashita, N., Tanaka, H., Matsukawa, H., & Tanabe, K. (2009). Development of extraction method of pharmaceuticals and their occurrences found in Japanese wastewater treatment plants. *Environment International* 35, 815-820. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2009.01.006>
- Oliveira, E. L. G., Silvestre, A. J. D., & Silva, C. M. (2011). Review of kinetic models for supercritical fluid extraction. *Chemical Engineering Research and Design* 89, 1104-1117. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2010.10.025>
- Oreopoulou, V. (2003). Extraction of Natural Antioxidants Extraction Optimization in Food Engineering (pp. 46-53). USA: Marcel Decker.
- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G., & McHugh, T. H. (2011). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry* 18, 1249-1257. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.01.005>
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., & Villar, A. (2001). Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76, 201-214. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3)
- Qiu, H., Lv, L., Pan, B.-c., Zhang, Q.-j., Zhang, W.-m., & Zhang, Q.-x. (2009). Critical review in adsorption kinetic models. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A* 10, 716-724. doi: 10.1631/jzus.A0820524
- Qu, W., Pan, Z., & Ma, H. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering* 99, 16-23.
- Qu, W., Shi, S., Li, P., Pan, Z., & Venkitasamy, C. (2014). Extraction kinetics and properties of proanthocyanidins from pomegranate peel. *International Journal of Food Engineering* 10, 683.
- Rakotondramasy-Rabesiaka, L., Havet, J. L., Porte, C., & Fauduet, H. (2009). Solid-liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L.-Kinetic modelling of influential parameters. *Industrial Crops and Products* 29, 516-523. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.10.001>
- Rastrelli, L., Caceres, A., Morales, C., De Simone, F., & Aquino, R. (1998). Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry* 49, 1829-1832.
- Rodríguez-Bernal, J.M., Serna-Jiménez, J.A., Uribe-Bohórquez, M.A., Klotz, B., Quintanilla Carvajal, M.X. (2015). Application of response surface methodology to evaluate the effect of the concentration of sugar and commercial starters on the fermentation kinetics of yogurt. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 213-225.
- Rochín-Wong C.S., Gámez-Meza N., Montoya-Ballesteros L.C., Medina-Juárez L.A., (2013). Effect of drying and pickling process on antioxidant capacity of phytochemical of chiltepin (*Capsicum annum* L. var *glabriusculum*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 2, 227-239.
- Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Señorans, F. J., & Ibáñez, E. (2009). Green processes based on the extraction

- with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT - Food Science and Technology* 42, 1213-1218. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.01.012>
- Shekarchi, M., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Gohari, A. R., & Hamedani, M. P. (2012). Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of *Labiatae* family. *Pharmacognosy Magazine* 8, 37-41. doi: 10.4103/0973-1296.93316
- Simeonov, E., & Koleva, V. (2012). Solid-liquid extraction of tannins from *Geranium Sanguineum* L.-Experimental kinetics and modelling. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 26, 249-255.
- Srinivasan, K. (2005). Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. *Food Research International* 38, 77-86. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2004.09.001>
- Svoboda, K., Brooker, J., & Zrustova, J. (2006). Antibacterial and antioxidant properties of essential oils. *Acta Hort ISHS* 709, 106.
- Tsimogiannis, D., Stavrakaki, M., & Oreopoulou, V. (2006). Isolation and characterization of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*). *International Journal of Food Science and Technology* 41, 39-48.
- Vági, E., Rapavi, E., Hadolin, M., Vasarhelyine Peredi, K., Balázs, A., Blázovics, A., & Simándi, B. (2005). Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 17-21.
- Vázquez-Cárdenas, C.F., Valiente-Banuet, J.I., Caballero-Mata, P., Mújica-Paz, H., Rodríguez-Rodríguez, J., Welti-Chanes, J. (2015). Kinetic and statistical criteria for the selection of conditions of extraction of volatile compounds of piquin pepper (*Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 2, 231-241.
- Zaibunnisa, A. H., Norashikin, S., Mamot, S., & Osman, H. (2009). An experimental design approach for the extraction of volatile compounds from turmeric leaves (*Curcuma domestica*) using pressurised liquid extraction (PLE). *LWT - Food Science and Technology* 42, 233-238. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.03.015>
- Zgorka, G. (2009). Pressurized liquid extraction versus other extraction techniques in micropreparative isolation of pharmacologically active isoflavones from *Trifolium L. species*. *Talanta* 79, 46-53. doi: 10.1016/j.talanta.2009.03.011
- Zhang, X., Xu, F., Gao, Y., Wu, J., & Zeng, X. (2012). Optimizing the extraction of tea polyphenols, (-) epigallocatechin gallate and theanine from summer green tea by using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology* 47, 2151-2157.