



Imagen de: Sheila Briget Malpica Acosta

Efecto de tres métodos de extracción en el rendimiento, actividad antioxidante, fenoles totales y estabilidad de extractos de hojas de *Plectranthus amboinicus*

Effect of three extraction methods on yield, antioxidant activity, total phenols, and stability of extracts from *Plectranthus amboinicus* leaves

Sheila Briget Malpica-Acosta¹, Andrés Antonio Acosta-Osorio², José Javier Benedito-Fort³, Rosa Isela Castillo-Zamudio^{1*}

RESUMEN

Los métodos de extracción de fitoquímicos convencionales presentan bajos rendimientos o largos tiempos de proceso. El ultrasonido ofrece alternativas para incrementar el rendimiento en extractos vegetales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tres métodos de extracción en rendimiento, composición de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y estabilidad de extractos de hojas de *Plectranthus amboinicus* (oreganón). Los métodos de extracción usados fueron: convencional con agitación (EC), asistida con baño de ultrasonidos (EABU) y asistida con sonda de ultrasonido (EASU). Se usó una proporción 1:10 (p/v) orégano:etanol a 35 ± 2 °C. Los rendimientos se calcularon como materia seca del extracto (% ms). Se usó un modelo de pseudo-segundo orden para ajustar las curvas de extracción experimentales de los tres métodos y obtener los parámetros cinéticos. Se determinaron compuestos fenólicos totales (CFT) y actividad antioxidante (AA) mediante los métodos de Folin-Ciocalteu y DPPH, respectivamente. Se evaluó la estabilidad del CFT y AA durante el almacenamiento. La EASU aumentó 33.93 % el rendimiento en los extractos con respecto a EC. La mayor concentración de CFT ($P \leq 0.05$) se obtuvo mediante EABU (10.32 mg EAG/ms) y para AA mediante EC (19.43 mg ET/g ms). El modelo cinético de pseudo-segundo orden ajustó adecuadamente las cinéticas experimentales. La constante de velocidad (k) de CFT más alta fue de 0.016 g ms/mg EAG-min para la EASU, siendo esta técnica la que demostró una disminución significativa de AA con respecto al tiempo de extracción. Los CFT de los extractos obtenidos mediante EABU, EASU y EC (3.7 mg EAG/g ms, 4.4 mg EAG/g ms y 7.2 mg EAG/g ms, respectivamente), al igual que la AA se mantuvieron estables y sin cambios significativos ($P \geq 0.05$) durante los 34 d de almacenamiento, mostrando nuevamente la ventaja de utilizar la técnica extractiva de ultrasonidos, en función del tiempo.

PALABRAS CLAVE:

oreganón, extracción, actividad antioxidante, compuestos fenólicos, rendimiento.

ABSTRACT

Conventional phytochemicals extraction methods have shown low yields or very long processing times for obtaining. The ultrasound offers alternatives to increase the yields of plant extracts. The objective of this work was to evaluate the effect of three extraction methods on the yield, phenolic compound composition, antioxidant activity and stability of *Plectranthus amboinicus* (oregano) leaf extracts. The extraction methods used were: conventional heat-assisted extraction (CE), ultrasound water bath assisted (UBAE) and ultrasound probe assisted extraction (UPAE). A 1:10 (w/v) oregano:ethanol ratio was used at 35 ± 2 °C. Yields were calculated as extract dry matter (% ms). A pseudo-second-order model was used to fit the experimental extraction curves of the three methods and obtain the kinetic parameters. Total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity (AA) were determined by Folin-Ciocalteu and DPPH methods, respectively. The stability of TPC and AA was evaluated during storage. UPAE increased 33.93 % yield in extracts concerning CE. The highest concentration of CFT ($P \leq 0.05$) was obtained by UBAE (10.32 mg EAG/ms) and for AA by CE (19.43 mg ET/g ms). The pseudo-second-order kinetic model adequately fitted the experimental kinetics. The highest TPC rate constant (k) was 0.016 g ms/mg EAG-min, for UPAE, this technique being the one that demonstrated a significant decrease in AA with respect to extraction time. The TPC of the extracts obtained by UBAE, UPAE and CE (3.7 mg EAG/g dms, 4.4 mg EAG/g dms and 7.2 mg EAG/g ms, respectively), as well as the AA remained stable and without significant changes ($P \geq 0.05$) during the 34 d of storage, again showing the advantage of using the ultrasound extractive technique, as a function of time.

KEYWORDS:

oreganon, extraction, antioxidant activity, phenolic compounds, yield.

*Correspondencia: rosychely@colpos.mx/Fecha de recepción: 20 de marzo de 2023/Fecha de aceptación: 22 de enero de 2024/Fecha de publicación: 30 de enero de 2024.

¹Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, km 88.5 carretera Federal Xalapa-Veracruz, Veracruz, México, C. P. 91700. ²Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Veracruz, Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Veracruz, México, C. P. 91870. ³Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos, Valencia, España, C. P. 46022.

INTRODUCCIÓN

El oreganón (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) es una planta suculenta, aromática, perenne, que se encuentra en regiones tropicales y subtropicales, con origen en Asia y África (Prasad y col., 2020). El oreganón se ha usado de forma tradicional como aromatizante, condimento y conservador natural de alimentos debido a su contenido nutricional, intenso olor y sabor (Silalahi, 2018). También se le han conferido propiedades antioxidantes, terapéuticas para el tratamiento de infecciones microbianas, antitusivas, nutritivas y antisépticas (Kumar y col., 2020). En sus hojas se han identificado diversos compuestos fenólicos, metabolitos secundarios resultantes del metabolismo basal de las plantas (Gordo, 2018); los más importantes son los flavonoides: salvigenina, quercetina, apigenina, luteolina, eriodictiol y taxifolina (Menéndez y Pavón, 1999).

En México, son escasas las investigaciones donde se determinen los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de *Plectranthus amboinicus*. En la mayoría se han determinado el contenido de vitaminas como tiamina, riboflavina y ácido ascórbico, así como los terpenos cariofileno, humuleno, camfor y limoneno. Entre los trabajos más destacados se encuentra el de Morton (1992), quien reportó especies de *P. amboinicus* en la ciudad de México y analizó su contenido fitoquímico; y, posteriormente, el de Bañuelos-Hernández y col. (2020), quienes colectaron especies en México e identificaron sus compuestos por espectrometría de masas.

Los antioxidantes son sustancias químicas que se caracterizan por impedir o retrasar el deterioro oxidativo que afecta a las células (Vilaplana, 2007). Moléculas con propiedades antioxidantes, presentes en extractos de algunas hojas como Murtilla, pueden ubicarse en las membranas que rodean las células, perturbar su estructura, y afectar el flujo de entrada al interior, entre ellos el paso de radicales libres (Avello y Suwalsky, 2006). La actividad antioxidante (AA) es la capacidad de

un compuesto para reducir un radical, el cual acepta un electrón o átomo no apareado de hidrógeno donado por el sustrato; en dicho mecanismo el antioxidante presente en la célula anula la reactividad de la sustancia oxidativa y/o inhibe la generación de radicales libres (Agusti y col., 2014; Galiano, 2019).

Koztowska y col. (2021), evaluaron el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de hojas secas y frescas de oreganón, usando etanol como solvente, y encontraron que ya deshidratadas cuentan con una mayor concentración de compuestos fenólicos que frescas. Este incremento de CFT durante el secado, considerando el aumento de temperatura, es controversial; algunos autores han encontrado disminución (Kulbat-Warycha y col., 2022), sin embargo, otros como Koztowska y col. (2021) e Isah (2019), indicaron que el aumento de los CFT en las hojas deshidratadas puede ser atribuido a tres mecanismos: 1) repuesta al estrés debido al incremento de la temperatura, donde la planta sintetiza estos metabolitos secundarios; 2) ruptura de paredes vegetales y liberación de compuestos bioactivos al medio extracelular; y 3) inactivación de enzimas que degradan los fitoquímicos y por ende, durante largos procesos de almacenamiento, las hojas que reciben tratamiento incrementan la concentración de CFT. Por otra parte, Patel y col. (2010) evaluaron la AA de extractos acuosos y etanólicos de *P. amboinicus*, siendo este último el que mostró una mayor concentración de compuestos con AA en comparación con el extracto acuoso.

Los compuestos bioactivos de plantas pueden ser extraídos por distintos métodos, condiciones y tratamientos del material vegetal, previo al proceso de extracción, con la finalidad de incrementar su concentración. Bhave y Dasgupta (2018), concluyeron que someter *P. amboinicus* a temperaturas por encima de 60 °C aumenta la composición de compuestos fenólicos y directamente la AA, siempre que esta propiedad esté directamente relacionada con la presencia de dichos fenoles. Por lo tanto, usar el método de secado como un

proceso previo a la extracción de las hojas de *P. amboinicus* puede favorecer la concentración de compuestos fenólicos y aumentar los rendimientos en el extracto (Pashazadeh y col., 2021).

En la selección de un solvente de extracción es importante considerar, la polaridad, selectividad, seguridad, costo, reactividad, recuperación, viscosidad y temperatura de ebullición del mismo (Abubakar y Haque, 2020). El etanol es quizá el solvente polar más utilizado, ya que puede extraer metabolitos secundarios importantes a fines a su polaridad, es de baja toxicidad y se recupera fácilmente (Kulbat-Warycha y col., 2022).

La extracción convencional (EC), es un proceso de separación de uno o más componentes en el seno de una mezcla, por la acción de un solvente. Se basa en fenómenos de transferencia de masa y está en función de las diferencias de solubilidad de los solutos (López y col., 2005). La EC consta de tres etapas: 1) la introducción del disolvente en el sólido para solubilizar los solutos; 2) desplazamiento de la disolución obtenida a la superficie del sólido; y 3) distribución de la disolución en el disolvente (Ramírez-Reyes y col., 2015).

Trabajos de EC con *P. amboinicus*, usando distintos solventes como agua, etanol o hexano, reportan rendimientos variables, en función a las diferencias de polaridad. Matias y col. (2019), reportaron que el uso de metanol logra un mayor rendimiento que los solventes acuosos, lo cual se puede deber a la capacidad del alcohol para romper la célula de la pared vegetal con mayor eficacia. Por otro lado, Wibisono y col. (2019) realizaron extractos de oreganón mediante EC, usando agitación y los solventes etanol, agua-hexano y etanol-agua, siendo esta última combinación, con la que se obtuvo mayor rendimiento. Resultados como éste demuestran que la implementación de agitación mecánica en la EC, permite mejores rendimientos y calidad del extracto, en comparación con la

técnica convencional de percolación (Acosta-Martínez y col., 2021).

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) es un método amigable con el ambiente, por la disminución de los residuos. Ofrece alta productividad, facilidad de uso y disminución en el consumo de energía (Singh-Sengar y col., 2020). La aplicación de ultrasonidos de potencia, en los procesos extractivos, intensifica la velocidad de transferencia de masa, debido a que las burbujas de cavitación, que implosionan sobre la superficie del sólido, generan rupturas de las células vegetales, lo que facilita el desplazamiento del disolvente en el sólido y la disolución del soluto de interés; finalmente, mediante el fenómeno de capilaridad emerge la disolución al medio de extracción (Corona-Jiménez y col., 2016; Galiano, 2019; Bhagya y Dash, 2020).

Muhamad y Mat (2018), realizaron la extracción asistida con baño de ultrasonidos (EABU) de hojas de *P. amboinicus*, en etanol como solvente, con el cual obtuvieron mayor contenido fenólico y AA, en contraste con los valores obtenidos usando agua y acetato de etilo. Asimismo, Tungmunnithum y col. (2019) llevaron a cabo la extracción del ácido rosmarínico, presente en *P. scutellarioides*, y reportaron mayor concentración usando etanol, en comparación a otros solventes evaluados.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tres métodos de extracción en el rendimiento, composición de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y estabilidad durante el almacenamiento de extractos de hojas de oreganón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del material vegetal

Las hojas de oreganón (*P. amboinicus*) fueron colectadas manualmente durante los meses de mayo y junio de 2022, en huertos de traspatio, en municipios de Veracruz, México: Jamapa, Manlio Fabio Altamirano, Medellín, Paso de Ovejas y Veracruz, con temperaturas máximas de 32 °C y mínimas de 25 °C (estación meteoroló-

gica del Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz). Las hojas maduras, las cuales presentaban una mayor concentración de metabolitos, fueron seleccionadas de acuerdo a su largo (Sabra y col., 2018), se lavaron con agua corriente y escurrieron un día antes de su procesamiento, a fin de garantizar la ausencia de agua sobre la superficie de la hoja. Posteriormente, se secaron de acuerdo a la metodología propuesta por Pashazadeh y col. (2021), usando un secador de bandejas (Marca Glint, Mod-041, Veracruz, México) con control de temperatura del aire a 60 ± 2 °C. El tiempo de secado fue de 4 h para alcanzar una actividad de agua en las hojas $a_w \leq 0.4$, dicha variable se midió mediante un higrómetro de rocío (Marca Aqualab, Modelo CX-2, Decagon Devices Inc., Washington, Estados Unidos). Las hojas deshidratadas fueron molidas en un molino de tejido vegetal Wiley (Marca Thomas Scientific, Modelo 3383-L70, New Jersey, Estados Unidos) con una malla 20, a fin de disminuir el tamaño de partícula y aumentar el área de contacto entre el sólido y el solvente. El producto resultante se almacenó en bolsas Ziploc®, envueltas en papel aluminio, con el propósito de protegerlas de la luz durante 3 d/4 °C, previo al proceso de extracción.

Producción de extractos

Se mezclaron 10 g de hojas de *P.amboinicus* deshidratadas y molidas con 100 mL de etanol (proporción 1:10 p/v), en matraces de 125 mL con tapa, envueltos de papel aluminio, a 35 ± 2 °C. Se utilizaron tres métodos de extracción por triplicado: EC, EABU y EASU.

La EC se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Ramírez-Reyes y col. (2015). Los matraces se colocaron con agitación usando un agitador orbital (Marca Thermo Scientific, Modelo MaxQ 4450, Ohio, Estados Unidos) a 175 rpm, durante 9 d y con 2 recambios de solvente cada 3 d.

La EABU se llevó a cabo en un baño sonificador (Marca Branson®, Modelo CPXH 3800, Branson, Connecticut, Estados Unidos) a 40 kHz

por 60 min (Galiano, 2019). Se recambió el solvente en su totalidad cada 10 min (6 recambios) a fin de realizar una extracción exhaustiva.

La extracción asistida con sonda de ultrasonido (EASU) se realizó en un sonicador digital (Marca Sonifier® Branson, Modelo 450 Cell Disruptor, Connecticut, Estados Unidos) por 15 min, empleando una sonda de titanio de un diámetro de 12.7 mm y una amplitud de 50 %, de acuerdo con la metodología propuesta por Corona-Jiménez y col. (2016). El recambio de solvente se realizó cada 2.5 min (6 recambios).

En ambos métodos de extracción asistidos con ultrasonidos, el calor generado fue disipado sumergiendo los matraces en un baño de agua con acumuladores rellenos de un refrigerante.

Rendimiento de extracción

Se determinó con base al porcentaje de sólidos extraídos (Benítez y col., 2019) y se expresó como porcentaje, considerando g de extracto/g de oreganón seco (ms) de acuerdo a la Ecuación 1:

$$\% R = \frac{W_i - W_f}{W_i} * 10 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

% R = porcentaje de rendimiento.

W_i = peso inicial del soluto.

W_f = peso final del soluto.

Determinación de compuestos fenólicos totales

El análisis CFT se determinó por el método Folin-Ciocalteu descrito por Palomino y col. (2009). Se mezclaron 1 680 µL de agua destilada, 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu y una muestra de 20 µL de extracto etanólico, usando un vórtex (Marca D-LAB, Modelo MX-S, Beijing, China) y se dejó reposar la mezcla por 5 min. Posteriormente, se añadió una solución de Na_2CO_3 al 20 % (p/p), se homogeneizó por 10 s y se incubó por 2 h a

temperatura de 35 ± 2 °C. Las mezclas se analizaron en un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys™ 10S, Thermo Scientific, Wisconsin, Estados Unidos) a 760 nm, para obtener la absorbancia y calcular la concentración de CFT a partir de la curva de calibración, que se realizó usando diferentes diluciones de ácido gálico, a fin de conocer el coeficiente de correlación, pendiente e intercepto. Los análisis de los extractos se llevaron a cabo usando diluciones (1.0 mg/mL, 0.80 mg/mL, 0.60 mg/mL, 0.40 mg/mL, 0.20 mg/mL, 0.1 mg/mL y 0.05 mg/mL) a partir de una solución madre de ácido gálico (1 mg/mL). Los resultados se expresaron en mg de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por gramo de muestra seca (g ms).

Actividad antioxidante

El análisis de la AA se determinó por el método de solución de radicales libres 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) descrita por Vasco y col. (2008). Se realizó una solución metanólica madre de DPPH (25 mg/mL) y se diluyó hasta una absorbancia cercana a 0.800; 3.9 mL de esta dilución se mezclaron con 0.1 mL de extracto y se incubaron en la oscuridad por 90 min a temperatura de 35 ± 2 °C. Transcurrido el tiempo, se leyeron las mezclas en un espectrofotómetro UV-Vis (Marca Genesys™, Modelo 10S, Thermo Scientific, Wisconsin, Estados Unidos) a 517 nm.

La curva de calibración se realizó a partir de una solución madre de Trolox (1 mg/mL) con etanol a diferentes concentraciones (0.01 mg/mL, 0.025 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL y 0.2 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg de equivalente de Trolox por gramo de muestra seca (mg ET/g ms).

Vida de almacenamiento

La vida útil de los extractos, almacenados a 4 °C, se midió en función de la concentración de CFT (Método Folin-Ciocalteu) y la AA usando el método DPPH (descritos previamente). Se analizaron tres muestras de cada tipo de extracto cada 4 d/36 d. Se almacenaron tres muestras, por cada tipo de método de extracción, en matraces forrados con papel

aluminio en una gaveta a 4 °C y protegidos de la luz. Los análisis de los extractos se realizaron por triplicado.

Modelización de las cinéticas de extracción

La velocidad del proceso de extracción se analizó de acuerdo a la concentración de los CFT y AA de los extractos, en función del tiempo de proceso. La tasa de velocidad (k) y la concentración de saturación del soluto en el solvente (C_s) se obtuvo mediante el modelo cinético propuesto por Bhagya y Dash (2020), el cual se presenta en la Ecuación 2:

$$\frac{dC_t}{dt} = k(C_s - C_t)^2 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

C_t = concentración de compuesto en el extracto en un tiempo (t) determinado (mg EAG/g ms) ó (mg ET/g ms).

C_s = concentración de saturación del componente químico en la fase líquida (mg EAG/g ms) ó (mg ET/g ms).

k = constante de velocidad del modelo de pseudo segundo orden; bajo las condiciones frontera: $C_t = 0$ en $t = 0$; $C_t = C_s$ en $t = t$ (g ms/mg EAG·min) ó (g ms/mg ET·min).

La ecuación anterior puede transformarse en la Ecuación 3:

$$C_t = \frac{C_s^2 kt}{1 + C_s kt} \quad \text{Ecuación 3}$$

La cual se puede simplificar en forma lineal en las Ecuaciones 4 y 5:

$$\frac{t}{C_s} = \frac{1}{kC_s^2} + \frac{t}{C_s} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\frac{t}{C_s} = \frac{t}{h} + \frac{t}{C_s} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

h = tasa de extracción inicial cuando $t = 0$, la cual es producto de k y C_s^2 .

Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) completamente al azar, usando el programa SAS® (Statistical Analysis System) versión 9.0, para cada tipo de variable: rendimiento de extracción, CFT y AA de los extractos.

Los parámetros estadísticos para evaluar la bondad del ajuste entre los datos experimentales y los predichos por el modelo cinético, para cada curva experimental de CFT y AA, fueron: cuadrado medio del error (MSE, por sus siglas en inglés: mean-square error), raíz cuadrada del cuadrado medio del error (RMSE, por sus siglas en inglés: root-mean-square error) y el coeficiente de determinación (R^2), calculados de acuerdo a Bhagya y Dash, (2020) mediante las ecuaciones 6, 7 y 8, respectivamente, para CFT y las ecuaciones 9, 10 y 11 para obtener los parámetros estadísticos del ajuste de la AA:

$$MSE_{CFT} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (CFT_{mod} - CFT_{exp}) \quad \text{Ecuación 6}$$

$$RMSE_{CFT} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (CFT_{mod} - CFT_{exp})^2}{n}} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$R_{CFT}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (CFT_{mod} - CFT_{exp})^2}{\sum_{i=1}^n (CFT_m - CFT_{exp})^2} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$MSE_{AA} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (AA_{mod} - AA_{exp}) \quad \text{Ecuación 9}$$

$$RMSE_{AA} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (AA_{mod} - AA_{exp})^2}{n}} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$R_{AA}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (AA_{mod} - AA_{exp})^2}{\sum_{i=1}^n (AA_m - AA_{exp})^2} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde:

CFT_{mod} = valor de CFT predicho por el modelo.

CFT_{exp} = valor de CFT experimental.

CFT_m = valor medio de CFT.

AA_{mod} = valor de AA predicho por el modelo.

AA_{exp} = valor de AA experimental.

AA_m = valor medio de AA.

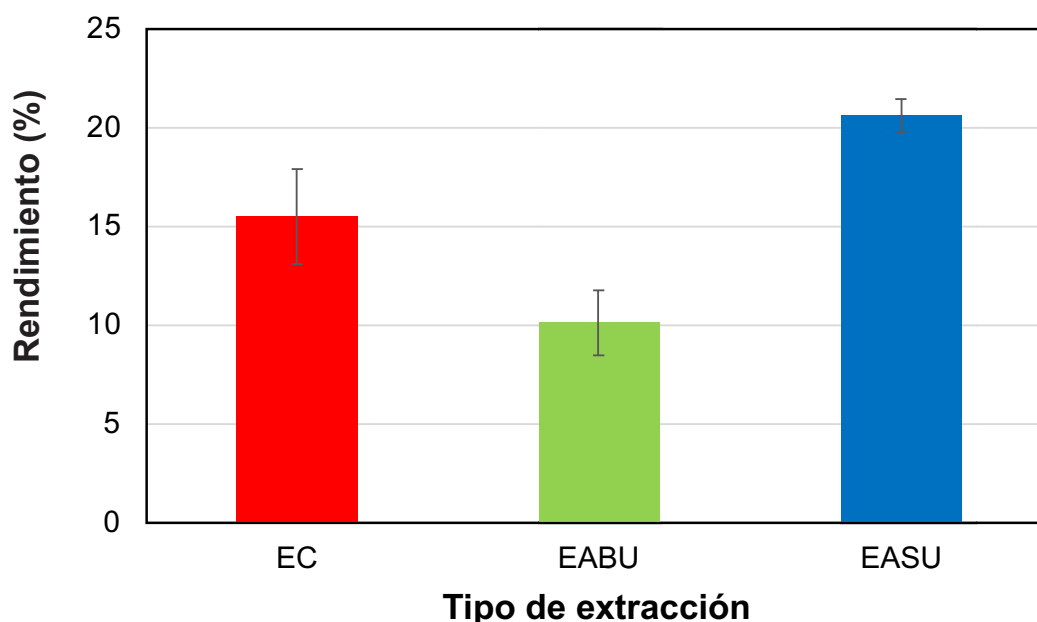
n = número de datos experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del rendimiento de extracción

El rendimiento más alto fue el obtenido mediante EASU (20.58 %) ($P \leq 0.05$), que representó un 39.33 % más que el de EC (Figura 1); y aunque la EABU obtuvo menor rendimiento (10.11 %), su tiempo de proceso fue 216 veces menor que el de la EC (60 min vs 216 h) (Figura 2). Estos resultados pueden ser explicados debido a los mecanismos involucrados en la aplicación de ultrasonidos de potencia. En ambos métodos se generan ondas ultrasónicas que viajan a través del medio conductor (solvente) provocando el fenómeno denominado cavitación, que genera burbujas que se impactan y/o crean presión sobre la superficie del sólido, produciendo erosión, cizallamiento y fisuras finas en los tejidos de la matriz vegetal, lo cual permite que el solvente ingrese más fácilmente al interior del producto y favorece la liberación de sustancias intracelulares en el solvente. Ambas acciones intensifican los fenómenos de transferencia de masa que se llevan a cabo durante el proceso de extracción sólido-líquido, y con ello, un mayor rendimiento en solutos (peso seco) en el solvente (Kulbat-Warycha y col., 2022). Por su parte, la sonda de ultrasonidos permite la generación de una mayor turbulencia del medio donde se difunden, por lo que minimiza la resistencia al fenómeno de transferencia en la interfase (Azwanida, 2015; Nurafifah y col., 2018), facilitando el proceso de extracción.

Se han reportado valores similares a los de este estudio en extractos etanólicos de hojas de *P. amboinicus*, mediante extracción por maceración. Rivas-Pérez y col. (2017), documentaron valores en un intervalo entre el 15 % a 20 % mediante maceración pasiva, en una relación 1:10; y Koztowska y col. (2021) alcanzaron un rendimiento de 21.97 %, usando extracción convencional con agitación. Por otra parte, Patel y col. (2010), obtuvieron valores de rendimiento del 18.10 % usando agua como solvente de extracción y, recientemente, Kulbat-Warycha y col. (2022) realizaron la extracción asistida con ultrasonidos de *Pectranthus barbatus* en una combinación agua-etanol como solvente y en-



■ **Figura 1.** Rendimiento de los distintos tipos de extracción con base al porcentaje de sólidos.

Figure 1. Mean values of the yield of the different types of extraction based on the percentage of solids.

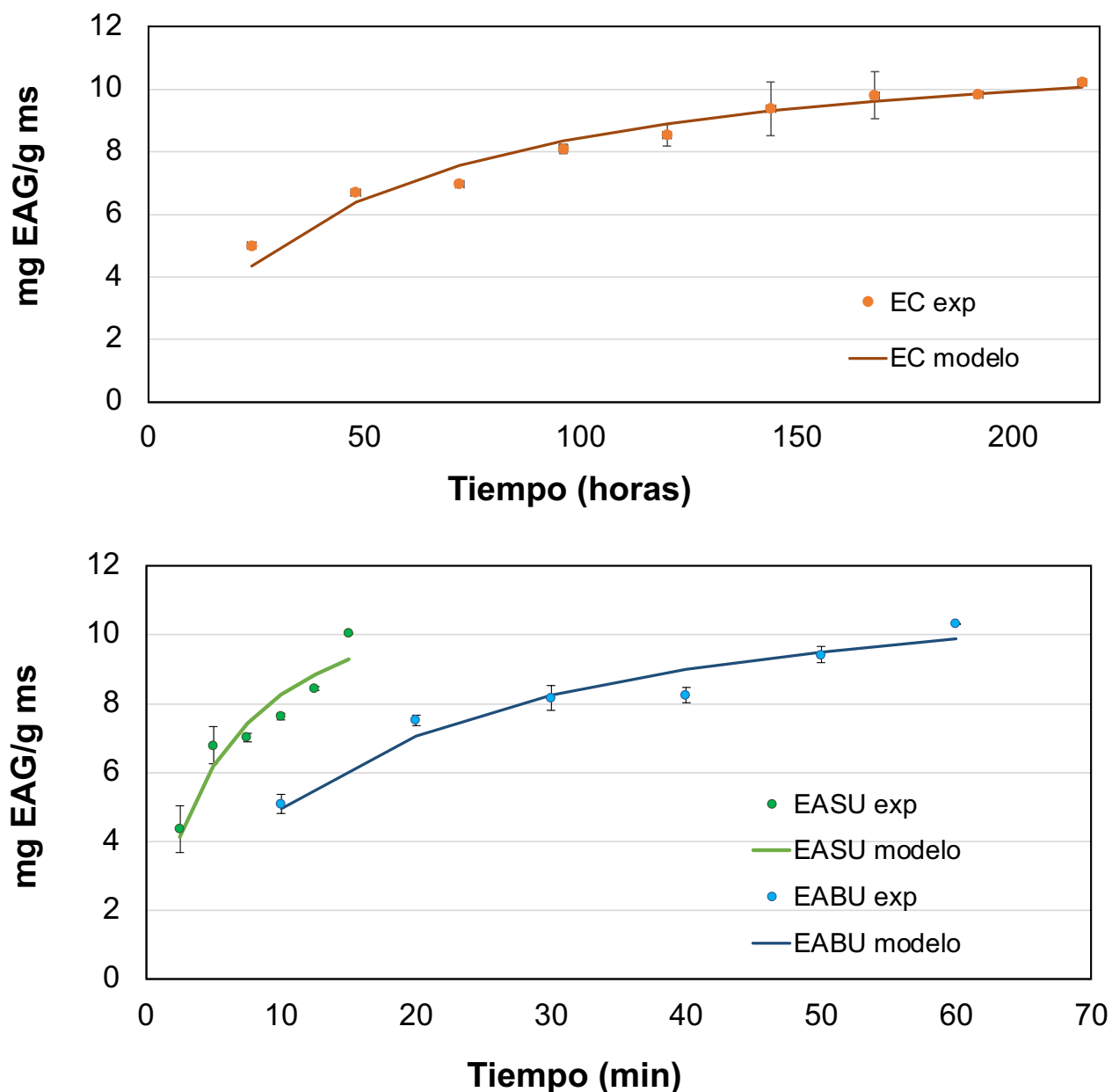
contraron rendimientos de extracción en un intervalo de 24.41 % a 36.36 %, lo cual refleja que, el uso de un solvente binario, agua-etanol, repercutió positivamente en el rendimiento de la extracción. Esto se debe a la concentración de compuestos polares y apolares presentes en el material vegetal, que tendrán mayor afinidad con un solvente u otro, lo que se verá reflejado en el resultado de materia seca (Wibisono y col., 2019).

Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante

La Figura 2 muestra que la concentración máxima de CFT alcanzada por los tres métodos de extracción fue superior a 10 mg EAG/g ms alcanzando el valor máximo de la extracción con EABU (10.32 mg EAG/g ms). Estas gráficas presentan la suma acumulada a través de los diferentes recambios utilizados. El método de extracción no afectó significativamente ($P \leq 0.05$) la cantidad máxima de fenoles extraídos, pero redujo los tiempos de proceso mediante ultrasonidos de potencia para alcanzar esta cifra. No obstante, se incrementó la cantidad de solvente utilizado, de 300 mL en las muestras tratadas por EC a 700 mL en los

procesos con ultrasonido. Cabe mencionar que al final del proceso los solventes fueron recuperados.

Respecto a la presencia de CFT en extractos etanólicos de *P. amboinicus*, algunos autores han reportado concentraciones cercanas a las de este estudio: Patel y col. (2010) encontraron una concentración máxima de 11.6 mg EAG/g ms, usando hojas de *P. amboinicus* en varios solventes (éter de petróleo, cloroformo, etanol y agua) mediante una maceración fría; Koztowska y col. (2021) obtuvieron un valor promedio de 14.677 mg EAG/g ms. En contraste, El-hawary y col. (2012) reportaron un valor promedio de 8.4 mg EAG/g ms, el cual es más bajo que los resultados de esta investigación. Otros autores documentaron concentraciones promedio de CFT más elevadas. Nguyen y col. (2020) obtuvieron 26.84 mg EAG/g ms, usando maceración con etanol como solvente; en tanto que, Shubha y Bhatt (2015) reportaron una concentración 11 veces más elevada (313 mg EAG/g ms), empleando hojas de *P. amboinicus*, en agua, con una relación 1:10, usando el proceso de extracción por hidrodestilación durante 1 h a 90 °C. Recientemente, Koztowska y col. (2021) do-



■ Figura 2. Cinéticas de compuestos fenólicos totales (CFT) obtenidos por el método Folin-Ciocalteu, de extractos de *P. amboinicus*, en función del método de extracción: EC, EABU y EASU. ● Valores medios de datos experimentales, — datos ajustados por el modelo.

Figure 2. Kinetics of total phenolic compounds (TPC) obtained by Folin-Ciocalteu method of *P. amboinicus* extracts, according to extraction method: CE, UBAE and UPAE. ● Mean values of experimental data, — data fitted by the model.

cumentaron una concentración promedio de 146.77 mg EAG/g, empleando hojas de *P. amboinicus* en etanol al 70 % como solvente, con una relación 1:15 durante 10 h a 45 °C, mediante decocción. Estas diferencias pueden estar atribuidas a los tipos y condiciones de ex-

tracción empleados por cada autor. Como se ha reportado en otros estudios (Patel y col., 2010; Wibisono y col., 2019), el agua ha mostrado una mayor afinidad con los compuestos fenólicos presentes en *P. amboinicus* y en particular, el vapor de agua, favorece transferen-

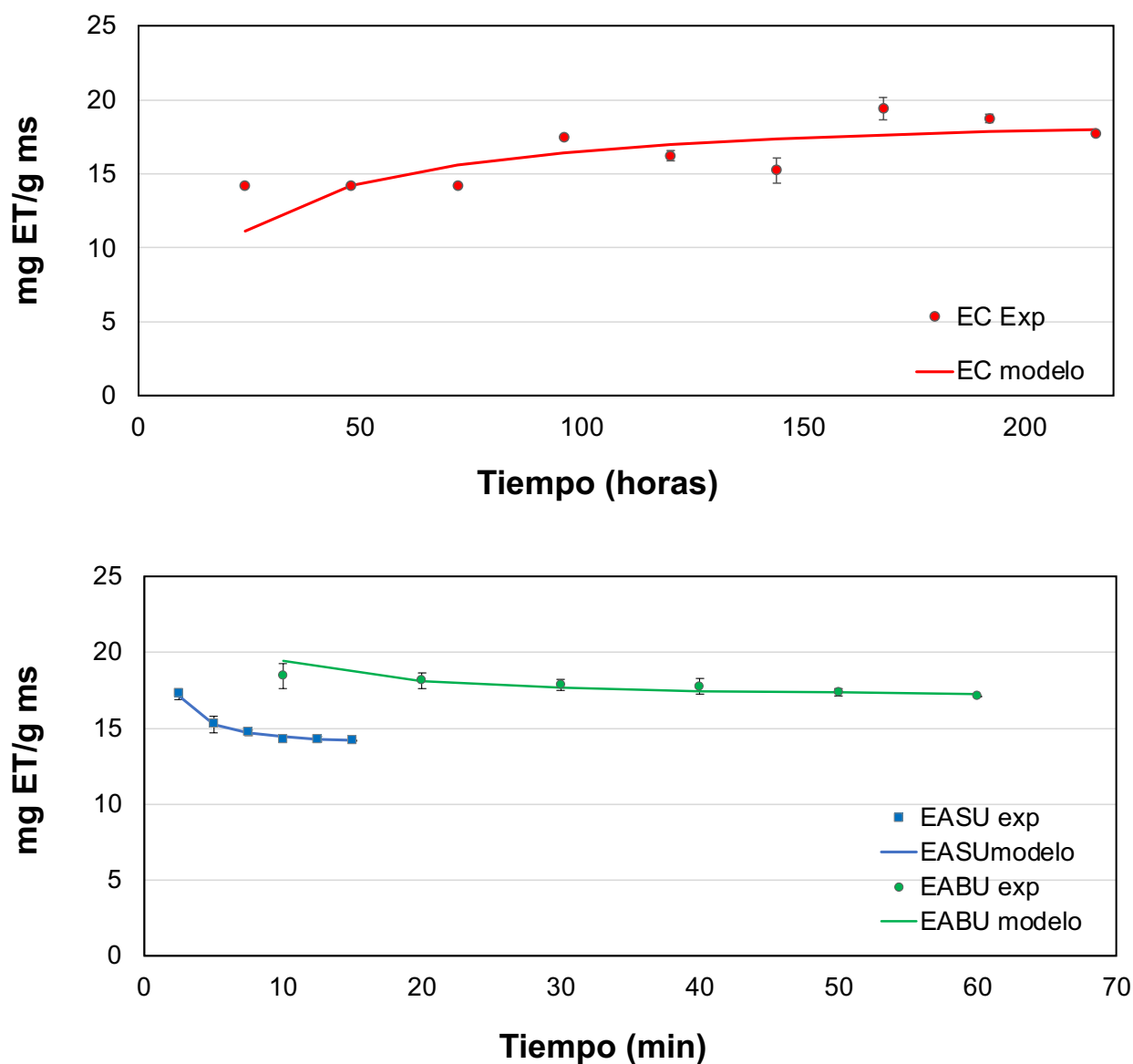
cia de masa y de solutos (Moreno y col., 2010). Otros factores que afectan el contenido de CFT (aumentando o disminuyendo su concentración) son las condiciones edafoclimáticas donde crece *P. amboinicus*, como la calidad de suelo, disponibilidad de agua y condiciones de estrés a las que fue sometida la planta y, finalmente, la capacidad de adaptación de la especie y su componente genético (Kumar y col., 2019).

Respecto a la AA de los extractos, el valor más alto ($P \leq 0.05$) obtenido fue en la EC, con una concentración de 19.43 ± 0.05 mg ET/g ms (Figura 3), sin embargo, el tiempo requerido para obtener esa cantidad de compuestos con AA fue de 168 h; por otra parte, usando ultrasonidos de potencia se alcanzaron los valores máximos de AA de 18.45 ± 0.42 mg ET/g ms y de 17.15 ± 0.23 mg ET/g ms, obtenidos por EABU (10 min) y EASU (2.5 min), respectivamente. Otros autores que han analizado la AA de extractos de *P. amboinicus* han sido Rivas-Pérez y col. (2017), quienes reportaron valores de AA entre 0.4 mg ET/g ms y 0.5 mg ET/g ms en extractos obtenidos mediante maceración pasiva; Samad y col. (2019) alcanzaron valores de 5.48 ± 0.77 mg ET/g ms mediante el uso de extracción asistida con ultrasonidos; y Koztowska y col. (2021) documentaron valores de 4.91 mg ET/g ms. Todos los valores de AA antes citados son muy bajos, en comparación a los resultados encontrados en el presente trabajo, lo que puede deberse a que en esta investigación se llevó a cabo un proceso de extracción exhaustiva con recambio del solvente, para los tres métodos de extracción, lo que favorece el fenómeno de transferencia de masa debido al incremento del gradiente de concentración y la baja saturación del solvente. Por ello, la relevancia de dicha práctica durante el proceso de extracción. Por otra parte, Muhamad y Mat (2019) reportaron valores de 19.55 mg ET/g ms, 27.41 mg ET/g ms y 48.08 mg ET/g ms para el proceso de extracción mediante EABU a 30 °C, 60 °C y 120 °C, respectivamente, en los extractos de hojas de *P. amboinicus*. Dicha diferencia demuestra que las condiciones de proceso, particularmente la

temperatura, puede favorecer la extracción de algunos compuestos con AA. El efecto positivo de la temperatura es debido a la mayor difusividad del solvente dentro de la matriz vegetal principalmente por variaciones de diferentes propiedades como viscosidad, tensión superficial y solubilidad del medio (Bhagya y Dash, 2020). Un dato interesante que se observó en los procesos de extracción asistida con ultrasonidos en la presente investigación, fue la disminución de la AA con respecto al tiempo (Figura 3); algunos autores como M'hiri y col. (2015), reportaron una disminución de la AA del extracto de cáscaras de naranja, atribuido a que el uso prolongado de ultrasonido pudo inducir la formación de radicales libres en el medio líquido, que conducen a reacciones sonoquímicas, provocando oxidación y degradación de los compuestos y a la formación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, debido al fenómeno de cavitación.

Análisis de almacenamiento de los extractos de *P. amboinicus*

El análisis de la vida útil de los extractos se estableció mediante la evaluación de la concentración de CFT (Figura 4) y la evolución de la AA (Figura 5) con respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. Los valores de CFT de los extractos obtenidos mediante EABU, EASU y EC (con valores iniciales de 3.7 mg EAG/g ms, 4.4 mg EAG/g ms y 7.2 mg EAG/g ms, respectivamente), se mantuvieron estables y sin cambios significativos ($P \geq 0.05$) hasta el final del almacenamiento durante 34 d. Los valores de AA también se mantuvieron estables ($P \geq 0.05$) en función del tiempo. La estabilidad de los CFT se ha observado en extractos líquidos de *Solanum tuberosum*, donde se mostró que los compuestos bioactivos se mantienen estables en condiciones de almacenamiento a 4 °C y en oscuridad (Ercoli y col., 2021). La estabilidad dependerá en principio de las condiciones del proceso, ya que el empleo de temperaturas superiores a la ambiental, durante la extracción, puede favorecer la inactivación enzimática, causantes de la degradación de metabolitos secundarios durante



■ Figura 3. Cinéticas de actividad antioxidante (AA) obtenida por el método DPPH, de extractos de *P. amboinicus*, en función del método de extracción: EC, EABU y EASU. ● Valores medios de datos experimentales, — datos ajustados por el modelo.

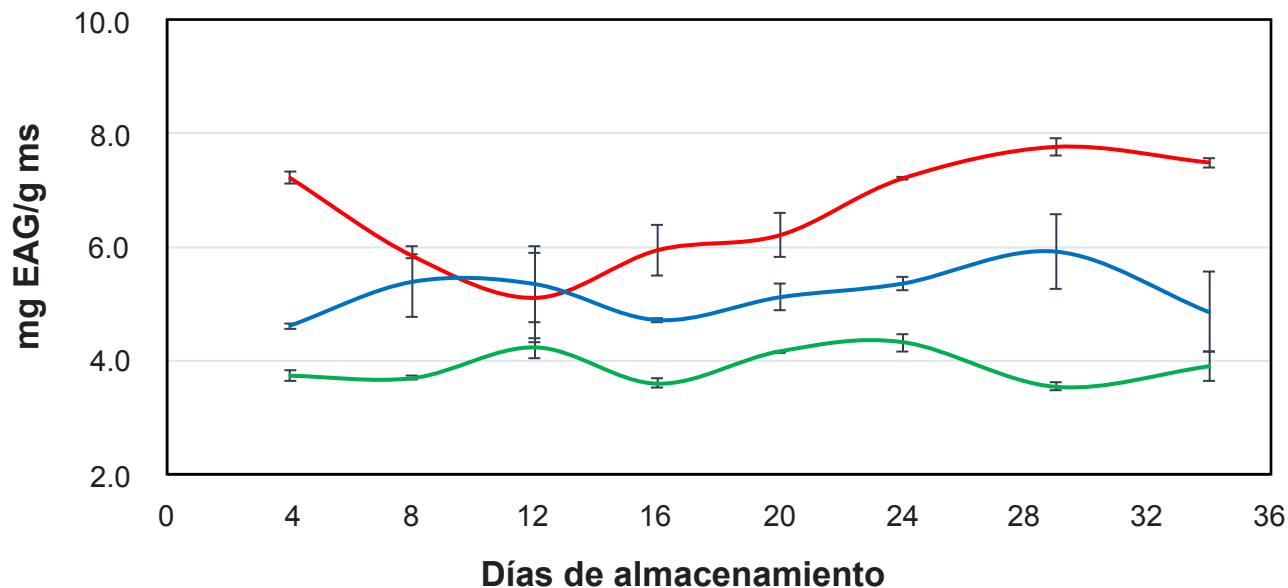
Figure 3. Kinetics of antioxidant activity (AA) obtained by the DPPH method, from *P. amboinicus* extracts, depending on the extraction method: CE, UBAE and UPAE. ● Mean values of experimental data, — data fitted by the model.

la fase de almacenamiento (Isah, 2019). Por otra parte, algunos autores han revelado que el uso de ultrasonidos contribuye a mejorar la estabilidad de almacenamiento de jugos, en función al contenido de metabolitos, con respecto a los tratamientos térmicos. Este comportamiento es atribuido probablemente a la eliminación del oxígeno ocluido del medio lí-

quido, manteniendo la concentración de metabolitos y algunas vitaminas contenidas en la fruta naturalmente (Ruiz-de-Anda y col., 2019).

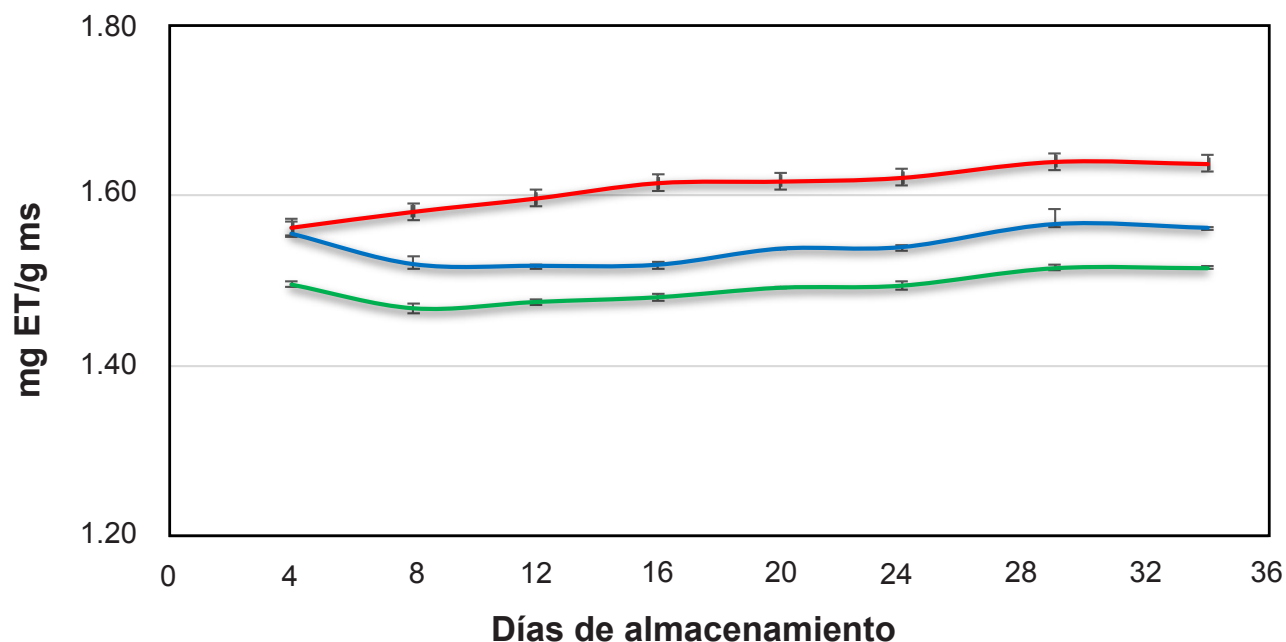
Análisis de los parámetros cinéticos del proceso de extracción

La velocidad de extracción de cada método fue evaluada a través de la concentración de



■ Figura 4. Evolución de compuestos fenólicos totales (CFT) obtenidos por el método Folin-Ciocalteu, de extractos de *P. amboinicus* almacenados a 4 °C, en función del método de extracción: EC (—), EABU (—) y EASU (—).

Figure 4. Evolution of total phenolic compounds (TPC) obtained by the Folin-Ciocalteu method, from *P. amboinicus* extracts stored at 4 °C, depending on the extraction method: CE (—), UBAE (—) and UPAE (—).



■ Figura 5. Evolución de la actividad antioxidante (AA) obtenida por el método DPPH, de extractos de *P. amboinicus* almacenados a 4 °C, en función del método de extracción: EC (—), EABU (—) y EASU (—).

Figure 5. Evolution of the antioxidant activity (AA) obtained by the DPPH method, of *P. amboinicus* extracts stored at 4 °C, depending on the extraction method: CE (—), UBAE (—) and UPAE (—).

saturación (Cs) y la constante de velocidad (k). La Tabla 1 muestra los resultados de cada parámetro cinético, de acuerdo a los métodos extractivos evaluados y los parámetros estadísticos (RMSE y R²) obtenidos para evaluar la bondad del ajuste del modelo cinético de pseudo-segundo orden, de las curvas experimentales de CFT y AA. En su interpretación es importante considerar que, los procesos asistidos con ultrasonido consideraron un mayor número de intercambios y volumen de solvente, adicional al efecto del método sónico.

Los valores de Cs y k, del CFT, en el extracto de *P. amboinicus*, fueron mayores para la extracción asistida con sonda de ultrasonidos (Tabla 1).

La concentración de saturación indica el momento en el cual el solvente ha llegado a alcanzar su capacidad máxima de extracción. La Cs más alta se alcanzó con la EASU (12.37 mg EAG/g ms), seguida de la EABU (12.34 mg EAG/g ms) y de la EC (12.04 mg EAG/g ms). En este mismo sentido, los valores de Cs, de la curva de AA (Tabla 1), oscilaron entre

13.717 mg ET/g ms para la EASU y 19.531 mg ET/g ms para EC. Estos valores son más altos comparados con los valores de Cs alcanzados para extracción de fitoquímicos reportados por Bhagya y col. (2020) que varían entre 9.35 mg EAG/g ms a 9.62 mg EAG/g ms durante el proceso de extracción con cáscara de pitahaya.

El efecto provocado por el uso de ultrasonidos, en el incremento de la Cs, durante la extracción ha sido ampliamente observado por otros autores. Pingret y col. (2012), evaluaron la extracción de compuestos fenólicos de la pulpa de manzana mediante ultrasonidos de potencia en un tanque piloto de extracción de 30 L, acoplado a una salida de ultrasonido cuádruple de 25 kHz y 200 W, misma potencia de la sonda de ultrasonidos usada en la presente investigación. Los resultados mostraron un rendimiento de extracción 15 % más alto que el obtenido por EC, lo cual fue atribuido a una mayor velocidad en los fenómenos de transporte debido a la ruptura de la pared celular de las células vegetales, con el consiguiente aumento de la penetración del disolvente.

■ **Tabla 1. Parámetros del modelo de pseudo segundo orden para las cinéticas de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de extractos obtenidos por EC, EABU y EASU.**

Table 1. Parameters of the pseudo second order model for the kinetics of total phenolic compounds and antioxidant activity of extracts obtained by CE, UBAE and UPAE.

Tipo de extracción	Compuestos fenólicos totales (CFT)			
	Cs g ms/mg EAG·min	k g ms/mg EAG·min	RMSE	R ²
EC	12.048	0.002	0.119	0.998
EABU	12.346	0.005	0.110	0.997
EASU	12.376	0.016	0.145	0.996
Actividad antioxidante (AA)				
	Cs g ms/mg ET·min	k g ms/mg ET·min	RMSE	R ²
EC	19.531	0.003	0.516	0.967
EABU	16.892	-0.045	0.120	0.995
EASU	13.717	-0.146	0.117	0.999

EC = Extracción convencional, EABU = Extracción asistida con baño de ultrasonidos, EASU = Extracción asistida con sonda de ultrasonidos.

La diferencia entre las Cs en ambos métodos ultrasónicos empleados en esta investigación, radica en que, el baño de ultrasonido funciona generalmente a una sola frecuencia entre 20 kHz o 40 kHz y la difusión de las ondas ultrasónicas son menos eficientes, porque se hace de forma indirecta en el medio de difusión. Por otro lado, en los sistemas de extracción por ultrasonido acoplado a una sonda, existe un contacto directo entre la muestra y el medio de difusión (solvente), lo cual le permite desarrollar una potencia de hasta 100 veces más que la proporcionada por el baño de ultrasonido (Corona-Jiménez y col., 2016; Bhagya y Dash, 2020).

Bendicho y col. (2012), lograron disminuir el tiempo de extracción de polifenoles de 4 h con la EC a 60 min con la EASU. Esto se debe al cambiar la fuerza impulsora en los fenómenos de transferencia: del gradiente de concentración cuando se pone en contacto el sólido con el líquido durante la EC, a la cavitación acústica provocada por el uso del ultrasonido. Durante el proceso se llevan a cabo una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del solvente, provocando la formación de burbujas, como consecuencia de los cambios de temperatura y de presión. Este tipo de “cavitación inestable” o transitoria, puede producir el cizallamiento de las burbujas que implosionan sobre la superficie de la matriz vegetal y fuertes turbulencias en la zona de cavitación, por lo cual, los parámetros cinéticos en la EASU son significativamente mayores con respecto a EC y EABU (Ruiz-de-Anda y col., 2019).

La constante de velocidad (k) obtenida en las cinéticas de CFT de extractos de hojas de orejón registró su valor más alto para la EASU (0.016 g ms/mg EAG·min). La constante k obtenida en las cinéticas de AA, fue positiva (k = 0.003) para la EC, mientras que para EABU y la EASU se obtuvieron valores de k negativos (- 0.045 ms/mg ET·min y - 0.146 g ms/mg ET·min, respectivamente). Los valores negativos de la constante de velocidad indicaron que la concentración del metabolito dis-

minuyó con el tiempo de exposición a los ultrasonidos. M'hiri y col. (2015) atribuyen este comportamiento a la relación de la cavitación con la formación de radicales libres y radicales oxhidrilos, es decir, la hidroxilación en las posiciones orto, meta y para de algunos metabolitos, lo que conlleva a un aumento en la concentración de CFT, pero una disminución en los valores de AA (Ruiz-de-Anda y col., 2019). La obtención de los parámetros cinéticos se considera una herramienta útil al momento de extrapolar las condiciones de proceso de extracción obtenidos en el laboratorio a condiciones de procesamiento en una escala industrial, permitiendo establecer el tiempo de procesamiento necesario para alcanzar el valor de la Cs. Los resultados obtenidos sugieren que la extracción de compuestos bioactivos mediante la aplicación de ultrasonidos permitiría, en procesos industriales, la reducción del tiempo de procesamiento sin afectar el rendimiento de CFT.

CONCLUSIONES

El uso de la sonda de ultrasonidos incrementó el rendimiento de compuestos extraíbles (materia seca), respecto a la extracción convencional, sin modificar la concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. El empleo de recambios de solvente utilizado para evitar la sobresaturación de solutos y facilitar la extracción de una mayor cantidad de compuestos redujo el tiempo de proceso. El modelo de pseudo-segundo orden empleado describió adecuadamente los datos experimentales, permitiendo obtener los valores cinéticos de concentración de saturación y de constante de velocidad. Los extractos se mantuvieron estables durante 34 d de almacenamiento a 4 °C y protegidos de la luz.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACYT por el financiamiento de la beca de Maestría en Ciencias para la estudiante de posgrado (Sheila Briget Malpica Acosta). Además, a la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA) del TECNM/Instituto Tecnológico de Veracruz y al Colegio de Postgraduados Campus Veracruz,

por todas las facilidades de infraestructura usadas en el desarrollo experimental del proyecto.

DECLARACIÓN DE INTERESES

Los autores declararon no tener conflicto de interés alguno.

REFERENCIAS

- Abubakar, A. R. and Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*. 12(1): 1-10.
- Acosta-Martínez, D. R., Morales-Zamora, M. y Villanueva-Ramos, G. (2021). Obtención de extracto fluido de *Plectranthus amboinicus* (orégano), utilizando el método de agitación mecánica. *Afinidad*. 78(592): 41-47.
- Agusti, B. A., Mansur, M. M., and Linde, A. M. (2014). Technical evaluation of antioxidant activity. *Medicinal Chemistry*. 4(7): 517-522.
- Avello, M. y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. (494): 161-172.
- Azwanida, N. A. (2015). Review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal and Aromatic Plants*. 4(3): 1-6.
- Bañuelos-Hernández, A. E., Azadniya, E., Ramírez, M. E., and Morlock, G. E. (2020). Bioprofiling of Mexican *Plectranthus amboinicus* (Lour.) essential oil via planar chromatography-effect-directed analysis combined with direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 43(9-10): 344-350.
- Bendicho, C., De-La-Calle, I., Pena, F., Costas, M., Cabaleiro, N., and Lavilla, I. (2012). Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*. 31: 50-60.
- Benítez, B., Sarria, R., Gallo, J., Pacheco, N., Sandoval, J. y Aristizabal, C. (2019). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 15(1): 31-40.
- Bhagya, G. V. S. and Dash, K. K. (2020). Ultrasound-assisted extraction of phytochemicals from dragon fruit peel: Optimization, kinetics and thermodynamic studies. *Ultrasonic Sonochemistry*. 68: 105180.
- Bhave, A. and Dasgupta, S. (2018). Effect of cooking on total phenol, total flavonoids and DPPH free radical scavenging potential of *Plectranthus amboinicus*. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 6(3): 82-84.
- Corona-Jiménez, E., Martínez-Navarrete, N., Ruiz-Espinosa, H. y Carranza-Concha, J. (2016). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chía (*Salvia hispánica* L.) y su actividad antioxidante. *Agrociencia*. 50(3): 403-412.
- El-hawary, S. S., El-sofanya, R. H., Abdel-Monema, A. R., Ashoura, R. S., and Sleem, A. A. (2012). Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng growing in Egypt (Lamiaceae). *Pharmacognosy Journal*. 4(32): 45-54.
- Ercoli, S., Cartes, J., Cornejo, P., Tereucán, G., Winterhalter, P., Contreras, B., and Ruiz, A. (2021). Stability of phenolic compounds, antioxidant activity and colour parameters of a coloured extract obtained from coloured-flesh potatoes. *LWT - Food Science and Technology*. 136: 110370.
- Galiano, D. (2019). *Determinación de la capacidad antioxidante de Thymus vulgaris*. España: Universidad de Jaén. 49 Pp.
- Gordo, D. (2018). Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 9(1): 81-104.
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*. 52(39).
- Koztowska, M., Scibisz, I., Przybyl, J. L., Ziarno, M., Zbikowska, A., and Majewska, E. (2021). Phenolic contents and antioxidant activity of extracts of selected fresh and dried herbal materials. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 71(3): 269-278.
- Kulbat-Warycha, K., Oracz, J., and Zyzelewicz, D. (2022). Bioactive properties of extracts from *Plectranthus barbatus* (*Coleus forskohlii*) roots received using various extraction methods. *Molecules*. 27(24): 8986.
- Kumar, S., Azam M., Venkatesan K., Anjly P., and Kulloli R. (2019). Morphological and Biochemical Variability in Aloe Germplasm in Hot Arid Region of India. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*.

25(2): 158-171.

Kumar, P., Sangam, and Kumar, N. (2020). *Plectranthus amboinicus*: A review on its pharmacological and pharmacognostical studies. *American Journal of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 10(2): 55-62.

López, S. M., Triana, J., Pérez, F. J. y Torres, M. E. (2005). *Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas*. España: Universidad de las Palmas de Gran Canaria. 52 Pp.

Matias, D., Nicolai, M., Fernandes, A. S., Saraiva, N., Almeida, J., Saraiva, L. and Rijo, P. (2019). Comparison study of different extracts of *Plectranthus madagascariensis*, *P. neochilus* and the rare *P. porcatius* (Lamiaceae): chemical characterization, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities. *Biomolecules*. 9(5): 179.

Menéndez, R. A. y Pavón, V. (1999). *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 4(3): 110-115.

M'hiri, N., Ioannou, I., Boudhrioua, N. M., and Ghoul, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioproducts Processing*. 96: 161-170.

Moreno, J., López, G. y Siche, R. (2010). Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). *Scientia Agropecuaria*. 1(2): 147-154.

Morton, J. F. (1992). Country horage (*Coleus amboinicus* Lour) A potent flavoring and medicinal plant. *Journal Herbs Spices Medicinal Plants*. 1(1-2): 77-90.

Muhamad, S. and Mat, A. S. F. Z. (2018). Effect of heating at 95°C on antioxidant activity and total phenolic content in extracts of *Plectranthus amboinicus* leaves. *International Journal of Recent Scientific Research*. 9(7): 28096-28099.

Muhamad, S. and Mat, A. S. F. Z. (2019). Boiling increase antioxidant activity, total phenolic content and total flavonoid content in *Plectranthus amboinicus* leaves. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 6(3): 024-030.

Nguyen, N. Q., Minh, L. V., Trieu, L. H., Bui, L. M., Lam, T. D., Hieu, V. Q., ..., and Trung, L. N. Y. (2020). Evaluation of total polyphenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Plectranthus amboinicus* leaves. Energy Security and Chemical Engineering Congress. *Conf. Series: Materials*

Science and Engineering. 736(6): 062017.

Nurafifah, F., Luqman, C. A., and Puteri, F. W. M. A. (2018). Drying of *Plectranthus amboinicus* (Lour) spreng leaves by using oven dryer. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*. 11(4): 239-244.

Palomino, G. L. R., García, P. C. M., Gil, G. J. H., Rojano, B. A. y Durango, R. D. L. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquía (Colombia). *Universidad de Antioquía Medellín, Colombia*. 16(3): 388-395.

Pashazadeh, H., Zannou, O., Galanakis, C. M., Aldawoud, T. M. S., Ibrahim, S. A., and Koca, I. (2021). Optimization of drying process for *Rosa pimpinellifolia* L. (black rose hips) based on bioactive compounds and modeling of drying process. *International Journal of Food Properties*. 24(1): 1367-1386.

Patel, R. D., Mahobia, N. K., Singh, M. P., Singh, A., Sheikh, N. W., Alam, G., and Singh, S. K. (2010). Antioxidant potential of leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. *Der Pharmacia Lettre*. 2(4): 240-245.

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Le-Bourvellec, C., Renard, C. M., and Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*. 111(1): 73-81.

Prasad, N., Basalingappa, K. M., Gopenath, T. S., Razvi, S. M., Murugesan, K., Ashock, G., and Divyashree, K. C. (2020). Nutritional significance of indian borage (*Plectranthus amboinicus*): A review. *Plant Archives*. 20(2): 3727-3730.

Ramírez-Reyes, T., Luna-Rodríguez, M., Noa-Carranza, J. C., Díaz-Fleischeer, F., Sánchez-Velásquez, L. R., and Flores-Estévez, N. (2015). Influence of season and organ on antibacterial activity of *Magnolia dealbata* Zucc. Against two phytopathogenic bacteria. *Chemistry and Ecology*. 31(1): 47-52.

Rivas-Pérez, B. N., Leal-Granadillo, I. A., Loaiza-Cuauro, L. F., Morillo, Y. E., and Colina-Chirinos, J. C. (2017). Phenolic compounds and antioxidant activity in extracts of four oregano spices. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad de Zulia*. 40(3): 134-142.

Ruiz-de-Anda, D., Ventura-Lara, M. G., Rodríguez-Hernández, G., and Ozuna, C. (2019). The impact of power ultrasound application on physicochemical, antioxidant, and microbiological properties of fresh

orange and celery juice blend. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 13: 3140-3148.

Sabra, A. S., Astatkie, T., Alataway, A., Mahmoud, A. A., Gendy, A. S. H., Said-Al-Ahl, H. A., and Tkachenko, K. G. (2018). Response of biomass development, essential oil, and composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. to irrigation frequency and harvest time. *Chemistry & Biodiversity*. 15(3): e1800005.

Samad, N. A., Abang-Zaidel, D. N., Salleh, E., Mohd-Yusof, A. H., Dailin, D. J., and Abang-Zaide, D. N. (2019). Optimization of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng extraction process using microwave-assisted technique. *Chemical Engineering Transactions*. 72: 397-402.

Silalahi, M. (2018). *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng sebagai bahan pangan dan obat serta bioaktivitasnya. *Journal Dinamika Pendidikan*. 11(2): 123-138.

Singh-Sengar, A., Rawson, A., Muthiah, M., and Kumar-Kalakandan, S. (2020). Comparison of different ultrasound assisted extraction techniques for pectin from tomato processing waste. *Ultrasonic Sonochemistry*. 61: 104812.

Shubha, J. R. and Bhatt, P. (2015). *Plectranthus amboinicus* leaves stimulate growth of probiotic *L. plantarum*: Evidence for ethnobotanical use in diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*. 166: 220-227.

Tungmunnithum, D., Garros, L., Drouet, S., Renouard, S., Lainé, E., and Hano, C. (2019). Green ultrasound assisted extraction of trans rosmarinic acid from *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. leaves. *Plants*. 8(3): 50.

Vasco, C., Ruales, J., and Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*. 111: 816-823.

Vilaplana, M. (2007). Antioxidantes presentes en los alimentos: vitaminas, minerales y suplementos. *Ámbito Farmacéutico Nutrición*. 26(10): 79-86.

Wibisono, K., Aisyah, S. I., Suhesti, S., and Nurcholli, W. (2019). Optimization of total flavonoids extraction and A-glucosidase inhibitory activity from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Leaves using the simplex-centroid design. *Molekul*. 14(2): 84-91.