

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

**PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS**



**Caracterización de la planta *Lippia dulcis* con potencial edulcorante para la
elaboración de alimentos funcionales.**

POR:

PAOLA JAZMIN ROBLERO RAMÍREZ

TESIS

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Caracterización de la planta *Lippia dulcis* con potencial edulcorante para la elaboración de alimentos funcionales.

POR:

PAOLA JAZMIN ROBLERO RAMÍREZ

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Dr. Antonio Aguilera Carbo

Asesor Principal

Aprobada por:



Dra. Xóchitl Ruelas Chacón

coasesor



MC. Juan López Trujillo

coasesor



MC. Carlos Alberto García Agustince

coasesor



Dr. José Duñez Alaniz

Coordinador de la División de Ciencia Animal



AGRADECIMIENTOS

Desde lo más profundo de mi corazón a **Dios** por la vida, y darme la oportunidad de estar en este mundo, por brindándome todas las oportunidades, por poner en mi camino a las personas correctas que me han sabido escuchar y brindado su amistad y cariño, por brindarme a una familia maravillosa e increíble y por darme las fuerzas para levantarme día a día.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** mi ALMA MATER, por abrirme sus puertas y brindarme todos los conocimientos para poder enfrentar el mundo laboral.

A todo el programa docente, tanto del departamento de Ingeniería en Alimentos, y profesores de otros departamentos que apoyan al Programa Docente de Ingeniería en Ciencia y Tecnología de Alimentos, por su paciencia, por su tiempo, por haber influido en mi formación y compartirme sus conocimientos.

A los profesores que hicieron posible este trabajo, a la QFB. María del Carmen Julia García, al Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó, al MC. Juan López Trujillo, a la Dra. Xóchitl Ruelas Chacón y al MC. Carlos Alberto García Agustince, estoy realmente agradecida por su apoyo, confianza y valioso tiempo invertido.

A Omar Valente Posada, Adilene Rodríguez, Adith García Alvarado, Ana Raya Villalpando, Mariana Hernández, Osiel Magnol Chávez, Fabiola Pérez, Julia Melisa, Daniel Roblero y Eduardo Rey, por ser mis compañeros y amigos, por su amor y apoyo en estos años.

A mis padres **Saúl ROBLERO Calderón y Elvira Ramírez Chávez** por todo su amor y apoyo incondicional en todo momento, agradezco sus regaños, pláticas y sobre todo sus consejos, además por los sacrificios que han realizado para que pudiera llevar a cabo cada uno de mis logros.

A mis hermanos **Manglio †, Roque y Amparo** por estar presentes en cada momento y por el amor que todos me brindan.

A mis cuñados **Daniel, Miriam y Gorety**, y a mis sobrinos **Eliza, Daniela y Emmanuel** por sus consejos y cariño incondicional.

A mi novio **Luis Alberto** por formar parte de mi vida, su apoyo incondicional y por amarme tanto como yo a él. Sin duda la vida es más bonita desde que te conocí Pichito.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	2
1.1 JUSTIFICACIÓN	5
1.2 OBJETIVOS	6
1.2.1 Objetivo General:	6
1.2.2 Objetivos Específicos:	6
II. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1 Antecedentes de edulcorante	8
2.2 Definición de edulcorantes	10
2.3 Generalidades de un edulcorante	10
2.4 Clasificación de edulcorantes	11
2.4.1 Edulcorantes naturales con valor nutritivo	12
2.4.2 Edulcorantes intensivos	13
2.4.3 Edulcorantes de carga o volumen	17
2.5 Generalidades de la <i>Lippia dulcis</i>	19
2.5.1 Historia	19
2.5.2 Descripción botánica	20
2.5.3 Hábitat y distribución geográfica	21
2.5.4 Importancia agrícola	21
2.5.5 Propiedades fisicoquímicas	22
2.5.6 Componentes conocidos de <i>Lippia dulcis</i>	23
2.5.7 Hernandulcina	24
2.5.8 Epi-hernandulcina	25
2.5.9 Toxicidad <i>L. dulcis</i>	25
2.5.10 Propiedades y usos	25
2.5.11 Diversas perspectivas sobre <i>Lippia dulcis</i>	26
2.6 Métodos de extracción de los compuestos activos	28
2.6.1 Extracción por medio de Solventes Orgánicos	28
2.6.2 Maceración	29
2.6.3 Lixiviación (percolación)	30
2.6.4 Extracción Soxhlet	30
2.6.5 Extracción por Solventes Acuosos	30

2.6.6 Extracción por Fluidos Supercríticos.....	31
2.6.7 Filtración	32
2.7 Purificación de compuestos activos	32
2.7.1 Combinación de membranas filtrantes.....	32
2.7.2 Adsorción con zeolitas modificadas	33
2.7.3 Resinas de Intercambio Iónico.....	33
2.8 Precipitación.....	34
2.9 Cristalización –Secado.....	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1 Obtención y tratamiento de la <i>Lippia dulcis</i>	36
3.2 Caracterización fisicoquímica de <i>Lippia dulcis</i> mediante un análisis proximal	36
3.3 Polifenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu).....	46
3.4 Taninos condensados (Método de HCl-Butanol).....	47
3.6 Cinética de extracción polifenólica y de taninos.....	49
3.6 Análisis estadístico.....	49
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	51
4.1 Análisis fisicoquímico	51
4.2 Azúcares totales a 0 y 24 horas	52
4.3 Azúcares reductores a 0 y 24 horas.....	54
4.4 Polifenoles hidrolizables.....	56
Muestras con previo lavado acuoso.....	57
4.5 Taninos condensados	61
V. CONCLUSIONES	67
VI. PERSPECTIVAS	69
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los edulcorantes.	3
Figura 2. Estructura química del hernandulcin.	4
Figura 3. Hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i>	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los disolventes	29
Tabla 2. Preparación de la curva patrón de sacarosa 1000 ppm para azúcares totales.....	45
Tabla 3. Preparación de la curva patrón de sacarosa 100 ppm para azúcares reductores	46
Tabla 4. Preparación de la curva patrón de ac. gálico 5000 ppm para polifenoles totales.....	47
Tabla 5. Preparación de la curva patrón de catequina 5000 ppm para taninos condensados	47
Tabla 6 Análisis estadístico de la cinética de extracción de los polifenoles hidrolizables	60
Tabla 7. Análisis estadístico de a cinética de extracción de taninos condensados	64

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Análisis fisicoquímico de <i>L. dulcis</i>	51
Gráfica 2. Contenido de azúcares totales a 0 horas.....	53
Gráfica 3. Contenido de azúcares totales a 24 horas.....	53
Gráfica 4. Contenido de azúcares reductoras a 0 horas.	54
Gráfica 5. Contenido de azúcares reductoras a 24 horas.	55
Grafica 6 Cuantificación de fenoles hidrolizables en muestras de <i>L. dulcis</i> a temperatura ambiente.	56
Grafica 7. cuantificación de fenoles hidrolizables en muestras de <i>L. dulcis</i> con un tratamiento de lavado con agua destilada.....	57
Gráfica 8. Fenoles hidrolizables en tiempos de 0 y 24 horas.	58

Grafica 9. Comportamiento de la extracción de polifenoles a 12 h de extracción usando solventes orgánicos y agua.	60
Grafica 10. Cuantificación de taninos condensados en muestras de <i>L. dulcis</i> sin lavado previo.	61
Grafica 11. cuantificación de taninos condensados en muestras de <i>L. dulcis</i> con previo tratamiento de lavado con agua destilada.	62
Grafica 12. Taninos condensados en <i>L. dulcis</i> a 0 y 24 horas.	63
Grafica 13. Cinética del comportamiento de la acumulación de taninos usando solventes orgánicos.	64

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de la planta *Lippia dulcis*, así mismo se determinó el rendimiento de extracción de polifenoles, cuantificación de azúcares totales, azúcares reductores, fenoles hidrolizables y taninos condensados. De acuerdo a reportes preliminares, esta planta tropical, posee alto contenido en azúcares y otros compuestos bioquímicos similares a la *Stevia rebusiana*, lo que la convierte en una planta con alto potencial edulcorante aplicable a la industria alimentaria.

Para el perfil bromatológico se empleó la técnica de la AOAC (2010) y para la cuantificación de fenoles y taninos condensados se emplearon la técnica de Fenol-Ciocalteu y HCl-Butanol respectivamente. Encontrándose que tiene un alto contenido en extracto libre de nitrógenos (52.4%), proteína (23%), fibra cruda (10.9%), grasa (2.3%). Así como valores promedio de materia seca total, humedad y cenizas similares a la reportada para *Stevia rebusiana*.

Para determinar el tiempo y el solvente con mayores rendimientos para polifenoles y taninos condensados, se llevó a cabo una cinética de extracción, en cuanto a tiempo de 0 a 12 h, monitoreando cada 2 h, utilizando 4 solventes (etanol, metanol, isopropanol y agua). En cuanto a la extracción de polifenoles se obtuvo que la acetona extrae mejor estos compuestos a las 6 h con 5.47 mg/g AG (ácido gálico), seguido del isopropanol con 4.79 mg/g AG a las 4 h, el etanol con 3.85 mg/ AG a las 12 h, metanol con 2.37 mg/g AG a 12 h y finalmente con agua a 60°C con 1.29 mg/g AG a 12 h. y para la extracción de taninos condensados que la acetona también es el solvente orgánico que extrae más compuestos con 32.53 equivalentes de catequina / g (mg/g) a las 10 h, seguido del etanol y metanol con 29.50 mg/g a las 8 h, el isopropanol y agua a 60°C con 28.06 mg/g y 20.98 mg/g respectivamente. El agua a temperatura ambiente extrajo 15.25 mg/g al tiempo 8 h.

La concentración de azúcares totales fue de bajo rendimiento usando agua a 0 horas (7.83 mg/g) en tanto con acetona se triplicó el contenido (20.11 mg/g). En tanto que al tiempo 24 h de tratamiento de arrastre con este mismo solvente aumentó la concentración hasta 43.08 mg/g. Para el caso de azúcares reductores el solvente orgánico logró una concentración de 53.10 mg/g y 67.30 mg/g a 0 h y 24 h respectivamente.

Palabras clave: Edulcorantes, *Lippia dulcis*, bromatológico, solventes orgánicos, extracción, azúcares totales, azúcares reductores, polifenoles, taninos.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.INTRODUCCIÓN

México está cambiando, la estructura actual del consumo de azúcar y otros edulcorantes como los jarabes de maíz de alta fructosa y los edulcorantes bajos en calorías es diferente a la que había hace tres décadas, cuando el azúcar prácticamente no tenía competencia. Ahora los jarabes de maíz y los edulcorantes de alta intensidad, como los que contienen aspartame, están desplazando azúcar en un segmento importante de mercado. El mercado de los edulcorantes en México está experimentando cambios estructurales motivados por varios aspectos, entre los que se destaca el cambio en los hábitos de consumo de la población por razones de salud. La incorporación de los edulcorantes diferentes del azúcar está ganando espacio en las preferencias del consumidor industrial y entre las personas que consumen productos bajos en calorías (García, 2011).

El término edulcorante, hace referencia a aquel aditivo alimentario que es capaz de mimetizar el efecto dulce del azúcar y que, habitualmente, aporta menor energía. Algunos de ellos son extractos naturales mientras que otros son sintéticos, en este último caso se denominan edulcorantes artificiales. El empleo de edulcorantes de bajas calorías como sustitutos de todo o parte del contenido en azúcares de comidas y bebidas, ha tenido su máxima expansión en los últimos 35 años (Gómez *et al.*, 2013).

El nuevo patrón de consumo, caracterizado por el consumo elevado de alimentos procesados con modificaciones que afectan al contenido en grasa y azúcares se aleja notablemente del patrón alimentario tradicional a nivel mundial. En este sentido, los alimentos edulcorados muestran una expansión exponencial tanto en los de aporte energético pleno como en aquellos supuestamente reducidos en energía. La estimación del consumo de edulcorantes es compleja, pero parece que en EE.UU. existen más de 6,000 productos pre-elaborados que los contienen, mayoritariamente bebidas refrescantes. En cuanto a su clasificación global, ante la gran variedad de tipos existentes (Fig. 1), los edulcorantes se pueden agrupar en función de su contenido calórico (calóricos o acalóricos), según su origen (natural o artificial) o incluso según su estructura química (Gómez *et al.*, 2013).

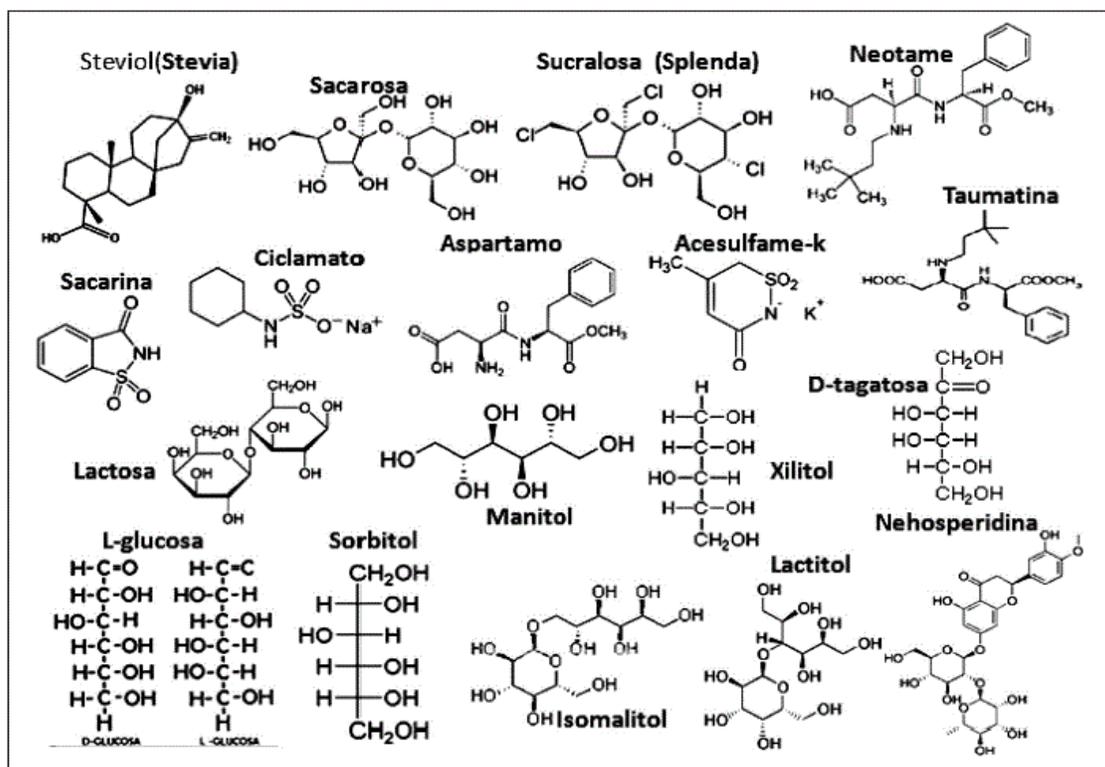


Figura 1. Estructura química de los edulcorantes.

Fuente: García-Almeida et al., 2013.

En la clasificación en base al aporte calórico permite evidenciar las características del mismo y define el uso que la industria alimentaria les confiere. Los edulcorantes no nutritivos o no calóricos se han posicionado en el centro de atención de la industria de aditivos para alimentos y suplementos dietéticos, entre ellos se encuentran: sacarina, ciclamato, aspartame, acesulfame-K, sucralosa, neotame y estevia, este último es el edulcorante de origen natural más utilizado a nivel comercial (Reyes, 2015).

En la actualidad la procedencia de un edulcorante es un factor determinante en la incidencia de la aceptación de los consumidores, ya ha habido una tendencia muy marcada hacia los productos de origen natural. Tomando en cuenta estas clasificaciones, la stevia, ha sido una excelente opción como edulcorante “natural” y no calórico, es considerado un producto nutracéutico y funcional, puesto que se

encuentra en la forma más biodisponible y generalmente pueden ser administrados a largo plazo, sin riesgos de efectos colaterales (Pérez, 2006).

El género *Lippia* (Verbenaceae) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños. Además, las hojas de la mayoría de estas especies se utilizan como condimento para preparaciones alimenticias. Con respecto a estos propósitos culinarios, es necesario resaltar la importancia de la especie *Lippia dulcis* Trevir, una planta dulce, cuyo componente principal y no tóxico fue aislado por Kinghorn: (+) – hernandulcina (Fig. 2), mostró que era 1000 veces más dulce que la sacarosa, esto abre camino a una nueva opción natural de obtener un edulcorante no calórico para ser usado tanto como uso doméstico como en la elaboración de productos industriales (Pascual *et al.*, 2001).

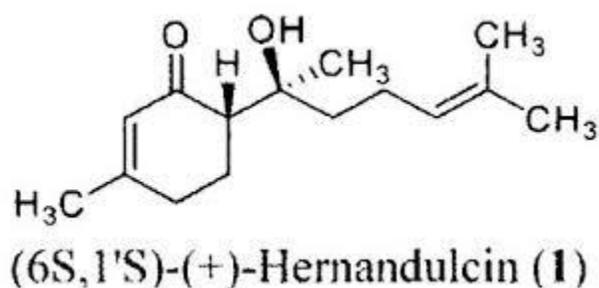


Figura 2. Estructura química del hernandulcina.

Fuente: Pérez *et al.*, 2012.

1.1 JUSTIFICACIÓN

Los edulcorantes artificiales en alimentos y bebidas han generado grandes problemas de salud a nivel mundial, debido a que son muy altos en contenido calórico. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el consumo a largo plazo de estos edulcorantes aumenta el riesgo de padecer enfermedades como obesidad, diabetes, presión arterial alta y demás problemas relacionados con el corazón, por lo que es necesario buscar alternativas que mitiguen esta problemática. En los últimos años se ha ido generando nuevas alternativas de alimentación que promueven estilos de vidas saludables como es el caso de los llamados alimentos funcionales. Bajo este nuevo modelo de alimentación sana y como contrapeso a lo mencionado anteriormente es necesario buscar nuevas fuentes edulcorantes de origen naturales, que proporcionen el sabor dulce del azúcar, pero con los niveles calóricos más bajos.

Por lo anterior, la presente tesis se centra en realizar un análisis proximal y una caracterización/evaluación del extracto acuoso y con solventes orgánicos de *Lippia dulcis*, un vegetal con amplio potencial edulcorante y del que se tiene pocas investigaciones al respecto.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General:

- Caracterizar fisicoquímicamente la planta y evaluar extracciones con solventes de *Lippia dulcis* con potencial como sustituyente de edulcorante.

1.2.2 Objetivos Específicos:

- Analizar fisicoquímicamente hojas, flores y tallos deshidratados de *Lippia dulcis*.
- Determinar el contenido de taninos condensados y fenoles hidrolizables mediante una cinética de extracción acuosa y con cuatro tipos de solventes orgánicos.
- Determinar el contenido de Azúcares reductores y Totales en la muestra vegetal.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA



II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes de edulcorante

Desde tiempos ancestrales la humanidad ha tenido una marcada preferencia hacia los alimentos dulces. A fines del siglo XVII una nueva idea se apoderó de la comunidad médica. Se decía que el azúcar era responsable de provocar muchas enfermedades y ante esta situación surgió la necesidad de buscar un aditivo que pudiera sustituir el azúcar, proporcionando las mismas cualidades y sensaciones que esta producía. Es así como nacen los edulcorantes; aditivos alimentarios que son capaces de simular la presencia del azúcar al agregarlos a los alimentos. Los edulcorantes artificiales han ganado espacio como herramientas de la dieta ya que proporcionan el sabor dulce del azúcar, pero sin el aporte calórico de esta, por lo tanto, pueden ayudar a bajar de peso y a la adhesión de una dieta baja en calorías. Los edulcorantes utilizados en la industria alimentaria están divididos en 2 grandes grupos: Edulcorantes naturales o nutritivos y edulcorantes artificiales o no nutritivos (Duran *et al.*, 2011).

Desde la época precolombina, los paraguayos usan una planta llamada “hierba dulce” (*Stevia rebaudiana*) para endulzar el mate y otras infusiones. Sus hojas son 10 a 15 veces más dulces que el azúcar común. En 1931 los franceses Bridel y Lavieille aislaron los responsables del sabor dulce, que llamaron esteviósidos y rebaudiósidos y son unas 300 veces más dulces que el azúcar. Tanto las hojas secas como sus extractos y los compuestos aislados de ellos, se emplean como edulcorantes. En 1991, un controvertido e injustificado fallo de la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés) prohibió su venta en USA. En 1995 se revirtió el fallo y desde entonces se permite su comercialización (Solano, 2018).

La sacarina, el más antiguo de los edulcorantes sintéticos, es unas 300 veces más dulce que la sacarosa, aunque deja un resabio metálico. Es muy estable al calor y se usa su sal sódica por su mayor solubilidad en agua. Fue descubierta en forma

casual en 1879 y calificada por la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos) como sustancia GRAS (del inglés “Generalmente reconocido como seguro”). En 1977, luego de varias acusaciones (de producir cáncer en ratones) y de exhaustivos estudios, la Food and Drug Administration (FDA), había decidido prohibir su uso, pero la opinión pública, entre ellas la de asociaciones de diabéticos, solicitaron una moratoria porque era el único edulcorante no calórico en el mercado (León, 2011).

Los edulcorantes naturales están siendo aceptados por la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos), FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), OMS (Organización Mundial de la Salud), Codex Alimentarius, etc. Lo cual está dando tarjeta verde para que algunas industrias y países empiecen a utilizar este grupo de aditivos, un ejemplo de esto es que el edulcorante de mesa Truvia (esteviósido), es el segundo mayor sustituto de azúcar en Estados Unidos por detrás de Splenda (sucralosa), los polioles no son cariogénicos en comparación con la sacarosa, además de dar frescura al producto. Esto da una idea de que tan lejos pueden llegar los edulcorantes naturales en el mercado alimenticio, debido al riesgo que puede llegar a generar los edulcorantes artificiales y al incremento en el costo de la sacarosa en los últimos años (Sánchez, 2014).

Las nuevas recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los asesores nutricionales oficiales del Reino Unido indican que solo el 5% de su ingesta diaria de calorías debe consistir en azúcares añadidos o “gratuitos”. Esto equivale a aproximadamente 30 g. Los niños deben tener menos: no más de 19 g al día para niños de 4 a 6 años y no más de 24 g para niños de 7 a 10 años (Pichardo, 2019).

Una alta ingesta de azúcar en sus diferentes formas conlleva al desarrollo de enfermedades relacionadas con la obesidad. Es así que el uso de edulcorantes en lugar de azúcar está justificado para la elaboración de productos alimenticios de reducido valor energético, cariogénicos y alimentos sin azúcares añadidos, con el

fin de prolongar el período de conservación y elaborar productos dietéticos (Pichardo, 2019).

2.2 Definición de edulcorantes

Se le llama edulcorante a cualquier sustancia, natural o artificial, adicionadas cuya finalidad es aportar sabor dulce. El edulcorante más conocido es el azúcar común llamado también azúcar blanco, azúcar refinado o sacarosa (Herradón, 2011).

Según establece el Real Decreto 2106/1996 de 20 de septiembre, se entiende por *edulcorantes*: “aquellos aditivos utilizados para dar sabor dulce a los productos alimenticios y/o que son utilizados por sus propiedades edulcorantes” (Decreto 2106/1996, 1996).

El CAE (Código Alimentario Español) indica que los edulcorantes son “sustancias sápidas sintéticas, que, sin tener cualidades nutritivas, poseen un poder edulcorante superior al de la caña de azúcar, remolacha o cualquier hidrato de carbono al que tratan de “sustituir”. A su vez, se entiende por *poder edulcorante* “los gramos de sacarosa que hay que disolver en agua para obtener un líquido con igual sabor que la disolución de 1 gramo de edulcorante en el mismo volumen (Navarro, 2012).

Se define como edulcorante a la sustancia que produce la sensación de dulzura, los hay de origen natural y sintético (NOM-043-SSA2-2012).

El termino edulcorante se utiliza principalmente para los edulcorantes de alta intensidad o para cualquier sustancia distinta de los carbohidratos cuya principal característica sensorial es el dulzor, pero a veces también para describir colectivamente a los edulcorantes nutritivos y no nutritivos (FAO, 1999).

2.3 Generalidades de un edulcorante

Los edulcorantes no calóricos, artificiales o naturales, son en este momento una de las áreas más dinámicas dentro del campo de los aditivos alimentarios, por la gran

expansión que está experimentando actualmente el mercado de las bebidas bajas en calorías. Para que un edulcorante natural o artificial sea utilizable por la industria alimentaria, además de ser inocuo, tiene que cumplir otros requisitos: el sabor dulce debe percibirse rápidamente, y desaparecer también rápidamente, y tiene que ser lo más parecido posible al del azúcar común, sin regustos. También tiene que resistir las condiciones del alimento en el que se va a utilizar, así como los tratamientos a los que se vaya a someter (Velásquez, 2006).

El uso de edulcorantes artificiales ha sido objeto de múltiples polémicas por lo que respecta a su seguridad a largo plazo. La forma más adecuada de enfocar esta polémica es desde la perspectiva del balance riesgo-beneficio. El consumidor tiene que decidir si asume en algunos casos un riesgo muy remoto como contrapartida de las ventajas que le reporta el uso de determinados productos, ventajas que en este caso serían la reducción de las calorías ingeridas sin renunciar a determinados alimentos o sabores. También deben tenerse en cuenta los efectos beneficiosos sobre el organismo de la limitación de la ingesta calórica, especialmente en la prevención de los trastornos cardiovasculares y de ciertos procesos tumorales. Aunque el efecto preventivo se produce fundamentalmente con la reducción del contenido de la grasa de la dieta, también puede contribuir la reducción del contenido energético global, y en este caso los edulcorantes artificiales serían una cierta ayuda. Por supuesto, son de gran interés para el mantenimiento de la calidad de vida de aquellas personas que por razones médicas tienen que controlar su ingestión de azúcares (Calvo, 2014).

Un edulcorante es un compuesto capaz de producir un sabor dulce en la boca dada su estereoquímica y facilidad para formar puentes de hidrógeno, así como la hidrofobia de sus moléculas para provocar un estímulo entre este y el sitio receptor de la boca (Valdés *et al.*, 2009).

2.4 Clasificación de edulcorantes

Los edulcorantes se dividen en:

- a) Los azúcares alimenticios, *de origen natural*, con valor nutritivo y poder edulcorante inferior o vecino a la sacarosa. Incluyen la sacarosa, fructosa, glucosa, isoglucosa, etc.
- b) *Edulcorantes de carga o volumen*: Los polioles, polialcoholes o azúcares-alcohol, de origen natural y/o semi-sintético, con valor nutritivo y bajo potencial edulcorante, inferior a la sacarosa. Incluyen el manitol, lactitol, isomaltitol, xilitol, sorbitol y maltitol (Navarro, 2012).

2.4.1 Edulcorantes naturales con valor nutritivo

Los edulcorantes nutritivos proporcionan energía, es decir, calorías. Entre ellos encontramos a la sacarosa (que no es otra cosa que el azúcar común), la fructuosa (el azúcar de las frutas, 1.5 veces más dulce que el azúcar, por lo cual, si bien tiene el mismo valor calórico que ésta, se requieren cantidades menores para lograr el mismo grado de dulzor), la miel de abeja, el jarabe de maíz, la melaza, el piloncillo, la dextrosa y la maltosa, entre otros más (Santamaria *et al.*, 2015).

Los edulcorantes nutritivos proveen calorías o energía a la dieta a razón de unas cuatro calorías por gramo, de manera similar a los carbohidratos o las proteínas, es por eso que deben usarse de forma moderada y utilizando las mismas equivalencias marcadas para hidratos de carbono (Requejo *et al.*, 2006.)

Los edulcorantes calóricos más usados en la fabricación de bebidas refrescantes y alimentos son los siguientes:

- a) **Sacarosa**: disacárido formado por glucosa y fructosa, procedente de la remolacha y de la caña de azúcar.
- b) **Fructosa**: Monosacárido presente en frutas como tal o unido a la glucosa en el caso de la sacarosa. Presenta un poder edulcorante 1,3 veces mayor que el de la sacarosa (azúcar).
- c) **Lactosa**: azúcar de la leche. Disacárido formado por glucosa y galactosa con un poder edulcorante menor que el de los anteriores.

- d) Glucosa:** Monosacárido que puede proceder de la lactosa, la sacarosa o la maltosa. Normalmente, procede de jarabes de glucosa a partir de hidrólisis del almidón. Disponibles con un grado de dextrosa equivalente que oscila entre 42 y 95. Cuanto más alto es el valor, más alto es el poder edulcorante.
- e) Jarabes ricos en fructosa procedentes de cereales:** Principalmente del maíz. Su poder edulcorante es muy parecido al de la sacarosa, dado que su composición en cuanto a porcentaje de glucosa y fructosa es similar. Se los considera ricos en fructosa debido a la conversión parcial de glucosa en frutos.
- f) Maltodextrinas:** Producidas por a hidrólisis parcial del almidón. Tienen un grado de dextrosa equivalente entre 15 y 30, con un alto peso molecular y poco poder edulcorante (Gil, 2010).

2.4.2 Edulcorantes intensivos

Los hay tanto de origen natural como sintético, que poseen un elevado poder edulcorante. Deben superar rigurosos controles hasta el momento que se acepte su inclusión en las listas positivas de determinados alimentos. Los factores a los que corresponden la inseguridad de estas sustancias corresponden a que son moléculas extrañas al organismo o por el contrario tan similares que interfieran en sus procesos de obtención (Rodríguez et al., 2008).

Algunos poseen naturaleza proteica por lo que no presentan problemas toxicológicos. Su alto poder edulcorante implica que se utilice en muy pequeñas concentraciones, tales que su valor calórico es insignificante. La misma naturaleza proteica, por su complejidad, puede traer consigo una inestabilidad frente a los factores del medio en el que se encuentran afectando su sitio activo y provocando la pérdida del poder edulcorante (Rodríguez et al., 2008).

Destacan en este grupo el aspartamo, la sacarina y el ácido ciclámico y sus sales. Se caracterizan por no aportar masa ni volumen al alimento, si no por su intenso sabor dulce y su nulo aporte calórico. Los de primera generación (sacarina y

ciclamato) han sido en parte desplazados por los de segunda generación (aspartamo y acesulfamo K) debido a que su sabor es más parecido al de la sacarosa y no tienen regustos desagradables (Esparza, 1999).

Entre los edulcorantes no nutritivos de mayor consumo podemos nombrar a:

- a) **Asesulfame-K:** Es de 100 a 200 veces más dulce que el azúcar y fue descubierto en 1967. Tiene un sabor dulce limpio que desaparece rápidamente sin dejar resabio. No se metaboliza y se elimina rápidamente a través de la orina, sin acumularse en el organismo y sin alteración ni cambios a su paso por los riñones por lo que no provee energía. Su IDA (Ingesta diaria admitida) es de 9 mg/kg. Cuando se mezcla con aspartamo, la combinación tiene un sabor dulce muy parecido al de la sacarosa (Fossas, 2012).
- b) **Taumatina:** Es una proteína edulcorante baja en calorías y modificadora del sabor. Se obtiene por extracción acuosa (pH 2.5-4.0) de los arilos del fruto de la cepa natural de *Thaumatococcus daniellii* (katemfe) de África Occidental y consiste, básicamente en las proteínas taumatina I y taumatina II junto con cantidades menores de constituyentes vegetales derivados del material fuente. Es un polvo muy soluble en agua, inodoro de color crema y sabor dulce intenso 2000-3000 veces más dulce que la sacarosa. Es metabolizada por el organismo como cualquier otra proteína dietaria. La taumatina está aprobada por JECFA y SCF (Barros, 2009).
- c) **Neohesperidina DC:** Descubierta en 1963 y permitida en Europa desde 1994, su capacidad de endulzado fluctúa, según la dosis del producto, entre las 300 y las 2,000 veces más que el azúcar. Tiene un retrogusto mentolado. Su síntesis química se basa en la hidrogenación de la neohesperidina (flavonoide procedente de los cítricos que se extraen con resinas artificiales durante el proceso de fabricación de zumos). Debido a que la neohesperidina es metabolizada por la flora intestinal, que se diferencia de una persona a otra, los experimentos llevados a cabo con ratas y los que se basa su supuesta inocuidad tienen un valor muy limitado (Núñez *et al.*, 2013).

- d) Sacarina:** su descubrimiento fue en 1879, aunque empezó a ser utilizada como edulcorante a comienzos del siglo pasado. Su utilización no ha estado exenta de polémicas y períodos de prohibiciones. Su poder edulcorante es entre 300 y 400 veces superior al de la sacarosa. No se metaboliza y se excreta inalterada. La molécula de sacarina tiene un grupo bencénico y pierde su sabor dulce si reemplazamos el hidrógeno unido al nitrógeno por un grupo CH₃, por lo que la unidad sápidica está ligada al nitrógeno. La forma ácida no es muy soluble en agua, por lo que se emplea como sal sódica o cálcica, más solubles. Su IDA es de 2.4 mg/kg (Requena *et al.*, 2008).
- e) Ciclamato de Sodio:** en 1937 fue descubierto en Estados Unidos y utilizable como edulcorante desde 1950. Es la sal sódica y cálcica del ácido ciclámico presenta una elevada solubilidad en agua. Es 25 a 30 veces más dulce que el azúcar. Es el edulcorante menos intenso por lo que para aumentar su poder endulzante se mezcla con sacarina sódica y así se logra un producto más dulce. El Ciclamato de Sodio puede ser utilizado como un sustituto de azúcar en edulcorantes de mesa (pastillas, polvo o en forma líquida), en bebidas soft (suaves), aderezos, tortas, galletitas, pan, helado, etc. También se utiliza en productos farmacéuticos o de cuidado personal (pasta de dientes, enjuague bucal) como agente de sabor. Su IDA es de 11 mg/kg (Fossas, 2012).
- f) Aspartamo:** Fue descubierto en 1965 y aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de los Estados Unidos en 1981 para su uso en forma de polvo y en endulzantes de mesa de bajas calorías y, al poco tiempo, en 1983, se lo aprobó para su uso en bebidas carbonatadas. En 1996 se aprobó su uso en todos los alimentos y bebidas, incluso en productos tales como jarabes, aderezos para ensalada y ciertas botanas para los cuales no se había otorgado la aprobación aún. En la actualidad, es el edulcorante intensivo más importante a nivel mundial. En su Composición entran dos aminoácidos, el ácido aspártico y la fenilalanina. Si bien por ello tiene un valor energético igual al de los glúcidos, es decir, cuatro calorías por gramo, en la práctica su aporte energético es despreciable debido a las pequeñas

cantidades que se ingieren. Ello está en directa relación con su elevado poder edulcorante, de 100 a 200 veces superior al de la sacarosa. Su IDA es de 40 mg/kg (García *et al.*, 2004).

g) Sucralosa: La sucralosa es un edulcorante no nutritivo descubierto en 1976, comercializado como Splenda, es 600 veces más dulce que la sacarosa, por lo que sólo 1 mg es equivalente a una cucharadita de azúcar. Se obtiene a partir de la glucosa, añadiendo átomos de cloro (4 átomos). Se ha convertido en el endulzante artificial más popular del mundo. Es muy compatible con el horneado y no cambia el sabor ni la textura al cocinarse y no se digiere ni se absorbe por nuestros cuerpos. En 1998, la FDA otorgó la aprobación del uso de la sucralosa en 15 categorías de alimentos y bebidas. Finalmente, en 1999, amplió su utilización, denominándola un edulcorante de aplicación general (Biesalski *et al.*, 2007).

h) Estevia: Stevia rebudiada es una planta selvática subtropical del alto Paraná, nativa del noroeste de la provincia de Misiones, en Paraguay. La planta de stevia produce en las hojas un edulcorante natural, cuyo poder es 300 veces mayor que la sacarosa. No contiene calorías y además, las hojas pueden utilizarse en su estado natural, gracias a su gran poder edulcorante, y sólo son necesarias pequeñas cantidades del producto. Es generalmente reconocida como segura por el FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos) como una comida aditiva y como edulcorante para la mesa. Cuando algo es generalmente reconocido como seguro por el FDA, (Administración de Medicamentos y Alimentos) significa que expertos han acordado que esto es algo seguro para el consumo por el público en cantidades apropiadas (Durán *et al.*, 2012).

Aunque el esteviósido es una sustancia natural, no se acepta como edulcorante en los Estados Unidos ni en Europa y tampoco es aceptada por la OMS. En los Estados Unidos esta sustancia se vende como suplemento dietético ((Biesalski *et al.*, 2007).

Desde 2012 ha iniciado su despegue en Europa, en donde ha estado prohibido desde 1995, como en Estados Unidos, por sospechas de un efecto

cancerígeno, basadas en estudios antiguos, realizados con una especie de ratón predispuesta al cáncer y apoyados por la industria del azúcar. Después de 17 años, los estudios que demostraban la inocuidad del esteviósido se impusieron, ya que no altera el material genético ni es cancerígeno, y su IDA (ingesta diaria admitida) es de 4 mg/kg lo que hace la sobredosis prácticamente imposible (Núñez *et al.*, 2013).

2.4.3 Edulcorantes de carga o volumen

Los azúcares alcohólicos, polioles o polialcoholes son los denominados edulcorantes de carga. Se fabrican a partir del azúcar al que se realizan determinadas modificaciones químicas, que facilitan que aporten menos energía que la sustancia original. Puesto que las bacterias causantes de las caries no pueden prosperar, o lo hacen con mucha dificultad, en estos edulcorantes, se les considera como “amistosos con los dientes”. Se utilizan sobre todo para endulzar chicles y caramelos, aunque, a diferencia de otros edulcorantes, éstos sí que aportan calorías. Como están formados en parte por bacterias intestinales, si se consumen en altas dosis pueden provocar diarreas y flatulencia (Coy *et al.*, 2017).

a) Manitol: Polirol ampliamente utilizado en las industrias de alimentos y farmacéutica debido a sus propiedades funcionales únicas. Es aproximadamente un 50% tan dulce como el azúcar y tiene un efecto refrescante deseable que muchas veces se usa para enmascarar sabores amargos. Es no cariogénico y tiene un bajo contenido calórico. Es apto para el consumo humano y se ha utilizado de forma segura durante más de 60 años. Se encuentra en la naturaleza (exudados de los árboles, algas marinas y en hongos frescos). Es un isómero del sorbitol y hoy en día se produce mediante la hidrogenación de jarabes de glucosa o por reducción de manosa, además es reducido en calorías con apenas 1.6 calorías por gramo. Se emplea en chicles, refrescos, bebidas, panadería, pastelería, surimi y productos para diabéticos (Gastalver, 2015).

b) Sorbitol: Es un edulcorante sintético y humectante. Se obtiene por reducción de glucosa extraída del sirope de maíz, manzanas, peras, melocotones y ciruelas. Se utiliza como sustituto de azúcar y a veces como estabilizante o aumentador de volumen. También se califica como Glucitos. Se emplea en chicles, refrescos, bebidas, panadería, pastelería, productos dulces, etcétera (Gastalver, 2015).

Es casi la mitad de dulce que el azúcar y se usa solo o con otros polialcoholes como edulcorante en alimentos dietéticos y especialmente en confituras sin azúcar, al igual que otros polialcoholes es absorbido en forma lenta e incompleta en el intestino, por lo que puede producir diarrea osmótica. Con la ingestión continua, la mayoría de las personas pueden adaptarse a cantidades de sorbitol de hasta 150 mg/kg/día. Después de la absorción el sorbitol dietético es oxidado a fructosa por la deshidrogenasa sorbitol y continúa su ciclo, en los mamíferos, como un intermediario metabólico normal (Barrancos *et al.*, 2006).

c) Isomaltita O Isomalta: Azúcar natural de remolacha, químicamente hidrogenada. Podría decirse que es un alcohol-azúcar. Sus ventajas incluyen ser apta para diabéticos, no formar caries, no ser higroscópica y contener la mitad de calorías que la sacarosa. La industria la usa para pastillas translúcidas. En pastelería, resulta útil para recubrir caramelos (dada su baja higroscopicidad) y realizar piezas artísticas (en reemplazo del caramelo) (Gross, 2013).

Es un carbohidrato poco digerible ya que se descompone muy despacio y sólo tiene un aprovechamiento energético del 50%. Por eso puede ser considerada más bien como fibra que ayuda a aportar un sabor dulce, sin que se eleve demasiado el nivel de azúcar o de insulina (Coy *et al.*, 2017).

d) Lactitol: Es un disacárido hidrogenado con sabor dulce obtenido por hidrogenación de la lactosa y cuya hidrólisis origina D-galactosa y D-sorbitol. Es un polvo cristalino o solución incolora de sabor dulce. Es bastante soluble en agua, poco higroscópico, y con puntos de fusión de 122°C. Presenta en disolución una viscosidad igual a la de la sacarosa, y disminuye el punto de congelación de las soluciones de la misma manera que esta. Su aporte calórico es de 2 Kcal/g. Carece de potencial cariogénico, su idoneidad en alimentos para

diabéticos es alta, sus efectos laxantes aparecen a consumos entre 70-80 g/d y no sufre pardeamiento químico (Cameán *et al.*, 2012).

e) Xilitol: Se obtiene por hidrólisis ácida del azúcar xilosa presente en fibras vegetales de los abedules, pulpa de caña de azúcar, vainas de semillas, cáscara de coco, mazorcas de maíz y avena, así como de plátanos, fresas y algunos hongos. También, la apariencia y textura del xilitol son similares a la sacarosa. Su costo es aproximadamente 10 veces más que el de la sacarosa. Su empleo principal es como sustituto parcial de otros azúcares. Tiene un dulzor y un sabor muy similar al del azúcar, pero con 35% menos de calorías con un toque refrescante y mentolado (Harris *et al.*, 2005).

2.5 Generalidades de la *Lippia dulcis*

Familia: Verbenaceae

Nombre científico: *Phyla dulcis* (Trevir). Syn. *Lippia dulcis*.

Otros nombres: Corozus del país, Hierba dulce, Hierbabuena dulce, Orégano grueso, Orozuz, Yerbabuena dulce, Orozú, Orozuz cimarrón, Corronchocho, Hierba buena dulce, Orozul, Orozuz del país, Salvia santa, Xtuhuxiu, Honey Herb. Los Aztecas la conocía como Tzonpelic xihuitl (Hierba dulce). Conocido desde la antigüedad, ya utilizados por los aztecas como remedio curativo y edulcorante natural. También es conocido por los nombres de *Phyla dulcis* y Yerba dulce mexicana su nombre azteca era xihuitl Tzonpelic, "hierba dulce" (Granados, 2009).

2.5.1 Historia

El orozuz aparece descrito con sumo detalle en algunas de las crónicas coloniales de varios historiadores, en todos los casos haciendo referencia a su potente sabor edulcorante; mencionando que las hojas son tan dulces que vencen en dulzura a la miel y el azúcar, y a cualquier otra cosa dulce y que la planta no deja de ser muy

útil, porque las hojas bebidas en agua, sanan las calenturas y el zumo también se bebe, aplaca la tos, la ronquera y despierta las ganas de comer. El principal compuesto dulce de *L. dulcis* es hernandulcina, nombre dado en honor a Francisco Hernández (Granados, 2009).

La literatura sobre los usos de esta especie se remonta a principios de tiempos coloniales en México. Esta planta comenzó a usarse como una droga oficial a fines del siglo XIX para el tratamiento de la tos y bronquitis. Un trabajo de campo realizado en México en 1981 y 1982 indicó que todavía hay un comercio activo que involucra a *L. dulcis* (Fig. 3) que se vende principalmente en los mercados por su presunta actividad abortiva (Compadre, 1986).



Figura 3. Hojas y flores de *Lippia dulcis*.

Fuente: Ethnoplants.com, 2017.

2.5.2 Descripción botánica

Planta herbácea, pero a veces algo leñosa en la base (no suculenta), decumbente o postrada, enraizando en los nudos, o erectas, aromáticas, tallos jóvenes con tricomas simples o diminutos. Hojas ovadas (lanceoladas), 3-7 cm de largo y 1.5-4

cm de ancho, ápice agudo, margen gruesamente estrellado en el ápice, haz con tricomas simples, inflorescencia 0.4-0.9 cm de largo y 0.4-0.6 cm de ancho y una espiga por axila, pedúnculo 2.5-5 cm de largo (Calleja, 2016).

2.5.3 Hábitat y distribución geográfica

Crece en matorrales húmedos, campos abandonados, riberas de ríos arboladas, orillas de bosques, bordes de estanques o en claros abiertos de pasturas siempre que exista suficiente humedad. Llega a crecer en pastizales de hasta 1800 msnm, pero se desarrolla mejor en alturas por debajo de los 900 msnm. *Lippia dulcis* es una planta originaria de México y Centroamérica. Entre los lugares de origen de *Lippia dulcis* se indican el sur de México, Panamá, Colombia y Venezuela. Ha llegado a la atención de los europeos después de la llegada de los españoles en América de las áreas una vez habitadas por los aztecas. En México esta hierba es conocida en los estados de Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Chiapas, Puebla, Quintana Roo, Veracruz y San Luis Potosí (Calleja, 2016).

2.5.4 Importancia agrícola

A pesar de ser una planta relativamente fácil de cultivar la producción es escasa o doméstica, la que se comercializa es principalmente por recolección en las regiones de crecimiento silvestre. Se propaga por semilla o vástago, aunque por vástago es más fácil. Se colectan las ramas largas, se lavan y se secan a la sombra durante 2-3 días, luego se aporrean o seleccionan manualmente y se separan las hojas y flores de los tallos. Según un estudio realizado, el orozuz posee una mejor respuesta en cuanto a rendimiento de aceite esencial cuando se encuentra en ambientes con cierto porcentaje de sombra, aunque la relación peso seco/peso fresco es mejor en ambientes a pleno sol. Las hojas se cosechan durante la floración y se secan a la sombra o con calor artificial a una temperatura de 45 °C. El período de floración de *Lippia dulcis* se extiende de enero a abril. Sus flores son pequeñas y esféricas, y su

color puede variar del blanco al púrpura. El *Lippia dulcis*, por su tamaño más bien pequeño, que la llevan a alcanzar una altura de no más de 20 a 25 centímetros, a menudo se vende como planta ornamental común. Sus ramas colgantes pueden alcanzar una longitud de 1 metro (Calderón, 2003).

2.5.5 Propiedades fisicoquímicas

Las partes aéreas de la hierba dulce contienen un aceite esencial en el cual se han identificado los monoterpenos borneol, delta-cadineno, alcanfor, 6-metil-hep-5-en-2-ona, limonelo, linalol, mirceno, alfa y beta-pineno, alfa-terpineol y terpinoleno; y los sesquiterpenos, beta-cariofileno, alfa-copaeno y hernandulcin, este último compuesto, también se detectó en hojas y flores. El tamizaje fotoquímico de las hojas demuestra aceite esencial, ácidos orgánicos, alcaloides, hidrocarburos alifáticos, azúcares y ésteres, aunque estudios más profundos no encontraron alcaloides, pero sí un hidrocarburo alifático saturado identificado como ácido silícico (0.7-1.8%) (Souto *et al.*, 1997).

Por destilación acuosa de hojas se obtiene un aceite neutro dulzón (0.8%), gravedad específica de 0.94875 g/ml a 20°C, rotación óptica -11.8°, constituido por lippiol, monoterpenos (alcanfor, borneol, canfeno, limoneno, linalool, mirceno, - y -pineno, terpinoleno, -terpineol) y sesquiterpenos (-cadineno, 6-metil-5-hepten-2-ona, -copaeno, -cariofileno), entre otros desconocidos. El compuesto edulcorante es un sesquiterpeno llamado hernandulcina [6-(1,5- dimetil-1-hidroex-4-enilo)-3-metilcicloex-2-enona], que representa únicamente el 0.004% de la hierba seca; de existir potencial en el uso de la molécula, se estima que sería más rentable la industrialización de la molécula de síntesis que la obtenida naturalmente (Souto *et al.*, 1997).

2.5.6 Componentes conocidos de *Lippia dulcis*

En 1881, se informó que *L. dulcis* produce, por destilación con agua, 0.5% de un aceite neutro con un sabor dulce, del cual un depósito se formaron cristales en forma de aguja después de estar de pie durante unos días. El sólido incoloro no identificado se aisló y describió como: emitiendo un peculiar olor alcanforado. En 1883, una planta llamada *Lippia mexicana* fue sometida a estudios químicos. El resultado de este estudio indicó que la planta contiene tanino, un compuesto que se asemeja a la quercetina, un aceite líquido volátil con olor a limón, así como una sustancia cristalina peculiar que se denominó "lippiol". Lippiol fue descrito como una sustancia similar al alcanfor con un punto de fusión entre 25 y 30 ° C, y que tiene la composición elemental de mentol (C 75.86%, H 12.43%, O 10.20%). En 1892, el sólido cristalino del aceite volátil de *L. dulcis* se volvió a aislar con un rendimiento del 0,39% y se identificó como alcanfor, utilizando métodos no especificados. Se describió que el aceite volátil produce una sensación inicialmente picante que se convirtió en un poco dulce y refrescante gusto. En un estudio fitoquímico más reciente de *L. dulcis* se informó que, si bien los alcaloides y las saponinas no estaban presentes, se obtuvo un compuesto alifático (hidrocarburo saturado), junto con un sólido inorgánico identificado como ácido silícico (0.77-1.8% de rendimiento) y una pequeña cantidad de ácido ascórbico (16.5 mg / 100 g). Según este informe, se aisló hasta el 0,8% p/p de aceite volátil de las hojas frescas de *L. dulcis*. El aceite exhibió una gravedad específica de 0.9485 g/ml a 20 °C, una rotación óptica de -11.8°, y contenía un compuesto similar al alcanfor identificado como "lippiol". El aceite volátil poseía un sabor intensamente dulce, con 5 mg del aceite en 100 ml de agua siendo claramente dulce (Compadre *et al.*, 1986).

La planta *L. dulcis* se caracteriza por la presencia de un alto porcentaje de sesquiterpenoides (79%). Los experimentos de aislamiento y la caracterización cromatografía de gases mediante inyección directa muestran que el sesquiterpenoide intensamente dulce (+) - hernandulcina (36%) y su epímero (-) - epi-hernandulcina (22%) son los principales componentes de estas hierbas. El aceite contiene, en su caso, cantidades indetectables de alcanfor (< 0.01%). Estos

hallazgos están en marcado contraste con la composición informada. Contiene compuestos fenólicos, flavonoides de distintos tipos y sesquiterpenos, principalmente del tipo bisaboleno, entre otros. La hernandulcina es el bisaboleno, identificado por la fórmula $C_{15}H_{24}O_2$, que le confiere a la planta su gran capacidad edulcorante, que llega a ser de 1000 a 1500 veces más dulce que el azúcar. Otras propiedades que hacen la hernandulcina especialmente interesante son su carácter no tóxico ni mutagénico. Adicionalmente, su alta solubilidad y estabilidad térmica en un amplio rango de pH, aunado a que no es calórico, perfilan este compuesto como una alternativa de uso en gran variedad de aplicaciones alimenticias, productos farmacéuticos y de higiene oral. El compuesto que proporciona un poder edulcorante muy superior a *Lippia dulcis* fue identificado en 1985 por Cesar M. Comparar y A. Douglas Kinghorn, expertos de la Universidad de Illinois y Chicago (Francisco *et al.*, 2012).

2.5.7 Hernandulcina

Es un edulcorante natural que se obtiene de un pasto que a su vez es usado en forma de té para provocar abortos. Este edulcorante no llegó al mercado debido a que la separación de la molécula que da el dulzor y la sustancia abortiva presente en la materia prima resulta muy costosa (De Icaza, 2018).

Se descubrió que Hernandulcina era un componente menor del petróleo volátil y presente en las partes aéreas de la planta mexicana (*Lippia dulcis*). El compuesto es preferentemente soluble en éter de petróleo y se purificó mediante cromatografía en comuna de gel de sílice y posterior cromatografía preparativa de capa fina, usando mezclas de hexano y acetona como eluyente y soluciones de desarrollo, respectivamente. La estructura de la hernandulcina se estabilizó sobre la base de una combinación de sus parámetros espectrales, su perfil de degradación térmica y su síntesis mediante una condensación aldólica dirigida (Colegate *et al.*, 2000).

Es un sesquiterpeno bisabolano que fue calificado con un aproximado de 1000 veces más dulce que la sacarosa por un panel humano (Compadre *et al.*, 1986).

La hernandulcina es un compuesto aislado de la planta *Lippia dulcis* con capacidad edulcorante de 1500 veces mayor que la sacarosa (Pérez *et al.*, 2005).

2.5.8 Epi-hernandulcina

Existen parejas de sustancias que son tan semejantes entre sí como lo son nuestra mano izquierda de la derecha. Tal parece que para que tengamos la sensación de dulzura se requiere que las moléculas de la sustancia dulce embonen perfectamente bien en los sitios receptores de sabor en nuestra lengua, de la misma manera que una mano derecha embona en un guante derecho y no embona en un guante izquierdo ni, mucho menos, en un guante de tres dedos. En este sentido tenemos a la epi-hernandulcina como un epímero estructural (no dulce) de la hernandulcina (Sosa, 1998).

2.5.9 Toxicidad *L. dulcis*

Los extractos acuosos y etanólico (500 ppm) de hojas, raíces y tallos fueron tóxicos a peces del género *Mollinesia*. El alcanfor puede ser tóxico (DL 50: 50 mg/kg); se sabe que cruza la placenta y podría ser la causa del poder abortivo atribuido popularmente a esta planta. La hernandulcina no presenta mutagenicidad usando bioensayos de *S. typhimurium* TM677; no presenta toxicidad aguda en el ratón a una sola dosis de 2 g/kg. La infusión de hojas administrada oralmente a ratones en dosis de 1-5 g/kg no presenta toxicidad aguda (Souto *et al.*, 1997).

2.5.10 Propiedades y usos

Esta hierba es dulce y ligeramente astringente. Es un expectorante natural. La raíz limpia la boca, promueve la salivación e incrementa las secreciones del tracto gastrointestinal. También es germicida. Se toma en forma de té para aliviar la tos, los resfriados y la congestión. Es un remedio efectivo para las úlceras pépticas y la gastritis. Se puede preparar en ghee (pasta) medicinal para uso externo y es empleada en personas con diabetes, bronquitis, resfriados y ataques de asma. La

asunción de *Lippia dulcis* se considera inocua para los diabéticos y se cree que, debido a su ligero regusto de menta y su inocuidad para el esmalte dental, es adecuado para ser utilizado como un ingrediente saborizante para la producción de productos para la 'higiene oral, sin temor a que pudieran dar lugar a consecuencias desagradables en los dientes (Lad, 1988).

Esta planta ha sido de gran importancia ya que tiene reconocidas propiedades medicinales contra enfermedades respiratorias, gastrointestinales, hepáticas, como antihipertensivo, anti-proliferativo y antiinflamatorio. Sus hojas y sus flores se utilizan como una adición fresca a las ensaladas, como guarnición o decoración para diferentes platos y postres. Las hojas pueden ser masticadas fresco para saborear el sabor. También son adecuados para ser seca y finamente triturado para la preparación de un edulcorante natural utilizado para hacer bebidas más sabrosas tales como té o té de hierbas. Existe la posibilidad de congelar las hojas para su uso posterior. En cuanto al aceite esencial es utilizado como larvicida, repelente, antimicrobiano, antiviral, antimalaria y molusquicida. Estas propiedades permiten que los constituyentes del aceite esencial de sean utilizados por diferentes sectores industriales, tales como la industria farmacéutica, de los cosméticos y de los aditivos alimentarios (Martínez *et al.*, 2000).

2.5.11 Diversas perspectivas sobre *Lippia dulcis*

La información que existe sobre *L. dulcis* es poca y muy limitada ya que autores como Compadre *et al.* (1986) mencionan en sus estudios descubrió que el compuesto tóxico alcanfor constituye el 53% p/p del aceite volátil de esta especie y se discute el uso potencial de *L. dulcis* para la extracción de hernandulcina y concluye diciendo que cualquier intento futuro de extraer hernandulcina pura de *L. dulcis* cultivada se verá obstaculizado no solo por el rendimiento relativamente bajo de esta sustancia dulce sino también por la necesidad de eliminar el alcanfor (ya que es clasificado como un compuesto muy tóxico con una dosis letal muy baja de

50 mg/Kg) y cualquier otro componente potencialmente tóxico que interfiera con el sabor durante el procedimiento de aislamiento.

Contrario a lo anterior Souto *et al.* (1996) reportó que, a pesar de numerosas investigaciones, la composición química de toda la planta de *L. dulcis* sigue siendo incierto, particularmente en relación con su constitución alcanforácea. Según información recolectada en sus análisis. Se informaron en las plantas de México que el aceite volátil aislado por destilación al vapor contenía un amargo monoterpenoide, alcanfor, presente como el 53% del aceite esencial de las plantas mexicanas, pero mediante el análisis que realizó en su trabajo encontró que en plantas de *L. dulcis* silvestres recolectadas en Puerto Rico el alcanfor no se encontró en ninguno de los aceites extraídos, aunque específicamente buscaron esta constitución. Si se confirma la identidad de las plantas mexicanas, estos resultados pueden revelar la existencia de dos quimiotipos de esta hierba, es decir, un tipo de hernandulcina y un alcanfor.

Funari *et al.* (2012) señala que debido a que la mayoría de las especies de *L. dulcis* son aromáticas, los estudios químicos y farmacológicos de este género se han centrado principalmente en sus aceites esenciales. En contraste, relativamente pocos se han centrado en constituyentes no volátiles, sumado a esto se han reportado varios problemas taxonómicos que involucran algunos géneros verbenácea ya que la familia Verbenaceae comprende aproximadamente 1035 especies y 36 géneros, incluido el género *Lippia* (dentro de este género se han llegado a describir 200 especies), que se distribuye en toda América del Sur y Central y en África tropical, En América del Norte en el estado de California en USA.

Pascual *et al.* (2001) también reporta que hay pocos estudios sobre la actividad farmacológica de estas especies. La mayoría de los estudios para fecha han centrado su atención en el antimicrobiano, efectos antifúngicos, repelentes o larvicidas de los aceites esenciales. Hay una escasez deplorables de estudios detallados de aislamiento publicados o detallados exámenes de sus actividades farmacológicas. Así, creen que el aislamiento de nuevos principios activos de estas especies sería de gran mérito científico. Además, las validaciones científicas para

el uso popular de ellos merecen ser investigados más a fondo. El aceite esencial contiene como componentes principales 10.1% (p/v) de hernandulcina y 32.62% (p/v) de alcanfor. La composición no cambió en los experimentos. El aceite sabe extremadamente dulce con el fuerte sabor posterior del alcanfor.

2.6 Métodos de extracción de los compuestos activos

En algunos procesos previamente remueven la grasa de la hoja por medio de un solvente como cloroformo o hexano y se realiza la eliminación preliminar de aceites esenciales, clorofila y otras partículas apolares (Repetto *et al.*, 2009).

2.6.1 Extracción por medio de Solventes Orgánicos

La separación o extracción de un compuesto presente en una muestra líquida o sólida se realiza con disolventes capaces de arrastrar aquél y de separarse de la muestra. La solubilidad de un producto en función de su polaridad, de forma que las sustancias iónicas o polares se disuelven en disolventes polares, y las no-iónicas, no-polares o lipídicas lo hacen en disolventes apolares o lipófilos (Repetto *et al.*, 2009).

Cualquiera sea el solvente usado la operación se realiza en forma similar. Por otra parte, existen en la literatura, para cada tipo de solvente, estudios experimentales sobre temperatura óptima de la extracción, con el fin de optimizar los resultados del proceso y asegurar la calidad del producto obtenido. La operación adoptada en esta etapa depende del solvente que se utiliza. En algunas plantas se usan alcoholes como el metanol, el cual posteriormente es removido del producto final. Se presume que el uso de tal compuesto aumenta la eficacia de la extracción y la separación de los esteviósidos. Sin embargo, el uso de esta en la operación, parece ser la razón por la cual la FDA (Food and Drug Administration) no califica a los extractos de Stevia como productos naturales y seguros. Los métodos aplicables si se usan esta clase de solventes son: Envasado de producto líquido, extracción, Secado, cristalización, pulverización, mezclado, envasado, filtración y purificación (Macia *et al.*, 2008).

Clases de disolventes	Ejemplos de los disolventes más utilizados
Hidrocarburos alifáticos	Pentano, hexano, heptano, decano
Hidrocarburos alicíclicos	Ciclohexano, metilciclohexano, alfa-pineno
Hidrocarburos aromáticos	Benceno, tolueno, xileno, etilbenceno, estireno
Hidrocarburos halogenados	Cloruro de metileno, cloroformo, tricloroetileno, tetracloruro de carbono, 1-2 dicloroetano, freones, 1-1-1 tricloroetano,, tetracloroetileno
Alcoholes	Metanol, etanol, isopropanol, butanol
Glicoles	Etilenglicol, dietilenglicol
Éteres	2-metoxietanol, etoxietanol, butoxietanol, p-dioxano
Esteres	Acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de i-propilo, acetato de n-butilo, acetato de i-butilo, acetato de 2-etoxietilo, metacrilato de metilo
Cetonas	Acetona, butanona-2, 4-Metil-pentanona-2, hexan-2, ciclohexanona
Otros	Nitroparafinas, disulfuro de carbono

Tabla 1. Clasificación de los disolventes.

2.6.2 Maceración

Es un procedimiento para extraer los principales activos a temperatura ambiente (15 a 25°C); puede utilizarse agua, alcohol, vino o aceite la materia prima es remojada, debidamente fragmentada, hasta que el solvente penetre en la primera estructura celular ablandando y disolviendo las partes solubles. El recipiente a utilizar debe ser hermético y resistir la acción de los solventes utilizados. Se colocan el material y solvente, dejándoselos reposar tapados durante un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Posteriormente se filtra el solvente que contiene los compuestos de interés, y se prensa el residuo sólido. En el caso de que la extracción no haya sido completa se repite la operación. La maceración en agua debe ser por tiempo corto, para evitar fermentación o formación de moho (Fonnegra *et al.*, 2007).

2.6.3 Lixiviación (percolación)

Es la separación de sustancias solubles de otras insolubles mediante disolventes adecuados. Es uno de los procesos más difundidos pudiendo utilizarse para solventes orgánicos e inorgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Se coloca la hoja fragmentada, en una especie de embudo y se hace pasar el solvente adecuado a través del mismo. Para realizar esta operación deben tenerse en cuenta una serie precauciones, el material sólido debe estar debidamente compactado para que el eluyente pueda atravesarlo con una lentitud adecuada, que permita el tiempo de contacto requerido entre los solutos y el solvente (Román, 1999).

2.6.4 Extracción Soxhlet

Es la técnica más antigua para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. Desarrollada en 1879, sigue siendo hoy en día una técnica aceptada por la Agencia de Protección Medioambiental (EPA). Consta de un balón en donde se hace bullir el solvente apropiado y sus vapores se condensan encima de la muestra, según el procedimiento clásico. Esta operación se repite sucesivamente, con lo cual la solución contenida en el balón evaporador se va enriqueciendo con los principios aislados. Este método no es apto para trabajar con sustancias termolábiles. Las ventajas más importantes de la extracción Soxhlet con el contacto continuo de la muestra con una porción fresca de disolvente, simplicidad, bajo costo de adquisición y la posibilidad de procesar grandes cantidades de muestra (Canosa, 2009).

2.6.5 Extracción por Solventes Acuoso

Procesos más modernos utilizan agua como solvente para la obtención de los principios activos de la hoja, esto permite cumplir con las especificaciones de producto natural requerida para su comercialización. En el caso de la aplicación industrial de extracción a partir de agua hirviendo se puede lograr entre un 93 y un 98 % de efectividad en la etapa, logrando obtener cristales de stevia con hasta un

96% de pureza. En el caso de utilizar agua como disolvente, la operación puede llevarse a cabo a través de los siguientes métodos:

- a) **Infusión:** Una infusión es una solución diluida de los componentes fácilmente solubles de las plantas crudas. Las infusiones se logran por el agregado de agua a la temperatura adecuada a las hojas. Éste método es beneficioso debido a que las mismas no corren peligro de que sus componentes se desnaturalicen. En algunos casos se utiliza una corriente de reflujo la cual permite un mayor tiempo de contacto entre el material expuesto y el solvente (Gennaro, 2000).
- b) **Destilación por arrastre de Vapor:** Los principios activos pueden ser arrastrados por vapor, en una columna de destilación, en tres etapas. Para el reconocimiento de la cantidad de extracto obtenido se suelen utilizar reacciones químicas que permiten identificar que los principios activos en las hojas han desaparecido. Luego de la extracción el solvente es eliminado en un evaporador rotatorio a temperaturas de entre 30 y 40 °C para proteger los compuestos termolábiles. El residuo gomoso remanente (extracto seco) es pesado y procesado de diferentes maneras, de acuerdo al metabolito que se desea obtener. El proceso consiste en fraccionar en trozos pequeños el material vegetal, pesarlo y colocarlo en la cámara de extracción. Proceder a montar el quipo, calentar el agua hasta ebullición, destilar durante 1 hora, suspender el calentamiento y dejar enfriar (Lamarque *et al.*, 2008).

2.6.6 Extracción por Fluidos Supercríticos

En éste se aprovecha el poder disolvente a temperaturas y presiones por encima de sus valores críticos. Esta operación está siendo ampliamente utilizada a nivel industrial. Un fluido supercrítico es cualquier fluido a una temperatura superior a la crítica, mostrando propiedades intermedias entre un líquido y un gas; ésta propiedades incrementan su poder como solvente y le proporcionan una penetración mayor en el material. Presenta una mayor capacidad frente a los

líquidos para penetrar en los micro-poros de la estructura sólida. Generalmente, leves cambios de la temperatura y la presión en la zona crítica provocan grandes cambios en la densidad y el poder solvente del mismo. El extracto obtenido es una solución con un contenido de partículas coloidales con un color marrón oscuro, contiene todos los principios activos, pigmentos de la hoja, polisacáridos solubles y otras impurezas (Luque *et al.*, 1993).

2.6.7 Filtración

La filtración es una operación unitaria que se utiliza para separar sólidos de líquidos. La separación ocurre debido a que el gradiente de presión que se aplica obliga al líquido a atravesar el medio filtrante (membrana) el cual, a su vez es impermeable al sólido. El extracto obtenido pasa por un proceso de filtración donde se retienen las partículas en suspensión, en éste proceso se puede hacer uso de dos o más filtros o membranas (Moya, 1995).

2.7 Purificación de compuestos activos

Existen 3 opciones para llevar a cabo la etapa de purificación:

2.7.1 Combinación de membranas filtrantes

Este método consta de la purificación por combinación de membranas filtrantes de distinto tamaño. Ésta consistente en el pasaje del extracto por membranas sucesivas de distinto tamaño. Inicialmente se realiza un filtrado con membranas que van desde 20 a 1 micra, luego la solución pasa por un filtro de carbón activado y finalmente se somete a un proceso de ultrafiltración, diafiltración y nanofiltración en ese orden. Los filtros retienen pigmentos y sustancia de alto peso molecular de hasta 150 Daltons, con un rendimiento del 20% en concentrado donde están presentes los glucósidos de interés (Macia *et al.*, 2008).

2.7.2 Adsorción con zeolitas modificadas

Consiste en la clarificación del extracto por pasaje del mismo por una columna de zeolitas, previamente modificadas. Ésta se logra intercambiando los iones sodio por iones calcio, bario o magnesio usando siempre cloruro como anión para facilitar su eliminación. En el caso del Bario provoca un sabor salado indeseable en el edulcorante. También introdujeron amonio cuaternario en la resina convencional utilizada, y se observó que el mecanismo de adsorción y decoloración se basa en interacciones hidrofóbicas, pero la decoloración, depende de las interacciones hidrofóbicas y del intercambio iónico. El extracto de stevia circula por el lecho de zeolitas modificadas en forma ascendente quedando retenidos los pigmentos por adsorción en la superficie de la zeolita, lográndose una decoloración de hasta 90 % pero con retención de edulcorantes. Posteriormente se demostró a través de la experimentación que la mejor relación decoloración-retención se lograba utilizando un extracto con 7% de edulcorante (Macia *et al.*, 2008).

2.7.3 Resinas de Intercambio Iónico

Este método se basa en una extracción acuosa de las hojas a temperatura controlada seguida del pasaje del líquido de extracción a través de una resina que retiene selectivamente los principios edulcorantes que posteriormente se recuperan por elusión de la columna con una mezcla hidroalcohólica, completándose la purificación por pasajes sucesivos a través de una resina de intercambio catiónico, una resina de intercambio aniónica y una columna de carbón activado granulado, obteniéndose un extracto incoloro. También se realizaron pruebas utilizando etanos tales como metanol, etanol y dioxano para la etapa de extracción obteniendo jarabes altamente coloreados, de los cuales no se logró precipitar el esteviósido por adición de alcohol ni cristalizarlo por evaporación. El rendimiento de proceso es de 5% sobre la base de las hojas secas (Macia *et al.*, 2008).

2.8 Precipitación

Algunos métodos utilizan sustancias que, al ser agregadas a la solución, hacen que los compuestos deseados precipiten. Esto tiene la desventaja de contaminar el producto, porque estas sustancias no pueden ser eliminadas completamente. En estos casos, el flujo continúa en un tanque clarificador (floculación/coagulación), en el que se separan los componentes endulzantes del resto de la mezcla. El uso de sustancias como la cal o sulfato de aluminio, carbonato de calcio u otras sales básicas de calcio provocan la precipitación de los componentes endulzantes en el fondo del tanque (Macia *et al.*, 2008).

2.9 Cristalización –Secado

Si se desea obtener el edulcorante en polvo, se evapora la solución para lograr la cristalización. Esta operación se realiza con el fin de obtener una sustancia sobresaturada y fomentar la formación de los cristales. El producto obtenido posee una humedad del 20%. Posteriormente se continúa con el proceso de secado, utilizando una corriente de aire caliente (80 °C, aproximadamente), en donde se reduce la humedad hasta alcanzar un 2%. Por último, en el caso de que el producto final lo requiera, se pasa por un molino, cuyo fin es pulverizar los cristales. Algunas marcas producen stevia mezclada con otros edulcorantes, como con lactosa, maltodextrina o dextrosa, por lo que se utiliza una mezcladora para alcanzar las condiciones requeridas por el consumidor (Reyes, 2015).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Nutrición Animal y Bioquímica, pertenecientes al Departamento de Producción Animal de la División de Ciencia Animal y al Departamento de Ciencias Básicas de la División de Ingeniería, respectivamente, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Saltillo, ubicada en la ex hacienda de Buenavista, municipio de Saltillo; Coahuila, a 7 km al sur de esta ciudad, sobre la carretera 54 (Saltillo-Zacatecas). Se localiza entre las coordenadas geográficas 25°22' de latitud norte y 101°02' longitud oeste y a una altitud de 1742 msnm. Clima muy seco, semicálido, con invierno fresco, extremoso, con lluvias en verano y una precipitación invernal superior al 10 % del total anual. La precipitación total anual media de 350-400 mm. La temperatura media anual de 19.8 °C.

3.1 Obtención y tratamiento de la *Lippia dulcis*

La recolección de la muestra se realizó en el ejido las Delicias, Siltepec, Chiapas; en el mes de septiembre. El proceso fue simple y consistió en cortar la planta llegando hasta la base. El paso siguiente fue un lavado para quitar rastros de tierra y finalmente se puso la muestra entre papel periódico para ser secada al sol.

Posteriormente, en el laboratorio, la muestra fue deshidratada en una estufa de secado a 60 °C por 24 h, para posteriormente ser molida en un mortero, para así obtener un polvo fino para los posteriores análisis.

3.2 Caracterización fisicoquímica de *Lippia dulcis* mediante un análisis proximal

Se llevó a cabo la caracterización físico-química de *Lippia dulcis*, los parámetros determinados fueron:

- Materia seca total
- Humedad
- Cenizas

- Extracto etéreo
- Nitrógeno
- Proteína cruda o bruta
- Fibra cruda
- Extracto libre de nitrógeno (ELN)

Los análisis fueron realizados de acuerdo al manual de técnicas utilizadas por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1980), técnicas utilizadas como estándar a nivel internacional. La muestra fue analizada por triplicado.

a) Materia seca total

La remoción parcial de la humedad libre del material permite la conservación del mismo disminuyendo su deterioro o alteraciones químicas. No obstante, el material aún conserva cierto nivel de humedad que está ligada a ciertas estructuras y compuestos, la cual debe ser removida para determinar con exactitud el contenido total de agua del material. Para determinar la materia seca total proceda con los siguientes pasos:

- Se coloca un crisol de porcelana en una estufa de secado a 105 °C por 24 horas por lo menos. Remueva el crisol de porcelana de la estufa, utilizando pinzas de metal, y se coloca en un desecador. Espere 15 minutos para que se enfríe el crisol, con unas pinzas de metal tome el crisol y péselo en una balanza analítica.
- Se agregan 2.0 g de muestra al crisol y registre el peso de la muestra.
- Se coloca el crisol en una estufa de secado a 105 °C durante 24 horas.
- Al final del periodo de secado, remueva el crisol de la estufa y lo coloca en un desecador, con las mismas precauciones indicadas con anterioridad. Déjelo enfriar por 15 minutos.
- Registre el peso del crisol más la muestra seca.

Para obtener el contenido de materia seca total a 105 °C, utilice la siguiente ecuación:

$$\% \text{ MST} = \frac{\text{peso de crisol} + \text{muestra seca} - \text{peso de crisol vacío}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

El contenido de humedad se obtiene por diferencia:

$$\% \text{ H} = 100 - \% \text{ MST}$$

Estas muestras secas se conservan en los crisoles para la determinación del contenido de cenizas.

b) Cenizas

Los minerales que están presentes en los alimentos, de muy diversas formas, constituyen la materia denominada inorgánica, la cual se obtiene como residuo de la incineración del material o cenizas. Para la determinación de cenizas proceda con los siguientes pasos:

- El crisol y la muestra seca utilizada para la determinación de materia seca total (MST) se coloca en la mufla, donde se ha preestablecido como temperatura máxima los 600 °C.
- Cuando la temperatura alcance los 600 °C deje las muestras por espacio de dos horas.
- Apague la mufla y deje que la temperatura descienda.
- Con mucho cuidado abra la puerta de la mufla, remueva los crisoles hacia un desecador, utilizando pinzas y guantes de asbesto, para que se enfríen. Esto puede durar cerca de una hora.
- Pese los crisoles más las cenizas con exactitud en una balanza y realice los cálculos siguientes para obtener el porcentaje de cenizas:

$$\% C = \frac{\text{peso de crisol + cenizas} - \text{peso de crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Para ajustar sus datos en base a materia seca total dividir su % cenizas entre su % MST y multiplicar por 100.

c) Nitrógeno o proteína cruda o bruta (Método Kjeldhal)

En muchas partes este análisis es conocido como determinación de proteína cruda, debido a que, por conversión, el porcentaje de nitrógeno determinado en el análisis se multiplica por el factor 6.25 para obtener el porcentaje de proteína cruda. Este factor está relacionado con el hecho de que la proteína, en términos generales, contiene un 16 % de nitrógeno, por lo que el factor se obtiene de la relación 100/16. Sin embargo, es conocido que esto no es tan cierto, puesto que se conoce que el porcentaje de nitrógeno en las proteínas varía desde un 15.5 hasta un 18 %, por lo que habría que aplicar un factor diferente para cada tipo de muestra. En el procedimiento conocido como método Kjeldhal, todo el nitrógeno presente en la muestra, exceptuando los nitratos y nitritos, se convierten en amonio que a su vez es liberado del medio de reacción en forma gaseosa y atrapado con un ácido débil para su titulación. El procedimiento para determinar nitrógeno y por consiguiente el porcentaje de proteína cruda o bruta por el método Kjeldhal es el siguiente:

- En un papel filtro o encerado libre de nitrógeno pese aproximadamente 1.0 g de muestra.
- Coloque la muestra con el papel dentro del matraz tipo Kjeldhal, evitando que se pierda algo de muestra.
- Añada con mucho cuidado 30 mL de H₂SO₄ concentrado al matraz y rote levemente el mismo para que humedezca completamente el papel con la muestra.
- Coloque las perlas de ebullición y la mezcla reactiva de selenio.
- Encienda el calentador de manera que la solución entre en ebullición. Durante este periodo la mezcla del matraz pasa de un color oscuro hasta

quedar completamente clara o ligeramente verdosa, y se dejan de emitir vapores. Terminado el periodo, apague el calentador y deje enfriar los matraces.

- Agregue lentamente al matraz aproximadamente 300 mL de H₂O destilada tratando de lavar las paredes, y deje enfriar a temperatura ambiente. Asegúrese de que no se le han formado cristales en el balón.
- Añada al matraz lentamente, sin agitar, aproximadamente 100 mL de NaOH al 40%. No permita que se caliente bruscamente la solución.
- Coloque el matraz sobre el calentador del sistema de destilación y en el extremo opuesto del sistema de condensación coloque un matraz Erlenmeyer con aproximadamente 50 mL de la solución de ácido bórico al 4 % e indicadores correspondientes, de manera que el extremo del tubo recolector quede inmerso en la solución. Gire el matraz de manera que la solución de NaOH se mezcle completamente con el contenido del matraz. Encienda el calentador y destile.
- Destile hasta haber recolectado cerca de 250 mL de destilado. La solución debe haber cambiado de un color rojo a verde.
- Retire el matraz Erlenmeyer y titule el destilado con la solución estandarizada de H₂SO₄ y calcule el porcentaje de nitrógeno en la muestra. Durante la titulación el color cambiará de color verde a un rojizo casi transparente. Registre el volumen utilizado de ácido. Se debe correr un blanco en donde se coloca igual cantidad de reactivos.
- Al volumen utilizado para titular la muestra se resta el volumen utilizado en el blanco y se calcula el contenido porcentual de nitrógeno en la muestra de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% N = \frac{0.014 \times [(mL \text{ de } H_2SO_4 \text{ de muestra} - mL \text{ de } H_2SO_4 \text{ de blanco}) \times N \text{ de } H_2SO_4]}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

gramos de muestra

Para el cálculo de proteína cruda se multiplica el contenido de nitrógeno por el factor 6.25 o en su defecto el factor que más se adecua al tipo de material analizado, según se indicó con anterioridad.

% de proteína cruda o bruta (PC o PB) = % de nitrógeno x 6.25

Para ajustar sus datos en base a materia seca total dividir su % PC entre su % MST y multiplicar por 100.

d) Extracto etéreo o grasa (Método Soxhlet)

El método para la determinación de la fracción de lípidos se basa en la evaporación continua de un solvente orgánico, en muchos casos éter de petróleo o hexano, que luego de condensarse pasa por la muestra extrayendo los materiales solubles. Al utilizar algún tipo de solvente orgánico se espera que los compuestos grasos o lípidos se disuelvan y puedan ser removidos del material. El procedimiento para determinar extracto etéreo utilizando el método Soxhlet es el siguiente:

- Un matraz bola de fondo plano con capacidad para 250 mL, se coloca en una estufa de secado a 105°C por espacio de dos horas como mínimo. Se deja enfriar en un desecador, se pesa en una balanza y se registra su peso.
- En el matraz bola de fondo plano se colocan de 100 a 150 mL del solvente orgánico que se va a utilizar (éter de petróleo). Se recomienda no utilizar solventes cuyo punto de ebullición exceda los 85 °C.
- Se pesan cerca de 4.0 g de muestra en una balanza y se colocan en los dedales de extracción a base de celulosa.
- Se coloca el dedal con la muestra dentro del sifón. Se conecta el sifón al matraz bola de fondo plano. Encienda las parrillas eléctricas.
- La muestra permanecerá en sifonado constante por alrededor de 8 horas.
- Retirar el dedal y recuperar el solvente.
- Una vez que no se tengan residuos de éter en el matraz, coloque los matraces con los residuos del extracto etéreo en la estufa de secado por 24 horas.

- Retírelos y colóquelos en un desecador. Déjelos enfriar, pese y registre el peso del matraz.

Estime el contenido de extracto etéreo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{peso de matraz + grasa} - \text{peso de matraz solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Para ajustar sus datos en base a materia seca total dividir su % EE entre su % MST y multiplicar por 100.

e) Fibra cruda

Este análisis corresponde al método proximal o de Weende. Se basa en la digestión de la muestra en soluciones ácidas y básicas, donde el peso perdido de la muestra luego de la incineración del residuo se considera la fibra cruda. La muestra a utilizar debe ser una muestra libre o con muy poco contenido de lípidos por lo que la muestra que se utiliza para esta determinación es la que proviene de la determinación de extracto etéreo. Los pasos para la determinación de este parámetro son los siguientes:

- Pese 2.0 g de muestra desengrasada, colóquela en el vaso de Berzelius, registre el peso de la muestra.
- Agregue 100 mL de ácido sulfúrico 0.255 N. Abra la llave del digestor, encienda la parrilla y coloque el vaso. A partir de que la muestra empiece a hervir se toma el tiempo de 30 minutos.
- Caliente agua destilada, coloque el filtro sobre el embudo filtre su muestra y lave con agua caliente.
- Por medio de una espátula vacíe su muestra en el vaso, agregue 100 mL de hidróxido de sodio 0.313 N a partir de que empiece a hervir tome el tiempo de 30 minutos.

- Retire su muestra, fíltrela y lave con agua caliente, con las pinzas saque un crisol de la estufa, por medio de una espátula retire la muestra y colóquela en el crisol. Deje el crisol en la estufa durante 24 horas
- Saqué el crisol de la estufa con las pinzas, colóquelo en el desecador enfrié por alrededor de 15 min. y pese.
- Coloque su crisol en la mufla durante 2 horas, enfrié en el desecador durante 30 minutos y pese.

f) Extracto libre de nitrógeno (ELN)

En realidad, no se determina por análisis en el laboratorio, sino que se calcula por diferencia. El ELN corresponde a los azúcares, el almidón y gran parte del material clasificado como hemicelulosa. Se obtiene de la suma de los resultados del % ceniza, % extracto etéreo, % proteína cruda y % fibra cruda y se resta de 100 partes de muestra analizada. El E.L.N. Es necesario para realizar el cálculo total de nutrientes digestibles. Para la realización de los cálculos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{ELN} = 100 - (\% \text{cenizas} + \% \text{extracto etéreo} + \% \text{proteína cruda} + \% \text{fibra de cruda}).$$

g) Azúcares totales (Dubois, M., Guilles, K. A. Hamilton, J. K., Rebers , P. A. y Smith, F. 1956)

El método de Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al.*,1956) se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y temperaturas altas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa con el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismo y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de los compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con el fenol.

Para el caso de una muestra sólida, se realiza un pretratamiento, el cual consiste en lo siguiente:

- Se coloca 1.0 g de muestra en un vaso de precipitado con 10 mL de agua destilada; se coloca en una parrilla de agitación por 20 min.
- Posteriormente se filtra (papel filtro en pliego de fabricación nacional: grado 615, abertura de poro 8 μm , filtración media) y el filtrado se recibe sobre hielo, para evitar que la muestra se oxide.
- Del filtrado se realiza una dilución 1:20 con la finalidad de que la muestra este dentro del rango de la curva patrón de sacarosa (200-1000 ppm).

Después de el pretratamiento a la muestra, se lleva a cabo el siguiente procedimiento para determinar azúcares totales:

- En un tubo de ensaye se coloca 1 mL de la muestra (dilución 1:20), el tubo deberá estar sumergido sobre un baño con hielo.
- Posteriormente se colocan 2 mL del reactivo fenol-sulfúrico lentamente por las paredes del tubo, esto con la finalidad de que la muestra no se queme. El tubo se agita dentro del baño con hielo.
- El tubo con la muestra se coloca en un baño María a ebullición por 5 min. Pasado este tiempo se retira del baño María y se deja enfriar el tubo a temperatura ambiente por 5 min.
- La muestra se lee en absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 480 nm.
- Registrar la lectura de la muestra, para posteriormente, interpolar los resultados en la curva patrón de sacarosa y así determinar la concentración en porcentaje de azúcares totales presentes en la muestra, tomando en cuenta la dilución que se realizó.
- Como blanco (es la referencia de 0 para calibrar la toma de lectura de absorbancia en el espectrofotómetro) se utilizó agua destilada aplicándole el mismo tratamiento.

Para la preparación de la curva patrón de sacarosa 1000 ppm (1000 mg/L) se sigue el procedimiento planteado en la tabla 2. Para realizar la curva patrón y analizar la muestra se llevaron a cabo 3 repeticiones, respectivamente.

<i>Tubo</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Solución madre: sacarosa (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Agua destilada (mL)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Reactivo fenol-sulfúrico(mL)	2	2	2	2	2	2
Volumen final (mL)	3	3	3	3	3	3

Tabla 2. Preparación de curva patrón de sacarosa 1000 ppm para azúcares totales.

h) Azúcares reductores (Método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico DNS. Miller, G.L., 1959)El método DNS (técnica de Miller) es una técnica colorimétrica que emplea ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra identificando los azúcares reductores presentes en ella. El DNS solo reacciona con azúcares reductores. Para el caso de *Lippia dulcis*, como es una muestra sólida, se realiza un pretratamiento, el cual consiste en lo siguiente:

- Se coloca 1.0 g de muestra en un vaso de precipitado con 10 mL de agua destilada; se coloca en una parrilla de agitación por 20 min.
- Posteriormente se filtra (papel filtro en pliego de fabricación nacional: grado 615, abertura de poro 8 μ m, filtración media) y el filtrado se recibe sobre hielo, para evitar que la muestra se oxide.

Después de el pretratamiento a la muestra, se lleva a cabo el siguiente procedimiento para determinar azúcares reductores:

- Se colocan 0.5 mL de la muestra en un tubo de ensayo.
- A dicho tubo se le adicionan 0.5 mL del reactivo DNS (agitar en vortex), y este es colocado en un baño María a ebullición por 5 min. Pasado este tiempo se coloca en un baño con hielo por 2 min.
- Posteriormente se colocan 4 mL de agua destilada (agitar en vortex).

- Leer la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.
- Registrar la lectura de la muestra, para posteriormente, interpolar los resultados en la curva patrón de fructosa (100 ppm) y así determinar la concentración en porcentaje de azúcares reductores presentes en la muestra.
- Como blanco (es la referencia de 0 para calibrar la toma de lectura de absorbancia en el espectrofotómetro) se utilizó agua destilada aplicándole el mismo tratamiento.

Para la preparación de la curva patrón de fructosa 100 ppm (100 mg/L) se sigue el procedimiento planteado en la tabla 3. Para realizar la curva patrón y analizar la muestra se llevaron a cabo 3 repeticiones, respectivamente.

Tubo	0	1	2	3	4	5
Solución madre: fructosa (mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Agua destilada (mL)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Reactivo DNS (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Volumen final (mL)	1	1	1	1	1	1

Tabla 3. Preparación de curva patrón de fructosa 100 ppm para azúcares reductores.

3.3 Polifenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu)

El contenido polifenólico de los extractos de *Lippia dulcis*, se determinaron por el método del Folin-Ciocalteu, (referencia). Se realizó una curva de calibración de ácido gálico a una concentración de 0 a 250 ppm. Se midió la absorbancia a 790 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (marca del espectrofotómetro). Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g de muestra seca).

Para la preparación de la curva patrón ácido gálico 500 ppm se sigue el procedimiento planteado en la tabla 4. Para realizar la curva patrón y analizar la muestra se llevaron a cabo 3 repeticiones, respectivamente.

Tubo	0	1	2	3	4	5
Solución madre: ac. Gálico (μL)	0	80	160	240	320	400
Agua destilada (μL)	400	320	240	160	80	0
Reactivo Folin Ciocalteu (μL)	400	400	400	400	400	400
Agua destilada (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Volumen final (mL)	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5

Tabla 4. Preparación de curva patrón de ac. gálico 500 ppm para polifenoles totales.

3.4 Taninos condensados (Método de HCl-Butanol)

Para la determinación de taninos condensados se aplicó el método del HCl-Butanol, de acuerdo con Swain *et al.*, (1959) y Ventura-Sobre Villa (2006). Se realizó una curva de calibración de catequina a una concentración de 0 a 500 ppm y se midió a una absorbancia de 460 nm en un espectrofotómetro de UV/VIS (marca del espectrofotómetro). Los resultados se expresaron como equivalente de catequina (mg AC/g).

Para la preparación de la curva patrón de catequina 500 ppm se sigue el procedimiento planteado en la tabla 5. Para realizar la curva patrón y analizar la muestra se llevaron a cabo 3 repeticiones, respectivamente.

Tubo	0	1	2	3	4	5
Agua (μL)	0	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Catequina (μL)	0.5	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
HCL-Butanol (μL)	3	3	3	3	3	3
Ferrico (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Volumen final (mL)	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6

Tabla 5. Preparación de curva patrón de catequina 500 ppm para taninos condensados.

3.5 Extracción de compuestos previos a la cinética.

Se llevaron a cabo dos pruebas previas a la cinética.

1. Considerando dos tiempos (0 y 24 horas):

La extracción sólido-líquido fue llevada a cabo en matraces Erlenmeyer de 300 mL, donde se colocaron 4.5 g de muestra seca y la cantidad requerida (45 mL) de solvente orgánico (agua a temperatura ambiente, metanol, acetona, isopropanol y etanol); la mezcla se agitó por 3 minutos en parrilla de agitación. La primera muestra fue tomada al momento de terminar la agitación (0 horas) y para la toma de la segunda muestra fue necesario dejar la muestra en reposo dentro de los matraces Erlenmeyer hasta completar el tiempo final de 24 horas. De cada extracto, se tomaron 2 mL, los cuales fueron recolectados en tubos Eppendorf, para su posterior análisis.

Nota: las muestras obtenidas en este proceso se usaron para la determinación de azúcares totales, azúcares reductores, taninos condensados y fenoles hidrolizables.

2. Realización de lavado de la muestra con agua destilada

Para este paso de la extracción se llevó a cabo la toma de muestras con y sin previo lavado acuoso.

a) Sin lavado: En matraces Erlenmeyer de 300 mL, se colocaron 4.5 g de muestra seca y la cantidad requerida (45 mL) de solvente orgánico (metanol, acetona, isopropanol y etanol); la mezcla se agitó por 3 minutos en parrilla de agitación y se tomaron 2 mL, los cuales fueron recolectados en tubos Eppendorf, para su posterior análisis.

b) Con lavado: Con la ayuda de un embudo y un filtro de tela se procedió a realizar un lavado de 4.5 g de la muestra con agua destilada, posteriormente se recuperó la muestra ya lavada y se colocó en matraces Erlenmeyer de 300 mL, se le añadió 45 mL del solvente orgánico (metanol, acetona, isopropanol y etanol); la mezcla se

agitó por 3 minutos en la parrilla de agitación y se tomaron 2 mL, los cuales fueron recolectados en tubos Eppendorf para su posterior análisis.

Nota: las muestras obtenidas en este proceso se usaron para la determinación de taninos condensados y fenoles hidrolizables.

3.6 Cinética de extracción polifenólica y de taninos

La extracción clásica con solventes orgánicos y variando la temperatura de extracción es la herramienta básica para obtener extractos fenólicos a partir de diferentes vegetales y de frutas, así como a partir de sus residuos. Los solventes más utilizados son: metanol, etanol, acetona y hexano para las fracciones lipídicas de polifenoles. El rango de temperatura puede variar según el polifenol a extraer. Sin embargo, el valor de la temperatura no puede ser muy alta ya que se podría degradar el componente activo, restando efectividad al mismo.

La extracción sólido-líquido fue llevada a cabo en matraces Erlenmeyer de 300 mL, donde se colocaron 4.5 g de muestra seca y la cantidad requerida (45 mL) de solvente orgánico (agua a temperatura ambiente, agua a 60 °C, metanol, acetona, isopropanol y etanol); la mezcla se agitó por 3 minutos. Las muestras fueron tomadas a intervalos de 2 h durante un periodo de 12 h, hasta completar el tiempo final de extracción. De cada extracto, se tomaron 2 mL, los cuales fueron recolectados en tubos Eppendorf, para su posterior análisis.

3.6 Análisis estadístico

Los análisis fueron realizados por triplicado y expresados como promedio \pm desviación estándar. Para los gráficos se usó nomenclatura en base a letras (letras distintas implica diferencia estadísticamente significativa).

El análisis estadístico del diseño de experimentos, fue realizado mediante un diseño bloques al azar (DBA) y los resultados se le aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con una ($p \leq 0.05$) usando SAS 9.4 (SAS Institute).

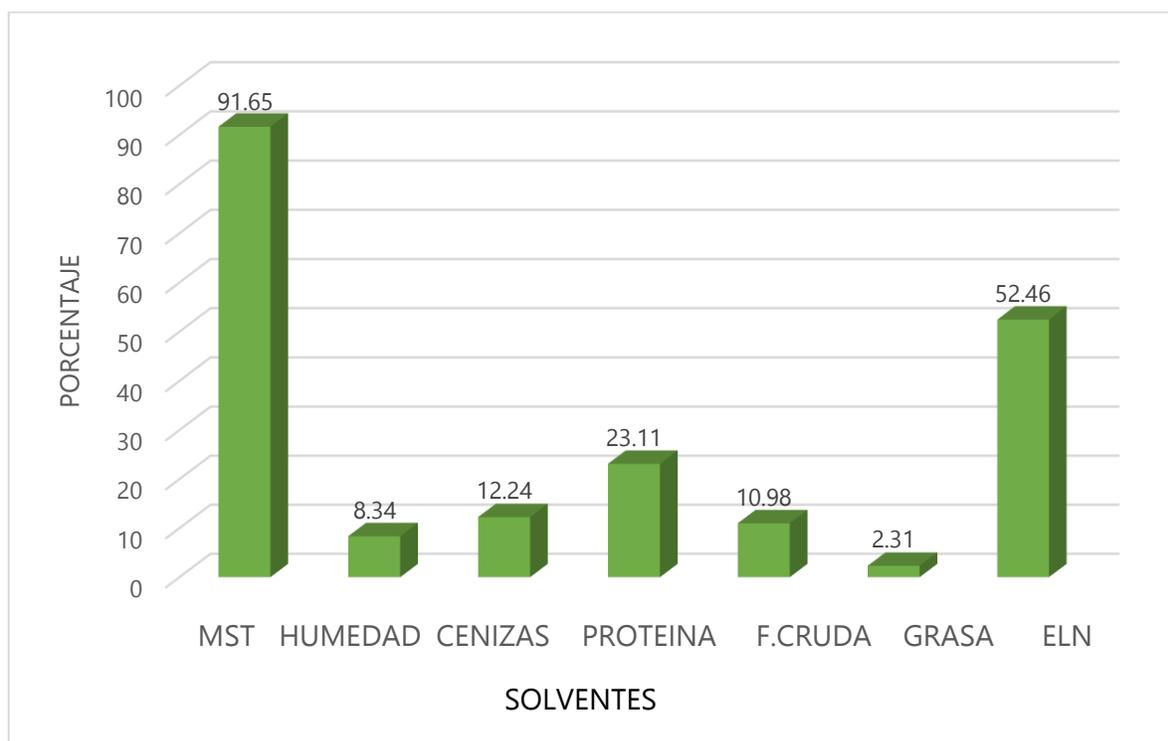
CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Análisis fisicoquímico

Los resultados mostrados en la gráfica 1 indican que la planta *Lippia dulcis* presenta un bajo contenido de humedad (8.34%), esto debido al pretratamiento de secado al sol que había recibido antes de iniciar con el análisis en laboratorio.



Gráfica 1. Análisis fisicoquímico de *L. dulcis*.

Por otro lado, el porcentaje de materia seca total obtenido fue de 91.65%; este valor es similar a lo reportado por González *et al.* (2014) en un análisis llevado a cabo para tres tipos de cultivos de *Stevia* en donde se obtuvieron porcentajes de 92.52, 94.15 y 94.85; en el mismo análisis González *et al.* (2014) encontró un contenido de grasa de 1.20, 1.84 y 1.85% cercano a los 2.31% que se obtuvo en este trabajo.

En cuanto a cenizas González *et al.* (2014) reporta 7.04, 6.27 y 7.55% en *Stevia rabudiana* (respectivamente para cada cultivo) mientras que los resultados

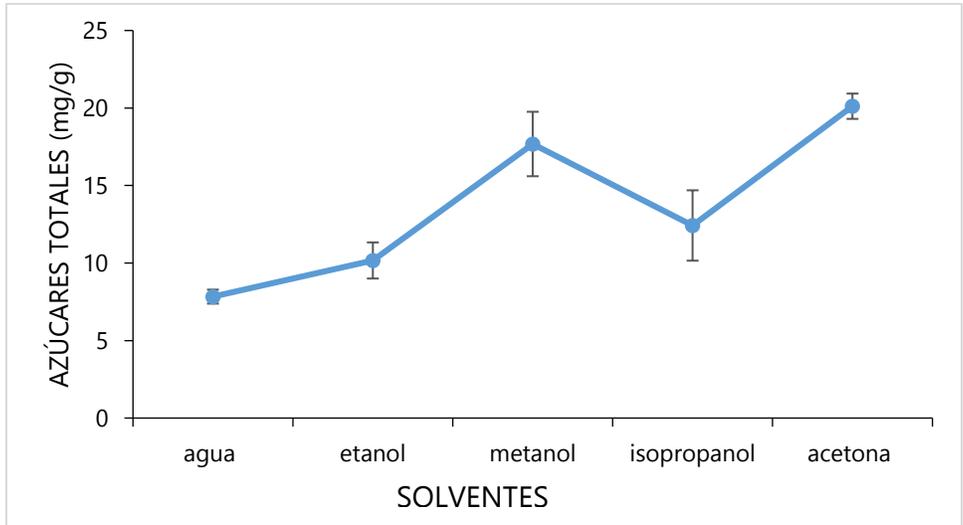
obtenidos en este trabajo mostraron un valor de 12.24% evidenciando una diferencia significativa entre dichas plantas; esta diferencia también es notoriamente positiva para el casos de *L. dulcis* en cuanto a proteína ya que González et al. (2014) menciona porcentajes de 11.13, 9.87 y 10.5 y en la gráfica 1 se puede observar claramente que el porcentaje de proteína en *Lippia dulcis* es de 23.11 superando fácilmente a la Stevia.

El extracto libre de nitrógeno *L. dulcis* tiene un 52.46% y es de importancia ya que el “ELN” representa la fracción de los carbohidratos solubles de los alimentos (azúcares simples y almidón) así como también vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados” (Caravaca et al., 2005) pudiendo ser aquí donde se encuentren los componentes que confieren el característico sabor dulce a *L. dulcis* por esa razón poder ser un potente candidato para edulcorantes naturales en alimentos.

4.2 Azúcares totales a 0 y 24 horas

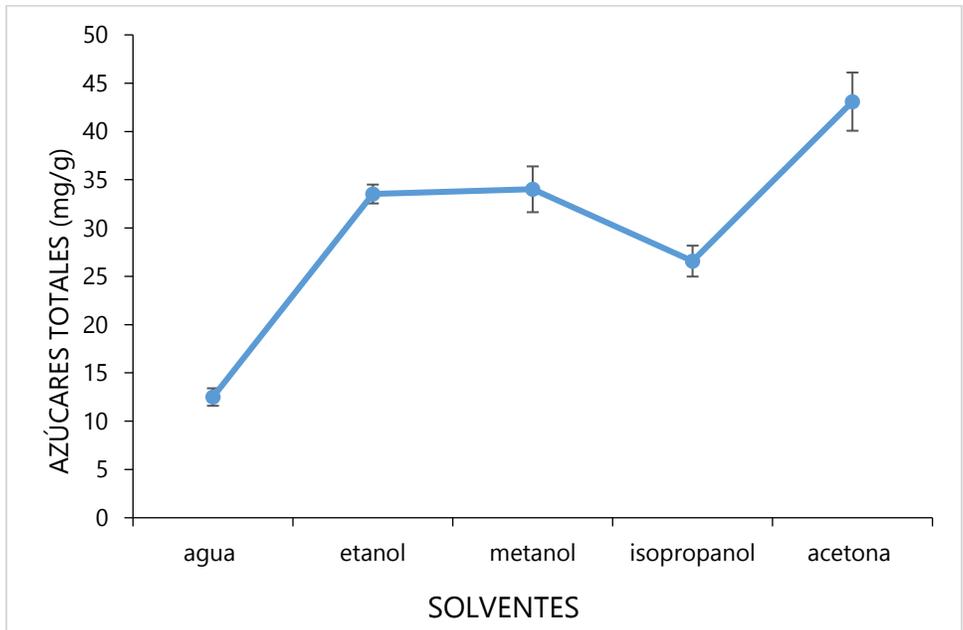
Para la valoración del azúcar Jarque (1994) recomienda el método fenol/sulfúrico puesto que es sensible, rápido y exacto. Este método determina todos los azúcares: reductores, no reductores, sustituidos o polímeros. En las plantas los azúcares como la glucosa, fructosa y sacarosa se acumulan especialmente en el jugo celular.

La gráfica 2 muestra el contenido de azúcares totales con tiempos de extracción de 0 horas de *Lippia dulcis* en donde el solvente con menos capacidad de extracción es el agua (7.83 mg/g) y el mejor solvente es la acetona con 20.11 mg/g de azúcares totales.



Gráfica 2. Contenido de azúcares totales a 0 horas.

La gráfica 3 con 24 horas de reposo de las muestras de *Lippia* obtiene los mejores resultados (en comparación con la gráfica 2) y utilizando la acetona como solvente se consigue extraer la cantidad máxima con un total de de 43.08 mg/g; mientras que la menor extracción se obtuvo con el agua (12.49 mg/g).



Gráfica 3. Contenido de azúcares totales a 24 horas.

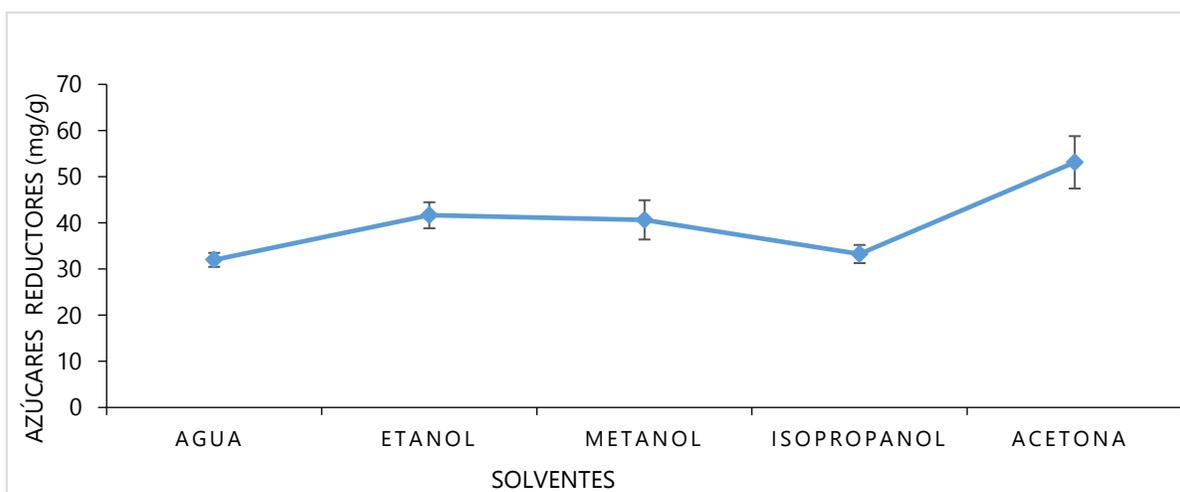
Rueda (2017) reporta que en el jugo de granada están presentes 1.37 mg/g de glucósidos, dato bajo en comparación con los 7.83 mg/g de azúcares totales cuantificados en *Lippia dulcis* mediante la realización de este trabajo (para el caso con menor extracción de agua a 0 horas); esto a pesar de que el jugo de granada tiene notorio sabor dulce.

4.3 Azúcares reductores a 0 y 24 horas

Soto (2002) señala que el método de extracción utilizando agua como solvente es ampliamente recomendado para la identificación y cuantificación de los glucósidos (responsables del sabor dulce) presentes en la stevia debido a que permite obtener un buen rendimiento.

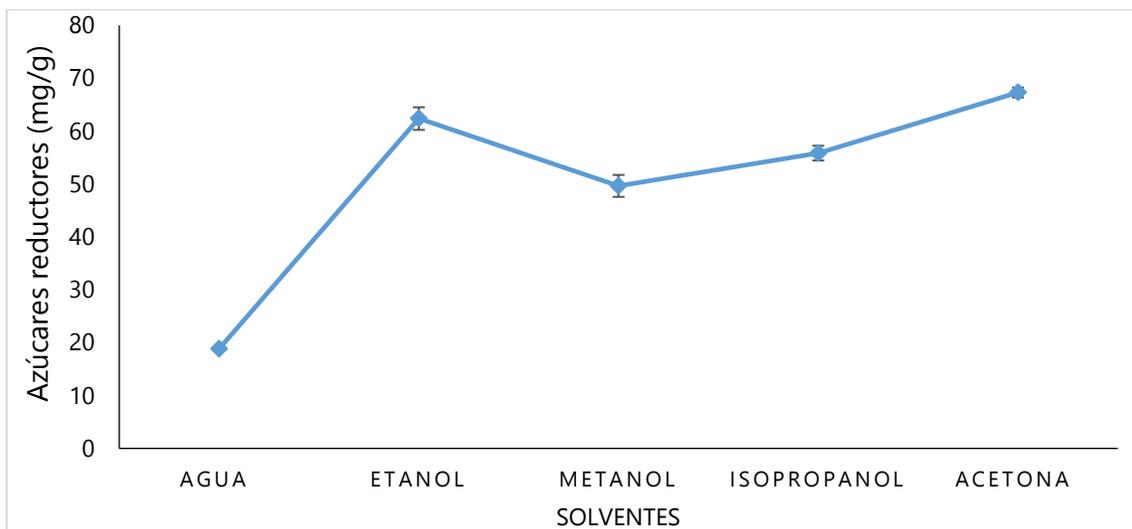
Si bien el agua permite un buen rendimiento, en las dos gráficas siguientes (4 y 5) se aprecia una capacidad superior de extracción utilizando solventes orgánicos tanto para 0 como para 24 horas.

La grafica 4 para un tiempo de extracción de 0 horas muestra una mejor captación de compuestos si se utiliza acetona (51.10 mg/g) superando este solvente a los otros cuatro (agua, etanol, metanol e isopropanol); por otro lado, el agua e isopropanol proporcionan un menor arrastre de azúcares reductores con 31.97 y 33.24 mg/g respectivamente.



Gráfica 4. Contenido de azúcares reductoras a 0 horas.

En la gráfica 5 existe un notorio incremento en la capacidad de extracción de los solventes etanol, metanol, isopropanol y acetona, perfilándose como el más apto la acetona con 67.30 mg/g. A diferencia de los demás solventes, el agua mostro una disminución en cuanto a la cantidad extraída ya que paso de 31.97 mg/g (gráfica 4) a 18.84 mg/g (gráfica 5).



Gráfica 5. Contenido de azúcares reductoras a 24 horas.

Cotejando las gráficas para azúcares reductoras (gráficas 4 y 5) se observa un ligero incremento en cuanto a la extracción en las 24 horas de reposo con los solventes y se presenta la acetona como mejor solvente en ambos tiempos con 53.10 mg/g en 0 horas y 67.30 mg/g de azúcares reductores.

Rueda (2017) reporta para jugo de granada 6.24 mg/g de azúcares reductoras, resultado inferior a cualquier dato expresado en las gráficas 4 y 5.

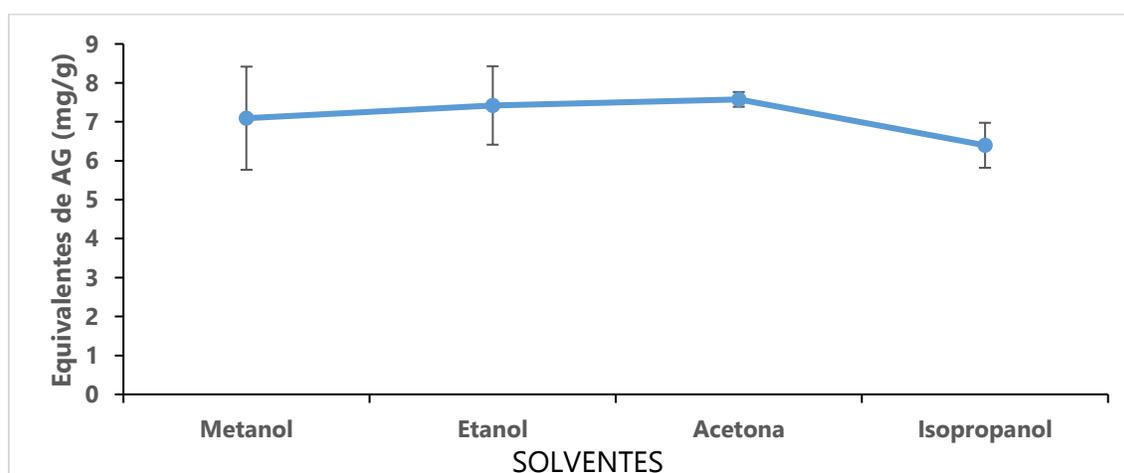
Belle et al., (2006) obtuvo 140 mg/g de azúcares reductores en el caso de jugo de caña con una concentración de 12.9 °Brix, más del doble que los 67.30 mg/g obtenidos en este trabajo con la utilización de acetona con un tiempo de 24 horas de extracción. Se desconoce los tipos de azúcares reductores que la *Lippia* pueda tener, pero para el caso de la azúcar de caña Chávez (2004) menciona que puede estar compuesto por azúcares reductores como la glucosa (en porcentaje de entre

70-88%) y fructosa (de entre 2-4%) dependiendo de la variedad y el estado de madurez.

Para el caso de la stevia, Reyes (2015) obtuvo 0.37 mg/ml de azúcares totales demostrando una gran diferencia con la *Lippia*, esta marcada desigualdad es dada por los procesos a los que Reyes (2015) sometió a sus muestras ya que realizó filtraciones con tela muselina, una segunda y tercera filtración con papel filtro #1 y #42 respectivamente; y finalmente filtró utilizando carbón activado. Además, es pertinente considerar que se utilizó agua como solvente el cual, como se demostró con la realización de este trabajo, es el solvente que extrae menor cantidad de compuestos. Por último, la temperatura de extracción a la que fueron expuestas las muestras de stevia fue a 100°C, una temperatura poco prudente ya que a partir de 60°C se pueden perder compuestos volátiles esenciales de la stevia.

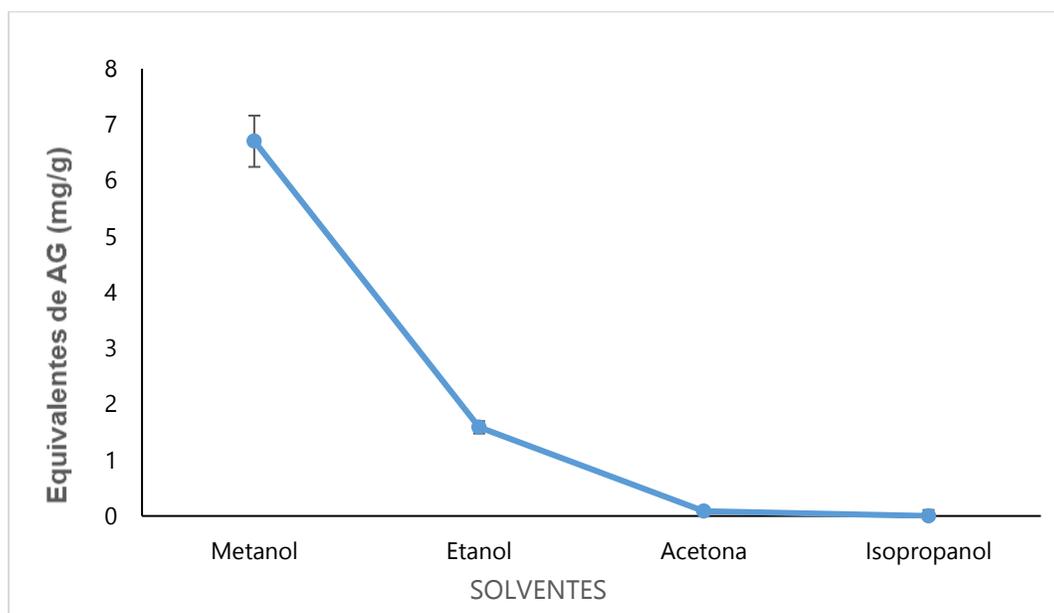
4.4 Polifenoles hidrolizables

Muestras sin previo lavado acuoso: De acuerdo a la gráfica 6 se aprecia que los solventes orgánicos extraen cantidades de fenoles destacándose que la acetona es la que mejor disuelve y libera estos compuestos químicos con 7.57 mg/g equivalentes de ácido gálico seguida del etanol (7.42 mg/g), metanol (7.09 mg/g), y por último el isopropanol (6.39 mg/g).



Gráfica 6 Cuantificación de fenoles hidrolizables en muestras de *L. dulcis* a temperatura ambiente sin lavado previo.

Muestras con previo lavado acuoso: En la gráfica 7 podemos observar que el porcentaje de extracción de compuestos es mayor en el caso de la muestra que fue tratada con metanol con un valor de 6.70 mg/g equivalentes de AG, seguido del etanol (1.58 mg/g), acetona (0.08) y el isopropanol con un valor de bajo de polifenoles.

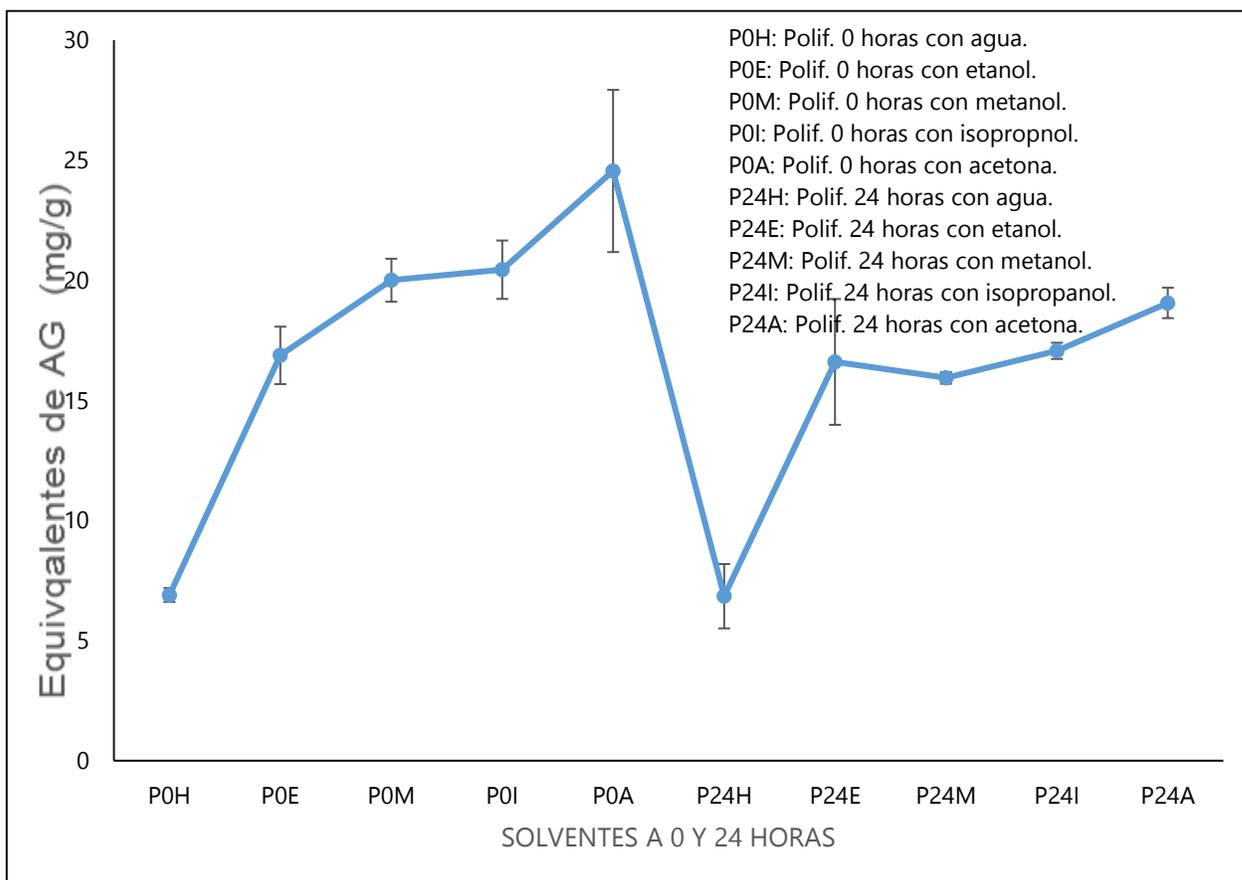


Gráfica 7. Cuantificación de fenoles hidrolizables en muestras de *L. dulcis* con un tratamiento de lavado con agua destilada.

Peña et al. (2004) manifiesta que la naturaleza polar del agua da lugar a la atracción electrostática entre sus moléculas. El hidrógeno de una molécula, en virtud de su carga parcialmente positiva es atraído hacia el oxígeno de otra molécula que a su vez posee una carga parcialmente negativa. De esta manera, cada hidrógeno de una molécula puede ser compartido con dos oxígenos de otras moléculas, del mismo modo que se comparten los electrones de dos átomos, cuando éstos forman una unión covalente. A este tipo de interacción se le llama puente de hidrógeno. Audesirk et al. (1992) también menciona que el agua es un excelente disolvente, es decir, puede disolver una amplia gama de sustancias, como proteínas, sales, aminoácidos y azúcares líquidos, como el alcohol etílico, el vinagre y la acetona o los compuestos que contienen grupos polares como el OH-(hidroxilo).

Teniendo en cuenta lo anterior se puede explicar por qué el poder de extracción de los solventes después de un previo lavado con agua destilada fue menor ya que la posibilidad de que se formaran puentes de hidrogeno entre el agua y los polifenoles es muy probable de esta manera los compuestos polifenólicos pudieron ser arrastrados junto con el agua traduciendo esto en la disminución mostrada en la gráfica 7.

La gráfica 8 muestra que la acetona se mantiene como el tratamiento más apto para extracción de polifenoles tanto para el tiempo de 0 horas (24.55 mg/g) como para 24 horas (19.05 mg/g). En contraste tenemos que los tratamientos con agua a 0 horas (6.89 mg/g) y 24 horas (6.84 mg/g) nos dan el rendimiento más bajo.

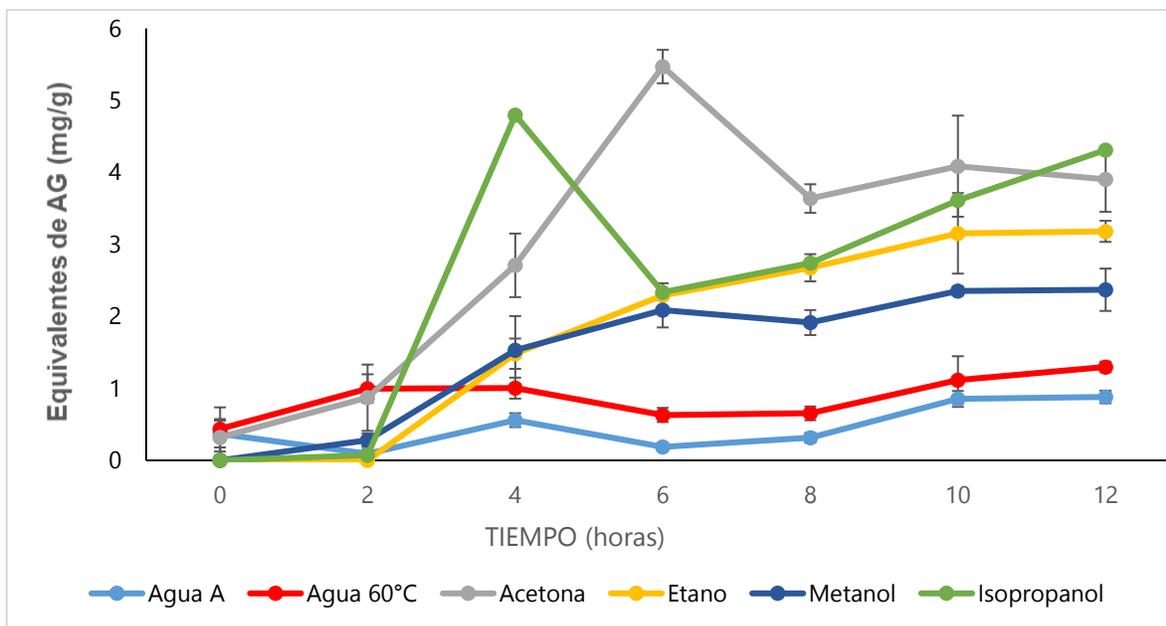


Gráfica 8. Fenoles hidrolizables en tiempos de 0 y 24 horas con distintos solventes orgánicos.

Para la cinética de extracción la gráfica 9 señala que el solvente que más extrajo compuestos fenólicos fue la acetona con un tiempo óptimo de 6 horas y una extracción de 5.47 mg/g, mientras que la menor extracción de compuestos se obtuvo con el etanol e isopropanol en tiempo de 0 horas con valores insignificantes.

Mediante el análisis estadístico mostrado en la tabla 1 de anexos también se concluye que en la acumulación cinética de fenoles hidrolizables existe diferencia estadística entre los tratamientos empleados. Donde el tratamiento IV (acetona) pudo extraer más y mejor los compuestos polifenólicos con respecto a los otros tratamientos y en el caso de los bloques se concluye que existe diferencia entre estos (tiempo de extracción) obteniéndose que el bloque IV (6 h) se extrae la máxima cantidad de dichos compuestos.

Según los resultados obtenidos por de la cuantificación de compuestos fenólicos de los extractos de *Stevia rebaudiana* usando como solvente metanol, por medio del método Folin-Ciocalteu, indican valores de 5.322, 3.919 y 2.381 mg.ÁcG/ g de muestra (Morales, 2017) comparando estos resultados contra los 5.47 mg/g obtenidos como el mejor resultado (con acetona en un tiempo de 6 horas) en este trabajo se observa una similitud entre estos valores; si también comparamos el solvente metanol este empieza con un valor de 0.32 y va aumentando hasta llegar a un máximo de 2.37 mg/g de ácido gálico el cual es bastante semejante al tercer valor reportado por Morales (2017) quien uso este solvente (metanol) en su trabajo.



Grafica 9. Comportamiento de la extracción de polifenoles a 12 h de extracción usando solventes orgánicos.

Confirmando los resultados anteriores con el análisis estadístico (tabla 6) se tiene que la acetona tiene el poder de extracción más alto a 6 horas y el etanol e isopropanol no presentan extracción de compuestos a las 0 horas.

TIEMPO (h)	Tratamiento					
	Agua TA	AGUA 60°C	Metanol	Acetona	Isopropanol	Etanol
0	0.5771 cb	0.6604 c	0.0187 e	0.5145 d	0.000 b	0.0000 e
2	0.2298 d	1.3618 b	0.4659 d	1.2021 d	0.202 b	0.0673 e
4	0.8131 b	1.3220 b	2.0284 c	3.5007 c	6.112 a	1.9659 d
6	0.3479 cd	0.9034 c	2.7229 ba	6.9520 a	3.035 ba	2.9798 c
8	0.5076 cd	0.9312 c	2.5076 b	4.6603 b	3.542 ba	3.4590 b
10	1.1345 a	1.5076 ba	3.0562 a	5.2228 b	4.633 a	4.0562 a
12	1.2159 a	1.7368 a	3.0770 a	4.9937 b	5.501 a	4.0909 a

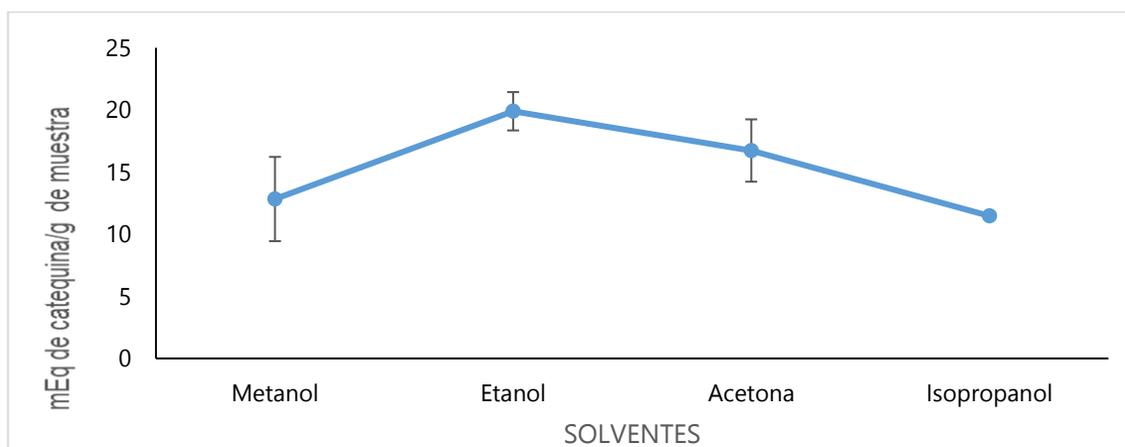
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tabla 6: Análisis estadístico de la cinética de extracción de los polifenoles hidrolizables.

4.5 Taninos condensados

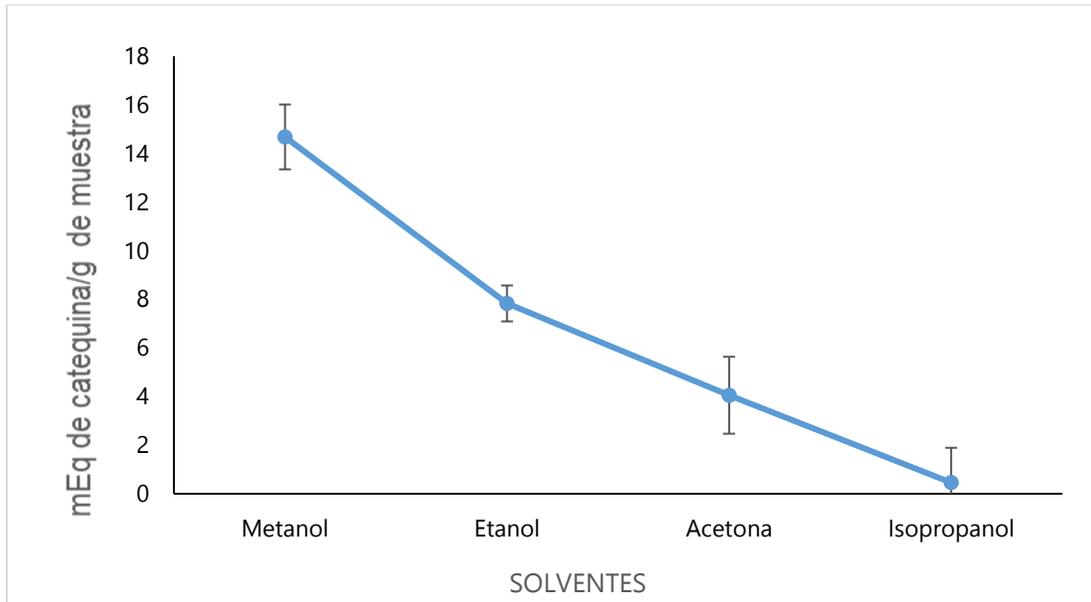
EL solvente con mejor rendimiento es el etanol (19.89 mEq./g) y el de menor extracción es el isopropanol (11.46 mEq./g) para muestras sin lavado previo (gráfica 10); mientras que para la cuantificación de taninos después de tratamiento de lavado (gráfica 11) con agua destilada resulta ser el metanol (14.67 mEq/g) el solvente con un mayor porcentaje de extracción de compuestos y el isopropanol (11.46 mEq/g) se mantiene como el más bajo.

Según menciona Monge et al. (2005) el agua tiene la característica de tener un extremo positivo y otro negativo. Esta característica se llama polaridad y le permite al agua disolver sustancias polares y cargadas, ya que la parte positiva del agua atrae a la parte negativa de la molécula y viceversa, por lo que las moléculas de agua quedan rodeadas y se evita que interactúen entre ellas. En líquidos también se observan grados variables de asociación entre sus moléculas, como en el caso del etanol, metanol, acetona y el isopropanol. También establecerse puentes de hidrogeno entre las moléculas de algunos sólidos, tales como el hielo y las proteínas. Partiendo de esta afirmación podemos considerar que al entrar en contacto con el agua la concentración de los solventes bajo por lo tanto el poder de extracción de los mismos presento una disminución mostrada en la gráfica 11 respecto a la gráfica 10.



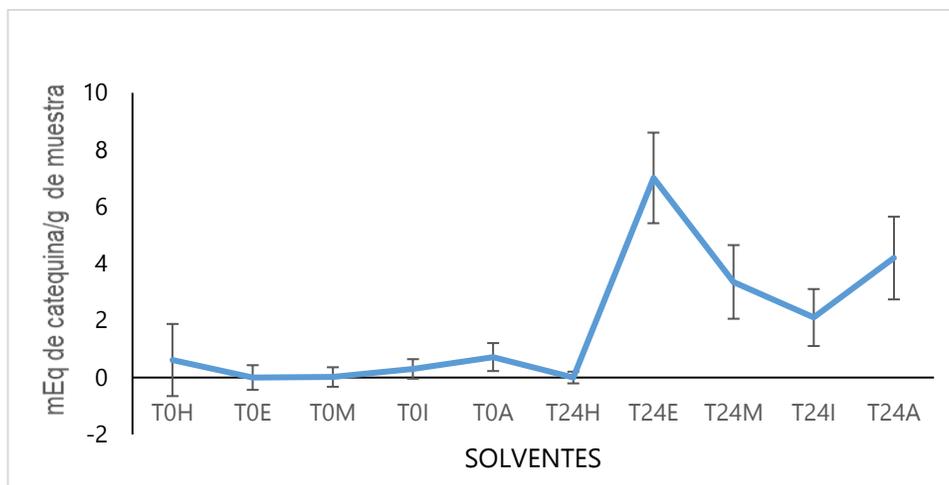
Grafica 10. Cuantificación de taninos condensados en muestras de *L. dulcis* sin lavado previo.

En cuanto a la cuantificación de taninos condensados con la realización de un previo lavado con agua destilada se puede observar que el poder de extracción disminuyó (grafica 11) teniendo un máximo de compuestos con el metanol con 14.67 mg/g y un mínimo con el isopropanol con 0.45 mg/g.



Grafica 11. Cuantificación de taninos condensados en muestras de *L. dulcis* con previo tratamiento de lavado con agua destilada.

Se observó que existe un incremento notorio en el rendimiento de taninos mostrado en los tratamientos con tiempo de 24 horas siendo el etanol (7.01 mEq./g) el solvente más apto en este tiempo y el agua como el solvente que nos da una extracción de compuestos insignificante (0 mEq/g); en el tiempo 0 el mejor tratamiento fue la acetona (0.71 mEq/g) y el que proporciono los resultados más bajos fue el etanol, el cual no logro la extracción de taninos (grafica 12).



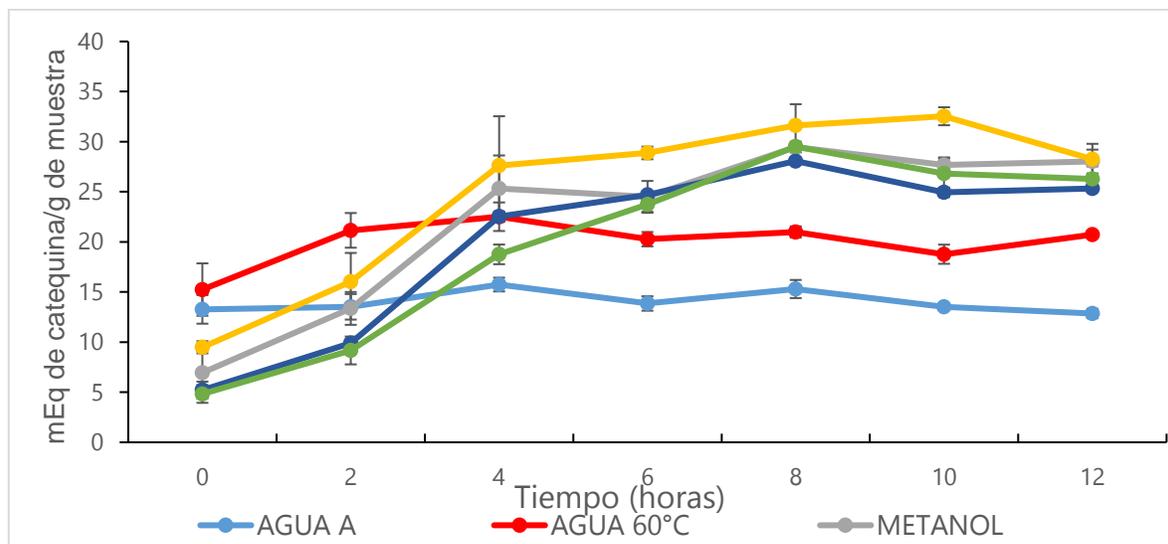
Gráfica 12. Taninos condensados en *L. dulcis* a 0 y 24 horas.

Los taninos condensados o proantocianidinas, se conocen también como no hidrolizables, ya que se hidrolizan con dificultad. Este tipo de taninos se producen en el metabolismo normal de los vegetales por lo que se consideran fisiológicos y se encuentran ampliamente repartidos en el reino vegetal. Químicamente se forman por condensación de catequinas o catecoles (flavanoles) con uniones directas C-C entre las moléculas y no contienen azúcares en su estructura. De las actividades farmacológicas de los taninos podemos destacar sus propiedades astringentes, tanto por vía interna como tópica. Presentan también los taninos propiedades antioxidantes comportándose como captadores de radicales libres. Actúan como inhibidores enzimáticos al precipitar la fracción proteica de los enzimas; esto permite en ocasiones la buena conservación de otros principios activos en las drogas, como por ejemplo algunos heterósidos, ya que impiden su hidrólisis enzimática. Las propiedades más interesantes de los taninos se deben a su capacidad de combinarse con diversas sustancias formando complejos (Formella *et al.*, 1998).

Los taninos condensados son polímeros aromáticos multihidroxilados, basados en una unidad flavonoide de 15 carbonos. Son conocidos por su amplia distribución en la naturaleza y particularmente por su alta concentración en la madera y corteza de muchas plantas. Uno de los factores principales que afectan el rendimiento de taninos en la extracción es el solvente que se utiliza. Existen diferentes solventes

para extraer taninos, algunos de ellos son acetona, metanol, etanol, agua, etc., así como mezclas de ellos (Rosales *et al.*, 2002).

Según observamos en la gráfica 13 la acetona (32.53 mEq/g) es el solvente con mejores resultados en un tiempo de 10 horas mientras que los rendimientos más bajos se obtuvieron con isopropanol (5.21 mEq/g) y etanol (4.82 mEq/g) en el tiempo inicial.



Gráfica 13. Cinética del comportamiento de la concentración de taninos usando solventes orgánicos.

Con el análisis estadístico (tabla 6) se confirma que el tratamiento con acetona tiene el poder de extracción más alto a 10 horas y que el etanol e isopropanol presentan la extracción de compuestos más baja a las 0 horas

TIEMPO (h)	Tratamiento					
	Agua TA	AGUA 60°C	Metanol	Acetona	Isopropanol	Etanol
0	13.4729 c	15.452 c	7.153 e	9.695 d	5.424 c	5.0354 f
2	13.7298 c	21.362 ba	13.570 d	16.230 c	10.105 c	9.3757 e
4	15.9521 a	22.723 a	25.542 bc	27.820 b	22.730 b	18.9659 d
6	14.0631 bc	20.480 ba	24.702 c	29.084 ba	24.897 ba	23.9659 c
8	15.5076 ba	21.202 ba	29.676 a	31.834 ba	28.278 a	29.7159 a

10	13.7229 c	18.980 b	27.909 bac	32.751 a	25.153 ba	27.0423 b
12	13.0632 c	20.931 ba	28.230 ba	28.459 ba	25.528 ba	26.4798 b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tabla 8: Análisis estadístico de la cinética de extracción de taninos condensados.

En la tabla 2 de anexos se concluye que existe diferencia estadística entre los tratamientos empleados. Destacándose que el tratamiento 4 (acetona) presenta la mayor cantidad de concentración de los taninos condensados evaluados. Se concluye también que existe diferencia entre los bloques (tiempo de extracción), destacándose que en el tiempo de 10 h se obtiene la máxima concentración de los taninos.

Para el caso de *Lippia dulcis* no existen datos o resultados que indiquen la cantidad de taninos presentes, por lo que se podría decir que los resultados presentados en este trabajo son resultados precursores para el estudio de esta planta en cuestión.

En 1883, una planta llamada *Lippia mexicana* fue sometida a estudios químicos. El resultado de esto indicó que la planta contiene taninos condensados, un compuesto que se asemeja a la quercetina y un aceite líquido volátil con olor a limón (Compadre *et al.*, 1985).

En cuanto a la acetona es el solvente que mejor extrae los taninos y a los polifenoles hidrolizables y en el extremo opuesto tenemos al agua que muestra una tendencia firme que no presenta incremento significativo en cuanto extracción de compuestos con forme pasan las horas; esto se debe a que según Lamarque *et al.* (2008) los compuestos orgánicos son generalmente más solubles en disolventes orgánicos que en agua. La elección del disolvente depende de la solubilidad del compuesto a extraer, de la volatilidad, la inflamabilidad y la toxicidad de los posibles solventes a emplear se aplica la regla que dice: lo semejante disuelve lo semejante, es decir, cuanto mayor sea la afinidad de la muestra orgánica por el disolvente de extracción elegido más fácilmente se extraerá.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la caracterización bromatológica de *L. dulcis*, en donde se puede destacar los valores de E.L.N con un porcentaje de 52.46 que es de gran importancia ya que aquí pudieran estar contenidos los azúcares presentes en la *Lippia dulcis* destacando su posible utilización como edulcorante natural.

Se concluye que *Lippia dulcis* es un edulcorante debido a la cuantificación de azúcares totales y reductores; en este trabajo se observa que existe una considerable cantidad de azúcares. Se obtuvo una cantidad considerable de “azúcares totales” con 43.08 mg/g y para azúcares reductores con 67.30 mg/g, en ambos casos el solvente que mejor logró concentrarlos fue la acetona, este último valor representa casi la mitad de azúcares reductores presentes en jugo de caña, de acuerdo a reportes de varios autores.

Todo el tiempo se buscan novedosas formas de ponerle sabor, color o textura a los alimentos para que sean atractivos y apetecibles, pero sobre todo que sean alimentos sanos y benéficos; *Lippia dulcis* puede tener altas posibilidades de incorporarse al sector agroindustrial como materia prima y con ello potenciar su valor agregado. Su contenido de azúcares podría despertar el interés de la industria para enfocar sus recursos en esta planta y aprovechar al máximo este recurso vegetal nativo del sur mexicano.

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS

VI. PERSPECTIVAS

Debido a los limitados estudios realizados a la planta *L. dulcis* es pertinente recomendar que se considere un estudio de laboratorio detallado para determinar su uso como agente edulcorante, así como también trabajar no solo con los aceites esenciales si no también con el resto de los componentes de esta planta ya que al priorizar estos (aceites esenciales) se están dejando a un lado constituyentes no volátiles pudiendo tener alguna importancia en su característico sabor dulce.

Antes de llevar a cabo cualquier análisis es conveniente identificar de manera correcta la especie de *L. dulcis* con la que se esté trabajando ya que se ha demostrado que entre cada una pueden existir diferencias de gran peso en una investigación; como es el caso tan polémico de la presencia de alcanfor en algunas especies mexicanas.

Para un acercamiento más certero hacia el potencial edulcorante es necesario llevar a cabo un análisis de azúcares totales y azúcares reductores; así como realizar análisis de HPLC-MS (cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas) para conocer los compuestos presentes en mayor cantidad de *L. dulcis*.

CAPÍTULO VII

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Audesirk T., Audesirk G., Byers B. (1996). Biología la vida en la tierra. Universidad de Massachusets, Denver. Página 28.
- Barrancos M, J., Barrancos P. (2006). Operatoría dental: integración clínica. Editorial Médica Panamericana. 4ª edición. Buenos Aires. Página 386-389.
- Barros S, C. (2009). Los Aditivos en la Alimentación de los Españoles y la Legislación que Regula Su Autorización y Uso. Madrid (España). Editorial Visión Libros. 2ª ediccion. Página 528-231.
- Bello G, D., Carrera B, E., Díaz M, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Cuba. La Habana, Cuba.
- Biesalski H, K., Grimm P., Nowitzki G, S., (2007). Nutrición: texto y atlas. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; Madrid. Página 282-284.
- Calderón M. (2003). Desarrollo de tecnología de cultivo de plantas medicinales y producción de fitoterápicos. Cuarto ciclo de Evaluaciones de Proyectos FEMCIDI. Guatemala.PDF.
- Calleja M, M. (2016). Plantas Medicinales. Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Químicas y Biológicas. Guerrero.
- Calvo R, M. (2014). Bioquímica de los alimentos. Universidad de Zaragoza. Madrid, España.
- Cameán A.M., Repetto M. (2012). Toxicología Alimentaria. Editorial Díaz de Santos. Madrid. Página 488.
- Canosa R, M.P. (2009). Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenes aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. Universidad de Santiago de Compostela. España. Página 38-40.
- Caravaca R, F.P., Castel G, J.M., Guzmán G, J.L., Delgado P, M. Mena G, Y. Alcalde A, M.J. González R, P. (2005). Bases de la producción animal. Servicio de publicaciones de la universidad de Huelva. España. Página 552.
- Chávez S, M., (2004). La caña de azúcar como materia prima para la producción de alcohol carburante. Centro de Investigación del Sector Azucarero Costarricense. San José, Costa Rica.

- Colegate S., Molyneux R. (2000). Bioactive Natural Products. Florida, USA. Editorial CRC press. Página 181.
- Compadre, C.M., Robbins, E.F., Kinghorn D. (1986). The intensely sweet herb, *Lippia dulcis trev.*: historical uses, field inquiries, and constituents. **Journal of ethnopharmacology**. 89-106.
- Coy J., Franz M. (2017). La nueva dieta anti-cáncer. Editorial Hispano Europea. Página 68.
- De Icaza T, G. (2018). La vida Útil de los alimentos y sus principales reacciones. Editorial Lugares de México. Ciudad de México. 2ª edición. 96-96.
- Decreto 2106/1996. (1996). Agencia Estatal Boletín del estado Real. Ministerio de la Presidencia Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática. Decreto 2106/1996, de 20 de septiembre, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios. Gobierno de España.
- Durán A, S., Quijada M, M., Silva V, L., Almonacid M, N., Rodríguez N, M. (2011). Niveles de ingesta Diaria de edulcorantes no nutritivos en escolares de la región de Valparaíso. Santiago, Chile.
- Durán A, S., Rodríguez N, M.P., Córdón A, K., Record C, J. (2012). Estevia (*stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. **Revista Chilena de nutrición**.
- FAO/OMS. (1999). Alimentación y Nutrición. Los carbohidratos en la nutrición humana. Roma. Página 112.
- Fonnegra G, R., Jiménez R, S. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. 2ª edición. Colombia. Página 7-10.
- Formella H, B.J., Bohnsack K., Rippke F., Benner G., Rudolph M., Tausch I., Gassmueller J. (1998). Anti-inflammatory of Hamamelis lotion in UVB erythema test. **Dermatology**; 196 (3): 316-22.
- Fossas F, J. (2012). Remedios naturales para la diabetes: Alimentación y estilo de vida para la diabetes. Editorial RBA Libros. Barcelona. España.
- Francisco O, P., Francisco M, R.A., Bolzan A., Barth D. (2012). Supercritical fluid extraction of hernandulcin from *Lippia dulcis trev.* **Journal of supercritical fluids**. 63: 161-168.
- Funari C.S., Eugster P.J., Martel. S., Carrupt P.A., Wolfender J.L., Silva H.S. (2012). High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass

spectrometry depeplication strategy for the metabolite profilbg of Brazilian *Lippia* species. **Journal of chromatography A**. 1259 (2012) 167-178.

García G., Quintero R., López M. (2004). Biotecnología Alimentaria. México. Editorial LIMUSA. Página 542-551.

García R. (2011). Análisis del mercado de los edulcorantes en México. Reporte de resultados. Universidad Autónoma Chapingo.

Gastalver R, M.C. (2015). Supervisión y ejecución de técnicas aplicadas a productos de confitería. Editorial elearningd. España. Pagina 49-52. UF1741

Gennaro A. R. (2000). Remeongton Farmacia. Editorial Panamericana. 2da. Edición. Buenos Aires, Argentina. Página 873.

Gil Esparza, A.M. (1999). Los aditivos edulcorantes. Alimentación, Nutrición y Salud. 6 (2): 54-58.

Gil H, Á. (2010). Tratado de Nutrición, tomo II, Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. 2ª edición. Madrid, España. Editorial medica Panamericana.

Gómez C., Palma M, S. (2013). Libro blanco del azúcar. Instituto de estudios documentales del azúcar y la remolacha. Madrid. Pp. 49-65.

González C., Tapia M.S., Pérez E., Dornier M., Morel G. (2014). Caracterización de cultivares de *stevia rebaudiana* Bertoni de diferentes procedencias. **Bioagro**, 2014; 26(2): 79-88.

Granados D, N. (2009). Phyla dulcis (Trevir). Moldenke: Descripción de características anatómicas diagnosticas de la droga cruda. Universidad de San Carlos de Guatemala.PDF.

Gross O. (2013). El ABC de la pastelería. Grupo Editorial Planeta. Buenos Aires. 56-60.

Harris N, O., García G, F. (2005). Odontología preventiva primaria. 2ª edición. Editorial El Manual Moderno. Ciudad de México. Página 297

Herradón B. (2011). La química de los alimentos: definición y clasificación de edulcorantes. Universidad Rey Juan Carlos. Madrid, España.

Jarque G, R. (1994). Química avanzada. Editorial Reverté. Barcelona, España. Página 159.

Lad V, A. La ciencia de curarse uno mismo: Guía práctica de medicina ayurvédica. Editorial Lotus Press. Estados Unidos. 1988. Página 139.

- Lamarque A., Zygadlo D., López L., Torres M., Maestri D. (2008). Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. Encuentro grupo editor. Argentina. Página 44-45
- León J, J. (2011). Edulcorantes: ¿Dulce Historia?. Departamento de química. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Luque M.D., Valcárcel M., Tena M.T. (1993). Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. Editorial Reverté. España. Página 119.
- Macia E., Monesterolo V. (2008). Evaluación de los procesos de extracción y purificación de los compuestos endulzantes de la hoja de *Stevia rebaudiana*. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa María. Córdoba, Argentina.
- MARTINEZ J.V., CACERES A. (2000). Fundamentos de Agrotecnología de cultivo de Plantas Medicinales. Iberoamericana. Habana, Cuba. página 534-537.
- Monge N, J., Gómez F, P., Rivas R, M. (2005). Biología general. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. Página 55
- Morales O, L.T. (2017). Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto vegetal obtenido de un cultivo comercial de *Stevia rebaudiana* ubicado en Olaya (Antioquia). Universidad de Tolima. Página 36-37.
- Moya M.A. (1995). Aprovechamiento de lactosueros por fermentación: producción de ácido L-láctico. Servicio de publicaciones de la universidad de castilla, España. Página 46.
- Navarro A, M. (2012). Aspectos bromatológicos y toxicológicos de los edulcorantes. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España. Pág. 476-477.
- Navarro Alarcon Miguel. (2012). Aspectos bromatológicos y toxicológicos de los edulcorantes. Monografía. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España.
- Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. Fecha de publicación: 22 de enero de 2013.
- Núñez M., Navarro C. (2013). Guía Completa de Aditivos Alimentarios. Editorial RBA libros. Barcelona (España). PDF.
- Pascual M. E., Slowing K., Carretero E., Mata D., Villar A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**. 201-214.

- Peña D, A., Arroyo B, A., Gómez P, A., Tapia I, R. (2004). Bioquímica. Editorial Limusa. México. Página 51-53.
- Pérez Leonard Heidy. (2006). Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Ciudad de la Habana, Cuba. PDF.
- Pérez S., Meckes M., Pérez C., Susunaga A., Zavala M.A. (2005). Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. Review. **Journal of Ethnopharmacology**. 102, 1-4.
- Pichardo C, L.M. (2019). Aditivos que Mejoran las Propiedades Sensoriales. Universidad Nacional del Callao, Facultad de Ingeniería Pesquera y Alimentos. Perú.
- Repetto J, M., Repetto K, G. (2009). Toxicología Fundamental. 4ª edición. Editorial Diaz de Santos. Sevilla, España. Página 529-531.
- Requejo M, A.M., Ortega A, R.M. (2006). Nutriguía. Manual de Nutrición clínica en atención Primaria. Universidad Complutense de Madrid. España. Editorial Complutense. Página 145-147.PDF.
- Requena R, A., Tomás B, L.M. (2008). Tríadas: Nuevas Lecturas en Ciencia y Tecnología. Universidad de Murcia. Editorial Netbiblo. España. Página 36-37.
- Reyes S, A. (2015). Extracción y cuantificación de compuestos activos presentes en la stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), mediante procesos físicos. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México.
- Rodríguez R, V.M., Simón M, E. (2008). Bases de la alimentación Humana. España. Editorial Netbiblo. Página 135-136.PDF.
- Román O, F. (1999). Diccionario de Medio Ambiente y Materias Afines. Editorial FC. Madrid, España. Página 146.PDF.
- Rosales M., Galindo A., González R.F. (2002). Sumario de información tecnológica: Taninos condensados en la corteza de *Pinus chihuahuana* y *Pinus durangensis*. Centro de información tecnológica, Chile. Vol. 13. 39-42.
- Rueda A, A. (2017). Degradación de residuos de granada para la obtención de compuestos de interés agroalimentario. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México.
- Sánchez G, M. (2014). Edulcorantes: Utilización y aprovechamiento en diferentes procesos de la industria alimentaria. Tesis licenciatura. Toluca, México. Universidad Autónoma del Estado de México.

- Santamaría L., Martínez L. (2015). Lo que debes saber sobre los edulcorantes. Salud Panamá. Pág. 71-79.
- Solano V, G. (2018). Stevia, la hierba dulce. Grupo Liberciencia. [En línea] citado el 09 de abril del 2019. Disponible en:<http://100ciasytecnoprofsolano.blogspot.com/2018/10/stevia-la-hierba-dulce.html>. PDF.
- Sosa H, P. (1998). El azúcar de mesa. Facultad de química de la UNAM. Revista de divulgación científica. Ciudad de México. Citado en línea. Disponible en: <https://scholar.google.com.mx/citations?user=l4hjmtAAAAAJ&hl=es>
- Soto, A, E. (2002). Extracción de los principios edulcorantes de la Stevia rebaudiana. **Revista de ciencias agrarias y tecnológica de alimentos**, vol. 20, 1666-2016.
- Souto B, F., Echevarría M,J.,Cárdenas G, O., Acuña R, P., Meléndez P, A., Romero R, L. (1997). Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. 691-697. **Phytochemistry** vol. 44.
- Valdés M, E., Ruiz O, M. (2009). Edulcorantes en alimentos: aplicaciones y normativas. Food Tech Summit & expo. Revista **Énfasis**.
- Velásquez G. (2006). Fundamentos de alimentación saludable. Editorial Universidad de Antioquia, Colombia. 2006. Página 79.

ANEXOS

Tabla 1: análisis de varianza de Fenoles hidrolizables (ANOVA).

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	F _c	F _{t0.05}
Tratamientos	5	58.491	11.698	16.545	2.53
Bloques	6	13.533	2.255	3.189	2.42
Error	30	21.219	0.707		
Total	41	93.243			

Tabla 2: análisis de varianza de taninos condensados (ANOVA).

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	F _c	F _{t 0.05}
Tratamientos	5	449.7803	89.9560	4.7172	2.53
Bloques	6	1371.273	228.5455	11.9849	2.42
Error	30	572.0837	19.0694		
Total	41	2393.137			

Tabla 3: Fenoles hidrolizables con diferentes solventes sin tratamiento de lavado con agua destilada.

Sin Lavar	mg/g
Metanol	7.09222
Etanol	7.42
Acetona	7.57556
Isopropanol	6.39778

Tabla 4: Fenoles hidrolizables con diferentes solventes y lavado previo con agua destilada.

Lavado	mg/g
Metanol	6.70333
Etanol	1.58667
Acetona	0.08667

Isopropanol	0
-------------	---

Tabla 5: Fenoles hidrolizables con diferentes solventes en tiempos de 0 y 24 horas.

TRATAMIENTOS	mg/g
POLIFENOL 0 hrs. (agua)	6.89778
POLIFENOL 0 hrs. (etanol)	16.8756
POLIFENOL 0 hrs. (metanol)	20.0033
POLIFENOL 0 hrs. (isopropanol)	20.4422
POLIFENOL 0 hrs. (acetona)	24.5533
POLIFENOL 24 hrs. (agua)	6.84778
POLIFENOL 24 hrs. (etanol)	16.6033
POLIFENOL 24 hrs. (metanol)	15.9367
POLIFENOL 24 hrs. (isopropanol)	17.0644
POLIFENOL 24 hrs. (acetona)	19.0589

Tabla 6: Fenoles hidrolizables con diferentes solventes a 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

TIEMPOS	mg/g T1	mg/gT2	mg/gT3	mg/g T4	mg/gT5	mg/gT6	mg/gT7
Agua A	0.37	0.09222222	0.55888889	0.18666667	0.31444444	0.85333333	0.88111111
Agua 60°C	0.43666667	0.99777778	1.00333333	0.63111111	0.65333333	1.11444444	1.29777778
Acetona	0.32	0.87	2.70888889	5.47	3.63666667	4.08666667	3.90333333
Etanol	0	0	1.48111111	2.29222222	2.67555556	3.15333333	3.18111111
Metanol	0	0.28111111	1.53111111	2.08666667	1.91444444	2.35333333	2.37
Isopropanol	0	0.07	4.79777778	2.33666667	2.74222222	3.61444444	4.30888889

Tabla 7: Taninos condensados con diferentes solventes sin lavado previo con agua destilada.

sin lavar	mg/g
Metanol	12.8298611
Etanol	19.8923611
Acetona	16.7326389
Isopropanol	11.46875

Tabla 8: Taninos condensados con diferentes solventes y lavado previo con agua destilada.

Lavado	mg/g
Metanol	14.6770833
Etanol	7.82986111
Acetona	4.05208333
Isopropanol	0.45833333

Tabla 9: Taninos condensados con diferentes solventes en tiempos de 0 y 24 horas.

TRATAMIENTOS	mg/g
TANINOS 0 hrs. (agua)	0.61458333
TANINOS 0 hrs. (etanol)	0
TANINOS 0 hrs. (metanol)	0.01736111
TANINOS 0 hrs. (isopropanol)	0.30208333
TANINOS 0 hrs. (acetona)	0.71875
TANINOS 24 hrs. (agua)	0
TANINOS 24 hrs. (etanol)	7.01041667
TANINOS 24 hrs. (metanol)	3.35763889
TANINOS 24 hrs. (isopropanol)	2.10763889
TANINOS 24 hrs. (acetona)	4.19791667

Tabla 10: Taninos condensados (en general) con diferentes solventes a 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

SOLVENTE	mg/g T1	mg/gT2	mg/gT3	mg/g T4	mg/gT5	mg/gT6	mg/gT7
AGUA A	13.2604167	13.5173611	15.7395833	13.8506944	15.2951389	13.5104167	12.8506944
AGUA 60°C	15.2395833	21.1493056	22.5104167	20.2673611	20.9895833	18.7673611	20.71875
METANOL	6.94097222	13.3576389	25.3298611	24.4895833	29.4618056	27.6631944	28.0173611
ACETONA	9.48263889	16.0173611	27.6076389	28.8715278	31.6215278	32.5381944	28.2465278
ISOPROPANOL	5.21180556	9.89236111	22.5173611	24.6840278	28.0659722	24.9409722	25.3159722
ETANOL	4.82291667	9.16319444	18.7534722	23.7534722	29.5034722	26.8298611	26.2673611

Tabla 11: cinética de fenoles hidrolizables con agua a temperatura ambiente a 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

DUNCAN		MEDIA	N	TIEMPO
AGRUPAMIENTOS				
	A	1.2159	3	12
	A	1.1345	3	10
	B	0.8131	3	4
C	B	0.5771	3	0
C	D	0.5076	3	8
C	D	0.3479	3	6
	D	0.2298	3	2

Tabla 12: cinética de fenoles hidrolizables con agua a temperatura a 60°C a 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

DUNCAN		MEDIA	N	TIEMPO
AGRUPAMIENTOS				
	A	1.7368	3	12
B	A	1.5076	3	10
B		1.3618	3	2
B		1.3220	3	4
	C	0.9312	3	8
	C	0.9034	3	6
	C	0.6604	3	0

Tabla 13: cinética de fenoles hidrolizables con metanol 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

DUNCAN		MEDIA	N	TIEMPO
AGRUPAMIENTOS				
	A	3.0770	3	12
	A	3.0562	3	10
B	A	2.7229	3	6
B		2.5076	3	8
	C	2.0284	3	4
	D	0.4659	3	2
	E	0.0187	3	0

Tabla 14: cinética de fenoles hidrolizables con acetona 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Medias con la misma letra no son

DUNCAN AGRUPAMIENTOS		MEDIA	N	TIEMPO
	A	6.9520	3	6
	B	5.2228	3	10
	B	4.9937	3	12
	B	4.6603	3	8
	C	3.5007	3	4
	D	1.2021	3	2
	D	0.5145	3	0

misma letra no

significativamente diferentes.

Tabla 15: cinética de fenoles hidrolizables con isopropanol 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

DUNCAN AGRUPAMIENTOS		MEDIA	N	TIEMPO
	A	6.112	3	4
	A	5.501	3	12
	A	4.633	3	10
B	A	3.542	3	8
B	A	3.035	3	6
B		0.202	3	2
B		0.000	3	0

Tabla 16: cinética de fenoles hidrolizables con etanol 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

DUNCAN AGRUPAMIENTOS		MEDIA	N	TIEMPO
	A	4.0909	3	12
	A	4.0562	3	10
	B	3.4590	3	8
	C	2.9798	3	6
	D	1.9659	3	4
	E	0.673	3	2
	E	0.000	3	0

Tabla 17: cinética de taninos condensados con agua a temperatura ambiente a 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

DUNCAN AGRUPAMIENTOS		MEDIA	N	TIEMPO
	A	15.9521	3	4
B	A	15.5076	3	8
B	C	14.0631	3	6
	C	13.7298	3	2
	C	13.7229	3	10
	C	13.4729	3	0
	C	13.0632	3	12

Tabla 18: cinética de taninos condensados con metanol a 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

DUNCAN AGRUPAMIENTOS			MEDIA	N	TIEMPO
	A		29.676	3	8
B	A		28.230	3	12
B	A	C	27.909	3	10
B		C	25.452	3	4
		C	24.702	3	6
	D		13.570	3	2
	E		7.153	3	0

Tabla 19: cinética de taninos condensados con acetona a 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

DUNCAN AGRUPAMIENTOS			MEDIA	N	TIEMPO
	A		32.751	3	10
B	A		31.834	3	8
B	A		29.084	3	6
B	A		28.459	3	12
B			27.820	3	4
	C		16.230	3	2
	D		9.695	3	0

Tabla 20: cinética de taninos condensados con isopropanol a 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

DUNCAN AGRUPAMIENTOS		MEDIA	N	TIEMPO
	A	28.278	3	8
B	A	25.528	3	12
B	A	25.153	3	10
B	A	24.897	3	6
B		22.730	3	4
	C	10.105	3	2
	C	5.424	3	0

Tabla 21: cinética de taninos condensados con etanol a 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

DUNCAN AGRUPAMIENTOS		MEDIA	N	TIEMPO
	A	29.7159	3	8
	B	27.0423	3	10
	B	26.4798	3	12
	C	23.9659	3	6
	D	18.9659	3	4
	E	9.3757	3	2
	F	5.0354	3	0