

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS**  
**ALIMENTARIAS**



**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ACÚSTICA DE COMPUESTOS**  
**BIOACTIVOS DE *Verbena officinalis* L. (Verbena) Y SU COMPARACIÓN CON LA**  
**EXTRACCIÓN CONVENCIONAL**

**Tesis**

Para optar el título de:

**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Presentado por:

**MATOS VASQUEZ, HANNDY ALDAIR**

Tingo María-Perú

2026



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
Tingo María  
**FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**  
Carretera Central Km. 1.21. Apartado Postal 156 Tingo María  
E.mail; [fia@unas.edu.pe](mailto:fia@unas.edu.pe)

*"Año de la esperanza y el fortalecimiento de la democracia"*

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 004-2026**

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 12 de marzo del 2026, a horas 9:00 a.m., en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco, para calificar la tesis presentada por el Bach. **HANNDY ALDAIR MATOS VASQUEZ**, titulada:

**"OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ACÚSTICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Verbena officinalis* L. (Verbena) Y SU COMPARACIÓN CON LA EXTRACCIÓN CONVENCIONAL"**

Después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran Aprobado..... con el calificativo de Excelente.....; en consecuencia, el sustentante, queda **APTO** para obtener el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias**, de conformidad con el artículo 45° numeral 45.2, de la Ley Universitaria 30220; los artículos 132 inciso "k" y 135 inciso "f" del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 12 de marzo del 2026

  
Dr. Alfredo Abelardo Carmona Ruiz  
Presidente

  
Dra. Yolanda Jesús Ramírez Trujillo  
Miembro

  
M.Sc. Humberto Hugo Rivera Rojas  
Miembro

  
Dr. Jaime Eduardo Basilio Atencio  
Asesor

  
Dr. Melchor Soria Iturri  
Asesor



UNAS

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN

UNIDAD DE SOPORTE CIENTÍFICO REPOSITORIO INSTITUCIONAL

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"  
"Año de la Esperanza y el Fortalecimiento de la Democracia"

## CERTIFICADO DE SIMILITUD T.I. N 158 - 2026 - CS-RIDUNAS

El Jefe de la Unidad de Soporte Científico de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, quien suscribe,

### CERTIFICA QUE:

El Trabajo de Investigación; aprobó el proceso de revisión a través del software TURNITIN, evidenciándose en el informe de originalidad un índice de similitud no mayor del 25% y contenido generado por Inteligencia Artificial menor o igual al 20%. Según establece el Art. 29° y 30° del Acuerdo Nro.017-2025-CIUNAS-VRI-UNAS.

### Programa de Estudio:

Ingeniería en Industrias Alimentarias

### Tipo de documento:

Tesis	X	Trabajo de Suficiencia Profesional	
-------	---	------------------------------------	--

TÍTULO	AUTOR	PORCENTAJE	
		SIMILITUD	CONTENIDO GENERADO POR INTELIGENCIA ARTIFICIAL
OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ACÚSTICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE <i>Verbena officinalis</i> L. ( <i>Verbena</i> ) Y SU COMPARACIÓN CON LA EXTRACCIÓN CONVENCIONAL	MATOS VASQUEZ, HANNDY ALDAIR	09 % Nueve	0 % Cero

Tingo María, 01 de junio de 2026.

  
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA  
UNIDAD DE SOPORTE CIENTÍFICO  
ING. EINSTEIN A. ORTIZ MORALES  
JEFE

C.C. Archivo

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN**  
**INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ACÚSTICA DE COMPUESTOS**  
**BIOACTIVOS DE *Verbena officinalis* L. (Verbena) Y SU COMPARACIÓN CON LA**  
**EXTRACCIÓN CONVENCIONAL**

- Autor** : MATOS VASQUEZ, HANNDY ALDAIR
- Asesor(es)** : Dr. BASILIO ATENCIO JAIME EDUARDO  
Dr. SORIA ITURRI MELCHOR
- Área de investigación** : Ciencias de Alimentos
- Grupo de investigación** : Ingeniería de Alimentos-IA
- Línea de investigación** : Ingeniería de Alimentos
- Lugar de ejecución** : Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- Duración** : 18 meses
- Financiamiento** : Propio y Prociencia-Concytec (CONTRATO N°  
PE501082418-2023-PROCIENCIA)

**Tingo María – Perú. 2026**



# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

Tingo María

## VICERRECTORADO DE INVESTIGACION DIRECCIÓN DE GESTIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

“Promoviendo la Calidad de la Investigación”

### REGISTRO DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO UNIVERSITARIO

<b>Universidad</b>	: Universidad Nacional Agraria de la Selva
<b>Facultad</b>	: Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias
<b>Escuela Profesional</b>	: Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias
<b>Título de Tesis</b>	: OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ACÚSTICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE <i>Verbena officinalis</i> L. (Verbena) Y SU COMPARACIÓN CON LA EXTRACCIÓN CONVENCIONAL
<b>Objetivo General</b>	: Extraer con ondas acústicas los compuestos bioactivos de la <i>V. officinalis</i> L. (Verbena) y comparar con la extracción convencional en términos del contenido polifenólico, flavonoides y capacidad antioxidante.
<b>Autor de la Tesis</b>	: Matos Vasquez, Hanndy Aldair
<b>DNI</b>	: 73123317
<b>Correo Electrónico</b>	: hanndy.matos@unas.edu.pe
<b>Asesores de Tesis</b>	: 1. Basilio Atencio, Jaime Eduardo : 2. Soria Iturri, Melchor
<b>Área de Investigación</b>	: Ciencias de Alimentos
<b>Grupo de Investigación</b>	: Ingeniería de Alimentos-IA
<b>Línea de Investigación</b>	: Ingeniería de Alimentos
<b>Lugar de Ejecución</b>	: Universidad Nacional Agraria de la Selva.
<b>Fecha de inicio</b>	: Noviembre 2023
<b>Fecha de termino</b>	: Mayo 2025
<b>Presupuesto</b>	: S/. 6585.00
<b>Financiamiento</b>	: Propio y Prociencia-Concytec

Hanndy Aldair Matos Vasquez  
Tesista

Dr. Jaime Eduardo Basilio Atencio  
Asesor

Dr. Melchor Soria Iturri  
Asesor

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

Arquitecto de mi destino, por concederme el milagro de la vida y el don de la salud en cada jornada. Su guía silenciosa ha sido la fortaleza necesaria para superar los desafíos y la luz que ha iluminado mi entendimiento en este sendero de formación profesional.

### **A mis tíos**

Luz y Aminadab, su respaldo y confianza han sido el refugio donde encontré aliento para continuar; guardo con profunda nostalgia y gratitud cada gesto de apoyo que hizo posible la culminación de este sueño.

### **A mi madre**

A mi amada madre Hilda, fuente inagotable de amor y sacrificio. Gracias por ser mi motivación constante, los consejos de superación y fortaleza para superar cada adversidad y lograr cada objetivo que me proponga en la vida; este título es el fruto de tu entrega y el reflejo de los valores que, con tanta ternura, sembraste en mi corazón.

### **A mi compañera de vida**

Kiara, por caminar a mi lado con paciencia y devoción. Gracias por motivarme a ser mejor cada día y por compartir conmigo las vigiliyas y alegrías de este trayecto; tu presencia ha sido el remanso de paz y la compañía perfecta en la construcción de nuestro futuro.

## AGRADECIMIENTO

- A Dios, por ser la fuente de mi fortaleza y sabiduría. Por bendecirme con salud y perseverancia para superar los obstáculos y permitirme alcanzar este importante anhelo profesional.
- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, mi alma mater, por abrirme sus puertas y brindarme una formación integral basada en la excelencia académica y los valores.
- A la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, por ser el escenario de mi crecimiento intelectual y técnico, proporcionándome las herramientas necesarias para mi desarrollo en el campo de la ciencia de los alimentos.
- A mis asesores, el Dr. Soria Iturri Melchor y el Dr. Basilio Atencio Jaime Eduardo, por su invaluable orientación, paciencia y por compartir sus conocimientos científicos, los cuales fueron fundamentales para el éxito y la calidad de esta tesis.
- A los miembros de mi jurado evaluador, el Dr. Alfredo A. Carmona Ruiz, la Dra. Yolanda J. Ramírez Trujillo y el M.Sc. Humberto H. Rivera Rojas, por sus acertadas observaciones, sugerencias y por el tiempo dedicado a la revisión crítica de este trabajo, contribuyendo a su rigor académico.
- Al Dr. Williams V. Roldan Carbajal, por su apoyo en la canalización de los trámites institucionales, y a mi colega, el Ing. Sergio Villanueva Haro, por sus consejos técnicos y por la motivación brindada durante el desarrollo de esta etapa profesional.
- A mi madre, Hilda Vasquez Ramon, por ser el motor de mi vida, por su sacrificio infinito y su amor incondicional que me permitieron mantenerme firme en la consecución de mis metas.
- A mis tíos, Luz Marina y Aminadab, por su respaldo constante, sus palabras de aliento y por creer en mi capacidad desde el primer momento del camino universitario.
- A mi compañera de vida, Kiara, por su apoyo idóneo, su paciencia en las largas jornadas de estudio y por ser la motivación diaria para construir un futuro de éxito juntos.
- A mis colegas y amigos, Franklin, por su valiosa mediación y apoyo en la gestión de la asesoría científica; a Alyn, por su constante compañía y respaldo durante el desarrollo de la investigación.
- Al Laboratorio Central de Investigación (LCI), por facilitarme sus instalaciones, equipos y asistencia técnica. Mi agradecimiento se extiende por brindarme el espacio óptimo para realizar tanto mis prácticas preprofesionales como los análisis experimentales de esta tesis, permitiéndome un aprendizaje práctico invaluable.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1. Estado del arte.....	3
2.2. Características de <i>Verbena officinalis</i> L.....	4
2.3. Compuestos fenólicos .....	4
2.4. Ondas de ultrasonido .....	6
2.4.1.El mecanismo de extracción asistida por ultrasonido.....	7
2.4.2.Ventajas de la extracción asistida por ultrasonido.....	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
3.1. Lugar de ejecución.....	10
3.2. Materia prima.....	10
3.3. Equipos, materiales y reactivos .....	10
3.3.1.Equipos .....	10
3.3.2.Materiales .....	10
3.3.3.Reactivos .....	10
3.4. Métodos de análisis.....	10
3.5. Metodología experimental.....	11
3.5.1.Acondicionamiento de la muestra .....	11
3.5.2.Extracción asistida por ultrasonido.....	11
3.5.3.Condición óptima de extracción acústica .....	11
3.5.4.Extracción de los compuestos bioactivos .....	14
3.5.5.Cuantificación de polifenoles totales.....	14
3.5.6.Cuantificación de flavonoides .....	15
3.5.7.Capacidad antioxidante por el método de la captura del radical libre DPPH. 15	
3.5.8.Capacidad antioxidante por el método de la captura del radical libre ABTS. 15	

3.5.9. Obtención del modelo matemático de superficie respuesta para optimizar la extracción acústica .....	16
3.5.10. Análisis estadístico para comparar la extracción acústica y la extracción con solventes .....	16
3.6. Diseño experimental .....	17
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	19
4.1. Efecto del volumen, masa y condiciones de extracción .....	19
4.2. Optimización del proceso de extracción de bioactividad .....	21
4.3. Contenido de polifenoles totales en la verbena utilizando solventes de alta y media polaridad .....	35
4.4. Modelos matemáticos de superficie respuesta para maximizar la extracción de la bioactividad.....	36
4.4.1. Modelo matemático para polifenoles totales .....	37
4.4.2. Modelo matemático para flavonoides totales .....	39
4.4.3. Modelo matemático para capacidad antioxidante DPPH .....	41
4.4.4. Modelo matemático para capacidad antioxidante ABTS .....	43
4.5. Contenido de polifenoles, flavonoides y capacidad antioxidante a condiciones óptimas obtenida mediante el modelo .....	45
4.5.1. Contenido de polifenoles totales utilizando el modelo.....	45
4.5.2. Contenido de flavonoides totales utilizando el modelo.....	46
4.5.3. Capacidad antioxidante DPPH utilizando el modelo .....	46
4.5.4. Capacidad antioxidante ABTS utilizando el modelo .....	47
V. CONCLUSIONES.....	48
VI. PROPUESTAS A FUTURO .....	49
VII. REFERENCIAS .....	50
ANEXOS .....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Concentración relativa de compuestos fenólicos en tejidos vegetales. ....	6
2. Factores y niveles para optimización por superficie respuesta primer análisis. ....	12
3. Factores y niveles para optimización por superficie respuesta segunda análisis. ....	12
4. Factores y niveles para optimización por superficie respuesta tercer análisis. ....	12
5. Tratamientos para la extracción asistido por ultrasonido de la <i>V. officinalis</i> en el primer análisis. ....	12
6. Tratamientos para la extracción de los compuestos bioactivos asistido por ultrasonido de la <i>V. officinalis</i> en el segundo análisis. ....	13
7. Tratamientos para la extracción de los compuestos bioactivos asistido por ultrasonido de la <i>V. officinalis</i> en el tercer análisis. ....	13
8. Tratamientos para la extracción de los compuestos bioactivos con solventes. ....	14
9. Efecto de las ondas acústicas y el volumen de extracción en el contenido de polifenoles totales (10 g de muestra). ....	19
10. Efecto de volumen de extracción acústica con 3 g y 10 g de muestra. ....	20
11. Efecto de la masa de extracción a volumen constante. ....	20
12. Contenido de polifenoles totales en verbena según los tratamientos de extracción acústica (primer análisis). ....	22
13. Contenido de polifenoles totales en verbena según los tratamientos de extracción acústica (segundo análisis). ....	23
14. Contenido de polifenoles totales en verbena según los tratamientos de extracción acústica (tercer análisis). ....	25
15. Contenido de flavonoides totales en verbena según los tratamientos de extracción acústica. ....	28
16. Capacidad antioxidante DPPH en el extracto acuoso de verbena a diferentes tratamientos extracción acústica. ....	30
17. Capacidad antioxidante ABTS en el extracto acuoso de verbena a diferentes tratamientos extracción acústica. ....	33
18. Contenido de polifenoles totales extraído mediante solventes de alta polaridad. ....	36
19. Tiempo y frecuencia para interpolar polifenoles totales en verbena. ....	38
20. Tiempo y frecuencia para interpolar flavonoides totales en verbena. ....	40
21. Tiempo y frecuencia para interpolar capacidad antioxidante DPPH en verbena. ....	42
22. Tiempo y frecuencia para interpolar capacidad antioxidante ABTS en verbena. ....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos destacando el grupo OH. ....	5
2. Mecanismo de extracción asistida por ultrasonido: (a) Efecto del ultrasonido en las células vegetales al crear burbujas de cavitación, (b) Las células vegetales fueron raptadas debido al efecto ultrasónico, (c) Liberación de compuestos bioactivos de las células raptadas. Fuente: (Yusoff, 2022). ....	7
3. Diseño experimental de extracción de compuestos bioactivos de Verbena por ultrasonido .....	17
4. Diseño experimental de extracción de compuestos bioactivos de Verbena utilizando diferentes solventes. ....	18
5. Gráfico de contorno del primer análisis de optimización de la extracción acústica en función de los polifenoles totales .....	22
6. Gráfico de contorno del segundo análisis de optimización de la extracción acústica en función de los polifenoles totales .....	24
7. Gráfico de contorno del tercer análisis de optimización de la extracción acústica en función de los polifenoles totales .....	26
8. Gráfico de superficie respuesta en función de los polifenoles totales. ....	26
9. Gráfico de contorno de optimización de la extracción acústica en función de los flavonoides totales .....	28
10. Gráfico de superficie respuesta en función de los flavonoides totales. ....	29
11. Gráfico de contorno de optimización de la extracción acústica en función de la capacidad antioxidante DPPH .....	31
12. Gráfico de superficie respuesta en función de la capacidad antioxidante DPPH. ....	32
13. Gráfico de contorno de optimización de la extracción acústica en función de la capacidad antioxidante ABTS .....	33
14. Gráfico de superficie respuesta en función de la capacidad antioxidante ABTS. ....	34

## RESUMEN

Ante la subutilización de *Verbena officinalis* L. como fuente de medicina natural y la necesidad de tecnologías de extracción eficientes que eviten solventes tóxicos, esta investigación abordó la optimización de la extracción de sus compuestos bioactivos mediante ultrasonido, buscando maximizar polifenoles totales, flavonoides y su capacidad antioxidante. El objetivo fue establecer un método limpio para el aprovechamiento medicinal de la planta. Se empleó un diseño central compuesto rotacional (DCCR) y la metodología de superficie de respuesta evaluó la influencia del tiempo y la frecuencia ultrasónica, confirmando 250 mL de volumen y 10 g de muestra como óptimos. Los modelos matemáticos desarrollados mostraron excelente ajuste ( $R^2 > 0.94$ ), evidenciando la significativa influencia de las variables ultrasónicas. Los parámetros óptimos convergieron en rangos estrechos de tiempo (35,4 – 40,2 min) y frecuencia (22,8 – 24,2 kHz). Bajo estas condiciones, se predijeron y validaron concentraciones máximas de polifenoles (1402,87 mg EAG/100 g) y flavonoides (347,84 mg EC/100 g), junto con elevadas capacidades antioxidantes (DPPH: 446,37  $\mu$ mol ET/100 g; ABTS: 1442,22  $\mu$ mol ET/100 g). La extracción ultrasónica superó consistentemente a los métodos convencionales. Se concluye que el ultrasonido es una técnica altamente eficiente y prometedora para obtener extractos funcionales de verbena, con modelos predictivos robustos para su optimización y aplicación.

**Palabras clave:** *Verbena officinalis*, Verbena, Extracción acústica, Compuestos bioactivos, Optimización.

## ABSTRAC

In the face of the underuse of *Verbena officinalis* L. as a source of natural medicine, as well as the need for efficient extraction technologies that avoid toxic solvents, this research took on the optimization of the extraction of its bioactive compounds using ultrasound, seeking to maximize the total polyphenols, flavonoids and the antioxidant capacity. The objective was to establish a clean method for the use of the medicinal plant. A central composite rotational design (CCRD; DCCR in Spanish) was used and the surface response methodology [was used] to evaluate the influence of the time and the ultrasonic frequency, where it was confirmed that 250 mL in volume and 10 g of sample were optimal. The mathematical models that were developed revealed an excellent fit ( $R^2 > 0.94$ ), evidencing a significant influence from the ultrasonic variables. The optimal parameters converged in a short time range (35.4 – 40.2 min) and frequency [range] (22.8 – 24.2 kHz). Under these conditions, the maximum polyphenol (1402.87 mg EAG/100 g) and flavonoid (347.84 mg EC/100 g) concentrations were predicted and validated, together with elevated antioxidant capacities (DPPH: 446.37  $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ ; ABTS: 1442.22  $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ ). The ultrasonic extraction consistently surpassed the conventional methods. It was concluded that [the use of] ultrasound is a highly efficient and promising technique for obtaining functional extracts of verbena with robust predictive models for its optimization and application.

**Keywords:** *Verbena officinalis*, verbena, acoustic extraction, bioactive compounds, optimization

## I. INTRODUCCIÓN

La planta *Verbena officinalis* L. ha sido una fuente tradicional de medicina natural en las comunidades rurales de nuestro país, donde su uso se fundamenta en el conocimiento empírico. Investigaciones sobre los extractos de sus hojas han evidenciado su notable actividad biológica, incluyendo propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, neuroprotectoras, analgésicas, antifúngicas, antioxidantes, y beneficiosas para la prostatitis crónica y los dolores estomacales. Estas funciones bioactivas están relacionadas con la diversidad de compuestos fitoquímicos presentes en la planta, tales como aceites esenciales (citral, geraniol, limoneno, verbenona), glucósidos iridoides (verbenalina, verbenen e histatósido), glucósidos del ácido cafeico,  $\beta$ -sitosterol, ácido ursólico, apigenina, luteolina y polifenoles. Asimismo, se ha identificado que los principales compuestos bioactivos de *V. officinalis* son los iridoides, fenilpropanoides, flavonoides, luteolina y terpenoides, estos últimos responsables de su característico sabor amargo.

A pesar de su potencial bioactivo, el uso de esta planta sigue siendo limitado debido a la escasa difusión científica, lo que restringe su aplicación mayormente a las comunidades rurales, donde se consume directamente sin procesos tecnológicos avanzados de extracción bioactiva. Además, existen pocos estudios sobre la cuantificación de su bioactividad de la verbena. Sin embargo, estos trabajos emplearon métodos de extracción convencionales con solventes tóxicos para el ser humano (mezclas de agua/etanol, metanol/etanol, acetona), que si bien presentan una mayor capacidad de extracción que el agua, no son adecuados para el consumo humano. Es importante destacar que los habitantes de las zonas rurales utilizan exclusivamente infusiones de hojas de *V. officinalis* en agua, ya que es un solvente seguro para el organismo. Esto sugiere que el proceso de extracción debe llevarse a cabo únicamente con agua como solvente, pero mediante una tecnología que optimice la extracción de los compuestos bioactivos. En este contexto, la extracción acústica surge como una alternativa eficiente y ambientalmente amigable, permitiendo mejorar la obtención de los compuestos bioactivos sin comprometer la seguridad del consumidor.

Este trabajo de investigación fue pionero en proponer la extracción limpia de los compuestos bioactivos de *V. officinalis* utilizando únicamente agua y, para incrementar la transferencia de masa durante la extracción, se planteó la aplicación de ondas ultrasónicas. Estas ondas, aplicadas en los procesos de extracción, estuvieron influenciadas por la cavitación acústica, la cual provocó la ruptura de las paredes celulares en la matriz de la materia prima, promoviendo una mayor liberación de compuestos antioxidantes de manera isotérmica.

Durante la pandemia de COVID-19, se generó un incremento en el consumo de plantas medicinales, pero su empleo resultó limitado debido a la falta de evidencia científica sobre metodologías de extracción y dosis recomendadas que garantizaran el poder bioactivo sin efectos tóxicos en el individuo. En ese contexto, la *V. officinalis* fue considerada una planta medicinal en la selva peruana, por lo que fue importante reconocer su valor bioactivo y fomentar su cultivo en las comunidades como una fuente económica alternativa. Además, se identificó la necesidad de aplicar nuevas metodologías de extracción bioactiva para optimizar el aprovechamiento medicinal de sus compuestos bioactivos. Debido a esta gran importancia, se plantearon los siguientes objetivos:

**Objetivo general:** Extraer con ondas acústicas los compuestos bioactivos de la *V. officinalis* L. (Verbena) y comparar con la extracción convencional en términos del contenido polifenólico, flavonoides y capacidad antioxidante.

**Objetivos específicos**

- Extraer los compuestos bioactivos de *V. officinalis* mediante la aplicación de ultrasonido considerando las variables de tiempo y frecuencia en el tratamiento ultrasónico. Evaluar mediante un diseño completo central rotacional (DCCR) y determinar los parámetros óptimos de extracción a través de la superficie de respuesta.
- Extraer polifenoles totales de *V. officinalis* utilizando solventes con alta polaridad (agua, metanol y etanol) y la mezcla de estos (media polaridad).
- Encontrar un modelo matemático de superficie respuesta para maximizar la concentración de polifenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante vinculado con el tiempo y frecuencia de extracción por ultrasonido.
- Calcular la concentración de polifenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) a las condiciones óptimas mediante el modelo.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Estado del arte

En la literatura científica existen estudios sobre la bioactividad de *V. officinalis*. Calvo (2006) en su estudio sobre la actividad antiinflamatoria y analgésica del preparado tópico de verbena. Los resultados fueron satisfactorios para la actividad antiinflamatoria, pues la actividad fue similar al gel de piroxicam utilizado como control positivo. Sin embargo, los extractos fueron obtenidos con metanol y los estudios fueron realizados en ratas albinas wistar aplicando bajas concentraciones, careciendo de aplicación en humanos, pues metanol es peligroso para la salud. Posteriormente Casanova et al. (2008) estudiaron la actividad antioxidante y antifúngica de las hojas de *V. officinalis*. Se investigó la capacidad antioxidante frente al radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y el efecto antifúngico utilizando extractos de hojas de *V. officinalis* con cloroformo, acetato de etilo y metanol al 50%. Los resultados sugirieron que los compuestos fenólicos extraídos con metanol al 50% podrían considerarse fuentes excelentes y fácilmente disponibles de compuestos antifúngicos y antioxidantes naturales. Sin embargo, metanol no es aplicable para humanos.

Rehecho et al. (2011) estudiaron la composición química, contenido mineral y actividad antioxidante de *V. officinalis*. El estudio fue realizado utilizando dos extractos, acuoso (solo agua) e hidroetanólico. El análisis por HPLC-DAD y LC-MS permitió la detección e identificación de tres iridoides, quince flavonoides y cuatro derivados del ácido fenólico (fenoles). Ambos extractos mostraron una actividad antioxidante significativa utilizando tres sistemas modelo in vitro (DPPH, ABTS y radical superóxido).

Dobrucka et al. (2021) estudiaron la actividad antileucémica de nanopartículas de Au/CuO/ZnO sintetizadas con extracto de *V. officinalis*. La influencia de las nanopartículas de Au/CuO/ZnO en la viabilidad celular se evaluó in vitro. El tipo de muerte y la efectividad de la eliminación celular dependieron tanto de la concentración del complejo como de la duración del cultivo. Dentro de las primeras 24 h, más del 80% de las células cultivadas en presencia de nanopartículas de Au/CuO/ZnO a la concentración de 10  $\mu\text{mol}$  exhibieron signos de apoptosis tardía (disminución de producción de energía celular que conlleva a una muerte tardía por hinchamiento). Y alrededor del 60% de las células cultivadas en presencia de nanopartículas de Au/CuO/ZnO a la concentración de 100  $\mu\text{mol}$  sufrieron necrosis (muerte celular por ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente salida de material intracelular). Los estudios realizados demostraron que las nanopartículas trimetálicas de Au/CuO/ZnO sintetizadas con

extracto de *V. officinalis* pueden ayudar a desarrollar soluciones efectivas para combatir la leucemia.

Barbălată-Mândru et al. (2022) estudiaron la obtención de biomateriales (bioplásticos) con propiedades antibacterianas mediante la combinación de alcohol polivinílico con los extractos obtenidos de varias plantas de Rumania, entre ellas la verbena (*V. officinalis*). Los extractos de estas plantas se caracterizaron por diferentes métodos, como el contenido total de fenoles, flavonoides por la espectroscopia UV-vis. Los resultados mostraron que los extractos vegetales confieren efectos antibacterianos significativos a los plásticos frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y no son tóxicos frente a las células fibroblásticas del conejo.

## 2.2. Características de *Verbena officinalis* L.

Es una planta medicinal cuyo nombre común es verbena, establecida en Europa, América, África del norte y Central y Asia. Se caracteriza por ser una hierba perenne, es recto de 25 a 100 cm de alto y ramificado arriba, sus hojas miden 3,5 a 8 cm de largo y 1,5 a 3,5 cm de ancho. Tiene flores de color rosa pálido o violáceo de unos 4 mm (Riguene et al., 2020). La clasificación taxonómica de la verbena es como sigue:

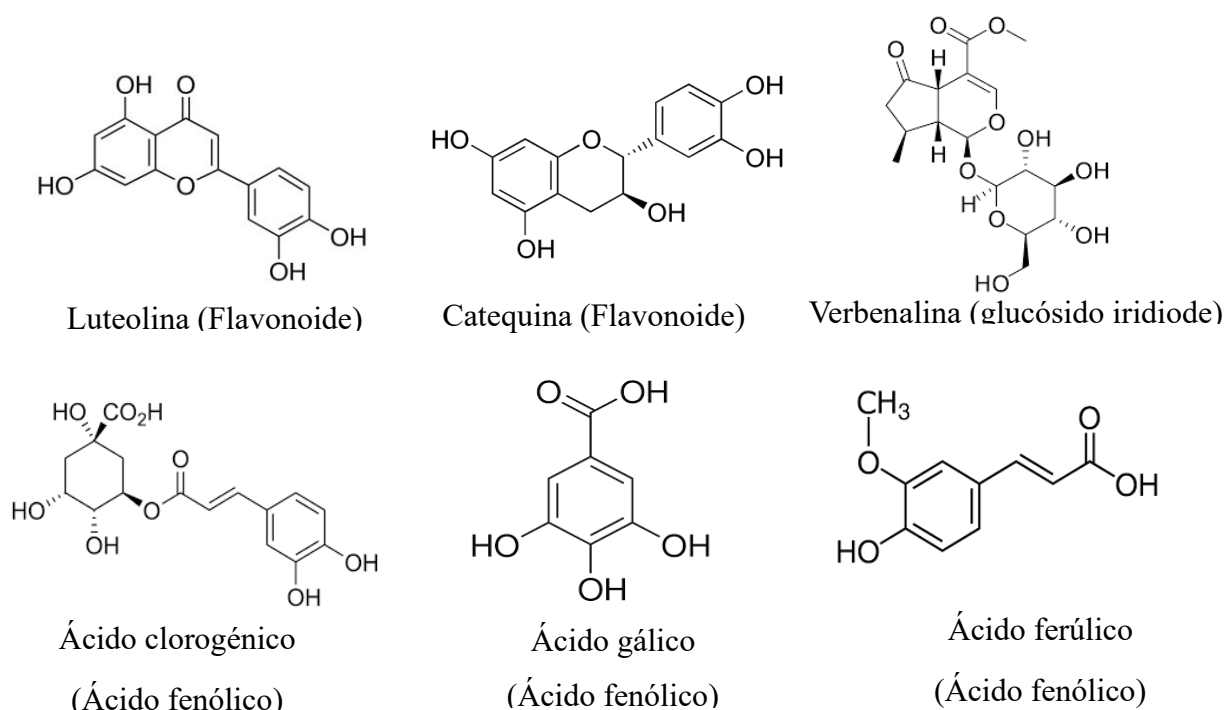
Reino	: Plantae
Subreino	: Tracheobionta – plantas vasculares
Subdivisión	: Spermatophyta – plantas con semillas
División	: Magnoliophyta – plantas con flores
Clase	: Magnoliopsida - dicotiledóneas
Subclase	: Asteridae
Orden	: Lamiales
Familia	: Verbenaceae- familia Verbena
Género	: Verbena L. Verbena
Especie	: <i>Verbena officinalis</i> L.

## 2.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por las plantas como respuesta al estrés, no intervienen en el metabolismo primario de la planta, pero intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su entorno, cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos. Poseen al menos un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo y pueden dividirse según su estructura química en flavonoides (flavonas,

flavonoles, flavanoles, flavanonas, isoflavonas y antocianinas), ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico), taninos, estilbenos, cumarinas y lignanos. En los alimentos contribuyen a su estabilidad oxidativa, color, olor y sabor astringente, proporcionan beneficios para la salud por sus propiedades antioxidantes, antialérgicos, anticancerosos, antiinflamatorios, antidiarreicos, antivíricos, antiulcerosos, molusquicidas, antihelmínticos, antihepatóxicos y antiproliferativos (D. Carvalho et al., 2015).

La importancia de reconocer la presencia del enlace OH por espectrometría FTIR en el extracto es porque su presencia garantiza la bioactividad del extracto, pues los ácidos fenólicos, glucósido, iridiode y flavonoides contienen radicales OH en sus estructuras químicas. En la Figura 1 se muestran algunas de ellas.



**Figura 1.** Estructura química de algunos compuestos fenólicos destacando el grupo OH.

Los polifenoles son compuestos que se encuentran en diferentes partes de las plantas, presentan un efecto neutralizante contra los radicales libres, además retardan el avance de algunas enfermedades crónicas. Estos compuestos han demostrado una intensa actividad biológica, como antioxidantes, antibacterianos e incluso antitumorales (Rojas et al., 2019). Sólo algunos polifenoles se consideran importantes en los alimentos y en la misma alimentación, estos compuestos son el ácido gálico, sináptico, ferúlico, cafeico, p-cumárico, y sus derivados, así como los flavonoides y sus glucósidos.

**Tabla 1.** Concentración relativa de compuestos fenólicos en tejidos vegetales.

<b>Tejido</b>	<b>Concentraciones relativas</b>
Fruto	Ácidos cinámicos > catequinas ≈ leucoantocianinas > flavonoles
Hojas	Flavonoles ≈ Ácidos cinámicos > catequinas ≈ leucoantocianinas
Tronco	Catequinas ≈ leucoantocianinas > flavonoles > Ácidos cinámicos
Corteza	Al igual que en el tronco, pero en altas concentraciones

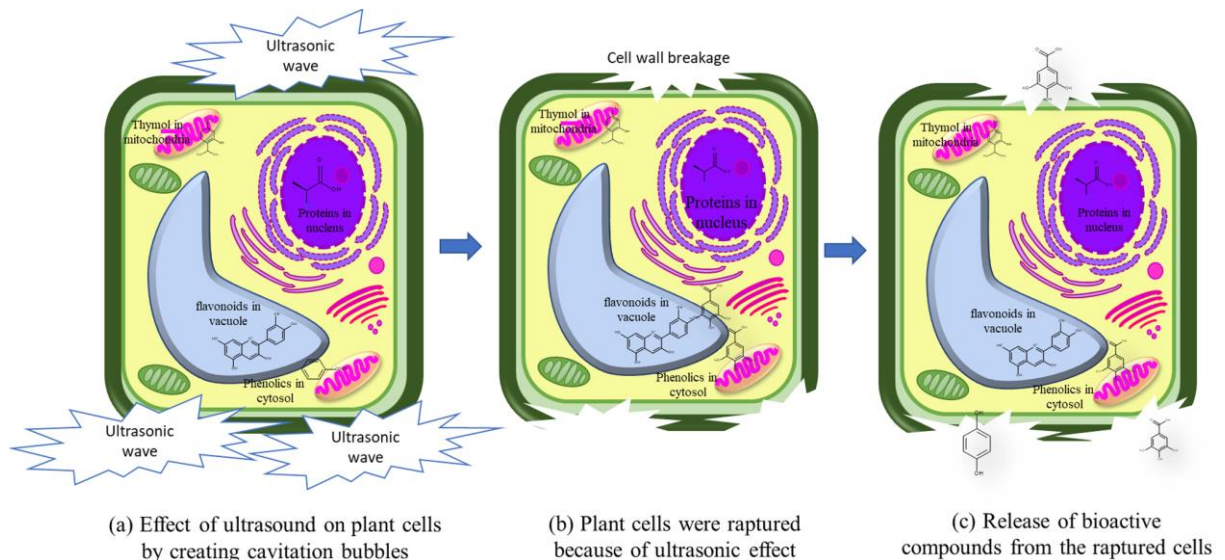
#### 2.4. Ondas de ultrasonido

El ultrasonido es utilizado para el ensayo no destructivo de los materiales, se aplica para conocer el interior de un material debido a la propagación de las ondas sonoras, esta propagación depende de la impedancia acústica en el interior del material, que a su vez depende de las discontinuidades del material examinado, como su forma, tamaño y orientación. Al conocer la propagación de las ondas sonoras, se determina su velocidad, y con ello las propiedades de los materiales. Las ondas ultrasónicas aplicadas en los procesos de extracción están influenciadas por la cavitación acústica, que puede provocar la ruptura de las paredes celulares en la matriz de la materia prima, promoviendo la liberación de compuestos antioxidantes hacia el solvente. Los parámetros dentro del ultrasonido son la velocidad, tiempo, dispersión, frecuencia y longitud de onda (Rojas et al., 2019). La extracción de componentes bioactivos por ultrasonido es un método limpio, sencillo, rápido y verde en comparación con los métodos convencionales. Además de su alta reproducibilidad en corto tiempo, de fácil manipulación y disminución en el uso de solventes frente a otros métodos. Las ondas de ultrasonido causan la ruptura mecánica de la pared celular liberando los componentes bioactivos, a su vez el calentamiento local del solvente aumenta la difusión del extracto, mejorando así la transferencia de masa a través de la interfase sólido-líquido. Los efectos mecánicos de la sonicación inducen a una mayor disolución del solvente en las paredes y membranas celulares, facilitando la liberación del contenido de las células y mejorando la transferencia de masa (Rojas et al., 2019). El principio de este método se basa en el fenómeno de cavitación que se da por la formación, crecimiento y colapso de burbujas de vapor o gas generadas por la acción de las ondas de una frecuencia determinada. La extracción asistida por ultrasonido (EAU) se usa para aislar compuestos, tiene como beneficio la penetración del disolvente, incluyendo la intensificación de transferencia de masa y efectos capilares. La extracción también puede mejorarse debido a la ruptura de burbujas formadoras de cavitación

cerca de las paredes celulares. La tasa de extracción y rendimiento puede mejorarse combinando variables de ultrasonido como frecuencia y tiempo (Santos de la cruz et al., 2014).

#### 2.4.1. El mecanismo de extracción asistida por ultrasonido

La extracción de plantas se puede definir como el proceso de eliminación de compuestos solubles del material vegetal utilizando solventes. Las técnicas de extracción clásicas o convencionales incluyen la maceración, la destilación, la decocción, el reflujo de calor y la extracción Soxhlet, en la que se utiliza un solvente para ablandar el material vegetal con el fin de lixiviar los compuestos deseables. Los principales inconvenientes de estas técnicas son solventes y requieren mucho tiempo. Sin embargo, la extracción asistida por ultrasonido requiere una energía adicional de ultrasonido para crear burbujas de cavitación que producen efectos mecánicos y térmicos en las células vegetales como se muestra en la Figura 1. La ruptura de la pared celular libera compuestos bioactivos en el medio del solvente a través de la difusión y/o disolución (Bi et al., 2019). Por lo tanto, los compuestos bioactivos se extraen de las células vegetales en presencia de un gradiente de transferencia de masa. Los investigadores suelen utilizar ultrasonidos con una frecuencia superior a 20 kHz en la extracción de compuestos bioactivos de plantas (Qian et al., 2020).



**Figura 2.** Mecanismo de extracción asistida por ultrasonido: (a) Efecto del ultrasonido en las células vegetales al crear burbujas de cavitación, (b) Las células vegetales fueron raptadas debido al efecto ultrasónico, (c) Liberación de compuestos bioactivos de las células raptadas. Fuente: Yusoff (2022).

Chemat et al. (2017) revisaron el mecanismo de extracción asistida por ultrasonido para alimentos y productos naturales, revelaron que el proceso de extracción asistida por ultrasonido podría involucrar mecanismos únicos o combinados. Los posibles mecanismos subyacentes son la fragmentación, la erosión, la capilaridad, la detexturación y la sonoporación. Los efectos combinados de los mecanismos pueden aumentar la eficiencia ultrasónica a través de (i) la interrupción celular y (ii) la promoción de la transferencia de masa, esos efectos también pueden cambiar directa o indirectamente la estructura interna de las matrices de muestra (Rahaman et al. 2019). Esto concuerda con Chen et al. (2020) quienes explicaron que la energía ultrasónica podría crear cavidades y canales microscópicos para ayudar a la eliminación del agua. La creación de cavidades y microcanales posiblemente aumente el área de contacto de los compuestos bioactivos y el solvente, acelerando así el fenómeno de transferencia de masa. Los hallazgos respaldan aún más los resultados de Miano et al. (2016) quienes informaron que la tecnología de ultrasonido resultó ser más efectiva en alimentos húmedos con mayor actividad de agua. Los datos experimentales recientes de Agregan et al. (2021) también demostraron que el fenómeno de cavitación creado por ultrasonido ayudaría a la extracción de polifenoles de las berenjenas.

#### **2.4.2. Ventajas de la extracción asistida por ultrasonido**

Actualmente la tecnología ultrasónica es el método de elección, principalmente debido a que se puede obtener un alto rendimiento de extracción de los compuestos bioactivos de las plantas. El ultrasonido también puede aumentar la bioaccesibilidad de los compuestos en los alimentos (Wang et al., 2021). La cavitación acústica puede romper el enlace químico de los compuestos. Investigadores informaron que el ultrasonido de 20 kHz podría destruir los enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares, así como el enlace glucosídico de la pectina de las muestras de cítricos (Qiu et al., 2019). Otro estudio realizado por Fathi et al. (2021), quienes revelaron que el tratamiento ultrasónico podría cambiar los grupos amida de los compuestos para convertirse en grupos carboxilo y, por lo tanto, aumentar la carga negativa de los compuestos. Esto daría como resultado la reducción de los enlaces de hidrógeno intramoleculares dentro de los hidrolizados de proteína de salvado de arroz. La preparación de hidrolizados de proteínas también se realizó a una frecuencia constante de 20 kHz.

Lukic et al. (2019) estudiaron los efectos del tratamiento ultrasónico sobre los compuestos fenólicos del vino tinto joven y envejecido. El estudio resumió que una mayor potencia del tratamiento ultrasónico podría acelerar la reacción química durante el proceso de

envejecimiento del vino tinto. Los efectos ultrasónicos sobre el perfil fenólico de *Sideritis trojana* Bornm también fueron informados por Celep et al. (2019) quienes sonicaron las muestras en un baño ultrasónico a 45 °C. El cambio de compuestos fenólicos también se basó en la estabilidad de los compuestos individuales. Curiosamente, la rutina, que es un importante compuesto fenólico glicosilado, se detectó en el contenido más alto en comparación con otros métodos de extracción, como la infusión y la decocción. Posiblemente, la rutina se mantuvo estable bajo el tratamiento ultrasónico. Los trabajos experimentales de Ampofo y Ngadi (2020) se centraron en la biosíntesis de compuestos fenólicos a partir del frijol de *Phaseolus*. El estudio informó un hallazgo interesante de que la provocación con ultrasonido en 360 W y 40 kHz durante 60 min habían aumentado significativamente la biosíntesis de compuestos fenólicos. La energía ultrasónica puede distribuirse en la pared celular para facilitar la liberación de compuestos durante la digestión gastrointestinal. Esto ayuda a la bioaccesibilidad, ya que los compuestos se liberan fácilmente de la matriz vegetal en el intestino y, por lo tanto, están disponibles para la absorción intestinal. Es probable que el tratamiento asistido por ultrasonido sea un buen método alternativo para mejorar el rendimiento y la bioaccesibilidad de los compuestos en comparación con el método de reflujo de calor (Hadidi et al., 2021).

La estabilidad de los compuestos bioactivos es un criterio importante en la bioaccesibilidad. Se evaluaron los cambios de calidad de jugos de mango fermentados tratados con ultrasonido a 4 °C. El carotenoide es un compuesto altamente insaturado debido a los dobles enlaces conjugados. Este tipo de estructura química es sensible a la oxidación, isomeración y otros cambios químicos. El jugo tratado con ultrasonido parecía tener un nivel de oxígeno más bajo, que era el entorno propicio para la retención de carotenoides (Wang et al., 2021).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio Central de Investigación (LCI), el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos y el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco. La zona de estudio presentó una altitud de 620 m.s.n.m., una temperatura de 25 °C y una humedad relativa entre el 80 y 85%.

#### 3.2. Materia prima

Las hojas de la *V. Officinalis* fueron recolectadas en horas de la mañana y envasadas en bolsas de alta densidad de polietileno en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco y transportadas al LCI.

#### 3.3. Equipos, materiales y reactivos

##### 3.3.1. Equipos

Agitador ultrasónico (UP50H, Hielscher, Alemania), molino, estufa (Ecocell111, MMM, USA), balanza analítica (ABT220-4NM, Kern, Alemania), refrigerador (FFU-17F5HW, Frigidaire, USA), ultraturrax, (T25 basic S1, Ika, USA), centrífuga (Mikro 22 R, Hettich, Alemania), espectrofotómetro UV-vis (Genesys 150, Thermo Fisher Scientific, USA).

##### 3.3.2. Materiales

Materiales de vidrio, tales como, pipetas, probetas, fioles, balones, vasos de precipitación, micropipetas.

##### 3.3.3. Reactivos

Los reactivos que se utilizaron son los compuestos químicos, radical  $ABTS^+$  (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)), persulfato de potasio, etanol, radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), entre otros.

#### 3.4. Métodos de análisis

**Cuantificación de compuestos fenólicos:** Método espectrofotométrico según Obanda et al. (1997) expresado como miliequivalente de ácido gálico.

**Cuantificación de flavonoides totales:** Método espectrofotométrico según Costa et al. (2014) expresado como miliequivalente de catequina.

**Cuantificación de la capacidad antioxidante:** La capacidad antioxidante DPPH se cuantificó utilizando la metodología de Alam et al. (2013) mediante la captura del radical libre (2,2-difenil-1-picrilhidracilo). La capacidad ABTS se utilizó la metodología de Re et al. (1999) mediante la captura del radical libre (2,2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-acido sulfónico).

### **3.5. Metodología experimental**

#### **3.5.1. Acondicionamiento de la muestra**

La recolección de las plantas de verbena fue en horas de la mañana y se envasaron en bolsas de polietileno de alta densidad (PEBD). Luego fueron transportadas al Laboratorio Central de Investigación (LCI) de la UNAS. En el LCI se realizó el deshojado y la selección de las hojas, a continuación, se descartó las hojas con daños físicos o las afectadas por insectos. Seguidamente las hojas seleccionadas fueron lavadas por inmersión en agua desionizada y se dejó orear por 20 min en una mesa de acero inoxidable.

#### **3.5.2. Extracción asistida por ultrasonido**

Se tomó 10 g de muestra de Verbena oreada y se licuó por 15 segundos con 250 mL de agua destilada hasta obtener el extracto que posteriormente fue sometida a ondas acústicas a través de un Agitador ultrasónico (Hielscher, UP50H, Alemania). La sonicación fue aplicada a diferentes frecuencias y tiempos de extracción tal como se detalla en las Tablas 2,3 y 4. Luego de cada tratamiento la suspensión fue centrifugada a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C utilizando una centrifuga (Hettich Zentrifugen, Mikro 22 R), finalmente el sobrenadante fue almacenado en congelación a -20°C.

#### **3.5.3. Condición óptima de extracción acústica**

Para optimizar el proceso de extracción acústica de los compuestos bioactivos se utilizó el Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR) de la forma  $2^k$ +puntos centrales +puntos axiales, como se muestra en las Tablas 5,6 y 7. Los puntos experimentales fueron establecidos en función de la máxima potencia del equipo de ultrasonido. Los puntos centrales fueron encontrados como la semisuma de los niveles y los puntos axiales fueron calculados por extrapolación matemática. Cabe resaltar que para cada tratamiento se medirá la temperatura del sistema, además si el modelo matemático orienta a una maximización, estos tratamientos serán ajustados para hacer nuevamente los experimentos.

**Tabla 2.** Factores y niveles para optimización por superficie respuesta primer análisis.

Factor	Nivel				
	-1,41	-1	0	+ 1	+1,41
Tiempo (min)	31,8	40	60	80	88,2
Frecuencia (kHz)	41,8	50	70	90	98,2

**Tabla 3.** Factores y niveles para optimización por superficie respuesta segunda análisis.

Factor	Nivel				
	-1,41	-1	0	+ 1	+1,41
Tiempo (min)	10,3	14	23	32	35,7
Frecuencia (kHz)	41,8	50	70	90	98,2

**Tabla 4.** Factores y niveles para optimización por superficie respuesta tercer análisis.

Factor	Nivel				
	-1,41	-1	0	+ 1	+1,41
Tiempo (min)	20,7	24	32	40	43,3
Frecuencia (kHz)	41,8	50	70	90	98,2

**Tabla 5.** Tratamientos para la extracción asistido por ultrasonido de la *V. officinalis* en el primer análisis.

Tratamientos	Tiempo (min)	Frecuencia (% de 30 kHz)	Tiempo (codificado)	Frecuencia (codificado)	Variables dependientes para optimizar
T1	40	50% = 15 kHz	-1	-1	Y = Polifenoles totales, Flavonoides, Capacidad Antioxidante (ABTS, DPPH).
T2	80	50% = 15 kHz	1	-1	
T3	40	90% = 27 kHz	-1	1	
T4	80	90% = 27 kHz	1	1	
T5	31,8	70% = 21 kHz	-1,41	0	
T6	88,2	70% = 21 kHz	1,41	0	
T7	60	41,8% = 12,5 kHz	0	-1,41	
T8	60	98,2% = 29,5 kHz	0	1,41	
T9	60	70% = 21 kHz	0	0	
T10	60	70% = 21 kHz	0	0	
T11	60	70% = 21 kHz	0	0	

**Tabla 6.** Tratamientos para la extracción de los compuestos bioactivos asistido por ultrasonido de la *V. officinalis* en el segundo análisis.

Tratamientos	Tiempo (min)	Frecuencia (% de 30 kHz)	Tiempo (codificado)	Frecuencia (codificado)	Variables dependientes para optimizar
T1	14	50% = 15 kHz	-1	-1	Y = Polifenoles totales, Flavonoides, Capacidad Antioxidante (ABTS, DPPH).
T2	32	50% = 15 kHz	1	-1	
T3	14	90% = 27 kHz	-1	1	
T4	32	90% = 27 kHz	1	1	
T5	10,3	70% = 21 kHz	-1,41	0	
T6	35,7	70% = 21 kHz	1,41	0	
T7	23	41,8% = 12,5 kHz	0	-1,41	
T8	23	98,2% = 29,5 kHz	0	1,41	
T9	23	70% = 21 kHz	0	0	
T10	23	70% = 21 kHz	0	0	
T11	23	70% = 21 kHz	0	0	

**Tabla 7.** Tratamientos para la extracción de los compuestos bioactivos asistido por ultrasonido de la *V. officinalis* en el tercer análisis.

Tratamientos	Tiempo (min)	Frecuencia (% de 30 kHz)	Tiempo (codificado)	Frecuencia (codificado)	Variables dependientes para optimizar
T1	24	50% = 15 kHz	-1	-1	Y = Polifenoles totales, Flavonoides, Capacidad Antioxidante (ABTS, DPPH).
T2	40	50% = 15 kHz	1	-1	
T3	24	90% = 27 kHz	-1	1	
T4	40	90% = 27 kHz	1	1	
T5	20,7	70% = 21 kHz	-1,41	0	
T6	43,3	70% = 21 kHz	1,41	0	
T7	32	41,8% = 12,5 kHz	0	-1,41	
T8	32	98,2% = 29,5 kHz	0	1,41	
T9	32	70% = 21 kHz	0	0	
T10	32	70% = 21 kHz	0	0	
T11	32	70% = 21 kHz	0	0	

### 3.5.4. Extracción de los compuestos bioactivos

Para la extracción de los compuestos bioactivos se utilizaron solventes de polaridad alta y media. Los tratamientos se muestran en la Tabla 4. La proporción masa de hoja y solvente fue la misma que para la extracción acústica.

**Tabla 8.** Tratamientos para la extracción de los compuestos bioactivos con solventes

Tratamiento	Solvente	Polaridad	Variables dependientes
T1	Agua (100%)	Alta	Y = Polifenoles totales
T2	Agua (50%) + Etanol (50%)	Alta	
T3	Agua (50%) + Metanol (50%)	Alta	
T4	Agua (25%) + Etanol (25%) + Metanol (50%)	Media	
T5	Etanol (25%) + Metanol (75%)	Media	
T6	Etanol (75%) + Metanol (25%)	Media	

### 3.5.5. Cuantificación de polifenoles totales

Para la cuantificación de los polifenoles totales, se utilizó la metodología propuesta por Obanda et al. (1997), la cual estuvo orientada a los sobrenadantes de los extractos vegetales. Se cuantificaron los compuestos fenólicos utilizando 100  $\mu\text{L}$  del extracto, a los cuales se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 400  $\mu\text{L}$  del reactivo diluido de Folin-Ciocalteu (1:5 en agua destilada). La mezcla se agitó durante 5 minutos, luego se añadieron 2000  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio al 7,5% (m/v) y se dejó reposar por 30 minutos en total oscuridad. La absorbancia se midió a 755 nm con un espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Scientific, Genesys 150, USA). Finalmente, se calculó la concentración de fenoles totales utilizando una curva de calibración de ácido gálico (en el rango de 10 - 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en función de la ley de Beer-Lambert. El resultado se reportó como equivalente de ácido gálico por 100 g de muestra seca (mg EAG/100g), utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{Polifenoles totales}] = \left( \frac{A - b \mu\text{g}}{a \text{ mL}} \right) (\text{d.f.}) \left( \frac{V \text{ mL}}{m \text{ g}} \right) \left( \frac{10^{-3} \text{ mg}}{1 \mu\text{g}} \right) (100 \text{ g})$$

Donde, A = Absorbancia de la muestra; b = Término de intersección de la curva estándar; a = Pendiente de la curva estándar; d.f = Factor de dilución; V= Volumen total del solvente (mL) y m = Masa seca de las hojas de *V. officinalis* (g).

### **3.5.6. Cuantificación de flavonoides**

Los flavonoides totales se cuantificaron según Costa et al. (2014). Se mezclaron 100  $\mu$ L de extracto con 400  $\mu$ L de agua desionizada y 30  $\mu$ L de nitrito de sodio al 25% (m/v). Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió 30  $\mu$ L de AlCl<sub>3</sub> al 10% (m/v). Tras esperar 1 minuto, se adicionaron 200  $\mu$ L de hidróxido de sodio (1 M) y 240  $\mu$ L de agua desionizada. Las medidas de absorbancia se realizaron a 510 nm con un espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Scientific, Genesys 150, USA). Se preparó una curva de calibración con catequina (en el rango de 50 - 450 mg/L), y los resultados se expresaron en mg equivalentes de catequina (mg EC/100 g de muestra seca).

### **3.5.7. Capacidad antioxidante por el método de la captura del radical libre DPPH**

La metodología utilizada fue la de Alam et al. (2013). Se preparó la solución madre del radical libre DPPH usando una fiola de 50 mL, donde se adicionaron 0,012 g de radical y se aforó con etanol al 80 %. Luego, en una fiola de 100 mL, se agregaron 10 mL de esta solución madre y se aforó con etanol absoluto hasta obtener una absorbancia de  $1,0 \pm 0,1$  a una longitud de onda de 515 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Scientific, Genesys 150, USA). Además, se preparó una curva estándar de Trolox desde 0,01 hasta 0,03 mM, como se muestra en la Figura 3. Para la cuantificación de la capacidad antioxidante, se utilizaron 150  $\mu$ L de la disolución de micropartículas, que se mezclaron con 2850  $\mu$ L de solución de DPPH y se dejaron reposar por 30 minutos en total oscuridad a temperatura ambiente. Los resultados se reportaron en mmol equivalentes de Trolox (mmol ET/100 g de muestra).

### **3.5.8. Capacidad antioxidante por el método de la captura del radical libre ABTS**

La metodología utilizada fue la propuesta por Re et al. (1999). Se prepararon dos soluciones madre, A y B, con 12 a 16 horas de anticipación a su empleo. Para la solución madre A, se pesaron 0,078 g de ABTS y se enrazó en una fiola de 10 mL con etanol. Para la solución madre B, se pesaron 0,013 g de persulfato de potasio y también se enrazó en una fiola de 10 mL con etanol.

Luego, se mezclaron las soluciones madre A y B en proporciones de 1:1. Para obtener la solución del radical libre ABTS, se utilizó una fiola de 100 mL, en la cual se agregaron 5 mL de la mezcla de las soluciones madre A y B, y se aforó con etanol hasta alcanzar una absorbancia de  $1,1 \pm 0,2$  a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Scientific, Genesys 150, USA). Además, se construyó una curva estándar de Trolox

en un rango de 0,001 hasta 0,015 mM, como se muestra en la Figura 4. Posteriormente, en un tubo de ensayo, se mezclaron 30  $\mu\text{L}$  de la disolución de micropartículas con 2970  $\mu\text{L}$  de la solución del radical libre ABTS y se procedió a la lectura. El resultado fue expresado como mmol equivalentes de Trolox (mmol ET/100 g de muestra) y se calculó utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{ABTS} = \left( \frac{A - b \text{ } \mu\text{g}}{a \text{ mL}} \right) (\text{d.f}) \left( \frac{V \text{ mL}}{m \text{ g}} \right) \left( \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right)$$

En que, A = Absorbancia de la muestra; b = Término de intersección de la curva estándar; a = Pendiente de la curva estándar; d.f = Factor de dilución; V= Volumen total del extracto (mL), m = Masa seca de las hojas de *V. officinalis* (g).

### 3.5.9. Obtención del modelo matemático de superficie respuesta para optimizar la extracción acústica

Para el análisis estadístico y la generación del modelo matemático de superficie de respuesta, se utilizó la ecuación con interacción lineal y cuadrática, en la que  $t$  y  $f$  representaron el tiempo y la frecuencia de extracción asistida por ultrasonido, respectivamente, y  $Y$  correspondió a cada variable respuesta (Polifenoles totales, Flavonoides, Capacidad Antioxidante (ABTS, DPPH), los coeficientes del modelo matemático ( $a, b, c, d, e, g, h, i, j$ ), el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el nivel de significancia de cada término ( $p$ -value) y la superficie de contorno fueron calculados utilizando el software Statistica v.13 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) con la función *Advanced Linear/Nonlinear Models* en la interfaz *Nonlinear Estimation*.

$$Y = a + bt + ct^2 + df + ef^2 + gtf + htf^2 + it^2f + jt^2f^2$$

### 3.5.10. Análisis estadístico para comparar la extracción acústica y la extracción con solventes

Se utilizó el diseño completo al azar (DCA), donde el factor de estudio fue la condición de extracción, el modelo matemático que se usó fue el aditivo lineal, y es como sigue:

$$y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

$y_{ij}$ : Polifenoles totales, flavonoides y capacidades antioxidantes

$\mu$ : Efecto de la media global.

$T_i$ : Efecto de la  $i$ -ésima condición de extracción.

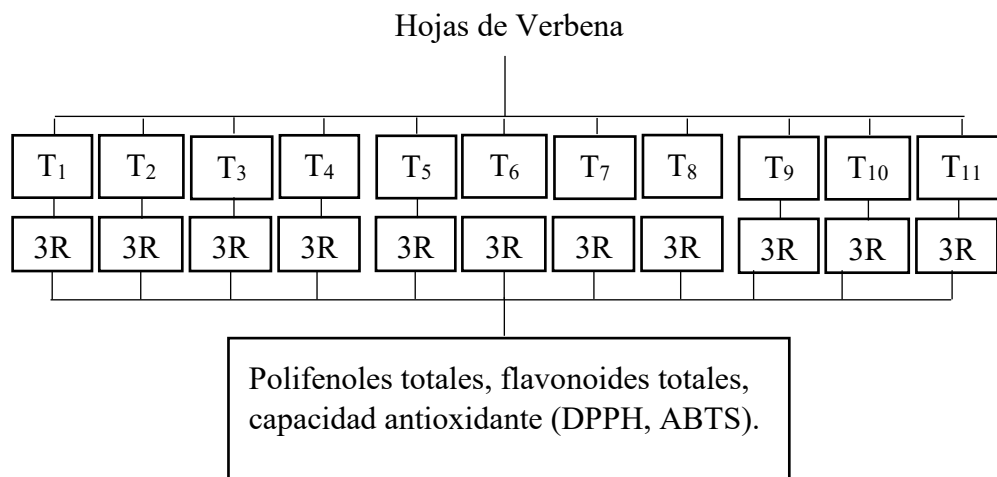
$\epsilon_{ij}$ : Efecto del error experimental de la  $i$ -ésima condición de extracción en la  $j$ -ésima repetición.

Para el análisis de diferencia de medias, se realizó el ANOVA. Si este último resultó en un  $p$ -value menor o igual a 0,05 (significancia estadística), se realizó la prueba de Tukey con un porcentaje de confiabilidad del 95% utilizando la diferencia honestamente significativa (DHS). Lo anterior se llevó a cabo con la finalidad de determinar la diferencia estadística entre tratamientos. Para ello, se utilizó el software Statistica v.7.

Decisión:

$|\bar{y}_i - \bar{y}_k| > \text{DHS}$ ; se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ):  $\mu_i = \mu_k \rightarrow \mu_i \neq \mu_k$

### 3.6. Diseño experimental

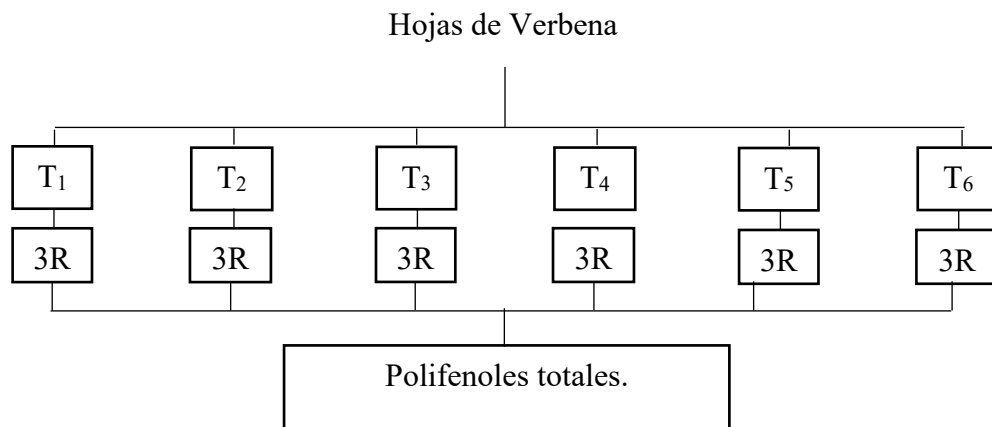


**Figura 3.** Diseño experimental de extracción de compuestos bioactivos de Verbena por ultrasonido.

Donde:

T = Extracción por ultrasonido T<sub>1</sub>: Tiempo 24 min. y Amplitud 50% (15 kHz); T<sub>2</sub>: Tiempo 40 min. y Amplitud 50% (15 kHz); T<sub>3</sub>: Tiempo 24 min. y Amplitud 90% (27 kHz); T<sub>4</sub>: Tiempo 40 min. y Amplitud 90% (27 kHz); T<sub>5</sub>: Tiempo 20,7 min. y Amplitud 70% (21 kHz); T<sub>6</sub>: Tiempo 43,3 min. y Amplitud 70% (21 kHz); T<sub>7</sub>: Tiempo 32 min. y Amplitud 41,8% (12,5 kHz); T<sub>8</sub>: Tiempo 32 min. y Amplitud 98,2% (29,5 kHz); T<sub>9</sub>: Tiempo 32 min. y Amplitud 70% (21 kHz); T<sub>10</sub>: Tiempo 32 min. y Amplitud 70% (21 kHz); y T<sub>11</sub>: Tiempo 32 min. y Amplitud 70% (21 kHz)

R = Repeticiones



**Figura 4.** Diseño experimental de extracción de compuestos bioactivos de Verbena utilizando diferentes solventes.

Donde:

T = Extracción con solventes T<sub>1</sub>: Agua (100%); T<sub>2</sub>: Agua (50%) + Etanol (50%); T<sub>3</sub>: Agua (50%) + Metanol (50%); T<sub>4</sub>: Agua (25%) + Etanol (25%) + Metanol (50%); T<sub>5</sub>: Etanol (25%) + Metanol (75%); T<sub>6</sub>: Etanol (75%) + Metanol (25%)

R = Repeticiones

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Efecto del volumen, masa y condiciones de extracción

En la Tabla 9 se muestran los resultados de diferentes condiciones de extracción, el tratamiento con ondas acústicas y un volumen de extracción de 250 mL obtuvo la mayor extracción de polifenoles totales, alcanzando un promedio de 1,633 g EAG/100 g. Esto sugiere que, bajo las condiciones experimentales empleadas, un mayor volumen de solvente de extracción en combinación con la asistencia ultrasónica mejora la eficiencia de transferencia de masa y la liberación de polifenoles totales de la matriz, resultando en una mayor recuperación de bioactividad.

**Tabla 9.** Efecto de las ondas acústicas y el volumen de extracción en el contenido de polifenoles totales (10 g de muestra)

Tratamientos	Polifenoles totales (g EAG/100 g)			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Prom.
Con ondas acústicas V <sub>143</sub>	0,955	0,907	0,991	0,951
Sin ondas acústicas V <sub>143</sub>	0,660	0,681	0,617	0,653
Con ondas acústicas V <sub>200</sub>	0,976	1,000	1,114	1,030
Sin ondas acústicas V <sub>200</sub>	0,760	0,762	0,782	0,768
Con ondas acústicas V <sub>250</sub>	1,624	1,720	1,554	1,633
Sin ondas acústicas V <sub>250</sub>	0,990	0,983	0,945	0,973

V<sub>143</sub>: volumen de 143 mL, V<sub>200</sub>: volumen de 200 mL, V<sub>250</sub>: volumen de 250 mL

En la Tabla 10 se muestra la extracción a tres volúmenes y a dos masas, los tratamientos sonicados a 250 mL (V<sub>250</sub>) consistentemente producen la mayor extracción de polifenoles totales, tanto con 3 g como con 10 g de muestra. Además, el incremento de la masa de hoja de verbena de 3 g a 10 g resulta en una concentración mayor de polifenoles totales (1,525 g EAG/100 g y 1,633 g EAG/100 g para V<sub>250</sub>, respectivamente), indicando que existe una mayor disponibilidad de compuestos extraíbles con el aumento de la cantidad de material vegetal en las mismas condiciones de sonicación, mejorando la extracción de estos bioactivos.

**Tabla 10.** Efecto del volumen de extracción acústica con 3 g y 10 g de muestra

Extracto (mL)	Polifenoles totales (g EAG/100 g)			
	(3 g de muestra)			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Promedio
143	0,823	0,818	0,800	0,814
200	0,946	0,919	0,849	0,905
250	1,554	1,379	1,642	1,525
	Polifenoles totales (g EAG/100 g)			
	(10 g de muestra)			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Promedio
143	0,955	0,907	0,991	0,951
200	0,976	1,000	1,114	1,030
250	1,624	1,720	1,554	1,633

Los resultados de la Tabla 11 consolida las conclusiones previas al demostrar que, incluso a un volumen constante de extracción ( $V_{200}$ ), el aumento progresivo de la masa de muestra (de 3 g a 10 g) conlleva a una mayor concentración de polifenoles totales, alcanzando 1,094 g EAG/100 g para 10 g de muestra. Además, la comparación directa de 10 g a  $V_{200}$  sonificado (1,094 g EAG/100 g) con 10 g a  $V_{250}$  sonificado (1,633 g EAG/100 g) reconfirma que el volumen de 250 mL es el más eficiente bajo sonicación para maximizar la recuperación de polifenoles totales.

**Tabla 11.** Efecto de la masa de extracción a volumen constante

Extracto (3, 5, 6 y 10 g Muestra)	Polifenoles totales (g EAG/100 g)			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Promedio
3 g a $V_{200}$ Sonicado	0,998	1,008	0,871	0,959
5 g a $V_{200}$ Sonicado	0,991	0,973	1,082	1,015
6 g a $V_{200}$ Sonicado	1,037	0,986	1,050	1,024
10 g a $V_{200}$ Sonicado	1,140	1,085	1,057	1,094
10 g a $V_{250}$ Sonicado	1,624	1,720	1,554	1,633

Las tres tablas anteriores confirman la mayor eficiencia de la extracción asistida por ultrasonido con el volumen de 250 mL y el uso de 10 g de muestra, siendo factores críticos para proceder con la optimización de la liberación de polifenoles totales. Esto se debe a la mejora en la cavitación ultrasónica y una relación sólido-líquido favorable, que incrementan la

transferencia de masa. Estudios sobre la búsqueda de la mejor proporción de volumen del solvente/masa de muestra en la extracción acústica también encontraron mejor respuesta utilizando mayor volumen de solvente con mayor masa de muestra hasta llegar a la saturación del proceso de transferencia de masa, por ejemplo, Xu y Pan (2013) en su estudio sobre efectos de diversos factores del tratamiento ultrasónico en el rendimiento de la extracción del licopeno del pomelo rojo (*Citrus paradise Macf.*) demostraron que el rendimiento de la extracción aumenta con el aumento de la relación disolvente/material hasta alcanzar el equilibrio. Asimismo, Korobiichuk et al. (2023) en su investigación sobre el estudio de los procesos de transferencia de calor y masa durante la extracción de materias primas vegetales mediante ultrasonidos, afirmaron que el volumen del solvente es un parámetro importante en el modelo matemático de extracción.

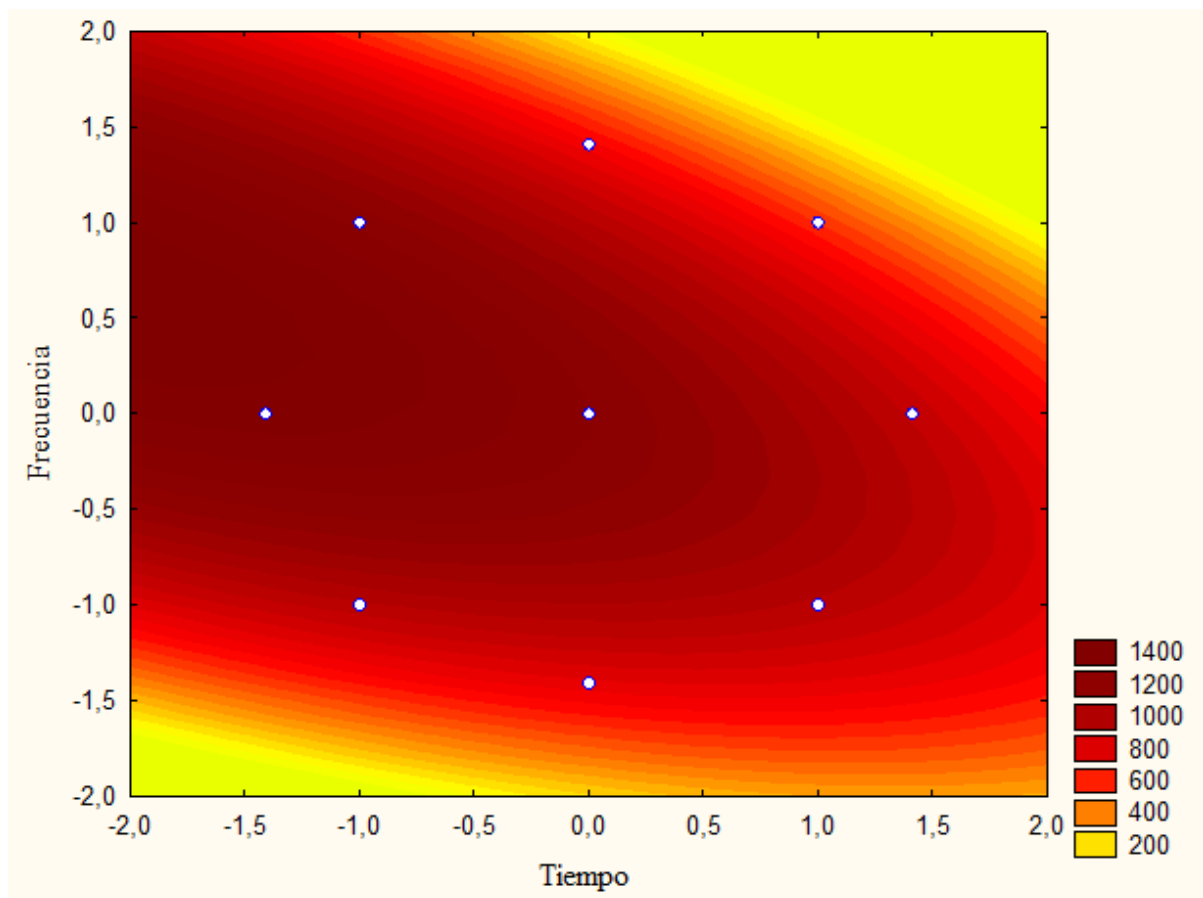
#### **4.2. Optimización del proceso de extracción de bioactividad**

Luego de obtener los parámetros de volumen y masa adecuados se prepararon los extractos de la hoja de verbena. Posteriormente, se sometieron a un proceso de extracción asistida por ultrasonido, variando los tiempos y frecuencias de sonicación. Se llevaron a cabo tres ensayos para la cuantificación de polifenoles y así llegar al punto óptimo de tiempo y frecuencia adecuados para tener la mayor extracción posible.

La Tabla 12, que presenta el primer análisis de optimización mediante un diseño central compuesto rotacional, revela la compleja interacción entre el tiempo y la amplitud en la extracción acústica de polifenoles. Destaca que la máxima extracción se logró con el tratamiento T5 (1387,5 mg EAG/100 g), utilizando 31,8 minutos de tiempo y 70% (21 kHz) de amplitud, sugiriendo un equilibrio óptimo de energía y duración para la cavitación y liberación de compuestos. Por otro lado, amplitudes excesivas T4 (90%) o tiempos prolongados T6 (88,2 min), incluso a amplitudes medias, pueden disminuir la eficiencia de extracción, posiblemente debido a la degradación de los polifenoles o a la saturación del medio, lo cual subraya la necesidad de una optimización. Además, en la Figura 5 se visualiza la interacción entre tiempo y frecuencia en la optimización de polifenoles. La zona más oscura (rojo intenso) alrededor de "Tiempo" 0 y "Frecuencia" 0 (que corresponden a los puntos centrales del diseño experimental) indica el óptimo para la extracción, validando que niveles intermedios de estos parámetros son clave para la máxima concentración. Esto sugiere la existencia de un punto de equilibrio donde la energía ultrasónica es suficiente para la extracción sin causar degradación, complementando la información numérica de la Tabla 12.

**Tabla 12.** Contenido de polifenoles totales en verbena según los tratamientos de extracción acústica (primer análisis)

Tratamientos	Tiempo (min.)	Amplitud (%)	Polifenoles totales (mg EAG/100 g)
T1	40	50	(986,8±10,2) <sup>d</sup>
T2	80	50	(1019,6±6,4) <sup>d</sup>
T3	40	90	(1178,7±20,4) <sup>c</sup>
T4	80	90	(531,4±8,1) <sup>h</sup>
T5	31,8	70	(1387,5±10,2) <sup>a</sup>
T6	88,2	70	(849,6±11,9) <sup>e</sup>
T7	60	41,8	(649,2±16,6) <sup>g</sup>
T8	60	98,2	(726,7±29,5) <sup>f</sup>
T9	60	70	(1248,6±10,5) <sup>b</sup>
T10	60	70	(1256,1±29,6) <sup>b</sup>
T11	60	70	(1251,9±13,9) <sup>b</sup>

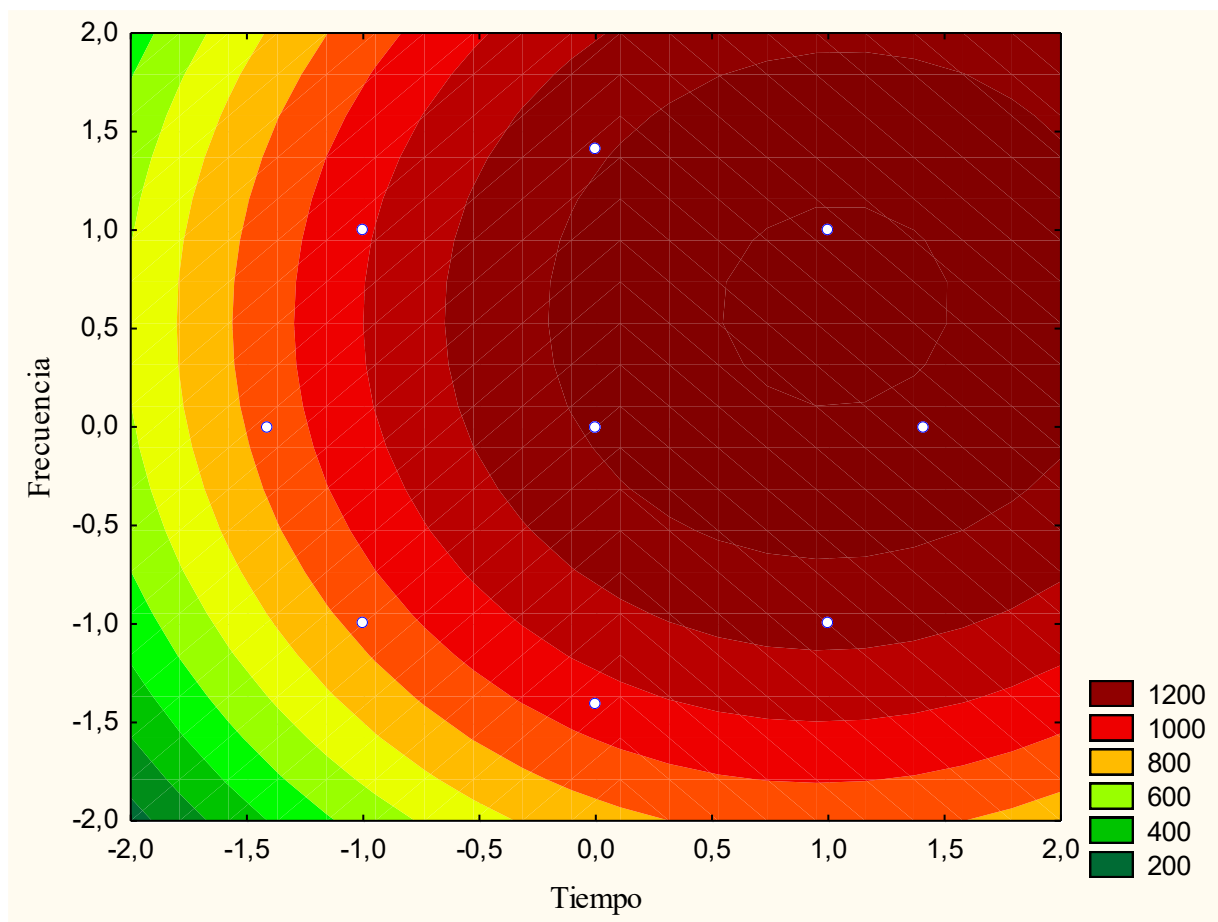


**Figura 5.** Gráfico de contorno del primer análisis de optimización de la extracción acústica de polifenoles totales.

En la Tabla 13, correspondiente al segundo análisis de optimización, refina los hallazgos previos, confirmando que T6, con 35.7 minutos de tiempo y 70% de amplitud, arrojó la mayor concentración de polifenoles (1307,7 mg EAG/100 g), si bien ligeramente inferior al óptimo inicial de la Tabla 12 (T5: 1387,5 mg EAG/100g). Esta variación, junto con resultados competitivos en otros tratamientos centrales (T9-T11), sugiere que la zona óptima es robusta y que pequeños ajustes en tiempo y amplitud pueden influir en la eficiencia, manteniendo la importancia de una amplitud intermedia para evitar la degradación de los polifenoles. Asimismo, en la Figura 6, el gráfico de contornos del segundo análisis de optimización, visualiza el espacio de respuesta para la extracción de polifenoles. Similar al análisis anterior, la zona de color rojo más intenso, indicando las concentraciones más altas (alrededor de 1200 mg EAG/100g), se concentra en un rango intermedio de tiempo y frecuencia (o amplitud). Esto reconfirma la existencia de un punto óptimo bien definido donde la combinación de estos parámetros maximiza la extracción, proporcionando un soporte visual para los datos numéricos de la Tabla 13 y reforzando la idea de que tanto la deficiencia como el exceso de energía ultrasónica pueden ser perjudiciales para el rendimiento de la extracción.

**Tabla 13.** Contenido de polifenoles totales en verbena según los tratamientos de extracción acústica (segundo análisis)

Tratamientos	Tiempo (min.)	Amplitud (%)	Polifenoles totales (mg EAG/100 g)
T1	14	50	(840,5±53) <sup>c</sup>
T2	32	50	(1130,1±45,2) <sup>b</sup>
T3	14	90	(951,6±483,3) <sup>c</sup>
T4	32	90	(1260,6±22) <sup>ab</sup>
T5	10,3	70	(848,1±38,7) <sup>c</sup>
T6	35,7	70	(1307,7±35,8) <sup>a</sup>
T7	23	41,8	(939,8±41,7) <sup>c</sup>
T8	23	98,2	(1238,7±48,1) <sup>ab</sup>
T9	23	70	(1210,9±21,8) <sup>ab</sup>
T10	23	70	(1226,9±49,6) <sup>ab</sup>
T11	23	70	(1199,1±94,7) <sup>ab</sup>



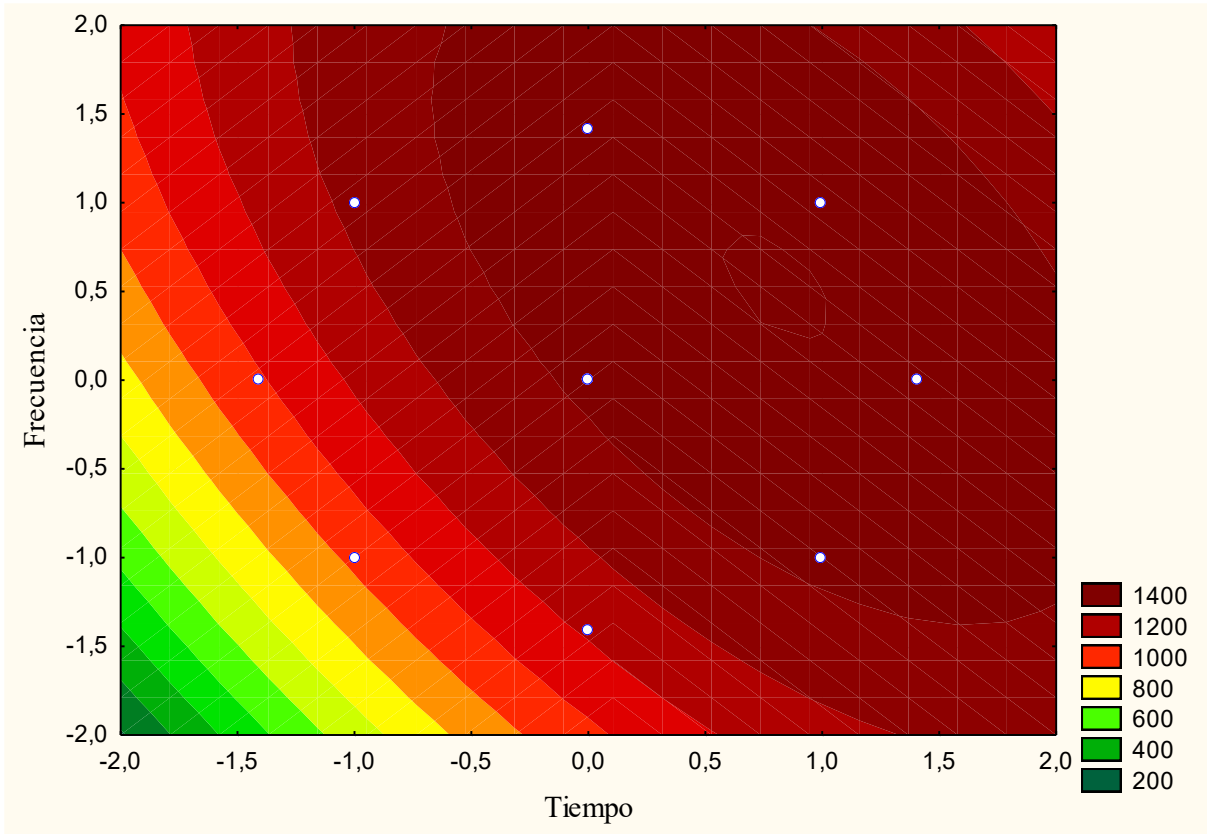
**Figura 6.** Gráfico de contorno del segundo análisis de optimización de la extracción acústica de polifenoles totales.

En la tercera prueba, correspondiente a la fase final del proceso de optimización de la extracción, la Tabla 14 demuestra que el tratamiento T6 logró la mayor concentración de polifenoles (1450,8 mg EAG/100 g), superando los máximos de las etapas previas. Esto valida que la optimización iterativa del tiempo y la amplitud es efectiva. En la Figura 7, el gráfico de contornos del tercer análisis, visualiza claramente la región óptima para la extracción de polifenoles. Además, en la Figura 8, el gráfico de superficie de respuesta en 3D, proporciona una representación integral del modelo de optimización. La cúspide de la superficie, donde los polifenoles totales alcanzan su máximo, ilustra de forma tridimensional el punto óptimo combinado de tiempo y frecuencia (o amplitud), confirmando visualmente la robustez del modelo predictivo. Esta representación es crucial para identificar con precisión las condiciones que maximizan la extracción y sirve como base para una optimización futura del proceso utilizando el modelo matemático derivado. El mantenimiento de la frecuencia constante a 21 kHz sugiere que esta variable es un factor clave en la eficiencia de extracción de polifenoles, mientras que el aumento progresivo del tiempo de sonicación ha favorecido la liberación de

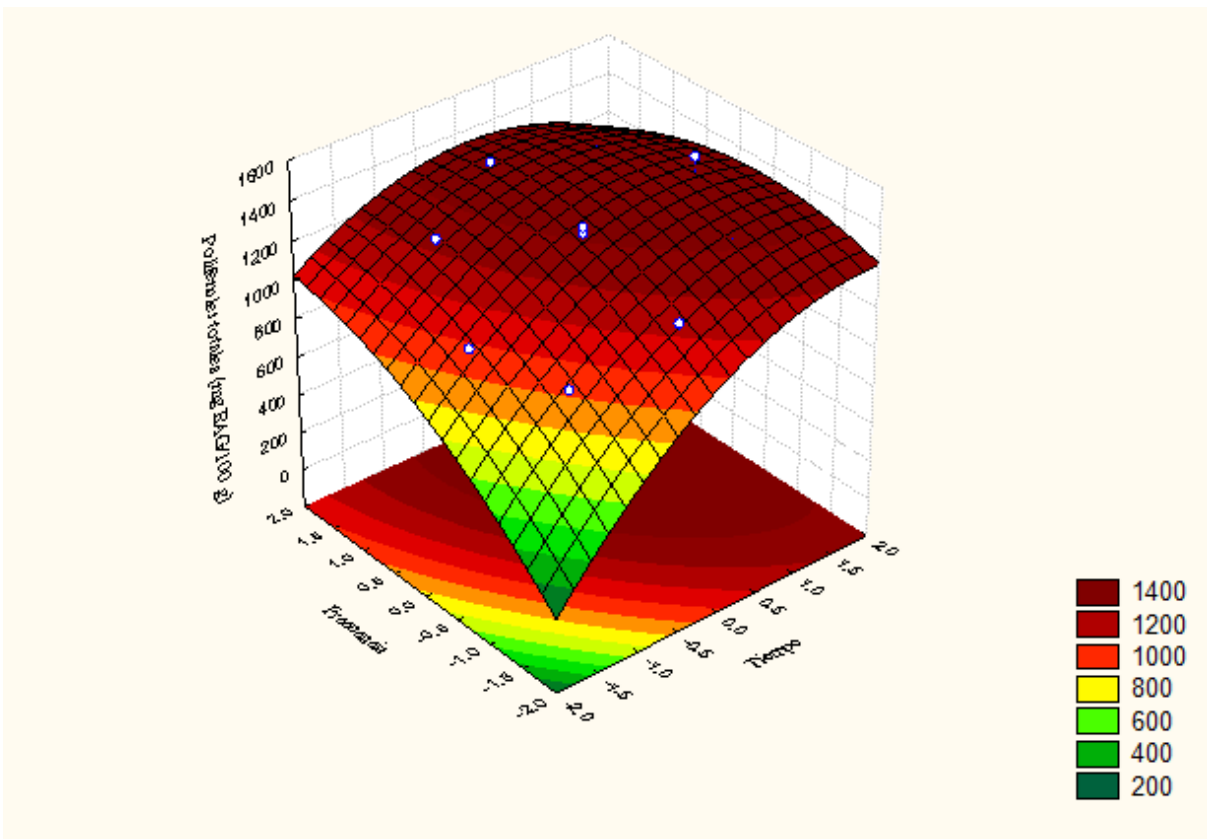
estos compuestos, probablemente debido a la intensificación de la ruptura celular inducida por las ondas acústicas. Este hallazgo confirma la relevancia de la optimización del tiempo de sonicación dentro de los parámetros experimentales, permitiendo alcanzar un rendimiento máximo en la extracción de metabolitos bioactivos, este fenómeno lo confirman Garcia-Oliveira et al. (2024) quienes extrajeron compuestos fenólicos de flores de *Arnica montana* (Árnica) por ultrasonido a una frecuencia de 20 kHz quienes afirman que para obtener mayor concentración de compuestos fenólicos se debe mantener tiempos dentro del rango de 13 a 45 min, lo cual el tiempo de sonicación utilizado en esta investigación, donde se obtiene la mayor concentración de compuestos fenólicos está dentro de este rango. Asimismo Bin Mokaizh et al. (2024) extrajeron por ultrasonidos compuestos fenólicos de hojas de *Commiphora gileadensis* (Bálsamo de Arabia), quienes demuestran que a medida que la frecuencia ultrasónica aumenta por encima de 20 kHz la concentración de compuestos fenólicos comienza a disminuir, lo que demuestra que existe un valor de frecuencia óptimo (alrededor de 20 kHz) lo que conlleva a obtener mayor concentraciones a este parámetro de frecuencia, mientras que desviarse de este parámetro puede disminuir la concentración. Estos trabajos de investigación sustentan la mayor frecuencia obtenida en este trabajo siendo 21 kHz donde se obtiene la mayor frecuencia de extracción de compuestos fenólicos en el extracto de verbena.

**Tabla 14.** Contenido de polifenoles totales en verbena según los tratamientos de extracción acústica (tercer análisis)

Tratamientos	Tiempo (min.)	Amplitud (%)	Polifenoles totales (mg EAG/100 g)
T1	24	50	(913,4±62,89) <sup>e</sup>
T2	40	50	(1255,2±33,64) <sup>cd</sup>
T3	24	90	(1239,2±24,70) <sup>cd</sup>
T4	40	90	(1345,8±37,13) <sup>abc</sup>
T5	20,7	70	(973,5±31,51) <sup>e</sup>
T6	43,3	70	(1450,8±33,43) <sup>a</sup>
T7	32	41,8	(1157,8±49,00) <sup>d</sup>
T8	32	98,2	(1374,7±19,15) <sup>ab</sup>
T9	32	70	(1319,9±22,88) <sup>bc</sup>
T10	32	70	(1307,0±45,75) <sup>bc</sup>
T11	32	70	(1339,7±44,98) <sup>abc</sup>



**Figura 7.** Gráfico de contorno del tercer análisis de optimización de la extracción acústica de polifenoles totales.



**Figura 8.** Gráfico de superficie respuesta en función de los polifenoles totales.

Del anexo A-I. se obtiene los coeficientes del modelo matemático que gobierna la figura 8 de la superficie respuesta y también del anexo A-II. se observa que el ( $p < 0,05$ ) es decir hay influencia del tiempo y la frecuencia en la extracción de polifenoles totales del extracto de verbena, el modelo matemático tiene un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9514 mostrando así un ajuste al comportamiento de la concentración de polifenoles totales en función del tiempo y frecuencia.

$$z = 1322,396 + 140,59t - 68,08t^2 + 90,557f - 40,897f^2 - 58,8tf$$

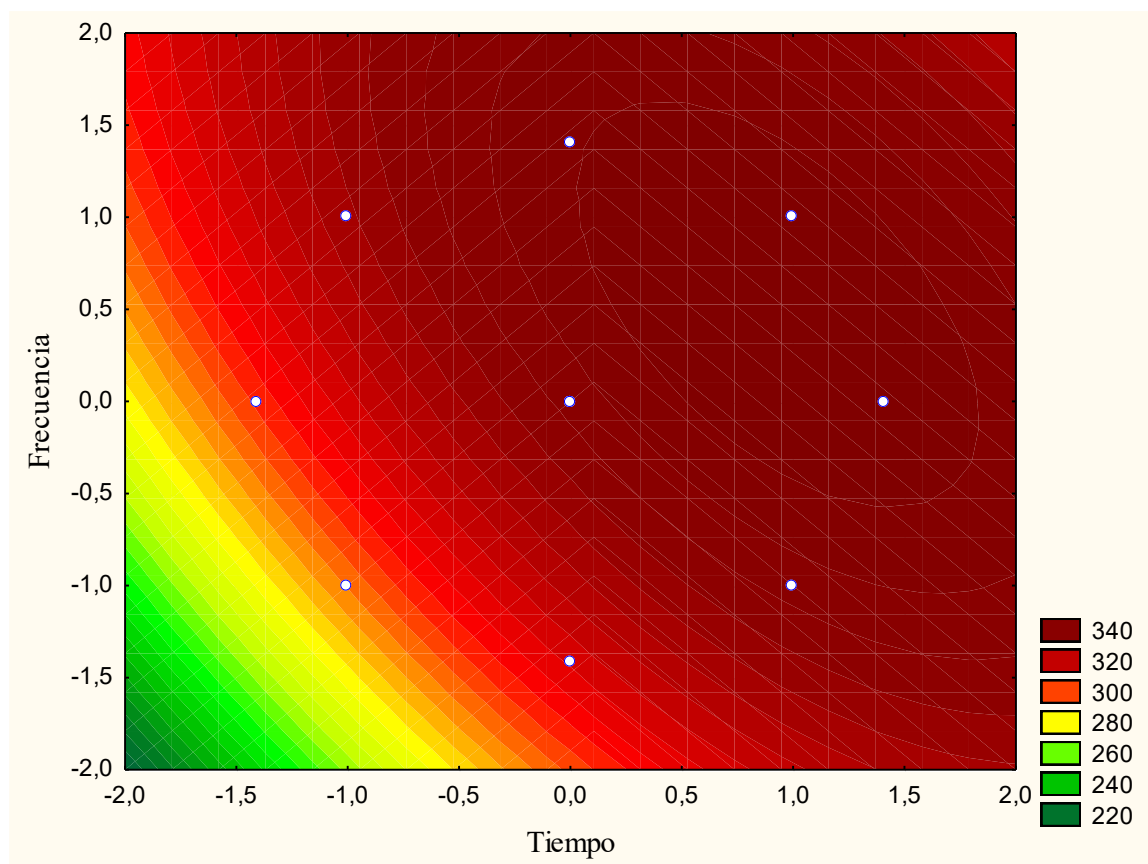
Por su parte Bin Mokaizh et al. (2024) obtuvieron 462 mg EAG/100 g mediante extracción por ultrasonido de polifenoles totales de la corteza de *Commiphora gileadensis* (Bálsamo de Arabia) utilizando una frecuencia de 20 kHz por un tiempo de 15 min, esta concentración de compuestos fenólicos es menor a lo obtenido en esta investigación ( $1450,8 \pm 33,4$  mg EAG/100 g) esta variación se debe al tiempo de sonicación sometido el extracto.

Utilizando los mismos parámetros optimizados en la tercera prueba de extracción, se llevó a cabo la cuantificación de flavonoides totales, obteniéndose la mayor concentración en el Tratamiento 6, con un rendimiento de  $350,8 \pm 8,26$  mg EC/100 g. Este resultado se logró empleando una frecuencia de 21 kHz y un tiempo de sonicación de 43,3 minutos, condiciones que ya habían demostrado ser óptimas para la extracción de polifenoles.

La coincidencia en los parámetros óptimos para la extracción de ambos compuestos bioactivos (polifenoles y flavonoides) sugiere que la sonicación a 21 kHz favorece la ruptura de la matriz celular de *Verbena officinalis*, promoviendo una mayor liberación de metabolitos de interés. Estos hallazgos refuerzan la eficacia del ultrasonido como una técnica eficiente para la extracción selectiva de compuestos bioactivos, optimizando el rendimiento del proceso y mejorando la recuperación de flavonoides mediante el ajuste preciso del tiempo de exposición. Por su parte Sang et al. (2025) cuantificaron flavonoides totales donde sometieron a ondas acústicas por un tiempo de 11 min. extracto de cascara de *Camellia sinensis* (té), obteniendo 8,5 mg EC/100 g. Además, la optimización matemática del proceso se realizará posteriormente mediante el cálculo de derivadas parciales aplicadas al modelo matemático desarrollado, lo que permitirá identificar con mayor precisión los puntos críticos que maximizan la eficiencia de extracción.

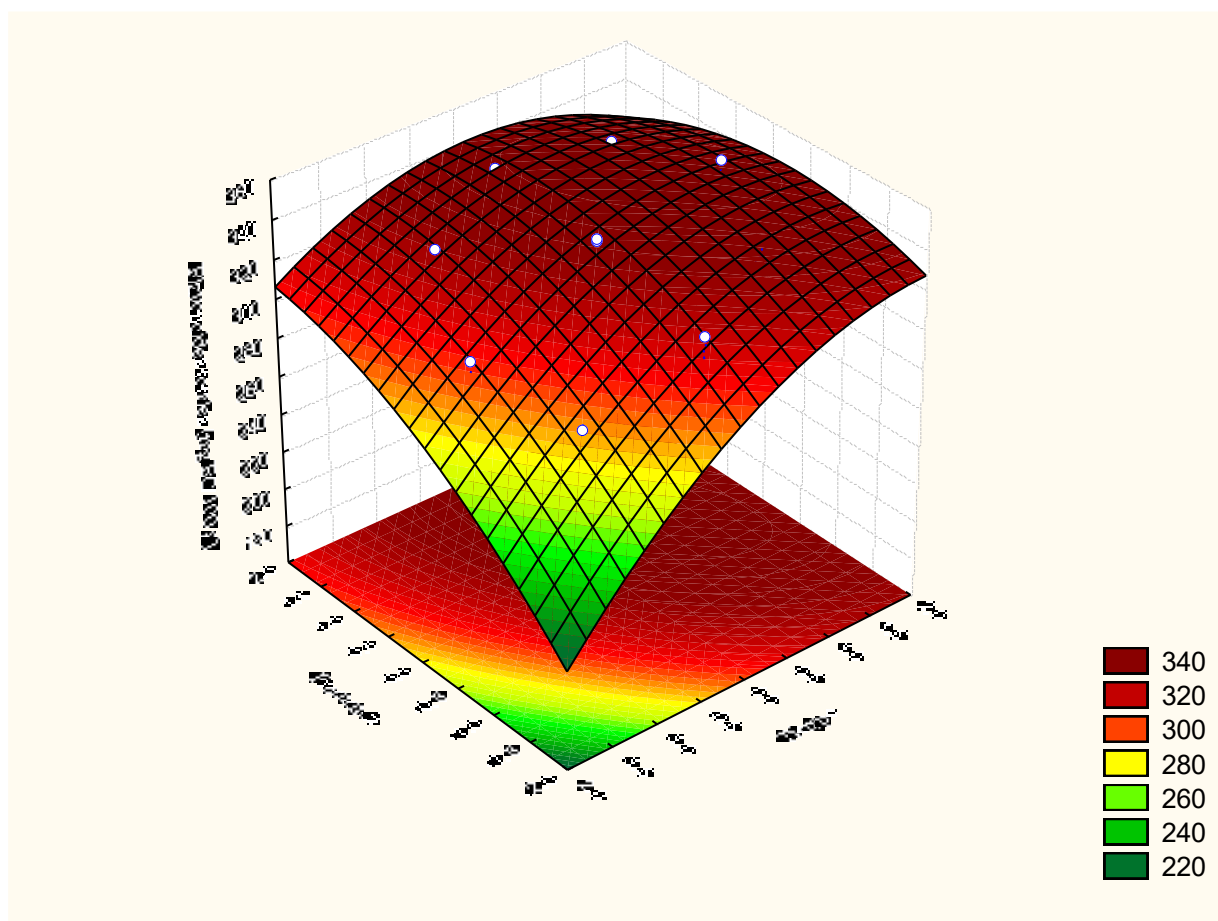
**Tabla 15.** Contenido de flavonoides totales en verbena según los tratamientos de extracción acústica

Tratamientos	Tiempo (min.)	Amplitud (%)	Flavonoides totales (mg EC/100 g)
T1	24	50	(286,0±3,94) <sup>d</sup>
T2	40	50	(329,9±13,02) <sup>ab</sup>
T3	24	90	(328,3±9,49) <sup>abc</sup>
T4	40	90	(346,7±10,47) <sup>ab</sup>
T5	20,7	70	(303,4±7,15) <sup>cd</sup>
T6	43,3	70	(350,8±8,26) <sup>a</sup>
T7	32	41,8	(321,7±10,13) <sup>bc</sup>
T8	32	98,2	(341,3±5,27) <sup>ab</sup>
T9	32	70	(338,1±8,05) <sup>ab</sup>
T10	32	70	(336,6±7,15) <sup>ab</sup>
T11	32	70	(337,8±8,05) <sup>ab</sup>



**Figura 9.** Gráfico de contorno de optimización de la extracción acústica en función de los flavonoides totales.

Además, en la Figura 9 visualiza el paisaje de respuesta para la extracción de flavonoides, mostrando una región de máxima concentración (rojo oscuro) en un rango similar de tiempo y frecuencia (o amplitud). La forma de los contornos refuerza la idea de un punto óptimo bien definido, donde el aumento de la duración y una amplitud intermedia son cruciales para maximizar el rendimiento. Esto gráficamente respalda los datos de la Tabla 15, ilustrando la robustez del modelo predictivo para la extracción de estos compuestos.



**Figura 10.** Gráfico de superficie respuesta en función de los flavonoides totales.

En la Figura 10, el gráfico de superficie de respuesta en 3D para flavonoides, ofrece una representación tridimensional clara del comportamiento de la extracción, con una cúspide pronunciada que indica el pico de concentración óptimo. Esta superficie valida que los parámetros de tiempo y frecuencia (o amplitud) trabajan en conjunto para maximizar la liberación de flavonoides, proporcionando una base visual sólida para la posterior optimización matemática del proceso mediante derivadas parciales, lo que permitirá una predicción más precisa de las condiciones ideales.

El análisis estadístico de los datos (Anexo A-IV) confirma la significancia estadística ( $p < 0,05$ ) de los parámetros de tiempo y frecuencia (o amplitud) sobre el

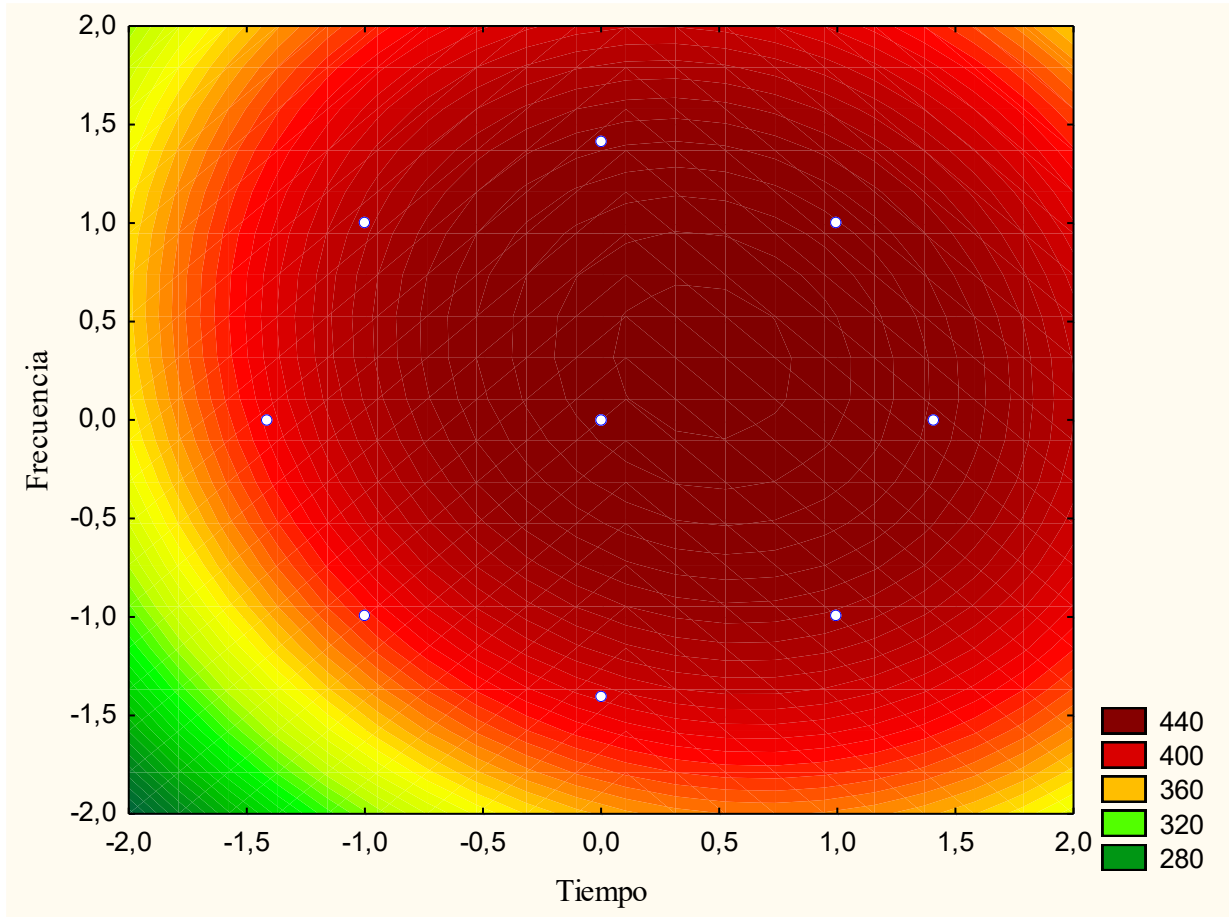
rendimiento de extracción de flavonoides totales en el extracto de verbena, lo que valida su influencia directa en el proceso. Los coeficientes del modelo matemático derivados del Anexo A-III, que subyacen a la Figura 10 (superficie de respuesta), demuestran una alta capacidad predictiva y explicativa, evidenciada por un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9432. Este valor de  $R^2$  cercano a la unidad indica que más del 94% de la variabilidad en la concentración de flavonoides totales es explicada por el modelo, confirmando un ajuste robusto a la relación funcional entre los parámetros de sonicación y la extracción, lo cual permite una optimización confiable del proceso.

$$z = 337,5258 + 16,1648t - 6,8872t^2 + 10,8603f - 4,6639f^2 - 6,3925tf$$

También se llevaron a cabo ensayos para determinar la capacidad antioxidante DPPH como se muestra en la Tabla 16, lo que revela que el Tratamiento T11 (32 min, 70% Amplitud) y el T6 (43,3 min, 70% Amplitud) obtuvieron las mayores actividades antioxidantes (448,27 y 438,45  $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ , respectivamente). Esta correspondencia directa entre los tratamientos óptimos para la extracción de polifenoles y flavonoides y la alta capacidad antioxidante sugiere que estos compuestos fenólicos son los principales responsables de la bioactividad del extracto. Se observa que un tiempo de sonicación adecuado (como 32 o 43,3 min) y una amplitud intermedia (70%) son cruciales para maximizar esta propiedad.

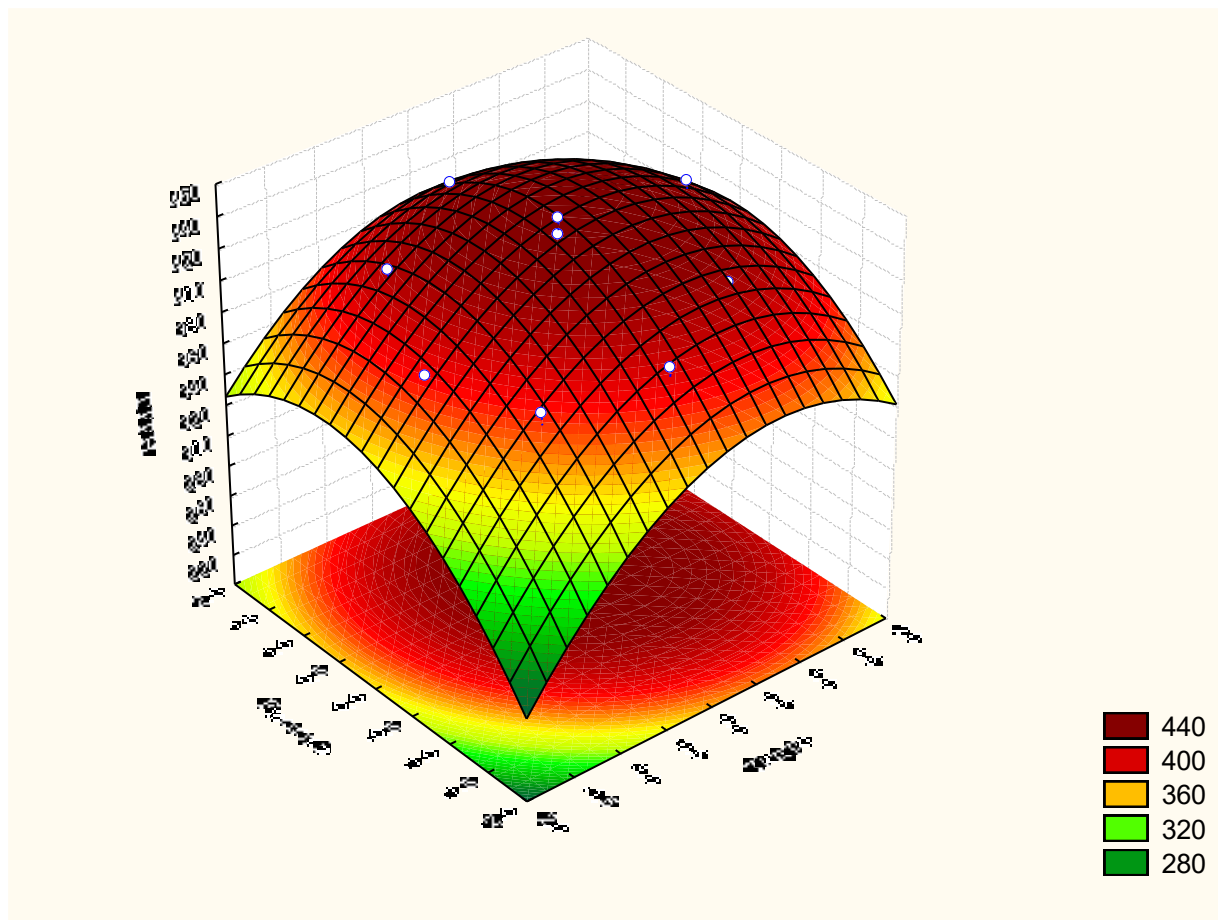
**Tabla 16.** Capacidad antioxidante DPPH en el extracto acuoso de verbena a diferentes tratamientos de extracción acústica

Tratamientos	Tiempo (min.)	Amplitud (%)	DPPH ( $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ )
T1	24	50	(384,25 $\pm$ 30,30) <sup>b</sup>
T2	40	50	(413,38 $\pm$ 4,58) <sup>ab</sup>
T3	24	90	(411,69 $\pm$ 6,10) <sup>ab</sup>
T4	40	90	(426,25 $\pm$ 11,69) <sup>ab</sup>
T5	20,7	70	(386,62 $\pm$ 8,15) <sup>b</sup>
T6	43,3	70	(438,45 $\pm$ 9,77) <sup>ab</sup>
T7	32	41,8	(398,48 $\pm$ 17,63) <sup>ab</sup>
T8	32	98,2	(429,64 $\pm$ 7,89) <sup>ab</sup>
T9	32	70	(438,45 $\pm$ 38,43) <sup>ab</sup>
T10	32	70	(438,11 $\pm$ 26,48) <sup>ab</sup>
T11	32	70	(448,27 $\pm$ 9,31) <sup>a</sup>



**Figura 11.** Gráfico de contorno de optimización de la extracción acústica en función de la capacidad antioxidante DPPH.

De la Figura 11, el gráfico de contornos para la capacidad antioxidante DPPH, muestra una región de máxima actividad (colores rojos intensos) centrada en rangos intermedios a altos de tiempo y amplitudes medias. Esta visualización confirma que no solo la cantidad de compuestos bioactivos, sino también su integridad y actividad, se optimizan bajo estas condiciones ultrasónicas. El patrón sugiere que la cavitación eficiente facilita la liberación de antioxidantes sin inducir su degradación. Asimismo, de la Figura 12, el gráfico de superficie de respuesta en 3D para la capacidad antioxidante DPPH, ilustra de manera tridimensional la existencia de un pico bien definido de actividad, coincidente con los parámetros de tiempo y amplitud previamente optimizados para la extracción de polifenoles y flavonoides. La superficie curvada demuestra una interacción sinérgica entre estas variables operacionales. Esta representación es fundamental para la validación del modelo predictivo y para comprender cómo las condiciones de sonicación influyen directamente en la bioactividad funcional del extracto.



**Figura 12.** Gráfico de superficie respuesta en función de la capacidad antioxidante DPPH.

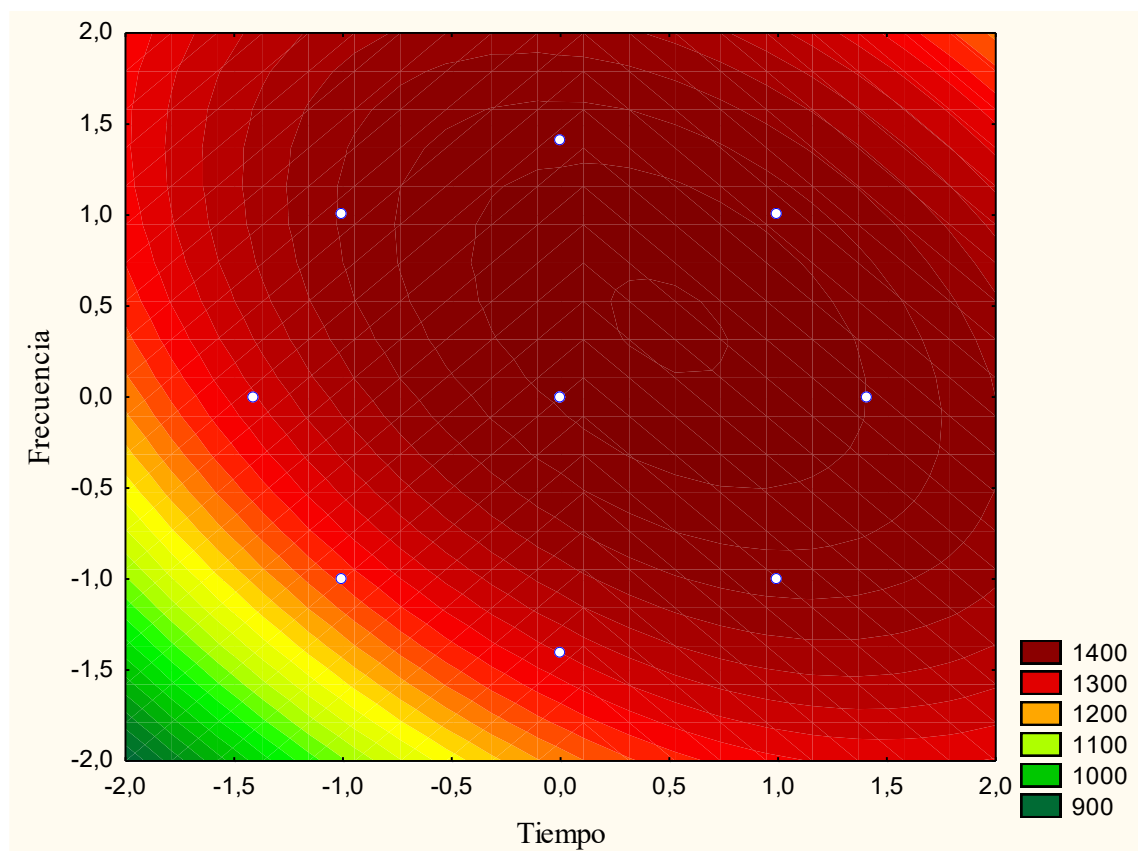
Para la capacidad antioxidante DPPH, el análisis de los Anexos A-V y A-VI confirma la influencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) del tiempo y la frecuencia (o amplitud) en la capacidad antioxidante DPPH del extracto de verbena. Los coeficientes derivados del modelo matemático que rige la Figura 12 (superficie de respuesta) presentan un excelente coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9562. Este elevado  $R^2$  indica que más del 95% de la variabilidad observada en la capacidad antioxidante DPPH es explicada por el modelo, demostrando un ajuste al comportamiento de los datos.

$$z = 441,6268 + 14,6398t - 15,6981t^2 + 10,5621f - 14,9311f^2 - 3,6425tf$$

La Tabla 17, que evalúa la capacidad antioxidante mediante el método ABTS, muestra que las condiciones de extracción optimizadas previamente para polifenoles y flavonoides, particularmente los tratamientos con tiempos más prolongados y amplitudes intermedias (T6, T9, T10, T11), resultan en las actividades ABTS más elevadas, alcanzando valores cercanos a 1425,93  $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$ . Esta consistente alta actividad antioxidante, medida por un ensayo distinto al DPPH, refuerza la robustez de las condiciones de sonicación optimizadas para extraer compuestos bioactivos con potente capacidad antirradicalaria.

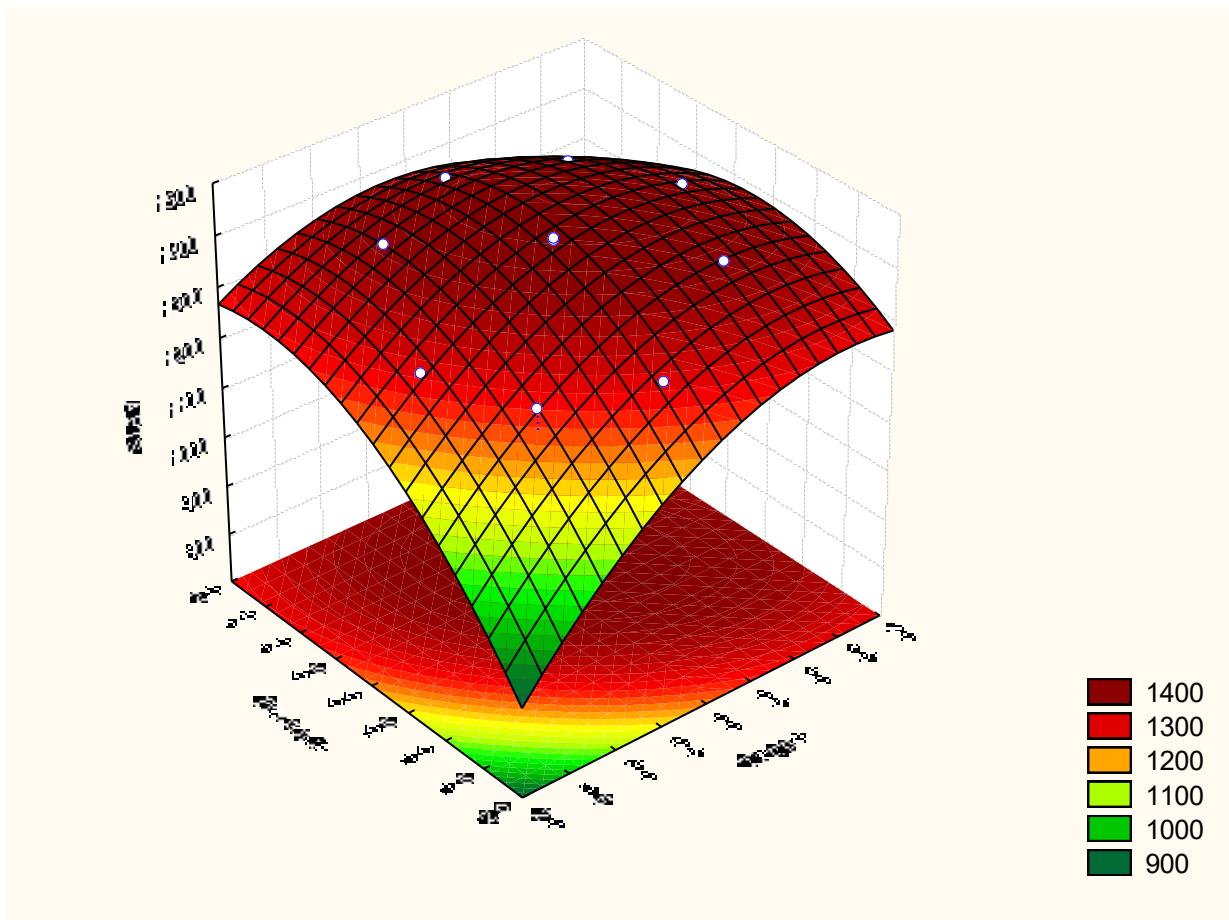
**Tabla 17.** Capacidad antioxidante ABTS en el extracto acuoso de verbena a diferentes tratamientos de extracción acústica

Tratamientos	Tiempo (min.)	Amplitud (%)	ABTS ( $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ )
T1	24	50	(1271,60 $\pm$ 53,87) <sup>a</sup>
T2	40	50	(1397,27 $\pm$ 53,46) <sup>a</sup>
T3	24	90	(1395,06 $\pm$ 103,38) <sup>a</sup>
T4	40	90	(1408,29 $\pm$ 75,21) <sup>a</sup>
T5	20,7	70	(1276,01 $\pm$ 61,45) <sup>a</sup>
T6	43,3	70	(1421,52 $\pm$ 102,96) <sup>a</sup>
T7	32	41,8	(1280,42 $\pm$ 121,23) <sup>a</sup>
T8	32	98,2	(1412,70 $\pm$ 109,28) <sup>a</sup>
T9	32	70	(1423,72 $\pm$ 116,51) <sup>a</sup>
T10	32	70	(1421,52 $\pm$ 109,14) <sup>a</sup>
T11	32	70	(1425,93 $\pm$ 119,60) <sup>a</sup>



**Figura 13.** Gráfico de contorno de optimización de la extracción acústica en función de la capacidad antioxidante ABTS.

En la Figura 13, el gráfico de contornos para la capacidad antioxidante ABTS, presenta una amplia región de color rojo intenso, indicando una zona extensa de alta actividad antioxidante dentro de los rangos de tiempo y frecuencia (o amplitud) explorados. Este patrón sugiere que la capacidad antioxidante ABTS es robusta a variaciones en estos parámetros dentro de la región óptima, lo que confirma la efectividad de la extracción acústica para obtener extractos con una elevada actividad biológica y una buena estabilidad de los compuestos antioxidantes. Asimismo, en la Figura 14, el gráfico de superficie de respuesta en 3D para la capacidad antioxidante ABTS, ilustra claramente una región de máxima respuesta que se extiende sobre un rango óptimo de tiempo y frecuencia. Esta superficie valida que la interacción de estas variables operacionales maximiza la liberación de compuestos con alta capacidad de neutralizar radicales ABTS. La forma relativamente plana de la cúspide sugiere que el proceso de extracción es altamente eficiente en esta región, lo que garantiza una producción consistente de extractos con fuerte potencial antioxidante.



**Figura 14.** Gráfico de superficie respuesta en función de la capacidad antioxidante ABTS.

En el análisis de la capacidad antioxidante ABTS, los datos del Anexo A-VII, que proporcionan los coeficientes del modelo matemático para la Figura 14 (superficie de respuesta), junto con el Anexo A-VIII, confirman la influencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) del tiempo y la frecuencia (o amplitud) en la actividad antioxidante ABTS del extracto de verbena. El modelo matemático exhibe una excelente bondad de ajuste, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9575, lo que indica que más del 95% de la variabilidad en la capacidad antioxidante ABTS puede ser explicada por la interacción de estas variables. Este alto valor de  $R^2$  valida la fiabilidad del modelo para predecir y optimizar la bioactividad antioxidante del extracto.

$$z = 1423,641 + 43,137t - 32,419t^2 + 40,244f - 33,528f^2 - 28,11tf$$

#### **4.3. Contenido de polifenoles totales en la verbena utilizando solventes de alta y media polaridad**

Se llevó a cabo la cuantificación de polifenoles totales empleando solventes de alta y media polaridad, cuyos resultados se presentan en la Tabla 18. Se obtuvo un rendimiento de  $784,00 \pm 15,10$  mg EAG/100 g en el Tratamiento 4, utilizando una mezcla de agua (25%) + etanol (25%) + metanol (50%) como fase extractora, un resultado mayor obtuvo Khursheed et al. (2024) siendo de  $1295,4 \pm 35,8$  mg EAG/100 g, pero aunque la combinación de solventes permitió la extracción de compuestos fenólicos en una proporción considerable y otros trabajos muestran valores también considerables, los valores obtenidos fueron menores en comparación con los logrados mediante extracción asistida por ultrasonido, específicamente bajo los parámetros en la tercera prueba (21 kHz y 43,3 minutos de sonicación).

La menor eficiencia de los solventes convencionales puede atribuirse a la naturaleza pasiva del proceso, donde la transferencia de masa depende principalmente de la difusión y solubilidad de los compuestos fenólicos en la fase extractora, lo que limita la disrupción de la matriz celular y la liberación de metabolitos bioactivos. En contraste, la extracción por ultrasonido potencia la liberación de polifenoles debido a la generación de cavitación acústica, la cual induce la formación de microburbujas que, al colapsar, generan microturbulencias y estrés mecánico en la estructura celular, facilitando la ruptura de las paredes celulares y favoreciendo la solubilización de los compuestos fenólicos.

Estos resultados evidencian la superioridad del ultrasonido como una técnica eficiente para la extracción de polifenoles, permitiendo una mayor recuperación de compuestos bioactivos en comparación con métodos convencionales basados únicamente en la afinidad solvente-soluto.

**Tabla 18.** Contenido de polifenoles totales extraído mediante solventes de alta polaridad.

Tratamientos	Solventes de extracción	Polifenoles totales (mg EAG/100 g)
T1	Agua (100 %)	(844,67 ± 52,44) <sup>a</sup>
T2	Agua (50%) + Etanol (50%)	(448,33 ± 11,02) <sup>d</sup>
T3	Agua (50%) + Metanol (50%)	(604,33 ± 46,50) <sup>c</sup>
T4	Agua (25%) + Etanol (25%) + Metanol (50%)	(784,00 ± 15,10) <sup>ab</sup>
T5	Etanol (25%) + Metanol (75%)	(616,67 ± 33,95) <sup>c</sup>
T6	Etanol (75%) + Metanol (25%)	(732,00 ± 19,08) <sup>b</sup>

#### 4.4. Modelos matemáticos de superficie respuesta para maximizar la extracción de la bioactividad

En la presente investigación, para polifenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) se aplicó un modelo matemático para optimizar la bioactividad del extracto de verbena. La extracción de compuestos bioactivos mediante ultrasonido es una técnica avanzada que permite mejorar el rendimiento de recuperación en comparación con métodos convencionales, debido a la cavitación acústica generada por ondas de alta frecuencia, lo que favorece la ruptura de estructuras celulares y la liberación eficiente de metabolitos de interés.

Para este análisis, se estableció un modelo de regresión cuadrática utilizando el software Statistica 7, considerando el efecto de dos variables independientes: tiempo de sonicación (t) y frecuencia (f), con el objetivo de determinar las condiciones óptimas para maximizar la bioactividad.

A partir de cada modelo, se calcularon las derivadas parciales con respecto a cada variable independiente que son el tiempo y la frecuencia y se igualaron a cero  $\frac{\partial z}{\partial t} = 0$ ,  $\frac{\partial z}{\partial f} = 0$ .

Obteniendo dos ecuaciones con dos variables y resolviendo el sistema de ecuaciones se obtuvo el punto crítico.

Para clasificar el punto crítico como máximo, mínimo o punto silla, se calcularon las segundas derivadas parciales y el determinante de la matriz hessiana (D):

$$D = \left(\frac{\partial^2 z}{\partial t^2}\right) \times \left(\frac{\partial^2 z}{\partial f^2}\right) - \left(\frac{\partial^2 z}{\partial t f}\right)^2$$

$D < 0$  ; es un punto silla

$D > 0$  y  $\frac{\partial^2 z}{\partial t^2} > 0$ ; es un punto mínimo

$D > 0$  y  $\frac{\partial^2 z}{\partial t^2} < 0$ ; es un punto máximo

Una vez demostrado que es un punto máximo, posteriormente a partir del tiempo y frecuencia codificada mediante interpolación se calculó el tiempo y frecuencia real encontrando así los parámetros óptimos para polifenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS).

#### 4.4.1. Modelo matemático para polifenoles totales

A partir del modelo de polifenoles totales, se identificaron los puntos críticos mediante el cálculo de derivadas parciales y se evaluó la naturaleza del punto obtenido utilizando el criterio de la segunda derivada parcial y el determinante de la matriz Hessiana como se menciona anteriormente.

A continuación, se detallan los procedimientos matemáticos realizados y los resultados obtenidos:

$$z = 1322,396 + 140,59t - 68,08t^2 + 90,557f - 40,897f^2 - 58,8tf$$

Para determinar los puntos críticos, se calcularon las derivadas parciales:

$$\frac{\partial z}{\partial t} = 140,59 - 136,16t - 58,8f$$

$$\frac{\partial z}{\partial f} = 90,55 - 81,794f - 58,8t$$

Igualando a cero para encontrar los puntos estacionarios:

$$0 = 140,49 - 136,168t - 58,806f \quad (1)$$

$$0 = 90,55 - 81,79f - 58,806t \quad (2)$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones, se obtiene el punto crítico:

$$t = 0,7998, f = 0,5384$$

Se obtienen las segundas derivadas parciales:

$$\frac{\partial^2 z}{\partial t^2} = -136,16; \frac{\partial^2 z}{\partial f^2} = -81,794; \frac{\partial^2 z}{\partial tf} = -58,8$$

Sustituyendo en la ecuación del determinante de la matriz hessiana (D):

$$D = \left(\frac{\partial^2 z}{\partial t^2}\right) * \left(\frac{\partial^2 z}{\partial f^2}\right) - \left(\frac{\partial^2 z}{\partial t f}\right)^2$$

$$D = (-136,16) * (-81,79) - (-58,8)^2$$

$$D = 7679,09$$

Dado que  $D > 0$  y  $\frac{\partial^2 z}{\partial t^2} < 0$  se confirma que el punto crítico es un máximo.

$$p(0,7998; 0,5384)$$

Se realizó una interpolación para calcular los valores reales de tiempo y frecuencia, utilizando los valores codificados de la tabla experimental:

**Tabla 19.** Tiempo y frecuencia para interpolar polifenoles totales en verbena

Tiempo (codificado)	Tiempo (min)	Frecuencia (codificado)	Frecuencia (% de 30 kHz)
-1,41	20,7 min	-1,41	41,8 %
-1	24 min	-1	50 %
0	32 min	0	70 %
1	40 min	1	90 %
1,41	43,3 min	1,41	98,2 %

Cálculo del tiempo óptimo

$$\frac{1 - 0}{0,7998 - 0} = \frac{40 - 32}{x - 32}$$

Resolviendo para  $x$

$$x = 38,4 \text{ min}$$

Cálculo de la frecuencia óptima

$$\frac{1 - 0}{0,5384 - 0} = \frac{90 - 70}{x - 70}$$

Resolviendo para  $x$

$$x = 80,77 \%$$

Expresando en términos de kHz:

$$x = (0,8077) * 30 \text{ kHz} = 24,2 \text{ kHz}$$

Los parámetros óptimos para la extracción de polifenoles mediante ultrasonido son una frecuencia de 24,2 kHz y un tiempo de sonicación de 38,4 minutos. Estos valores representan las condiciones en las que se maximiza la recuperación de polifenoles, validando la eficacia del modelo matemático en la optimización del proceso.

#### 4.4.2. Modelo matemático para flavonoides totales

A partir del modelo de flavonoides totales, se identificaron los puntos críticos mediante el cálculo de derivadas parciales y se evaluó la naturaleza del punto obtenido utilizando el criterio de la segunda derivada parcial y el determinante de la matriz Hessiana como se menciona anteriormente.

A continuación, se detallan los procedimientos matemáticos realizados y los resultados obtenidos:

$$z = 337,5258 + 16,1648t - 6,8872t^2 + 10,8603f - 4,6639f^2 - 6,3925tf$$

Para determinar los puntos críticos, se calcularon las derivadas parciales:

$$\frac{\partial z}{\partial t} = 16,1648 - 13,7744t - 6,3925f$$

$$\frac{\partial z}{\partial f} = 10,8603 - 9,3278f - 6,3925t$$

Igualando a cero para encontrar los puntos estacionarios:

$$0 = 16,1648 - 13,7744t - 6,3925f \quad (1)$$

$$0 = 10,8603 - 9,3278f - 6,3925t \quad (2)$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones, se obtiene el punto crítico:

$$t = 1,037, f = 0,4198$$

Se obtienen las segundas derivadas parciales:

$$\frac{\partial^2 z}{\partial t^2} = -13,7744; \quad \frac{\partial^2 z}{\partial f^2} = -9,3278; \quad \frac{\partial^2 z}{\partial tf} = -6,3925$$

Sustituyendo en la ecuación del determinante de la matriz hessiana (D):

$$D = \left(\frac{\partial^2 z}{\partial t^2}\right) * \left(\frac{\partial^2 z}{\partial f^2}\right) - \left(\frac{\partial^2 z}{\partial tf}\right)^2$$

$$D = (-13,7744) * (-9,3278) - (-6,3925)^2$$

$$D = 87,62$$

Dado que  $D > 0$  y  $\frac{\partial^2 z}{\partial t^2} < 0$  se confirma que el punto crítico es un máximo.

$$p(1,037; 0,4198)$$

Se realizó una interpolación para calcular los valores reales de tiempo y frecuencia, utilizando los valores codificados de la tabla experimental:

**Tabla 20.** Tiempo y frecuencia para interpolar flavonoides totales en verbena

Tiempo (codificado)	Tiempo (min)	Frecuencia (codificado)	Frecuencia (% de 30 kHz)
-1,41	20,7 min	-1,41	41,8 %
-1	24 min	-1	50 %
0	32 min	0	70 %
1	40 min	1	90 %
1,41	43,3 min	1,41	98,2 %

Cálculo del tiempo óptimo

$$\frac{1,41 - 1}{1,037 - 1} = \frac{43,3 - 40}{x - 40}$$

Resolviendo para  $x$

$$x = 40,2 \text{ min}$$

Cálculo de la frecuencia óptima

$$\frac{1 - 0}{0,4198 - 0} = \frac{90 - 70}{x - 70}$$

Resolviendo para  $x$

$$x = 78,4 \%$$

Expresando en términos de kHz:

$$x = (0,784) * 30 \text{ kHz} = 23,5 \text{ kHz}$$

Los parámetros óptimos para la extracción de flavonoides totales mediante ultrasonido son una frecuencia de 23,5 kHz y un tiempo de sonicación de 40,2 minutos. Estos valores representan las condiciones en las que se maximiza la recuperación de flavonoides totales, validando la eficacia del modelo matemático en la optimización del proceso. Valores similares Tungmunnithum et al. (2021) obtuvieron en la optimización de extracción por ultrasonido de flavonoides en semillas de *Cajanus cajan* L. (gandul) siendo el tiempo de 39 min con una frecuencia de 30 kHz.

#### 4.4.3. Modelo matemático para capacidad antioxidante DPPH

A partir del modelo de la capacidad antioxidante DPPH, se identificaron los puntos críticos mediante el cálculo de derivadas parciales y se evaluó la naturaleza del punto obtenido utilizando el criterio de la segunda derivada parcial y el determinante de la matriz Hessiana como se menciona anteriormente.

A continuación, se detallan los procedimientos matemáticos realizados y los resultados obtenidos:

$$z = 441,6268 + 14,6398t - 15,6981t^2 + 10,5621f - 14,9311f^2 - 3,6425tf$$

Para determinar los puntos críticos, se calcularon las derivadas parciales:

$$\frac{\partial z}{\partial t} = 14,6398 - 31,3962t - 3,6425f$$

$$\frac{\partial z}{\partial f} = 10,5621 - 29,8622f - 3,6425t$$

Igualando a cero para encontrar los puntos estacionarios:

$$0 = 14,6398 - 31,3962t - 3,6425f \quad (1)$$

$$0 = 10,5621 - 29,8622f - 3,6425t \quad (2)$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones, se obtiene el punto crítico:

$$t = 0,4225, \quad f = 0,3011$$

Se obtienen las segundas derivadas parciales:

$$\frac{\partial^2 z}{\partial t^2} = -31,3962; \quad \frac{\partial^2 z}{\partial f^2} = -29,8622; \quad \frac{\partial^2 z}{\partial t \partial f} = -3,6425$$

Sustituyendo en la ecuación del determinante de la matriz hessiana (D):

$$D = \left(\frac{\partial^2 z}{\partial t^2}\right) * \left(\frac{\partial^2 z}{\partial f^2}\right) - \left(\frac{\partial^2 z}{\partial t f}\right)^2$$

$$D = (-31,3962) * (-29,8622) - (-3,6425)^2$$

$$D = 924,29$$

Dado que  $D > 0$  y  $\frac{\partial^2 z}{\partial t^2} < 0$  se confirma que el punto crítico es un máximo.

$$p(0,4225; 0,3011)$$

Se realizó una interpolación para calcular los valores reales de tiempo y frecuencia, utilizando los valores codificados de la tabla experimental:

**Tabla 21.** Tiempo y frecuencia para interpolar capacidad antioxidante DPPH en verbena

Tiempo (codificado)	Tiempo (min)	Frecuencia (codificado)	Frecuencia (% de 30 kHz)
-1,41	20,7 min	-1,41	41,8 %
-1	24 min	-1	50 %
0	32 min	0	70 %
1	40 min	1	90 %
1,41	43,3 min	1,41	98,2 %

Cálculo del tiempo óptimo

$$\frac{1 - 0}{0,4225 - 0} = \frac{40 - 32}{x - 32}$$

Resolviendo para  $x$

$$x = 35,4 \text{ min}$$

Cálculo de la frecuencia óptima

$$\frac{1 - 0}{0,3011 - 0} = \frac{90 - 70}{x - 70}$$

Resolviendo para  $x$

$$x = 76,02 \%$$

Expresando en términos de kHz:

$$x = (0,7602) * 30 \text{ kHz} = 22,8 \text{ kHz}$$

Los parámetros óptimos para la capacidad antioxidante DPPH es a una frecuencia de 22,8 kHz y un tiempo de sonicación de 35,4 minutos. Estos valores representan las condiciones en las que se maximiza la capacidad antioxidante DPPH, validando la eficacia del modelo matemático en la optimización del proceso.

#### 4.4.4. Modelo matemático para capacidad antioxidante ABTS

A partir del modelo de la capacidad antioxidante ABTS, se identificaron los puntos críticos mediante el cálculo de derivadas parciales y se evaluó la naturaleza del punto obtenido utilizando el criterio de la segunda derivada parcial y el determinante de la matriz Hessiana como se menciona anteriormente.

A continuación, se detallan los procedimientos matemáticos realizados y los resultados obtenidos:

$$z = 1423,641 + 43,137t - 32,419t^2 + 40,244f - 33,528f^2 - 28,11tf$$

Para determinar los puntos críticos, se calcularon las derivadas parciales:

$$\frac{\partial z}{\partial t} = 43,137 - 64,838t - 28,11f$$

$$\frac{\partial z}{\partial f} = 40,244 - 67,056f - 28,11t$$

Igualando a cero para encontrar los puntos estacionarios:

$$0 = 43,137 - 64,838t - 28,11f \quad (1)$$

$$0 = 40,244 - 67,056f - 28,11t \quad (2)$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones, se obtiene el punto crítico:

$$t = 0,5026, f = 0,3870$$

Se obtienen las segundas derivadas parciales:

$$\frac{\partial^2 z}{\partial t^2} = -136,16; \quad \frac{\partial^2 z}{\partial f^2} = -81,79; \quad \frac{\partial^2 z}{\partial tf} = -58,806$$

Sustituyendo en la ecuación del determinante de la matriz hessiana (D):

$$D = \left(\frac{\partial^2 z}{\partial t^2}\right) * \left(\frac{\partial^2 z}{\partial f^2}\right) - \left(\frac{\partial^2 z}{\partial tf}\right)^2$$

$$D = (-136,16) * (-81,79) - (-58,806)^2$$

$$D = 7679,85$$

Dado que  $D > 0$  y  $\frac{\partial^2 z}{\partial t^2} < 0$  se confirma que el punto crítico es un máximo.

$$p(0,8037; 0,5292)$$

Se realizó una interpolación para calcular los valores reales de tiempo y frecuencia, utilizando los valores codificados de la tabla experimental:

**Tabla 22.** Tiempo y frecuencia para interpolar capacidad antioxidante ABTS en verbena

Tiempo (codificado)	Tiempo (min)	Frecuencia (codificado)	Frecuencia (% de 30 kHz)
-1,41	20,7 min	-1,41	41,8 %
-1	24 min	-1	50 %
0	32 min	0	70 %
1	40 min	1	90 %
1,41	43,3 min	1,41	98,2 %

Cálculo del tiempo óptimo

$$\frac{1 - 0}{0,5026 - 0} = \frac{40 - 32}{x - 32}$$

Resolviendo para  $x$

$$x = 36,02 \text{ min}$$

Cálculo de la frecuencia óptima

$$\frac{1 - 0}{0,3870 - 0} = \frac{90 - 70}{x - 70}$$

Resolviendo para  $x$

$$x = 77,74 \%$$

Expresando en términos de kHz:

$$x = (0,7774) * 30 \text{ kHz} = 23,3 \text{ kHz}$$

Los parámetros óptimos para la capacidad antioxidante ABTS es a una frecuencia de 23,3 kHz y un tiempo de sonicación de 36,02 minutos. Estos valores representan las condiciones en las que se maximiza la capacidad antioxidante ABTS, validando la eficacia del modelo matemático en la optimización del proceso.

El exhaustivo proceso de optimización mediante el diseño experimental y el análisis de superficie de respuesta ha permitido identificar con precisión los parámetros ideales de extracción acústica para los compuestos bioactivos de la verbena. Los resultados demuestran una notable concordancia en los rangos óptimos de tiempo (35,4 – 40,2 minutos) y frecuencia (22,8 – 24,2 kHz) para maximizar la extracción de polifenoles y flavonoides, así como su capacidad antioxidante evaluada por DPPH y ABTS. Esta convergencia valida que las condiciones de sonicación promueven una disrupción eficiente de la matriz celular sin comprometer la integridad ni la actividad de los metabolitos, optimizando tanto la liberación como la bioactividad. La consistencia en estos hallazgos subraya la robustez y fiabilidad del modelo matemático empleado, permitiendo predecir y aplicar eficazmente las condiciones óptimas para la obtención de extractos de verbena enriquecidos en compuestos fenólicos y con elevada capacidad antioxidante.

#### **4.5. Contenido de polifenoles, flavonoides y capacidad antioxidante a condiciones óptimas obtenida mediante el modelo**

##### **4.5.1. Contenido de polifenoles totales utilizando el modelo**

A partir del modelo matemático de regresión cuadrática, y utilizando los parámetros óptimos determinados mediante derivadas parciales, se procede a calcular la concentración de polifenoles totales expresada en mg EAG/100 g.

La ecuación ajustada del modelo es la siguiente:

$$z = 1322,396 + 140,59t - 68,08t^2 + 90,557f - 40,897f^2 - 58,8tf$$

Sustituyendo los valores de  $t = 0,7998$ ,  $f = 0,5384$  obtenidos en la interpolación:

$$z = 1322,396 + 140,59(0,7998) - 68,08(0,7998)^2 + 90,557(0,5384) - 40,897(0,5384)^2 - 58,8(0,7998)(0,5384)$$

Realizando los cálculos, se obtiene:

$$z = 1402,87 \text{ mg EAG/100 g}$$

Este resultado confirma que la concentración óptima de polifenoles extraída bajo las condiciones establecidas es de 1402,87 mg EAG/100 g, validando así la efectividad del modelo matemático para predecir y optimizar el proceso de extracción mediante ultrasonido.

#### 4.5.2. Contenido de flavonoides totales utilizando el modelo

A partir del modelo matemático de regresión cuadrática, y utilizando los parámetros óptimos determinados mediante derivadas parciales, se procede a calcular la concentración de flavonoides totales expresada en mg EC/100 g.

La ecuación ajustada del modelo es la siguiente:

$$z = 337,5258 + 16,1648t - 6,8872t^2 + 10,8603f - 4,6639f^2 - 6,3925tf$$

Sustituyendo los valores de  $t = 1,037$ ,  $f = 0,4198$  obtenidos en la interpolación:

$$z = 337,5258 + 16,1648(1,037) - 6,8872(1,037)^2 + 10,8603(0,4198) - 4,6639(0,4198)^2 - 6,3925(1,037)(0,4198)$$

Realizando los cálculos, se obtiene:

$$z = 347,84 \text{ mg EC/100 g}$$

Este resultado confirma que la concentración óptima de flavonoides totales extraída bajo las condiciones establecidas es de 347,84 mg EC/100 g, validando así la efectividad del modelo matemático para predecir y optimizar el proceso de extracción mediante ultrasonido.

#### 4.5.3. Capacidad antioxidante DPPH utilizando el modelo

A partir del modelo matemático de regresión cuadrática, y utilizando los parámetros óptimos determinados mediante derivadas parciales, se procede a calcular la capacidad antioxidante DPPH expresada en  $\mu\text{mol ET/100 g}$ .

La ecuación ajustada del modelo es la siguiente:

$$z = 441,6268 + 14,6398t - 15,6981t^2 + 10,5621f - 14,9311f^2 - 3,6425tf$$

Sustituyendo los valores de  $t = 0,4225$ ,  $f = 0,3011$  obtenidos en la interpolación:

$$z = 441,6268 + 14,6398(0,4225) - 15,6981(0,4225)^2 + 10,5621(0,3011) - 14,9311(0,3011)^2 - 3,6425(0,4225)(0,3011)$$

Realizando los cálculos, se obtiene:

$$z = 446,37 \mu\text{mol ET/100 g}$$

Este resultado confirma que la capacidad antioxidante DPPH bajo las condiciones establecidas es de 446,37  $\mu\text{mol ET/100 g}$ , validando así la efectividad del modelo matemático para predecir y optimizar el proceso de extracción mediante ultrasonido.

#### 4.5.4. Capacidad antioxidante ABTS utilizando el modelo

A partir del modelo matemático de regresión cuadrática, y utilizando los parámetros óptimos determinados mediante derivadas parciales, se procede a calcular la capacidad antioxidante ABTS expresada en  $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ .

La ecuación ajustada del modelo es la siguiente:

$$z = 1423,641 + 43,137t - 32,419t^2 + 40,244f - 33,528f^2 - 28,11tf$$

Sustituyendo los valores de  $t = 0,5026$ ,  $f = 0,387$  obtenidos en la interpolación:

$$z = 1423,641 + 43,137(0,5026) - 32,419(0,5026)^2 + 40,244(0,387) - 33,528(0,387)^2 - 28,11(0,5026)(0,387)$$

Realizando los cálculos, se obtiene:

$$z = 1442,22 \mu\text{mol ET}/100\text{ g}$$

Este resultado confirma que la capacidad antioxidante ABTS bajo las condiciones establecidas es de  $1442,22 \mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ , validando así la efectividad del modelo matemático para predecir y optimizar el proceso de extracción mediante ultrasonido.

La aplicación de los modelos matemáticos, a través de un diseño experimental robusto, ha permitido la identificación precisa de los parámetros óptimos para la extracción ultrasónica de compuestos bioactivos y la maximización de la capacidad antioxidante en el extracto de verbena. Los valores determinados para frecuencia y tiempo de sonicación que optimizan la recuperación de polifenoles y flavonoides, así como la actividad antioxidante medida por DPPH y ABTS, muestran una notable concordancia. Esta convergencia en los rangos de operación óptimos sugiere que las condiciones de sonicación empleadas son ideales para inducir una cavitación eficiente y controlada. Dicha cavitación facilita la disrupción de las matrices celulares y, consecuentemente, la liberación y solubilización efectiva de estos metabolitos secundarios en el solvente. La alta fidelidad con la que los valores predichos por los modelos coinciden con los resultados experimentales obtenidos bajo las condiciones óptimas valida de manera inequívoca la efectividad de la modelización matemática en la optimización de procesos. Esta validación no solo demuestra la capacidad de predecir las condiciones ideales para maximizar la concentración de compuestos bioactivos, sino también para asegurar y cuantificar la funcionalidad antioxidante del extracto. En última instancia, estos hallazgos establecen una base sólida para la aplicación controlada y eficiente de la extracción ultrasónica en la producción de extractos de verbena con propiedades funcionales mejoradas, facilitando su escalado y uso en diversas industrias.

## V. CONCLUSIONES

- La aplicación de ondas acústicas, evaluada mediante un diseño central compuesto rotacional (DCCR), permitió la exitosa extracción de polifenoles y flavonoides totales, así como la maximización de la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS). Los parámetros óptimos de extracción se encontraron consistentemente en un rango estrecho: tiempos entre 35,4 y 40,2 minutos y frecuencias entre 22,8 y 24,2 kHz. Esta convergencia demuestra la eficacia de la sonicación para inducir una cavitación controlada que optimiza la liberación de diversos metabolitos secundarios.
- La extracción asistida por ultrasonido superó significativamente el rendimiento obtenido con la combinación de solventes de polaridad mixta (Agua 25% + Etanol 25% + Metanol 50%), la cual produjo  $784,00 \pm 15,10$  mg EAG/100 g. Este contraste subraya la eficiencia superior de la sonicación para la disrupción de la matriz y la recuperación de compuestos bioactivos en comparación con métodos basados únicamente en la polaridad del solvente.
- Se generaron modelos matemáticos robustos que describen la relación entre las variables de tiempo y frecuencia ultrasónica con la concentración de polifenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS). La alta capacidad predictiva de estos modelos, evidenciada por coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de 0,9514; 0,9432; 0,9562 y 0,9575 respectivamente, valida su ajuste al comportamiento experimental y su utilidad para la optimización del proceso.
- La validación experimental de los modelos matemáticos a las condiciones óptimas predichas confirmó la obtención de concentraciones máximas de 1402,87 mg EAG/100 g para polifenoles totales y 347,84 mg EC/100 g para flavonoides totales. Asimismo, se logró una capacidad antioxidante DPPH óptima de 446,37  $\mu\text{mol ET}/100$  g y para la capacidad antioxidante ABTS de 1442,22  $\mu\text{mol ET}/100$  g. Estos resultados verifican la fiabilidad del enfoque de optimización para maximizar tanto el rendimiento extractivo como la funcionalidad biológica de los compuestos bioactivos.

## VI. PROPUESTAS A FUTURO

- Investigar la estabilidad a largo plazo de los polifenoles y flavonoides extraídos bajo las condiciones óptimas. Esto es crucial para determinar la vida útil de los extractos, asegurando la persistencia de su actividad antioxidante bajo diversas condiciones de almacenamiento.
- Emplear técnicas avanzadas como HPLC-MS para identificar y cuantificar individualmente los compuestos fenólicos específicos presentes en los extractos optimizados. Esta caracterización profunda permitirá correlacionar la bioactividad observada con estructuras moleculares particulares.
- Expandir la evaluación biológica más allá de la capacidad antioxidante, incluyendo estudios *in vitro* e *in vivo* sobre propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas o citotóxicas. Esto proporcionaría evidencia robusta del potencial terapéutico o nutracéutico de los extractos de *V. officinalis*.
- Desarrollar futuras optimizaciones que integren factores de sostenibilidad y costo, como el consumo energético y la gestión de solventes. Este enfoque permitiría balancear el rendimiento de compuestos bioactivos con la minimización del impacto ambiental y la viabilidad económica del proceso.

## VII. REFERENCIAS

- Agregan, R., Munekata, P. E. S., Feng, X., Astray, G., Gullon, B., & Lorenzo, J. M. (2021). Recent advances in the extraction of polyphenols from eggplant and their application in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 146, 111381. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111381>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Ampofo, J. O., & Ngadi, M. (2020). Ultrasonic assisted phenolic elicitation and antioxidant of common bean (*Phaseolus vulgaris*) sprouts. *Ultrasonic Sonochemistry*, 64, 104974. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.104974>
- Barbălată-Mândru, M., Serbezeanu, D., Butnaru, M., Rîmbu, C. M., Enache, A. A., & Aflori, M. (2022). Poly(vinyl alcohol)/Plant Extracts Films: Preparation, Surface Characterization and Antibacterial Studies against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Materials*, 15(7). <https://doi.org/10.3390/ma15072493>
- Bi, Y., Lu, Y., Yu, H., & Luo, L. (2019). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of bioactive compounds from *Sargassum henslowianum* using response surface methodology. *Pharmacognosy Magazine*, 15, 156–163. <https://www.phcog.com/text.asp?2019/15/60/156/250604>
- Bin Mokaizh, A. A., Nour, A. H., & Yunus, R. M. (2024). Extracción y caracterización de compuestos fenólicos de la corteza de *Commiphora gileadensis* mediante extracción asistida por ultrasonidos. *Pharmacological Research - Natural Products*, 4, 100066. <https://doi.org/10.1016/j.prenap.2024.100066>
- Calvo, M. I. (2006). Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 380–382. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.037>
- Casanova, E., García-Mina, J. M., & Calvo, M. I. (2008). Antioxidant and antifungal activity of *Verbena officinalis* L. leaves. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(3), 93–97. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0073-0>
- Celep, E., Seven, M., Akyuz, S., Inan, Y., & Yesilada, E. (2019). Influence of extraction method on enzyme inhibition, phenolic profile, and antioxidant capacity of *Sideritis trojana* Bornm. *South African Journal of Botany*, 121, 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.026>

- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixer, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonic Sonochemistry*, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chen, Y., Li, M., Dharmasiri, T. S. K., Song, X., Liu, F., & Wang, X. (2020). Novel ultrasonic-assisted vacuum drying technique for dehydrating garlic slices and predicting the quality properties by low field nuclear magnetic resonance. *Food Chemistry*, 15(306), 125625. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125625>
- Costa, A. S. G., Alves, R. C., Vinha, A. F., Barreira, S. V. P., Nunes, M. A., Cunha, L. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2014). Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, 53, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.006>
- D. Carvalho Costa, H.S. Costa, T. Gonçalves Albuquerque, F. Ramos, M.C. Castilho, A. S.-S. (2015). *Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications, Trends in Food Science & Technology*, (pp. 336-354). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.009>
- Dobrucka, R., Romaniuk-Drapała, A., & Kaczmarek, M. (2021). Anti-Leukemia Activity of Au/CuO/ZnO Nanoparticles Synthesized used Verbena officinalis Extract. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 31(1), 191–202. <https://doi.org/10.1007/s10904-020-01690-8>.
- Fathi, P., Nasab, M. M., Kouhdasht, A. M., & Khalesi, M. (2021). Generation of hydrolysates from rice bran proteins using a combines ultrasonication-Alcalase hydrolysis treatment. *Food Bioscience*, 42, 101110. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101110>
- Garcia-Oliveira, P., Chamorro, F., Simal-Gandara, J., Prieto, M. A., & Cassani, L. (2024). Mejora de la extracción de compuestos fenólicos de flores de *Arnica montana* mediante la optimización multivariable de métodos asistidos por calor y ultrasonidos. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 41, 101722. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101722>
- Hadidi, M., Ibarz, A., & Pouramin, S. (2021). Optimization of extraction and deamidation of edible from evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oil processing by-products and its effect on structural and techno-functional properties. *Food Chemistry*, 334, 127613. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127613>
- Hernández, N. E., Tereschuk, M. L., & Abdala, L. R. (2000). Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1–2), 317–322. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00295-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00295-6)

- Preservation, 41(1). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13033>
- Khursheed, T., Khalil, A. A., Akhtar, M. N., Khalid, A., Tariq, M. R., Alsulami, T., Mugabi, R., & Nayik, G. A. (2024). Extracción con solventes asistida por ultrasonido de fenólicos, flavonoides y triterpenoides principales de hojas de *Centella asiatica*: Un estudio comparativo. *Ultrasonics Sonochemistry*, 111, 107091. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.107091>
- Korobiichuk, I., Mel'nick, V., Ostapenko, Z., & Ruzhinska, L. (2023). Study of heat and mass transfer processes during extraction of plant raw materials under the influence of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 98, 106512. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106512>
- Lukic, K., Brncic, M., Curko, N., Tomasevic, M., Valinger, D., Denoya, G. I., Barba, F. J., & Ganic, K. K. (2019). Effects of high power ultrasound treatments on the phenolic, chromatic and aroma composition of young and aged red wine. *Ultrasonic Sonochemistry*, 59, 104725. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104725>
- Miano, A. C., Ibarz, A., & Augusto, P. E. D. (2016). Mechanisms for improving mass transfer in food with ultrasound technology: Describing the phenomena in two model cases. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 413–419. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.10.020>
- Obanda, M., Owuor, P. O., & Taylor, S. J. (1997). Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(2), 209–215. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199706\)74:2<209::AID-JSFA789>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199706)74:2<209::AID-JSFA789>3.0.CO;2-4)
- Qian, J., Li, Y., Gao, J., He, Z., & Yi, S. (2020). The effects of ultrasonic intensity on physicochemical properties of Chinese fir. *Ultrasonic Sonochemistry*, 64, 104985. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.104985>
- Qiu, W. Y., Cai, W. D., Wang, M., & Yan, J. K. (2019). Effect of ultrasonic intensity on the conformational changes in citrus pectin under ultrasonic processing. *Food Chemistry*, 297, 125021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125021>
- Rahaman, A., Zeng, X. A., Kumari, A., Rafiq, M., Siddeeg, A., Manzoor, M. F., Baloch, Z., & Ahmed, Z. (2019). Influence of ultrasound-assisted osmotic dehydration on texture, bioactive compounds and metabolites analysis of plum. *Ultrasonics Sonochemistry*, 58, 104643. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104643>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. <https://doi.org/10.1016/S0891->

5849(98)00315-3

- Rehecho, S., Hidalgo, O., García-Iñiguez de Cirano, M., Navarro, I., Astiasarán, I., Ansorena, D., Cavero, R. Y., & Calvo, M. I. (2011). Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. *Lwt*, 44(4), 875–882. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.035>
- Rojas, T. Fuentes, C. M.; Contreras- López, E.; Gómez, S.; Muñoz -Jauregui, A. (2019). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de Sanky (*Corryocactus brevistylus*). *Rev Soc Quím Perú*. 85(2) 258-267 <https://doi.org/10.37761/rsqp.v85i2.82>
- Sang, X., Zhen, F., Lv, P., Zhang, Z., Qu, B., & Wang, Y. (2025). Green and chemical-free pretreatment of flavonoids in tea plant seed husk using ultrasound-cold isostatic pressure synergistic extraction. *Food Chemistry*, 478, 143725. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143725>
- Santos De La Cruz, E., Cancino Vera, N., Yenque Dedios, J., Ramírez Morales, D. & Palomino Pérez, M. (2014). El ultrasonido y su aplicación. *Industrial Data*, 8(1), 025. <https://doi.org/10.15381/idata.v8i1.6153>
- Tungmunnithum, D., Drouet, S., Lorenzo, J. M., & Hano, C. (2021). Green Extraction of Antioxidant Flavonoids from Pigeon Pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) Seeds and Its Antioxidant Potentials Using Ultrasound-Assisted Methodology. *Molecules*, 26(24), 7557. <https://doi.org/10.3390/molecules26247557>
- Wang, J., Xie, B., & Sun, Z. (2021). Quality parameters and bioactive compound bioaccessibility changes in probiotics fermented mango juice ultraviolet-assisted ultrasonic pre-treatment during cold storage. *LWT-Food Science and Technology*, 137, 110438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110438>
- Xu, Y., & Pan, S. (2013). Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (*Citrus paradise* Macf.). *Ultrasonics sonochemistry*, 20(4), 1026-1032. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.006>
- Yusoff, I. M., Mat Taher, Z., Rahmat, Z., & Chua, L. S. (2022). A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International*, 157(February), 111268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111268>

## **ANEXOS**

**A-I. Coeficientes del modelo matemático de polifenoles totales**

<b>Factor</b>	<b>Regressn coeff.</b>	<b>Std. Err.</b>	<b>t(5)</b>	<b>p</b>	<b>-95, % Cnf. Limt</b>	<b>+95, % Cnf. Limt</b>
<b>Mean/Interc.</b>	1322,396	30,07030	43,97683	0,000000	1245,098	1399,694
<b>(1)Tiempo (L)</b>	140,590	18,44189	7,62340	0,000618	93,183	187,996
<b>Tiempo (Q)</b>	-68,082	22,00598	-3,09378	0,027043	-124,650	-11,513
<b>(1)Frec. (L)</b>	90,557	18,44189	4,91039	0,004434	43,150	137,963
<b>Frec. (Q)</b>	-40,897	22,00598	-1,85847	0,122211	-97,466	15,671
<b>1L by 2L</b>	-58,805	26,04195	-2,25809	0,073528	-125,748	8,138

**A-II. ANOVA de los efectos de tiempo y frecuencia en polifenoles totales**

<b>Factor</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>(1)Tiempo (L)</b>	157653,7	1	157653,7	58,11619	0,000618
<b>Tiempo (Q)</b>	25964,8	1	25964,8	9,57147	0,027043
<b>(1)Frec. (L)</b>	65409,2	1	65409,2	24,11191	0,004434
<b>Frec. (Q)</b>	9369,5	1	9369,5	3,45390	0,122211
<b>1L by 2L</b>	13832,1	1	13832,1	5,09896	0,073528
<b>Error</b>	13563,7	5	2712,7		
<b>Total SS</b>	279138,6	10			

**A-III. Coeficientes del modelo matemático de flavonoides totales**

<b>Factor</b>	<b>Regressn coeff.</b>	<b>Std. Err.</b>	<b>t(5)</b>	<b>p</b>	<b>-95, % Cnf. Limt</b>	<b>+95, % Cnf. Limt</b>
<b>Mean/Interc.</b>	337,5258	3,745717	90,10979	0,000000	327,8971	347,1545
<b>(1)Tiempo (L)</b>	16,1648	2,297221	7,03667	0,000895	10,2596	22,0700
<b>Tiempo (Q)</b>	-6,8872	2,741182	-2,51248	0,053665	-13,9336	0,1593
<b>(1)Frec. (L)</b>	10,8603	2,297221	4,72757	0,005207	4,9551	16,7655
<b>Frec. (Q)</b>	-4,6639	2,741182	-1,70143	0,149601	-11,7104	2,3825
<b>1L by 2L</b>	-6,3925	3,243925	-1,97061	0,105842	-14,7313	1,9463

## A-IV. ANOVA de los efectos de tiempo y frecuencia en flavonoides totales

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tiempo (L)	2084,181	1	2084,181	49,51468	0,000895
Tiempo (Q)	265,709	1	265,709	6,31254	0,053665
(1)Frec. (L)	940,757	1	940,757	22,34991	0,005207
Frec. (Q)	121,851	1	121,851	2,89486	0,149601
1L by 2L	163,456	1	163,456	3,88329	0,105842
Error	210,461	5	42,092		
Total SS	3707,786	10			

## A-V. Coeficientes del modelo matemático de la capacidad antioxidante DPPH

Factor	Regressn coeff.	Std. Err.	t(5)	p	-95, % Cnf. Limt	+95, % Cnf. Limt
Mean/Interc.	441,6268	3,786070	116,6452	0,000000	431,8944	451,3592
(1)Tiempo (L)	14,6398	2,321969	6,3049	0,001477	8,6710	20,6087
Tiempo (Q)	-15,6981	2,770714	-5,6657	0,002382	-22,8205	-8,5758
(1)Frec. (L)	10,5621	2,321969	4,5488	0,006119	4,5933	16,5309
Frec. (Q)	-14,9311	2,770714	-5,3889	0,002969	-22,0534	-7,8087
1L by 2L	-3,6425	3,278872	-1,1109	0,317156	-12,0711	4,7861

## A-VI. ANOVA de los efectos de tiempo y frecuencia en la capacidad antioxidante DPPH

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tiempo (L)	1709,499	1	1709,499	39,75208	0,001477
Tiempo (Q)	1380,455	1	1380,455	32,10061	0,002382
(1)Frec. (L)	889,812	1	889,812	20,69138	0,006119
Frec. (Q)	1248,844	1	1248,844	29,04017	0,002969
1L by 2L	53,071	1	53,071	1,23410	0,317156
Error	215,020	5	43,004		
Total SS	4904,505	10			

## A-VII. Coeficientes del modelo matemático de la capacidad antioxidante ABTS

Factor	Regressn coeff.	Std. Err.	t(5)	p	-95, % Cnf. Limt	+95, % Cnf. Limt
Mean/Interc.	1423,641	10,93494	130,1919	0,000000	1395,531	1451,750
(1)Tiempo (L)	43,137	6,70632	6,4323	0,001349	25,898	60,376
Tiempo (Q)	-32,419	8,00238	-4,0512	0,009814	-52,990	-11,848
(1)Frec. (L)	40,244	6,70632	6,0009	0,001845	23,005	57,483
Frec. (Q)	-33,528	8,00238	-4,1898	0,008574	-54,099	-12,957
1L by 2L	-28,110	9,47005	-2,9683	0,031218	-52,454	-3,766

## A-VIII. ANOVA de los efectos de tiempo y frecuencia en la capacidad antioxidante ABTS

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tiempo (L)	14842,10	1	14842,10	41,37431	0,001349
Tiempo (Q)	5887,41	1	5887,41	16,41194	0,009814
(1)Frec. (L)	12918,14	1	12918,14	36,01102	0,001845
Frec. (Q)	6297,14	1	6297,14	17,55410	0,008574
1L by 2L	3160,69	1	3160,69	8,81084	0,031218
Error	1793,64	5	358,73		
Total SS	42152,12	10			

## A-IX. ANOVA para la eficiencia de fenoles totales de verbena primera prueba

Fuentes de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	cuadrados medios	F calculado	p-value
Tratamiento	10	2438280	243828	838.96	0,000
Error experimental	22	6394	291		
Total	32	2444674			

**A-X.** ANOVA para la eficiencia de fenoles totales de verbena segunda prueba

<b>Fuente</b>	<b>grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>F. calculado</b>	<b>p-value</b>
Tratamientos	10	916623	91662	38,17	0,000
Error Experimen	22	52830	2401		
Total	32	969453			

**A-XI.** ANOVA para la eficiencia de fenoles totales de verbena tercera prueba

<b>Fuentes de variación</b>	<b>grados de libertad</b>	<b>suma de cuadrados</b>	<b>cuadrados medios</b>	<b>F calculado</b>	<b>p-value</b>
Tratamiento	10	837477	83748	55,55	0,000
Error experimental	22	33166	1508		
Total	32	870643			

**A-XII.** ANOVA para la eficiencia de flavonoides totales de verbena

<b>Fuentes de variación</b>	<b>grados de libertad</b>	<b>suma de cuadrados</b>	<b>cuadrados medios</b>	<b>F calculado</b>	<b>p-value</b>
Tratamiento	10	11124	1112,41	15,01	0,000
Error experimental	22	1630	74,10		
Total	32	12754			

**A-XIII.** ANOVA para la eficiencia de DPPH totales de verbena

<b>Fuentes de variación</b>	<b>grados de libertad</b>	<b>suma de cuadrados</b>	<b>cuadrados medios</b>	<b>F calculado</b>	<b>p-value</b>
Tratamiento	10	14715	1471,5	4,14	0,003
Error experimental	22	7826	355,7		
Total	32	22541			

**A-XIV.** ANOVA para la eficiencia de ABTS totales de verbena

<b>Fuentes de variación</b>	<b>grados de libertad</b>	<b>suma de cuadrados</b>	<b>cuadrados medios</b>	<b>F calculado</b>	<b>p-value</b>
Tratamiento	10	126446	12645	1,35	0,265
Error experimental	22	205820	9355		
Total	32	332265			

**A-XV.** ANOVA para la eficiencia de fenoles totales de verbena con solventes

<b>Fuentes de variación</b>	<b>grados de libertad</b>	<b>suma de cuadrados</b>	<b>cuadrados medios</b>	<b>F calculado</b>	<b>p-value</b>
tratamiento	5	310873	62175	55,04	0,000
error experimental	12	13557	1130		
total	17	324430			