Caracterización química de los residuos agroindustriales de la menta para el desarrollo de ingredientes naturales

Karina Andrea Sierra Henao y Édison Javier Osorio Durango

La agroindustria es una actividad económica que combina el proceso productivo agrícola con el proceso de transformación industrial para la elaboración de ingredientes y productos destinados al mercado. Este proceso trae consigo la formación de residuos, los cuales se consideran un problema ambiental. A pesar de existir diferentes estrategias para la generación de valor agregado de las materias primas de interés en la industria alimentaria y farmacéutica, son pocas las alternativas para la transformación y el aprovechamiento del material agroindustrial excedente. En este caso, el proceso de exportación de la menta debe cumplir ciertos requerimientos de calidad, por lo que es necesario realizar una selección rigurosa de la materia prima, que se traduce en una producción de aproximadamente el 40 % de excedentes no comercializables. Esta investigación buscó caracterizar en términos químicos los residuos generados en el proceso agroindustrial y de exportación de la menta, a fin de proponer alternativas para la elaboración de un ingrediente natural valorizado con amplio interés industrial. Este desarrollo se realizó por medio de extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad, en el que se estandarizaron las mejores condiciones para la extracción de los compuestos de interés. Se encontró que, a través de un mismo sistema (etanol:agua 80:20), se obtienen los compuestos mayoritarios de carácter fenólico y terpénico de la menta: ácido rosmarínico y carvona, los cuales fueron analizados por HPLC/DAD y GC/MS, respectivamente. Estos compuestos fueron usados como marcadores para la cuantificación y elección del mejor material vegetal para el desarrollo de un ingrediente natural. Durante el proceso, se evidenció que las muestras cultivadas en campo abierto son promisorias, toda vez que presentan mayor cantidad de compuestos de interés y no presentan diferencias significativas entre las muestras destinadas a su exportación y sus residuos. Por tal motivo, los residuos de empresas comercializadoras son elegidos para el desarrollo de un ingrediente natural. Así, se procedió a la elaboración de extractos y su evaluación química cuantitativa y organoléptica cualitativa, a través de procesos sostenibles que buscan disminuir tiempos de procesamiento y usando solventes ecológicos que presentaran un alto rendimiento en la extracción de los compuestos objetivos. Los resultados permitieron conocer las mejores condiciones de extracción y evaluación de la especie *M. spicata* y proponer el residuo de comercializadora como el mejor material para el desarrollo de un ingrediente natural con aplicación a la industria alimentaria.

El interés principal de esta investigación es el aprovechamiento de los residuos generados en la cadena de comercialización de la menta en el Oriente antioqueño, de tal forma que se favorezca el desarrollo de productos innovadores que puedan incursionar en mercados nacionales e internacionales. En este sentido, se quiso desarrollar ingredientes naturales, como extractos hidroalcohólicos, tisanas o sólidos microencapsulados, enfocados en la industria alimentaria, en procura de contribuir a la disminución de la pérdida de material, con la generación de valor agregado de un material que es destinado a descarte dentro del proceso de producción, con la promoción de alternativas de ingresos para los productores y el establecimiento de una visión más amplia, requerida en el desarrollo de productos de exportación.

Para establecer la calidad de los residuos de menta con respecto al material de exportación, se realizó la caracterización química en términos del perfil de compuestos terpénicos y fenólicos, además de la determinación del contenido de polifenoles totales (CPT). El estudio de los metabolitos de características terpénicas (monoterpenos y sesquiterpenos) fue realizado utilizando cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masas (GC/MS). Los compuestos fenólicos fueron analizados a través de cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD), con base en los compuestos reportados previamente para la especie. Los compuestos que no se identificaron a través de esta técnica se analizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Los resultados obtenidos mediante la caracterización química permitieron discriminar las muestras por fincas, determinar la calidad de los residuos con respecto al material vegetal de exportación y seleccionar los nichos productivos de residuos químicamente relevantes. De esta forma, los residuos con mayor cantidad de compuestos de interés fueron elegidos para el desarrollo de un ingrediente natural: un extracto hidroalcohólico con fines en la industria alimentaria.

Evaluación cualitativa y cuantitativa de los subproductos de menta

La menta es una de las principales plantas medicinales y aromáticas cultivadas y comercializadas en la región del Oriente antioqueño, que cuenta con los pisos térmicos requeridos para la producción de la especie y cumple con otros parámetros óptimos para los cultivos, como altitudes inferiores a los 2.500 m s. n. m., alta luminosidad, clima templado y suelos ligeros, areno-arcillosos, fértiles, profundos y húmedos (Bonilla & Guerrero, 2010). En zonas frías se puede observar también el cultivo bajo cubiertas plásticas. Lastimosamente, la agroindustria de la menta presenta una alta generación de residuos en sus fases de producción y comercialización, los cuales constituyen el material objetivo de la presente investigación. La selección de los productores de esta planta aromática se

basó en la capacidad de producción, el conocimiento de las características de las semillas y las condiciones de siembra y suelo en las colectas realizadas. Los productores asociados al estudio están ubicados en la vereda Galicia del municipio de Rionegro, la vereda El Higuerón del municipio de El Retiro y en el C. I. La Selva de AGROSAVIA, en el municipio de Rionegro.

Selección del material vegetal

Según el listado de plantas medicinales aprobadas con fines terapéuticos en Colombia (Invima, 2018), las partes aéreas de la menta corresponden a la parte de la planta que está indicada para su uso farmacológico. Esto coincide con reportes de la especie donde solo se aprovechan las partes aéreas (Abootalebian et al., 2016; Zhao et al., 2013). Así, la evaluación en este trabajo se realizó en tres muestras diferentes de menta: 1) hojas, 2) tallos y 3) hojas más tallos. Las muestras fueron recolectadas en el mismo lugar de cosecha realizando un proceso de separación, limpieza y desinfección. Las tres muestras se analizaron y se compararon por su contenido de polifenoles totales (CPT) y de ácido rosmarínico (AR); este último fue determinado por HPLC/DAD. La comparación se realizó con el fin de seleccionar el material que sería utilizado en los análisis posteriores. Las hojas presentan un mayor contenido de AR y de CPT, mientras que se observa un contenido significativamente menor en los tallos (figuras 3.1a y 3.1b, respectivamente); por tal motivo, se eligen las hojas como droga vegetal para los análisis. De esta forma, se evidencia que los compuestos fenólicos no se distribuyen uniformemente en las diferentes secciones de la planta, pues como se reporta en algunos estudios (Brown et al., 2019), los niveles de compuestos fenólicos a menudo se concentran en las capas externas de las plantas y no en sus partes interiores.

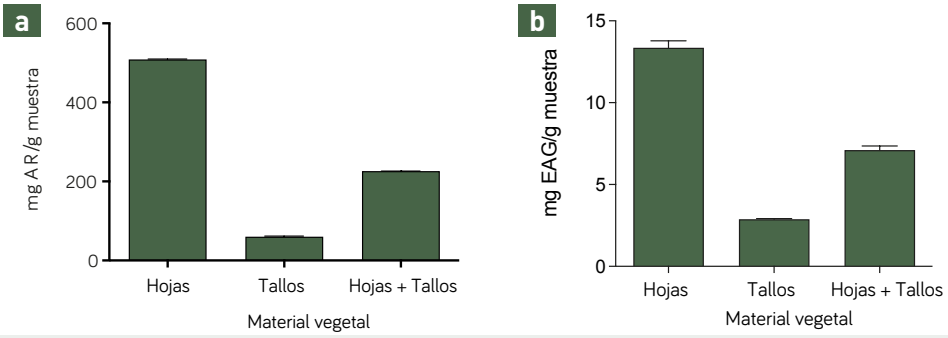


Figura 3.1. Contenido de AR y CPT en hojas, tallos y hojas más tallos. **a.** Ácido rosmarínico (AR); **b.** Polifenoles totales (CPT). El análisis estadístico usa una Anova de una vía (test de Bonferroni, $p < 0,05$). Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa.

Fuente: Elaboración propia

Estandarización de condiciones previas para los análisis

Para determinar las mejores condiciones en la extracción, es de gran importancia definir los factores más influyentes del proceso. En el presente estudio se determinó la influencia del solvente de extracción y para ello se establecieron seis mezclas con diferentes proporciones de etanol y agua desde 50:50 hasta 100 % etanol (%v/v). Los seis extractos obtenidos fueron analizados por su contenido de polifenoles totales (CPT) y ácido rosmarínico (AR), este último determinado por HPLC/DAD, de acuerdo con la curva de calibración establecida. La proporción P4 etanol/agua 80:20 presentó el mejor resultado de extracción en términos de los compuestos de interés (figuras 3.2a y 3.2b, respectivamente).

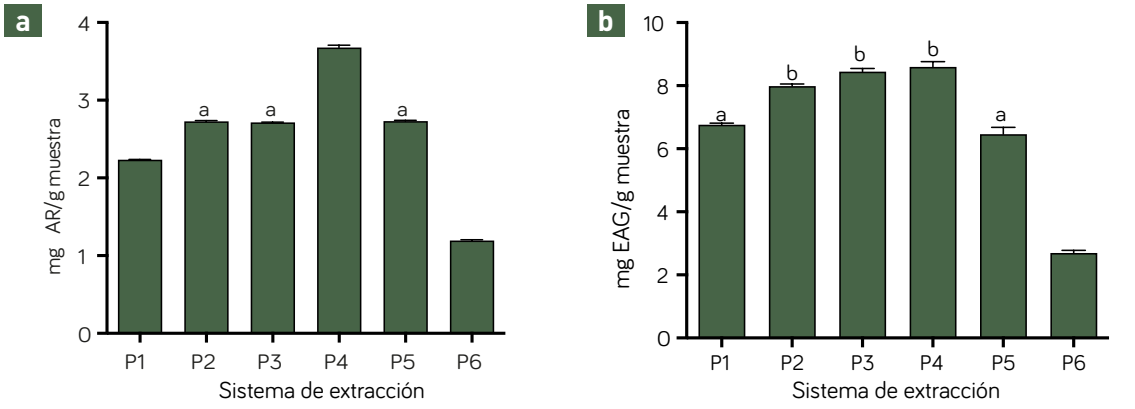


Figura 3.2. Selección del sistema de extracción en extractos obtenidos con diferentes proporciones de solvente. P1: etanol 50 %; P2: etanol 60 %; P3: etanol 70 %; P4: etanol 80 %; P5: etanol 90 %; P6: etanol 100 %. **a.** Contenido de ácido rosmarínico (AR); **b.** Polifenoles totales (CPT). El análisis estadístico usa una Anova de una vía (test de Bonferroni, $p < 0,05$). Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa.

Fuente: Elaboración propia

También se evaluó el tiempo de extracción, y para ello se midieron los tiempos de 10-20-30-40-50-60-80 minutos en baño de ultrasonido. Según los resultados obtenidos en términos de valor de CPT y AR, 30 minutos en baño de ultrasonido favorecen la mejor extracción de los compuestos de interés (figuras 3.3a y 3.3b, respectivamente). La influencia del tiempo en la extracción de los compuestos muestra un aumento significativo en los primeros treinta minutos, después de este tiempo hay una disminución que pudo ocurrir como error experimental. Sin embargo, de acuerdo con el análisis Anova (valor $p > 0,05$), no es significativo con respecto a los tiempos de 40 a 80 minutos. Por esta razón,

se selecciona el menor tiempo que favorece la extracción. Una vez obtenida la información del tiempo de extracción y el solvente, se buscó la mejor relación sólido/solvente, que determinaba la influencia del material vegetal y la capacidad de la mezcla extractora. Para esto, se planteó la evaluación de las proporciones 2, 4, 8, 12, 16 y 20 % (p/p). Nuevamente, el análisis se basó en la evaluación en términos de CPT y de AR (figuras 3.4c y 3.4d, respectivamente). Esta es una variable importante en los procesos de estandarización de las extracciones, que busca obtener la mayor cantidad de compuestos de interés, preservando una buena fluidización de los sólidos en el líquido.

Según los resultados, se evidencia que el 16 % permite la mayor cantidad de compuestos de interés, manteniendo poca saturación del sistema y una correcta homogeneización de la mezcla. Mayores proporciones de material vegetal no permitieron esta evaluación.

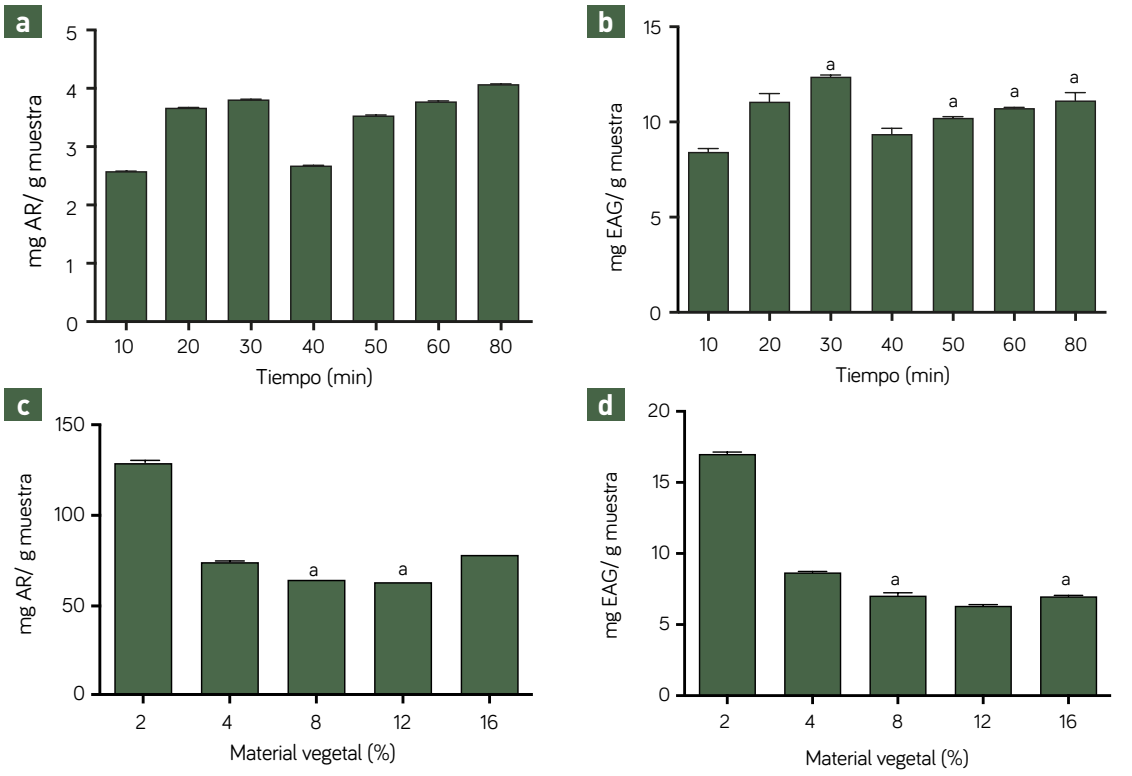


Figura 3.3. Selección del tiempo de extracción y relación sólido/solvente en los extractos obtenidos. **a.** Tiempo ácido rosmarínico (AR); **b.** Tiempo polifenoles totales (CPT). Relación sólido/solvente; **c.** Ácido rosmarínico (AR); **d.** Polifenoles totales (CPT). El análisis estadístico usa una Anova de una vía (test de Bonferroni, $p < 0{,}05$). Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa.

Fuente: Elaboración propia

Determinación del contenido de polifenoles totales de los extractos de menta

Después de la estandarización de las condiciones de extracción con una solución de extracción etanol/agua 80:20 por 30 minutos y una relación sólido/solvente del 16 % (condiciones usadas en todos los ensayos posteriores), se determinó el valor CPT para las muestras recolectadas en diferentes fincas. Los resultados estuvieron en el rango de 1,461 a 14,392 mg EAG/g de muestra (figura 3.4a). Para la realización del análisis en una misma finca, en diferentes épocas, el rango estuvo entre 2,304 a 20,853 mg EAG/g de muestra (figura 3.4b). Estos valores presentan similitud con los reportados previamente para la misma especie (Brahmi et al., 2015).

La figura 3.5a muestra la comparación entre los residuos obtenidos en los procesos de cosecha comparados con los residuos generados en comercializadora y el material de exportación. En términos del CPT, se evidencia que el material de exportación presenta una mayor dispersión de los datos, y que los residuos no presentan diferencias significativas. Adicionalmente, se observan diferencias entre

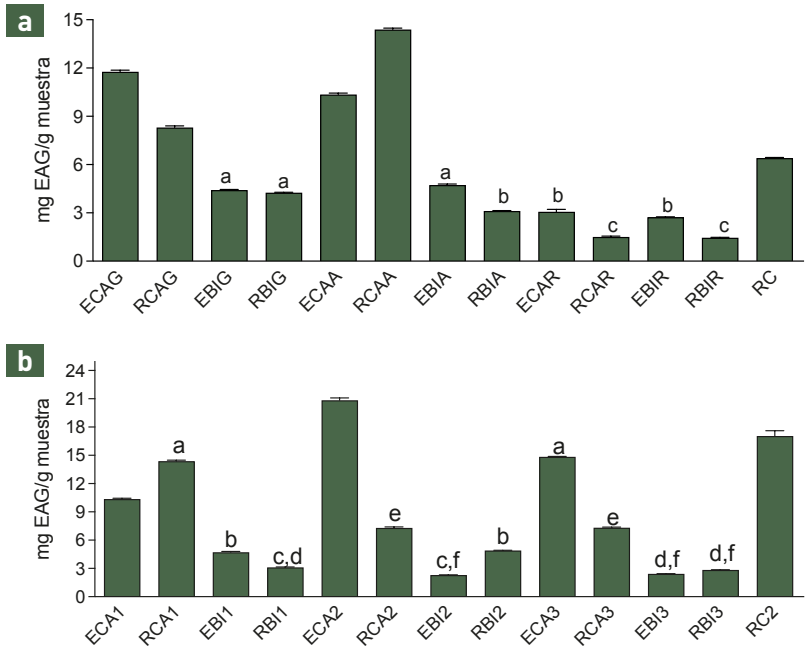


Figura 3.4. a y b. Contenido de polifenoles totales (CPT) de muestras de *M. spicata* obtenidas de diferentes fincas del Oriente antioqueño, en diferentes ambientes de cultivo (campo abierto e invernadero). Donde ECA: exportación campo abierto; RCA: residuos campo abierto; EBI: exportación bajo invernadero; RBI: residuos bajo invernadero; RC: residuos comercializadora; G: Galicia; A: AGROSAVIA, y R: El Retiro. 1: primera cosecha en AGROSAVIA; 2: segunda cosecha en AGROSAVIA, y 3: tercera cosecha en AGROSAVIA. RC2: segundo residuo comercializadora. El análisis estadístico usa una Anova de una vía (test de Bonferroni, $p < 0,05$). Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa.

Fuente: Elaboración propia

los orígenes de cada muestra (figura 3.5b), es decir, entre las fincas productoras, específicamente las muestras de la finca 2, que se caracteriza por tener una expresión mayor de los compuestos polifenólicos con respecto a las otras dos fincas. Las muestras que presentaron un mayor valor de CPT corresponden a las cultivadas en campo abierto, presentando diferencias significativas (valor $p < 0,05$) en comparación con las muestras cultivadas bajo invernadero (figura 3.5c). Algunos estudios (Del Valle et al., 2008; Salazar-García et al., 2017) reportan que el contenido de compuestos fenólicos es altamente influenciable por las condiciones ambientales y que es mayor en plantas expuestas a la luz en comparación con muestras provenientes de plantas cubiertas con redes. Además, la acumulación de los compuestos fenólicos en los tejidos vegetales son características distintivas del estrés ambiental, y el aumento de la biosíntesis de compuestos polifenólicos ayuda a hacer frente a las múltiples tensiones abióticas y bióticas como la salinidad, los metales pesados, la sequía, la temperatura, la luz ultravioleta, la progresión de la enfermedad, etc. (Cheynier et al., 2013; Tuladhar et al., 2021). En el análisis realizado en tres cosechas, en una misma finca (figura 3.5d), se evidencia que no hay variaciones con respecto a las épocas en el año y la edad de los cultivos; las muestras fueron colectadas en la tercera, sexta y octava cosecha, es decir, a los 120, 240 y 320 días, respectivamente.

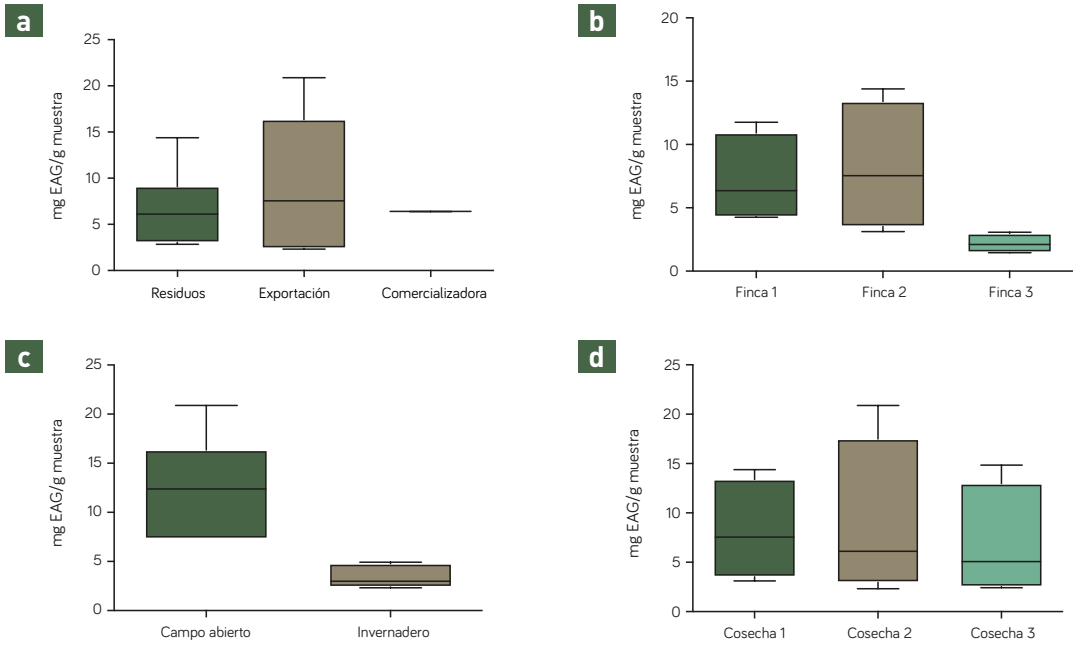


Figura 3.5. Comparación del contenido de polifenoles totales (CPT) utilizando análisis univariados por medio de gráficos de caja y bigotes. **a.** En muestras de residuo, exportación y comercializadora. **b.** En muestras de diferentes fincas (en donde Finca 1: Galicia; Finca 2: AGROSAVIA, y Finca 3: El Retiro); **c.** En muestras de campo abierto e invernadero; **d.** En muestras de diferentes cosechas.

Fuente: Elaboración propia

Análisis de los compuestos fenólicos de menta por HPLC/DAD

En este estudio se realizó la caracterización química de los extractos de menta obtenidos con una mezcla de extracción etanol/agua 80:20. Según la literatura, se seleccionó un grupo de compuestos (estándares) para determinar su presencia o ausencia en los extractos vegetales (Cirlini et al., 2016; Brahmi et al., 2015). Los compuestos analizados corresponden al ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, rutina hidrato, luteolina 7-*O*-glucósido, naringina, ácido rosmarínico, apigenina 7-*O*-glucósido, luteolina, apigenina y kaempferol.

Las muestras fueron evaluadas bajo las mismas condiciones cromatográficas, optimizadas mediante un proceso simultáneo a partir de los estándares de referencia y las muestras de menta. Con este método se determinó la presencia de ácido rosmarínico (8) como compuesto mayoritario, usando DAD a 390 nm (figura 3.6). Este compuesto está presente en todas las muestras evaluadas y ha sido considerado uno de los principales marcadores fenólicos en menta (Narasimhamoorthy et al., 2015). Finalmente, según el tiempo de retención, los compuestos ácido cafeico, ácido clorogénico, luteolina 7-*O*-glicósido y kaempferol fueron identificados tentativamente en los cromatogramas de las muestras.

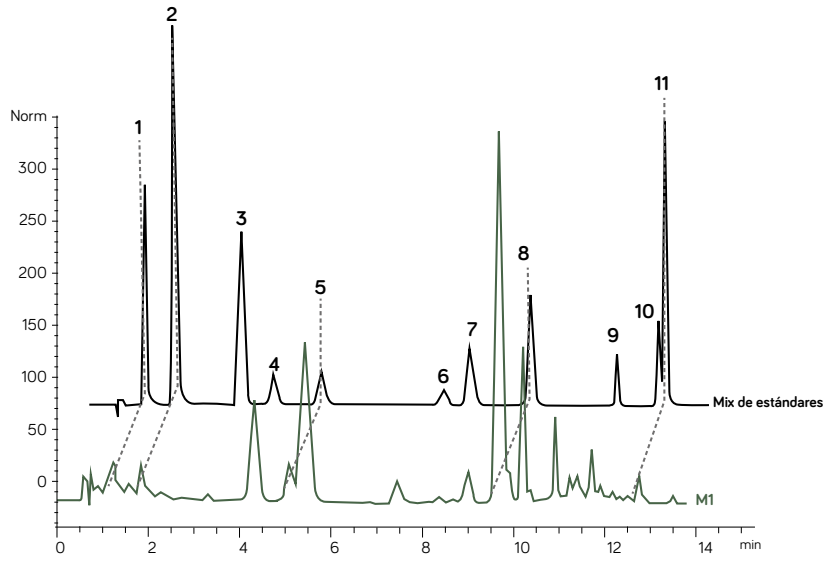


Figura 3.6. Cromatograma representativo de la muestra de análisis M1 por HPLC/DAD: *M. spicata*, exportación a campo abierto vereda Galicia, y cromatograma representativo del mix de estándares utilizados a 50 ppm: ácido clorogénico (1); ácido cafeico (2); ácido p-cumárico (3); rutina-hidrato (4); luteolina 7-*O* glucósido (5); naringina (6); apigenina 7-*O* glicósido (7); ácido rosmarínico (8); luteolina (9); apigenina (10); kampferol (11).

Fuente: Elaboración propia

Con el objetivo de obtener un resultado más representativo, las muestras fueron cuantificadas en términos de mg de ácido rosmarínico por gramo de muestra, y con ello poder hacer comparaciones cuantitativas entre las diferentes muestras colectadas.

Como se observa en la figura 3.7, se presenta un aumento del compuesto de interés en las muestras cultivadas a campo abierto, a diferencia de las muestras cultivadas bajo invernadero. El rango de respuesta se evidencia entre 0,082 y 9,112 mg AR/g muestra.

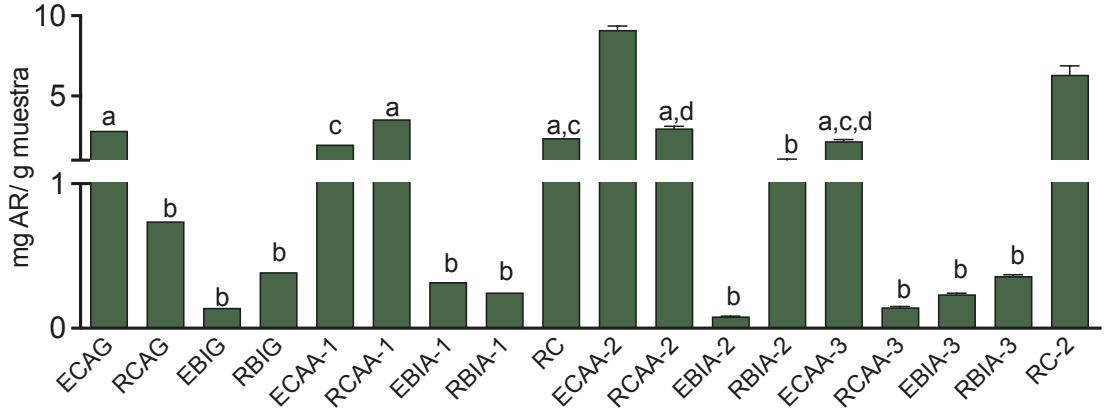


Figura 3.7. Contenido de ácido rosmarínico de muestras de *M. spicata* obtenidas en diferentes fincas del Oriente antioqueño, con diferentes ambientes de cultivo (campo abierto e invernadero). Donde ECA: exportación campo abierto; RCA: residuos campo abierto; EBI: exportación bajo invernadero; RBI: residuo bajo invernadero; RC: residuos comercializadora; G: Galicia; A:AGROSAVIA, y R: El Retiro. 1: primera cosecha en AGROSAVIA; 2: segunda cosecha en AGROSAVIA, y 3: tercera cosecha en AGROSAVIA. RC2: segundo residuo comercializadora. El análisis estadístico usa una Anova de una vía (test de Bonferroni, $p < 0,05$). Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa.

Fuente: Elaboración propia

En este trabajo se determinó el ácido rosmarínico como el marcador principal de los compuestos fenólicos presentes en esta especie. Por tal motivo, se realizaron las diferentes comparaciones en términos de este. Se observa que los residuos de comercializadora presentan un contenido de ácido rosmarínico comparable con aquel presente en el material de exportación (figura 3.8a); en ese sentido, este material se presenta como candidato para el desarrollo de un ingrediente alimentario. Al igual que los datos obtenidos en CPT, cuando se realiza la comparación entre los orígenes de las muestras, se encuentra que en la finca 2 hay una mayor expresión del metabolito de interés, y en la finca 3 las muestras analizadas no presentan ácido rosmarínico (figura 3.8b). Las muestras obtenidas de cultivos en campo abierto presentaron mayor

cantidad de compuestos fenólicos y ácido rosmarínico que las obtenidas de cultivos bajo invernadero (figura 3.8c). Finalmente, en el análisis realizado en tres cosechas en una misma finca (figura 3.8d), se evidencian las variaciones con respecto a las épocas en el año y la edad de los cultivos. Las muestras de la segunda cosecha realizadas en febrero tienen gran cantidad de ácido rosmarínico.

Análisis por HPLC-DAD-ESI/MSn

En procura de obtener más información sobre los compuestos fenólicos presentes en las muestras, se decidió realizar una identificación mediante análisis por HPLC-DAD-ESI/MS^n. El perfil cromatográfico obtenido para el extracto de *M. spicata* se muestra en la figura 3.9 y en la tabla 3.5, en las que se identifican los 27 compuestos hallados tentativamente, los cuales fueron identificados según el tiempo de retención, los espectros de masas y los patrones

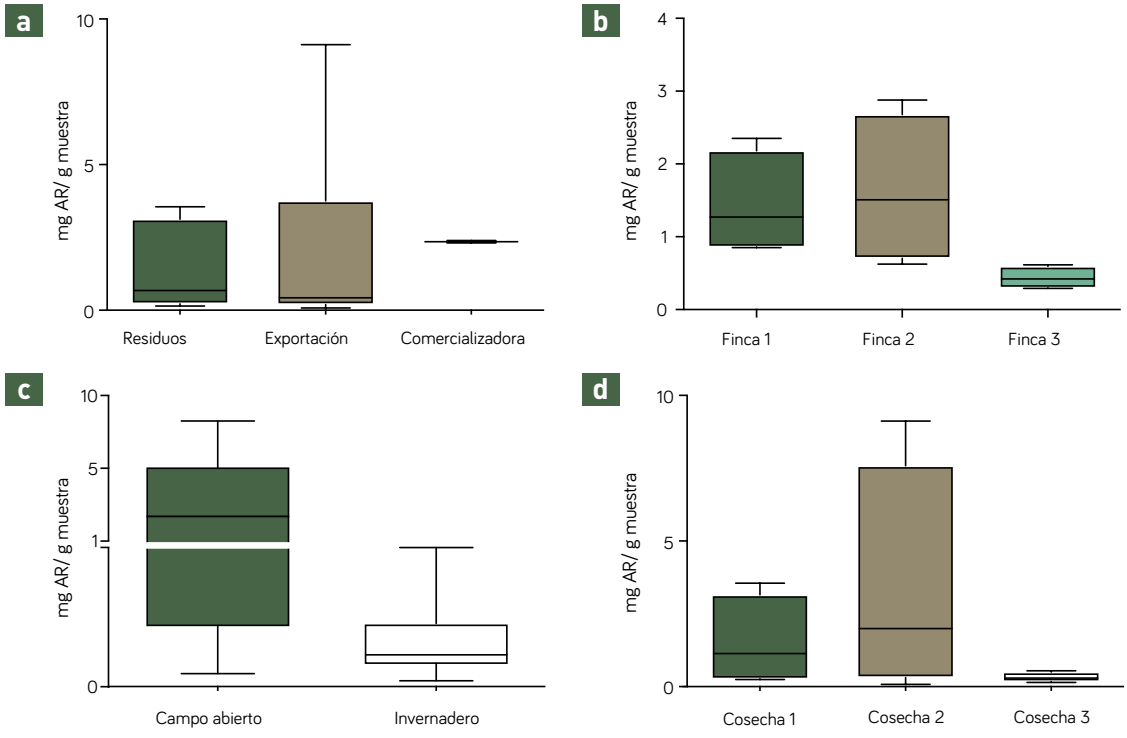


Figura 3.8. Comparación del contenido de ácido rosmarínico a partir de análisis univariados por medio de gráficos de caja y bigotes. **a.** En muestras de residuo, exportación y comercializadora. **b.** En muestras de diferentes fincas (donde Finca 1: Galicia; Finca 2: AGROSAVIA, y Finca 3: El Retiro); **c.** En muestras de campo abierto e invernadero; **d.** En muestras de diferentes cosechas.

Fuente: Elaboración propia

de fragmentación encontrados en bases de datos. Los 27 compuestos fueron tentativamente identificados con base en el análisis de su espectro de masas característico (MS^2 y MS^3) y su comparación con la información reportada en la literatura. Todos los compuestos presentes en la muestra fueron informados previamente para la especie (Brown et al., 2019; Cirlini et al., 2016; Özer, 2018). Además, se comprueba que el compuesto mayoritario es el ácido rosmarínico (*m/z* 359, MS^n 359, 223,197, 161), y que es posible detectar diferentes derivados de este. Otros productos polares incluidos en la menta corresponden a los ácidos hidroxicinámicos, como el ácido cafeico, el ácido caftárico y el ácido cumárico (Cirlini et al., 2016). El perfil de compuestos fenólicos muestra también la presencia de compuestos derivados del ácido cafeolquínico, tales como él ácido neo y criptoclorogénico, y el ácido feruloilquínico (Cirlini et al., 2016). Finalmente, algunas flavonas (luteolina y apigenina), flavonoles (kaempferol) y flavanonas (naringenina) también fueron identificadas en la muestra.

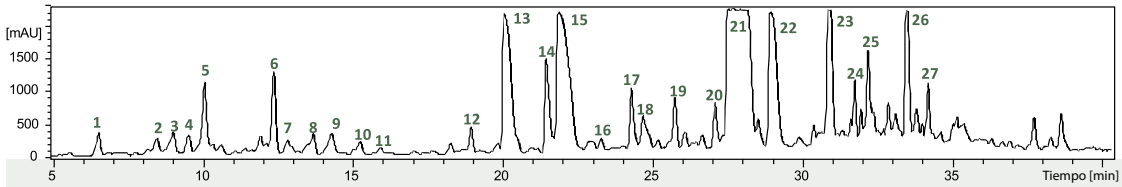


Figura 3.9. Cromatográfico representativo de *M. spicata* obtenido por HPLC-DAD-ESI/MS^n.

Fuente: Elaboración propia



Tabla 3.5. Compuestos identificados tentativamente por HPLC-DAD-ESI/MS^n

Pico	TR min	$[M-H]^-$ m/z	MS^n (MS^2, MS^3) experimental	Compuestos
1	6,5	353	**191**, 179, 135	Ácido neoclorogénico
2	8,5	311	179, **149**	Ácido caftárico
3	9,0	337	**163,** 119	Ácido 3- ρ-cumariolquínico
4	9,5	325	**163,** 119	Hexosa ρ-cumariol
5	10,0	353	179, **173**	Ácido criptoclorogénico
6	12,3	179	159, **153**	Ácido cafeico
7	12,8	593	473, 383, 503, **353**, 297	Vicenin 2
8	13,7	337	**173**, 137, 111	Hexosa 4- ρ-cumariol
9	14,7	377	**359**, 265	Derivado ácido rosmarínico
10	15,0	377	**359**, 197, 135	Derivado ácido rosmarínico
11	15,2	367	191, **173**	Ácido -4-feruloilquínico
12	18,9	595	287, 151	Eritrocina
13	20,0	593	**285**, 241, 175, 151	Luteolina-7-*O*-rutinósido
14	21,4	447	**285**	Luteolina-7-*O*-glucósido
15	21,8	461	**285**, 243, 175	Luteolina-7-*O*-glucorónido
16	23,3	579	**271**	Narinrutina
17	24,3	577	**269**, 225	Apigenina-7-*O*-rutinosido
18	24,7	717	**519**, 475, 365, 321	Ácido salvianólico
19	25,7	609	**301**, 286, 227	Hesperidina
20	27,0	445	**269**, 225, 175	Apigenina-7-*O*- glucorónido
21	27,5	359	**359**, 223, 197, 161	Ácido rosmarínico
22	29,0	461	315, **285**, 241	Kaempferol-7- *O*- glucorónido
23	30,9	537	**493**, 359, 295	Ácido litospérmico
24	31,7	533	**387**, 369, 207, 163	Medioresionol- *O*-ramnósido
25	32,2	563	**387**, 370/369, 207	Medioresionol- *O*-glucorónido
26	33,4	493	**359**, 223, 179, 161	Derivado ácido rosmarínico
27	34,1	493	**359**, 223, 197, 179, 161	Derivado ácido rosmarínico

Fuente: Elaboración propia

Análisis de compuestos terpénicos en *M. spicata* por GC/MS

Con base en la información reportada para *M. spicata*, el aceite esencial, los extractos apolares y aquel obtenido con etanol al 80 % fueron sometidos a análisis por GC/MS sin realizar ningún proceso de derivatización (Narasimhamoorthy

et al., 2015). Se determinó la composición del aceite esencial en seis de las muestras colectadas, con el propósito de conocer su quimiotipo. Estas muestras fueron las cultivadas a campo abierto en las tres fincas productoras: ECAR, ECAG, ECAA, además de las cultivadas bajo invernadero en AGROSAVIA, tanto de residuos como exportación RCAA, EBIA y RBIA. La selección de estas muestras se basó en la gran disponibilidad de material vegetal. De acuerdo con el análisis de los patrones de fragmentación y los pesos moleculares de los compuestos, se obtiene la información para cada muestra, además de la comparación entre el índice de Kovats (experimental) y el reportado en la literatura (teórico). Este índice describe el comportamiento de retención de un compuesto de interés con respecto al de una muestra de alcanos (tabla 3.6) (Chrysargyris et al., 2017; Kedia et al., 2014). Un total de 23 compuestos (alrededor del 80 % del aceite esencial) fueron identificados a través de la base de datos NIST 2017. El principal constituyente identificado correspondió a la carvona (30-49 %), seguido de *trans*-carveol (10-17 %), β-cariofileno (4-8 %) y germacreno-D (2-4 %). Diferentes estudios reportan la composición del aceite esencial de menta y se establece la presencia de diferentes quimiotipos, a saber: quimiotipo 1: carvona e dihidrocarvona; quimiotipo 2: linalool; quimiotipo 3: mentona e isomentona, y quiomitipo 4: piperitónn óxido y pulegona. Por lo tanto, independientemente de las fincas o de los ambientes de las muestras recolectadas, estas se pueden considerar pertenecientes al quimiotipo de carvona, aunque con variaciones cuantitativas en sus porcentajes. Los resultados concuerdan con los de otros autores que reportan perfiles cromatográficos relacionados con el quimiotipo de carvona obtenido a partir de *M. spicata* (Edris et al., 2003; Snoussi et al., 2015; Zheljazkov et al., 2010).

La comparación de los aceites esenciales provenientes de las muestras de fincas cultivadas a campo abierto identifican que ECAA (58,52 %) presenta el mayor contenido de carvona con respecto a ECAR y ECAG (29,77 % y 48,01 %, respectivamente). Si bien todas las muestras son cultivadas a campo abierto, se presenta una diferencia significativa entre la cantidad de carvona presente en ellas. Finalmente, el análisis del material proveniente de residuos y tipo exportación de menta, tanto en campo abierto como en invernadero (ECAA 58,52 %, RCAA 40,01 %, EBIA 49,22 %, RBIA 47,15 %), no muestra diferencias significativas en la cantidad de carvona para los residuos y el material de exportación en el material cultivado bajo invernadero. Por el contrario, el material obtenido a campo abierto presenta diferencias significativas según el análisis Anova (test Bonferroni $p > 0,05$). El rendimiento de la extracción del aceite esencial estuvo entre 0,198 % y 0,297 %, valores similares a los obtenidos por otros autores que informan rendimientos relativamente bajos para la especie (Orellana Salazar, 2017) (tabla 3.6).

Como el objetivo de esta investigación se relaciona con la posibilidad de aprovechar los compuestos terpénicos presentes en los residuos de menta, fue fundamental el análisis de la composición química del aceite esencial y el grado de extracción de los compuestos volátiles, que se puede alcanzar a través del uso de solventes con diferentes polaridades. Así, la química del aceite esencial fue comparada con la química de los extractos obtenidos con solventes orgánicos como hexano, diclorometano, acetato de etilo y las proporciones hexano/acetato de etilo 50:50 y 75:25. Estos solventes se han usado durante muchos años

Tabla 3.6. Composición química del aceite esencial de *M. spicata*

Índice de Kovats			Aceite esencial % relativo					
	Teórico	Experimental	ECAR	ECAG	ECAA	RCAA	EBIA	RBIA
Furan, 2,5-dietiltetrahidro	1,028 a	9,01	0,59					
D-Limonene	1,198 a	1,027	0,66	1,84	4,28	0,43	1,19	0,52
Neodihydrocarveol	1,219 a	1,194	3,24	1,23	0,61	2,22	0,95	2,19
trans-carveol	1,244 a	1,218	17,12	11,07	4,0	14,2	10,12	13,55
Carvona	1,324 b	1,246	29,77	48,01	58,52	40,01	49,22	47,15
Dihydrocarvyl acetate		1,323				0,36		
trans-Carveyl acetate		1,331	0,95	0,38		0,41		
γ-Elemene	1386 a	1,335	0,67				0,41	
β-bourbenene	1,393 a	1,386	4,38	3,23	3,59	4,35	3,29	2,83
β-Elemene	1,425 a	1,392	1,09	1,11	1,75	1,39	1,23	1,05
β-Caryophyllene		1,424	8,42	5,38	4,55	4,92	6,37	5,38
β-Copaen-4α-ol		1,430	1,84	1,46	1,17	1,56	1,77	1,55
ε-Muurolene		1,445					0,86	
(-)-Isogermacrene D		1,446	1,16	1,02	0,84	1,07		0,87
(E)-β-Famesene	1,466 c	1,450	1,61	1,21	0,93	1,38	1,41	1,24
cis-Muurola-4(15),5-diene	1,481 c	1,465	1,29	1,9	1,07	1,72	1,8	1,55
Germacrene D		1,483	4,52	3,62	2,55	2,76	4,09	3,51
γ-cadinene	1,534 a	1,497	0,72				0,44	0,37
trans-Calamenene	1,578c	1,533	0.8	1.31	0.69	1.27	1.34	1.25
(-)-Spathulenol	1,657 a	1,581	2.74	0.75		0.77	0.94	0.91
α-Cadinol		1,656	0.9	1.04		1.32	1.12	1.42
(1R,7S,E)-7-Isopropyl-4,10-		1,688	0.46			0.46		
dimethylenecyclodec-5-enol		2,102				0.74		0.44
Monoterpenos		52,33		62,53	67,41	57,63	61,48	63,41
Sesquiterpenos		30,6		22,03	17,14	23,71	24,66	22,37
Total		82,93		84,56	84,55	81,34	86,55	85,78
% Rendimiento		0,199		0,198	0,198	0,297	0,199	0,199

Fuente: Elaboración propia

para la extracción de compuestos apolares, gracias a su facilidad de disolver sustancias no hidrosolubles (Li et al., 2016). Sin embargo, se decidió utilizar también el sistema etanol/agua 80:20, el cual se estandarizó en trabajos previos en el laboratorio. Este sistema, que presentó el mayor porcentaje de extracción de compuestos fenólicos, es aprobado también para su uso en alimentos, así como en la elaboración de ingredientes naturales con fines alimentarios. Los resultados muestran que la mayor cantidad de compuestos terpénicos también es obtenida con etanol al 80 % (tabla 3.7). Así, se evidencia que el etanol permite la extracción de compuestos polares y no polares, tal como se reportó previamente (Sumarni et al., 2020). Esta información es de gran relevancia, pues con el mismo modelo de extracción se pueden obtener los compuestos fenólicos y terpénicos, sin la necesidad de pasos secuenciales de extracción.

Tabla 3.7. Composición química de los diferentes sistemas de extracción de muestras de *M. spicata*

	Solventes de extracción % relativo						
	AE	H:A 50:50	H:A 75:25	Hexano 100%	Acetato de etilo 100%	Diclorometano 100%	Etano l80 %
D-Limonene	4,28						0,23
Neodihydrocarveol	0,61						
Trans-Carveol	4,0	3,72	2,82	9,11	6,09		
Carvona	58,52	17,89	12,64	39,42	26,36	25,85	30,51
Dihydrocarvylacetate Trans-Carveylacetate				0,57 0,75			
γ-Elemene				0,67			
β-bourbenene	3,59			0,79			3,11
β-Elemene	1,75						0,47
β-Caryophyllene	4,55						8,96
β-Copaen-4α-ol	1,17				3,06		
ε-Muurolene							2,54
(-)-IsogermacreneD	0,84			4,10			2,39
(E)-β-Famesene	0,93						1,5
cis-Muurola- 4(15),5-diene	1,07			1,60	0,80		5,72
Germacrene D	2,55	2,24	0,78	2,99	1,66	6,23	6,26
γ-cadinene							
trans-Calamenene	0,69						3,24
Monoterpenos	67,41	21,61	15,46	49,85	32,45	25,85	30,74
Sesquiterpenos	17,14	2,24	0,78	10,15	5,52	6,23	34,19
TOTAL	84,55	23,85	16,24	60,00	37,97	32,08	64,93

H:A = hexanos/acetato de etilo
Fuente: Elaboración propia

Posteriormente, se procedió a cuantificar la carvona mediante una curva de calibración, y con base en la información obtenida se analizaron las variaciones en cada muestra. El contenido de carvona estuvo en el rango de 0,203 a 0,756, y de 0,122 a 0,756 mg carvona/g para las muestras cultivadas en diferentes fincas y diferentes épocas, respectivamente (figura 3.10a y 3.10b). Las muestras que presentaron mayor cantidad de carvona corresponden a las cultivadas en la primera cosecha en AGROSAVIA, ECCA-1, RCAA-1, EBIA-1 y RBIA-1.

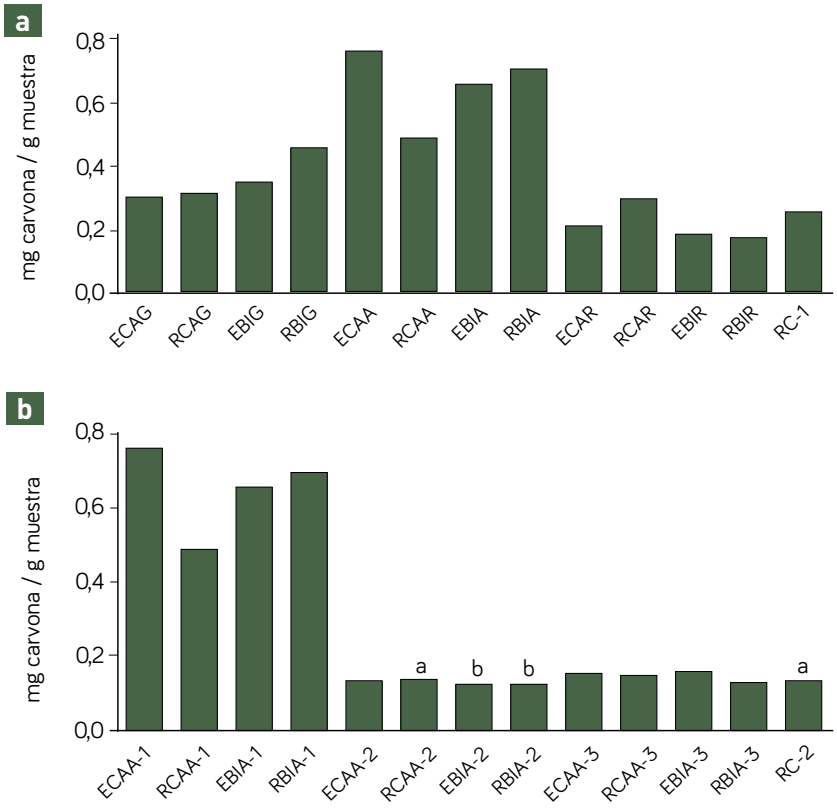


Figura 3.10. a y b. Contenidos de carvona en muestras de diferentes fincas del Oriente antioqueño con diferentes ambientes de cultivo (campo abierto e invernadero). Donde ECA: exportación campo abierto; RCA: residuos campo abierto; EBI: exportación bajo invernadero; RBI: residuos bajo invernadero; RC: residuos comercializadora; G: Galicia; A: AGROSAVIA, y R: El Retiro. 1: primera cosecha en AGROSAVIA; 2: segunda cosecha en AGROSAVIA, y 3: tercera cosecha en AGROSAVIA. RC2: segundo residuo comercializadora. El análisis estadístico usa una Anova de una vía (test de Bonferroni, $p < 0,05$). Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa.

Fuente: Elaboración propia

En la comparación realizada entre los residuos obtenidos en los procesos de cosecha comparados con los residuos generados en comercializadora y el material de exportación, se encuentra que los valores del material de residuo no presentan diferencias significativas con respecto al material de exportación (figura 3.11a). Cuando se realiza el análisis de los orígenes de cada muestra, es decir, entre las fincas productoras (figura 3.11b), se encuentra que la finca 2 se caracteriza por tener una expresión mayor de carvona en comparación con las otras dos fincas. Esta información es similar a la obtenida en AR y CPT. En el caso de la comparación de los ambientes de cultivo en campo abierto y bajo invernadero (figura 3.11c), se evidencia poca diferencia en los dos ambientes de cultivo en términos de carvona. No obstante, en los cultivos de invernadero hay una mayor variabilidad de los datos. En el análisis realizado en tres cosechas en una misma finca (figura 3.11d), se evidencia la mayor cantidad de carvona en la primera cosecha. Sin embargo, no se presenta información relacionada con esta especie ni los cambios en los cultivos a través del tiempo.

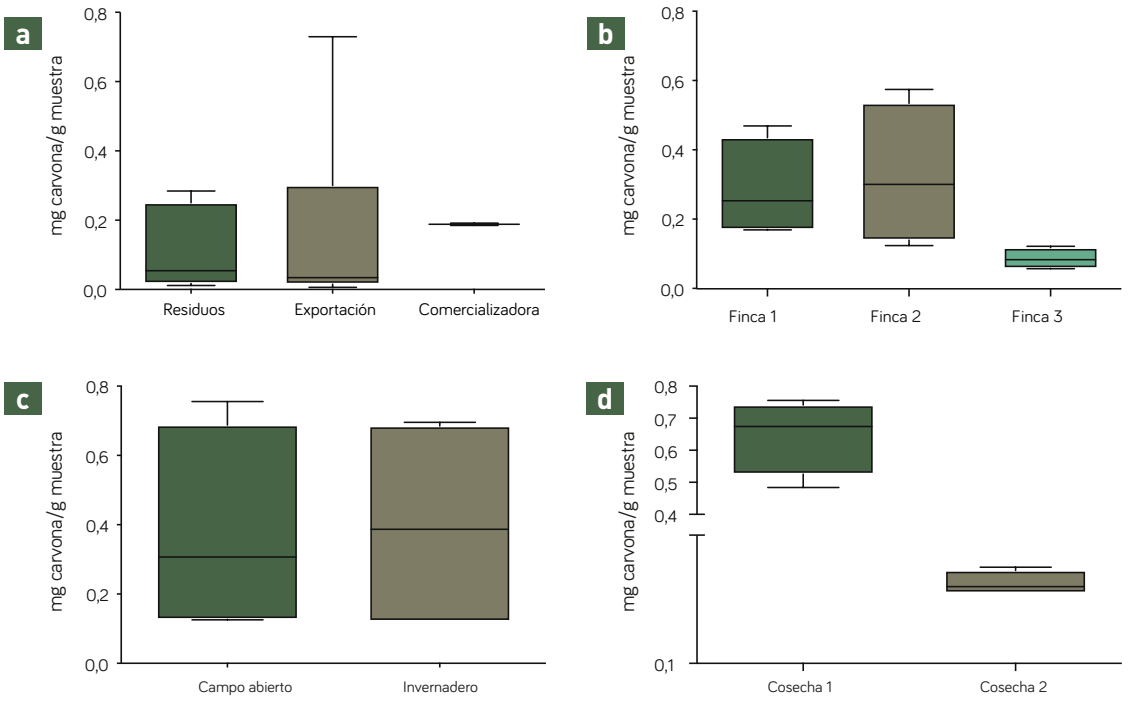


Figura 3.11. Comparación del contenido de carvona utilizando análisis univariados por medio de gráficos de caja y bigotes. **a.** En muestras de residuo, exportación y comercializadora, **b.** En muestras de diferentes fincas (donde finca 1: Galicia; finca 2: AGROSAVIA, y finca 3: El Retiro); **c.** En muestras de campo abierto e invernadero; **d.** En muestras de diferentes cosechas.

Fuente: Elaboración propia

Con la información obtenida en los diferentes análisis a través del capítulo, se encuentra que los residuos tanto de comercializadora como el generado en las fincas podrían ser utilizados de igual forma que el material de exportación para el desarrollo de los ingredientes naturales. En este punto es importarte aclarar que el material de residuos en campo requiere un proceso adicional de separación de los tallos y las hojas. Si bien la química no presenta cambios a la hora de realizar los escalados, se deben evaluar los factores de tiempo y proceso. En el caso específico de los residuos de comercializadora, los valores no presentan distribución debido a la poca cantidad de muestra. Sin embargo, se encuentra que este material tiene igual calidad química y su procesamiento no requierede tanta inversión de tiempo. Por este motivo, se proponen los residuos de comercializadora para el desarrollo del bioingrediente.

Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido y desarrollo de un ingrediente natural

Selección de la relación sólido/solvente de extracción

Para la optimización de la relación sólido/solvente en la extracción asistida por ultrasonido, se determinó la influencia del material vegetal y la capacidad de la solución. En las figuras 3.12a, 3.12b y 3.12c, se observa un incremento de los compuestos de interés en forma proporcional al porcentaje de material vegetal en 4 y 7 % de sólidos. Basados en resultados visuales, la carga a 10 % no fue evaluada por la saturación del flujo y, por ende, una deficiente homogeneización de la mezcla. Teniendo presente los resultados, se determina una diferencia significativa entre los porcentajes de material vegetal de acuerdo con un análisis de varianza (Anova). Se establece que, en términos de los compuestos analizados (CPT, AR y carvona), la relación 7 % de material vegetal presenta buena fluidización del sistema y la mayor cantidad de compuestos de interés en el proceso extractivo a flujo constante y asistido por ultrasonido de alta i,te,si,ad,(U,I),

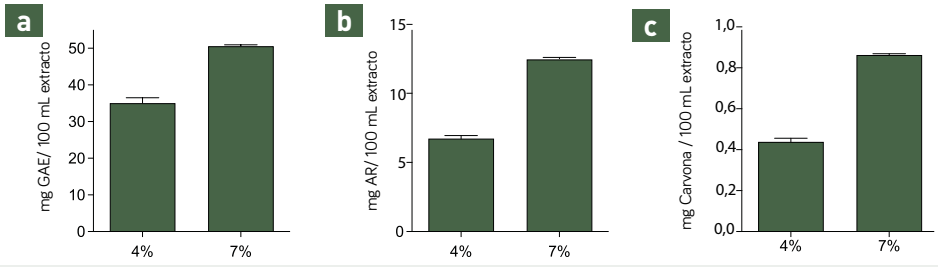


Figura 3.12. Relación sólido/solvente de extracción en extractos obtenidos con diferentes proporciones de material vegetal. **a.** Contenido de polifenoles totales (CPT). **b.** Ácido rosmarínico; **c.** Carvona. El análisis estadístico usa una Anova de una vía (test de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

Modelado de extracción (tiempo y amplitud ultrasónica)

Anteriormente, se determinó un porcentaje de material vegetal del 7 % como primera condición optimizada. No obstante, existen otros factores que requieren ser optimizados, tales como el tiempo de extracción y la amplitud ultrasónica. Los datos recogidos experimentalmente y el modelado de la cinética de extracción de Peleg en la obtención de los compuestos marcadores de *M. spicata* se presentan en la figura 3.13a, que muestra diferentes amplitudes y tiempos de extracción, y en la figura 3.13b, que indica diferentes temperaturas y tiempo.

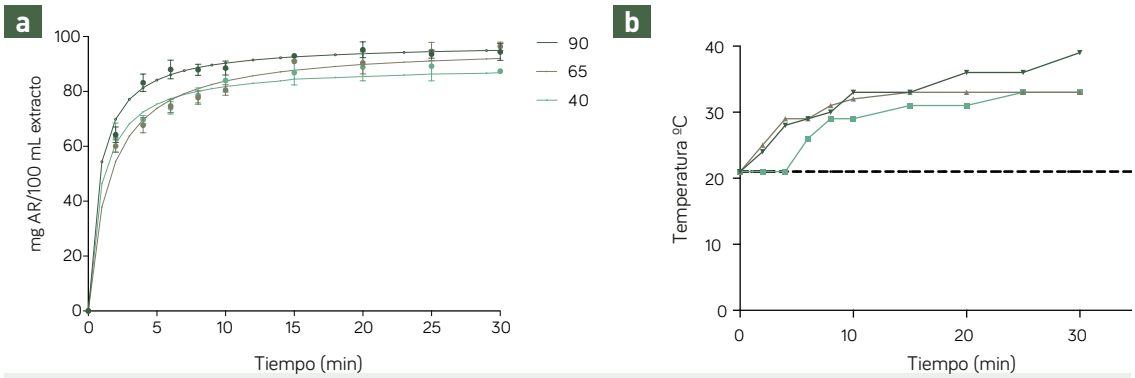


Figura 3.13. Modelado de cinética de extracción. **a.** Cinética de extracción de ácido rosmarínico en *M. spicata* con diferentes amplitudes y tiempos; **b.** Cambios de la temperatura a diferentes amplitudes.
Fuente: Elaboración propia

El análisis de los resultados determina que el factor con mayor impacto en la extracción de los compuestos de interés corresponde en mayor medida a la amplitud ultrasónica; sin embargo, el tiempo también es un factor influyente. En el caso de la cinética de ácido rosmarínico, se obtuvo un buen ajuste de los datos experimentales con el modelo aplicado con un r^2 de 0,99. Según la cinética de extracción, se encuentran diferencias en las amplitudes evaluadas, aunque las curvas de extracción obtenidas mostraron un comportamiento similar. La cantidad de ácido rosmarínico aumentó rápidamente en los primeros cinco minutos, con una rampa de crecimiento hasta el minuto 10. Después de este tiempo, la concentración creció ligeramente hasta llegar al equilibrio (figura 3.13a). Estos valores aumentaron directamente con el tiempo y la amplitud utilizada, los cuales acrecentaron la temperatura en el sistema. Un aumento en la temperatura se relaciona con el aumento de la solubilidad por saturación del disolvente (Sandilya & Kannan, 2010).

En el proceso de extracción del ácido rosmarínico fue indispensable la estandarización de la amplitud y el tiempo de extracción. Según los resultados, se elige la amplitud de 90 % y un tiempo de 5 minutos. Un análisis similar se realizó para el compuesto mayoritario terpénico, la carvona (figura 3.14a) y el contenido de polifenoles totales (figura 3.14b). En un estudio similar, los autores indicaron que la obtención de carvona presentó mayor rendimiento a través de la técnica de extracción asistida por ultrasonido. Se encontró que las variables de amplitud ultrasónica y tiempo de extracción fueron efectivas en el rendimiento de las extracciones con ultrasonido (Mansoori et al., 2020). Estos compuestos tienen un comportamiento similar al obtenido con el ácido rosmarínico, en el que se observa la influencia de la amplitud y el tiempo para favorecer su extracción. Así, con los resultados de optimización de la extracción por UAI, se presenta la opción integrada para la obtención simultánea de compuestos fenólicos y terpénicos a partir de plantas de ment,,

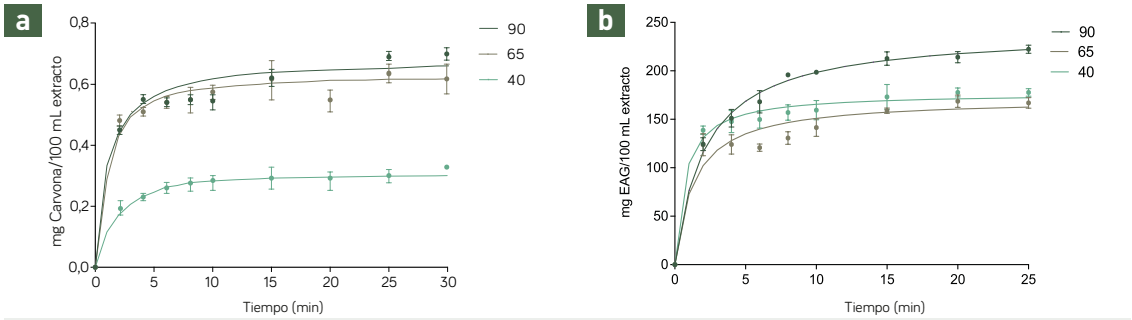


Figura 3.14. Modelado de cinética de extracción. **a.** Cinética de extracción de carvona en *M. spicata* con diferentes amplitudes y tiempos; **b.** Cinética de extracción de polifenoles totales.
Fuente: Elaboración propia

Extracciones sucesivas

Una vez optimizados los parámetros de relación sólido/solvente, amplitud y temperatura, se procedió a evaluar la capacidad de saturación del solvente de extracción. Para este análisis se partió de un lote de 700 mL de solvente de extracción etanol/agua 80:20, con una carga inicial de 7 % de material sólido seco y molido con las condiciones establecidas en el equipo ultrasónico. Una vez terminado el proceso de extracción, el líquido obtenido después de la primera extracción fue filtrado y se utilizó como solvente de la segunda extracción. Con este nuevo volumen, se recalculó la cantidad de material vegetal nuevo a adicionar y se repitió una vez más el proceso de extracción. El experimento se

realizó sucesivamente seis veces y se evaluó la cantidad de polifenoles totales (figura 3.15a), ácido rosmarínico (figura 3.15b) y carvona (figura 3.15c).

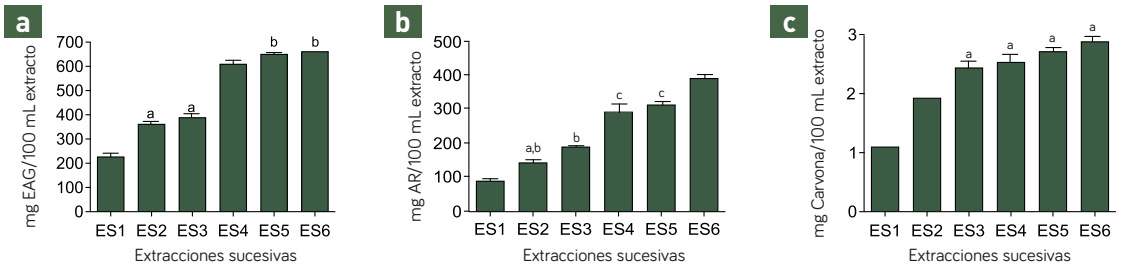


Figura 3.15. Extracciones sucesivas de extractos obtenidos después de realizar nuevas cargas de material vegetal en cada extracción, manteniendo el mismo solvente. **a.** Contenido de polifenoles totales (CPT); **b.** Ácido rosmarínico; **c.** Carvona. El análisis estadístico usa una Anova de una vía (test de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

Al comparar los valores obtenidos de CPT, ácido rosmarínico y carvona, se determinó una diferencia medianamente significativa entre las extracciones sucesivas a partir de ES4, de acuerdo con un análisis de varianza (Anova) con la prueba de Bonferroni. Esta evaluación permite entender que el solvente de extracción puede ser cargado varias veces con material vegetal sin llegar a un punto de saturación. No obstante, al analizar en términos de practicidad, se debe considerar el gasto de material vegetal, el gasto energético en los pasos de filtración y las pérdidas de solvente, lo cual podría hacer más costoso el proceso productivo. Teniendo en cuenta estos datos, se consideran viables los desarrollos que impliquen reducción de variables y pasos en la realización. Se establece, entonces, que la extracción sucesiva ES4 es la mejor extracción para ser utilizada en los procesos extractivos asistidos por UAI.

Desarrollo de ingrediente natural con aplicación alimentaria. Obtención de los extractos

El primer paso para la obtención de los ingredientes líquidos hidroalcohólicos fue realizar los extractos líquidos con las condiciones previamente establecidas. Sin embargo, en este punto se buscó determinar diferentes porcentajes de material vegetal seco y fresco; este último se obtuvo en forma de pasta, tras un proceso de licuado de las hojas. Estas proporciones en las mezclas no deben superar el 7 % de relación sólido/solvente. Así, se realizaron cuatro tratamientos con el mismo solvente de extracción, pero con diferentes mezclas de material

seco y material fresco de menta. El primer ingrediente, E1, contenía un 100 % de material seco; el segundo ingrediente, E2, 20 % de pasta y 80 % de material seco; el tercer ingrediente, E3, 35 % de pasta y 65 % de material seco, y el último ingrediente, E4, 50 % de pasta y 50 % de material seco. El propósito de las diferentes mezclas entre las formas del material vegetal consistió en obtener la mayor cantidad de compuestos presentes en el material seco y conservar las características organolépticas en el material fresco. Una vez obtenidos, se procedió a evaluar las propiedades químicas y organolépticas.

Pruebas organolépticas: análisis descriptivo y discriminativo de los extractos desarrollados

En el análisis de los ingredientes desarrollados se realizó el análisis descriptivo y discriminativo. Para esto se inició con la cuantificación de los compuestos de interés previamente estudiados, ácido rosmarínico, carvona y contenido de polifenoles totales. De acuerdo con los resultados, el extracto E1 presentó la mayor cantidad de polifenoles totales (figura 3.16a), seguido de E2, E3 y E4. En general, se observan diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$), excepto entre los extractos E3 y E4. Un comportamiento similar se observa en el análisis de ácido rosmarínico (figura 3.16b), donde E1 tiene más AR, y por último en el análisis de carvona (figura 3.16c); se evidencia significativamente la cantidad de este compuesto en E1 con respecto a los demás extractos. Se concluye que, cuando hay mayor presencia de material seco, se incrementa la cantidad de compuestos de interés.

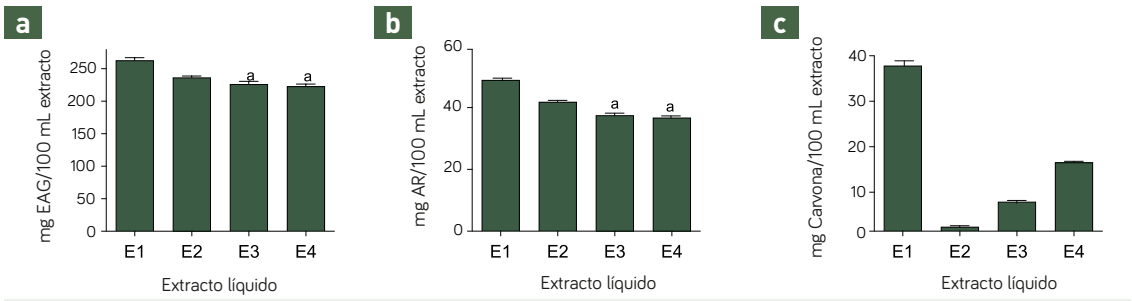


Figura 3.16. Proporción de material vegetal seco y pasta en extractos obtenidos con diferentes proporciones de material vegetal. **a.** Contenido de polifenoles totales (CPT); **b.** Ácido rosmarínico; **c.** Carvona. El análisis estadístico usa una Anova de una vía (test de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

Para el análisis sensorial de los ingredientes de menta, se tomaron las muestras realizadas anteriormente y se prepararon al 1 % en agua. Además, se comparó con respecto a un té comercial de menta y un macerado de hojas para confrontar el sabor. Se realizó el proceso correspondiente para poder obtener cada muestra de comparación y realizar la catación. Cada muestra conservó un respectivo código para su identificación. En el análisis sensorial de los extractos, siguiendo la metodología propuesta, se pretendió determinar cuál de los extractos presentaba mejor color, olor y sabor, y si alguno de estos mostraba similitud con el té comercial o con las hojas maceradas de menta. De acuerdo con los resultados sobre la aceptabilidad sensorial, se encuentra que el 84,6 % de los encuestados prefirieron el E1 en cuanto a olor, el 50,0 % en cuanto a color y el 65,4 % en cuanto a sabor (figura 3.17 y tabla 3.8). En cuanto a la comparación hedónica de similitud, los panelistas concluyeron que, si bien el extracto tiene las características organolépticas de la menta, no se presenta similitud con el té comercial o el macerado de hojas frescas. Esto podría explicarse por varias razones, entre ellas el lugar y el tipo de material recolectado, la forma de secado en marquesina y también el método de obtención del extracto.

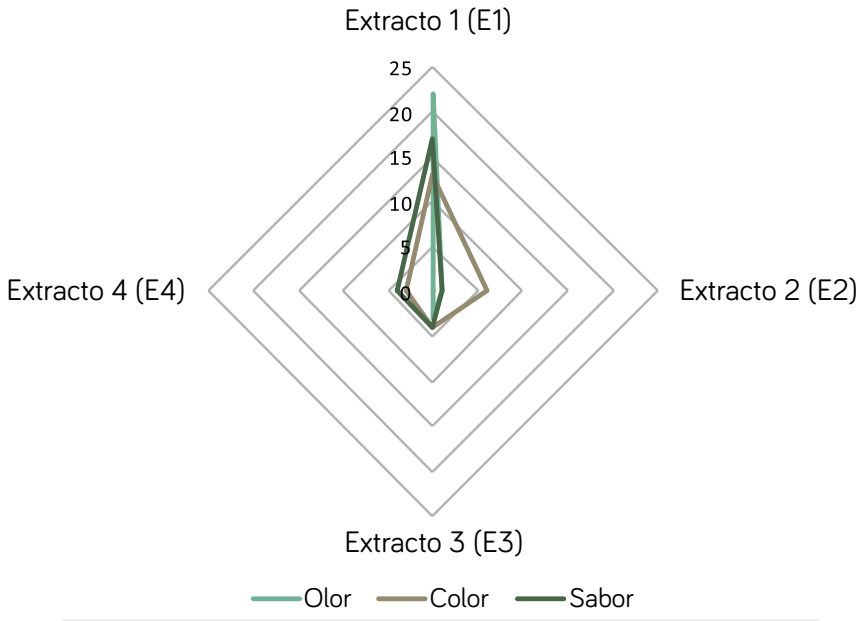


Figura 3.17. Perfil sensorial de las características evaluadas de los ingredientes de hierbabuena.
Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.8. Porcentajes de aceptación de cada extracto evaluado

	Olor % preferencia	Color % preferencia	Sabor % preferencia
Extracto 1	84,6	50,0	65,4
Extracto 2	3,8	23,1	3,8
Extracto 3	11,5	15,4	15,4
Extracto 4	0,0	11,5	15,4

Fuente: Elaboración propia

El primer paso para la obtención del ingrediente hidroalcohólico con fin alimentario fue la caracterización y definición de los extractos líquidos. Cuatro extractos fueron propuestos y realizados con el mismo solvente de extracción, pero con diferentes cantidades de material vegetal y pasta. Según las pruebas descriptivas cualitativas y cuantitativas, el extracto que presentó mayor contenido de ácido rosmarínico, CPT y carvona fue E1. Los resultados muestran que, cuando se usa material completamente seco, hay mayor concentración de los compuestos, los cuales son los responsables del olor y el sabor, lo que se evidencia en las pruebas organolépticas. Es probable que este comportamiento se dé al secarse el material vegetal y concentrar los compuestos, toda vez que, cuando se usa material fresco, se incrementa el contenido de agua. La menta presenta alrededor de un 80 % de humedad y ello permite la dilución de los compuestos.

Combinando toda la información obtenida, se postula el extracto 1 (E1) como ingrediente natural proveniente de los residuos de comercializadora de menta, con su potencial uso en las industrias de bebidas alimentarias.

Conclusiones

La caracterización química de muestras de menta (residuos y material de exportación) permite determinar el potencial de la especie para el desarrollo de un ingrediente natural de interés en la industria alimentaria, específicamente para la elaboración de bebidas. De esta forma, se pueden aprovechar conjuntamente las propiedades funcionales y las características organolépticas de la planta. Con el análisis químico se determinaron los compuestos tipo ácidos fenólicos, flavonoides y compuestos terpénicos en muestras de menta cultivadas en el Oriente antioqueño.

El estudio químico por HPLC/DAD demostró que el ácido rosmarínico es el mayor constituyente fenólico de la especie *M. spicata*, lo cual se comprobó con HPLC/MS. A su vez, se determinó que la carvona es el mayor constituyente terpénico de la especie, analizado por GC/MS.

Se identificó una relevancia significativa en los ambientes de cultivo de menta, observando una mayor cantidad de metabolitos en las muestras cultivadas en campo abierto con respecto a aquellas cultivadas bajo invernadero. A su vez, se encontró que no había diferencias significativas entre el material de exportación y las muestras de los residuos generados en campo y en las comercializadoras. Sin embargo, debido a los procesos de separación adicional que requieren los residuos de campo, se proponen los residuos de comercializadora como el material para el desarrollo de ingredientes naturales.

Mediante el planteamiento de diseños de experimentos, se logró estandarizar un proceso de extracción a través de un equipo de ultrasonido de alta intensidad, en procura de maximizar la extracción de los compuestos de interés presentes en la menta, minimizando el uso de tecnologías convencionales que generan grandes gastos energéticos y que son altamente contaminantes. De esta forma, se establecen las condiciones de amplitud ultrasónica de 90 %, tiempo de 5 minutos y una carga del 7 % de material vegetal para la extracción de los compuestos de interés.

En vista de las potencialidades químicas y funcionales reportadas previamente en la menta, se establece el punto de partida para el desarrollo de productos de valor. Se obtuvo un prototipo de ingrediente natural con aplicación en la industria alimentaria que contiene las propiedades benéficas de los compuestos fenólicos de la especie y conserva las características organolépticas por sus compuestos terpénicos. La investigación química de ingredientes naturales permite generar un valor agregado en las plantas aromáticas y medicinales, lo cual contribuye al aprovechamiento de la materia prima y, en especial, al uso de residuos generados en esta agroindustria, disminuyendo por ende las fuentes de contaminación.

Referencias

Abootalebian, M., Keramat, J., Kadivar, M., Ahmadi, F., & Abdinian, M. (2016). Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different Mentha spicata and M. longifolia accessions. Annals of *Agricultural Sciences*, *61*(2), 175-179. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2016.10.002

Bonilla, C. R., & Guerrero, M. R. (2010). *Menta (*Mentha *spp.). Producción y manejo poscosecha.* Cámara de Comercio de Bogotá; Corpoica. http://hdl.handle.net/20.500.12324/12923

Brahmi, F., Hauchard, D., Guendouze, N., Madani, K., Kiendrebeogo. M., Kamagaju, L., Stévigny. C., Chibane, M., & Duez, P. (2015). Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, *74*, 722-730. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.038

Brown, N., John, J. A., & Shahidi, F. (2019). Polyphenol composition and antioxidant potential of mint leaves. *Food Production, Processing and Nutrition*, *1*(1), 1-14. https://doi.org/10.1186/s43014-019-0001-8

Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, *72*, 1-20. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009

Chrysargyris, A., Xylia, P., Botsaris, G., & Tzortzakis, N. (2017). Antioxidant and antibacterial activities, mineral and essential oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L.) affected by the potassium levels. *Industrial Crops and Products*, *103*, 202-212. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.010

Cirlini, M., Mena, P., Tassotti, M., Herrlinger, K. A., Nieman, K. M., Dall'Asta, C., & Del Rio, D. (2016). Phenolic and volatile composition of a dry spearmint (*Mentha spicata* L.) extract. *Molecules*, *21*(8), 1-15. https://doi.org/10.3390/molecules21081007

Del Valle, G., González-León, A., Sotelo-Mundo, R. R., Islas-Osuna, M. A., Bringas-Taddei, E., García-Robles, J. M., Varvallo, T., & Báez, R. (2008). Efecto del sombreado de racimos sobre color y calidad en uvas rojas para mesa (*Vitis vinifera* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, *31*(1), 7-17. https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/31-1/2a.pdf

Edris, A. E., Shalaby, A. S., Fadel, H. M., & Abdel-Wahab, M. A. (2003). Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata* L.) grown in Siwa Oasis, Egypt. *European Food Research and Technology*, *218*(1), 74-78. https://doi.org/10.1007/s00217-003-0802-4

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos [Invima]. (2018). *Listado de plantas medicinales aceptadas con fines terapéuticos*. https://bit.ly/3p55eMO

Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P. K., Chanotiya, C. S., & Dubey, N. K. (2014). Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *89*, 29-36. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.027

Li, Z., Smith, K. H., & Stevens, G. W. (2016). The use of environmentally sustainable bio-derived solvents in solvent extraction applications–A review. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *24*(2), 215-220. https://doi.org/10.1016/j.cjche.2015.07.021

Mansoori, S., Bahmanyar, H., Jafari Ozumchelouei, E., & Najafipour, I. (2020). Investigation and optimisation of the extraction of carvone and limonene from the Iranian *Mentha spicata* through the ultrasound-assisted extraction method. *Indian Chemical Engineer*, *64*(2), 141-150. https://doi.org/10.1080/00194506.2020.1831407

Narasimhamoorthy, B., Zhao, L. Q., Liu, X., Yang, W., & Greaves, J. A. (2015). Differences in the chemotype of two native spearmint clonal lines selected for rosmarinic acid accumulation in comparison to commercially grown native spearmint. *Industrial Crops and Products, 63*, 87-91. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.044

Orellana, A. C. (2017). *Caracterización del aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata *L.) obtenido por el método de arrastre con vapor* [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional del Callao, Perú. http://hdl.handle.net/20.500.12952/3612

Osorio, J. (2021). *Informe exportaciones de hierbas aromáticas.* Analdex. https://www.analdex.org/2021/10/20/informe-exportaciones-de-hierbas-aromaticas/

Özer, Z. (2018). Investigation of phenolic compounds and antioxidant activity of *Mentha spicata* subsp. *spicata* and *M. longifolia* subsp. *typhoides* (Briq.) Harley decoction and infusion. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry, 5*(2), 445-456. https://doi.org/10.18596/jotcsa.350089

Salazar-García, S., Medina-Carrillo, R. E., & Álvarez-Bravo, A. (2017). Influencia del riego y radiación solar sobre el contenido de fitoquímicos en la piel de frutos de aguacate 'Hass'. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 13*, 2565-2575. https://doi.org/10.29312/remexca.v0i13.483

Sandilya, D. K., & Kannan, A. (2010). Effect of ultrasound on the solubility limit of a sparingly soluble solid. *Ultrasonics Sonochemistry.* https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.10.005

Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., & De Feo, V. (2015). *Mentha spicata* essential oil: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of vibrio spp. strains. *Molecules, 20*(8), 14402–14424. https://doi.org/10.3390/molecules200814402

Sumarni, N. K., Hasanuddi, A., Nuryanti, S., & Hutumo, G. S. (2020). Isolation and characterization of terpenoid compounds ethanol extract on young coconut coir (*Cocos nucifera* L). *International Journal of Scientific and Technology Research, 9*(2), 5622-5625. http://www.ijstr.org/final-print/feb2020/Isolation-And-Characterization-Of-Terpenoid-Compounds-Ethanol-Extract-On-Young-Coconut-Coir-cocos-Nucifera-L.pdf

Tuladhar, P., Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Role of phenols and polyphenols in plant defense response to biotic and abiotic stresses. *Biocontrol Agents and Secondary Metabolites*, 419-441.

Zhao, D., Xu, Y. W., Yang, G. L., Husaini, A. M., & Wu, W. (2013). Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq. and *Mentha spicata* L. from China. *Industrial Crops and Products, 42*(1), 251-260. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.010

Zheljazkov, V. D., Cantrell, C. L., Astatkie, T., & Hristov, A. (2010). Yield, content, and composition of peppermint and spearmints as a function of harvesting time and drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(21), 11400-11407. https://doi.org/10.1021/jf1022077