

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA  
Y DEL MEDIO NATURAL

**Composición química y actividad  
antioxidante de los aceites esenciales de  
*Mentha longifolia* y *Mentha x piperita***

Trabajo de Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Curso 2019/2020

Autor: D. Juan José Martínez García

Tutor académico: Profesor Dr. D. Juan Antonio Llorens Molina

Cotutora: Profesora Dra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Desamparados Quiles Chuliá

Directora experimental: Dra. D<sup>a</sup> Jennifer Alexandra Audrey Borreani

**Valencia, a 19 de Noviembre de 2019**

Autor: Alumno D. Juan José Martínez García

Valencia, a 19 de Noviembre de 2019

Tutor académico: Profesor Dr. D. Juan A. Llorens Molina

## RESUMEN

### **Composición química y actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Mentha longifolia* y *Mentha x piperita*.**

Existe un creciente interés por la utilización de productos naturales en el ámbito agroalimentario, como consecuencia de los efectos nocivos para la salud y el medio ambiente de algunos productos sintéticos. Dentro de los productos naturales, los aceites esenciales obtenidos a partir de plantas aromáticas y medicinales son ampliamente utilizados como consecuencia de diferentes aspectos de su actividad biológica. Por este motivo, es relevante el estudio de su aplicación como conservantes alternativos en la industria agroalimentaria.

En este trabajo se ha evaluado la actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Mentha longifolia* L y *Mentha x piperita*. El aceite esencial de *Mentha longifolia* fue obtenido por hidrodestilación con equipo Clevenger, mientras que el aceite esencial de *Mentha x piperita* fue de origen comercial. El análisis de la composición química se realizó mediante cromatografía de gases con detección mediante espectroscopía de masas para la identificación previa de los componentes y con detector de ionización de llama (FID) para su cuantificación aproximada. Los compuestos principales que se observaron en la *Mentha longifolia* fueron los óxidos de piperitona y de piperitenona, mientras que para la *Mentha x piperita* los compuestos principales fueron el mentol y lomentona.

La actividad antioxidante de los aceites esenciales se evaluó mediante tres metodologías distintas que son: DPPH (2,2-difenil-1-picril hidracilo), FRAP (usando una recta patrón a través del reactivo Trolox, y fenoles totales (mediante el reactivo Folin-Ciocalteu y curva patrón con ácido gálico). Cuando se aplicó el método basado en el DPPH también se realizó una prueba con aceite esencial de orégano, de origen comercial, para realizar una comparación al ser un conocido aceite esencial con una gran capacidad antioxidante.

Se obtuvieron resultados satisfactorios, mostrando la *Mentha longifolia* valores de capacidad antioxidante superiores a los de la *Mentha x piperita*.

Con estos resultados se podría elegir el uso de *Mentha longifolia* como antioxidante en alimentos por su mayor capacidad antioxidante, manteniendo unas buenas características organolépticas.

**Palabras clave:** Antioxidante, *Mentha longifolia*, aceite esencial, *Mentha x piperita*

Author: Student D. Juan José Martínez García

Valencia, November 19<sup>th</sup>, 2019

Academic tutor: Professor Dr. D. Juan A. Llorens Molina

## ABSTRACT

### **Chemical composition and antioxidant activity of the essential oils of *Mentha longifolia* and *Mentha x piperita*.**

There is a growing interest in the use of natural products in the agri-food sector, as a consequence of the harmful effects on health and the environment of some synthetic products. Among natural products, essential oils obtained from aromatic and medicinal plants are widely used as a consequence of different aspects of their biological activity. For this reason, the study of its application as alternative preservatives in the agri-food industry is relevant.

In this work the antioxidant activity of the essential oils of *Mentha* has been evaluated. *Longifolia L* and *Mentha x piperita*. The essential oil of *Mentha longifolia* was obtained by hydrodistillation with Clevenger equipment, while the essential oil of *Mentha x piperita* was of commercial origin. The analysis of the chemical composition was carried out by means of gas chromatography with detection by mass spectroscopy for the previous identification of the components and with a flame ionization detector (FID) for its approximate quantification. The main compounds that were observed in the *Mentha longifolia* were the oxides of piperitone and piperitenone, while for the *Mentha x piperita* the main compounds were menthol and lomentone.

The antioxidant activity of the essential oils was evaluated using three different methodologies: DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydracil), FRAP (using a straight line through the Trolox reagent, and total phenols (using the Folin-Ciocalteu reagent) and standard curve with gallic acid.) When the method based on DPPH was applied, a test with oregano essential oil, of commercial origin, was also carried out to make a comparison since it is a known essential oil with a high antioxidant capacity.

Satisfactory results were obtained, showing the *Mentha longifolia* values of antioxidant capacity superior to those of the *Mentha x piperita*.

With these results we could choose the use of *Mentha longifolia* as an antioxidant in foods due to its greater antioxidant capacity, maintaining good organoleptic characteristics.

**Keywords:** Antioxidant, *Mentha longifolia*, essential oil, *Mentha x piperita*

Autor: Alumne D. Juan José Martínez García

València, a 19 de Novembre de 2019

Tutor acadèmic: Professor Dr. D. Juan A. Llorens Molina

## RESUM

### **Composició química i activitat antioxidant de l'oli essencial de *Mentha longifolia* i *Mentha x piperita*.**

Hi ha un creixent interès per la utilització de productes naturals en l'àmbit agroalimentari, com a conseqüència dels efectes nocius per a la salut i el medi ambient d'alguns productes sintètics. Dins dels productes naturals, els olis essencials obtinguts a partir de plantes aromàtiques i medicinals són àmpliament utilitzats com a conseqüència de diferents aspectes de la seva activitat biològica. Per aquest motiu, és rellevant l'estudi de la seva aplicació com a conservants alternatius en la indústria agroalimentària.

En aquest treball s'ha avaluat l'activitat antioxidant dels olis essencials de *Mentha longifolia* L i *Mentha x piperita*. L'oli essencial de *Mentha longifolia* va ser obtingut per hidrodestilació amb equip Clevenger, mentre que l'oli essencial de *Mentha x piperita* va ser d'origen comercial. L'anàlisi de la composició química es va realitzar mitjançant cromatografia de gasos amb detecció mitjançant espectroscòpia de masses per a la identificació prèvia dels components i amb detector d'ionització de flama (FID) per a la seva quantificació aproximada. Els compostos principals que es van observar en la *Mentha longifolia* van ser els òxids de piperitona i de piperitenona, mentre que per a la *Mentha x piperita* els compostos principals van ser el mentol i l'amentona.

L'activitat antioxidant dels olis essencials es va avaluar mitjançant tres metodologies diferents que són: DPPH (2,2-difenil-1-picril hidracilo), FRAP (usant una recta patró a través del reactiu trolox, i fenols totals (mitjançant el reactiu Folin-Ciocalteu i corba patró amb àcid gàl·lic). Quan es va aplicar el mètode basat en el DPPH també es va realitzar una prova amb oli essencial d'orenga, d'origen comercial, per a realitzar una comparació en ser un conegut oli essencial amb una gran capacitat antioxidant.

Es van obtenir resultats satisfactoris, mostrant la *Mentha longifolia* valors de capacitat antioxidant superiors als de la *Mentha x piperita*.

Amb aquests resultats es podria triar l'ús de *Mentha longifolia* com a antioxidant en aliments per la seva major capacitat antioxidant, mantenint unes bones característiques organolèptiques.

**Paraules clau:** Antioxidant, *Mentha longifolia*, oli essencial, *Mentha x piperita*

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi agradecimiento al director de este trabajo D. Juan Antonio Llorens Molina, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, haber despertado mi interés en los aceites esenciales y por su implicación a la hora de realizar el trabajo ayudando, corrigiendo y supervisando.

A Amparo Quiles Chuliá y Jennifer Alexandra Audrey Borreani por su tiempo dedicado a este trabajo y su ayuda e implicación en la parte de las determinaciones antioxidantes.

A Edu, Carlos, Raquel, Gonzalo, Andrés, Iniesta y Boix por todos los grandes momentos vividos estos años y además de haber sido grandes compañeros se han convertido en una parte importante en mi vida.

A mi padre porque sin él nada de esto sería posible, por haberme dado la oportunidad de seguir estudiando sin ningún tipo de impedimentos y haber estado a mi lado apoyándome cuando más lo he necesitado.

Muchas gracias a todos.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 MORFOLOGÍA.....	1
1.2 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA Y CLIMA .....	1
1.3 USOS TRADICIONALES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA .....	1
1.4 COMPOSICIÓN Y TOXICIDAD .....	1
1.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	2
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>4</b>
2.1 OBJETIVOS.....	4
2.2 PLAN DE TRABAJO .....	4
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>5</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL .....	5
3.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL .....	6
3.2.1 Materiales .....	6
3.2.2 Fundamento.....	6
3.2.3 Metodología .....	6
3.3 COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	7
3.3.1 Materiales .....	7
3.3.2 Fundamento.....	7
3.3.3 Metodología .....	7
3.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	9
3.4.1 ENSAYO DPPH .....	9
3.4.1.1 Materiales: .....	9
3.4.1.2 Fundamento.....	9
3.4.1.3 Metodología .....	10
3.4.2 ENSAYO FRAP .....	11
3.4.2.1 Materiales: .....	11
3.4.2.2 Fundamento.....	11
3.4.2.3 Metodología .....	12
3.4.3 ENSAYO DE FENOLES TOTALES .....	13
3.4.3.1 Materiales: .....	13
3.4.3.2 Fundamento.....	13
3.4.3.3 Metodología .....	14
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>15</b>
4.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL .....	15
4.2 COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	15

<b>4.3 ENSAYO DPPH .....</b>	<b>18</b>
<b>4.4 ENSAYO FRAP .....</b>	<b>20</b>
<b>4.5 ENSAYO DE FENOLES TOTALES .....</b>	<b>20</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>21</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>22</b>

## ÍNDICE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tabla con diferentes remedios tradicionales de la <i>M. longifolia</i> de diferente procedencia. ....	<b>1</b>
<b>Tabla 2.</b> Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de <i>M. longifolia</i> de diferente procedencia .....	<b>2</b>
<b>Tabla 3.</b> Cantidad destilada del aceite esencial de <i>M. longifolia</i> y rendimiento. ....	<b>15</b>
<b>Tabla 4.</b> Composición química del aceite esencial de <i>M. piperita</i> comercial. ....	<b>16</b>
<b>Tabla 5.</b> Composición química del aceite esencial de <i>M. longifolia</i> L.....	<b>17</b>
<b>Tabla 6.</b> Valores de IC50 de los diferentes aceites esenciales. ....	<b>19</b>
<b>Tabla 7.</b> Valores del ensayo FRAP de los aceites esenciales.....	<b>20</b>
<b>Tabla 8.</b> Valores del ensayo de fenoles totales de los aceites esenciales .....	<b>20</b>

## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Menta cultivada en parcela de la Universitat Politècnica de Valencia.....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante. ..	<b>10</b>
<b>Figura 3.</b> Reacción involucrada en el ensayo FRAP.....	<b>11</b>
<b>Figura 4.</b> Reactivo de Folin antes y después de la reacción.....	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> Ácido gálico.....	<b>14</b>
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de captación de DPPH frente a la concentración de AE de <i>M. longifolia</i> . ....	<b>18</b>
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de captación de DPPH frente a la concentración de AE de <i>M. piperita</i> .....	<b>18</b>
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de captación de DPPH frente a la concentración de aceite esencial de orégano.....	<b>19</b>



# 1. Introducción

## 1.1 Morfología

La planta silvestre *Mentha longifolia*, perteneciente a la familia *Lamiaceae*, es una planta perenne variable con aroma a menta. Posee un rizoma rastrero con tallos directos de 40-120 cm de altura. Las hojas son de oblongas-elípticas a lanceoladas, con colores verdes a grisáceos en el haz y blancas en el envés. Las flores tienen 3-5 mm de largo y de colores lilas, violetas o blancas, son producidas en densos racimos en espigas altas ramificadas y afiladas. (Mikaili *et al.*, 2013)

## 1.2 Localización geográfica y clima

La menta silvestre crece extensamente en las regiones de clima mediterráneo, tanto en Europa como en Asia Menor, Australia y el norte de África. (Stanisavljević *et al.*, 2012). Su hábitat corresponde a lugares semi-sombreados en suelos húmedos. (Ahmad *et al.*, 2011)

## 1.3 Usos tradicionales y actividad biológica

Además de sus usos culinarios, las diferentes especies del género *Mentha* también se utilizan en la medicina tradicional. Son principalmente utilizadas para curar trastornos gastrointestinales, pero el espectro de actividades médicas es más amplio (Brahmi *et al.*, 2017). En la *M. longifolia* se utilizan diferentes partes de la planta como las hojas, la flor, el tallo o las semillas. Dependiendo del país la *M. longifolia* es utilizada tradicionalmente para diversos fines medicinales como se puede ver en la tabla 1. (Mikaili *et al.*, 2013)

**Tabla 1.** Tabla con diferentes remedios tradicionales de la *Mentha longifolia* de diferente procedencia.

Enfermedad	Parte de la planta	País
Estreñimiento	Hojas	Jordania
Indigestión	Flores	Irán
Vómitos (antiemético)	Partes aéreas	Grecia
Tos	Flores	Irán
Asma	Partes aéreas	Turquía
Fiebre	Hojas	Jordania
Parásitos (Desparasitación)	Partes aéreas	Turquía
Cálculos renales	Partes aéreas	Grecia
Piedras en el riñón	Partes aéreas	Irán

## 1.4 Composición y toxicidad

La composición del aceite esencial de *M. longifolia* ha sido estudiada con plantas procedentes de diferentes regiones geográficas o de la misma con diferentes quimiotipos mostrando una gran variabilidad en los componentes como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de *M. longifolia* de diferente procedencia

Referencia	País	Componentes mayoritarios (>5%)
<b>Fraisse et al.; 1985; Vidal et al.; 1985</b>	Francia	Quimiotipo 1: Mentona (60%), pulegona (10%), 1,8-cineol (9%) Quimiotipo 2: Isómero de óxido de piperitona (60%), óxido de piperitenona (15%), $\alpha$ -muurolol (6%) Quimiotipo 3: Carvona (57%), 1,8-cineol (13%), limoneno (7%)
<b>Koliopoulos et al., 2010</b>	Grecia	Quimiotipo 1: Carvona (55%), limoneno (20%) Quimiotipo 2: ( <i>Z</i> )-epóxido de piperitona (33%), 1,8-cineol (25%), ( <i>E</i> )-epóxido de piperitona (17%)
<b>Fleisher and Fleisher, 1998</b>	Israel	1,8-cineol (29%), ( <i>Z</i> )-óxido de piperitona (15%), piperitona (14%)
<b>Monfared et al., 2002</b>	Irán	Carvona (62%), limoneno (19%)
<b>Jaimand and Rezaei, 2002</b>	Irán	Piperitona (68%), 1,8-cineol (12%)
<b>Venskutonis, 1996</b>	Lituania	Óxido de piperitenona (44-57%), 1,8-cineol (8-15%), mircenol (6-10%)
<b>Mimica-Dukić et al., 1991</b>	Serbia	Quimiotipo 1: ( <i>E</i> )-Dihidrocarvona (18%), isomentona (12%), piperitona (8%) Quimiotipo 2: Isomentona (42%), mentona (12%) Quimiotipo 3: Mentofurano (38%), 1,8-cineol (10%), ( <i>E</i> )-cariofileno (11%)
<b>Viljoen et al., 2006</b>	Sudáfrica	Mentofurano (51-62%), ( <i>Z</i> )-óxido de piperitona (15-36%), óxido de piperitenona (15-66%)
<b>Gulluce et al., 2007</b>	Turquía	( <i>Z</i> )-Epóxido de piperitona (18%), pulegona (16%), óxido de piperitenona (15%)

La variación estacional, la ubicación geográfica y los factores ambientales (clima, suelo, nutrición, enfermedades) juegan sin duda un papel importante en las diferencias químicas del aceite esencial de *M. longifolia*. (Hussain et al., 2010)

## 1.5 Capacidad antioxidante

La búsqueda de antioxidantes naturales, especialmente en plantas, ha aumentado considerablemente, debido a la posibilidad de causar o promover efectos negativos en la salud. Por este motivo algunas plantas aromáticas han sido ampliamente estudiadas por su intensa actividad antioxidante, entre las que destacan: albahaca, salvia, orégano y menta, lo que ha resultado en el desarrollo de formulaciones de antioxidantes naturales. Las especies reactivas de oxígeno no solo están fuertemente asociadas con la peroxidación de lípidos y el consecuente deterioro de alimentos, sino que también están involucradas en el desarrollo de enfermedades cancerígenas, por lo que el consumo de alimentos con alto contenido de antioxidantes es importante en la prevención de estas, debido a que son compuestos que pueden retrasar o inhibir la

oxidación de lípidos y otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de especies reactivas de oxígeno. (Martínez-Damián *et al.*, 2013). De esta manera la capacidad antioxidante del aceite esencial del quimiotipo de *M. longifolia* caracterizado por su elevado contenido en óxidos de piperitona y piperitenona, se presenta aquí por primera vez para poder estudiar su uso en alimentación.

## 2. Objetivos y plan de trabajo

### 2.1 Objetivos

Los objetivos a lograr con la realización de este trabajo son:

- 1) Caracterizar la composición química del aceite esencial de *Mentha longifolia* (quimiotipo óxido de piperitona + óxido de piperitenona), procedente de una población localizada en Calamocha (Teruel), cultivada en una parcela experimental de la ETSIAMN (UPV).
- 2) Evaluar y comparar la actividad antioxidante de este aceite con el obtenido en un aceite esencial de menta de origen comercial (*Mentha x piperita*) y con aceite esencial de orégano, característico por su elevada actividad antioxidante

### 2.2 Plan de trabajo

El plan de trabajo establecido para el cumplimiento de los objetivos establecidos es el siguiente:

- Recolección del material vegetal *M. longifolia*
- Secado del material vegetal y almacenamiento a -25 °C hasta el momento de la extracción del aceite esencial.
- Obtención del aceite esencial de *M. longifolia* mediante hidrodestilación.
- Análisis de la composición química mediante cromatografía de gases (GC) como método de separación y con detección mediante espectroscopía de masas (EM) para la identificación de los componentes con detector de ionización a la llama (FID) para su cuantificación aproximada.
- Realización de ensayos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), FRAP (TPTZ (2,4,6 tri(2-piridil)-s-triazina)) y fenoles totales (Folin-Ciocalteu) para determinar la capacidad antioxidante.

### 3. Material y métodos

#### 3.1 Material vegetal

Las muestras fueron obtenidas recolectando las partes aéreas seleccionadas al azar de una plantación en las parcelas experimentales de la Universitat Politècnica de Valencia (UPV). Esta recolección se llevó a cabo antes de la floración desechando las hojas y tallos deteriorados. El origen de esta plantación es una población silvestre localizada en Calamocha, (Teruel), concretamente, en la confluencia de los ríos Pancrudo y Jiloca (40° 58' 11.89" N, 1° 8' 49.40" O)



**Figura 1.** *M. longifolia* en la parcela de la Universitat Politècnica de Valencia

## **3.2 Extracción del aceite esencial**

### **3.2.1 Materiales**

- Equipo Clevenger (vidraFOC)
- Manta calefactora (Ibx-Instruments)
- Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A.)
- Matraces balón (vidraFOC)
- Viales (20 mL)
- Parafilm (PARAFILM)
- Bandeja de plástico (Great plastic)
- Embudo
- Algodón
- Guantes (semperguard®)
- Vasos de precipitados (PYREX)

#### **Reactivos:**

- Sulfato de sodio anhidro (Panreac, nº CAS: 7727-73-3)

### **3.2.2 Fundamento**

La hidrodestilación es una técnica de destilación mediante arrastre con vapor de agua. La separación de los componentes más volátiles del material vegetal (que constituyen el aceite esencial) se basa en la aditividad de las presiones de vapor de líquidos inmiscibles, como lo son el agua y los compuestos que forman el aceite esencial. Dado que la ebullición tiene lugar cuando la presión de vapor es igual a la externa (en este caso la atmosférica), al calentar conjuntamente el agua y el material vegetal, los componentes volátiles de éste pueden pasar a estado de vapor a una temperatura notablemente inferior a su temperatura de ebullición como sustancias puras (en torno a la temperatura de ebullición del agua). De este modo, el vapor generado contiene pequeñas cantidades de aceite esencial que al condensar, por su inmiscibilidad, quedan separadas de la fase acuosa (normalmente en la parte superior ya que suelen ser menos densos que el agua) (Barrow, 1972). Prolongando el proceso durante el tiempo necesario (al menos 3 h., es posible extraer de modo prácticamente cuantitativo el aceite esencial).

### **3.2.3 Metodología**

Para realizar la hidrodestilación se emplearon 3 matraces balón en los cuales se introdujeron 400 g divididos en 1 matraz con 200 g y los otros dos con 100 g cada uno. Se le añadió a cada uno agua a razón de 10 mL de agua por gramo de material vegetal aproximadamente.

Una vez terminada la destilación, al cabo de 3 horas, se recogió el aceite esencial en un vial y con una pipeta pasteur se separó el aceite esencial del agua. Se añadió sulfato de sodio anhidro para deshidratar el aceite y se filtró en otro vial para su conservación hasta la determinación de la capacidad antioxidante y el análisis cromatográfico. Se midió la cantidad de aceite destilado total para evaluar el rendimiento del proceso de extracción.

### **3.3 Composición de los aceites esenciales**

#### **3.3.1 Materiales**

- CG/MS (columna apolar ZB-5) (PerkinElmer Inc. Wellesley, EEUU)
- Guantes (semperguard®)

#### **Reactivos:**

- Diclorometano (Scharlau, nº CAS: 75-09-2)

#### **3.3.2 Fundamento**

La cromatografía de gases es un método físico de separación en el que los componentes de una mezcla, previamente volatilizada, se incorpora a una fase móvil gaseosa, de modo que sus diferentes componentes se van desplazando con diferente velocidad a través de una fase estacionaria, produciéndose su separación. De este modo al llegar sucesivamente al detector, pueden medirse los denominados “tiempos de retención”, a partir de los cuales pueden calcularse también los índices de retención referidos a patrones puros de n-alcános. Dichos índices constituyen también una valiosa información complementaria para la identificación de los distintos componentes del aceite esencial. (García-Segura *et al.*, 1996).

Según el tipo de detector empleado, podemos identificar los componentes del aceite esencial o llevar a cabo su cuantificación aproximada. En el primer caso el detector es un espectrómetro de masas (MS), en el segundo, de ionización de llama (FID).

La espectroscopía de masas es una técnica en la que los iones obtenidos de una sustancia (en general orgánica), se separan según su relación masa-carga iónica por impacto electrónico con un haz de electrones a 70 eV, dando lugar al espectro de masas característico de la citada sustancia. En la actualidad, la combinación directa cromatografía de gases-espectrometría de masas se reconoce como uno de los sistemas más eficientes para el estudio de mezclas complejas de productos orgánicos. Conectando la salida de un cromatógrafo de gases a la cámara de ionización de un espectrómetro de masas se puede obtener información estructural para cada uno de los componentes de la mezcla original, a medida que estos son eludidos en serie en la columna cromatográfica (Dabrio *et al.*, 1973). Los espectros de masas obtenidos para cada pico del cromatograma son comparados automáticamente con los registrados en determinadas bases de datos, de manera que a partir de su similitud, pueden identificarse con elevada fiabilidad los componentes correspondientes a cada pico cromatográfico.

#### **3.3.3 Metodología**

Una vez se extrajo el aceite esencial, se prepararon las disoluciones en diclorometano con una concentración de 10 µL/mL para realizar el análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GS/MS). Se utilizó una columna

apolar ZB-5 como sistema de separación (5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano) (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm; Phenomenex Inc., Torrance, EEUU). Como fase móvil se utilizó gas Helio con un caudal de 1,2 mL/min. La temperatura del inyector fue de 250°C, mientras que la temperatura del horno se programó desde 50°C a 250°C a razón de 3°C/min.

Una vez obtenido el cromatograma se llevó a cabo una determinación de la composición química del aceite esencial. Para ello se calcularon los índices de retención de Kovats de cada pico del cromatograma y comparándolos con los de la bibliografía. Para calcular los índices de retención de Kovats se necesitan los tiempos de retención de los patrones n-alcenos y su cromatograma. A partir de este con una hoja de cálculo se puede aplicar la fórmula del índice de Kovats:

$$IK = 100 \times n + 100 \frac{(\log_{10} t_{Rx} - \log_{10} t_{Rn})}{(\log_{10} t_{RN} - \log_{10} t_{Rn})}$$

Donde:

n es el número de átomos de carbono del n-alceno que eluye antes del pico analizado.

$t_{Rx}$  es el tiempo de retención del pico analizado.

$t_{Rn}$  es el tiempo de retención del n-alceno anterior al pico analizado.

$t_{RN}$  es el tiempo de retención del n-alceno posterior al pico analizado.



### **3.4 Evaluación de la capacidad antioxidante**

#### **3.4.1 Ensayo DPPH**

##### **3.4.1.1 Materiales:**

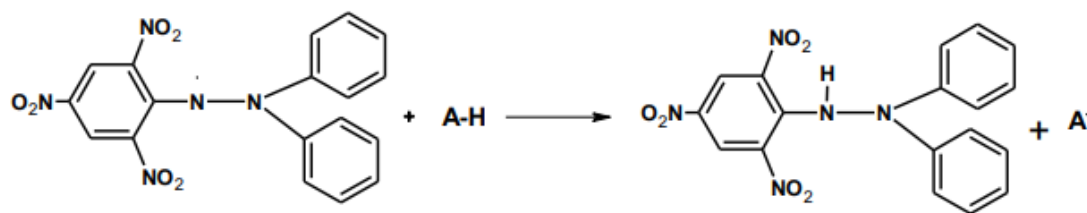
- Espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific Inc., Cambridge, Reino Unido)
- Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A.)
- Vaso de precipitados (PYREX)
- Propipetas (LLG® LABWARE)
- Pipetas (NORMAX)
- Centrifuga
- Guantes (semperguard®)
- Pipeta Pasteur (VWR)
- Tubos de ensayo (PYREX)
- Gradilla (Kartell)
- Matraces aforados (NORMAX)
- Vortex
- Eppendorf
- Espátula (SELECTA)

##### **Reactivos:**

- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Sigma ALDRICH, nº CAS: 1898-66-4)
- Etanol 96% (Sigma ALDRICH, nº CAS: 64-17-5)

##### **3.4.1.2 Fundamento**

El DPPH es conocido como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. (Tovar del río, 2013)



**Figura 2.** Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.

### 3.4.1.3 Metodología

Para determinar la capacidad antioxidante se utilizó el método propuesto por Shah (2016) y se realizó por triplicado. Previo a la determinación se prepararon las muestras realizando una extracción, para ello se tomaron 0.12 g de, los cuales se mezclaron con 1 mL de etanol 96% y fue agitado en vortex, posteriormente estuvieron 10 minutos a 10000 rpm a una temperatura de 4°C en centrifuga. Una vez pasado este tiempo se procedió a recoger el sobrenadante (0.9 mL) y se repitió el proceso añadiendo esta vez 0.9 mL de etanol con la muestra que quedaba en el eppendorf. Se mezclaron los dos sobrenadantes obtenidos y se aforó para 10 mL con etanol 96% obteniéndose la disolución madre. Para poder calcular la IC50 (que es la concentración de muestra que causa el 50% de reducción de DPPH) se realizaron diluciones cogiendo 1 mL, 2 mL y 5 mL de disolución madre y aforando a 10 mL con etanol 96%.

Se añadió en tubos de ensayo 1 mL del extracto y 4 mL de DPPH (40 µg/mL) y se agitó en vortex durante 10 segundos y para que la disolución DPPH reaccionara con el sustrato antioxidante se guardaron durante 30 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Se realizó también una muestra control con 1 mL de etanol 96% y 4 mL de DPPH; y un blanco con 1 mL de extracto y 4 mL etanol 96%. Posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm en un espectrofotómetro.

$$\% \text{ de inhibición de DPPH} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra (extracto)} - \text{Abs blanco}}{\text{Abs control}} \times 100$$

### 3.4.2 Ensayo FRAP

#### 3.4.2.1 Materiales:

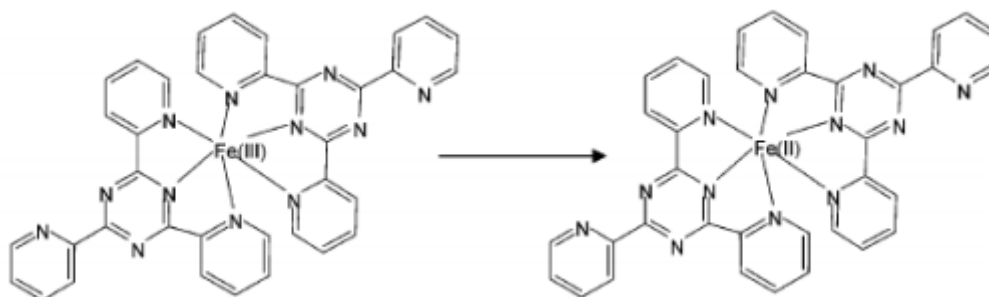
- Espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific Inc., Cambridge, Reino Unido)
- Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A.)
- Vaso de precipitados (PYREX)
- Centrifuga
- Guantes (semperguard®)
- Pipeta Pasteur (VWR)
- Vortex
- Eppendorf
- Baño de agua
- Cubetas
- Espátula (SELECTA)

#### Reactivos:

- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylcroman-2carboxylic acid)
- Tampón acetato sódico anhidro 0,3 M pH 3,6
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  20 mM
- TPTZ (2,4,6 tri(2-piridil)-s-triazina) 10 mM en HCl 40 mM
- Etanol 96%

#### 3.4.2.2 Fundamento

El ensayo FRAP fue desarrollado originalmente por Benzie y Strain (1996) para medir el poder reductor en muestras de plasma, sin embargo, también se ha adaptado y utilizado para el ensayo de antioxidantes en productos botánicos. La reacción mide la reducción del complejo férrico-2,4,6,tripiridil-s-triazina (TPTZ), en la cual el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ) se reduce a ión ferroso a bajo pH, causando la formación de un complejo ferroso-tripiridiltriazina coloreado ( $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ), que absorbe a una longitud de onda de 593 nm. Este ensayo considera la actividad antioxidante de una muestra como una medida de su capacidad reductora del  $\text{Fe}^{3+}$ . (Valenzuela Bustamante, 2015)



**Figura 3.** Reacción involucrada en el ensayo FRAP.

El trolox es un análogo de la  $\alpha$ -tocoferol soluble en agua. Es conocido por su alta capacidad antioxidante 60 y por tanto es utilizado como compuesto de referencia y actividad antioxidante es expresada como equivalentes trolox (Oehlke *et al.*, 2011)

### **3.4.2.3 Metodología**

Se obtuvo el extracto de la misma manera que en el método DPPH. Se siguió el método de Benzie & Strain (1996) con algunas modificaciones. Para la preparación del reactivo FRAP se mezclaron 2.5 mL de Tampón acetato sódico anhidro + 2.5 mL de  $\text{FeCl}_3$  + 2.5 mL de TPTZ y se obtuvo una coloración caramelo que asegura que se ha realizado correctamente. Después de ser mezclado estuvo durante 30 minutos en un baño a 37°C protegido de la luz. Se cogieron cubetas de 1.5 mL y se colocaron 30  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 30  $\mu\text{L}$  de muestra y 900  $\mu\text{L}$  de reactivo FRAP (ferric reducing antioxidant power). Para realizar el blanco se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de etanol en vez de la muestra. Se incubaron las cubetas durante 30 minutos en un baño a 37 °C y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La curva de calibrado se realizó utilizando diferentes concentraciones de Trolox en etanol al 96%.

### **3.4.3 Ensayo de fenoles totales**

#### **3.4.3.1 Materiales:**

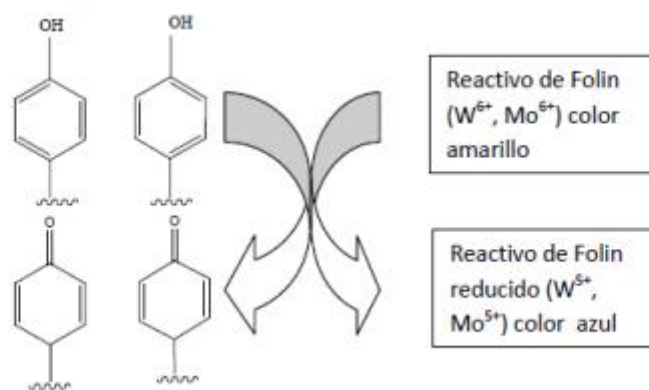
- Espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific Inc., Cambridge, Reino Unido)
- Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A.)
- Vaso de precipitados (PYREX)
- Centrifuga
- Guantes (semperguard®)
- Pipeta Pasteur (VWR)
- Vortex
- Eppendorf
- Gradilla (Kartell)
- Tubos de ensayo (PYREX)
- Parafilm

#### **Reactivos:**

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado (20%)
- Ácido gálico
- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Etanol 96%
- Agua bidestilada

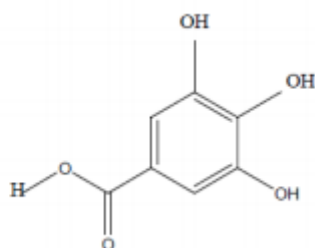
#### **3.4.3.2 Fundamento**

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles.



**Figura 4.** Reactivo de Folin antes y después de la reacción.

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total. La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción. (García Martínez *et al.*, 2015)



**Figura 5.** Ácido gálico

### 3.4.3.3 Metodología

Para la preparación de muestras se repitió el mismo proceso que en DPPH y FRAP, llegando hasta la obtención de la disolución madre. El contenido en fenoles solubles totales (FST) de las muestras se determinó utilizando el método colorimétrico Folin-Denis, según la metodología indicada por Arnal y del Río (2004). En tubos de ensayo se añadieron 1 mL del mismo extracto obtenido en los ensayos anteriores o 1 mL de agua bidestilada para la realización del blanco, 6 mL de agua bidestilada y 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu, se agitaron en vortex brevemente y se guardaron protegidos de la luz 3 minutos. Posteriormente se adicionó 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado (20%) y 1.5 mL de agua bidestilada y se dejó reposar durante 90 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz y también protegido del oxígeno, tapando la boca de cada tubo con parafilm. Tras este tiempo se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 765 nm. La curva de calibrado se realizó utilizando diferentes concentraciones de ácido gálico en etanol 96%.

## 4. Resultados

### 4.1 Extracción del aceite esencial

Se realizó una sola extracción de aceite esencial, en la siguiente tabla se puede apreciar la cantidad destilada y el rendimiento.

**Tabla 3.** Cantidad destilada del aceite esencial de *M. longifolia* y rendimiento.

<b>Destilado (g)</b>	8.18
<b>Rendimiento (%)</b>	2.05

### 4.2 Composición de los aceites esenciales

<sup>1</sup> Compuestos enumerados por orden de elución en una columna cromatográfica ZB-5.

<sup>2</sup> Índices de retención lineales, según corresponde a un programa no isotérmico.

<sup>3</sup> % según normalización de las áreas de los picos en el cromatograma obtenido con detector de ionización de llama (FID), sin aplicar factores de respuesta.

<sup>4</sup> % < 0.1 son indicados como trazas (tr)

**Tabla 4.** Composición química del aceite esencial de *Mentha x piperita* comercial.

**Mentha x piperita (Peppermint Oil, Shoker (Sigma-Aldrich™))**

<sup>1</sup> Compuesto	<sup>2</sup> LRI exp	<sup>3</sup> % (FID)
$\alpha$ -Tuyeno	924	<sup>4</sup> tr
$\alpha$ -Pineno	931	0.3
Sabineno	970	0.1
$\beta$ -pinene	973	0.4
Octen-3-ol	976	tr
Mirceno	989	tr
3-octanol	993	0.1
<i>p</i> -Cimeno	1021	0.2
Limoneno	1026	0.7
1,8-Cineol	1027	4.3
( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno	1035	tr
$\gamma$ -terpineno	1055	0.1
( <i>Z</i> )-sabineno hidrato	1063	0.8
Isoterpinoleno	1085	tr
Linalool	1097	0.1
2-metilbutanoato de isoamilo	1101	tr
Isovalerato de amilo	1106	tr
Mentona	1151	20.5
Mentofurano	1160	5.2
Neomentol	1161	3.1
Mentol	1173	51.8
Terpinen-4-ol	1175	0.7
Isomentol	1180	0.6
Neoisomentol	1185	0.1
$\alpha$ -Terpineol	1187	0.2
Pulegona	1234	0.8
Piperitona	1248	0.3
Acetato de neomentilo	1271	0.2
Acetato de mentilo	1290	6.6
Acetato de isomentilo	1303	0.2
$\alpha$ -Bourboneno	1379	0.2
$\beta$ -Cariofileno	1414	1.5
$\beta$ -Farneseno	1452	tr
Germacreno-D	1476	0.4
$\beta$ -Selinene	1491	0.1
<b>Total identificado</b>		<b>99.7</b>

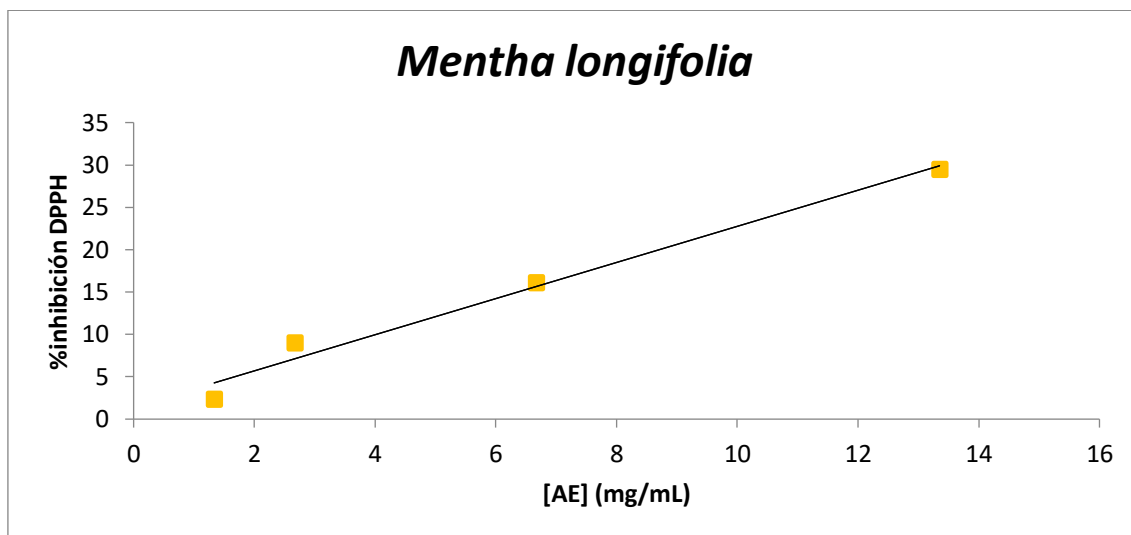


**Tabla 5.** Composición química del aceite esencial de *M. longifolia* L**Mentha longifolia L (quimiotipo óxido de piperitona + óxido de piperitenona)**

<sup>1</sup> Compuesto	<sup>2</sup> LRI exp	<sup>3</sup> % (FID)
$\alpha$ -Pineno	930	0.2
Sabineno	969	2.6
$\beta$ -Pineno	974	0.7
Mirceno	988	0.8
3-octanol	997	0.5
Limoneno	1027	0.9
1,8-Cineol	1030	4.8
(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1035	1.5
(E)- $\beta$ -Ocimeno	1045	0.2
$\gamma$ -Terpineno	1056	0.1
2-Metilbutanoato de isopentilo	1101	0.2
Linalool	1108	0.1
Acetato de 3-octilo	1121	0.2
Dihidrolinalool	1138	0.1
Neomentol	1158	<sup>4</sup> tr
$\delta$ -Terpineol	1168	0.3
Terpinen-4-ol	1177	0.1
$\alpha$ -Terpineol	1192	0.9
Pulegona	1236	0.1
Óxido de piperitona	1247	35.8
Óxido de carvona	1266	0.1
Diosphenol	1293	1.2
Carvotanacetona	1297	0.6
Piperitenona	1333	0.2
Óxido de piperitenona	1359	39.5
$\beta$ -Bourboneno	1387	0.1
$\beta$ -Elemeno	1390	0.7
$\beta$ -Cariofileno	1407	5.0
Muurolo-3,5-dieno	1447	0.3
(E)- $\beta$ -farneseno	1461	tr
Germacreno-D	1473	1.3
Biclogermacreno	1487	0.1
$\gamma$ -Cadineno	1512	0.1
Germacrene-D-4-ol	1568	0.3
epi- $\alpha$ -Muurolool	1648	tr
<b>Total identificado</b>		<b>98.1</b>

### 4.3 Ensayo DPPH

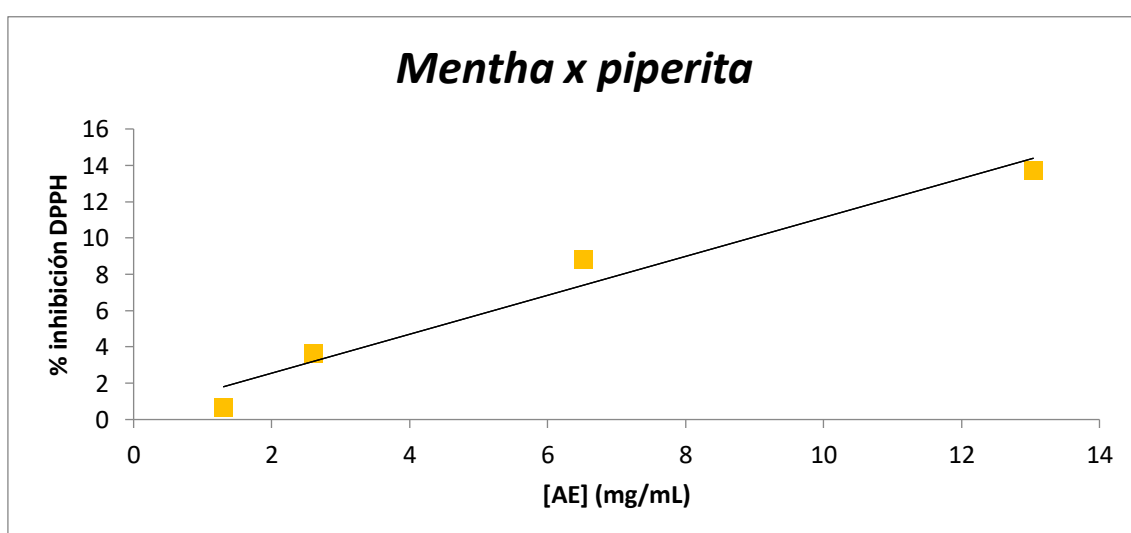
Se muestran las gráficas respectivas a los ensayos DPPH de las muestras de *M. longifolia* y *M. piperita* así como su ecuación de la recta lineal.



**Figura 6.** Porcentaje de captación de DPPH frente a la concentración de AE de *M. longifolia*.

**Ecuación *Mentha longifolia*:**

$$\% \text{ Inhibición} = 2.1321 [\text{AE}] + 1.4316$$

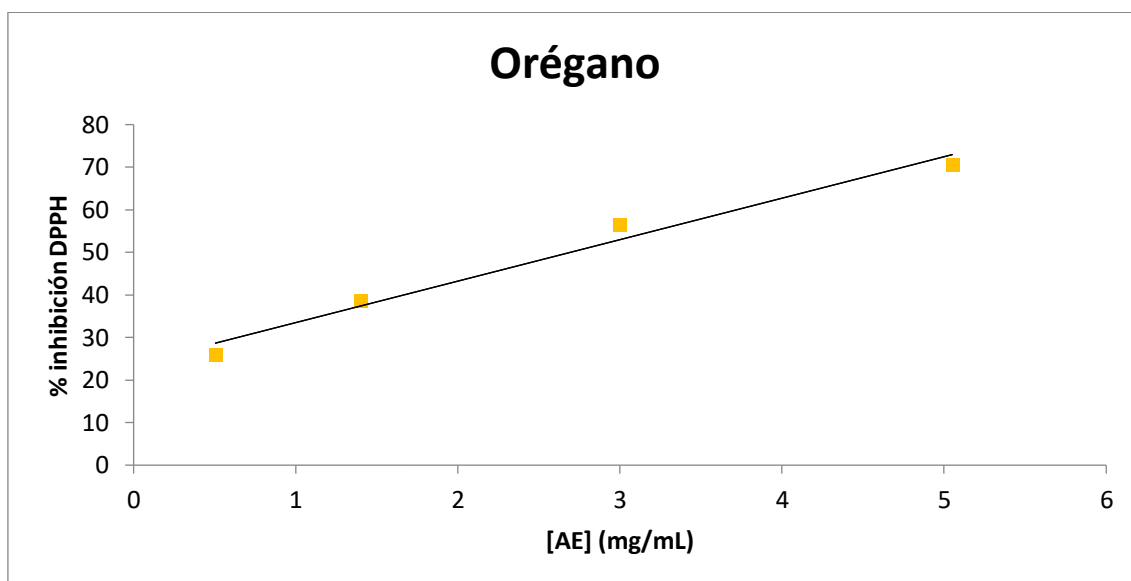


**Figura 7.** Porcentaje de captación de DPPH frente a la concentración de AE de *M. piperita*

**Ecuación *Mentha x piperita*:**

$$\% \text{ inhibición} = 1,0719 [\text{AE}] + 0,409$$

Además de las muestras de *M. longifolia* y *M. piperita* también se estudió mediante el ensayo DPPH una muestra de aceite esencial de orégano de origen comercial, a modo de referencia, debido a que es un conocido antioxidante.



**Figura 8.** Porcentaje de captación de DPPH frente a la concentración de aceite esencial de orégano

**Ecuación orégano:**

$$\% \text{ inhibición} = 9.7417 [\text{AE}] + 23.747$$

Si se calcula el coeficiente de correlación de Pearson, el cual mide el grado de asociación lineal entre dos variables a partir de calcular la raíz cuadrada de  $R^2$ . Se obtienen valores de este coeficiente de 0.991 para *M. longifolia* y 0.980 para *M. piperita*, lo que indica una correlación positiva entre las dos variables analizadas. 0.978 para orégano.

Los resultados se expresan como el IC50, que como se ha indicado antes es la concentración de muestra que causa el 50% de reducción de DPPH. Este valor se consigue a partir de la ecuación de la recta lineal igualando la ecuación al 50% de inhibición de DPPH. Por lo tanto cuanto menor sea el valor de IC50 más capacidad antioxidante tendrá el aceite esencial. En la siguiente tabla se pueden ver los valores de IC50 para los tres aceites esenciales.

**Tabla 6.** Valores de IC50 de los diferentes aceites esenciales.

Aceite esencial	IC50 (mg/mL)
<i>Mentha longifolia</i>	23 ± 2
<i>Mentha x piperita</i>	46 ± 4
Orégano	3 ± 0

#### 4.4 Ensayo FRAP

Los resultados del ensayo FRAP se muestran en la siguiente tabla expresados en  $\mu\text{mol}$  de trolox por gramo de aceite.

**Tabla 7.** Valores del ensayo FRAP de los aceites esenciales

<b>Aceite esencial</b>	<b><math>\mu\text{mol}</math> de trolox/g aceite</b>
<i>Mentha longifolia</i>	$57 \pm 5$
<i>Mentha x piperita</i>	$44 \pm 2$

#### 4.5 Ensayo de fenoles totales

Los resultados del ensayo de la determinación de fenoles totales están expresados en la siguiente tabla como  $\text{mg}$  de ácido gálico por gramo de aceite.

**Tabla 8.** Valores del ensayo de fenoles totales de los aceites esenciales

<b>Aceite esencial</b>	<b><math>\text{mg}</math> ácido gálico/g aceite</b>
<i>Mentha longifolia</i>	$6 \pm 1$
<i>Mentha x piperita</i>	$3 \pm 0$

## 5. CONCLUSIONES

- 1) La composición química del aceite esencial de *M. longifolia* cuya actividad antioxidante ha sido evaluada en este trabajo corresponde a un quimiotipo descrito ampliamente en la bibliografía. Cabe destacar que el material vegetal del que se ha extraído el aceite esencial proviene de una selección previa realizada mediante *screening* por cromatografía en capa fina de los individuos procedentes de la población silvestre citada. Ello permite disponer de quimiotipos mucho mejor definidos, susceptibles de una adecuada estandarización.
- 2) Los diferentes métodos utilizados en la evaluación de la actividad antioxidante son coherentes en cuanto a sus resultados, observándose una actividad claramente mayor en la *M. longifolia*. A la vista de las composiciones de ambos aceites, la diferencia puede ser atribuida a la presencia de los componentes mayoritarios: óxidos de piperitona y piperitenona, frente al mentol y sus derivados, característicos de la *M. piperita*.
- 3) Es muy acusada la diferencia de actividad antioxidante con respecto al aceite de orégano. No obstante, las cualidades sensoriales del aceite de *M. longifolia* podrían aconsejar su uso, teniendo en cuenta además que habría que considerar su actividad antifúngica y antimicrobiana, para evaluar de un modo global su potencial utilidad en la conservación de alimentos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

AHMAD, I., AHMAD, M.S.A., ASHRAF, M., HUSSAIN, M., ASHRAF, M.Y. 2011. *Seasonal variation in some medicinal and biochemical ingredients in Mentha Longifolia (L.) huds.* Pak. J. Bot., 43: 69-77, Special Issue, December, 2011

BARROW, G.M. (1985). *Química Física*. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, 491 pp.

BRAHMI, F., KHODIR, M., MOHAMED, C. Y PIERRE, M. (March 15th 2017). *Chemical Composition and Biological Activities of Mentha Species, Aromatic and Medicinal Plants*. Hany El-Shemy, IntechOpen, DOI: 10.5772/67291.

DABRIO, M.V., ALBAIGUÉS, J., CLEMENTE, A.E., GASCÓ, L., GARCÍA, J.A., GELPÍ, E. y MARTÍNEZ R. (1973). *Cromatografía de gases* (vol. II) Ed. ALHAMBRA. 223 pp.

FLEISHER, Z. AND A. FLEISHER. 1998. *Volatile extracts of Mentha longifolia growing in Israel*. Aromatic plants of the Holy Land and Sinai. Part XIII. J. Essent. Oil Res. 10:647-648.

FRAISSE, K.N., C. SUON, M.G. SCHARFF, G. VERNIN, R.M. ZAMKOTSIAN, AND J. METZGER. 1985. *Huiles essentielles de menthe crépue*. Parf. Cosm. Aromes 65: 71-75.

GARCÍA MARTÍNEZ, E. M., SEGOVIA, I. F., & LÓPEZ, A. F. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*.

GARCÍA-SEGURA, J.M., GAVILANES, J.G., MARTÍNEZ DEL POZO, A., MONTERO, F., OÑADERRA, M. Y VIVANCO F. (1996). *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. Ed. SÍNTESIS, SA. Madrid. 398 pp.

GULLUCE, M., F. SAHIN, M. SOKMEN, H. OZER, D. DAFERERA, A. SOKMEN, M. POLISSIOU, A. ADIGUZEL, AND H. OZKAN. 2007. *Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia*. Food Chem. 103:1449-1456

HUSSAIN, A.I., F. ANWAR, P. S.NIGAM, M. ASHRAF, AND A.H. GILANI. 2010. *Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four Mentha species*. J. Sci. Food Agric. 90:1827-1836.

JAIMAND, K. AND M.B. REZAEI. 2002. *Chemical constituents of essential oils from Mentha Sharopov et al.: Essential oil composition of Mentha longifolia from wild populati 83 longifolia (L.) Hudson var. asiatica (Boriss.) Rech. f. from Iran*. J. Essent. Oil Res. 14:107- 108.

KOLIOPOULOS G., D. PITAROKILI, E. KIOULOS, A. MICHAELAKIS, AND O. TZAKOU. 2010. *Chemical composition and larvicidal evaluation of Mentha, Salvia, and Melissa essential oils against the West Nile virus mosquito Culex pipiens*. Parasitol. Res. 107:327-335.

MARTÍNEZ-DAMIÁN, M.T., CRUZ-ÁLVAREZ, O., BERYL COLINAS-LEÓN, M.T., RODRÍGUEZ-PÉREZ, J.E. Y RAMÍREZ-RAMÍREZ, S.P. 2013. *Actividad enzimática y capacidad antioxidante en menta (Menta piperita L.) almacenada bajo refrigeración. AGRONOMÍA MESOAMERICANA*, 24 (1): 57-69.

MIKAILI P, MOJAVERROSTAMI S, MOLOUDIZARGARI M, AGHAJANSHAKERI S. *Pharmacological and therapeutic effects of Mentha Longifolia L. and its main constituent, menthol. Ancient Science of Life*. 2013; 33(2):131-138.

MIMICA-DUKIĆ, N., O. GASIĆ, G. KITE, L. FELLOW, AND R. JANCIĆ. 1991. *A study of the essential oil of Mentha longifolia growing in Yugoslavia. Planta Med.* 57:83-84.

MKADDEM, M., J. BOUJILA, M. ENNAJAR, A. LEBRIHI, F. MATHIEU, AND M. ROMDHANE. 2009. *Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of Mentha (longifolia L. and viridis) essential oils. J. Food Sci.* 74:358-363.

MONFARED, A., M.R. NABID, AND A.A.H. ROUSTAEIAN. 2002. *Composition of a carvone chemotype of Mentha longifolia (L.) Huds. from Iran. J. Essent. Oil Res.* 14:51-52.

OEHLKE, K., STEFFEN-HEINS, A., STÖCKMANN, H., SÖNNICHSEN, F., SCHWARZ, K. (2011). New insights into the antioxidant activity of Trolox in o/w emulsions. *Food Chemistry - FOOD CHEM.* 124. 781-787. 10.1016/j.foodchem.2010.06.095.

STANISAVLJEVIĆ D, ĐORĐEVIĆ S, MILENKOVIĆ M, LAZIĆ M, VELIČKOVIĆ D, RANDELOVIĆ N, ZLATKOVIĆ B. Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oils Obtained from Mentha longifolia L. Hudson, Dried by Three Different Techniques. *Rec Nat Prod.* 2014:61–65.

TOVAR DEL RÍO, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la Ecoregión cafetera.* Trabajo de grado. Universidad Tecnológica de Pereira, 150 pp.

VALENZUELA-BUSTAMANTE, P. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de Ugni molinae Turcz., 83.

VENSKUTONIS, R. 1996. *A chemotype of Mentha longifolia L from Lithuania rich in piperitenone oxide. J. Essent. Oil Res.* 8:91-95.

VIDAL, J.P., I. NOLEAU, G. BERTHOLON, J. LAMY, AND H. RICHARD. 1985. *Constituants volatils des huiles essentielles de Menthes sylvestres de la Drôme. Parf. Cosm. Aromes* 64:83-87.

VILJOEN, A.M., S. PETKAR, S.F. VAN VUUREN, AND A.C. FIGUEIREDO. 2006. *The chemo-geographical variation in essential oil composition and the antimicrobial properties of "wild mint" – Mentha longifolia subsp. Polyadena (Lamiaceae) in southern Africa. J. Essent. Oil Res.* 18:60-65.