



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



TRABAJO RECEPCIONAL
BAJO LA MODALIDAD DE TESIS
TITULADO

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIDIABÉTICA *in vitro*
DE HOJAS DE OROZÚ (*Lippia dulcis* T.) COMO ALTERNATIVA DE
EDULCORANTE NATURAL**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS

QUE PRESENTA

JOSÉ ENRIQUE GALLEGOS CASTILLO

DIRECTOR

Dra. ARELI CARRERA LANESTOSA

CODIRECTOR

Dr. JUAN GUZMÁN CEFERINO

VILLAHERMOSA, TAB.

Mayo de 2023



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División Académica de
Ciencias Agropecuarias

Coordinación de
Estudios Terminales



Asunto: Autorización de impresión
de Trabajo Recepcional.
Fecha: 17 de abril de 2023.

**LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y
TITULACIÓN DE LA UJAT.
PRESENTE**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado(a), informo a usted que con base en el artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, la Dirección a mi cargo **autoriza** al (la) **C. José Enrique Gallegos Castillo**, con **matrícula 162C14003**, egresado(a) de la Licenciatura de **Ingeniería en Alimentos** de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, **la impresión de su Trabajo Recepcional** bajo la modalidad de **Tesis**, titulado: **" EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIDIABETICA *in vitro* DE HOJAS DE OROZÜ (Lippia dulcis T.) COMO ALTERNATIVA DE ENDULCORANTE NATURAL"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**M.V.Z. JORGE ALFREDO THOMAS TELLEZ
DIRECTOR**

U.J.A.T.



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS
DIRECCIÓN

C.C.P. Archivo.

Km 25, Carret. Villahermosa-Teapa
Ra. La Huasteca, 2ª Sección, 86298, Centro, Tabasco, México
Tel. (+52 993) 3581500 ext. 6614
Correo electrónico: terminales.daca@ujat.mx

www.ujat.mx

CARTA DE CEDE DE DERECHO

El que se suscribe, Jose Enrique Gallegos Castillo del programa de estudios de Ingeniería en Alimentos, con numero de matricula 162C14003, adscrito a la División Académica de Ciencias Agropecuarias, manifestó ser autor intelectual y titular de los Derechos de Autor del presente Trabajo de Tesis denominada **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIDIABÉTICA *in vitro* DE HOJAS DE OROZÚ (*Lippia dulcis* T.) COMO ALTERNATIVA DE EDULCORANTE NATURAL “**, y autorizo a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice el siguiente trabajo con fines académicos y de investigación ya sea de forma física o digital para su difusión y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la red abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que se pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 24 días del mes de abril del año 2023

ATENTAMENTE

Jose Enrique Gallegos Castillo

162C14003

AGRADECIMIENTOS

Principalmente doy gracias a dios por permitir llevarme una grata experiencia dentro de la universidad, por darme la fortaleza y la salud para concluir mis estudios.

A MIS PADRES

Martin Gallegos Alegría y Norma Alicia Castillo Barrueta por su gran apoyo incondicional durante mi formación académica, por fomentar un buen ejemplo, orientarme para tomar buenas decisiones en la vida y ser los pilares durante mi educación.

A MIS HERMANOS

Diana, Luis y Gustavo por apoyarme y aconsejarme para lograr esta meta, por los ánimos que me dieron cuando sentía no poder más y alentarme a cumplir mis sueños.

A UNA PERSONA ESPECIAL

Laura Gabriela Que Vázquez, por su amor incondicional, comprensión, cariño, consejos, por apoyarme durante la realización de este proyecto y por lo feliz que estoy de tenerla como compañera de vida.

A MI COMPAÑERA Y AMIGA

Mildred por su apoyo y consejos, siendo un orgullo para mi el haber trabajado con ella durante la carrera, DIOS la bendiga.

A MIS ASESORES DE TESIS

Dra. Areli Carrera Lanestosa y Dr. Juan Guzmán Ceferino por guiarme sabiamente durante la realización de este proyecto, porque apesar de las dificultades de la pandemia, hicieron lo necesario para concluir con este compromiso y lograr mi titulación, DIOS los bendiga.

Este trabajo de tesis fue realizado en el **Laboratorio de Biotecnología de Alimentos** ubicado dentro del **Centro de Investigación de Ciencias Agropecuarias (CICA)**, bajo la Dirección de la Dra. Areli Carrera Lanestosa y el Dr. Juan Guzmán Ceferino. Fue financiado por el **Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Tabasco (CCYTET)**, a través del proyecto denominado **“Evaluación de la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* de plantas medicinales tradicionales cultivadas en Tabasco, México.”** Con clave de registro **“PRODECTI-2020-01/018”**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLA.....	V
RESUMEN.....	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Plantas medicinales en México.....	3
2.2 Enfermedades tratadas con plantas.....	4
2.2.1 Familia Verbenaceae.....	4
2.3 Edulcorantes naturales.....	5
2.4 Capacidad antioxidante.....	6
2.5 Actividad antidiabética.....	7
2.6 Alimentos nutraceuticos.....	9
III. OBJETIVOS.....	10
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4.1 Colecta y preparación de la planta.....	11
4.2 Procedimiento de extracción.....	11
4.3 Determinación de polifenoles totales.....	12
4.4 Determinación de la capacidad antioxidante.....	12
4.4.1 Ensayo DPPH.....	12
4.4.2 Ensayo ABTS.....	13
4.4.3 Ensayo FRAP.....	14
4.5 Determinación de la capacidad antidiabética.....	14
4.5.1 Ensayo de inhibición de la actividad de la α -amilasa.....	14
V. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	16
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	17
6.1 Determinación de polifenoles totales.....	17
6.2 Determinación de la capacidad antioxidante.....	18
6.2.1 Ensayo DPPH.....	18
6.2.2 Ensayo ABTS.....	20
6.2.3 Ensayo FRAP.....	21

6.3 Determinación de capacidad antidiabética	23
6.3.1 Ensayo de inhibición de la actividad de la α -amilasa	23
VII. CONCLUSIONES.....	25
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Contenido de polifenoles totales en extractos acuosos (EA), etanólicos (EE) e hidroalcolicos (EH) de hojas de *L. dulcis* T. como alternativa de edulcorante natural. Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).....14
- Figura 2.** Efecto de la captura del radical DPPH en extractos acuosos (EA), etanólicos (EE) e hidroalcolicos (EH) de hojas de *L. dulcis* T. como alternativa de edulcorante natural. Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).....16
- Figura 3.** Actividad antioxidante por método ABTS en extractos acuosos (EA), etanólicos (EE) e hidroalcolicos (EH) de hojas de *L. dulcis* T. como alternativa de edulcorante natural. Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).....17
- Figura 4.** Actividad antioxidante por método FRAP en extractos acuosos (EA), etanólicos (EE) e hidroalcolicos (EH) de hojas de *L. dulcis* T. como alternativa de edulcorante natural. Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).....18
- Figura 5.** Porcentaje de inhibición de α -amilasa en extractos acuosos (EA), etanólicos (EE) e hidroalcolicos (EH) de hojas de *L. dulcis* T. como alternativa de edulcorante natural. Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).....19

ÍNDICE DE TABLA

TABLA 1. Tratamientos empleados.....	14
--------------------------------------	----

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

RESUMEN

Lippia dulcis Trev. (*L. dulcis* T.) conocida como Orozú o hierba dulce, es una especie vegetal perteneciente a la familia *Verbenaceae*, originaria de México y Centroamérica. Esta planta ha tomado elevada importancia por su característica de dulzura, así como por sus propiedades terapéuticas contra diversos padecimientos como enfermedades respiratorias, gastrointestinales y como coadyuvante al control de la diabetes mellitus (DM) (Masateru et al., 2005). La búsqueda de compuestos bioactivos naturales de baja toxicidad y que presenten capacidades antioxidantes e inhibidoras de enzimas metabólicas han ganado protagonismo en el control y tratamiento de la DM y sus complicaciones, en comparación con los compuestos sintéticos (Justino et al., 2018). Diversas plantas alrededor del mundo han sido probadas por su utilidad en tratar y controlar la DM en todo el mundo, y se han aislado varios fitoquímicos de plantas medicinales que exhiben actividad antidiabética incluso más potente que drogas utilizadas actualmente (Boston et al., 2020). Para conocer la capacidad antioxidante y antidiabética *in vitro* de los extractos de hojas de *L. dulcis* T, cultivadas en Tabasco, se llevaron a cabo tres métodos de técnicas antioxidantes: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y Poder Reductor Antioxidante Férrico (FRAP); así como una técnica antidiabética: Inhibición de la actividad de la α -amilasa. Se realizaron tres extractos de hojas de *L. dulcis* T: EA (extracto acuoso), EE (extracto etanólico), y EH (extracto hidroalcohólico) y fueron evaluados por triplicado encontrándose los siguientes resultados: Los tres extractos evaluados muestran una fuerte actividad antioxidante obteniendo el EA y el EE un 74 y 73 %, respectivamente con el método DPPH, con los otros dos métodos la capacidad antioxidante fue similar en los tres tipos de extractos evaluados a una misma concentración, no presentando diferencias estadísticas mínimas significativas ($P < 0.05$). Por otro lado, los resultados encontrados en la evaluación de la inhibición de la enzima amilolítica α -amilasa, se encontró que el extracto etanólico mostró un mayor porcentaje de inhibición (70.65 %), en comparación a los otros dos extractos evaluados, los cuales obtuvieron resultados de 55.2 y 50.77 %, respectivamente a

una misma concentración. Con los resultados descritos de *L. dulcis* T revelados en este estudio, esta planta originaria de México podría ser una alternativa válida como edulcorante natural debido a su capacidad endulzante, así como coadyuvante terapéutico en pacientes con envejecimiento prematuro y DM.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe un creciente interés por la medicina tradicional dada su probada evidencia para contrarrestar padecimientos y enfermedades que afectan a los seres humanos. Según la OMS, el 80-85 % de la población mundial (más de cuatro mil millones de personas), utiliza las plantas como principal remedio medicinal. Esta práctica está asociada al empirismo en muchos casos y faltan estudios químicos, clínicos y epidemiológicos que confirmen de forma fehaciente los efectos fisiológicos de las plantas y los principios activos responsables (Escalona, 2015; Espinosa-Moreno et al., 2017).

En los países en vías de desarrollo la medicina tradicional sobrevive de una forma más auténtica y esto facilita la identificación de especies vegetales que necesitan ser científicamente evaluadas. La distancia entre la medicina tradicional y la ortodoxa empieza a acortarse y no se considera la primera como un obstáculo del progreso científico, que avala el uso de las plantas, sus extractos o sus compuestos activos contra diversas enfermedades como la diabetes, hipertensión y cáncer, o con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antimicóticas, antiprotozoarias, relajantes y sedativas (Escalona, 2015).

México es uno de los países de América con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria medicinal, donde se registran poco más de 3,000 especies que se emplean en remedios naturales y que tienen un potencial terapéutico; sin embargo, solo aproximadamente el 1% de las plantas medicinales han sido estudiadas a fondo en sus propiedades medicinales (Molina-Mendoza et al., 2012).

Lippia dulcis Trev. (*L. dulcis* T.) conocida como Orozú o hierba dulce, es una especie vegetal perteneciente a la familia *Verbenaceae*, originaria de México y Centroamérica. Esta planta ha sido de gran importancia debido a sus reconocidas propiedades medicinales contra enfermedades respiratorias, gastrointestinales y como coadyuvante al control de la *Diabetes Mellitus* (DM) (Masateru et al., 2005).

La búsqueda de compuestos bioactivos naturales de baja toxicidad y que presenten capacidades antioxidantes y actividades inhibitoras de enzimas metabólicas han ganado protagonismo en el control y tratamiento de la DM y sus complicaciones, en comparación con los compuestos sintéticos (Justino et al., 2018). Las revisiones de la literatura revelan que numerosas plantas han sido probadas por su utilidad en tratar y controlar la DM en todo el mundo, y se han aislado varios fitoquímicos de plantas medicinales que exhiben actividad antidiabética incluso más potente que drogas utilizadas actualmente (Boston et al., 2020).

Debido a la necesidad de edulcorantes naturales y la importancia de estos en la alimentación de los pacientes diabéticos, se llevará a cabo el estudio de las hojas de la planta medicinal tradicional conocida como Orozú (*L. dulcis* T.) en virtud de esclarecer el posible beneficio medicinal de esta planta. Es por ello que en el presente estudio se evaluará la actividad antioxidante y la actividad antidiabética *in vitro* de los extractos acuosos, etanólicos e hidroalcohólicos de hojas de *L. dulcis* T.

II. ANTECEDENTES

2.1 Plantas medicinales en México

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que sintetizan de manera secundaria algunos compuestos activos, los cuales son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento para aliviar la enfermedad o restablecer la salud perdida; es decir, que tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad (Muñoz, 1996).

Según la OMS, los medicamentos herbarios pueden ser obtenidos mediante las hierbas, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, estos contienen principios activos en diversas partes de plantas y su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz. Las plantas medicinales continúan formando parte de una compleja estructura médica local; cuyos conocimientos, técnicas terapéuticas y tratamientos especializados se encuentran actualmente vigentes (Urióstegui-Flores, 2015).

El uso de plantas medicinales para curar algunos malestares de la salud es una práctica muy común en muchos países. En México, los conocimientos sobre herbolaria se han transmitido en la población, principalmente de generación en generación (Muñetón, 2009).

México es uno de los países donde la medicina tradicional aún está presente en todos los niveles culturales; tan solo en el mercado Sonora de la Ciudad de México se venden día con día aproximadamente unas 10 toneladas de plantas curativas. Se estima que la industria herbolaria de la ciudad de México procesa y comercializa unas 2000 toneladas mensuales. Si consideramos los demás mercados de todas las capitales, los mercados regionales, y las empresas naturistas de provincia, se calcula que al menos se comercializan 3500 toneladas de plantas medicinales al mes en todo el país (Muñetón, 2009).

2.2 Enfermedades tratadas con plantas

Trabajos recientes han logrado determinar que los extractos de plantas contienen compuestos bioactivos o metabolitos secundarios que poseen actividad farmacológica y propiedades terapéuticas importantes para el tratamiento de diversas enfermedades gastrointestinales, dérmicas, del sistema nervioso central, hipertensión, cáncer, DM, etc. (Esquivel-Gutiérrez et al., 2012).

Para controlar enfermedades crónico degenerativas como la DM se ha utilizado constantemente la caña agria (*Costus villosissimus*), Stevia (*Stevia rebaudiana*), Orozú (*Lippia dulcis* T.), entre otras. Estudios similares sostienen que las plantas medicinales o sus extractos pueden optimizar el metabolismo de la glucosa y la condición integral de los diabéticos, no solo por sus efectos hipoglucemiantes sino también al mejorar el perfil lipídico (Gutiérrez et al., 2013).

Para curar enfermedades como el cáncer, se utiliza la guanábana (*Annona muricata*), la col (*Brassica oleracea*) y el noni (*Morinda citrifolia* L.) (Gutiérrez et al., 2013).

Las enfermedades hiperlipidémicas como del colesterol y triglicéridos son aliviados principalmente con linaza (*Linum usitatissimum* L.), fruta de pan (*Artocarpus altalis*), pepino (*Cucumis sativus*), apio (*Apium graveolens*), albahaca (*Ocimum basilicum*), verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), mastranto (*Lippia alba*), sábila (*Aloe vera*); propiedades similares de estas plantas se han detectado en otros estudios realizados en Colombia (Gallegos-Zurita, 2016).

2.2.1 Familia Verbenaceae

La familia botánica de las *Verbenaceae* es una que incluye varias especies de valor medicinal, seis de ellas se encuentran incluidas en la relación de especies de uso terapéutico popular de la Farmacopea Herbolaria los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM): *Aloysia triphylla* Royle (Té cedrón), *Lantana camara* L. (Cinco negritos),

Verbena bipinnatifida Nutt. (Moradilla), *Verbena carolina* L. (Verbena), *Verbena litoralis* Kunth (Verbena) y *Lippia dulcis* Trev. (Hierba dulce) (Calzada-Sánchez et al., 2014).

L. dulcis T., conocida como Orozú o hierba dulce, es una especie vegetal perteneciente a la familia *Verbenaceae*, originaria de México y Centroamérica. Esta planta ha sido de gran importancia ya que además de sus reconocidas propiedades medicinales contra enfermedades respiratorias, metabólicas y gastrointestinales (García, 2004). Contiene diversos compuestos fenólicos, taninos y flavonoides de distintos tipos (Masateru et al., 2005).

Sánchez, (2016) también reportó, que “*hierba dulce*” además de su uso medicinal tradicional en México, Caribe, Colombia y Venezuela; es además utilizada como edulcorante natural, debido al sabor dulce de sus hojas. Describió que *L. dulcis* T. una planta herbácea perenne, erecta o decumbente, de unos 40-60 cm de altura, con hojas de rómbico-ovadas a lanceoladas, de 2-5 (- 7) x 0,7-2 (-4) cm, cuneadas en la base, agudas o acuminadas en el ápice y con el margen crenado-aserrado, rugosas por el haz y tomentosas por el envés, membranáceas, aromáticas al estrujarlas y con sabor dulzón al masticarlas. Las flores son blancas, muy pequeñas, y se disponen sobre cabezuelas ovoides o cilíndricas de hasta 30 x 3 mm, en el extremo de pedúnculos solitarios, axilares, de 1-5 cm de longitud.

2.3 Edulcorantes naturales

Los edulcorantes son constituyentes comunes de los alimentos, estos pueden ser de naturaleza sintética o natural. El edulcorante ideal debe poseer como características un alto grado edulcorante, sabor agradable sin gusto amargo, sin color ni olor, solubilizarse rápidamente, ser estable, funcional y económico, no ser tóxico, no provocar caries dentales y ser metabolizado o excretado normalmente (Giannuzzi y Molina, 1995).

Los edulcorantes pueden clasificarse como edulcorantes calóricos y de bajas

calorías; los edulcorantes calóricos son aquellos que realizan un aporte energético al metabolismo como la sacarosa y fructosa y entre los edulcorantes de bajas calorías se puede encontrar a la sacarina, aspartame, acesulfame de potasio y el ciclamato (Alonso, 2010). Otra forma de clasificarlos es tomando en cuenta su origen; es decir, entre edulcorantes sintéticos y edulcorantes naturales, pudiendo encontrarse entre los primeros a la sacarina, el aspartamo, el ciclamato y el acesulfamo-K y dentro de los edulcorantes naturales están las taumatina, monelina, miraculina, esteviósidos, brazzeína, Neohesperidina, dihidrochalcona, glicirricina, Xilitol y Hernandulcina (Giannuzzi y Molina, 1995; Alonso, 2010).

Los edulcorantes no calóricos, en especial los naturales, constituyen hoy una de las áreas más dinámicas dentro del campo de los aditivos alimentarios, debido a la seguridad de uso a largo plazo y por la gran expansión que ha experimentado en estos últimos años el mercado de los alimentos bajos en calorías para los pacientes obesos, para controlar el síndrome metabólico, para la prevención de caries dentales, para los pacientes diabéticos y para controlar el estrés oxidativo (Alonso, 2010).

2.4 Capacidad antioxidante

El metabolismo oxidativo, es un proceso biológico normal capaz de generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son compuestos químicos caracterizados por poseer uno o más electrones desapareados. En estos se incluyen el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidróxilo ($+OH$), el radical óxido nítrico (NO^+) y el oxígeno singulete (1O_2) (Troncoso & Guija, 2007).

Algunos de ellos son extremadamente reactivos, como el $+OH$, otros menos reactivos como el O_2^- y el H_2O_2 , que por definición no es considerado un radical libre de oxígeno, pero es potencialmente capaz de generar fácilmente $+OH$ y generar estrés oxidativo (EO). El EO ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas como: arterioesclerosis, demencia, cáncer, artritis

reumatoide, DM, enfermedad de Alzheimer, envejecimiento prematuro etc. (Troncoso & Guija, 2007).

Para frenar el EO se utilizan antioxidantes que pueden ser obtenidos vía endógena y exógena. Los antioxidantes exógenos de fuentes naturales como las plantas tienen la capacidad de detener el estrés oxidativo al llevar a cabo la captación de radicales libres donándoles un electrón y estabilizándolo (Azofeifa, 2009).

Las plantas producen una gran variedad de compuestos bioactivos y metabolitos secundarios que actúan como antioxidantes naturales para proteger a la planta al ataque de insectos, microorganismos, el daño mecánico inducido por factores físicos y para adaptarse a ambientes adversos; esta defensa involucra la activación transcripcional de diversos genes de proteínas necesarias para la cicatrización de la herida y la prevención de la invasión de microorganismos patógenos (Jiménez et al., 2003). Estos antioxidantes naturales pueden entonces actuar en el organismo para contrarrestar la proliferación de las ROS (Veléz-Terranova et al., 2014).

Algunos extractos de plantas que presentan una gran actividad antioxidante son: escoba amarga (*Parthenium hysterophorus*), ajeno (*Artemisia absinthium*), chaya (*Cnidoscolus chayamansa*), borraja (*Borago officinalis*), balsa (*Ochroma sp.*), linaza (*Linum usitatissimum*), hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), toronjil (*Melissa officinalis*), buganvilla (*Bougainvillea spectabilis*), alcachofa (*Cynara scolymus*), guaviduca (*Piper carpunya*), altamisa (*Ambrosia cumanensis*), diente de león (*Taxacum officinales*), buscapina (*Parietaria officinalis*) y moringa (*Moringa oleifera*) así como una buena captación de radicales libres: extractos etanólicos de borraja (*B. officinalis*), alcachofa (*C. scolymus*) y moringa (*M. oleifera*) los que presentan una mayor capacidad de captación de radicales libres (Echavarria, et al., 2016).

2.5 Actividad antidiabética

La DM es un trastorno metabólico que resulta de una deficiencia en la secreción de insulina por las células β del páncreas o la insensibilidad de los tejidos a la insulina

en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre; caracterizándose también como hiperglucemia crónica (Berawi et al., 2017; Solanki et al., 2020; Alwan et al., 2020).

La diabetes ha alcanzado proporciones epidémicas y es uno de las principales enfermedades no transmisibles contribuyentes a la carga económica de los países (Alwan et al., 2020). Se estimó que alrededor de 382 millones de personas viven con DM a nivel mundial, con una proyección alarmante (Adefegha et al., 2015). Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF), el número total de adultos con diabetes en todo el mundo en 2017 fue de aproximadamente 425 millones, y se estima que el número será de 629 millones en 2045 (Alwan et al., 2020).

Los medicamentos utilizados actualmente para la DM son acarbosa y miglitol, los cuales reducen el nivel de glucosa en sangre, pero con graves efectos secundarios (Adefegha et al., 2015). Es importante encontrar medicamentos curativos eficaces en tratar la DM con efectos secundarios más bajos, como las medicinas a base de hierbas y compuestos bioactivos de las plantas, las cuales podrían coadyuvar a disminuir los niveles de glucosa en sangre (Bahmani et al., 2014).

En el estado de Oaxaca existen al menos 35 especies de plantas usadas para el tratamiento de la DM que sustentan su uso tradicional a partir de ensayos *in vitro* o *in vivo* con modelos animales, o bien a través de la química hipoglucemiante de productos naturales. Sobre este último punto, se observa que para más de 50 % de las especies aquí descritas se revelan los compuestos químicos involucrados en los efectos antidiabéticos, que son sobre todo compuestos fenólicos y terpenos con actividad comprobada a partir de su identificación y aislamiento en las mismas plantas o en otras diferentes (Juárez-Castro et al., 2014). En el estado actual del conocimiento tradicional en Tabasco sobre plantas medicinales utilizadas para el control de la diabetes, se utilizan empíricamente 36 especies de plantas, de las cuales se ha validado científicamente su efecto hipoglucemiante en un 47% (Villarreal-Ibarra et al., 2015).

2.6 Alimentos nutraceuticos

Los alimentos nutraceuticos son productos basados en ingredientes procedentes de la propia naturaleza (animales, plantas o minerales) y se caracterizan por ser ricos en determinados nutrientes, lo cual determina su incidencia en la nutrición y en nuestra salud. Estos productos atractivos por su origen natural, puesto que se encuentran en la forma más biodisponible y generalmente pueden ser administrados a largo plazo, sin riesgos de efectos colaterales (Leonard, 2006). Un nutraceutico, por otro lado, es un suplemento dietético concentrado, hecho a partir de una sustancia natural bioactiva presente en los alimentos y que proporciona un efecto favorable sobre la salud, superior al que tendría el alimento normal (Cruzado & Cedrón, 2012). El concepto "nutraceutico" en sí es un concepto más complejo, ya que no se trata de alimentos, pero sí de componentes de estos que se pueden consumir en mayores concentraciones que las habituales; tampoco son medicamentos ya que no se les atribuye propiedades terapéuticas, pero sí potencialmente preventivas (Valenzuela et al., 2014).

En los últimos años se está llevando a cabo un gran avance en el conocimiento científico de los mecanismos de acción de muchos componentes presentes en las plantas medicinales que puedan ayudar en un futuro próximo a la prevención y tratamiento de diversas patologías (Campillo-Álvarez, 2008).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y antidiabética de extracto etanólico, acuoso e hidroetanólico de hojas de *L. dulcis* T. como alternativa de edulcorante natural.

Objetivos específicos

Cuantificar el contenido de polifenoles totales en los extractos de *L. dulcis* T.

Determinar la capacidad de captación de radicales libres de los extractos de *L. dulcis* T. mediante tres métodos *in vitro*.

Evaluar la actividad antidiabética *in vitro* por medio de la inhibición de la enzima α -amilasa de los extractos de hojas de *L. dulcis* T.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Colecta y preparación de la planta

El material vegetal fue adquirido en el mercado municipal de Lic. José María Pino Suarez del municipio del Centro, Tabasco. Se adquirieron alrededor de 5 kg de material fresco de la planta *Lippia dulcis* T. Se transportaron a la División Académica de Ciencias Agropecuarias (Laboratorio de Biotecnología de Alimentos) para llevar a cabo la separación de las hojas, las cuales fueron secadas en periodos de sol y periodos de sombra durante 3 días. Posteriormente se molieron en una licuadora variable Speed laboratory blender hasta obtener un tamaño de partícula reducido y finalmente fueron tamizadas en malla 40 mm. Las muestras se almacenaron en frascos de plástico color ámbar de 500 mL.

4.2 Procedimiento de extracción

Los extractos se obtuvieron de acuerdo a la metodología de Dutta et al. (2010), se pesaron 5g de polvo de las hojas y se disolvieron en 100 mL de agua destilada, etanol absoluto y una mezcla hidroetanólico etanol/agua (70:30 v/v).

Para los extractos acuosos se utilizaron un termoagitador MS1 minishaker IKA a 90 °C durante 30 minutos. Los extractos hidroetanólicos y etanólicos se obtuvieron a temperatura ambiente con una agitación continua de 150 rpm, en un agitador orbital Orbit Shaker LAB-LINE durante 24 h.

Concluido el tiempo de extracción, se filtró al vacío con la ayuda de un matraz Kitasato colocándole un embudo büchner y un papel filtro marca Whatman No.1, se utilizó una bomba de vacío para poder efectuarse la filtración. Los sobrenadantes se recuperaron en dos ocasiones y al residuo sólido nuevamente se le adicionó 100 mL del solvente correspondiente. Una vez obtenido el sobrenadante total de los extractos fue centrifugado a 2,700 x g por 30 min a 10 °C en una centrífuga mikro220R Hettich. Posteriormente, al extracto hidroalcohólico se le eliminó el

disolvente inorgánico por medio de un evaporador rotatorio; inmediatamente después se congelaron todos los extractos y se fueron liofilizados en una liofilizadora Virtus Freezemobile Sentry 2.0 hasta eliminar totalmente el agua. El extracto liofilizado se almacenó en un desecador a temperatura ambiente hasta su utilización. Finalmente se denominaron como EE (Extracto etanólico), EH (Extracto hidroetanólico) y EA (Extracto acuoso).

4.3 Determinación de polifenoles totales

Los compuestos polifenólicos totales (TPC) se cuantificaron aplicando el método Folin-ciocalteau, según lo describe (Fărcaș et al., 2015). El cual consistió en mezclar 200 μL de extracto con 200 μL de Folin-ciocalteau y se dejó reaccionar por 5 min, posteriormente se adicionaron 200 μL Na_2CO_3 0.01 M y se colocó en reposo por 5 min, transcurrido el tiempo se adicionó 1250 μL de agua destilada y se incubó por 30 min en ausencia de luz. Finalmente, la absorbancia se leyó a 790 nm en un espectrofotómetro VELAB. El contenido total de compuestos polifenólicos fueron expresados en equivalentes de ácido gálico por g de muestra seca (mg EAG/g muestra), por lo que se elaboró una curva estándar de ácido gálico de 0 a 400 $\mu\text{g/L}$. Todos los análisis de los extractos, se realizaron por triplicado.

4.4 Determinación de la capacidad antioxidante

4.4.1 Ensayo DPPH

Para determinar la capacidad de captación de radicales libres de los extractos se empleó la metodología propuesta por Shimada et al. (1992), la cual consistió en emplear el radical 1,1- difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). Se disolvieron los extractos de la planta según el tipo de extracto, se tomaron alícuotas de 150 μL y se mezcló

con 1,350 μL de DPPH (0.1 mM en etanol). Las mezclas se agitaron en vortex por 20 s y se dejaron reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente protegida de la luz. Concluida la reacción se determinó la absorbancia en un espectro Thermo Scientific Evolution 220 UV-VIS a una longitud de onda de 517 nm. Como control positivo se utilizó el ácido ascórbico. Todos los análisis de los extractos, se realizaron por triplicado.

El porcentaje de captación de radicales DPPH se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Captación radicales} = [(AC - AE)/AC] \times 100$$

Dónde: AC es la absorbancia del control y AE es la absorbancia en presencia del extracto.

4.4.2 Ensayo ABTS

Se determinó de acuerdo al método de Pukalskas et al. (2002). Se preparó una solución stock de radical catión 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS), disolviendo 54.8 mg de ABTS (2 mM) en 50 mL de buffer salino de fosfatos (PBS 0.01 M, pH 7.4). El radical catión ABTS \cdot^+ se originó al reaccionar 10 mL de la solución stock de ABTS con 40 μL de $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_8$ 70 mM preparado 16 -17 h antes de su uso. Para estudiar los compuestos antioxidantes, se diluyó 7 mL del radical ABTS \cdot^+ en 52 mL de buffer PBS hasta alcanzar una absorbancia de 0.8 ± 0.030 medida a una longitud de onda de 734 nm. Se realizó una curva estándar de trolox, disolviendo inicialmente en microtubos de 2 ml, 990 μL de radical ABTS diluido y 10 μL de solución trolox a 0.5, 1, 1.5, 2.5 y 3.5 mM.

Posteriormente, se colocó dicha solución en una celda de cuarzo y se leyó la absorbancia en un espectro UV-VIS a 734 nm para cada concentración de Trolox después de 6 min. Se llevó a cabo los análisis de los distintos extractos por triplicado.

4.4.3 Ensayo FRAP

El método FRAP se preparó mezclando buffer acetato 300 mM (pH 3.69, TPTZ 10 mM y FeCl₃ · 6 H₂O 20 mM en una relación 10:1:1). Una vez preparado el reactivo se tomó 1 mL de éste y fue mezclado con 33.33 µL de muestra y se incubó a 37 °C por 15 min en ausencia de luz. La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a 593 nm. El potencial antioxidante de las muestras fue determinado mediante la comparación con los valores obtenidos de una curva estándar de Trólox en un rango de concentración de 0 a 200 µg/mL (Yan et al., 2018). Todos los análisis de los extractos, se realizaron por triplicado.

4.5 Determinación de la capacidad antidiabética

4.5.1 Ensayo de inhibición de la actividad de la α-amilasa

Para determinar la actividad de la α-amilasa *in vitro* de los extractos se empleó la metodología reportada por Dineshkumar et al. (2010), basada en la inhibición de la α-amilasa. Se adicionaron en los tubos 200 µL de almidón marca Maizena® y se incubaron en un baño María VWR® Heating circulator modelo 1130-2S a 100 °C por 5 min y posteriormente se incubaron a 37 °C por 5 min. Se agregaron 200 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO) al 50%, posteriormente se adicionaron 200 µL de los distintos extractos disueltos en agua o etanol al 95% según el tipo de extracto, a una concentración de 1 mg/mL, seguidamente se adicionaron 200 µL de α-amilasa pancreática porcina (2 U/MI), posteriormente 100 µL de amortiguador (Tris-HCl 0.5 M-cloruro de sodio 0.01 M (pH 6.9)) y por último 500 µL de 3,5-dinitrosalicilato (DNS) al 0.1%. Las mezclas se dejaron reaccionar por 10 min a 100 °C y se dejó enfriar a

temperatura ambiente por 15 min. Todos los análisis de los extractos, se realizaron por triplicado.

Las absorbancias de las mezclas se determinaron en un espectro UV-VIS a una longitud de onda de 540 nm. Como control positivo se utilizó el medicamento acarbosa.

La actividad inhibitoria se calculó empleando la siguiente fórmula:

Actividad inhibitoria de la α -amilasa = $(Ac+) - (Ac-) - (As-Ab) / (Ac+) - (Ac-) \times 100$

Dónde:

Ac+, es la absorbancia cuando la enzima actúa sin interferencia (disolvente con enzima).

Ac-, es la absorbancia cuando la enzima no actúa (disolvente sin enzima).

As, es la absorbancia cuando la enzima actúa en presencia de muestra

Ab, es la absorbancia del blanco.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevó a cabo un diseño completamente al azar, donde las variables dependientes fueron los tipos de extractos analizados de *L. dulcis* T, (acuoso, etanólico e hidroalcohólico) y las variables de respuesta fueron los polifenoles totales, actividad antioxidante y antidiabética obtenida por medio de técnicas *in vitro*, teniendo en esta etapa del estudio un total de tres tratamientos con tres réplicas (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos empleados

Parte de la planta	disolventes	Extractos
Hojas	Etanólico	EE
Hojas	Hidroetanólico	EH
Hojas	Acuoso	EA

EE.- Extracto etanólico. EH.- Extracto hidroetanólico. EA.- Extracto acuoso.

Los datos derivados de las variables de respuesta en los extractos de hojas de *L. dulcis* T, fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) $p \leq 0.05$, mientras que las diferencias estadísticas significativas fueron evaluadas usando la técnica de Tukey con un $p \leq 0.05$.

Todos estos análisis se efectuaron utilizando el paquete computacional GraphPad Prisma 5.0.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Determinación de polifenoles totales

En la figura 1, se observa el contenido polifenólico total de cada uno de los extractos de *L. dulcis* T, sobre el que se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$), destacando el mayor contenido de estos compuestos en el extracto hidroalcohólico (EH) con valores superiores a 2.0 mg EAG/g de muestra. Mientras que la menor concentración se presentó en el extracto acuoso (EA) con valores inferior a 1.5 mg EAG/g. Por lo que existe influencia de medio de extracción para obtener estos contenidos; en otras palabras, los compuestos polifenólicos presentes en esta muestra tienen menor polaridad.

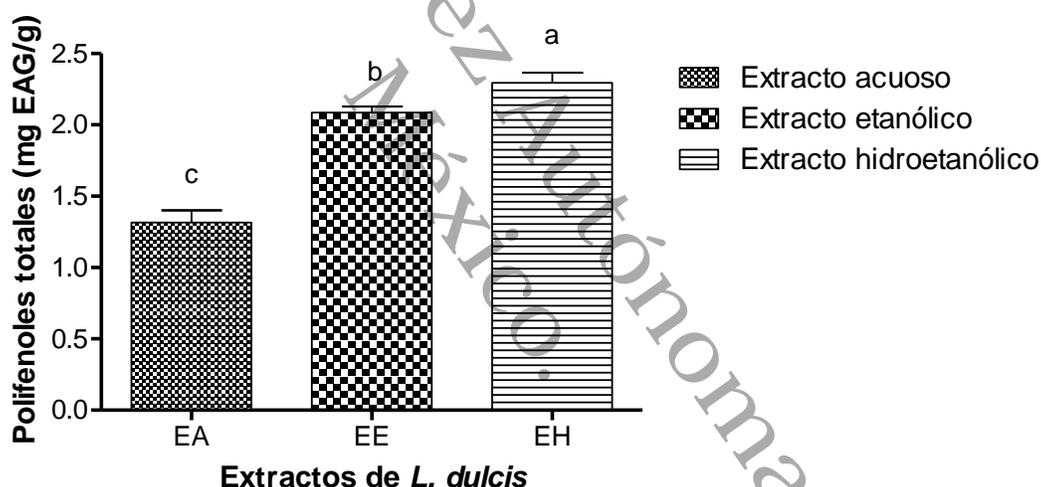


Figura 1. Contenido de polifenoles totales en extractos acuosos (EA), etanólicos (EE) e hidroetanólicos (EH) de hojas de *L. dulcis* T. como alternativa de edulcorante natural. Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

En el presente estudio el extracto EH mostró una mayor concentración de polifenoles en comparación con los demás extractos evaluados. Quiñones, 2021; determinó el contenido de polifenoles de las hojas y tallos de *Lippia Alba* (*Verbenaceae*), el estudio consistió en evaluar la concentración de polifenoles por medio del método de Folin Ciocalteu, utilizando como referencia la catequina. Los

compuestos fenólicos cuantificados fueron mayores en los extractos metanólicos de hojas y tallos con concentraciones de 17.36 ± 0.70 y 15.67 ± 0.65 , respectivamente; en comparación con los extractos acuosos (infusiones) de las mismas partes de la planta (6.11 ± 0.05 y 13.85 ± 0.90) para tallos y hojas respectivamente.

Por otro lado Ricco et al. (2010), analizaron especies de la familia *Verbenaceae* de la flora argentina: *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (cedrón del monte) *Tronc.*, *Aloysia schulziana* (cedrón del monte), *Aloysia polystachya* (yerba del burro) y *Lippia integrifolia* (incayuyo) e investigaron los contenidos de polifenoles totales, flavonoides totales y ácidos hidroxicinámicos totales, así como la capacidad antioxidante y genotoxicidad de las preparaciones acuosas (infusiones y cocimientos). Ellos encontraron que la especie *L. integrifolia* mostró mayor contenido de fenoles totales ($58,72 \pm 3,10$) y *A. polystachya* fue la especie que mostró un menor contenido de compuestos fenólicos ($31,24 \pm 1,35$).

Los estudios discutidos en este trabajo se llevaron a cabo en plantas de la variedad *Verbenaceae*, que corresponde a la misma familia de *L. dulcis* T. Es importante mencionar que en la revisión bibliográfica no se encontraron reportes de determinación de compuestos fenólicos en *L. dulcis* T, lo que muestra que es una planta que no ha sido estudiada a fondo; por lo tanto, resulta novedoso conocer en este estudio la concentración en la parte de las hojas, debido a que son la parte que más se utilizan en los tratamientos tradicionales herbales (Villarreal-Ibarra, 2015).

6.2 Determinación de la capacidad antioxidante

6.2.1 Ensayo DPPH

En la figura 2, se presenta el porcentaje de captación de radicales libres de los extractos por efecto de captura del radical DPPH, el análisis estadístico indicó diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre los extractos, cuyos valores fluctuaron entre 44 a 73 %. Correspondiendo el mayor efecto de captura al extracto acuoso (EA) y etanólico (EE).

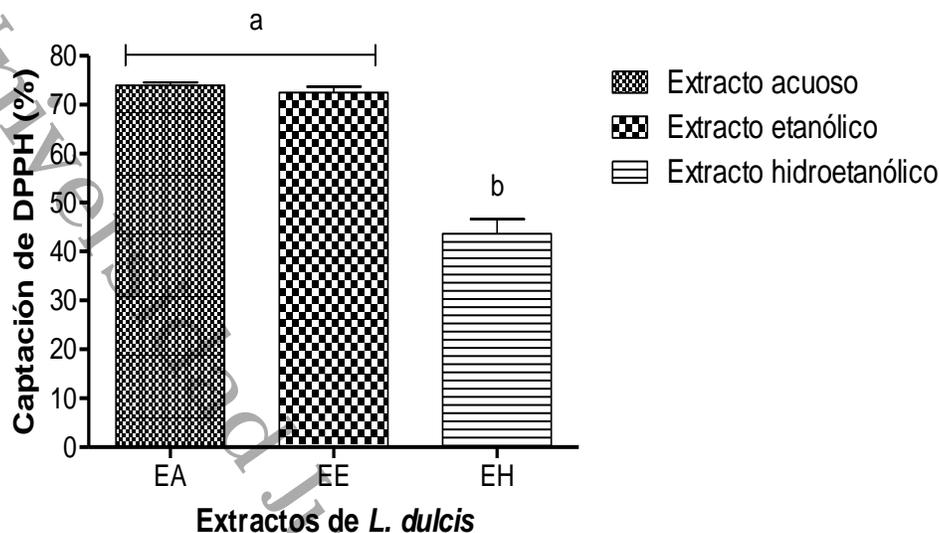


Figura 2. Efecto de la captura de radical DPPH en extractos acuosos (EA), etanólicos (EE) e hidroetanólicos (EH) de hojas de *L. dulcis* T. como alternativa de edulcorante natural. Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Investigaciones realizadas por Terrones, (2016); demostraron que los extractos de hoja de *L. dulcis* T. poseen capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante se expresó en IC_{50} para DPPH obteniéndose valores de 289, 291, 251, 256, 255 y 213 $\mu\text{g/ml}$ en seis tratamientos evaluados (T1, T2, T3, T4, T5 y T6) respectivamente, valores superiores comparados con esta investigación.

La familia botánica *Verbenaceae* comprenden alrededor de 35 géneros y 1000 especies distribuidas principalmente en los trópicos y subtropicos. Son ampliamente usadas en la medicina tradicional de diferentes países para el tratamiento de enfermedades parasitarias y trastornos respiratorios e inflamatorios. También se les han atribuido propiedades antioxidantes y antimicrobianas, las cuales están directamente relacionadas con su amplia composición fitoquímica (Navarrete et al., 2020).

Los resultados encontrados en este estudio, fueron mayores a lo reportado por Busso et al. (2020), los cuales evaluaron extractos acuosos al 5 % de las hojas de la planta *Aloysia gratissima*, encontrando un porcentaje de captación de radicales

libres de 44.5 %. Sin embargo, son menores a lo reportado por Garrido et al. (2013), quienes evaluaron extractos metanólicos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. y encontraron actividad antioxidante con un IC₅₀ de 24.9 µg/mL; siendo las plantas discutidas de la misma familia *Verbenaceae*.

6.2.2 Ensayo ABTS

En la figura 3, se puede observar el efecto antioxidante por efecto de captura del radical ABTS presentes en los extractos de *L. dulcis* T. El gráfico nos muestra que no existen diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$), entre los extractos evaluados.

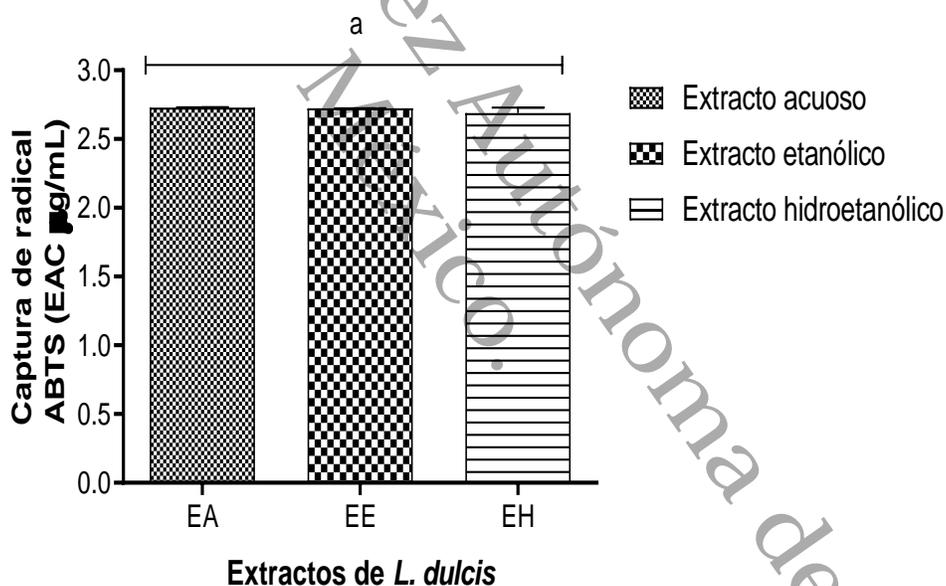


Figura 3. Actividad antioxidante por método ABTS en extractos acuosos (EA), etanólicos (EE) e hidroetanólicos (EH) de hojas de *L. dulcis* T. como alternativa de edulcorante natural. Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Arango et al. (2012), evaluaron la capacidad antioxidante de una especie de orégano (*Lippia organoides* H.B.K), el cual pertenece a la familia de las *Verbenaceae*, como la planta analizada en el presente trabajo. La actividad

antioxidante se evaluó mediante los métodos espectrofotométricos de DPPH y ABTS, encontrando valores de IC₅₀ para DPPH en el AEO (aceite esencial de las hojas de orégano) de 5.58 µg/mL. Por su parte los valores TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) para ABTS en el AEO fue de 0.0033 mg/mL, actividad antioxidante similar a lo reportado en el presente estudio. El alto rendimiento de extracción y contenido de timol en el aceite esencial de orégano del Alto Patía hacen que esta especie tenga un alto potencial para la obtención de antioxidantes naturales (Arango et al., 2012).

Durante la revisión bibliográfica no se encontraron reportes de actividad antioxidante por medio de la técnica ABTS para *L. dulcis* T; lo que resulta en una investigación novedosa, que podría representar el primer trabajo con esta técnica espectrofotométrica.

En otro estudio realizado en la planta *Verbena carolina* (Verbenaceae), se encontró que en extractos acuosos de sus hojas muestra una actividad antioxidante de 7.10 µMol trolox/mg extracto (Lara et al., 2019). La presencia de los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de estos pueden variar debido a las condiciones que enfrentan las planta durante el crecimiento, que puede ser condiciones bióticas, como herbivoría, interacción con otras plantas, hongos fitopatógenos y abióticas como fotoperíodos, composición de suelo, pH, etc. (Navarrete et al., 2020).

6.2.3 Ensayo FRAP

Se presenta en la figura 4 el efecto antioxidante por efecto FRAP de los extractos *L. dulcis* T, sobre los cuales no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$), a pesar de las concentraciones de compuestos polifenólicos que en ellos variaron.

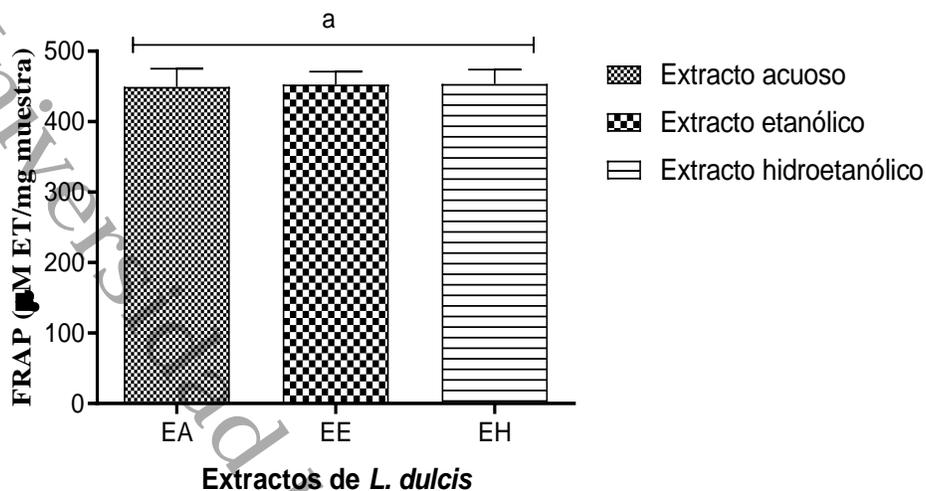


Figura 4. Actividad antioxidante por método FRAP en extractos acuosos (EA), etanólicos (EE) e hidroetanólicos (EH) de hojas de *L. dulcis* T. como alternativa de edulcorante natural. Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Se puede observar en la figura 4 que los extractos evaluados de *L. dulcis* T. mostraron una muy capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC) por el método FRAP fue de 446 $\mu\text{Mol ET/mg}$ de muestra; estos resultados son mayores a lo reportado para especies de la familia *Verbenaceae* reportadas por otros autores. Tal es el caso de Lara et al. (2019), los cuales reportaron valores de TEAC por método FRAP en extractos acuosos de hojas de *Verbena carolina* L. de 3.88 $\mu\text{Mol ET/mg}$ de muestra y de Nieto, (2019), el cual evaluó extractos de hojas de *Lippis graveolens* en un solvente hidroalcohólico (metanol: ácido fórmico: agua destilada (80:2:18)) de tres comunidades del estado de Querétaro (Cadereyta, Peñamiller y Tolimán), este autor encontró que entre las comunidades de Cadereyta y Peñamiller la actividad antioxidante fue similar con valores de 140 y 143 $\mu\text{Mol ET/mg}$ de muestra, mientras que en la comunidad de Tolimán el valor fue de 118 $\mu\text{Mol ET/mg}$ de muestra.

Por otro lado, Rascón-Valenzuela et al. (2019), evaluaron un extracto etanólico de hojas de *Lantana montevidensis*, la cual es una planta de la familia *Verbenaceae*, encontrando valores de TEAC por el método de FRAP de 52.30 mg ET/g de muestra. Es importante mencionar que durante la revisión bibliográfica no se

encontraron reportes de actividad antioxidante por medio de la técnica FRAP para *L. dulcis* T; lo que nos indica que esta planta es una especie de las *Verbenaceae* que necesita una investigación científica profunda para conocer sus bondades antioxidantes y antidiabéticas que podrían coadyubar al tratamiento de la DM y el envejecimiento prematuro.

6.3 Determinación de capacidad antidiabética

6.3.1 Ensayo de inhibición de la actividad de la α -amilasa

Los resultados de los extractos evaluados de hojas de *L. dulcis* T. a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, mostraron un rango de inhibición de α -amilasa de 50.77 – 70.64 %, entre los cuales existe diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Se observa en la Figura 5 que la concentración del extracto etanólico fue el que mostró un mayor efecto inhibitorio de esta enzima en comparación con los demás extractos evaluados. Cabe mencionar que el control positivo utilizado fue el medicamento acarbosa, el cual mostró una potente inhibición de esta enzima con un porcentaje de 96.12 % a 150 $\mu\text{g/mL}$.

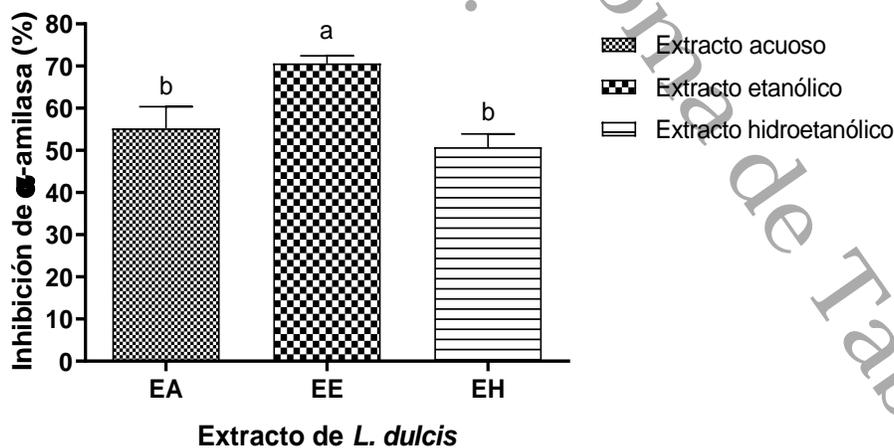


Figura 5. Porcentaje de inhibición de α -amilasa en extractos acuosos (EA), etanólicos (EE) e hidroetanólicos (EH) de hojas de *L. dulcis* T. Letras minúsculas indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre extractos.

Los porcentajes de inhibición de la enzima α -amilasa reportados en extractos de hojas en el presente estudio son mayores a lo reportado por Ávila-Reyes et al. (2019), los cuáles evaluaron un extracto etanólico de hojas de *Lippia umbelata*, encontrando un porcentaje de inhibición enzimática de 11.12 y 18.16 % a concentraciones de extracto de 1000 y 2000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. De igual manera Keneilwe et al. (2018), reportaron un porcentaje de inhibición de 23.20 % a una concentración de 2500 $\mu\text{g/mL}$, en extracto metanólico de hojas de *Lippia scaberrimathe*.

En otro estudio revisado en la bibliografía se encontró que los resultados reportados en este estudio para extracto etanólico de hojas de *L. dulcis* T, fueron similares a los publicados por Braga et al. (2019); donde ellos reportan que el extracto etanólico de hojas de *Lippia sinoides* fue de 66.91 %.

L. dulcis T. es una planta que pertenece a la familia *Verbenaceae*, al igual que *Lippia umbelata*, *Lippia scaberrimathe* y *Lippia sinoides*, las cuales fueron tomadas en cuenta para la discusión y comparación con los resultados de este estudio. Es importante mencionar que en la revisión bibliográfica no se encontraron reporte de inhibición de la enzima α -amilasa en *L. dulcis* T, lo que muestra que es el primer trabajo donde se demuestra la actividad antidiabética de sus hojas.

Lippia nodiflora, es otra planta de la misma familia que las plantas publicadas en el párrafo anterior; la cual es una hierba perenne, autóctona de América, y ampliamente utilizada para enfermedades infecciosas; no existe evidencia de su potencial diabético en este país, sin embargo, en estudios realizados en la India se aisló el γ -sitosterol de *Lippia nodiflora* y mostró un aumento efecto de secreción de insulina en presencia de glucosa en ratas diabéticas (Ávila-Reyes et al., 2019).

Por otro lado, otros estudios han demostrado que las plantas de la familia *Verbenaceae* contienen antioxidantes como fenoles, flavonoides, taninos y otros fitoquímicos responsables de sus propiedades biológicas como antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antidiabéticas, entre otras (Keneilwe et al., 2018).

VII. CONCLUSIONES

Los extractos de las hojas de *L. dulcis* T. contienen compuestos polifenólicos que les confiere actividades biológicas como capacidad inhibidora de radicales libres como DPPH y ABTS; así como actividad antidiabética en los distintos extractos evaluados. El extracto que exhibió mayor capacidad antioxidante por el método de DPPH, fue el extracto EH, en comparación con los extractos EA y EE. Mientras que, con los demás métodos, los tres extractos obtuvieron resultados similares. Por otro lado; el potencial antidiabético fue mayor en el extracto EE, podría deducirse que el extracto etanólico extrajo metabolitos de polaridad intermedia, que pudieron realizar una inhibición competitiva o acompetitiva en la enzima α -amilasa para detener su acción catalizadora. Con los resultados obtenidos en el presente estudio se puede proponer el consumo diario de extractos de hojas de *L. dulcis* T. como alternativa de edulcorante natural debido a su potente dulzor, así como un coadyuvante terapéutico para la prevención de enfermedades mediadas por proliferación de radicales libres como DM.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adefegha, S. A., Oyeleye, S. I. & Oboh, G. (2015). Distribution of Phenolic Contents, Antidiabetic Potentials, Antihypertensive Properties, and Antioxidative Effects of Soursop (*Annona muricata* L.) Fruit Parts *in vitro*. *Biochemistry Research International*, 2015, 1-8.
- Aguilar, C.G. (2001). Determinación de la actividad hipoglucemiante de *phoradendron tommtom* (dc) engelm, sobre un modelo de ratas diabéticas de experimentación. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Alonso, J. R. (2010). Endulcorantes naturales. *La Granja* 12(2), 3-12.
- Alwan, I. A., Lim, V., Samad, N. A., Widyawati, T., & Yusoff, N. A. (2020). Effect of *Annona muricata* L. On metabolic parameters in *diabetes mellitus*: A systematic review. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 8(1), 1–11.
- Aranda-González, I., Segura-Campos, M., Moguel-Ordoñez Y. & Betancur-Ancona, D. (2014). *S. rebaudiana* Bertoni. Un potencial adyuvante en el tratamiento de la DM, *CyTA – J of Food*, 12, 218-226.
- Arango B., O, Pantoja D., D, Santacruz CH., L. & Hurtado B., A M. (2012). Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides HBK*) del alto patía. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10 (2), 79-86. Recuperado el 25 de octubre de 2022, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612012000200010&lng=en&tlng=es.
- Ávila-Reyes, J.A., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E.A., Torres-Ricario, R., Naranjo-Jiménez, N., Gutierrez-Velazquez, M.V., González-Valdez, L., Uribe-Soto, J.N. & Vasavilbazo-Saucedo, N. (2019). α -Glucosidase and α -amylase inhibition potentials of ten wild Mexican species of *Verbenaceae*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* January 18 (1): 31-36.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Bahmani, M., Zargaran, A., Rafieian-Kopaei, M. & Saki, K. (2014). Ethnobotanical study of medicinal plants used in the management of *diabetes mellitus* in the Urmia, Northwest Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(S1), S348–S354.
- Berawi, K. N., Shidarti, L., Nurdin, S. U., Lipoeto, N. I., Wahid, I., Sari, J. & Nurcahyani, E. (2017). Comparison effectiveness of antidiabetic activity extract herbal mixture of soursop leaves (*Annona muricata*), bay leaves (*Syzygium*

- polyanthum*) and pegagan leaves (*Centella asiatica*). *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10(3), 1481–1488.
- Boston, C., Rosales, J., & Singh, J. (2020). Phytochemical Analysis and Anti-diabetic Potential of *Annona muricata* L., *Persea americana* Mill. and *Montrichardia arborescens* L. Schott Utilized by the Residents of Pakuri (St. Cuthbert's Mission) in Guyana. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research*, 1–12.
- Braga, M., Silva-Abreu, T., Vinicius-Cardoso, M., Andrade Machado, G.H., Silva-Pereira, L.L., Assaid-Simão, A. & Marcussi, S. (2019). Prospection of enzyme modulators in aqueous and ethanolic extracts of *Lippia sidoides* leaves: genotoxicity, digestion, inflammation, and hemostasis. *Chem. Biodiversity* 18(1): 23-35.
- Busso, M., Munafo, J., Galie, F. & Bucciaelli, A. (2020). Actividad gastroprotectora, tamizaje fitoquímico y actividad atrapadora de radicales libres de *aloyisia gratissima* (*verbenaceae*). *Asociación Médica de Bahía Blanca*. 30(1), 20-27
- Calzada-Sánchez, E. V., Aguilar-Rodríguez, S., López-Villafranco, M. & Aguilar-Contreras, A. (2014). Anatomía de hoja y tallo de *Verbenácea* medicinales empleadas en México. *Botanical Sciences*, 92(4), 469-480.
- Campillo-Álvarez, J. E. (2008). Alimentación y salud 2006: un laberinto cultural y científico.
- Celis. C. N. Escobar R. P. Isaza. J. H. Martínez. J. R. & Stashenko. E. (2007). Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Lippia dulcis*, especies de la familia Verbanaceae. *Scientia Et Technica*. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia.
- Cruzado, M. & Cedrón, J. C. (2012). Nutraceuticos, alimentos funcionales y su producción. *Revista de Química*, 26(1-2), 33-36.
- Dineshkumar, B. Analava, M. & Manjunatha, M. (2010). Studies on the anti-diabetic and hypolipidemic potentials of *mangiferin* (Xanthone Glucoside) in streptozotocin-induced Type 1 and Type 2 diabetic model rats. *Int J Adv in Pharma Sci*, 75-85.
- Dutta, P.K., Razu, M.M.T., Alam, M.K., Awal, M.A. & Mostofa, M. (2010). Comparative efficacy of aqueous extract of *Stevia* (*S. rebaudiana* Bertoni) leaves and metformin hydrochloride (Comet®) in streptozotocin induced *diabetes mellitus* in rats. *Int J Biol Res*, 2(8), 17-22.

- Echavarría, A., Regnault, H. D. A., Lisbeth, N., Matute, L., Jaramillo, C., de Astudillo, L. R. & Benitez, R. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales/Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts. *Ciencia Unemi*, 9(20), 29-35.
- Escalona, L.J., Aguilar, A.T., Martínez, A.E. & Mojena, M.L.A. (2015). Traditional use of medicinal plants for the major adult in the mountain community Corralillo Arriba. Guisa, Granma. (In Spanish). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(4), 429-43.
- Espinosa-Moreno, J., Centurión-Hidalgo, D., Mayo-Mosqueda, A. & Velázquez-Martínez, J.R. (2017). Plantas aromáticas y medicinales con potencial actividad microbiana. Villahermosa, Tabasco: José N. Roviroso.
- Esquivel-Gutiérrez, E.R., Noriega-Cisneros, R., Bello-González, M.A., Saavedra-Molina A. & Salgado-Garcigüía, R. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas, 14(1): 45–52.
- Fărcaș, A. C., Socaci, S. A., Dulf, F. V., Tofană, M., Mudura, E. & Diaconeasa, Z. (2015). Volatile profile, fatty acids composition and total phenolics content of brewers' spent grain by-product with potential use in the development of new functional foods. *Journal of Cereal Science*, 64, 34–42.
- Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac med*. 77(4), 327-32.
- García, D. E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y forrajes*, 27(1).
- García, de A, G. J. E., Ramírez, H. B. C., Robles, A. G., Zañudo, H. J., Salcedo, R. A. L. & García, J. E. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, (39), 29-44. Recuperado en 03 de junio de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1607-050X2012000200003&lng=es&tlng=es.
- Garrido, G., Ortiz, M. & Pozo, P. (2013). Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 1(1), 30-38

- Giannuzzi, L., & Molina, O. S. (1995). Edulcorantes naturales y sintéticos: Aplicaciones y aspectos toxicológicos. *Acta Farm. Bonaerense*, 14(2), 119-133.
- Gregersen, S., Jeppesen, P.B., Holst, J.J. & Hermansen, K. (2004). Antihyperglycemic effects of Stevioside in type 2 diabetic subjects. *Met*, 53, 73-6.
- Gutiérrez, E. R. E., Cisneros, R. N., González, M. A. B., Molina, A. S. & Garciglia, R. S. (2013). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas. Rev. Cienc. Biológico Agropecu. Univ. Michoacana San Nicolás Hidalgo* 14(1), 45–52.

<https://doi.org/10.1016/j.iff.2018.01.006>

- Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., & Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Juárez-Castro, C. J., Villa Ruano, N., Ramírez García, S. A. & Mosso González, C. (2014). Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Revista cubana de plantas medicinales*, 19(1), 101-120.
- Justino, A. B., Miranda, N. C., Franco, R. R., Martins, M. M., Silva, N. M. da. & Espindola, F. S. (2018). *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 100(November 2017), 83–92.
- Keneilwe, M.N., Saramma, G. & Chabaesele Kelvin. (2018). An *In-vitro* Antioxidant and Antidiabetic Evaluation of Traditional Medicinal Plants of Botswana. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 22(6): 1-12.
- Lara, G., Salgado, C., Pedraza, J., Omar, N., Morales, A., Águila, M., & Avilés, M., Rivero, B., Navarro, V., Ríos, R., Aguilar, M. (2019). Antimicrobial, Antioxidant Activities, and HPLC Determination of the Major Components of *Verbena carolina* (Verbenaceae). *MOLECULES*. 24 1-17
- Leonard, H. P. (2006). Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 40(3), 20-28.
- Márquez, B., Muñoz, O., Rascón, V., Martínez, M., & Preciado M. (2019). Comparación en la eficiencia de extracción de alicina y eucaliptol de *Allium*

- sativum* Y *Eucalyptus globulus*. Congreso estatal de ciencias exactas y naturales. 1, 85-93
- Masateru, O, Morinaga, H., Masuoka, C., Ikeda, T., Okawa, M., Kinjo, J. & Nohara, T. (2005). New Bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. Notes. *Chemical & pharmaceutical Bulletin*, 53(9), 1175-1177.
- Mesa-Vanegas, A. M., Gaviria, Carlos A., Cardona, F, Sáez-Vega, J. A., Blair Trujillo, S. & Rojano, Benjamín A. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(2), 13-26. Recuperado en 26 de noviembre de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962010000200003&lng=es&tlng=es.
- Mohd-Radzman, N.H., Ismail, W.I.W., Adam, Z., Jaapar, S.S. & Adam, A. (2012). Potential Roles of *S. rebaudiana* Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A Review. Medical Technology Division, Nuclear Malaysia, Kajang, Malaysia.
- Molina-Mendoza, J.L., Galván-Villanueva, R., Patiño-Siciliano, A. & Fernández-Nava, R. (2012). Medicinal plants and preliminar floristic list from the municipality of Huasca de Ocampo, Hidalgo, México. (In Spanish). *Polibotánica*, 34, 259-291.
- Muñetón, P. P. (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo. *Revista Digital Universitaria*, 10(9), 67-79.
- Muñoz, F. (1996). Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Madrid. Mundi-Prensa Libros. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=WmX5TibuSrlC&oi=fnd&pg=PA15&dq=que+son+las+plantas+arom%C3%A1ticas+&ots=-657bU9jC1&sig=kwva9wDVs_pgzjwLi56jhOUD4jl#v=onepage&q=que%20son%20las%20plantas%20arom%C3%A1ticas&f=false
- Navarrete, N., Pita, E., Sánchez, R., Giraldo, E. & Bernal, M. (2020). Actividad in vitro de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas. *NOVA*, 18 (33), 53-7.
- Nieto R. M. I. (2019). Establecimiento de las condiciones del cultivo para incrementar la producción de carvacrol en oregano (*lippia graveolens*) Queretaro, Qro. (Tesis de maestría), Universidad autónoma de Querétaro.

- OMS | Medicina tradicional: definiciones [Internet]. WHO. [citado 24 de julio de 2016]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.
- Pukalskas, A., Van Beek, T.A., Venskutonis, R.P., Linsen, J.P.H., Van Veldhuizen, A. & Grood, A. (2002). Identification of radical scavengers in sweet grass (*Hierochloa odorata*). *J agric and food chem*, 50, 2914-2919.
- Quiñones C. G. M. (2021). Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de las hojas y tallo de *Lippia alba*. (Mill) N.E. Brown (pampa orégano). Tesis de grado. Universidad Católica los Ángeles de Chimbote Perú.
- Rascón-Valenzuela A., León, M.C., Pérez, E., Ferrándiz, D., Horrín, R., Volpato, G., Barrera, D., Gutiérrez, M. & Contreras, R. (2019). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61(2), 185-204.
- Ricco, R A.; Wagner, M L.; Portmann, E; Reides, C; Llesuy, S; Gurni, A A. & Carballo, M A. (2010). Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (*Verbenaceae*) *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 9, núm. 5, 2010, pp. 388-396 Universidad de Santiago de Chile Santiago, Chile
- Sánchez, J. M. (2016). Contribución al conocimiento de los géneros *Phyla Lour.*, *Lippia* y *Aloysia Palau* (*Verbenácea*) en España. *Bouteloua* 23, 85-94.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric and Food Chem*, 40, 945-948.
- Solanki, J., Mandaliya, V. B., & Georrge, J. J. (2020). Medicinal Properties of *Annona muricata* Extracts in Various Disease. *Biochemistry*, 2020(126), 126–133.
- Soledad, A., Malena G., & Nuñez, M. (2019). Caracterización fitoquímica y actividad antioxidante de las especies *Sapium haematospermum Müll. Arg.* (*Euphorbiaceae*) y *Baillonia amabilis Bocq.* (*Verbenaceae*). *Dominguezia*, 35(1), 87-91
- Stashenko, E., Martínez, J., Durán, D., Córdoba, Y., & Caballero, D., (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (*Verbenaceae*) cultivadas en Colombia. *Ciencias naturales*. 38 89-105

- Terrones A. E. J. (2016). Capacidad antioxidante de la menta dulce *Lippia dulcis treviranus* (familia verbenaceae) en Iquitos, Loreta, Perú. Tesis de grados, Universidad de la Amazonia Peruana.
- Troncoso, L.V. & Guija, E. (2007). Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas con intoxicación hepática inducida por paracetamol. *Anal de la Fac de Med*, 68(4), 333-343.
- Urióstegui-Flores, A. (2015). Hierbas medicinales utilizadas en la atención de enfermedades del sistema digestivo en la ciudad de Taxco, Guerrero, México. *Rev. Salud pública* 17(1), 85-96.
- Valenzuela, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., & Morales, G. (2014). Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación?, *Revista chilena de nutrición*, 41(2), 198-204.
- Vélez-Terranova, M., Gaona, R. C., & Sánchez-Guerrero, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3), 489-499.
- Villarreal-Ibarra, E. C., Espinoza, L. D. C. L., López, P. A., García-López, E., López, D. J. P., Ortiz-García, C. F., & Cárdenas, M. A. O. (2015). Evaluación etnofarmacológica de plantas con propiedades hipoglucémicas usadas en la medicina tradicional del sureste de México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(2), 99-112
- Yan, S., Shao, H., Zhou, Z., Wang, Q., Zhao, L., & Yang, x. (2018). Non-extractable polyphenols of green tea and their antioxidant, anti- α -glucosidase capacity, and release during in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 42(january), 129-136.

Evaluación de la actividad antioxidante y antidiabetica in vitro de hojas de Orozú (Lippia dulcis T,) como alternativa de endulcorante natural

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	ri.ujat.mx Internet	245 palabras — 4%
2	ru.dgb.unam.mx Internet	74 palabras — 1%
3	scielo.sld.cu Internet	71 palabras — 1%
4	www.scielo.org.co Internet	52 palabras — 1%
5	dialnet.unirioja.es Internet	48 palabras — 1%
6	es.scribd.com Internet	44 palabras — 1%
7	repositorio.utc.edu.ec Internet	44 palabras — 1%
8	mcta.uas.edu.mx Internet	39 palabras — 1%
9	cybertesis.unmsm.edu.pe Internet	37 palabras — 1%

10	tesis.ipn.mx Internet	37 palabras — 1%
11	www.revista.unam.mx Internet	37 palabras — 1%
12	www.redalyc.org Internet	35 palabras — 1%
13	farmasalud2021.sld.cu Internet	33 palabras — < 1%
14	pesquisa.bvsalud.org Internet	31 palabras — < 1%
15	www.scielo.org.mx Internet	31 palabras — < 1%
16	raccefyn.co Internet	27 palabras — < 1%
17	Aura I. Urrea, Paula A. Castrillón, Zulma Monsalve. "Propagación <i>in vitro</i> y desdiferenciación tisular en <i>Lippia dulcis</i> ", Actualidades Biológicas, 2010 Crossref	26 palabras — < 1%
18	docslib.org Internet	26 palabras — < 1%
19	biblioteca.usac.edu.gt Internet	25 palabras — < 1%
20	www.coursehero.com Internet	25 palabras — < 1%
21	hdl.handle.net Internet	24 palabras — < 1%

22	journal2.stikeskendal.ac.id Internet	23 palabras — < 1%
23	doi.org Internet	21 palabras — < 1%
24	www.scribd.com Internet	21 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 20 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.