



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Trabajo Fin de Grado

Determinación de la capacidad antioxidante de *Thymus vulgaris*

Alumno: David Galiano Latorre

Julio, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

GRADO EN QUÍMICA

Trabajo Fin de Grado

Determinación de la capacidad antioxidante de *Thymus vulgaris*

Trabajo Fin de Grado presentado por

David Galiano Latorre

Jaén, Julio de 2019

Fdo.: David Galiano Latorre

INDICE

1. Resumen	2
2. Introducción	3
2.1. Plantas y especias aromáticas.....	3
2.2. Radicales libres, estrés oxidativo y defensa antioxidante celular	4
2.3. Estructura química y clasificación de los compuestos fenólicos	5
2.3.1. Compuestos fenólicos en plantas	10
2.4. Consideraciones generales de la planta objeto de estudio.	11
2.5. Métodos de extracción de compuestos fenólicos.....	12
2.6. Métodos de evaluación del contenido total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante	14
2.6.1. Mecanismos de reacción.....	14
2.6.2. Determinación del contenido total en compuestos fenólicos (TPC)	16
2.6.3. Contenido total en flavonoides (TFC)	17
2.6.4. Ensayo ABTS in vitro (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) in vitro	18
2.6.5. Ensayo DPPH in vitro (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) in vitro.	18
2.7. Objetivos	20
3. Parte experimental.....	20
3.1. Reactivos y equipamiento.....	20
3.2. Muestra seleccionada y pretratamiento	21
3.3. Extracción de compuestos fenólicos en <i>Thymus vulgaris</i>	22
3.4. Contenido total de fenoles (TPC) y flavonoides (TFC) y ensayos para la capacidad antioxidante.....	24
3.4.1. Contenido total de compuestos fenólicos (TPC)	24
3.4.2. Contenido total de flavonoides (TFC)	27
3.4.3. Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) <i>in vitro</i>	29
3.4.4. Ensayo ABTS (Sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) <i>in vitro</i>	30
3.5. Tratamiento de los datos.	33
4. Resultados y discusión	33
5. Conclusiones	41
6. Bibliografía.....	42

1. RESUMEN

El propósito de este Trabajo Fin de Grado tiene como finalidad el estudio de la capacidad antioxidante y la determinación del contenido total de polifenoles y flavonoides, así como saber que técnica de extracción empleada favorece la obtención de compuestos fenólicos en una planta aromática típica de Andalucía, *Thymus vulgaris* conocida comúnmente como tomillo, ya que a día de hoy la investigación y la ciencia informan que dichos compuestos reducen el riesgo de desarrollar enfermedades.

La determinación del contenido total de polifenoles (TPC) y flavonoides (TFC) se determinó mediante métodos llamados Folin-Ciocalteu y formación de complejos flavonoide-Al, respectivamente, mientras que la capacidad antioxidante fue llevada a cabo mediante ensayos llamados ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo).

Los métodos fueron realizados con distintas técnicas de extracción y agentes extractantes, como la extracción mediante calentamiento por infusión y la extracción asistida por ultrasonidos de forma directa e indirecta. El análisis estadístico de los resultados ha revelado que la concentración mayor fenólica y la mejor capacidad antioxidante se obtuvieron con agua como disolvente de extracción, por lo que la técnica más adecuada para extraer compuestos fenólicos en la planta aromática es la extracción mediante calentamiento (infusión), con unos valores de 464 ± 5 mg GAE/100 g muestra (TPC), 123 ± 5 mg QER/100 g (TFC), 3.2 ± 0.1 mmol trólox/100 g (ABTS) y 1.9 ± 0.1 mmol trólox/100 g (DPPH), seguida por la extracción mediante metanol como disolvente en la técnica de extracción asistida por ultrasonidos de forma indirecta y directa, respectivamente.

ABSTRACT

The purpose of this Final Degree Project is to study the antioxidant capacity and the determination of the total content of polyphenols and flavonoids, as well as to know that the extraction technique used favors the obtaining of phenolic compounds in a typical plant in Andalusia, *Thymus vulgaris* commonly known as thyme, since today research and science report that these compounds reduce the risk of developing diseases.

The determination of the total content of polyphenols (TPC) and flavonoids (TFC) was determined by methods called Folin-Ciocalteu and formation of flavonoid-Al complexes, respectively, while the antioxidant capacity was carried out by means of tests called ABTS (Diammonium salt of the 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil).

The methods were carried out with different extraction techniques and extractant agents, such as extraction by heating (infusion) and extraction assisted by ultrasound directly and indirectly. The highest phenolic concentration and the best antioxidant capacity were obtained with water as extraction solvent, so the most appropriate technique to extract phenolic compounds is extraction by heating (infusion) with values of 464 ± 5 mg GAE / 100 g sample (TPC), 123 ± 5 mg QER / 100 g (TFC), 3.2 ± 0.1 mmol trolox / 100 g (ABTS) and 1.9 ± 0.1 mmol trólox / 100 g (DPPH), followed by extraction by methanol as solvent in the ultrasound-assisted extraction technique indirectly and directly, respectively.

2. INTRODUCCION

2.1. Plantas y especias aromáticas.

Las plantas y las especias, especialmente las especias aromáticas y sus extractos, han tenido un creciente interés en la industria alimentaria y en la investigación científica, debido a sus propiedades antioxidantes, que les permite competir con otros antioxidantes naturales y sintéticos utilizados actualmente (Suhaj, M., 2006). Estas propiedades se deben en gran cantidad a sustancias como los compuestos fenólicos (Calucci, L. et al., 2003). Las hierbas y especias usadas, por lo general para condimentar platos, se han caracterizado por ser una excelente fuente de compuestos fenólicos (Carlsen, M. H. et al., 2010), aportando grandes beneficios frente a los efectos adversos de radicales libres y estrés oxidativo celular.

Actualmente un gran número de plantas se usan como antioxidantes en la industria alimentaria. En vista de este gran auge, los estudios que se realizan en la búsqueda de antioxidantes seguros aumentan, para mantener la calidad del producto. La eficacia antioxidante de especias como el romero, tomillo, orégano y

clavo (Berdahl, D. R.; Nahas, R. I.; Barren, J. P., 2010) se han experimentado en diversos alimentos e incluso se han usado en el desarrollo de complementos alimenticios; por todo ello también representan un rol importante en la industria farmacéutica (Kähkönen, M. P. et al., 1999).

2.2. Radicales libres, estrés oxidativo y defensa antioxidante celular

Los radicales libres son compuestos que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. La molécula estable que le cede el electrón se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que destruye nuestras células, moléculas y tejidos. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos (Finkel y Holbrook, 2000).

Los radicales libres se sintetizan fisiológicamente en el organismo humano como parte del metabolismo energético. Los más relevantes son los radicales derivados de oxígeno, estos se denominan de forma colectiva especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS). Cuando el aumento del contenido intracelular de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Gutteridge y Halliwell, 1999).

Los antioxidantes son sustancias que pueden prevenir los efectos adversos de radicales libres y estrés oxidativo sobre las funciones fisiológicas humanas y forman parte de los alimentos y plantas (Patthamakanokporn et al., 2008). Para minimizar los efectos adversos dichos, la capacidad antioxidante celular comprende mecanismos mediante los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres y, por consiguiente, el estrés oxidativo (Greenwald, 1990). Estos mecanismos comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con capacidad antioxidante. Los antioxidantes exógenos provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides. La

vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario (Kinsella *et al.*, 1993).

Según su mecanismo de reacción los antioxidantes se pueden clasificar en (Oliveras, 2005):

- Primarios: impiden la formación de radicales libres, detienen la reacción en cadena y se comportan como captadores de estos radicales libres, como es el caso de la vitamina C, E y de polifenoles como el resveratrol.
- Secundarios: interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres o desplazan las especies reactivas. De este modo, se inhibe la generación de radicales libres, como es el caso del ácido ascórbico y de los carotenos.
- Terciarios: reparan el daño causado a las moléculas por los radicales libres o eliminan aquellos que se han dañado. Modifican el potencial redox sobre todo los antioxidantes como la vitamina C, polifenoles y selenio.

2.3. Estructura química y clasificación de los compuestos fenólicos

Los tres grupos más importantes en los que se dividen los compuestos fenólicos son: flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles. Químicamente los fenoles pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, incluyendo a sus derivados funcionales.

Las plantas y alimentos contienen una amplia variedad de derivados fenólicos incluyendo fenoles simples, fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas. Algunas de las propiedades que se les confiere a los fenoles son la función de antibióticos, uso como pesticidas naturales, agentes protectores de los rayos UV y aislantes en las paredes celulares (Shahidi y Naczk, 2004).

Las antocianinas son otro grupo derivado de los fenoles, las cuales están distribuidas ampliamente en alimentos, especialmente en frutas y tejidos florales y son utilizadas como nutraceuticos en su forma seca y pulverizada.

Lo anterior ha generado el interés de estudiar y cuantificar los compuestos y la generación de metabolitos a partir de los grupos fenólicos, midiendo su capacidad antioxidante entre otras propiedades (Gil *et al.*, 2002).

- *Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenilacéticos*

Los fenoles simples como el fenol, cresol, timol y resorcinol están ampliamente distribuidos entre todas las especies vegetales. Igualmente, los ácidos fenólicos como el gálico, vainillínico, *p*-hidroxibenzoico, y los aldehídos como la vainillina, también son abundantes en plantas superiores y helechos. Por el contrario, existe poca información en la literatura científica sobre los ácidos fenilacéticos en los vegetales (Martínez *et al.*, 2000).

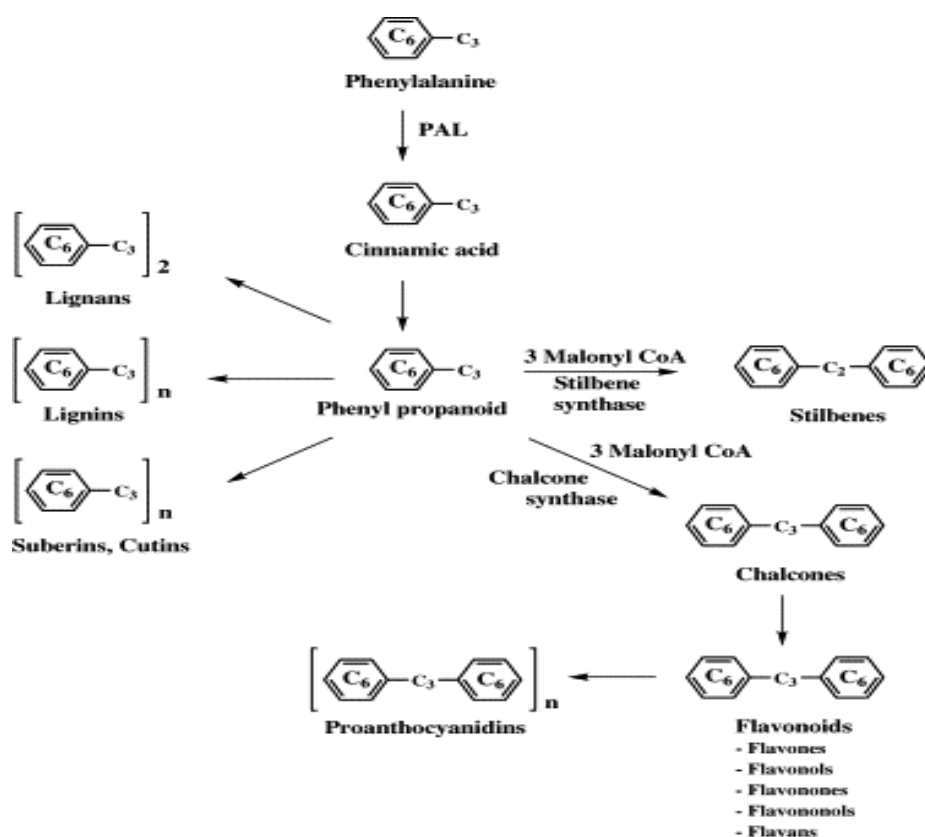


Figura 1. Producción de fenilpropanoides, estilbenos, lignanos, ligninas, suberinas, cutinas, flavonoides y taninos de la fenilalanina. Adaptado de Shahidi y Naczk (2004).

Ácido	Nombre científico	Radical	Radical 2	Radical
<i>p</i> -	4-Hidroxibenzoico	H	OH	H
Protocatecoico	3,4-Dihidroxibenzoico	OH	OH	H
Vainillínico	4-Hidroxi-3-	OCH ₃	OH	H
Siríngico	3,5-Dimetoxibenzoico	OCH ₃	OH	OCH ₃
Gálico	3,4,5-	OH	OH	OH

Tabla 1. Radicales de algunos ácidos fenólicos (Shahidi y Naczk, 2004).

Los ácidos fenólicos presentan generalmente actividad antioxidante en frutas, verduras y otras plantas (Zheng y Wang, 2001).

- *Ácidos cinámicos, cumarinas e isocumarinas*

Los ácidos cinámicos se encuentran raramente libres, ya que por regla general, se hallan presentes en forma de derivados. Así por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido quínico como ácido clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico. Las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósido, mientras que los cromonoles son menos conocidos y se forman a partir de las antocianidinas ante el incremento del pH del medio (Martínez *et al.*, 2000).

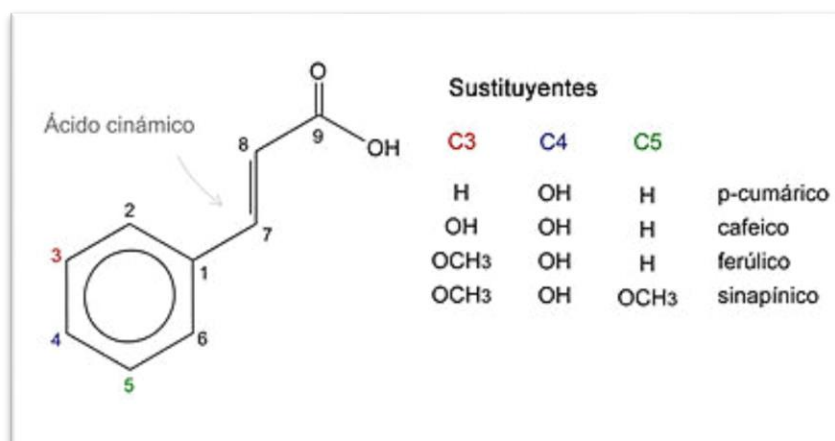


Figura 2. Estructura química del ácido cinámico y derivados.

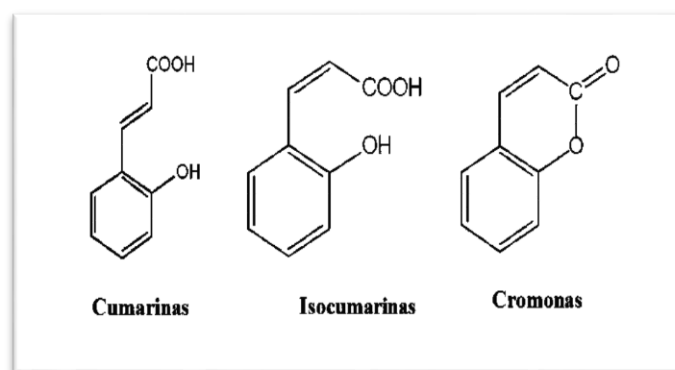


Figura 3. Estructura química de compuestos fenólicos derivados de cumarina y cromonas.

- *Lignanos y neolignanos*

Los lignanos son polifenoles biológicamente activos que dan origen a muchas estructuras químicas presentes en la naturaleza (Sarría, 2005).

Estos son metabolitos de plantas de bajo peso molecular formados por el acoplamiento oxidativo de unidades de hidroxifenilpropano. Los lignanos constituyen monómeros y polímeros del ácido hidroxicinámico y también del alcohol cinámico, propenilbenceno y alilbenceno. El término lignano se aplica cuando el compuesto está formado a partir de uniones entre el ácido y/o el alcohol, mientras que cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno la molécula resultante se denomina neolignano (Martínez *et al.*, 2000).

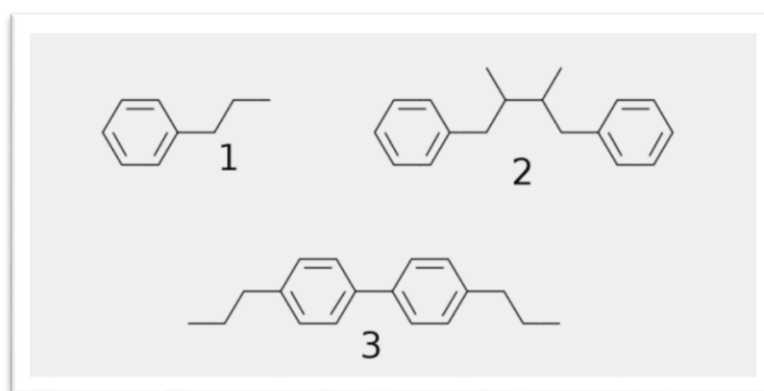


Figura 4. Estructura química de compuestos fenólicos derivados de lignanos y neolignanos

- *Taninos*

Muchos flavonoides se polimerizan en las propias plantas. Estos polímeros se conocen como taninos, los cuales son responsables de precipitar algunas proteínas y alcaloides (Sarria, 2005).

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles que contienen un número importante de grupos hidroxilos entre otros grupos funcionales, siendo capaces de unirse a proteínas y otras macromoléculas (Martínez *et al.*, 2000).

Los taninos se clasifican en dos grupos, hidrolizables y no hidrolizables o condensados.

Los taninos hidrolizables, constan de ácido gálico o ácido elágico, al que se esterifica un poliol no aromático, como el azúcar o el ácido quínico. En esta clase de taninos, también pueden producirse otras uniones (C-C ó C-O-C), para formar polímeros y complejos superiores, que tienen varios grados de resistencia a la fractura química.

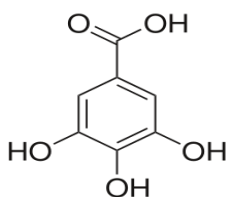


Figura 5. Estructura química del ácido gálico (tanino)

- *Flavonoides*

En la figura 6 se presentan algunos flavonoides presentes en alimentos, también denominados fitonutrientes. Son una subclase de los polifenoles que se caracterizan por poseer estructuras C6-C3-C6 y dos o más anillos aromáticos, y por tener cada uno, al menos un hidroxilo aromático y conectar con un puente de carbono.

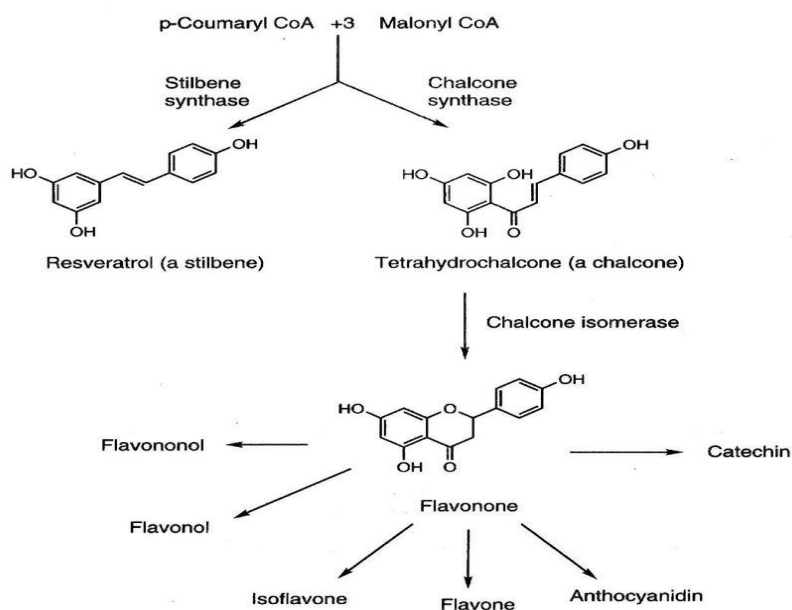


Figura 6. Producción de flavonoides y estilbenos a partir de fenilpropanoides.
Adaptado de Shahidiy Naczk (2004).

La clasificación de los flavonoides es la siguiente:

1. Flavonas y flavonoles
2. Flavononas y flavonololes.
3. Chalconas y Isoflavonoides
4. Dímeros de flavonoides, denominados diflavonoides (Sarría, 2005).

2.3.1. Compuestos fenólicos en plantas

Los fenoles son compuestos químicos que se encuentra ampliamente distribuidos en los alimentos y plantas. Originan una de las clases más importantes de metabolitos secundarios en plantas. Estos compuestos constituyen un amplio grupo de sustancias, con diferentes estructuras químicas y actividades metabólicas. Existen más de 8000 compuestos fenólicos identificados (Shahidi y Nazk, 1995).

Los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales en las plantas, por lo que la obtención y preparación de productos con un alto contenido de estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, pudiendo incluso englobarlos dentro de los complementos funcionales nutraceuticos. Los nutraceuticos son productos provenientes de alimentos cuyas características

nutricionales y funcionales proporcionan beneficios contribuyendo a mejorar la salud y por tanto reducir el riesgo de padecer enfermedades.

La alta concentración de compuestos fenólicos presentes en plantas aromáticas como el tomillo, romero, orégano, entre otras, han demostrado presentar un alto poder antioxidante (Carlsen, M. H et al., 2010) por lo que son ampliamente utilizados como complementos nutraceuticos, además de utilizarse como condimentos alimentarios ya que su fragancia es persistente y posee propiedades bactericidas, útiles para la conservación de algunos alimentos (Chizzola, R. et al., 2008).

El tomillo y sus extractos, como complemento nutraceutico, se han usado a nivel digestivo para trastornos gastrointestinales. También es conocido su uso en diversas enfermedades como tos, bronquitis, laringitis y amigdalitis (Zheng, W.; Wang, S.Y., 2001). Además actúa como un agente antiparasitario, antihemítico, antiséptico, antiespasmódico y cicatrizante. (Baranauskiene, Ret al., 2003).

2.4. Consideraciones generales de la planta objeto de estudio.

Thymus vulgaris, conocido comúnmente como tomillo, es una planta aromática del género *Thymus* y de la familia *Lamiaceae*, procedente de la región mediterránea, aunque actualmente está distribuida por todo el mundo. Tiene unas hojas estrechas de un color verde agrisado oscuro, generalmente son aromáticas y las flores son tubulares de color malva, agrupadas en el extremo en ramas.

Thymus vulgaris posee dos componentes principales: el timol y el carvacrol que son los compuestos aromáticos principales del mismo. Según (Perestrelo et al., 2016) *Thymus vulgaris* tuvo un 67% de timol, mientras (Bertoli et al., 2010) detectaron entre 50-55% en las diferentes variedades de *Thymus vulgaris*. Los de menor concentración son los sesquiterpenos que se encuentran en menor cantidad en todas las partes de la planta del tomillo (hoja, flores y tallo) siendo el principal componente el trans-cariofileno (Guillen, M. et al., 1998). La planta contiene además ácidos fenólicos: como el ácido cafeico, clorogénico, cinámico, quínico y ferúlico y flavonoides como la apigenina y derivados de la quercetina (Roby, M. H. et al., 2013).

2.5. Métodos de extracción de compuestos fenólicos

Para la separación de los compuestos fenólicos de las plantas se usan generalmente técnicas de extracción sólido- líquido con la utilización de diferentes disolventes o extractantes de distinta polaridad. Estos suelen ser metanol, etanol, agua y mezcla hidroalcohólicas, así como otros extractantes como el acetato de etilo y acetona.

La extracción de compuestos orgánicos mediante disolventes, en general, se puede clasificar en dos grupos, en función de que se necesiten o no un aporte de calor para favorecer la extracción (Cámara, C., 2002). Esta misma clasificación se puede aplicar a la extracción de compuestos fenólicos en plantas.

- Los que necesitan un aporte de calor para favorecer la extracción como la extracción Soxhlet, infusión, decocción y extracción asistida por microondas. La extracción Soxhlet se trata de una destilación- extracción mediante calentamiento y con un alto consumo de agente extractante. Por otro lado, la decocción se trata de la adición de la materia vegetal al agente extractante, llevando hasta ebullición la mezcla durante un tiempo determinado. No obstante la infusión, es un tipo de extracción, generalmente acuoso, donde se calienta el disolvente hasta una temperatura determinada (aproximadamente 80°C), con la posterior adición de la materia vegetal.
- Los que se realizan sin aporte de calor como son la maceración, agitación magnética simple y agitación asistida por ultrasonidos. La maceración es un tipo de extracción muy sencillo ya que se trata de añadir a la materia vegetal una cantidad de agente extractante durante un periodo de tiempo y a temperatura ambiente (Ortega-Heras et al., 2012). Sin embargo, la extracción mediante agitación magnética tiene la modalidad que difiere de la anterior en que en esta existe la agitación, favoreciendo el contacto entre el analito y el disolvente. Luego, la extracción asistida por ultrasonidos puede ser de dos tipos, tratándose de una extracción asistida por ultrasonidos directa o indirecta. La directa resulta de un contacto directo entre las ondas de ultrasonidos y la muestra, como es el caso de la sonda de ultrasonidos. Sin embargo, la extracción indirecta se trata de un contacto entre las ondas ultrasonidos y la muestra mediante un baño de agua.

Recientemente ha habido un interés creciente en el uso de la extracción con fluidos supercrítico (EFS) con dióxido de carbono como solvente. Este proceso usa las propiedades de los gases por sobre sus puntos críticos para extraer en forma selectiva los componentes solubles de una materia prima (Cavero et al., 2006).

Características	Tipo de extracción					
	Asistida por ultrasonido	Asistida por microondas	Por fluidos supercríticos	Infusión	Agitación magnética	Soxhlet
T.Ex	10-60 min	3-30 min	10-60 min	5-10 min	1-4 h	6-24 h
T.M	1-30 g	1-10 g	1-5 g	1-30 g	1-30 g	1-30 g
Dis	50-200 mL	10-40 mL	30-60 mL	50-200 mL	< 50 mL	150-500 mL
V	Fácil manejo, segura, uso moderado de solvente	Rápido, fácil manejo, uso moderado de solvente	Rápido, seguro, no es necesario filtrar, alta selectividad	Rápido, segura, uso moderado de solvente	No es necesario el uso de equipos sofisticados	No es necesario el uso de equipos sofisticados
D	Paso de filtración requerido, posible degradación de los analitos a altas frecuencia	Riesgo de explosión (El solvente puede absorber la energía de microondas), costosa, paso de filtración requerido	Muchos parámetros para optimizar	Posible degradación de los analitos termolábiles	Riesgo de derrames y exposición a vapores orgánicos, Posible degradación de los analitos termolábiles	Riesgo de exposición a vapores orgánicos, Degradación de analitos termolábiles

Tabla 2. Características principales, ventajas y desventajas de disitntos tipos de extracción (Bendicho et al. 2012; Chemat & Khan, 2011). (T.Ex: tiempo de extracción; T.M: tamaño de muestra; Dis: disolvente; V: ventajas; D: desventajas).

2.6. Métodos de evaluación del contenido total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

Este Trabajo Fin de Grado presenta un estudio, teniendo en cuenta distintas técnicas de extracción, realizado sobre el contenido total de compuestos fenólicos y de flavonoides, así como la capacidad antioxidante de una planta aromática, ya nombrada, utilizada en la elaboración de infusiones, como complemento alimenticio y como condimento alimentario

La determinación de la capacidad antioxidante es llevada a cabo mediante diversos métodos ya que no existe un método que refleje de forma completa el perfil del antioxidante. La presente memoria ha sido desarrollada mediante varios métodos. Las condiciones ideales que debe reunir un procedimiento para la determinación de la capacidad antioxidante son: tener un mecanismo químico definido y un punto final, evaluar reacciones de transferencia de electrones y de átomos de hidrogeno y ser adaptable para medir antioxidantes hidrófilos y lipófilos. (Romero, 2012).

2.6.1. Mecanismos de reacción

Los antioxidantes pueden inactivar los radicales a través de dos vías principales: reacciones de transferencia de átomo de hidrógeno (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET). El resultado final es el mismo, independientemente del mecanismo, pero la cinética y las reacciones colaterales difieren (Huang et al., 2005).

En las reacciones tipo HAT, se inactiva el radical por donación de un átomo de hidrógeno por parte del antioxidante. La reacción se muestra en la Figura 7, siendo $X^\bullet$ el radical libre y AH, el antioxidante:

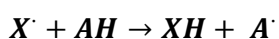


Figura 7. Reacción de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).

El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial. Las reacciones HAT vienen determinadas por la entalpia de disociación del grupo donador de hidrógeno en la molécula antioxidante. Las reacciones HAT dependen del pH y del solvente, y normalmente son muy rápidas (Huang et al., 2005).

Por otro lado, en las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir cualquier compuesto, incluyendo, metales, carbonilos y radicales.

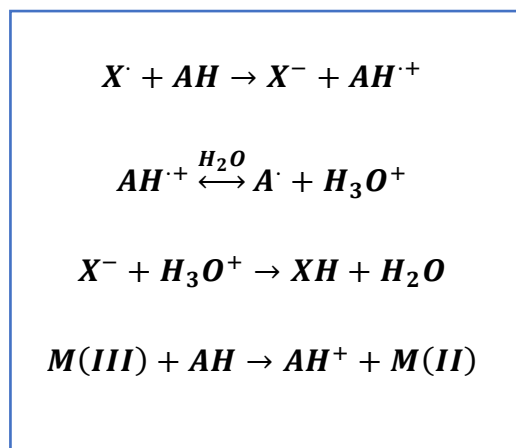


Figura 8. Reacciones de transferencia de un electrón (SET)

Los mecanismos SET y HAT casi siempre ocurren al mismo tiempo, el pH y la estructura de los antioxidantes determinará cuál de ellos es el predominante.

La reactividad relativa en el método SET se basa principalmente en la desprotonación y en el potencial de ionización del grupo funcional reactivo, por lo que las reacciones son dependientes del pH. En general, el potencial de ionización disminuye con el incremento del pH, reflejando el aumento de la capacidad donadora de electrones con desprotonación.

Cuando $AH^{\bullet+}$ tiene un tiempo de vida alto, las reacciones secundarias producen interferencias significativas en el ensayo, también son muy sensibles a la presencia de trazas de contaminantes y otros componentes (particularmente metales) que pueden convertirse en la causa de una alta variabilidad, pobre reproductibilidad y poca consistencia de los resultados (Prior et al., 2005).

2.6.2. Determinación del contenido total en compuestos fenólicos (TPC)

El ensayo de Folin-Ciocalteu es el método más empleado para determinar el contenido de compuestos fenólicos en alimentos y plantas. El ensayo se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por los compuestos fenólicos en condiciones alcalinas. La naturaleza química exacta del reactivo de Folin-Ciocalteu no está claramente definida, pero se cree que está constituido por una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico que se reducen para producir un cromóforo de color azul con máximo de absorbancia a 765 nm (Shahidini, Zhong, 2015).

De los componentes del reactivo de Folin-Ciocalteu el molibdato es más fácil de reducir que el tungsteno, esto sugiere que la reacción de transferencia de electrones sea más frecuente entre los reductores y el molibdato.

En el ensayo, la reacción entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu tiene lugar a pH 10, el cual se alcanza mediante la adición de carbonato sódico. En condiciones básicas, la disociación del protón de los compuestos fenólicos conduce a la formación del ion fenolato, el cual es capaz de reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu.

El principal inconveniente de este ensayo es que en extractos de plantas pueden aparecer interferentes (otros compuestos reductores) que pueden reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu y producen que se determine de forma inexacta el contenido en compuestos fenólicos. Entre estos compuestos reductores encontramos al ácido ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (DHA) y azúcares reductores. La presencia de estos interferentes no debe ser un problema en las muestras a analizar en este trabajo.

En condiciones ácidas el reactivo de Folin-Ciocalteu y los compuestos reductores AA y DHA reaccionan rápidamente, esto se observa por la aparición de color azul justo cuando se mezcla el reactivo de Folin-Ciocalteu con el extracto. La observación de este color azul antes de adicionar el carbonato sódico nos indica la presencia de AA, DHA u otros compuestos reductores que no requieren la forma de fenolato para reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu (Sánchez et al., 2013).

2.6.3. Contenido total en flavonoides (TFC)

Este ensayo se basa en la capacidad quelante de los flavonoides y fue desarrollado por Woisky y Salatino, estos autores utilizaron AlCl_3 para formar complejos con flavonoides. Estos complejos presentan un color amarillo intenso. El valor de la absorbancia en este método se medía a 420 nm, utilizando quercetina como estándar. Este método ha sido modificado por (Chang et al, 2002) y es específico para la determinación del contenido en flavonas y flavonoles, la modificación consistió en la adición de acetato potásico después de la adición de cloruro de aluminio y la posterior medición de la absorbancia a 415 nm. La quercetina se sigue utilizando como estándar. Este último método es el que se ha utilizado en este trabajo.

El principio del método colorimétrico con AlCl_3 se basa en que este compuesto forma complejos estables con el grupo ceto del C-4 y los hidroxilos del C-3 de flavonoles y C-5 de flavonas (Figura 9). Además, el AlCl_3 forma complejos ácidos lábiles con los grupos ortodihidroxilos del anillo A o B de los flavonoides. Los 15 complejos formados por flavonoles con grupos hidroxilos en C-3 y C-5, como galangina, morina y canferol, al igual que los que poseen grupos orto-dihidroxilos adicionales, como rutina, quercetina y miricetina, tienen un máximo de absorbancia a 415-430 nm (Chang et al., 1997).

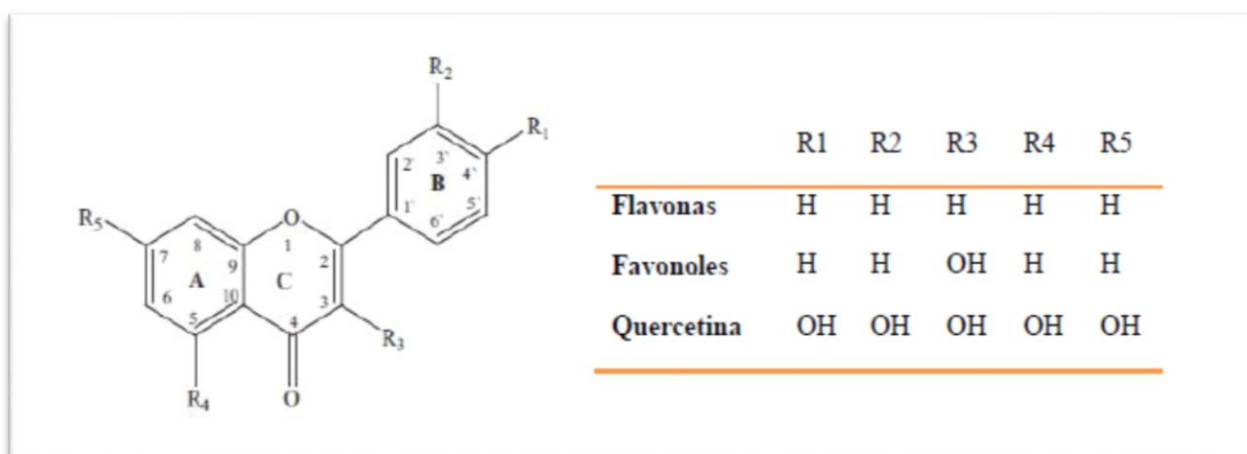


Figura 9. Estructura química de las flavonas y flavonoles.

2.6.4. Ensayo ABTS in vitro (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) in vitro.

Este método fue reportado inicialmente por Miller y colaboradores, y se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado $\text{ABTS}^{\cdot+}$, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) (Figura 9) por metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como equivalentes de Trólox o TEAC (por su nombre en inglés, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

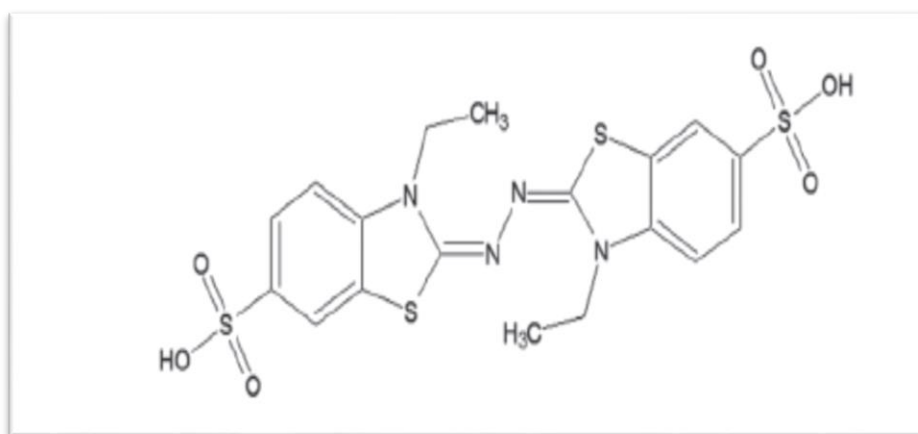


Figura 10. Estructura química del ABTS.

Entre las ventajas de este método está que los valores de TEAC de una amplia gama de alimentos están reportados lo que permite establecer comparaciones; adicionalmente puede ser usado en un amplio rango de pH y fuerza iónica, además de que el $\text{ABTS}^{\cdot+}$ es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Entre las desventajas están que el $\text{ABTS}^{\cdot+}$ debe ser generado previamente, que no es un radical fisiológico y que la cinética de reacción con algunos antioxidantes suele ser bastante lenta y, por lo tanto, el punto final de medición debe fijarse de manera arbitraria.

2.6.5. Ensayo DPPH in vitro (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) in vitro.

Este ensayo fue propuesto originalmente por Brand-Williams. El DPPH $\cdot$ (Figura 10) es uno de los pocos radicales orgánicos estable, presenta una fuerte

coloración violeta, es comercialmente disponible y no tiene que ser generado in situ como el ABTS $\cdot^+$. El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH $\cdot$, esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 516 nm. La reacción de estabilización se considera que transcurre principalmente mediante un mecanismo de transferencia electrónica, con un aporte marginal de HAT.

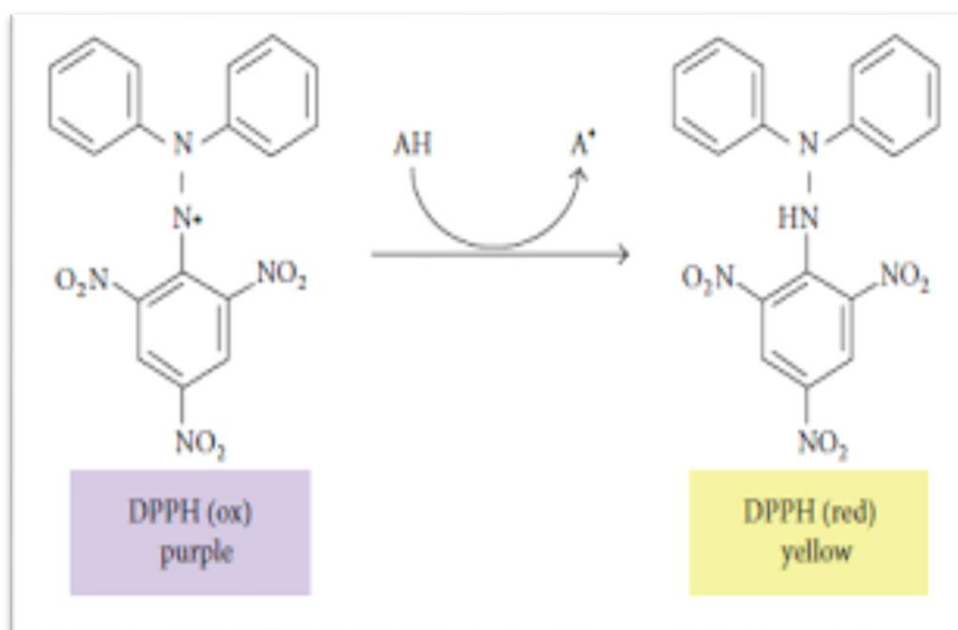


Figura 11. Principio de ensayo de la capacidad de captación de radicales DPPH.

Los resultados se suelen expresar como EC_{50} , es decir, la concentración de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del DPPH $\cdot$. Sin embargo, han surgido otros parámetros como la eficiencia anti-radicalaria (EA) basada en la cinética de la reacción y que involucran, además de la concentración de antioxidante, el tiempo necesario para ejercer su efecto.

Entre las ventajas de este método están su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental; sin embargo, entre las desventajas están la dificultad de interpretar los resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el del radical; adicionalmente el DPPH $\cdot$ es un radical estable, centrado en nitrógeno, que dista mucho de parecerse a las especies reactivas de

importancia biológica; de hecho muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo no lo hacen así con DPPH·, debido al impedimento estérico que representa la estructura química que rodea al radical, lo cual hace que sustancias pequeñas generalmente muestren una mayor actividad.

2.7. Objetivos

Los objetivos principales de este Trabajo Fin de Grado son:

- 1) Determinar el contenido total de compuestos fenólicos (ensayo Folin-Ciocalteu) y flavonoides (método complejo Al- flavonoide) y realizar un estudio de la capacidad antioxidante *in vitro* mediante ensayos ABTS y DPPH de los extractos de *Thymus vulgaris* (tomillo) utilizando diferentes técnicas de extracción.
- 2) Comparar estadísticamente los resultados obtenidos en función de las distintas técnicas de extracción empleadas, extracción asistida por ultrasonidos y extracción por calentamiento mediante infusión, para la obtención de los extractos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos y equipamiento

Los reactivos y estándares utilizados en la realización de los ensayos fueron adquiridos de Sigma- Aldrich (Madrid, España) y, todos ellos, con una calidad para análisis. El agua empleada para el desarrollo de esta memoria fue agua ultrapura procedente del sistema de purificación de agua Milli-Q ultra pura de Millipore (Milford, EEUU) y el disolvente común empleado para tratar las muestras y disoluciones fue metanol (>99%).

Para el método de determinación del contenido total de compuestos fenólicos (TPC) se utilizó ácido gálico ($\geq 99\%$), reactivo Folin-Ciocalteu y carbonato sódico (99%), mientras que para el contenido de flavonoides (TFC) se utilizó

quercetina (95%), tricloruro de aluminio hexahidratado (99%) y acetato potásico (99%). Por otro lado, en cuanto al ensayo de ABTS se utilizó ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (97%), sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (98%) y etanol (96%) y para el ensayo DPPH, ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (97%) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (97%).

El equipamiento utilizado consta de un espectrofotómetro Zuzi modelo 4201/50; balanza analítica modelo Entris 224I 1S marca Sartorius (Madrid, España); rotavapor Heidolph modelo Hei- VAP (Alemania); baño de ultrasonido Bandelin Sonorex Digital 10 P (Sigma Aldrich, Madrid, España); dispositivo de ultrasonido de sonda QSonica sonicators modelo Q55 (Newtown, CT. EEUU) y agitador magnético con placa calefactora marca IKA C- MAG modelo HS7 (Madrid, España).

3.2. Muestra seleccionada y pretratamiento

La especie de planta, *Thymus vulgaris* (tomillo), fue adquirida de un herbolario procedente de la ciudad de Jaén. La planta pertenece a una casa comercial conocida como Granadiet y viene como extracto seco.



Imagen 1. Planta seleccionada para realizar este Trabajo de Fin de Grado, *Thymus Vulgaris*.

La muestra debe de estar totalmente exenta de humedad y bien molida para facilitar por homogeneización la determinación de la capacidad antioxidante. *Thymus vulgaris* de la casa comercial Granadiet viene como un extracto bien seco y molido (imagen 1), por lo tanto, no necesita de un previo pretratamiento, es decir,

se prepara una cantidad de extracto seco y molido y se almacena a una temperatura de - 20°C hasta su extracción.

3.3. Extracción de compuestos fenólicos en *Thymus vulgaris*

Para la extracción de compuestos fenólicos de *Thymus vulgaris* (tomillo) se llevó a cabo una extracción sólido- líquido, empleando dos técnicas de extracción diferentes. La técnica de extracción asistida por ultrasonidos, como es el baño de ultrasonidos y el dispositivo de ultrasonidos de sonda y la extracción por calentamiento mediante una. Las dos primeras se realizaron mediante extractos metanólicos y la última, mediante calentamiento, hizo uso de extractos acuosos. La extracción asistida por ultrasonidos empleó 2.5 gramos de muestra seca y 50 mililitros de metanol para análisis y, sin embargo, la infusión empleó 2 gramos de muestra seca y 150 mililitros de agua ultra pura Milli- Q (imagen 2). Los procedimientos fueron los siguientes:

- Para el dispositivo de ultrasonidos de sonda, el tiempo de extracción fue de 10 minutos a una amplitud de 50 kHz y una temperatura moderada, por debajo de los 40 °C, como consecuencia de la sonicación.
- Para el baño de ultrasonidos el tiempo de extracción fue de 60 minutos a una temperatura ambiente, controlada mediante el uso de una refrigeración por introducción en el agua del baño de hielo procedente de agua ultra pura Milli- Q.
- La infusión se lleva a cabo mediante calentamiento de agua ultra pura Milli- Q en una placa calefactora a una temperatura de 80 °C, donde se depositará la muestra durante 5 minutos, una vez alcanzada la temperatura.

Los extractos metanólicos y acuosos resultantes se llevaron al rotavapor y se sometieron a presión reducida con el objetivo de evaporar el disolvente y preconcentrar la muestra, para obtener un extracto de muestra seca, con la ayuda de un secado posterior mediante cloroformo y una corriente de nitrógeno gaseoso. El resultado fueron extractos secos de *Thymus vulgaris* que se almacenaron en viales topacios de 2 mililitros y se congelaron a -20°C hasta su análisis.

A continuación se muestran imágenes realizadas durante la etapa de extracción de compuestos fenólicos a partir de las distintas técnicas de extracción empleadas.

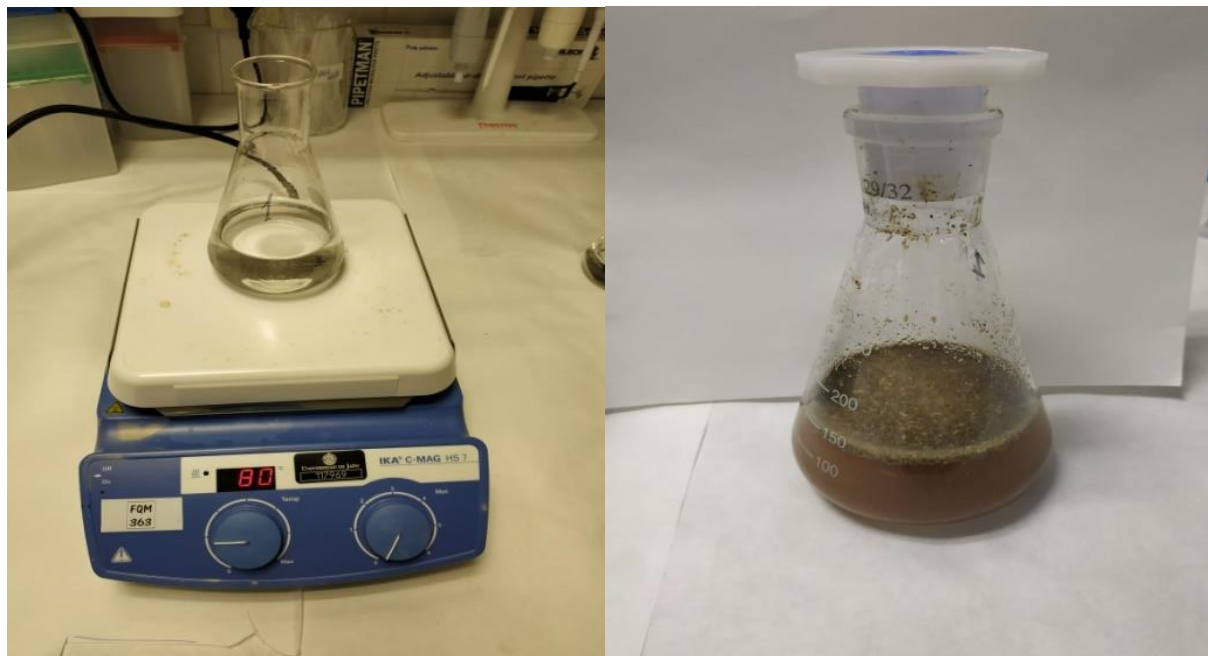


Imagen 2. Extracto acuoso de *Thymus vulgaris* obtenido por infusión.



Imagen 3. Extractos metanólicos de *Thymus vulgaris* en proceso de extracción por la acción de la sonda y baño de ultrasonido, respectivamente.



Imagen 4. Proceso de extracción de compuestos fenólicos. Extracto metanólico sometido a extracción por técnica de ultrasonido, vaporización del disolvente mediante presión reducida en el rotavapor, extracto húmedo resultante obtenido y vial topacio con extracto seco por la acción del cloroformo y nitrógeno.

3.4. Contenido total de fenoles (TPC) y flavonoides (TFC) y ensayos para la capacidad antioxidante

3.4.1. Contenido total de compuestos fenólicos (TPC)

Para determinar el contenido total de compuestos fenólicos se hizo uso de un método ya nombrado y conocido como Folin- Ciocalteu. El procedimiento llevado a cabo para este método fue el descrito por (Spínola et al., 2014).

La descripción de este procedimiento es mostrada en la figura 12.

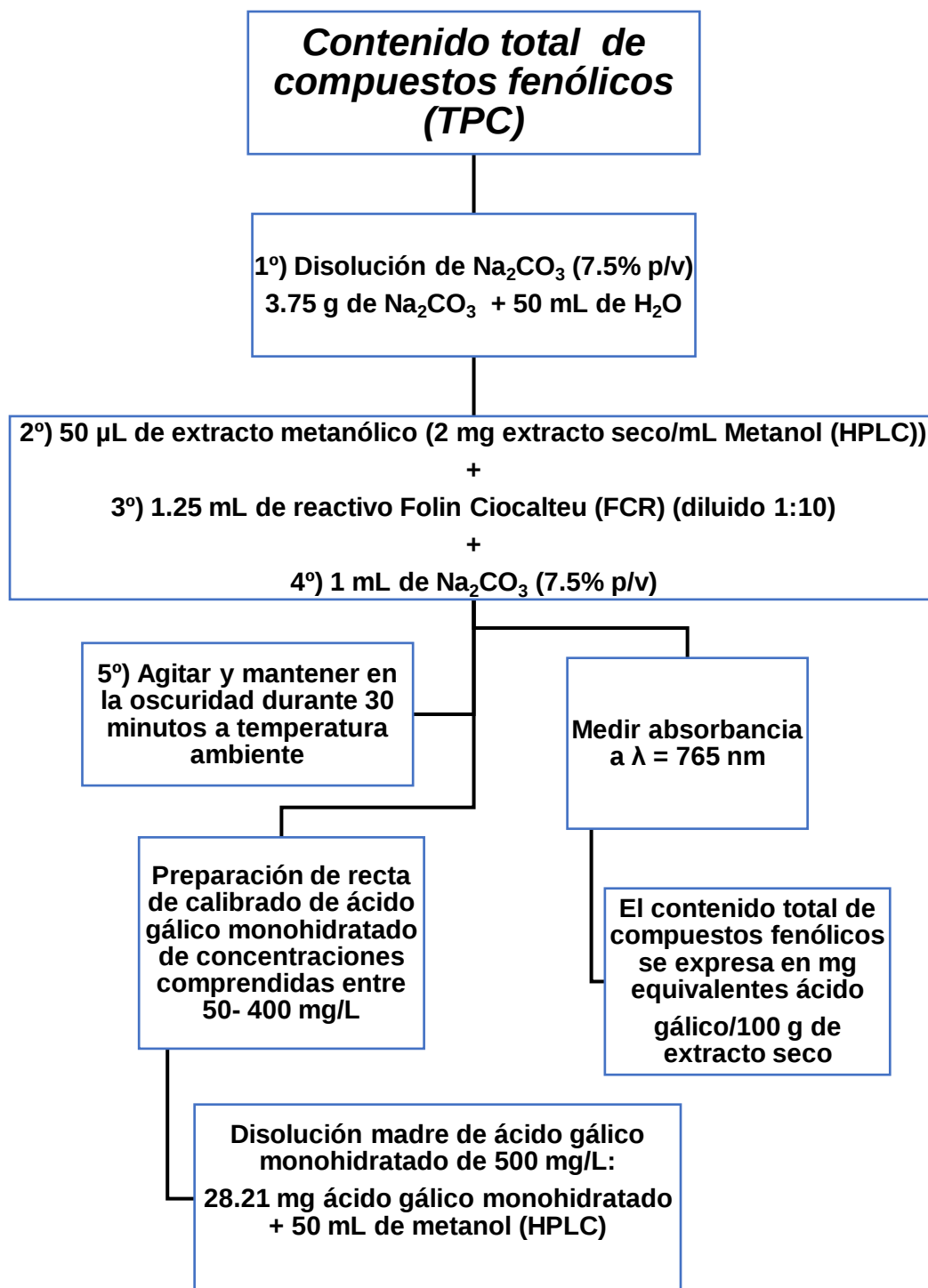


Figura 12. Procedimiento del método TPC

A continuación se muestran dos imágenes tomadas en la realización del método

TPC.

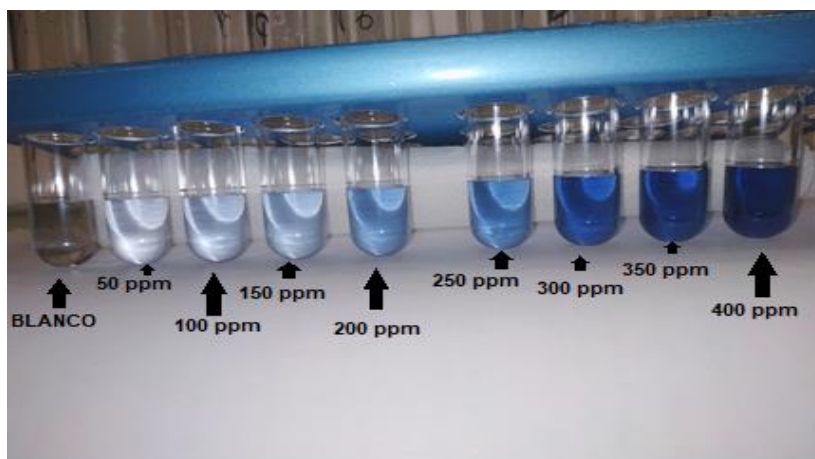


Imagen 5. Recta de calibrado del método TPC con distintas concentraciones del patrón, ácido gálico, donde se puede observar la variación en la intensidad de color conforme aumenta la concentración de ácido gálico.

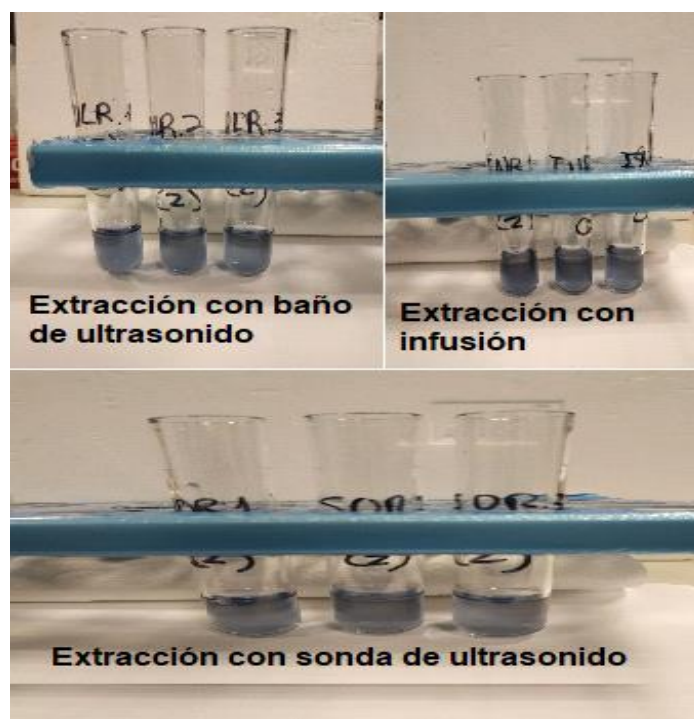


Imagen 6. Método TPC en la muestra de *Thymus vulgaris* extraído con las distintas técnicas de extracción empleadas en este Trabajo de Fin de Grado.

3.4.2. Contenido total de flavonoides (TFC)

Para determinar el contenido total de flavonoides se empleó el procedimiento descrito por (Spínola et al., 2014).

Este procedimiento será descrito en la figura 12.

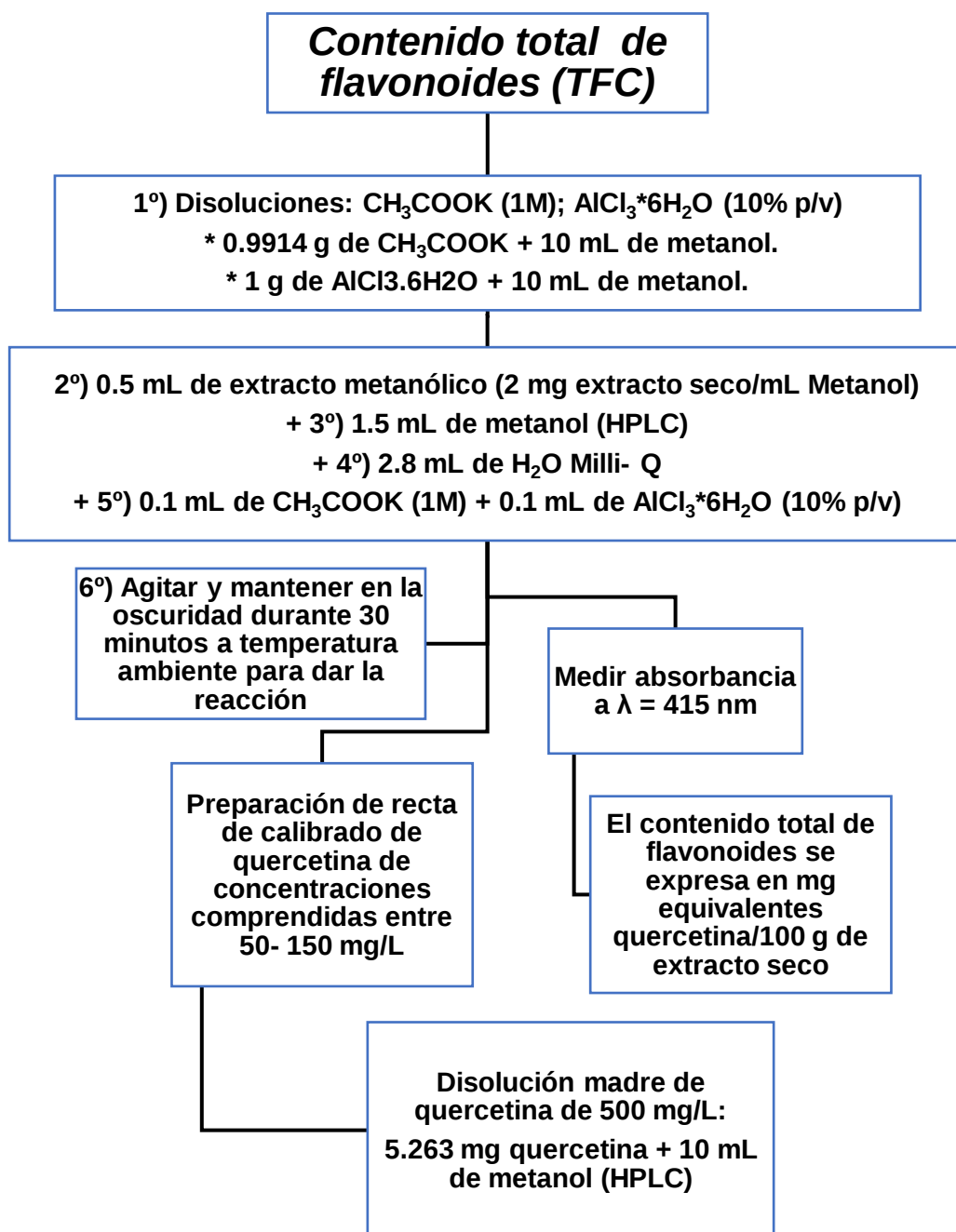


Figura 13. Procedimiento del método TFC.

A continuación se muestran dos imágenes tomadas en el método TFC.

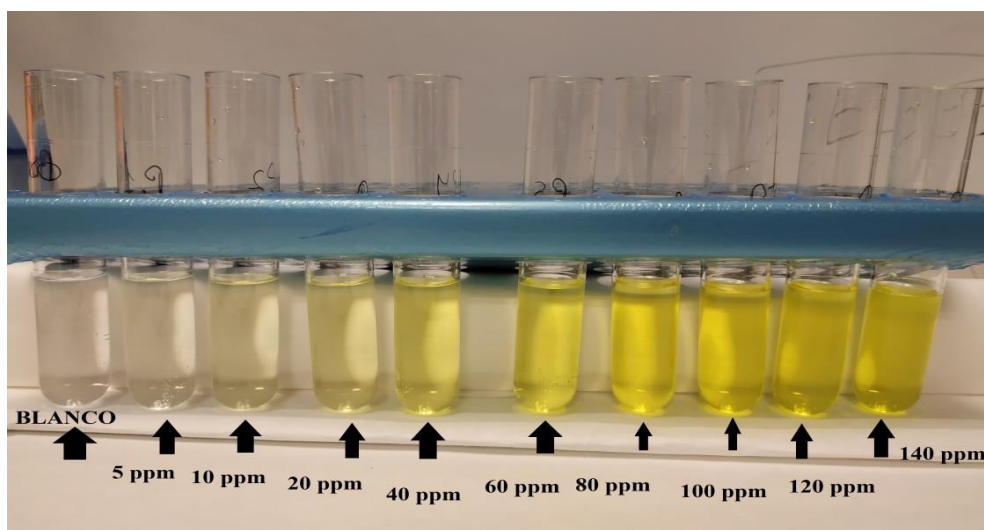


Imagen 7. Recta de calibrado del método TFC con distintas concentraciones del patrón, quercetina, donde se puede observar la variación en la intensidad de color con forme aumenta la concentración de quercetina.

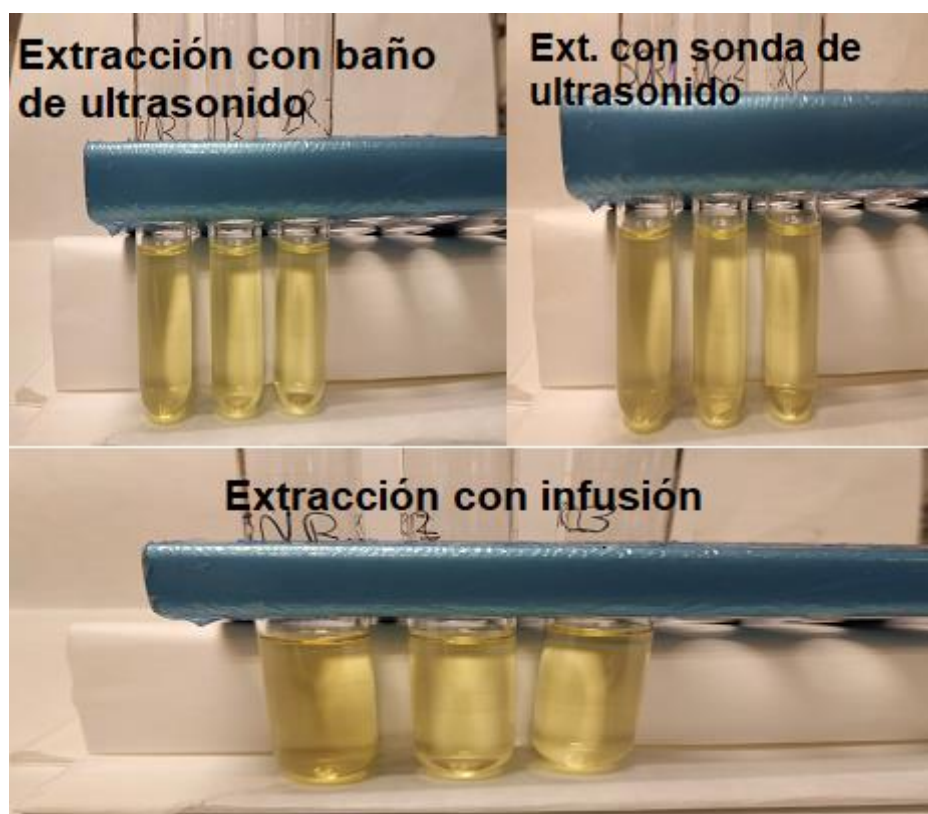


Imagen 8. Método TFC en la muestra de *Thymus vulgaris* extraído con las distintas técnicas de extracción empleadas en este trabajo.

3.4.3. Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) *in vitro*.

El procedimiento llevado a cabo para este ensayo fue el descrito por (Gouveia, Castilho, 2011; Spínola et al., 2014) y a continuación será mostrado mediante la figura 14.

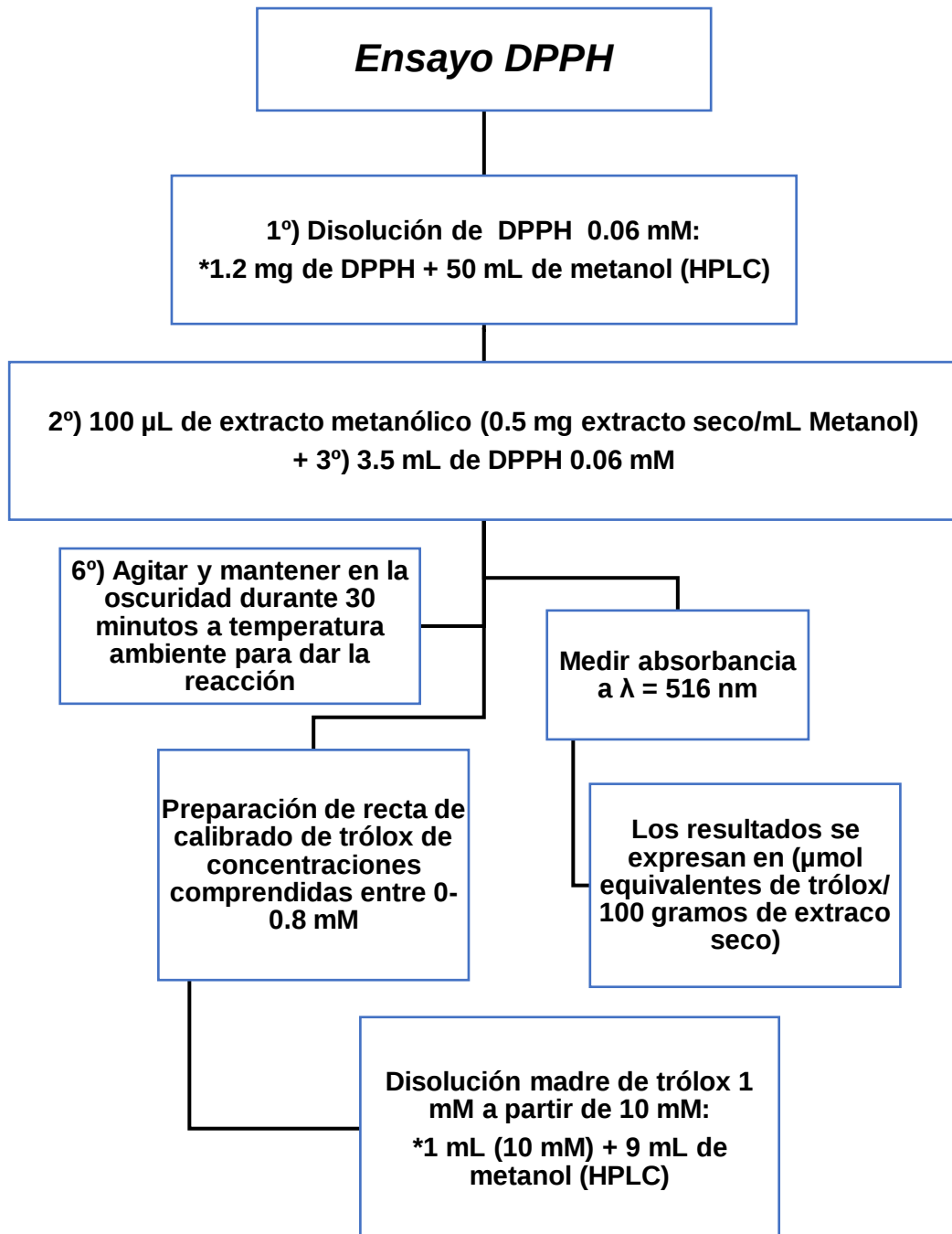


Figura 14. Procedimiento del ensayo DPPH.

A continuación se muestran una imagen tomada en el ensayo DPPH.

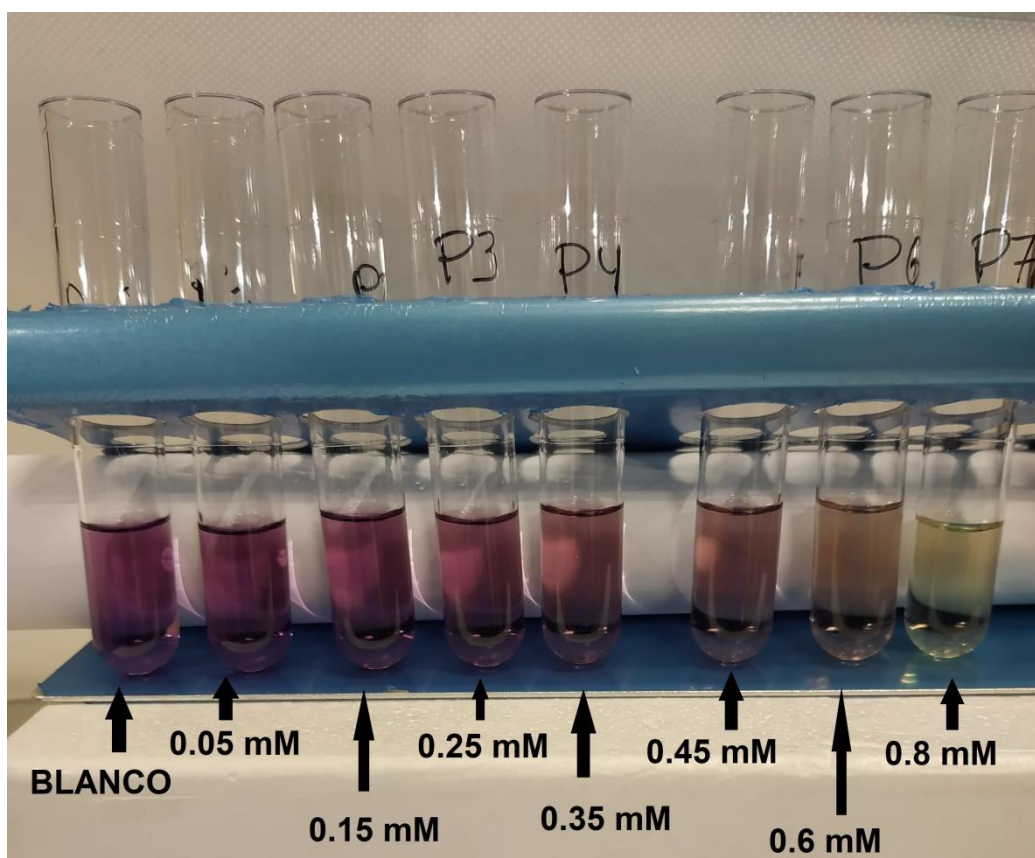


Imagen 9. Recta de calibrado del ensayo DPPH con distintas concentraciones del patrón, trólox, donde se puede observar la variación de color con forme aumenta la concentración de trólox.

3.4.4. Ensayo ABTS (Sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) *in vitro*.

Para realizar el ensayo ABTS se siguió el procedimiento descrito por (Gouveia & Castilho, 2011), teniendo en cuenta algunas modificaciones en las concentraciones de los extractos metanólicos de la muestra seleccionada. Según el procedimiento como tal, la concentración del extracto metanólico es de 10 mg/mL, sin embargo, la muestra de *Thymus vulgaris* contiene una gran concentración de compuestos a analizar. Por lo tanto, se hizo una dilución para determinar el ensayo con una concentración de extracto de 0,2 mg/mL para las muestras extraídas con el baño de ultrasonidos e infusión y de 0,35 mg/mL para las muestras extraídas con la sonda de ultrasonidos.

El procedimiento del ensayo se muestra en la figura 15.

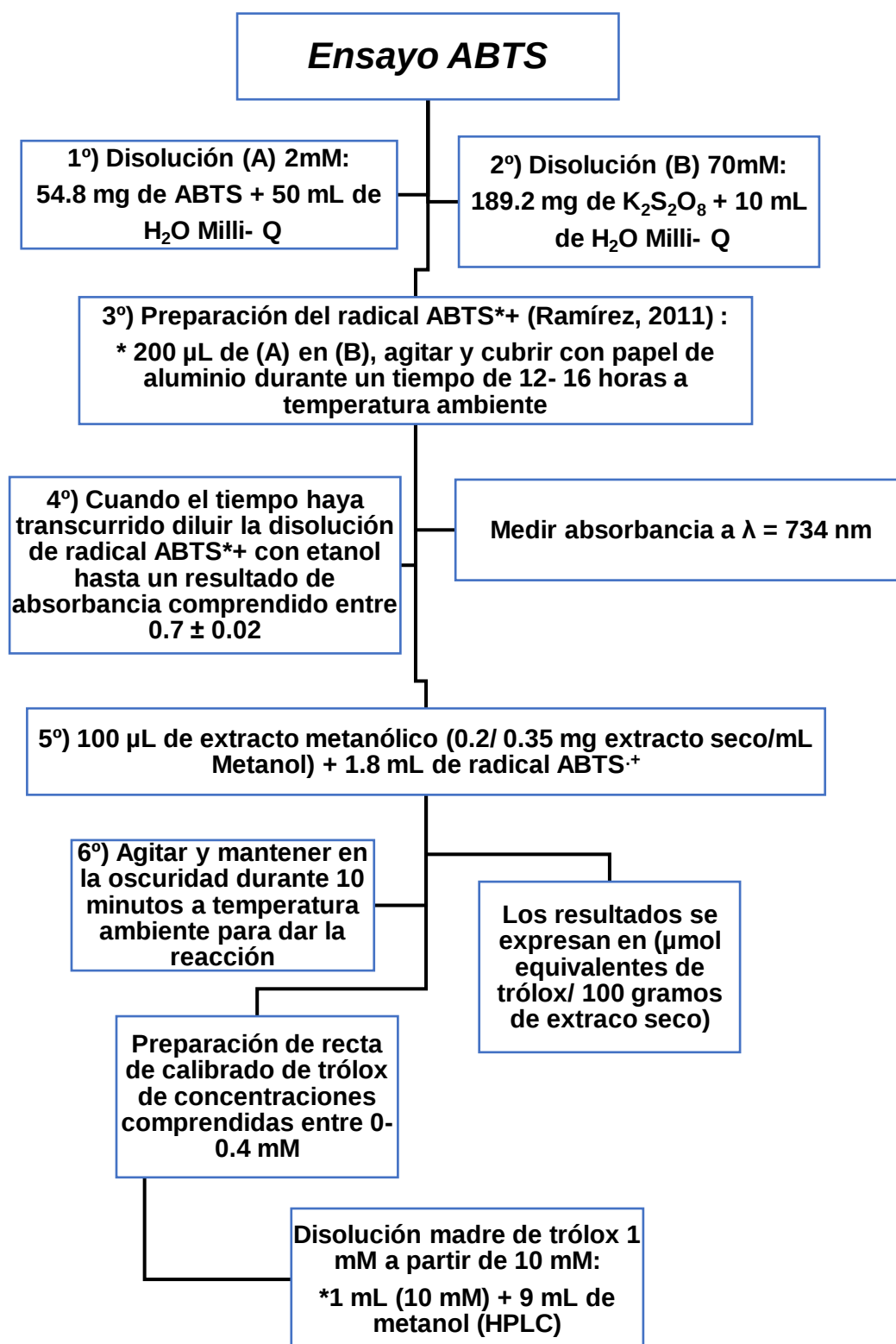


Figura 15. Procedimiento del ensayo ABTS.

A continuación se muestran dos imágenes tomadas en el ensayo ABTS.

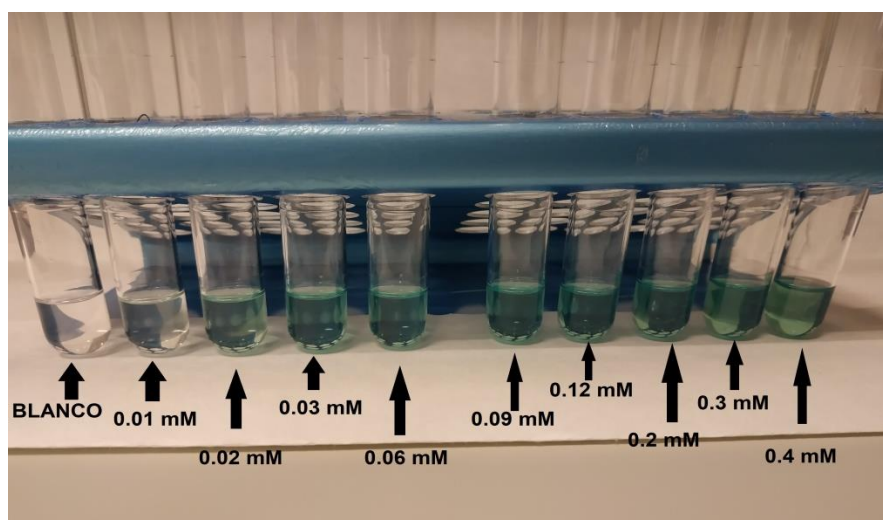


Imagen 10. Recta de calibrado del ensayo ABTS con distintas concentraciones del patrón, trólox, donde se puede observar la variación de color con forme aumenta la concentración de trólox.

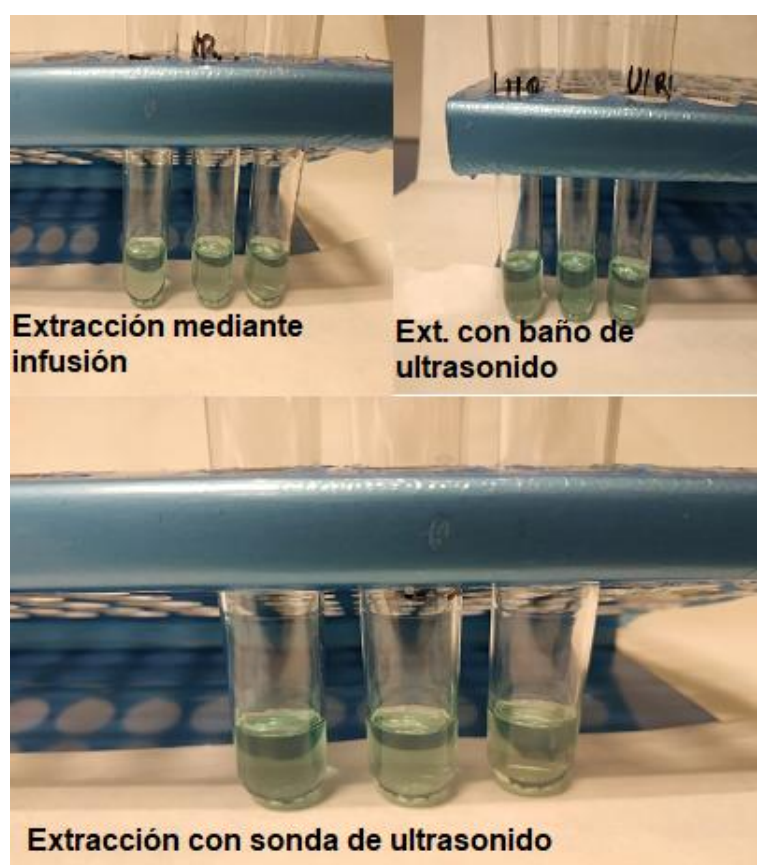


Imagen 11. Ensayo ABTS en la muestra de *Thymus vulgaris* extraído con las distintas técnicas de extracción empleadas.

3.5. Tratamiento de los datos.

Los resultados de los métodos y ensayos fueron realizados por triplicado en cada una de las técnicas de extracción empleadas y expresados como el valor medio $\pm$ límite de confianza. El análisis estadístico empleado para obtener los datos se lleva a cabo mediante la prueba *F de Snedecor* y *t de Student* mediante el análisis de datos de *Microsoft Office Excel*, para una probabilidad del 95 % ($p = 0.05$)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se muestran a continuación mediante la regresión lineal de las rectas de calibrado y sus correspondientes datos de concentración y absorbancia del patrón utilizado, para cada uno de los métodos realizados en este estudio.

Contenido total de compuestos fenólicos (TPC)

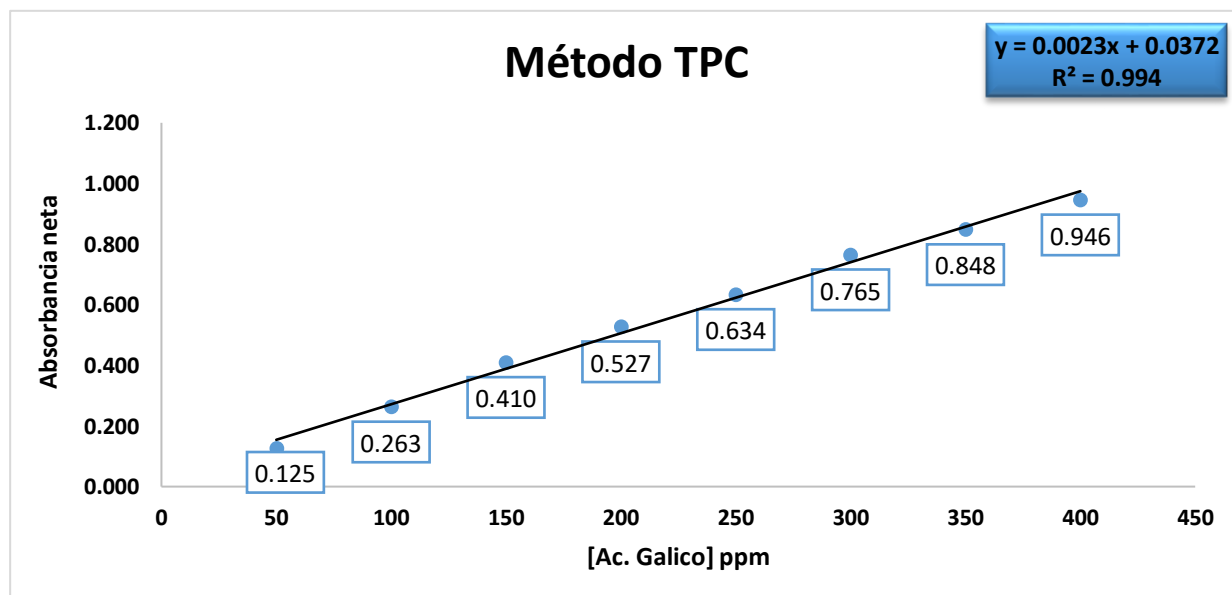


Figura 16. Recta de calibrado del método TPC, usando como patrón ácido gálico monohidratado y regresión lineal.

Contenido total de flavonoides (TFC)

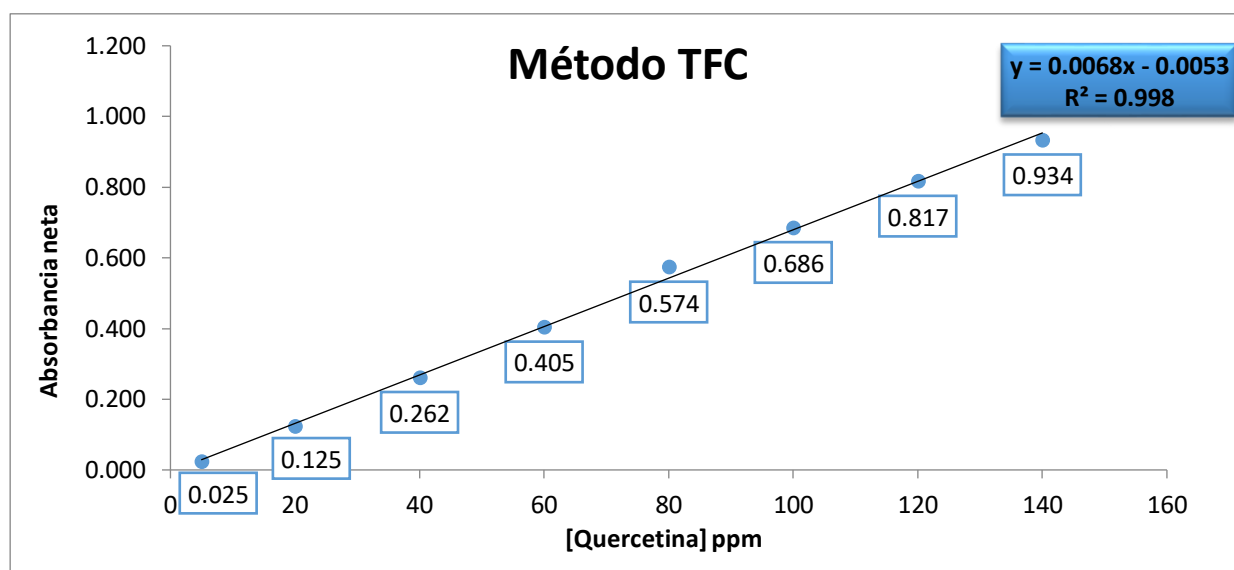


Figura 17. Recta de calibrado del método TFC, usando como patrón quercetina y regresión lineal.

Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

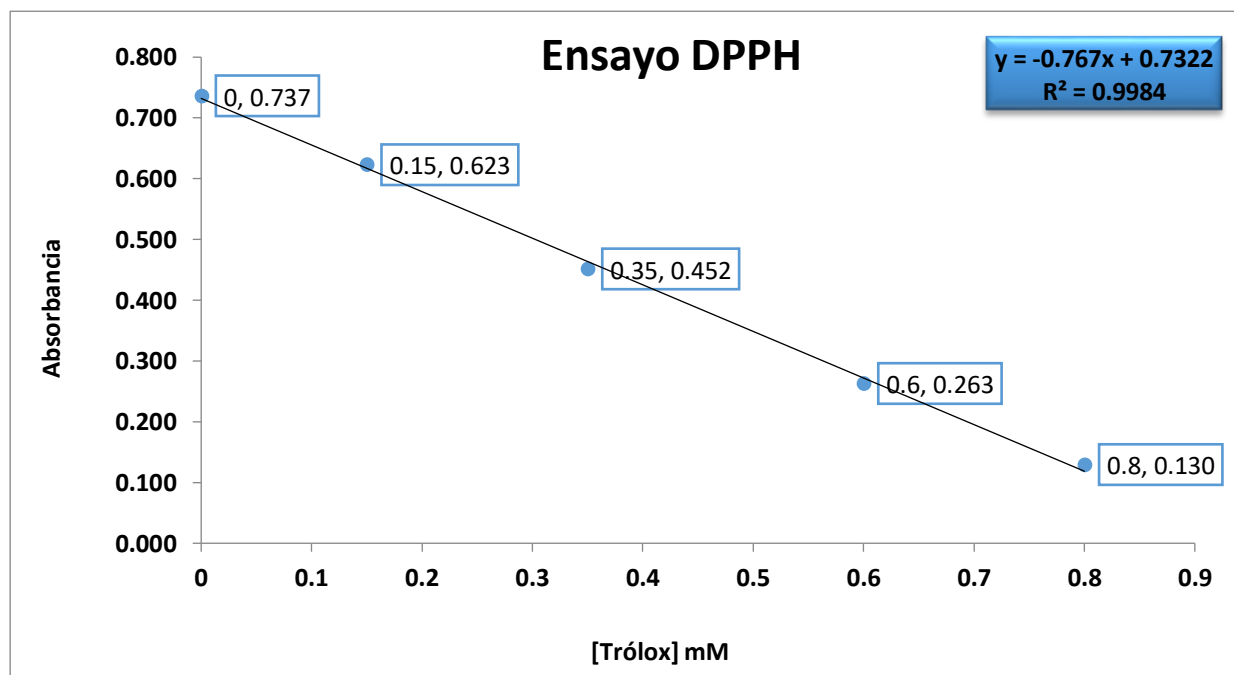


Figura 18. Recta de calibrado del ensayo DPPH, usando como patrón trólox y regresión lineal.

Ensayo ABTS (Sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)).

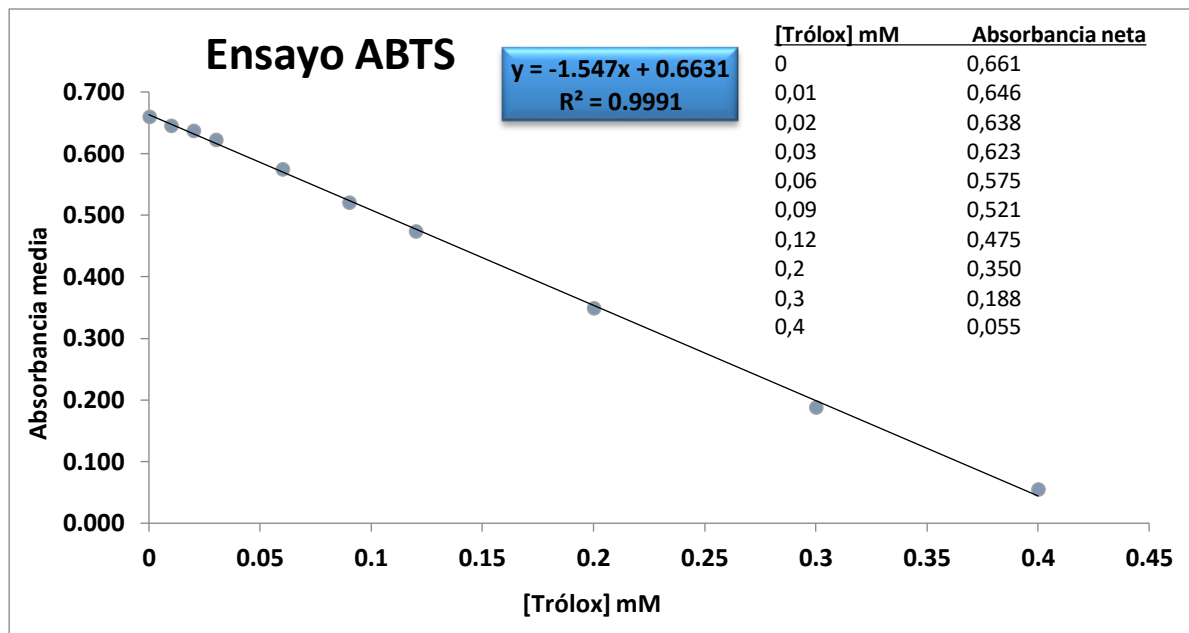


Figura 19. Recta de calibrado del ensayo ABTS, usando como patrón trólox y regresión lineal.

Resultados:

En la tabla 3, se representa la determinación del contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides y la capacidad antioxidante de *Thymus vulgaris* llevada a cabo con los tres tipos de extracción empleados.

	Tipo de extracción		
	Asistida por ultrasonidos		Mediante calentamiento
	baño	Sonda	Infusión
TPC	309 ± 1	230 ± 4	464 ± 5
TFC	101 ± 10	85 ± 9	123 ± 5
ABTS	2,3 ± 0,1	1,52 ± 0,01	3,2 ± 0,1
DPPH	1,36 ± 0,09	0,85 ± 0,04	1,9 ± 0,1

Tabla 3. Resultados obtenidos de los diferentes métodos y ensayos mediante las técnicas de extracción empleadas en este trabajo Fin de Grado. TPC y TFC vienen expresados como mg GAE/100 g de muestra y ABTS y DPPH como mmol trólox/100 g de muestra.

Con los resultados obtenidos para los diferentes ensayos se han realizado dos estudios comparativos. El primero de ellos es entre las dos modalidades de extracción asistida por ultrasonidos, donde se establecerá cuál es más adecuada para extraer mayor contenido de compuestos fenólicos. El segundo estudio tratará de una comparación estadística entre la modalidad más conveniente anterior y la extracción mediante calentamiento (infusión).

1º. Comparación entre los resultados obtenidos con la misma técnica de extracción.

- Determinación del contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides mediante extracción asistida por ultrasonidos.

	Determinación del contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides				
	Extracción asistida por ultrasonidos		Análisis estadístico		
	Baño	Sonda	F calculada	t calculada	Significación
TPC (mg GAE/100 g de muestra)	309 ± 1	230 ± 4	21,735	8,705	D.S
TFC (mg QER/100 g de muestra)	101 ± 10	85 ± 9	2,521	1,796	N.S

Tabla 4. Determinación del contenido total de compuestos fenólicos extraído mediante ultrasonidos. (GAE -Ácido Gálico- QER -Quercetina- D.S -Diferencia Significativa- N.S -No Significación-). (TPC -t teórica: 4,303-; -F teórica: 19-). (TFC -t teórica: 3,182-; -F teórica: 19-).

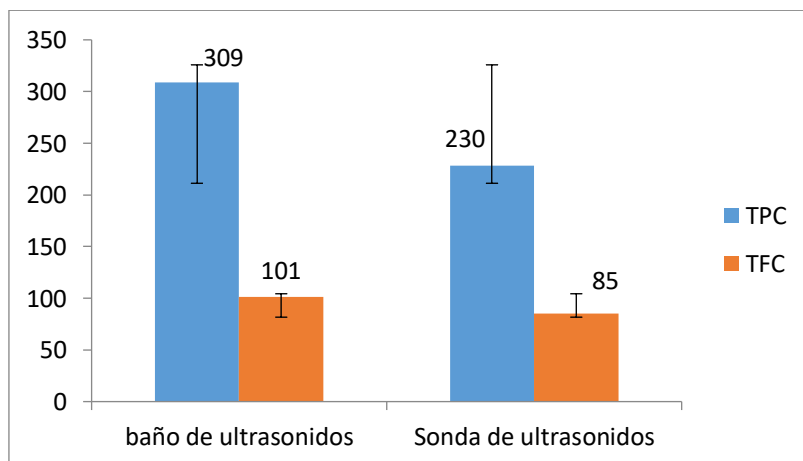


Figura 20. Comparación de los distintos tipos de extracción con ultrasonidos y métodos para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos. Las barras representan la desviación estándar en la determinación.

El análisis estadístico de los datos revela significación entre los resultados ($t_{calculada} > t_{teórica}$). Por lo tanto, la técnica de extracción asistida por ultrasonidos más conveniente para determinar el contenido total de compuestos fenólicos (TPC) es el baño de agua, en un 25,7 % más que la sonda. Por otro lado, en cuanto al método para calcular el contenido total de flavonoides (TFC) en tomillo, resulta invariable la elección del tipo de extracción asistida por ultrasonidos ya que el análisis estadístico de los datos revela que no hay significación entre los resultados ($t_{calculada} < t_{teórica}$).

- Determinación de la capacidad antioxidante mediante extracción asistida por ultrasonidos.

	Determinación de la capacidad antioxidante				
	Extracción asistida por ultrasonidos		Análisis estadístico		
	Baño	Sonda	F calculada	t calculada	Significación
ABTS (mmol Trólox/100 g de muestra)	2,3 ± 0,1	1,52 ± 0,01	38,454	11,327	D.S
DPPH (mmol Trólox/100 g de muestra)	1,36 ± 0,09	0,85 ± 0,04	2,087	11,535	D.S

Tabla 5. Determinación de la capacidad antioxidante extraída mediante ultrasonidos. (D.S - Diferencia Significativa- N.S -No Significación-). (ABTS -t teórica: 4,303-; -F teórica: 19-). (DPPH -t teórica: 2,776-; -F teórica: 19-).

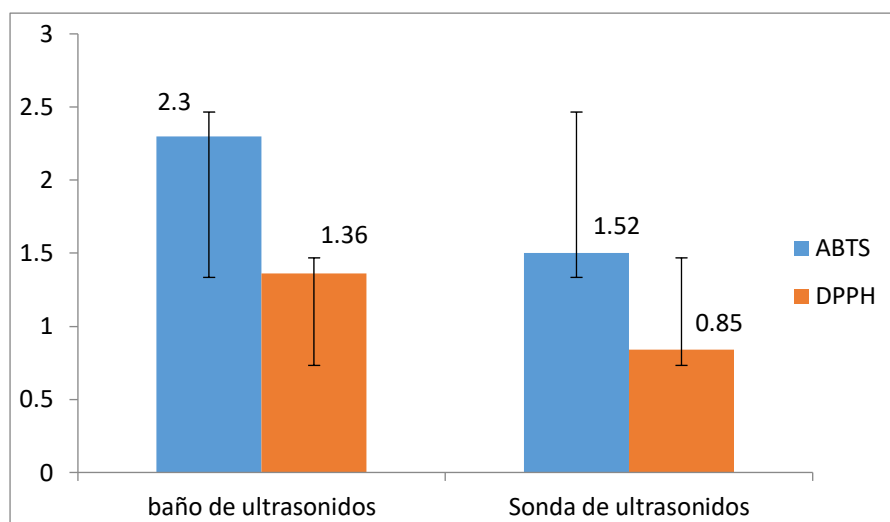


Figura 21. Comparación de los distintos tipos de extracción con ultrasonidos y ensayos para la determinación de la capacidad antioxidante. Las barras representan la desviación estándar en la determinación.

El análisis estadístico revela que hay significación ($t_{calculada} > t_{teórica}$) entre los valores medios obtenidos en los ensayos *in vitro*. La extracción asistida por ultrasonidos mediante el baño presenta valores mayores, $2,3 \pm 0,1$ y $1,36 \pm 0,09$ mmol Trólox/100 g de muestra, que los determinados mediante la extracción asistida por ultrasonidos con sonda, $1,52 \pm 0,01$ y $0,85 \pm 0,04$ mmol Trólox/100 g. Por lo tanto, el tipo de extracción asistido por ultrasonidos más adecuado para determinar la capacidad antioxidante de la planta es el baño de agua.

A la vista de los resultados, se concluye que la extracción con baño de ultrasonidos es más apropiada para la determinación tanto del contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides como para la capacidad antioxidante.

2º. Comparación entre los resultados obtenidos con las dos técnicas de extracción.

- Determinación del contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides a través de la extracción asistida por ultrasonidos con baño y mediante calentamiento.

En la tabla 6, se representan los resultados obtenidos mediante extracción con baño de ultrasonidos e infusión.

Determinación del contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides					
	Técnica de extracción		Análisis estadístico		
	Baño de ultrasonidos	Infusión	F calculada	t calculada	Significación
TPC (mg GAE/100 g de muestra)	309 ± 1	464 ± 5	1,655	10,469	D.S
TFC (mg QER/100 g de muestra)	101 ± 10	123 ± 5	10,006	2,649	N.S

Tabla 6. Determinación del contenido total de compuestos fenólicos extraído mediante ultrasonidos y calentamiento. (GAE -Ácido Gálico- QER -Quercetina- D.S -Diferencia Significativa- N.S -No Significación-). (TPC -t teórica: 4,303-; -F teórica: 19-). (TFC -t teórica: 3,182-; -F teórica: 19-).

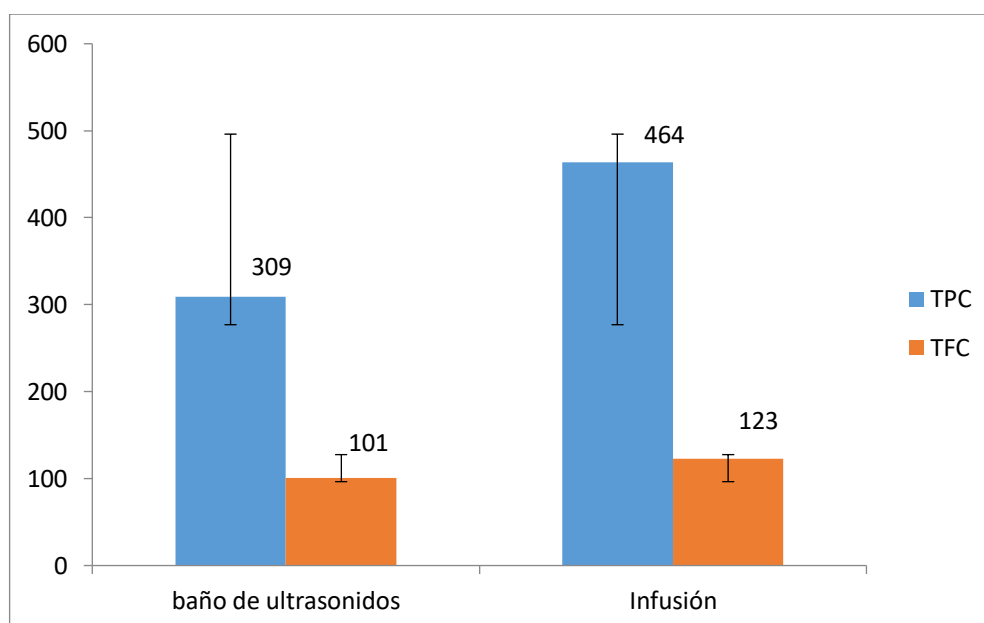


Figura 22. Comparación de las distintas técnicas y métodos para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos. Las barras representan la desviación estándar en la determinación.

El análisis estadístico confirma que hay diferencia significativa ($t_{calculada} > t_{teórica}$) en cuanto a los valores medios obtenidos en la determinación del contenido total de compuestos fenólicos (TPC). Los resultados obtenidos para la técnica mediante calentamiento por infusión fueron de 464 mg GAE/100 g, mientras que para la extracción mediante ultrasonidos con baño fueron de 309 mg GAE/100 g. Por lo tanto, la técnica más adecuada para determinar este

método es a través de la extracción mediante calentamiento por infusión, con un resultado mayor con respecto al obtenido mediante la técnica con baño de ultrasonidos, en un 33.4 %.

Sin embargo, en cuanto al método de determinación del contenido total de flavonoides (TFC), la selección de la técnica de extracción es invariable ya que los resultados no presentan significación ($t_{calculada} < t_{teórica}$).

- Determinación de la capacidad antioxidante a través de la extracción asistida por ultrasonidos con baño y mediante calentamiento.

En la tabla 7, se representan los resultados mediante extracción con baño de ultrasonidos e infusión para la determinación de la capacidad antioxidante del tomillo.

	Determinación de la capacidad antioxidante				
	Técnica de extracción		Análisis estadístico		
	Baño con ultrasonidos	Infusión	F calculada	t calculada	Significación
ABTS (mmol Trólox/100 g de muestra)	2,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1	2,922	6,394	D.S
DPPH (mmol Trólox/100 g de muestra)	1,36 ± 0,09	1,90 ± 0,1	9,080	4,245	D.S

Tabla 7. Determinación de la capacidad antioxidante extraída mediante ultrasonidos y calentamiento. (D.S -Diferencia Significativa- N.S -No Significación-). (ABTS -t teórica: 4,303-; -F teórica: 19-). (DPPH -t teórica: 2,776-; -F teórica: 19-).

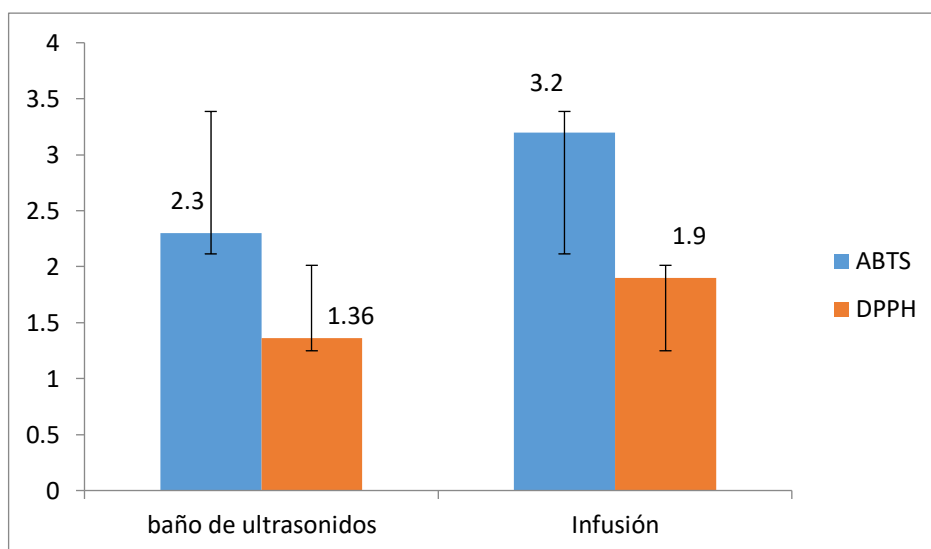


Figura 23. Comparación de las distintas técnicas y ensayos para la determinación de la capacidad antioxidante. Las barras representan la desviación estándar en la determinación.

El análisis estadístico de los valores medios obtenidos revela que existe significación entre ambas técnicas ($t_{calculada} > t_{teórica}$). La extracción mediante calentamiento por infusión presenta resultados mayores tanto en el ensayo *in vitro* ABTS como DPPH, $3,2 \pm 0,1$ y $1,90 \pm 0,1$ mmol Trólox/100 g, que los determinados mediante la extracción asistida por baño de ultrasonidos, $2,3 \pm 0,1$ y $1,36 \pm 0,09$ mmol Trólox/100 g. Por lo tanto, la técnica de extracción mas conveniente para determinar la capacidad antioxidante es mediante calentamiento por infusión.

A la vista de los resultados, se concluye que para determinar el contenido total de compuestos fenólicos (TPC) y la capacidad antioxidante, la técnica de extracción más apropiadas es mediante calentamiento por infusión. Sin embargo, teniendo en cuenta ambas técnicas, la determinación del contenido total de flavonoides (TFC) es invariable ante la selección de la técnica de extracción.

5. CONCLUSIONES

En la presente memoria se emplearon dos técnicas de extracción diferentes para extraer los compuestos fenólicos y determinar la capacidad antioxidante del tomillo, que fueron la extracción asistida por ultrasonidos y la

extracción mediante calentamiento. El tratamiento estadístico de los resultados ha revelado que la técnica más conveniente para extraer los compuestos fenólicos en *Thymus vulgaris* (tomillo), es la infusión, proporcionando valores superiores en un 25.7 % y 28.3 % con respecto a la extracción asistida por ultrasonidos mediante un baño en la determinación del contenido total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, respectivamente. Considero que esto puede ser debido a que los compuestos fenólicos que constituyen la planta de tomillo, son más solubles en agua que en disolventes alcohólicos. No obstante, no ha podido ser comprobado mediante técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) ya que esto no formaba parte de los objetivos de esta memoria.

Los resultados también han ofrecido información para saber que en esta memoria, las condiciones de extracción asistida por ultrasonidos de forma indirecta han beneficiado la extracción de compuestos fenólicos de la materia vegetal con respecto a la extracción de la misma de forma directa. Esto puede ser debido a que las condiciones empleadas en la extracción asistida por ultrasonidos con sonda acoplada no han sido las óptimas, ya que (Priego y Luque, 2004), reportan que la extracción asistida por ultrasonidos de forma directa proporciona unos resultados mayores conforme se aumenta la potencia ultrasónica.

Este trabajo ha dado como resultado unos valores con los que se puede observar que *Thymus vulgaris*, aparte de ser un condimento utilizado en la alimentación, sirve como fuente de compuestos bioactivos antioxidantes, ya que pueden contribuir, gracias a su capacidad antioxidante, a alargar la vida útil de otros alimentos y mejorar sus propiedades beneficiosas, como complemento alimenticio.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Venereo Gutiérrez, Justo R.

Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". Rev Cubana Med Milit 2002; 31(2):126-33

- Avello, Marcia; Suwalsky, Mario.
Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea
Nº 494– II Sem. 2006: 161-172
- Castroviejo & al. (eds.), Flora iberica (Real Jardín Botánico). Vol. 2 1 10 11 12 13 14
15 17 18 2 20 21 3 4 5 6 7 8
- J.A. Devesa (Castroviejo & al. (eds.), Flora iberica). Vol. Real Jardín Botánico Real
Jardín Botánico
- Valdés B., Talavera. S., & Fernández-Galiano E.
Flora Vascular de Andalucía Occidental (Ed. Ketres). Vol. 1 2 3
- A. P. Porras- Loaiza; A. López- Malo.
Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. Temas Selectos de
Ingeniería de Alimentos 3- 1 (2009); 121- 134.
- Pérez Tortosa, V. PFC07-VPT- Proyecto de investigación de los antioxidantes del
tomillo. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
- Fereidoon Shahidi, Priyatharini Ambigaipalan.
Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant
activity and health effects – A review. Journal of functional foods 18 (2015)
820–897
- Sánchez E, et al. (2013)

LYRM7/MZM1L is a UQCRFS1 chaperone involved in the last steps of
mitochondrial Complex III assembly in human cells. Biochim Biophys
Acta 1827(3):285-93
- Julian Londoño Londoño.
Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Parte
III, Capítulo 9.

- Ryman Aromaterapia, enciclopedia de las plantas aromáticas y de sus aceites esenciales; Segunda ed.; Editorial Kairós: Barcelona, 2002.

- Zheng, W.; Wang, S. Y.
Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5165–70.

- Baranauskiene, R.; Venskutonis, P. R.; Viskelis, P.; Dambrauskiene, E.
Influence of Nitrogen Fertilizers on the Yield and Composition of Thyme (*Thymus vulgaris*). J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 7751–7758.

- Perestrelo, R.; Silva, C. L.; Rodrigues, F.; Caldeira, M.; Câmara, J. S.
A powerful approach to explore the potential of medicinal plants as a natural source of odor and antioxidant compounds. J. Food Sci. Technol. 2016, 53, 132–44.

- Bertoli, A.; Sárosi, S.; Bernáth, J.; Pistelli, L.
Characterization of some Italian ornamental thyme by their aroma. Nat. Prod. Commun. 2010, 5, 291–6.

- Guillen, M.; Manzanos, M.
Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant. Food Chem. 1998, 63, 373–383.

- Roby, M. H. H.; Sarhan, M. A.; Selim, K. A. H.; Khalel, K. I.
Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. Ind. Crops Prod. 2013, 43, 827– 831.

- Jordán, M. J.; Martínez, R. M.; Martínez, C.; Moñino, I.; Sotomayor, J. A.
Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels. Ind. Crops Prod. 2009, 29, 145–153.

- Berdondes, J. Plantas medicinales, descripción y aplicaciones; Océano, S.L.: Barcelona, 2009.

- Chizzola, R.; Michitsch, H.; Franz, C.
Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 6897–6904.
- Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 165 (2019) 374–380.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., (2004).
Antioxidantes de los alimentos: aplicaciones prácticas. Ed, Acribia: Zaragoza.
- Toren Finkel; Nikki J. Holbrook.
Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing *Nature* volume 408, 239–247 (2000)
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.
Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, 1-25. (1999).
- Thornalley PJ & Vasak M.
Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Acta* 827: 36-44.
- Palamanda JR, Kehrer JP.
Involvement of vitamin E and protein thiols in the inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione. *Lipids*. 1993 May;28(5):427-31.
- Oruma Patthamakanokporn; Prapasri Puwastien; Anadi Nitithamyong; Prapaisri P. Sirichakwal.
Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. Volume 21, Issue 3, May 2008, 241-248.
- Baranauskiene R, Venskutonis PR, Viskelis P, Dambrauskiene E.

Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *J Agric Food Chem.* 2003 Dec 17;51(26):7751-8.

- R. Isla; R. Yagüe; D. Quílez; J. Cavero.
Nitrogen balances in maize crop under irrigation in Aragón. (España), 2006.
- Ortega-Heras. M; Pérez-Magariño. S; González-San José. M.
Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencía red wine. *LWT – Food. Sci Technol.* 2012;48:1–8.
- C. Bendichol; I. De La Calle; F. Pena; M. Costas; N. Cabaleiro; I. Lavilla.
Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*
Volume 31, January 2012, Pages 50-60.
- Farid Chemat; Zill-e-Huma; Muhammed Kamran Khan.
Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*
Volume 18, Issue 4, July 2011, Pages 813-835.
- Berdahl, D. R.; McKeague, J.
Handbook of Antioxidants for Food Preservation; Elsevier, 2015.
- Berdahl, D. R.; Nahas, R. I.; Barren, J. P.
Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications; Elsevier, 2010.
- Rodríguez-Rojo, S.; Varona, S.; Núñez, M.; Cocero, M. J.
Characterization of rosemary essential oil for biodegradable emulsions. *Ind. Crop. Prod.* 2012, 37, 137–140.
- Kähkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J.-P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; Heinonen, M.
Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 3954–3962.

- Lindberg Madsen, H.
Spices as antioxidants. Trends Food Sci. Technol. 1995, 6, 271–277.

- S. Mohan; K. Subramani; A.C. Tangavelou.
Antioxidant phenolic acids from some selected medicinal plants of South India.
Int. J. Modn. Res. Revs. Volume 3, Issue 1, pp 599-603, January, 2015.

- Embuscado, M. E.
Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - A mini review. J. Funct. Foods 2015, 18, 811–819.

- Carlsen, M. H.; Halvorsen, B. L.; Holte, K.; Bøhn, S. K.; Dragland, S.; Sampson, L.; Willey, C.; Senoo, H.; Umezono, Y.; Sanada, C.; Barikmo, I.; Berhe, N.; Willett, W. C.; Phillips, K. M.; Jacobs, D. R.; Blomhoff, R.
The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. Nutr. J. 2010, 9, 3.

- Cámara, C. (Ed.). (2002). Toma y tratamiento de muestras. Madrid, España: Editorial Síntesis, D.L.

- Suhaj, M.
Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. J. Food Compos. Anal. 2006, 19, 531–537.

- Calucci, L.; Pinzino, C.; Zandomenighi, M.; Capocchi, A.; Ghiringhelli, S.; Saviozzi, F.; Tozzi, S.; Galleschi, L.
Effects of gamma-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 927–34.