



**Universidad**  
Zaragoza

## TRABAJO FIN DE GRADO

“Obtención de extractos de *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Portugal) y determinación de su actividad antioxidante.”

"Obtention of extracts from *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Portugal) and determination of its antioxidant activity."

Autor

Mónica Pérez Rodrigo

Directores

José Francisco Martínez López  
Ana María Mainar Fernández

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR

2018



AGRADECIMIENTOS

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a José Francisco y Ana por su tiempo y dedicación.

A mis ITAS por su apoyo incondicional en este largo camino, especialmente a Lara, por tener la suficiente paciencia de leerse el proyecto entero para tranquilizarme, cosa que sé que no es fácil. A Ibo, por “tirar de mí” y hacer las tardes de estudio más divertidas.

A Rafa, por su apoyo y paciencia. Hoy comienza nuestra nueva vida.

A mi madre, por no dejar nunca de creer en mí, por ayudarme a levantar todas las veces que he caído, sin ella jamás habría llegado hasta aquí.

A mis yayos y Titi, por transmitirme el amor hacia mi pueblo y el medio rural. Gracias a ellos hoy puedo decir que mi pasión es mi profesión.

Gracias.

*“He fallado más de 9000 tiros en mi carrera, he perdido casi 300 juegos, 26 veces han confiado en mí para el tiro que ganaba el partido y he fallado. He fracasado una y otra vez en mi vida. Y por eso he alcanzado el éxito.”*

Michael “ Air” Jordan

## ÍNDICE GENERAL

## ÍNDICE GENERAL

1.- RESUMEN .....	1
2. - ABSTRACT .....	3
3.- OBJETIVOS .....	5
4.- INTRODUCCIÓN .....	7
4.1.- <i>Lavandula stoechas subsp. luisieri</i> (Rozeira) Riv-Mart. ....	7
4.2.- Especies antioxidantes .....	14
4.2.1.- Clasificación de polifenoles .....	15
4.3.- Procesos extractivos y métodos para determinar la actividad antioxidante .....	20
4.3.1.- Procesos de extracción de principios activos.....	20
4.3.2.- Métodos para determinar la capacidad antioxidante .....	31
4.3.2.1.-Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante .....	31
4.3.2.2.- Métodos para la determinación de polifenoles totales.....	35
4.3.2.3.- Métodos para la determinación de flavonoides totales .....	35
5.- MATERIALES Y METODOLOGÍA .....	38
5.1.- Materiales .....	38
5.1.1.-Material vegetal .....	38
5.1.1.2.- Disolventes y reactivos.....	38
5.2.- Métodos .....	39
5.2.1.- Determinación de masa .....	39
5.2.2.- Molienda y tamizado.....	39
5.2.3.- Grado de Humedad.....	40
5.2.4.- Rotovaporización .....	40
5.2.5.- Espectrofotómetro .....	41
5.2.6.-Procesos de extracción de principios activos .....	44
5.2.6.1.- Maceración .....	44
5.2.7.- Fraccionamiento supercrítico antidisolvente (SAF) .....	45
5.2.8.- Medida de la capacidad antioxidante .....	49
5.2.8.1.-Método del DPPH.....	49
5.2.8.2.- Preparación de la recta de calibrado .....	51
5.2.8.3.- Medida de la actividad antioxidante del Trolox™ .....	52

5.2.8.4.- Determinación de polifenoles totales.....	53
5.2.8.5.- Determinación de flavonoides totales.....	54
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	57
6.1.- Tamizado .....	57
6.2.- Grado de humedad .....	59
6.3.- Extracciones .....	60
6.4.- Resultados de la actividad antioxidante en los extractos de <i>L.luisieri</i> .....	61
6.4.1.- Obtención de las rectas de calibrado de DPPH.....	61
6.4.2.- Validación del método experimental con Trolox <sup>TM</sup> .....	62
6.4.3.- Cálculo de la actividad antioxidante de los extractos.....	64
6.4.3.1.- Cálculo de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de flores y hojas .....	64
6.4.3.2.- Cálculo de la actividad antioxidante del extracto etanólico de flores y hojas sometido a SAF.....	66
6.5.- Contenido de polifenoles totales en los extractos de <i>L.luisieri</i> . ....	68
6.6.- Contenido de flavonoides totales en los extractos de <i>L.luisieri</i> .....	70
7.- CONCLUSIONES .....	74
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	76
9.- ANEXOS .....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Lavandula stoechas subsp.Luisieri</i> Detalle inflorescencia. Imagen de flora vascular. Autor: Maite Santisteban Rivero .....	9
<b>Figura 2.</b> <i>Lavandula luisieri</i> (Rozeira) Riv-Mart.; p: porte general (longitud $\pm$ 27.5 cm); h: hoja; b: bráctea inferior; f: flor; i: indumento (García-Vallejo, 1992). .....	9
<b>Figura 3.</b> Mapa de aridez de España. Fuente: Programa de Acción Nacional contra la Desertificación, 2008. ....	10
<b>Figura 4.</b> Mapa de riesgo de desertificación de España. Fuente: MAGRAMA,2016. ..	11
<b>Figura 5.</b> Reserva hidráulica. Fuente: Confederación hidrográfica del Ebro (16/4/2018). .....	12
<b>Figura 6.</b> Estructura del ácido benzoico.....	16
<b>Figura 7.</b> Estructura del ácido cinámico.....	16
<b>Figura 8.</b> Ácidos fenólicos: ácidos benzoicos y ácidos cinámicos.....	16
<b>Figura 9.</b> Estructura básica de los flavonoides. ....	17
<b>Figura 10.</b> Isoflavones típicos, neoflavones y chalcones .....	17
<b>Figura 11.</b> Flavonas, flavonoles flavanonas y flavanonoles. ....	18
<b>Figura 12.</b> Estructura de las antocianidinas más comunes.....	18
<b>Figura 13.</b> Flavanoles y Proantocianidinas.....	19
<b>Figura 14.</b> Estructura de las principales amidas polifenólicas.....	19
<b>Figura 15.</b> Estructura de otros polifenoles importantes.....	20
<b>Figura 16.</b> Proceso de maceración.....	22
<b>Figura 17.</b> Filtrado tras la maceración.....	22
<b>Figura 18.</b> Soxhlet tradicional.....	23
<b>Figura 19.</b> Extractor ultrasonic. Fuente: Hielscher ultrasonic.....	24
<b>Figura 20.</b> Panorama general de las características más sobresalientes de los fluidos supercríticos .....	26
<b>Figura 21.</b> Diagrama de fases del CO <sub>2</sub> .....	26
<b>Figura 22.</b> Diagrama de flujo para un proceso de extracción supercrítica .....	28
<b>Figura 23.</b> Diagrama del proceso SAF .....	29
<b>Figura 24.</b> Densidad y polaridad (expresada a través del parámetro de Hildebrand) del CO <sub>2</sub> en condiciones supercríticas, como función de la presión y la temperatura.....	30
<b>Figura 25</b> .Estructura química del Radical DPPH· .....	32
<b>Figura 26.</b> Reducción del DPPH· .....	33
<b>Figura 27.</b> Diferentes colorimetrías de la reducción del DPPH· .....	33

<b>Figura 28.</b> Tamizadora CISA modelo BA 300 N con varios tamices. ....	39
<b>Figura 29.</b> Materia vegetal utilizada en el analizador de humedad. ....	40
<b>Figura 30.</b> Rotovapor Büchi R-210. ....	41
<b>Figura 31.</b> Espectofotómetro Evolution 300. ....	42
<b>Figura 32.</b> Kit de filtros Pye Unicam Ltd. Cambridge England. ....	42
<b>Figura 33.</b> Proceso de maceración. ....	44
<b>Figura 34.</b> Filtrado tras la maceración. ....	44
<b>Figura 35.</b> Planta piloto de fraccionamiento antidisolvente con SC-CO <sub>2</sub> . ....	46
<b>Figura 36.</b> Esquema de la planta piloto. ....	47
<b>Figura 37.</b> Software de la planta de extracción con SC-CO <sub>2</sub> . ....	47
<b>Figura 38.</b> Filtrado del extracto. ....	48
<b>Figura 39.</b> Extracto filtrado en SAF. ....	48
<b>Figura 40.</b> Fracción sólida de la cámara. ....	49
<b>Figura 41.</b> Fracción líquida de cámara y colector. ....	49
<b>Figura 42.</b> Estructura del Trolox <sup>TM</sup> . ....	52
<b>Figura 43.</b> Serie de disoluciones de ácido gálico para la realización de la recta de calibrado. ....	54
<b>Figura 44.</b> Serie de disoluciones de quercitina para la realización de la recta de calibrado. ....	55
<b>Figura 45.</b> Representación de las diferentes masas de hojas en cada tamiz. ....	58
<b>Figura 46.</b> Representación de las diferentes masas de flores en cada tamiz. ....	59
<b>Figura 47.</b> Recta de calibrado del DPPH. ....	62
<b>Figura 48.</b> Gráfico del contenido de polifenoles totales (µg EAG/g) en los extractos de <i>L.luisieri</i> . ....	69
<b>Figura 49.</b> Gráfico del contenido de flavonoides totales (mg EQ /ml) en los extractos de <i>L.luisieri</i> . ....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Variación del porcentaje de superficie en cada tipo de aridez (MAGRAMA, 2016).	11
<b>Tabla 2.</b> Disolventes y reactivos empleados en los análisis y extracciones.	38
<b>Tabla 3.</b> Longitudes de onda para el Holmio y medidas experimentales.	43
<b>Tabla 4.</b> Longitudes de onda para el filtro de Didimio y medidas experimentales	43
<b>Tabla 5.</b> Grado de poder antioxidante en función del AAI.	50
<b>Tabla 6.</b> Resultados de la molienda y el tamizado de todo el material vegetal de partida.	57
<b>Tabla 7.</b> Diámetro de partícula medio obtenido de flores y hojas.	58
<b>Tabla 8.</b> Resultados tras la determinación de humedad en hojas por termogravimetría en <i>L. luisieri</i> .	59
<b>Tabla 9.</b> Resultados tras la determinación de humedad en flores por termogravimetría en <i>L. luisieri</i> .	60
<b>Tabla 10.</b> Rendimientos de las extracciones de hojas de <i>L. luisieri</i> .	60
<b>Tabla 11.</b> Rendimientos de las extracciones de flores de <i>L. luisieri</i> .	61
<b>Tabla 12.</b> Datos calibración DPPH· para todas las rectas.	61
<b>Tabla 13.</b> Concentraciones de Trolox <sup>TM</sup> de las disoluciones de partida, ratio Trolox <sup>TM</sup> / DPPH·. absorbancia final y concentración remanente de DPPH·.	62
<b>Tabla 14.</b> Valores de EC <sub>50</sub> obtenidos para el Trolox <sup>TM</sup> , media y desviación estándar de los mismos.	63
<b>Tabla 15.</b> Concentración de extracto inicial (g/L), relación entre los gramos de extracto y los de DPPH· (g <sub>extracto</sub> /g <sub>DPPH·</sub> ), valores de absorbancia tras la reacción y porcentaje remanente de radical DPPH·.	64
<b>Tabla 16.</b> Valores EC <sub>50</sub> IC <sub>50</sub> , AAI de los extractos etanólicos procedentes de las flores.	65
<b>Tabla 17.</b> Concentración de extracto inicial (g/L), relación entre los gramos de extracto y los de DPPH· (g <sub>extracto</sub> /g <sub>DPPH·</sub> ), valores de absorbancia tras la reacción y porcentaje remanente de radical DPPH·.	65
<b>Tabla 18.</b> Valores EC <sub>50</sub> IC <sub>50</sub> , AAI de los extractos etanólicos procedentes de las hojas.	66
<b>Tabla 19.</b> Valores EC <sub>50</sub> IC <sub>50</sub> , AAI de La fracción obtenida en cámara y colector de extractos procedentes de las flores de <i>L. luisieri</i> .	66
<b>Tabla 20.</b> Valores EC <sub>50</sub> IC <sub>50</sub> , AAI de La fracción obtenida en cámara y colector de extractos procedentes de las hojas de <i>L. luisieri</i> .	67

<b>Tabla 21.</b> Concentración media de polifenoles totales (PFT) en los extractos <i>L.luisieri</i> . .....	68
<b>Tabla 22.</b> Medias de los diferentes extractos y series de polifenoles totales y desviación estándar.....	68
<b>Tabla 23.</b> Concentración media de flavonoides totales (FT) en los extractos <i>L.luisieri</i> . .....	70
<b>Tabla 24.</b> Medias de los diferentes extractos y series de flavonoides totales y desviación estándar.....	70
<b>Tabla 25.</b> Resultados medios de capacidad antioxidante, en polifenoles y flavonoides totales en los extracto de <i>L.luisieri</i> . ....	72

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**AAI:** Índice de Actividad Antioxidante.

**Abs:** Absorbancia.

**C:** Concentración

**AG:** Ácido Gálico.

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de Carbono.

**CSIC:** Consejo superior de investigaciones científicas.

**EC<sub>50</sub>:** Concentración eficiente al 50%.

**FSC:** Fluido supercrítico.

**FT:** Flavonoides Totales.

**FSC:** Fluido supercrítico.

**PFT:** Polifenoles Totales.

**Q:** Quercitina.

**SAF:** Supercritical Antisolvent Fractionation.

**TPTZ:** 2,4, 6-tripiridil-s-triazina.

**σ :** Desviación estándar.

RESUMEN



## 1.- RESUMEN

*Lavandula stoechas subsp. luisieri* es una planta aromática que se encuentra en la mitad sur de la Península Ibérica. Utilizada para tratamientos terapéuticos, en la industria cosmética y en perfumería. Debido a los problemas que hay actualmente en España de desertificación y sequías, su cultivo gracias a su adaptabilidad y baja necesidad hídrica, supondría una alternativa a la actual agricultura intensiva insostenible.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio del poder antioxidante de extractos y sus fracciones (hojas y flores por separado) de *L. luisieri*. El extracto etanólico (maceración a temperatura ambiente) fue sometido a un proceso de fraccionamiento supercrítico antidisolvente (SAF) utilizando CO<sub>2</sub> a temperatura de 40 °C y una presión de 115 bar.

Para determinar la actividad antioxidante de los diferentes extractos se siguió el método del radical libre DPPH·, habiéndose encontrado una mayor capacidad antioxidante en los extractos etanólicos y su fracción de cámara frente a la fracción obtenida en el colector contiguo a cámara (espurgo). Finalmente, se completó el estudio mediante la determinación, por separado, de polifenoles y flavonoides totales en los diferentes extractos y fracciones, observándose generalmente un mayor contenido de polifenoles y flavonoides en los extractos etanólicos y de cámara frente a espurgo.

**Palabras clave:**

*Lavandula stoechas subsp. luisieri*, capacidad antioxidante, DPPH·, AAI, polifenoles, flavonoides.

## ABSTRACT

## 2. - ABSTRACT

*Lavandula stoechas subsp. luisieri* is an aromatic plant widespread in the south of Iberian Peninsula. Used for therapeutic treatments and industries such as cosmetics and perfumery. Because of the problems that currently exist in Spain of desertification and droughts, these species would suppose an alternative to the unsustainable intensive agriculture, due to its high adaptability and low hydrological needs.

In this work, it has been carried out a study of the antioxidant power of extracts and its fractions (from leaves and flowers separately) of *L. luisieri*. The ethanolic extract (room temperature soaking) was subjected to a supercritical anti-solvent fractionation process (SAF) using CO<sub>2</sub> at a temperature of 40 °C and at a pressure of 115 bar.

In order to determine the antioxidant activity of the different extracts, the DPPH-free radical method was followed, and a greater antioxidant capacity was found in the ethanolic extracts and in their chamber fraction compared to the fraction obtained in the collector downstream from chamber. Finally, the study was complemented with the determination, separately, of both total polyphenols and flavonoids in the different extracts and fractions. In general a mayor content of polyphenols and flavonoids were obtained in the ethanolic and chamber extracts compared to the extracts obtained in the collector downstream.

### **Keywords**

*Lavandula stoechas subsp. luisieri*, antioxidant capacity, DPPH·, AAI, polyphenols, flavono

OBJETIVOS

### 3.- OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es realizar un estudio del poder antioxidante de los extractos y fracciones obtenidas a partir de la planta aromática *Lavandula stoechas*, subsp. *luisieri* (Originaria de Portugal), tanto por métodos tradicionales de extracción como por métodos basados en técnicas avanzadas sostenibles y amistosas con el medioambiente.

Como objetivos específicos conducentes a la consecución del objetivo general tenemos los siguientes:

- a) Realización de extracciones de *Lavandula luisieri* mediante disolventes orgánicos habituales como hexano y etanol.
- b) Concentración de sustancias activas de extractos tradicionales de *Lavandula luisieri* mediante fraccionamiento antidisolvente (SAF) con dióxido de carbono a presión.
- c) Determinación del poder antioxidante correspondiente a la transferencia electrónica, método DPPH·, de los extractos y fracciones obtenidas.
- d) Estudio comparativo de los resultados obtenidos y conclusiones.

## INTRODUCCIÓN

## 4.- INTRODUCCIÓN

### 4.1.- *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) Riv-Mart.

El género *Lavandula* fue creado por Linné en 1737 para designar a aquellas plantas que hasta entonces se conocían como *Stoechas vulgaris* (*L. Stoechas*), *Stoechas foliis dentatis* (*L. dentata*), *Stoechas pedunculata* (*L. pedunculata*), *Stoechas purpurea* (*L. stoechas*), etc. Término procedente del griego *stixas* utilizado por Dioscórides en su “Materia médica”, usado para designar unas plantas de las islas Stechades-. Más tarde, el propio Linné, corrige el nombre de *Lavandula* por el de *Lavandula*, del latín, lavare, lavar, por usarse para perfumar los baños. (Suárez-Cervera, Seoane Camba, 1986) .El nombre específico procede del griego *stoichas*: alineadas y aludiría a la disposición ordenada de las flores.

#### Taxonomía:

Reino: Plantae

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Lamiaceae*

Subfamilia: *Nepetoideae*

Tribu: *Lavanduleae*

Género: *lavándula*

Sección: *Stoechas*

Especie: *L. stoechas*

Cuando hablamos de plantas aromáticas con potencial antioxidante, debemos de hablar del género *Lavandula*. Este género se extiende desde la región Macaronésica por toda la cuenca Mediterránea y dispersa por la mitad norte de África hasta la Península Arábiga y sur de Asia hasta la India. Consta de 39 especies y desde antiguo se usan estas plantas como ornamentales y para la obtención de esencias, sobre todo el espliego (*L. angustifolia*, *L. latifolia*) y el lavandín; en menor

medida *L. dentata*, *L. stoechas* y *L. pedunculata*. Ello explica el interés botánico y humano que siempre han suscitado las especies de este género. (Morales, 2004).

### Descripción morfológica

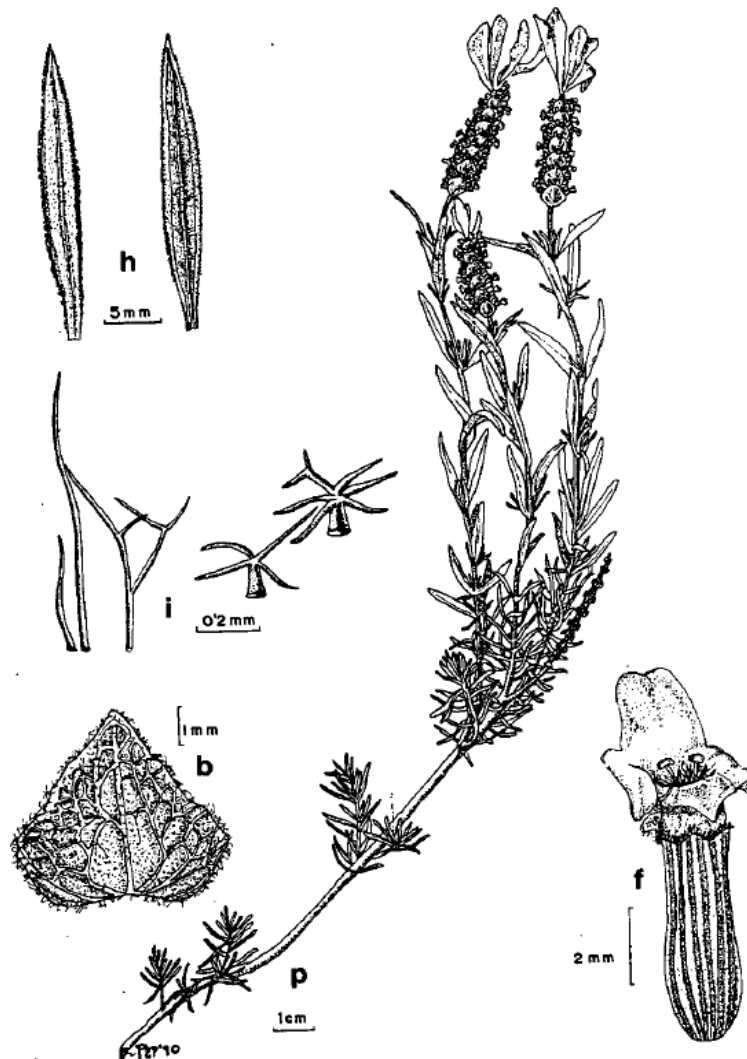
Planta leñosa, 23-100 cm. Tallos muy foliosos, los jóvenes muy pelosos, con pelos cortos y blanquecinos, tomentulosos. Hojas 6-37 x 1,5-4 mm, de lineares a lanceoladas, estas últimas revolutas, con frecuencia reticuladas por el envés debido a la nerviación marcada, las jóvenes 6-10 x 1-1,5 mm, en fascículos axilares, con frecuencia en disposición muy densa, imbricadas, blanquecinas, tomentosas, con pelos compuestos muy pequeños que le dan un aspecto de borra y con glándulas esferoidales amarillas, sobre todo por el envés. Inflorescencia 15-47(55) x (6)8-19 mm, que nace casi pegada a las últimas hojas, o sea, con pedúnculo muy corto, como máximo 2 veces el tamaño de la inflorescencia, excepcionalmente más largo, de sección cuadrangular o redondeada, entonces más ancha, muy densa, formado por 8-16(19) verticilastros de 6-14 flores cada uno. Brácteas 4-8 x 4,5-10 mm, de anchamente elípticas a orbiculares, a veces cuneadas, agudas, acuminadas, reticuladas, en general glabras por el haz y pelosas por el envés, con frecuencia de rebordes lanosos, verduzcas, pardas, moradas, a veces oscuras, imbricadas, con los cálices ± sobresalientes, dependiendo del grado de desarrollo; las terminales o comas 2-8, 8-36 x 2-10 mm, de tamaño homogéneo o heterogéneo, de lanceoladas a elípticas, con nervio central marcado y laterales pinnados muy leves, en general redondeadas arriba, a veces agudas, de azuladas a moradas, que forman un penacho sobre la inflorescencia. Cáliz 6-8 mm, con 4 dientes agudos, a veces con bordes muy pelosos, blanquecinos, y 1 diente apendiculado, c. 1,5 x 2,1 mm, anchamente elíptico. Corola 4-5,5 mm, de azulada a morada, muy oscura arriba, negruzca, solamente los lóbulos; tubo descolorido, lóbulos c. 1,5 mm, los 2 superiores algo mayores que los 3 inferiores; garganta pelosa de la que apenas asoman dos anteras. Núculas 1,6-1,8 x 1,1-1,3 mm, de contorno elíptico, subtrígonas, a veces aplanadas, con una cara convexa, lisas, brillantes, a veces papilosas hacia el ápice, marrones. (Morales, 2004).

Generalmente de forma vulgar se le suele llamar cantahueso, cantueso o romero del señor entre otros.





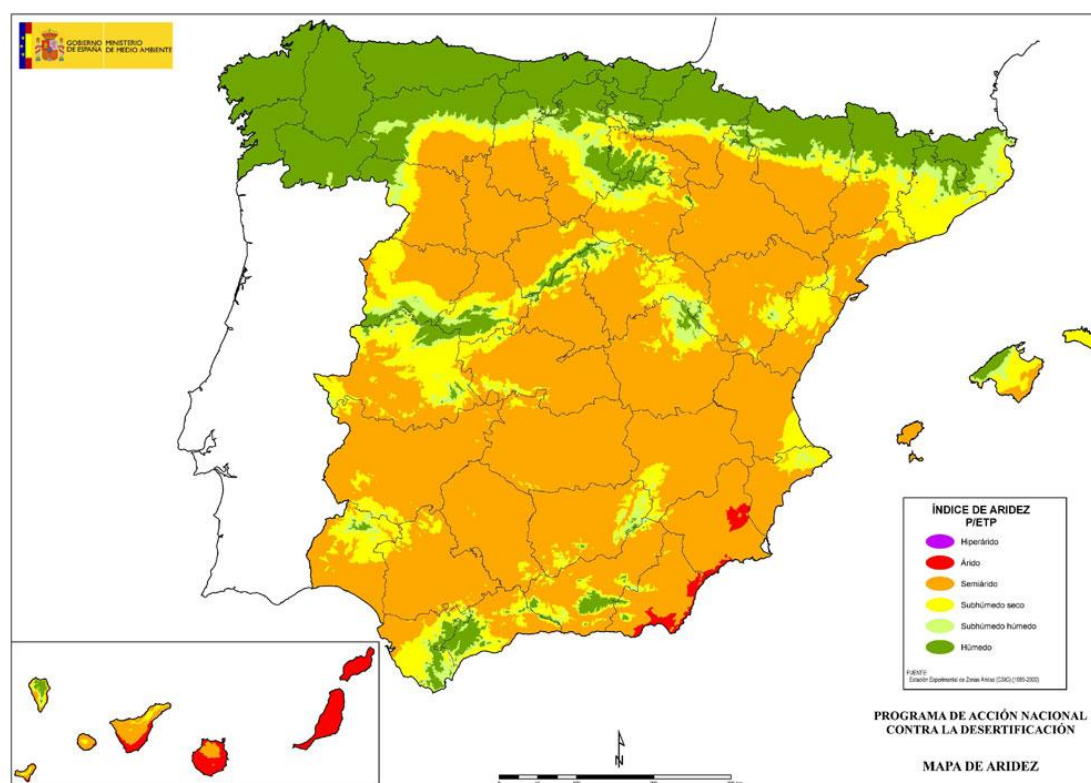
**Figura 1.** *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* Detalle inflorescencia. Imagen de flora vascular.  
Autor: Maite Santisteban Rivero



**Figura 2.** *Lavandula luisieri* (Rozeira) Riv-Mart.; p: porte general (longitud  $\pm$  27.5 cm); h: hoja; b: bráctea inferior; f: flor; i: indumento (García-Vallejo, 1992).

Es una planta que suele habitar en suelos arenosos, cuartícos, graníticos o pizarrosos y muy pobres. Aunque tolera muchos tipos de suelos, prefiere los silíceos o sotobosques de encinares, alcornoques, robledales o pinares (Morales, 2004). Por lo tanto, es una planta con una gran adaptación a diferentes terrenos. Normalmente su presencia es más común en las zonas del sur que en las del norte, ya sea a nivel del mar o incluso a latitudes de 1000 m. Es una especie pionera en áreas recientemente áridas, reproduciéndose especialmente por semilla. La ocupación del suelo no es un factor limitante a su distribución. (Delgado, 2010).

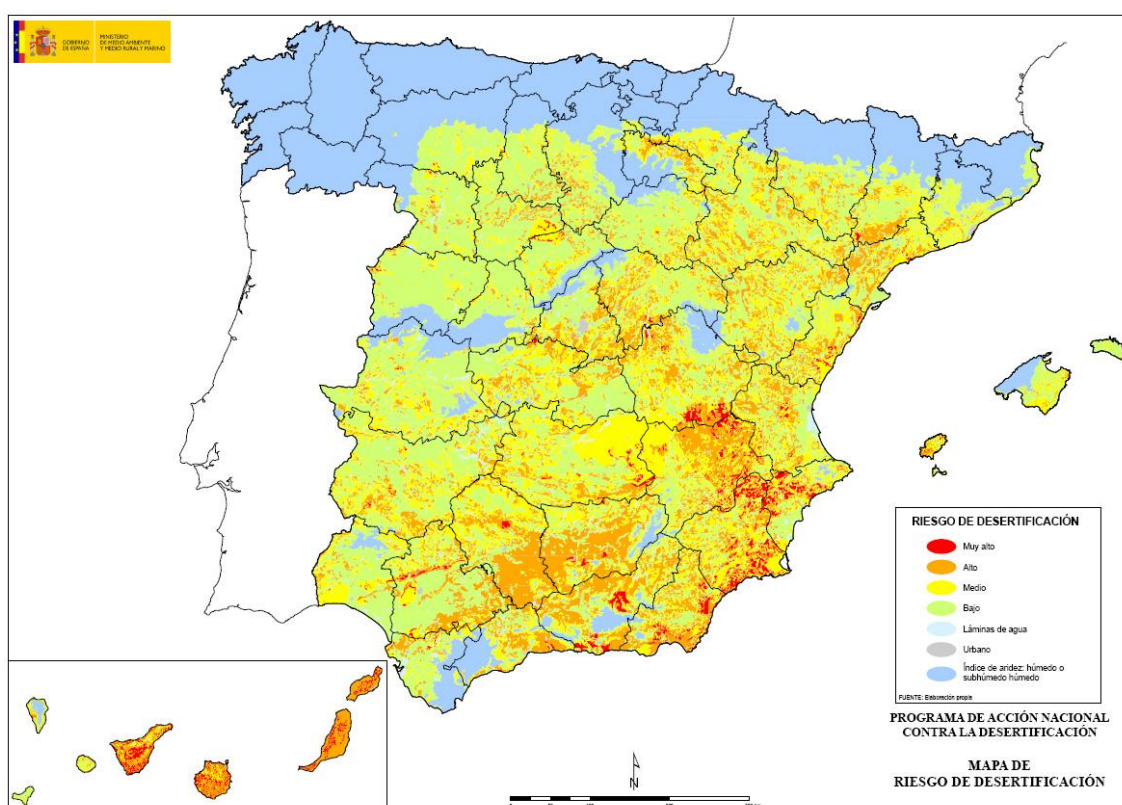
Se adapta perfectamente a suelos sin humedad y pluviometrías escasas, pudiendo habitar en entorno hostiles para muchas otras plantas y donde pasa más de 20 o 30 días sin tener agua, por lo que es una especie con un gran potencial para realizar alternancia de cultivos, o realizar cambios de cultivos en zonas áridas. Suele resistir heladas suaves y medias, donde la temperatura no baje de  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y no perdure durante mucho tiempo. En floración, que ocurre entre primavera y verano, las temperaturas deben ser superiores a los  $5\text{-}10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Además su cultivo y conservación supone importantes implicaciones en tareas de reforestación en zonas dañadas por el fuego. (González-Coloma et al., 2011).



**Figura 3.** Mapa de aridez de España. Fuente: Programa de Acción Nacional contra la Desertificación, 2008.

**Tabla 1.** Variación del porcentaje de superficie en cada tipo de aridez (MAGRAMA, 2016).

Índice de Aridez	1971-2000 (periodo de control)	2011-2040	2041-2070	2071-2100
Árido	4,40%	4,39%	6,17%	6,38%
Semiárido	23,43%	29,53%	43,30%	49,81%
Subhúmedo Seco	21,53%	22,56%	17,46%	15,36%
Subhúmedo húmedo	11,22%	9,52%	7,07%	6,25%
Húmedo	39,41%	34,01%	26,00%	22,20%

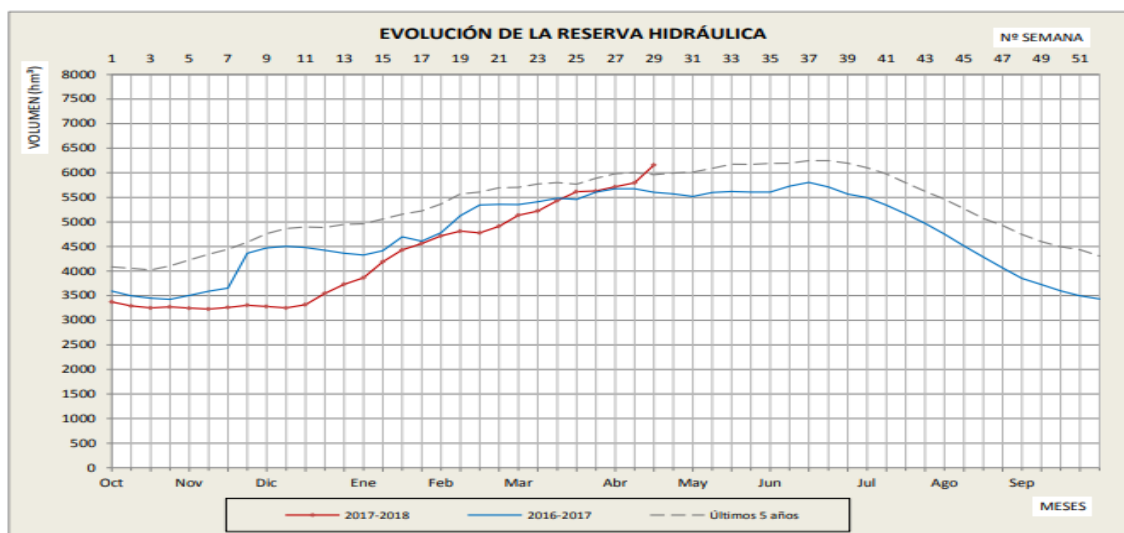
**Figura 4.** Mapa de riesgo de desertificación de España. Fuente: MAGRAMA, 2016.

En la convención de la lucha contra la desertificación (CLD) se definió la desertificación como la degradación de las tierras de zonas áridas, semiáridas y subhúmedas secas resultantes de diversos factores, tales como las variaciones climáticas y las actividades humanas. (Impactos del Cambio Climático en los procesos de desertificación de España, MAGRAMA, 2016).

Como se observa en (Figura 4) muchas zonas de la geografía española se encuentran afectadas por el proceso de desertificación, más de dos terceras partes del territorio pertenecen a las categorías de áreas áridas, semiáridas y subhúmedas secas. Al analizar la (Tabla 1) se observa que el porcentaje del índice de aridez irá

umentando conforme pasen los años. Esto se debe a la combinación tanto de factores naturales y humanos.

Además de los procesos de desertificación y de aridez, en (Figura 5) se muestra la evolución de los embalses, en la cual se observa que los niveles de reservas hídricas de los embalses desde octubre a marzo del 2018 son mucho menores que en los últimos 5 años. Por lo que la pluviometría va disminuyendo. Hay sequías estacionales, extrema variabilidad de las lluvias y lluvias de gran intensidad.



**Figura 5.** Reserva hídrica. Fuente: Confederación hidrográfica del Ebro (16/4/2018).

Debido a todo lo expuesto anteriormente debemos de intentar adaptar nuestros cultivos a la nueva situación, cada día los cultivos cerealistas y cultivos intensivos son menos rentables además de que los suelos son más pobres, lo que conlleva al abandono de las tierras, deterioro del suelo y de las estructuras de la conservación de agua que, de manera ocasional se utilizan de forma insostenible los recursos hídricos subterráneos que implican una contaminación química y la salinización de acuíferos. Como consecuencia de todo lo nombrado, hay una mayor despoblación de las zonas rurales, lo que agrava su erosión.

El cultivo de la *Lavandula stoechas subs. luisieri* es una buena alternativa, contribuye a la recuperación del suelo y lo protege contra la erosión. Por lo que es adecuado para la protección de los suelos. En tierras no cultivadas por su escaso o nulo interés agrícola se desarrolla muy bien. Además, en los suelos que, debido a una agricultura intensiva, son o se han vuelto inútiles para otros cultivos, pueden cultivarse algunas de estas especies.

## Aplicaciones

Las plantas aromáticas, como el cantueso y sus principios activos, proporcionan importantes beneficios medioambientales, económicos y sociales, además de constituir un amplio campo de aplicación de las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Aparte de todo lo nombrado, existe una relación simbiótica entre la apicultura y el cultivo del cantueso, ya que se produce una miel y polen de calidad, lo que le otorga al cultivo un valor añadido.

Otro de los beneficios que aporta el cantueso, ya en 1955 según Pedacio Dioscórides, el autor hace una descripción estableciendo algunas de sus virtudes tales como su utilidad para el tratamiento de las enfermedades de pecho, capacidad de contrarrestar venenos y especial acción sobre el cerebro, nervios y sentidos siendo aplicada en forma de conocimiento (Gutiérrez Durán y Basante Pol, 1984). En otros estudios más actuales, también se cita el cantueso con el objetivo de mejorar el estado general y aumentar la calidad de vida de los pacientes (Baptista et al., 2015; Julio et al., 2016; Matos et al., 2009).

Como citaba Linné en 1737 ya se utilizaba para perfumar los baños (Suárez-Cervera y Seoane Camba, 1986), hoy en día se utiliza en cosmética en forma de cremas, colonias, lociones... (Baptista et al., 2015; González-Coloma et al., 2011; González-Coloma, et al., 2006; Matos et al., 2009; Zuzarte et al., 2012).

Los aceites esenciales se han utilizado durante siglos, por una enorme variedad de motivos terapéuticos y cosméticos, además de utilizarse para cosmética también son muy utilizados en aromaterapia, (Rostagno, y Prado, 2013) gracias a sus efectos por inhalación y compuestos volátiles. (Sanz, Soria y García-Vallejo, 2004; Matos et al., 2009; Zuzarte et al., 2012). Los aceites esenciales de las especies de *Lavandula* tienen un valor económico para varias industrias (Coloma, et al., 2006).

Los componentes volátiles en menor medida han sido empleados como condimento en alimentación (Baptista et al., 2015; Matos et al., 2009; Zuzarte et al., 2012).

Otro de los beneficios de las plantas aromáticas, es que muchas de ellas tienen propiedades germicidas, fungicidas, bacteriostáticas, insectífugas, bactericidas, nematocidas, e incluso herbicidas (Baptista et al., 2015; González-Coloma et al., 2011; Julio et al., 2014; Julio et al., 2016; Matos et al., 2009; Zuzarte et al., 2012). Estos compuestos, al tratarse de productos que no son tóxicos ni residuales, serían una

buena alternativa para combatir plagas y enfermedades, por lo que se lograría una protección vegetal natural en la agricultura. (Palacio, 2000).

Como ejemplo de aprovechamiento del cultivo del cantueso está Brihuega (Guadalajara), pueblo que ha sabido utilizar todos los recursos que este cultivo les proporciona. Esto repercute en un beneficio socio- económico.

#### 4.2.- Especies antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos capaces de inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas impidiendo la iniciación y propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. (Muñoz Juárez y Gutiérrez, 2004).

Los radicales libres son generados de forma constante en nuestro organismo, tanto en la respiración como en la digestión, factores externos como la contaminación o la alimentación también los producen. El envejecimiento y algunas enfermedades son producidas por estrés oxidativo, esto sucede cuando la exposición a radicales libres es mayor de la que los antioxidantes pueden neutralizar. (Rodríguez, 2008). Además, otros estudios afirman que los daños celulares causados por radicales libres y especies reactivas de oxígeno están detrás de una gran variedad de enfermedades, incluyendo diferentes problemas cardiovasculares, síndrome metabólico, procesos neurodegenerativos y cáncer. Existen numerosas evidencias experimentales de que los antioxidantes ejercen efectos beneficiosos sobre estas patologías. (CSIC)

Los antioxidantes se clasifican dependiendo de su procedencia en dos tipos: sintéticos y naturales. Los antioxidantes sintéticos debido a su carácter tóxico en los alimentos, ha fomentado el interés en la investigación de antioxidantes naturales en fuentes vegetales y el estudio de las materias primas para la identificación de nuevos compuestos (Moure et al., 2001). Éstos pueden ser inocuos para la salud y actúan a bajas concentraciones. (Molyneux, 2004; Gaviria et al., 2009). Este creciente interés no se centra únicamente en la industria alimentaria, sin que también lo hace en el uso de estos antioxidantes como cosméticos, plásticos y farmacéuticos. Cabe recalcar que la mayoría de los antioxidantes son nutrientes que se encuentran en los alimentos (Fernández, 2004).

Debido a su importancia diferentes fuentes naturales con capacidad antioxidante han sido investigadas como: el vino y el té (Magalhaes, et, al. 2001),

hojas de olivo (Brhami, et al. 2012) y sobre todo diversas especias: orégano, tomillo, jengibre, romero o canela, entre otras (Shah, Bosco y Mir, 2014).

Existen gran variedad de compuestos antioxidantes conocidos como: ácido ascórbico, melatonina, carotenoides (entre otros) y los compuestos fenólicos los cuales son los más encontrados en las plantas. Éstos últimos proporcionan numerosos efectos positivos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, neurológicas, cancerígenas o circulatorias. Además, posee actividades anti-inflamatoria, antimicrobiana, antialérgica, antitrombótica, y antineoplásica (Kukoski, et al., 2009).

#### 4.2.1.- Clasificación de polifenoles

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Entre otras, intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas y en procesos defensivos frente a patógenos (Gülçin, 2006) (Martínez-Valverde, et al. 2000). Dependiendo de su estructura, se ha descrito que tienen el papel de proporcionar color a la planta para contribuir así a la polinización (López Corona, 2013).

Los polifenoles constituyen uno de los grupos más numerosos y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. En la actualidad se conocen más de 8000 estructuras fenólicas y han sido identificados alrededor de 4000 flavonoides.

Aunque los polifenoles se caracterizan por su estructura fenólica. Este grupo está altamente diversificado y contiene muchos subgrupos de compuestos fenólicos.

La diversidad y la amplia distribución de polifenoles en las plantas han conducido a los diferentes modos de clasificar estos compuestos que se producen de forma natural. Los polifenoles se clasifican según su origen, función biológica y estructura química.

En el presente trabajo se clasifican según Tsao, (2010) de acuerdo a su estructura química en ácidos fenólicos, flavonoides, amidas polifenólicas y otros polifenoles.

Ácidos fenólicos

Son compuestos polifenólicos derivados del ácido benzoico  $C_7H_6O_2$  (Figura 6) (ácido gálico, ácido vanílico, etc.) y del ácido cinámico  $C_9H_8O_2$  (Figura 7) (ácido cafeico, ácido cumárico, ácido clorogénico, etc.) (Figura 8).

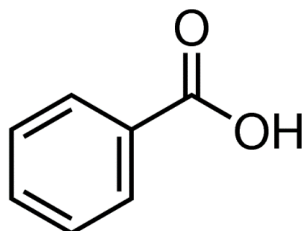


Figura 6. Estructura del ácido benzoico

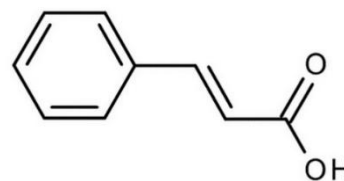


Figura 7. Estructura del ácido cinámico

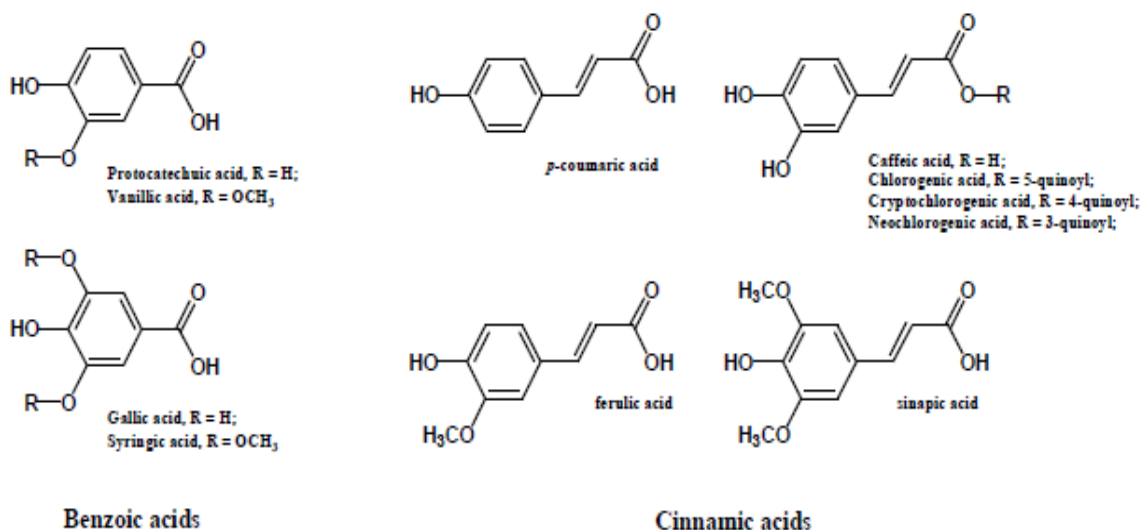


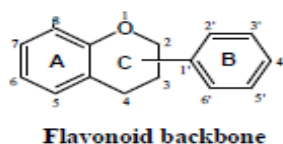
Figura 8. Ácidos fenólicos: ácidos benzoicos y ácidos cinámicos.

Flavonoides

La estructura general de los flavonoides es C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> en la cual ambos C<sub>6</sub> son de naturaleza fenólica.

Debido a la hidroxilación del patrón y la variación en el anillo cromano, los flavonoides pueden ser divididos en diferentes grupos como: antocianinas, flavonas, flavanones y flavanoles.





**Figura 9.** Estructura básica de los flavonoides.

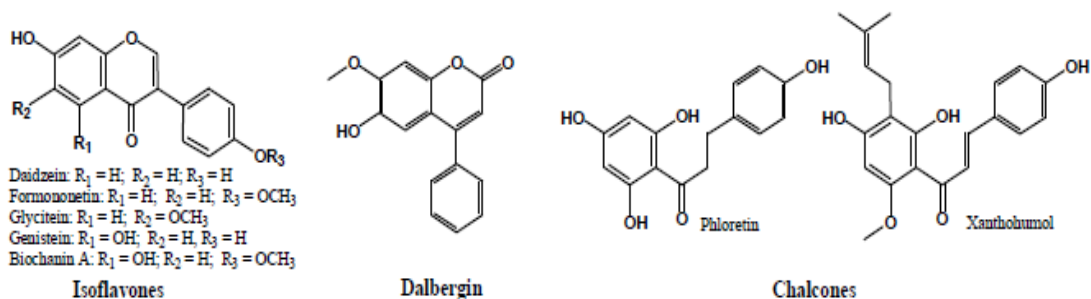
La actividad biológica de estos compuestos, incluyendo la actividad antioxidante, depende de la diferencia estructural y los patrones de glicosilación.

### 1. Isoflavones, Neoflavonoides y Chalcones

**Isoflavones:** Se caracterizan por tener el anillo B unido al C3 del anillo C. Se localizan generalmente en las leguminosas.

**Neoflavonoides:** No se localizan con frecuencia en las plantas comestibles, aunque el dalbergin es el neoflavonoide más común en el reino vegetal.

**Chalcones:** Se caracteriza por tener el “anillo abierto”, se encuentra en el lúpulo o frutas como la manzana.



**Figura 10.** Isoflavones típicos, neoflavones y chalcones

### 2. Flavonas, Flavonoles, Flavanonas y Flavanonoles.

Este subgrupo es el más común de todos, además de ser uno de los más extendido en el reino vegetal.

El número de flavanones y sus 3-hidroxi flavonoles derivados identificados en los últimos 15 años se han incrementado significativamente. (Figura 11)

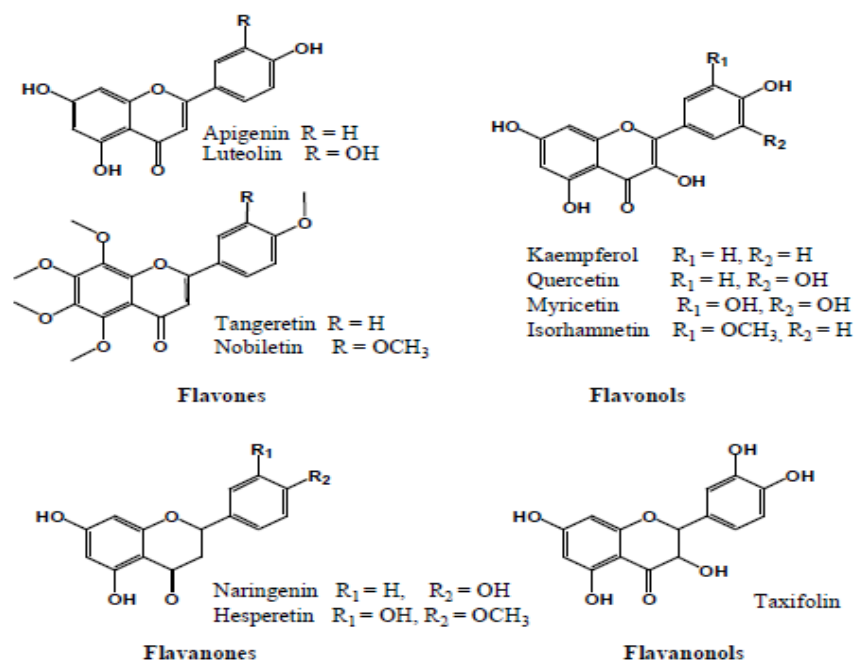


Figura 11. Flavonas, flavonoles flavanonas y flavanonoles.

### 3. Antocianidinas

En las plantas existe principalmente en formas glicosídicas, a las que comúnmente nos referimos como antocianinas. Cianidina, delphinidina y pelargonidina son generalmente las antocianidinas más encontradas. (Figura 12).

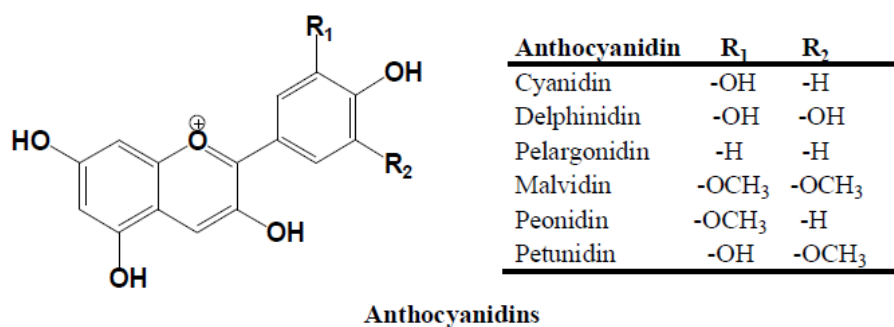


Figura 12. Estructura de las antocianidinas más comunes

### 4. Flavanoles y Proantocianidinas

Flavanoles: Más comúnmente conocidos como Catequinas. Se diferencian de la mayoría de los flavonoides en que éstos no tienen un doble enlace entre C2-C3 y no existe en C4 un carbonilo en el anillo C. Este grupo se considera con un fuerte antioxidante, asociado a grandes beneficios para la salud. (Tsao, 2010). (Figura 13).

**Proantocianidinas:** Consideradas tradicionalmente como taninos condensados. (Figura 13).

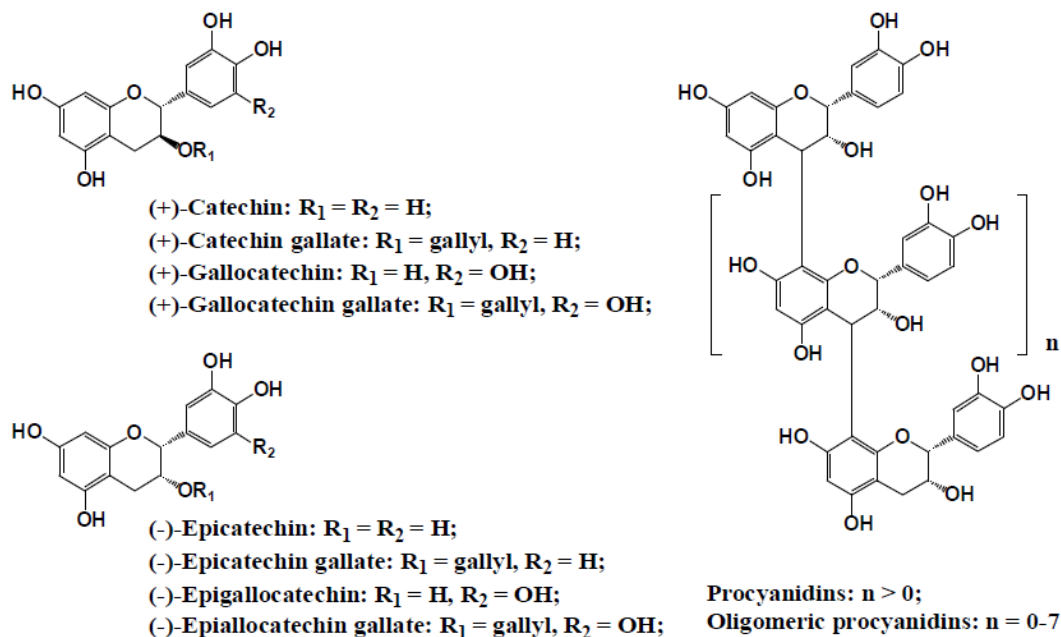


Figura 13. Flavanoles y Proantocianidinas.

### 5. Amidas polifenólicas

Son polifenoles que contienen como sustituyente funcional nitrógeno. A este grupo pertenecen la capsaicina (responsable del picante de los chiles) y avenanthramidas (contenido en la avena) (Figura 14). Se ha demostrado que tienen fuerte capacidad antioxidante y antiinflamatoria, y modulan el sistema de defensa oxidativa en las células. (Tsao, 2010).

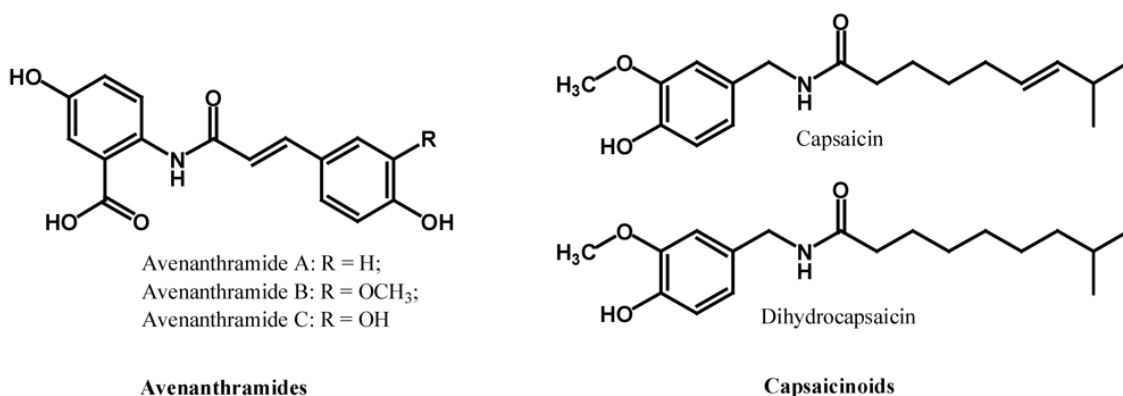
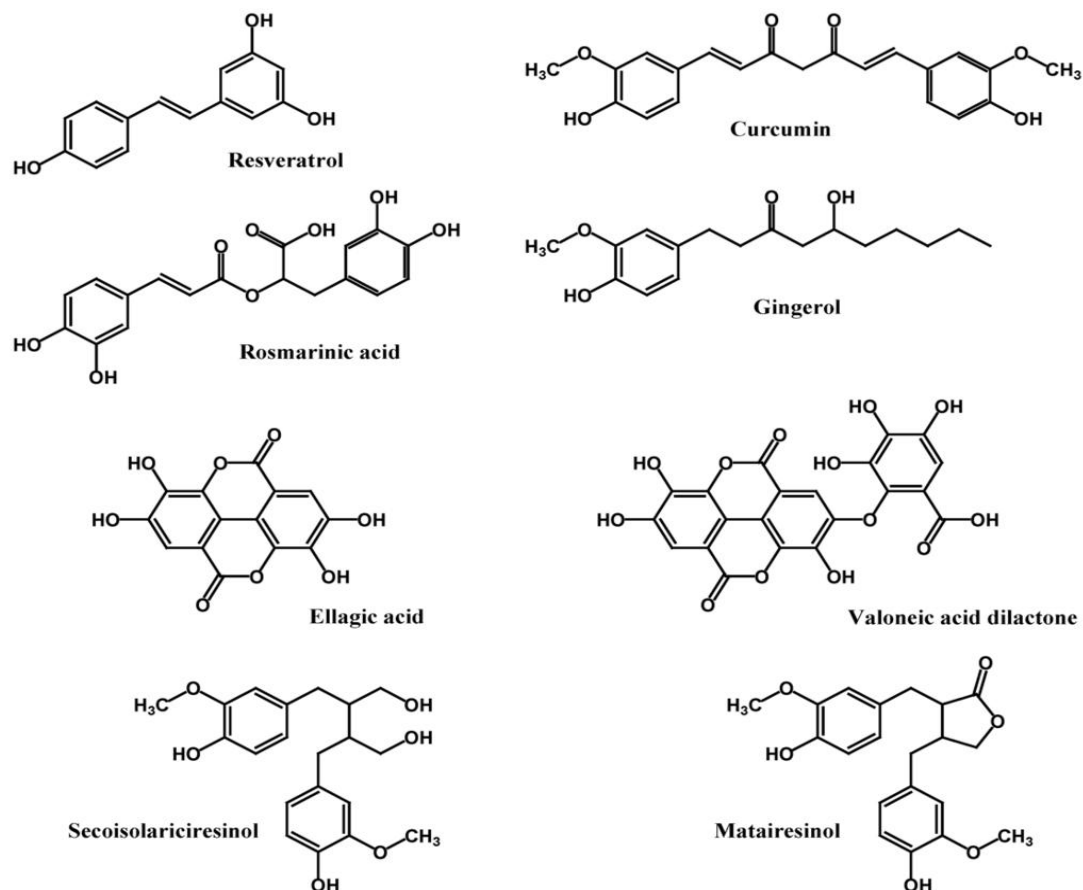


Figura 14. Estructura de las principales amidas polifenólicas.

### 6. Otros polifenoles

Además de los compuestos citados, hay varios polifenoles que se encuentran en alimentos como el resveratrol, o el ácido gálico. Cuyas estructuras se muestran en (Figura 15). Cabe destacar el ácido rosmarínico que se encuentra presente en nuestra planta según un estudio previo realizado (Gimenez- Rota, 2015) en el estudio de la *Lavandula luisieri* ( Toledo).



**Figura 15.** Estructura de otros polifenoles importantes.

## 4.3.- Procesos extractivos y métodos para determinar la actividad antioxidante

### 4.3.1.- Procesos de extracción de principios activos

Antes de realizar cualquier método de análisis de material vegetal, se requiere un proceso previo de extracción de los principios activos. Dependiendo tanto del material a analizar y los análisis que se van a realizar, se debe elegir el método adecuado. Para ello se debe tener en cuenta varios factores que influyen

directamente en los procesos de extracción; las propiedades de la planta, el disolvente extractante, la presión, la temperatura y el tiempo de extracción. Una elevada temperatura favorece y acelera la extracción, algo que puede resultar atractivo a la hora de elegir el método, pero en contra, puede descomponer alguno de los principios activos y provocar pérdidas por volatilización. Por lo tanto, la selección del método es un paso fundamental a la hora de realizar el estudio, ya que influirá en los resultados obtenidos.

Antes de realizar una breve descripción de los métodos de extracción, a grandes rasgos, podríamos decir que éstos se dividen en dos grupos: métodos convencionales y métodos avanzados. Algunos de los métodos convencionales son hidrodestilación, maceración o Soxhlet entre otros. Los métodos avanzados son procesos ambientalmente sostenibles puesto que se disminuye o sustituye el uso de extractivos orgánicos, esto supone mayores rendimientos, menores tiempos de extracción y mayor calidad del extracto obtenido. Algunos métodos que podríamos considerar avanzados son técnicas basadas en ultrasonidos, extracción mediante tratamiento enzimático o fluidos supercríticos.

A continuación, se describen brevemente los diferentes métodos de extracción:

❖ Extracción mecánica:

Se realiza mediante el uso de prensas para ejercer presión sobre el material vegetal y así obtener su aceite.

❖ Extracción mediante tratamiento enzimático:

Las enzimas al actuar como catalizadores en la reacción aceleran el proceso de extracción. Por lo tanto, la utilización de las enzimas adecuadas hace que se rompa la estructura de la membrana celular con la consecuente liberación del compuesto deseado.

❖ Extracción por arrastre con vapor de agua:

Es un proceso muy utilizado para la extracción de aceites esenciales. Éstos están constituidos por terpenoides y fenilpropanoides, compuestos volátiles y por lo tanto arrastrables con vapor de agua.

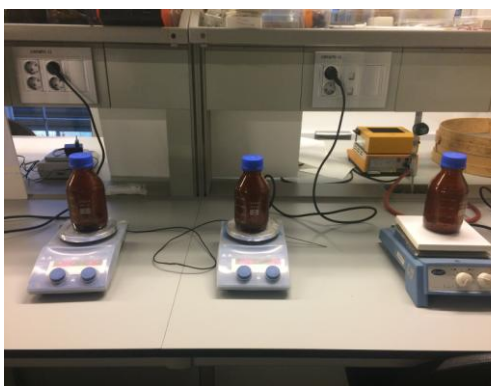
Es una técnica muy útil cuándo la sustancia en cuestión a presión atmosférica hierve por encima de los 100°C y se descompone en su punto de ebullición o por debajo de éste, logrando separa cantidades pequeñas que se encuentran en mezclas con grandes cantidades de sólidos y en donde la destilación o la extracción son impracticables. (Otalora Vera, 2012).

❖ Extracción con disolventes:

Técnica basada en la transferencia selectiva de los compuestos deseados desde el material vegetal hacia una fase líquida. Métodos más utilizados y realizados de diversas maneras:

1. Maceración

Es una técnica fácil, accesible y barata para obtener extractos y compuestos activos. En el presente trabajo se ha utilizado, para ello, el material vegetal una vez molido y tamizado se puso en contacto con el disolvente durante 24h a temperatura ambiente y en agitación (Figura 16). Una vez terminado el proceso de maceración se realizó un filtrado (Figura 17).



**Figura 16.** Proceso de maceración.



**Figura 17.** Filtrado tras la maceración.

2. Extracción Soxhlet

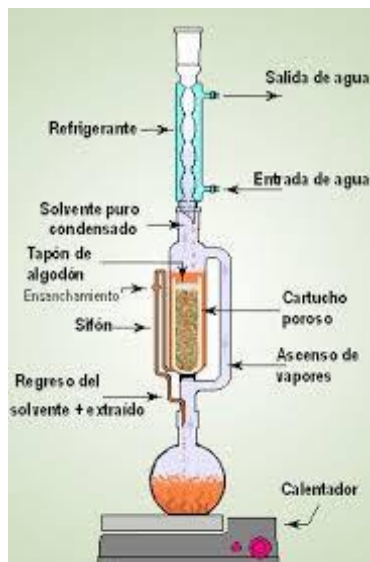
Método de extracción utilizado cuando los compuestos a extraer, generalmente sólidos de origen vegetal, tienen una solubilidad limitada en un disolvente y el extracto es insoluble en ese disolvente. Inicialmente esta técnica fue diseñada para la extracción de lípidos, en la actualidad se ha ampliado su uso y aplicación. (Azmir et al., 2013).

Su campo de aplicación fundamentalmente es el agroalimentario, aunque en los últimos tiempos, ha comenzado a utilizarse en el área medioambiental.

El mecanismo de la extracción Soxhlet es muy sencillo, lo que hace es realizar un sinfín de extracciones de manera automática, con el mismo solvente que se evapora y condensa llegando siempre de manera pura al material extraído.

El material vegetal se coloca en un cartucho de celulosa que se introduce en el cuerpo del Soxhlet situado encima del matraz que contiene el disolvente de extracción y por debajo de un condensador (Figura 18). Aplicándole calor el disolvente entra en

ebullición y los vapores condensados llenan la cámara mojando el cartucho que contiene el material vegetal. Una vez la cámara de extracción se llena completamente con el disolvente se produce un efecto sifón que hace pasar hacia el matraz al disolvente con los solutos extraídos.



**Figura 18.** Soxhlet tradicional

### 3. Extracción asistida por microondas

Las microondas son campos electromagnéticos en el rango de 0.3 a 300 GHz. Consiste en dos campos oscilantes perpendiculares, igual que los campos eléctricos y magnéticos (Azmir et al., 2013). Las microondas consiguen mejorar el rendimiento de extracción al aplicar un tratamiento térmico para generar calor dentro del material y que se caliente en periodos de tiempo más cortos. De esta forma se evita la degradación de los compuestos de interés. Esta extracción permite obtener compuestos bioactivos, orgánicos y organometálicos de manera rápida.

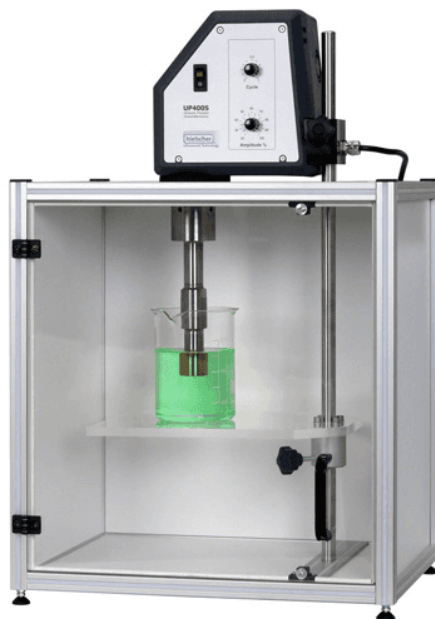
### 4. Extracción asistida por ultrasonidos

El ultrasonido es bien conocido por su capacidad de extracción. Es una aplicación muy exitosa ya que la cavitación generada por ultrasonidos altera las células vegetales y mejora la transferencia de masa de modo que el material intracelular está disponible.

De este modo se logra una extracción más eficiente y con mayores rendimientos. ([www.hielscher.com](http://www.hielscher.com)).

Al aplicar ultrasonidos intensos, los ciclos de expansión crean burbujas en el líquido, cuando explotan, es debido a que no pueden absorber más energía,

produciéndose presiones y temperaturas elevadas que favorecen la liberación de los compuestos.



**Figura 19.** Extractor ultrasonico. Fuente: Hielscher ultrasonic.

#### 5. Extracción acelerada con disolventes

El proceso se lleva a cabo a altas presiones para trabajar con disolventes en fase líquida por encima de su punto de ebullición.

#### 6. Hidrodestilación

Método tradicional para la extracción de compuestos bioactivos y aceites esenciales de las plantas.

Hay tres tipos de hidrodestilación: destilación de agua, destilación de agua y de vapor y destilación directa de vapor. El material vegetal se coloca en un compartimento, el cual se llena de agua y se lleva a ebullición, alternativamente se inyecta vapor directamente en la muestra. El agua caliente y el vapor son los encargados de liberar los compuestos bioactivos de la muestra. El enfriamiento por agua condensa la mezcla de vapor de agua y compuestos. Esta mezcla condensada fluye desde el condensador a un separador donde el aceite y los compuestos bioactivos se separan del agua.

La hidrodestilación implica tres procesos físico químico: hidrodifusión, hidrólisis y descomposición por calor.



Al utilizar este método se debe tener en cuenta que a una alta temperatura de extracción algunos componentes volátiles pueden perderse. Este inconveniente limita su uso para extracción de compuestos termolábiles. (Azmir et al., 2013).

#### 7. Extracción campo eléctrico pulsado

Doevenspeck en 1960 fue el pionero en el desarrollo de esta tecnología, quien generó una patente describiendo los equipos y métodos para el procesamiento de salchichas. (Cerón-Carrillo, et al., 2010). Por lo tanto, es una técnica muy utilizada en ingeniería de los alimentos.

Consiste en la destrucción de membranas celulares para aumentar su extracción. Para ello, un potencial eléctrico atraviesa las membranas celulares provocando la separación de las moléculas en función de su carga. La repulsión entre cargas diferentes provoca la formación de poros en zonas débiles de la membrana aumentando su permeabilidad. La efectividad del método depende de diferentes parámetros como fuerza del campo, temperatura, voltaje, número de pulsos, tiempo de proceso y propiedad del material (Azmir et al., 2013).

#### 8. Extracción con fluidos supercríticos

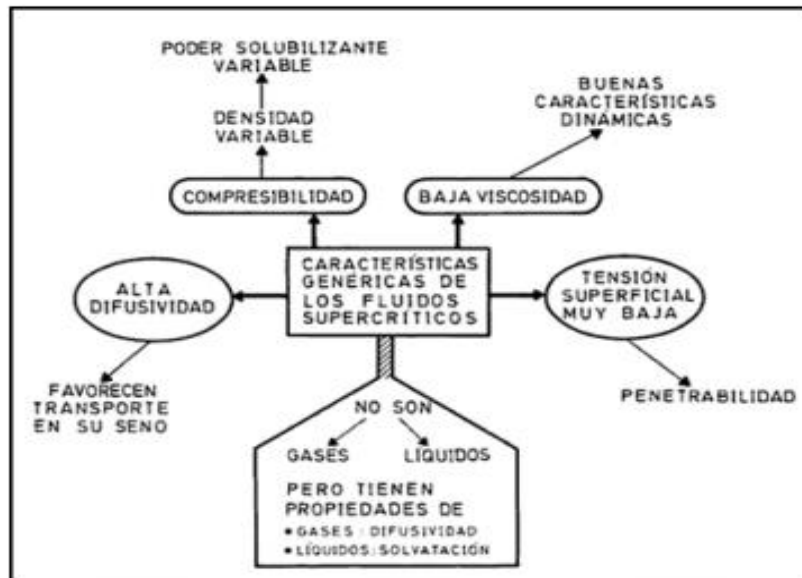
En la actualidad es una técnica muy utilizada y avanzada de separación ya que se puede clasificar dentro de la “química verde”. Puede generar productos de alto valor añadido sin degradación térmica o sin el uso masivo de disolventes (generalmente tóxicos), como sucede en las extracciones clásicas (maceraciones) con disolventes orgánicos (Martín Navarro, 2012).

Un fluido supercrítico (FCS) es cualquier compuesto a una temperatura y presión por encima de su punto crítico. En este punto el compuesto es compresible, se comporta como un gas; características que no tiene cuando está en estado líquido (fluido no compresible que ocupa el fondo del contenedor). No obstante, tiene la densidad de un líquido y por lo tanto su poder disolvente. (Andrews Espinosa, et al. 2016).

El comportamiento de un fluido en estado se describe como el de un líquido muy móvil. Su solubilidad se aproxima a la de la fase líquida mientras que su penetración en una matriz sólida se facilita debido a su alta difusividad y baja viscosidad (próxima a la de los gases, lo que facilita su movilidad).

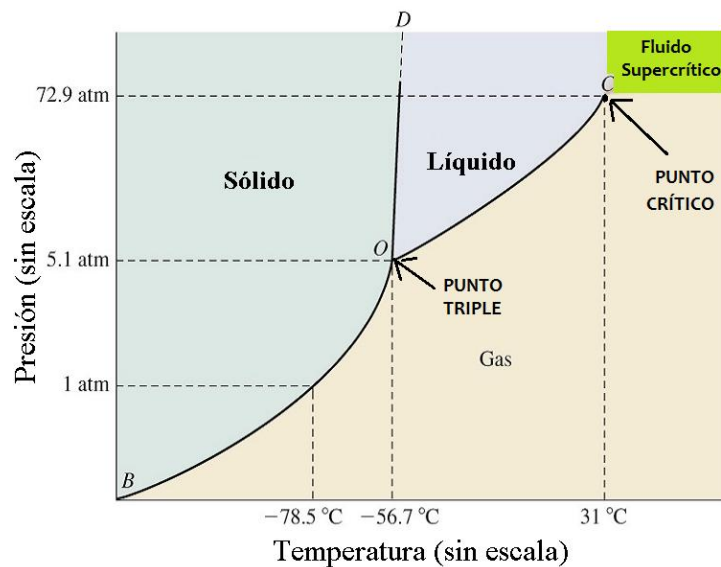
Como consecuencia, las velocidades de extracción y separación de fases pueden ser significativamente más rápidas para los procesos de extracción

convencionales (Andrews Espinosa, et al. 2016). Las características de un fluido supercrítico se resumen en (Figura 20).



**Figura 20.** Panorama general de las características más sobresalientes de los fluidos supercríticos

En (Figura 21) se muestra el diagrama de fases Presión -Temperatura del dióxido de carbono, sustancia pura, en la que se observa que por encima del punto crítico (intersección de temperatura y presión crítica) se encuentra el estado supercrítico, zona donde la coexistencia de las fases líquidas y vapor no es posible.



**Figura 21.** Diagrama de fases del  $\text{CO}_2$ .

**Temperatura crítica:** Por encima de esta temperatura el componente gaseoso del compuesto puro no puede ser licuado sin importar la presión aplicada.

**Presión crítica:** Por encima de esta presión, el componente líquido del compuesto puro no puede ser evaporado sin importar la temperatura aplicada.

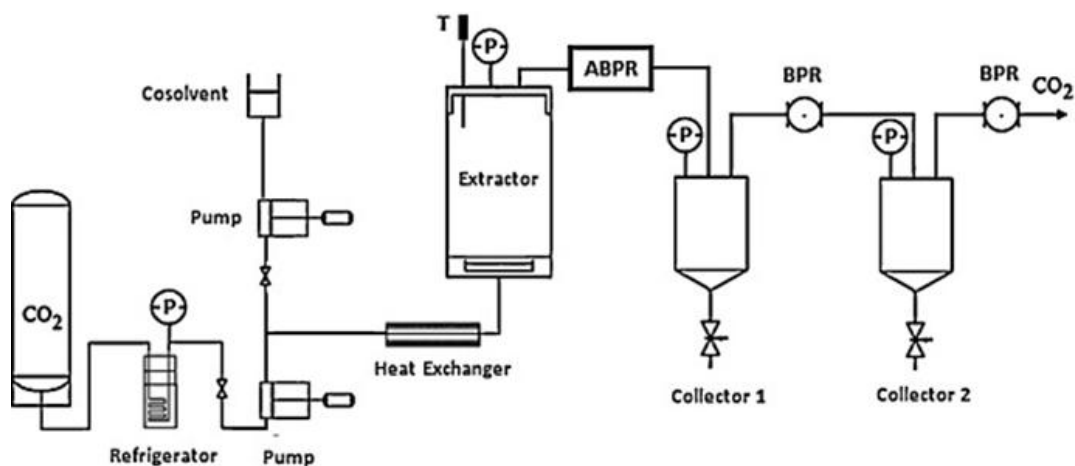
La extracción por fluidos supercríticos depende de la densidad del fluido, ésta se controla a través de la presión y temperatura del sistema. Además, la solubilidad del soluto en el solvente varía con estos parámetros. En condiciones ambientales la solubilidad del soluto en un gas se relaciona directamente con la presión del vapor del soluto, generalmente despreciable.

En un FSC se han reportado solubilidades de hasta 10 órdenes mayores que las predichas por la ley de los gases ideales (Andrews Espinosa, et al., 2016)

De entre todos los fluidos supercríticos el CO<sub>2</sub> ha sido el más estudiado y aplicado gracias a sus bajos parámetros críticos (31.1 °C y 73.8 bar). Esto se debe a que es un gas inocuo, químicamente inerte, económico y de fácil disponibilidad en estado puro. Su baja temperatura crítica y su presión crítica moderada lo convierten en un disolvente adecuado para compuestos termolábiles o fácilmente oxidables, evita la degradación termal de los compuestos extraídos. (Martín Navarro, 2012). El uso del CO<sub>2</sub> como solvente propicia una condición anaeróbica para los compuestos altamente insaturados. Desde el punto de vista del proceso, trabajar con el CO<sub>2</sub> es seguro y no existen problemas de residuos de disolvente en los productos finales (Bhimanagouda Patil, et al., 2006), por lo que no es necesario incluir etapas posteriores de eliminación.

La extracción supercrítica se puede emplear directamente como técnica extractiva sobre un material sólido o como técnica de fraccionamiento aplicado a un extracto cuya finalidad es separar los compuestos en dos fracciones según la afinidad por el disolvente supercrítico. Si se quiere incrementar la polaridad (para compuestos muy polares) del CO<sub>2</sub> supercrítico regularmente se utiliza un co-solvente en cantidades pequeñas y de mayor polaridad. El sistema de co-solvente se encuentra en un estado supercrítico cuando la presión y la temperatura se encuentran por encima del punto crítico de la mezcla, que generalmente no son muy diferentes a los valores para el CO<sub>2</sub> puro y suelen ser alcoholes de cadena corta (Bhimanagouda Patil, et al., 2006).

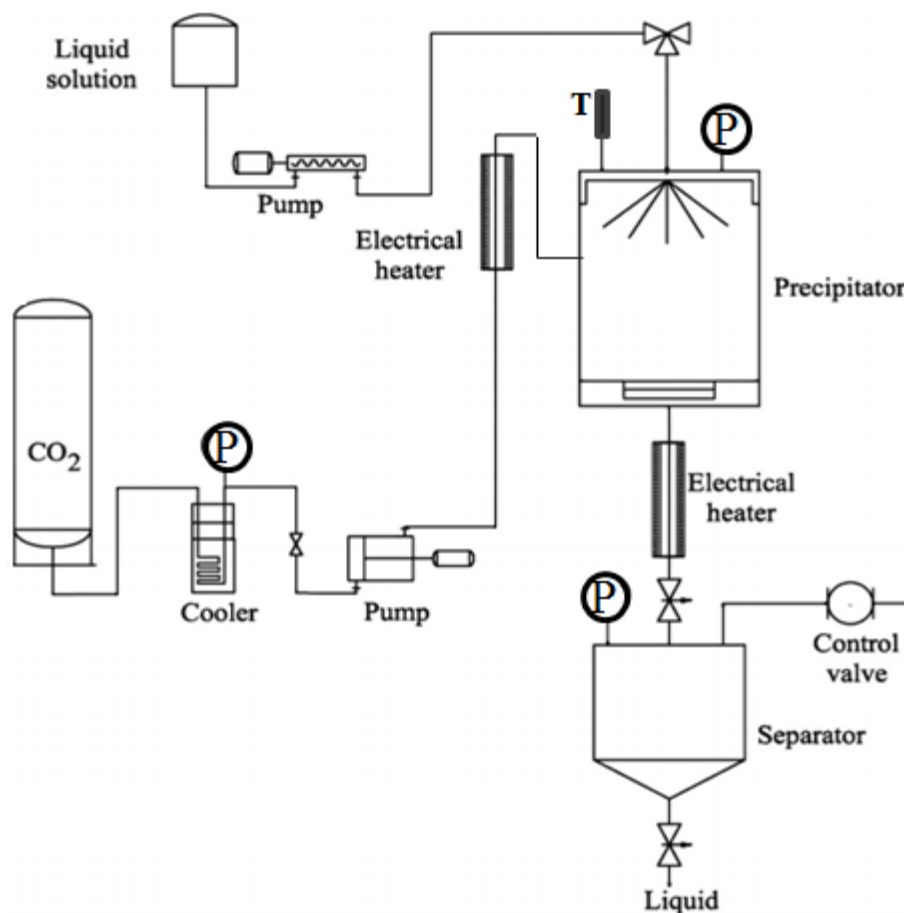
En (Figura 22) se muestra un diagrama de flujo para un proceso de extracción supercrítica.



**Figura 22.** Diagrama de flujo para un proceso de extracción supercrítica

Los fluidos supercríticos tienen otras utilidades, como técnica de fraccionamiento (separación) de los compuestos presentes en un extracto en dos fracciones, (SAF, Supercritical Antisolvent Fractionation). En concreto se realizó un fraccionamiento antidisolvente con SC-CO<sub>2</sub>.

Este proceso considerado como un proceso de post-extracción, se utiliza para enriquecer extractos complejos, eliminar disolventes orgánicos o generar materiales sólidos micro y nanométricos con distribución homogénea del tamaño de partícula. Esquema mostrado en (Figura 23).

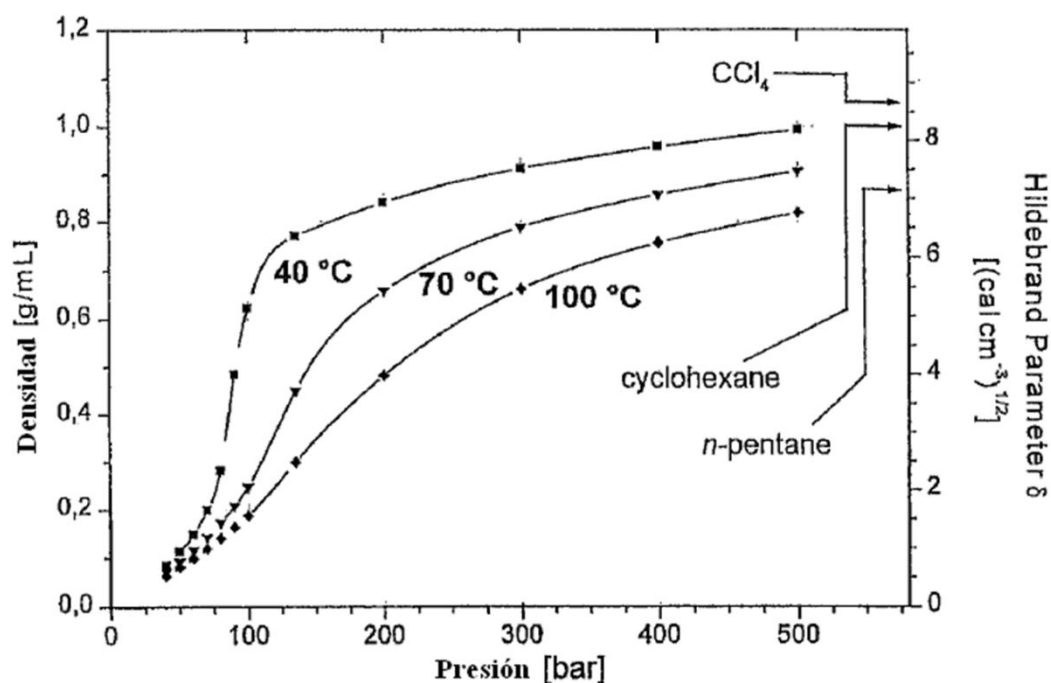


**Figura 23.** Diagrama del proceso SAF

El proceso SAF consiste en poner en contacto, en una cámara de precipitación a presión, al SC-CO<sub>2</sub> con la disolución etanólica que contiene el extracto a fraccionar (en nuestro caso extracto de *Lavandula stoechas subs. luisieri*). La disolución etanólica se introduce en la cámara en forma de aerosol líquido para facilitar la mezcla. El SC-CO<sub>2</sub> entra en la cámara y forma con el etanol una mezcla supercrítica. Debido a la insolubilidad de muchos de los compuestos del extracto en la nueva mezcla de disolventes formada, se precipita en la cámara. Por otro lado, los compuestos que sigan siendo solubles en la nueva mezcla supercrítica CO<sub>2</sub>-etanol atraviesan el filtro situado en el fondo de la cámara y se recogen en un separador a una presión menor (espurgo). Por lo tanto, los compuestos insolubles en la mezcla precipitan en cámara y los solubles pasan a través del filtro hacia el colector de espurgo. Esta técnica permite el fraccionamiento de mezclas con compuestos no solubles en SC-CO<sub>2</sub>, ampliando la versatilidad de las técnicas de extracción supercríticas.

Es fundamental que el sistema se presurice hasta alcanzar la presión y la temperatura de extracción. Cambios en las propiedades físicas suponen grandes variaciones en la presión en las proximidades del punto crítico. Estos cambios son de gran importancia en procesos de extracción ya que están relacionados con cambios en la solubilidad y la transferencia de masa, por lo tanto, asociados a la selectividad del disolvente.

En (Figura 24) se observa que variando la presión y temperatura se obtienen valores de solubilidad de CO<sub>2</sub> similares a otros disolventes.



**Figura 24.** Densidad y polaridad (expresada a través del parámetro de Hildebrand) del CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas, como función de la presión y la temperatura.

El parámetro de solubilidad de Hildebrand,  $\delta$ , representa el poder disolvente de un fluido y está relacionado con la densidad del disolvente a través de la siguiente ecuación:

$$\delta = 1.25 P_c^{1/2} \left[ \rho / \rho_{liq} \right]$$

Donde: →  $P_c$ : presión crítica.

→  $\rho$ : densidad del gas.

→  $\rho_{liq}$ : densidad del líquido.

Al analizar (Figura 24), se observa que a bajas presiones, la densidad de un gas es baja por lo que el poder de solvatación es bajo; cerca de las condiciones críticas, la densidad aumenta rápidamente aproximándose a la del líquido haciendo que la solubilidad aumente conforme aumenta la presión. Esto supone que haya cambios en la densidad y en la solubilidad con la consecuencia de diferentes rendimientos en cámara, según la naturaleza polar que tengan los compuestos del extracto.

El proceso de extracción con fluidos supercríticos está siendo aplicado en diferentes áreas: farmacéutica, alimentaria, cosmética o industrias de proceso químico ya que la ausencia de residuos tóxicos en el producto final la convierten en una técnica muy atractiva y verde. Es especialmente útil en extracción de compuestos bioactivos de alto valor y en la eliminación de componentes orgánicos indeseables como toxinas, pesticidas o contaminantes orgánicos. Algunas de las desventajas que tiene este método de extracción son: alta inversión para el equipo y mantenimiento, medidas elaboradas de recirculación del disolvente para reducir costos energéticos.

#### 4.3.2.- Métodos para determinar la capacidad antioxidante

A continuación, se exponen los métodos utilizados para el cálculo de la capacidad antioxidante, polifenoles y flavonoides totales.

##### 4.3.2.1.-Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante

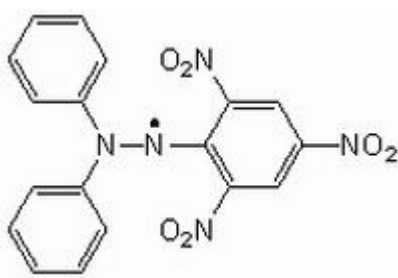
Cómo ya se ha citado anteriormente, el creciente interés en la obtención de del poder antioxidante ha conllevado el aumento de diferentes metodologías para su extracción. Esto supone que no existan métodos unificados y una disparidad de condiciones para su desarrollo.

Estos métodos se pueden clasificar en directos e indirectos. Los métodos directos se basan en el estudio del efecto antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema. Por otro lado, con los métodos indirectos se mide la habilidad del antioxidante de estabilizar algún radical libre, empleando radicales libres metaestables coloreados, con fuerte absorción en el visible ,al añadir el antioxidante se produce una disminución en la absorbancia, pudiendo así determinar actividad estabilizadora de radicales libres.

A continuación, de forma resumida se explican los métodos más utilizados para la determinación de la actividad antioxidante.

#### 1. Método del radical DPPH.

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de plantas medicinales y alimentos, pero la técnica que más atención ha recibido es el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidralizo o N,N- difenil-N'- (2,4,6-trinitrofenil) hidracilo (Figura 25) conocido por las siglas DPPH $\cdot$ . (Guija-Poma, et al., 2015). Este método fue desarrollado por Blois en 1958. Su mecanismo de reacción presenta tanto transferencia de electrónica como de hidrógeno.



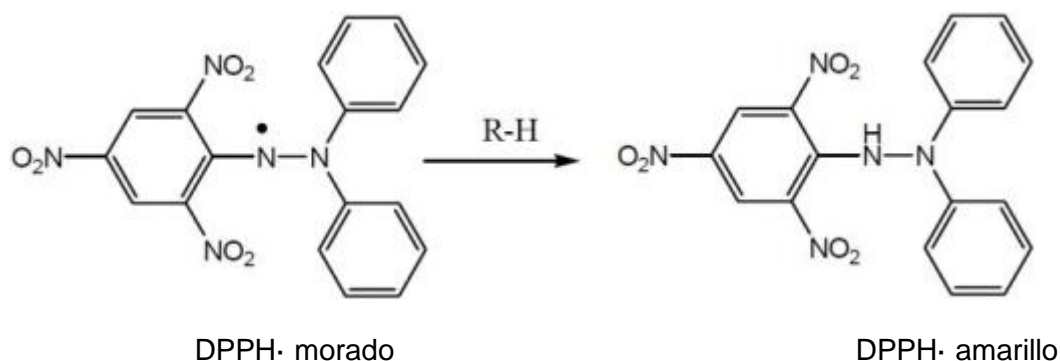
**Figura 25.** Estructura química del Radical DPPH $\cdot$ .

Es un radical estable, gracias a que posee un electrón desapareado, deslocalizado. Esto le permite mantenerse como si fuera un monómero, además le proporciona un color morado en disolución, cuya banda de absorción permite detectar su presencia a 515 nm, mediante espectrofotometría UV-Visible. Además, se da la circunstancia de que la especie reducida del radical DPPH $\cdot$  de color amarillo, no presenta absorbancia a esa longitud de onda.

La reducción del DPPH $\cdot$  se produce cuando este radical interacciona con una sustancia antioxidante capaz de donarle un átomo de hidrógeno, tornándose de color morado a amarillo debido al grupo picril (2,4,6-trinitrofenil) (Kedare y Singh, 2011; Molyneux, 2004; Sharma y Bhat, 2009). (Figura 26).



El proceso se puede esquematizar así:



**Figura 26.** Reducción del DPPH·.



**Figura 27.** Diferentes colorimetrías de la reducción del DPPH·.

Como se aprecia en (Figura 27) se produce un cambio de color progresivo al añadir una disolución etanólica de un extracto natural conteniendo antioxidantes.

En el presente trabajo se ha utilizado este método gracias a su sencillez, rapidez, economía y alta estabilidad.

## 2. Método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

Método basado en la transferencia de electrones y aplicado originalmente por Benzie y Strain para medir el poder reductor en plasma, en la actualidad se ha extendido a otros fluidos biológicos, alimentos, extractos de plantas, etc. (Antolovich, et al., 2002).

Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Consiste en medir el incremento en la absorbancia a 593 nm (azul) que se

desarrolla cuando el complejo TPTZ-Fe<sup>3+</sup>, incoloro se reduce a TPTZ-Fe<sup>2+</sup>, coloreado por productos con potenciales redox menores a 0,7 V. (Benzie y Strain, 1996). Cuanto más antioxidante es la sustancia a estudio, mayor reducción y concentración de Fe<sup>2+</sup> y por lo tanto mayor absorbancia.

### 3. Método ORAC ( Oxygen-Radical Absorbance capacity)

Este método consiste en medir la disminución en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre un daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido (ROO). Mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la proteína (fluoresceína) del daño oxidativo (Zulueta et al., 2009).

El mecanismo de la reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre. El radical APPH (2,2'-Azobis-(2-aminopropano)-dihidrocloruro) oxida a la fluoresceína y pierde su fluorescencia. Las sustancias antioxidantes presentes en el extracto disminuirían la pérdida de fluorescencia (Agudo, 2002).

### 4. Método ABTS<sup>+</sup>

Método espectrofotométrico ampliamente utilizado para determinar la actividad antioxidante tanto en materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica.

Se basa en la cuantificación de la decoloración del radical catiónico ABTS<sup>+</sup> (verde-azul) reduciéndose a ABTS dependiendo de la actividad antioxidante y su concentración además de la duración de la reacción. Es el radical más adecuado para los compuestos coloreados, como los antocianos por tener un pico de absorción a 734nm (mide entre 415nm y 734 nm) (Kuskoski, Asuero, García-Parrilla, Troncoso y Fett, 2004). El radical ABTS<sup>+</sup> puede ser generado por enzimas o químicamente.

#### 4.3.2.2.- [Métodos para la determinación de polifenoles totales](#)

Los polifenoles son compuestos bio-sintetizados por las plantas (frutos, hojas, tallos, raíces, semillas, etc...) caracterizados por poseer más de un grupo fenol en sus moléculas. Además, de ser fuertes antioxidantes. Las investigaciones de los últimos años apoyan firmemente el papel de los polifenoles en la prevención de enfermedades degenerativas, particularmente cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. (Tsao, 2010)

Para la determinación de la cantidad e polifenoles totales, generalmente se utiliza el reactivo Folin- Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico), ya que, debido a su simplicidad, disponibilidad comercial del reactivo y que es un procedimiento estandarizado, es un método muy utilizado en el área de la agroquímica e industrias alimenticias. (Singleton, et al, 1999).

El ensayo Folin - Ciocalteu mide la capacidad que tiene los polifenoles para reducir el Mo(VI) a Mo (V), como resultado de tal reacción el reactivo de color amarillo adquiere un color azul que se mide con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760nm. Suelen extraerse utilizando agua, disolventes orgánicos polares como metanol, etanol, acetonitrilo o acetona, o su mezcla en agua (Tsao, 2010)

Para la cuantificación de polifenoles totales mediante este procedimiento analítico se realiza una comparación con una recta patrón basada en algún compuesto polifenólico como es el caso del ácido gálico. Este ha sido el método utilizado para la determinación de polifenoles totales en *L. Luisieri*.

#### 4.3.2.3.- [Métodos para la determinación de flavonoides totales](#)

Los flavonoides son un constituyente muy valioso de las plantas en la captura de radicales libre, debido a la gran cantidad de hidroxilos presentes en su estructura (Kumarappant et al., 2012). Se consideran compuestos con una alta polaridad, por lo que son extraíbles con disolventes polares como el metanol, etanol, acetona o agua. Entre todas, las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes.

El método más utilizado para la determinación de flavonoides totales es el método colorimétrico de cloruro de aluminio. Se fundamenta en la formación de un complejo entre el ion aluminio Al (III) y los grupos carboxilo e hidroxilo de algunos

flavonoides (flavonas y flavonoles) produciendo un color amarillo medible por espectrofotometría a una longitud de onda de 415 nm (Pontis, et al., 2014). En concreto el  $\text{AlCl}_3$  forma complejos estables en solución ácida con el grupo C-4 y el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles. Además, forma complejos lábiles ácidos con los grupos ortodihroxilo en el anillo A o B de los flavonoides (Chang, et al., 2002).

Otro método es el colorimétrico con DNP (2,4-dinitrofenilhidrazina) donde este compuesto reacciona con aldehídos y cetonas formándose 2,4-dinitrofenilhidrizona, el cual produce un color rojo medible por espectrofotometría a una longitud de onda de 495 nm (Pontis, et al., 2014).

Los métodos colorimétricos son los más empleados para la determinación de flavonoides totales, sin embargo, ninguno de ellos es capaz de determinar todo tipo de flavonoides.

El método de cloruro de aluminio ha sido el empleado para la determinación de flavonoides totales en el presente trabajo.

## MATERIALES Y METODOLOGÍA

## 5.- MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 5.1.- Materiales

#### 5.1.1.-Material vegetal

El material vegetal utilizado son flores y hojas de *Lavandula luisieri* originaria de Portugal y adaptada en una parcela experimental localizada en el término municipal de Aguarón (Zaragoza) perteneciente al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de la Diputación General de Aragón (CITA). La planta fue secada convenientemente en las dependencias del CITA, se separaron por un cribado manual (con ayuda de un cedazo) las flores de las hojas.

Una vez finalizado este pretratamiento del material vegetal de partida se guardaron por separado hojas y flores, en bolsas herméticas y fueron almacenadas en un congelador con la finalidad de conservar al máximo sus propiedades.

#### 5.1.1.2.- Disolventes y reactivos

Los disolventes y reactivos empleados en los diferentes análisis se muestran en (Tabla 2).

**Tabla 2.** Disolventes y reactivos empleados en los análisis y extracciones.

Compuesto	Proveedor	Pureza (% en masa)
<b>n- Hexano</b>	Panreac	99,0
<b>Etanol</b>	VWR BDH Chemicals	99,94
<b>Dióxido de carbono</b>	Contse	99,99
<b>Agua</b>	Autoservicio Fac. C. Z.	Agua ultrapura Milli-Q
<b>Trolox<sup>TM</sup> *</b>	Sigma-Aldrich	97
<b>DPPH- **</b>	Sigma-Aldrich	-
<b>Ácido gálico</b>	Sigma-Aldrich	≥97.5
<b>Reactivo de Folin-Ciocalteu</b>	Sigma-Aldrich	-
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Sigma Aldrich	≥99.0
<b>Tricloruro de Aluminio</b>	Acros organics	99,0
<b>Quercitina</b>	Glentham Life Sciences	99,9
<b>Nitrito de Sodio</b>	Probys	97,5
<b>Hidróxido de Sodio</b>	T3Q	≥99,0

**Nombres IUPAC del DPPH- y trolox:** \* Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico;

\*\*di(fenil)-(2,4,6 trinitrofenil)iminoazanio.

## 5.2.- Métodos

### 5.2.1.- Determinación de masa

Para la determinación de la masa utilizamos una micro balanza electrónica de precisión METLER TOLEDO modelo AB265 S con una precisión de 0,01 mg/0,1 mg para capacidades máximas 81 g/220 g.

### 5.2.2.- Molienda y tamizado

El material vegetal de partida (flores y hojas de *Lavandula luisieri*) fue sometido a molienda mediante un molinillo "Taurus".



**Figura 28.** Tamizadora CISA modelo BA 300 N con varios tamices.

Tras la molienda se realizó el tamizado (Figura 28) de flores y hojas por separado, obteniéndose muestras de diferentes tamaños.

Para el tamizado se utilizó una tamizadora CISA modelo BA-300N, la cual es electromagnética y digital con cribas de diferente tamaño de partícula comprendidas entre 0,074 mm y 0,900 mm. Estos tamices se colocan en orden ascendente según su tamaño de luz de malla.

El tamizado se realizó en 2 partes:

1º: 900  $\mu$  - 710  $\mu$  - 589  $\mu$  - 495  $\mu$

2º: 400  $\mu$  - 246  $\mu$  - 150  $\mu$  - 0.074  $\mu$

El proceso de tamizado duró 30 minutos y los distintos tamaños de partículas se conservaron en bolsas herméticas.

El objetivo de esta criba es obtener material vegetal con un diámetro medio de partícula adecuado, en torno a 0,3 mm siguiendo el procedimiento detallado en el método normalizado ANSI/ ASAE S.

### 5.2.3.- Grado de Humedad



**Figura 29.** Materia vegetal utilizada en el analizador de humedad.

El grado de humedad fue determinado mediante termogravimetría que consiste en determinar la pérdida de masa al calentar una sustancia. Para ello se utilizó el analizador de humedad Sartorius modelo MA 40.

Se pesó 1 gramo del material vegetal (Figura 29) y se introdujo en el analizador y se alcanzaron 110 grados centígrados. Cuando el peso se estabilizó, anotamos la masa final.

El grado de humedad expresado como porcentaje, es la diferencia entre el peso de la masa inicial, menos el peso de la masa final tras el calentamiento.

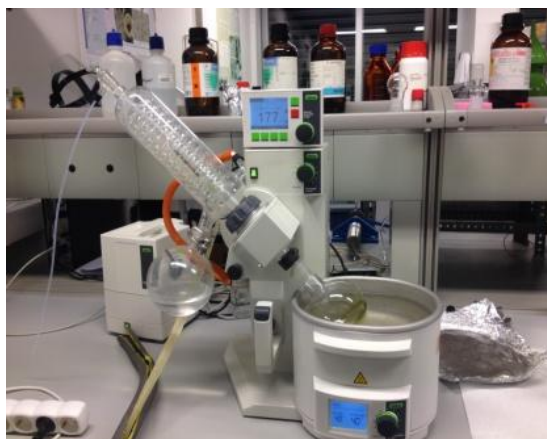
Este proceso fue realizado por quintuplicado.

### 5.2.4.- Rotovaporización

El rotovapor se utiliza para destilaciones de una sola etapa de manera rápida. Este método se basa en la condensación y evaporación de disolventes mediante un matraz de evaporación rotativo, de manera uniforme, bajo condiciones de vacío. Las rotovaporizaciones producen una mezcla ecuánime de la muestra evitando el sobrecalentamiento localizado en el matraz. El vacío disminuye la temperatura de ebullición incrementando la destilación.

El rotovapor utilizado es el modelo *Büchi R-210* acoplado a una bomba de vacío V-700 con baño calefactor *B-491*, un refrigerador F-105 y controlador de vacío V-850.





**Figura 30.** Rotovapor Büchi R-210.

Las condiciones de trabajo fueron, 40° C para el baño y la presión se redujo convenientemente en función del disolvente empleado (178 mbar para el hexano y 63 mbar para el etanol).

Este proceso es necesario para determinar los rendimientos obtenidos de los diferentes extractos o sus fracciones. La operación de rotovaporización se ha de llevar a cabo de manera conveniente evitando la presencia de disolvente, teniendo en cuenta que, a la hora de realizar los pesajes de las muestras, la presencia de disolvente, podría producir resultados erróneos. Para evitar tales errores, se consideró que el extracto estaba exento de disolvente en el momento en que la diferencia de dos pesadas consecutivas fuera insignificante.

El rendimiento fue determinado mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Masa}_{\text{extracto seco}}}{\text{Masa}_{\text{materia vegetal inicial}}} \times 100$$

El extracto o las fracciones se conservaron en el congelador a -20°C hasta su posterior utilización.

#### 5.2.5.- Espectrofotómetro

Para poder determinar el poder antioxidante de los distintos extractos obtenidos en el presente trabajo, es necesario el empleo de la espectroscopía de absorción visible- UV.

El espectrofotómetro empleado para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos, es el “Evolution 300. UV-VIS Spectrophotometer”, (Figura 31), éste va acompañado del software VISIONpro para una correcta utilización. Evolution 300 consta de un ancho de banda variable y una lámpara de xenón, la cual ofrece un buen rendimiento en todo el intervalo de longitud de onda. Otra característica de este equipo es que nos permite controlar la temperatura de trabajo a las condiciones deseadas, en nuestro caso 25°C.



**Figura 31.** Espectrofotómetro Evolution 300.

Este instrumento tiene la capacidad de proyectar un haz de luz monocromática a través de una muestra, colocada en una celda de plástico, puesto que trabajamos en la región visible, y determinar la cantidad de luz absorbida por dicha muestra. ([www.equiposylaboratorio.com](http://www.equiposylaboratorio.com)).

Para cerciorarnos de un correcto funcionamiento del espectrofotómetro, se verificó su exactitud a diferentes absorbancias y longitudes de onda.



**Figura 32.** Kit de filtros Pye Unicam Ltd. Cambridge England.

Para ello se utilizó el conjunto de filtros Pye Unicam Ltd. Cambridge England (referencia: Pt. No. 790850) mostrados en (Figura 32). El conjunto consta de un bloque de alineación del haz y de varios filtros para el control de la absorbancia (fabricados en Níquel) y de la longitud de onda (Holmio y Didimio).

Se llevaron a cabo varios barridos abarcando el rango de longitud de onda disponible en el equipo. En (Tablas 3 y 4) se recogen las longitudes de onda de los picos de absorbancia que generan, respectivamente, los filtros de Holmio y Didimio junto con las longitudes de onda medidas.

**Tabla 3.** Longitudes de onda para el filtro de Holmio y medidas experimentales.

$\lambda_{\text{filtro}}$	$\lambda_{\text{experimental}}$	Diferencia
241,5	<b>240,6</b>	<b>0,9</b>
279,4	<b>279,4</b>	<b>0</b>
287,5	<b>287,8</b>	<b>-0,3</b>
333,7	<b>333,6</b>	<b>0,1</b>
360,9	<b>360,8</b>	<b>0,1</b>
385,9	<b>385,8</b>	<b>0,1</b>
418,7	<b>418,8</b>	<b>-0,1</b>
453,2	<b>453,6</b>	<b>-0,4</b>
460	<b>460,2</b>	<b>-0,2</b>
484,5	<b>485,4</b>	<b>-0,9</b>
536,2	<b>536,6</b>	<b>-0,4</b>
637,5	<b>637,8</b>	<b>-0,3</b>
<b>Valor medio</b>		<b>0,38</b>

**Tabla 4.** Longitudes de onda para el filtro de Didimio y medidas experimentales

$\lambda_{\text{filtro}}$	$\lambda_{\text{experimental}}$	Diferencia
573	<b>572,8</b>	<b>0,2</b>
586	<b>585,4</b>	<b>0,6</b>
685	<b>685</b>	<b>0</b>
<b>Valor medio</b>		<b>0,26</b>

Tras analizar los valores medios (absolutos) obtenidos en los experimentos se verificó que el equipo funcionaba correctamente.

## 5.2.6.-Procesos de extracción de principios activos

### 5.2.6.1.- Maceración

La maceración es un método de extracción sólido- líquido de los principios activos de una planta en un líquido. En este caso, el sólido; material vegetal de hojas y flores de *Lavandula luisieri*, se mantiene en contacto con un disolvente orgánico como extrayente de los compuestos solubles en él, durante un periodo determinado de tiempo.

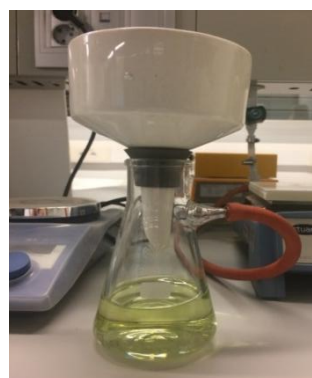
Se hicieron dos extracciones consecutivas; la primera de ellas en hexano para eliminar todas las ceras y lípidos, la segunda en etanol para eliminar los compuestos de naturaleza polar.

Se utilizaron 20 g de material vegetal de tamaño de partícula aproximado de 0,3 mm tanto de flores como de hojas de *Lavandula luisieri*. Por cada gramo de material vegetal se añadieron 10 ml de disolvente, por lo tanto, se añadieron 200 ml de disolvente. Para llevar a cabo el proceso de maceración se utilizaron botellas de vidrio de 500 ml de color topacio (evita la fotoxidación) y provistas de un cierre hermético para evitar la evaporación.

Una vez preparada la muestra a macerar, se colocó en la placa agitadora durante 48h a temperatura ambiente. Las maceraciones se realizaron por triplicado. (Figura 33).



**Figura 33.** Proceso de maceración.



**Figura 34.** Filtrado tras la maceración.

Pasadas las 48h dimos por concluida la maceración y se filtró a vacío, mediante el embudo Büchner, en el que colocamos papel de filtro para evitar el posible

paso de partículas a la disolución filtrada, la cual se recoge en un kitasato, acoplado a una trompa de vacío. (Figura 34).

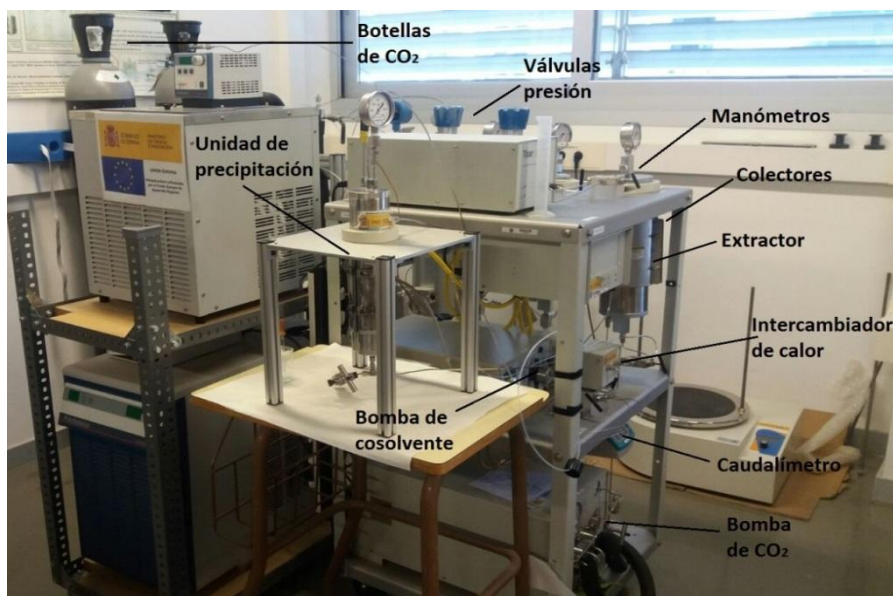
Tras la filtración obtuvimos dos fracciones diferentes, las cuales se trataron de forma distinta:

- Fracción sólida: Se retiró convenientemente el papel de filtro, evitando la pérdida de material vegetal. Lo dejamos secando durante 24h. Pasadas las 24 h se realizó la segunda extracción con etanol, siguiendo el proceso explicado anteriormente, al realizar la extracción con hexano. Previamente se pesó el material vegetal para cerciorarnos de la cantidad exacta que utilizamos.
- Fracción líquida: La disolución de extracto obtenida tras la primera maceración, se rotovaporizó eliminándose el hexano para calcular el rendimiento en ceras y compuestos apolares. En el caso de la segunda maceración etanólica se rotovaporizó para determinar el rendimiento del extracto (compuestos de naturaleza polar).

Los extractos etanólicos obtenidos se utilizaron para la determinación de su actividad antioxidante de forma directa. Además mediante la técnica SAF (técnica detallada en el apartado 5.2.7) se consiguió fraccionar el extracto etanólico y se procedió también a la determinación del poder antioxidante de las fracciones obtenidas por separado.

#### 5.2.7.- Fraccionamiento supercrítico antidisolvente (SAF)

El fraccionamiento antidisolvente con SC-CO<sub>2</sub> se llevó a cabo en la planta del laboratorio situada en el edificio I3A (Campus Río Ebro) y puesta a punto por el grupo GATHERS. El dispositivo (Figura 35), permite extraer y separar aceites y ceras de material vegetal a una temperatura de hasta 120°C y presiones de hasta 400 bar.



**Figura 35.** Planta piloto de fraccionamiento antidisolvente con SC-CO<sub>2</sub>.

Partes de las que consta la planta piloto:

- Botella de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub> Tank)
- Bomba de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub> Pump)
- Reservorio de codisolvente (Co-solvent)
- Bomba de codisolvente (Co-solvent Pump)
- Intercambiador de calor, Heat Exchanger, calienta el CO<sub>2</sub> a 40°C
- Cámara de precipitación
- Regulador de presión automático (Automated BPR)
- Vasijas colectoras (Coll Vess 1 y 2)
- Regulador de presión manual en las vasijas colectoras (Manual BPR)
- Caudalímetro de CO<sub>2</sub>
- Controladores de temperatura

El control de todos los parámetros (presión, temperatura y flujo) se realiza a través del software de la planta (Figura 36 y 37).

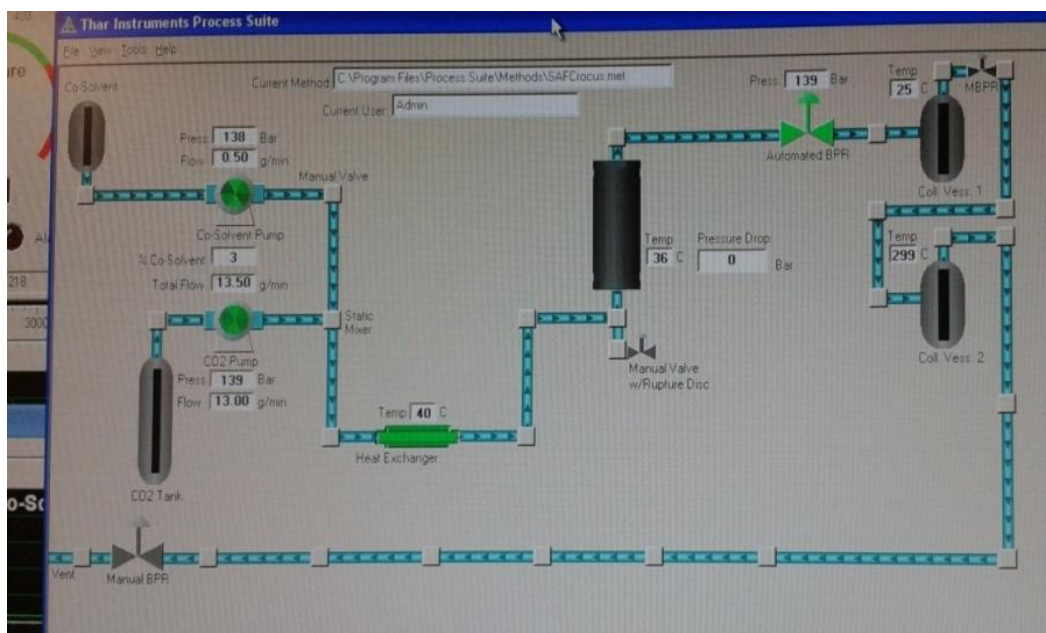


Figura 36. Esquema de la planta piloto.

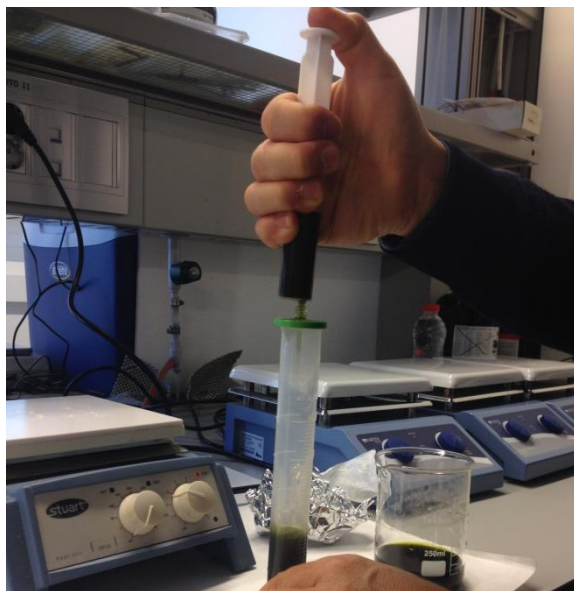


Figura 37. Software de la planta de extracción con SC-CO<sub>2</sub>.

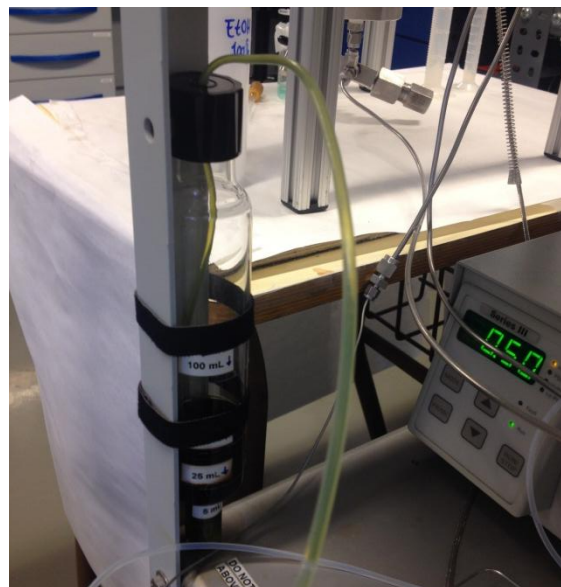
La (Figura 37) es una imagen de la pantalla del ordenador utilizada para controlar el proceso. El equipamiento cuenta con todos los sistemas de seguridad necesarios: discos ruptura y límites de presión, BPR y temperatura de seguridad que en el supuesto de que se alcanzase esa temperatura se detendría de inmediato el proceso.

En el caso de las flores, pesamos aproximadamente 1,2 g. Estos 1,2 g son el resultado de la maceración, recordamos que se hicieron tres réplicas, por lo que aproximadamente cada matraz contiene 0.4g de extracto.

A cada matraz le añadimos 20 mL de etanol para que el extracto se diluyese completamente. Posteriormente, lo echamos en un vaso por lo que obtuvimos aproximadamente 1,2g y 60 mL de etanol.



**Figura 38.** Filtrado del extracto



**Figura 39.** Extracto filtrado en SAF

Como se observa en (Figura 38), antes de inyectar la disolución se ha de filtrar el extracto para evitar que cualquier resto sólido que haya podido quedar. Para ello se utilizó una jeringa de Nylon 0.45  $\mu\text{m}$ .

Una vez filtrado y comprobadas las condiciones de trabajo; presión de 115 bar, temperatura constante de 40°C, caudal de  $\text{CO}_2$  30g/min y un Co-solvent de 0,5 mL/min. , se inicia el bombeo de  $\text{CO}_2$  y se inyecta la disolución etanólica del extracto.

Recaltar que estas condiciones óptimas de trabajo en las que se obtienen los mayores rendimientos previenen de estudios previos realizados a este trabajo en el laboratorio de Química Sostenible, del I3A, todos ellos pertenecientes al grupo GHATERS.

Una vez inyectada la disolución etanólica del extracto, se establece el mezclado de la corriente de  $\text{SC-CO}_2$  y un aerosol de la disolución líquida. En la cámara, (en cuyo interior se encuentra un filtro para retener todas las partículas sólidas generadas) se produjo la separación donde quedaron los compuestos no solubles en la mezcla de  $\text{CO}_2$ + etanol (Figura 40).

Los compuestos solubles (no retenidos en cámara) en la mezcla de  $\text{CO}_2$ + etanol son conducidos a un colector donde se produce la separación del  $\text{CO}_2$  gaseoso



por la parte superior, y por el fondo en el colector, cada 15 minutos se recoge la fracción etanólica o espurgo (Figura 41).

Finalizado el bombeo, se ha de lavar la planta para evitar que quede extracto en el interior del circuito, para ello introducimos 40 mL de etanol puro y arrastramos todo el extracto que pudiese quedar. Una vez hecho esto, se hizo circular CO<sub>2</sub> para un lavado completo.

De cada experimento, hojas y flores, se obtuvieron:

- Fracción sólida: Localizada en la cámara (Figura 40).
- Fracción líquida: Tanto en cámara como en el colector o espurgo (Figura 41).

La fracción líquida, se rotovaporizó, para eliminar el disolvente y poder calcular su poder antioxidante.



**Figura 40.** Fracción sólida de la cámara



**Figura 41.** Fracción líquida de cámara y colector

## 5.2.8.- Medida de la capacidad antioxidante

### 5.2.8.1.-Método del DPPH.

Para seguir la evolución de la reacción, utilizamos la medida espectroscópica a una longitud de onda fija de 515 nm. Es imprescindible usar esta longitud de onda, puesto que es la que presenta el máximo de absorbancia en el visible de la disolución del DPPH·. La caída de la absorbancia está directamente relacionada con la cantidad de radical libre presente en cada momento.

Los resultados de esta técnica se pueden presentar de diferentes maneras, pero en este caso, la capacidad antioxidante de los extractos se expresó mediante 3

índices: EC<sub>50</sub> (Efficient Concentration), definido como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir a la mitad la concentración inicial de DPPH· (Brand-Williams et al., 1994), IC<sub>50</sub> como la concentración que proporciona el 50% de inhibición y AAI, índice de actividad antioxidante (Scherer y Teixeira Godoy, 2009).

El cálculo del EC<sub>50</sub> se realizó con la recta resultante de la representación gráfica del porcentaje de cantidad de DPPH· remanente (%CR) frente a la relación g<sub>extracto</sub>/g DPPH· o bien en el caso de una sustancia pura (de masa molecular conocida) como es el caso del Trolox<sup>TM</sup>, se utilizó la relación mol<sub>trolox</sub>/mol<sub>DPPH·</sub>.

$$\% \text{Cremanente} = \frac{C_f \text{ DPPH}}{C_i \text{ DPPH}} * 100$$

Donde: C<sub>f</sub> DPPH·: Concentración final de DPPH·, tras una hora de reacción. C<sub>i</sub> DPPH·: Concentración inicial, antes de comenzar la reacción. Ambas concentraciones se calcularon a partir de la recta de calibrado.

Para el cálculo del IC<sub>50</sub> se utilizó el gráfico que representa el porcentaje de inhibición (%I) frente a la concentración de los diferentes extractos. (Anexos páginas 91-97).

$$\%I = \left[ \frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_i} \right] * 100$$

Donde Abs<sub>i</sub>: Absorbancia inicial; Abs<sub>f</sub>: Absorbancia final.

Obtenidos los índices de inhibición se procede a la preparación de las rectas. En el eje y se colocaron las concentraciones de la cubeta para cada patrón y en el eje x el % inhibición.

Finalmente, el cálculo del AAI se realizó a través de la siguiente expresión:

$$AAI = \frac{C_i \text{ de DPPH } (\mu\text{g/ml})}{IC_{50} (\mu\text{g/ml})}$$

Donde C<sub>i</sub>: Concentración inicial de DPPH·

Método de cuantificación del grado de actividad antioxidante:

**Tabla 5.** Grado de poder antioxidante en función del AAI.

Rango AAI	Poder antioxidante
AAI < 0.5	Pobre
0.5 < AAI < 1.0	Moderado
1.0 < AAI < 2.0	Alto
2.0 < AAI	Muy antioxidante

#### 5.2.8.2.- Preparación de la recta de calibrado

Para determinar espectroscópicamente el  $EC_{50}$  de los extractos, lo primero que se tuvo que hacer fue realizar una recta de calibrado. Se preparó una disolución madre de DPPH·, para ello se pesaron aproximadamente 0,005g del radical en la balanza de precisión, los cuales transvasamos a un matraz aforado de 100 ml, donde añadimos etanol hasta su enrase. Por ello la disolución madre de DPPH· tenía una concentración aproximada a 0,05 g /L.

Una vez enrasado el matraz aforado con el radical en etanol, se introdujo un núcleo y se llevó a agitación durante 10 minutos y posteriormente otros 10 minutos en ultrasonidos para cerciorarnos de una correcta disolución.

Por dilución, a partir de la disolución madre de concentración conocida, se prepararon 4 disoluciones patrón de concentraciones aproximadas de 0,01 g/L, 0,02 g/L, 0,03 g/L y 0,04 g/L, en matraces aforados de 25 mL y diluidas con etanol. Todas las disoluciones, nada más concluir su preparación se envolvieron los matraces con papel de aluminio y se introdujeron en un armario para protegerlas de la degradación debido a la luz.

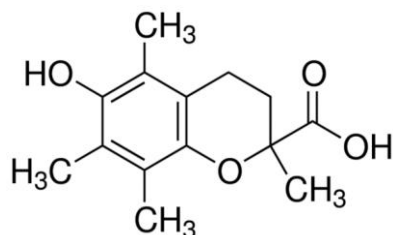
Antes de proceder a la medida de la absorbancia, comprobamos que teníamos la temperatura de consigna en el espectrofotómetro a 25°C ya que se debe de controlar hasta conseguir una temperatura estable mientras que preparamos las disoluciones. Ajustamos la línea de trabajo y seleccionamos una longitud de onda de 516 nm.

Previo a los análisis con las muestras, se hizo un blanco empleando etanol absoluto. Pipeteamos 3,5 mL que colocamos en la cubeta de plástico y comenzamos con la medida de la absorbancia. Siempre empezando por la más concentrada y terminando por la más diluida. La cubeta se limpió y se secó adecuadamente tras cada medida, para evitar posibles contaminaciones.

Como es habitual en la realización de este trabajo, las medidas se realizaron por triplicado.

### 5.2.8.3.- Medida de la actividad antioxidante del Trolox™

Para comprobar que el método del DPPH· empleado, es correcto, se determinó la actividad antioxidante del compuesto comercial comúnmente llamado Trolox™ (ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un análogo sintético de la vitamina E, generalmente usado como referencia. (Figura 42).



**Figura 42.** Estructura del Trolox™.

El procedimiento experimental fue el siguiente:

Se preparó una disolución madre de Trolox™ de 1 g/L aproximadamente, pesando 0,05 g y disolviendo en etanol hasta 50 mL, en un matraz aforado, a partir de la cual se preparan por dilución varias disoluciones de concentraciones aproximadas de 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,2 g/L, 0,3 g/L y 0,04 g/L.

Una vez preparadas todas las disoluciones de Trolox™, se preparó una disolución fresca de DPPH· con concentración de 0,03 g/L. Una vez enrasado el matraz aforado con el radical en etanol, se introdujo un núcleo y se llevó a agitación durante 10 minutos y posteriormente otros 10 minutos en ultrasonidos para cerciorarnos de una correcta disolución.

Para realizar las medidas de la capacidad antioxidantes, al igual que al calcular los puntos de la recta de calibrado, se mantuvo una temperatura constante de 25°C y trabajamos a una longitud de onda de 516 nm en el espectrofotómetro. Realizamos la medida del blanco, sólo con etanol y procedimos a realizar las medidas pertinentes de las 5 disoluciones.

Se introdujo la cubeta en el espectrofotómetro con 2,5 mL de la disolución de DPPH·, y se puso en marcha la medida, a los 2 minutos se añadieron 50 µL de Trolox™. La medida consiste en observar la disminución de la absorbancia en el tiempo durante 30 minutos, tiempo para el cual la absorbancia se ha hecho constante (Anexo, pag.98).

Para evitar la posible contaminación con restos de muestra, después de cada uso de la micropipeta, se limpió. Primero con etanol y tras su secado, se homogeneizó con la nueva disolución.

Este proceso se realizó por triplicado.

#### 5.2.8.4.- Determinación de polifenoles totales

Para cuantificar el total de polifenoles se utilizó el espectrofotómetro UV/VIS. El procedimiento llevado a cabo para la determinación es una modificación del método Folin-Ciocalteu propuesto por Yu y Dahlgren (2000).

Para la recta de calibrado utilizamos como patrón el ácido gálico, con el cual se prepara una disolución madre en etanol. A partir de la madre, se prepararon disoluciones con diferente concentración; 20, 40, 100, 160, 220, 280 y 340  $\mu\text{g/g}$ . Con ellas se obtienen diferentes puntos de la curva. Al igual que en todas las pruebas realizadas se hace un blanco, con agua destilada.

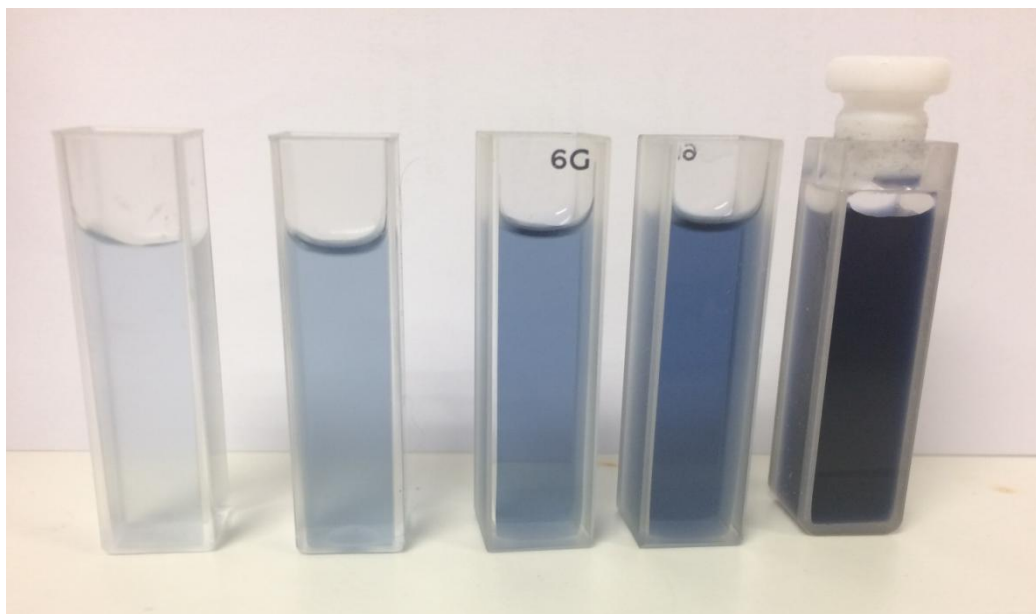
Las muestras empleadas provienen tanto de la maceración en etanol, como del SAF; cámara y espurgo. Las concentraciones preparadas son de 1,2 g/L.

Para la preparación de la recta de calibrado, en un tubo de vidrio ámbar de 10 mL se añadieron: 0,5 ml de disolución patrón de ácido gálico, extracto o agua destilada, esta última en el caso de la realización del blanco. Recordar que el blanco se realiza en todos los métodos antes de comenzar a analizar los extractos., 0,5 mL del reactivo Folin- Ciocalteu y 8 ml de agua destilada. La mezcla se agita manualmente durante aproximadamente 30 segundos y se introduce a ultrasonidos durante 5 minutos.

Pasados los 5 minutos, sacamos la muestra del ultrasonido y añadimos 1 mL de la disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% en agua, agitamos para una mezcla homogénea y sometimos a oscuridad durante 30 minutos para asegurar una correcta reacción.

Tras los 30 minutos se mide la absorbancia en el espectrofotómetro, pipeteando 3,5 mL de la disolución e introduciéndolos en la cubeta, (recordar que siempre ha de haber una cubeta de referencia en el fondo del espectrofotómetro). Se repite el proceso 3 veces.

Para la medición de los extractos se sigue el mismo procedimiento, tomando en vez de 0,5 mL de la disolución patrón, 0,5 ml del extracto de la planta ya sea, hojas, flores, cámara o espurgo.



**Figura 43.** Serie de disoluciones de ácido gálico para la realización de la recta de calibrado

#### 5.2.8.5.- Determinación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó con el método colorimétrico descrito por (Bathii et al., 2007). Una vez preparado todo lo requerido para el análisis, comenzamos realizando el blanco.

Se introducen en la cubeta 3,5 mL de la muestra, siempre con un núcleo dentro de la misma, la cual se colocó de tal forma que pase el haz de luz por ella para medir la absorbancia. Tras consultar varias publicaciones, se decidió medir la absorbancia a una longitud de onda de 510nm.

Para la recta de calibrado utilizamos como patrón la quercitina, con la cual se preparó una disolución madre en metanol. A partir de la madre, se prepararon disoluciones con diferente concentración; 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Pipeteamos la parte correspondiente y llevamos a un matraz de 10 mL donde enrasamos con metanol.

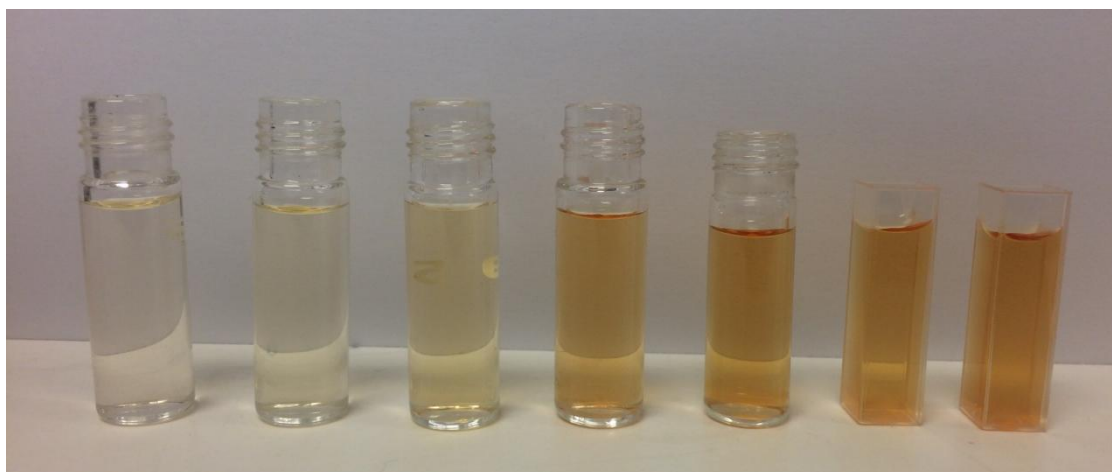
En un vial de 10 mL introducimos: 1 mL de disolución de quercitina, 4 mL de agua Milli-Q, 0,3 mL de  $\text{NaNO}_2$  al 5%, previamente diluido en un matraz de 50 mL con agua. Agitamos alrededor de 30 segundos y ponemos en el ultrasonidos durante 5

minutos, transcurridos los 5 minutos añadimos 0,3 mL de  $\text{AlCl}_3$  al 10%, (diluido en un matraz de 25 mL con metanol). Repetimos el proceso de agitación para homogeneizar la mezcla durante 30 segundos y esta vez lo colocamos en el ultrasonidos durante 6 minutos. Pasados 6 minutos añadimos 2 mL de NaOH (diluida en un matraz de 100mL con agua) y finalmente enrasamos con agua hasta alcanzar los 10 ml. Tras 15 minutos en la oscuridad, podemos proceder a medir la absorbancia en el espectrofotómetro UV- visible.

Las muestras empleadas provienen tanto de la maceración en etanol, como del SAF; cámara y espurgo. Las concentraciones preparadas son de aproximadamente 1,2 g/L.

Para calcular la absorbancia de las muestras, en vez de preparar el vial con 1 mL de la disolución patrón (Quercitina), se prepara con 1 mL de extracto, el resto del procedimiento es idéntico.

Nuevamente, las pruebas de las rectas de calibrado y los extractos se realizan por triplicado.



**Figura 44.** Serie de disoluciones de quercitina para la realización de la recta de calibrado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se muestran los resultados obtenidos de los diferentes procesos y metodologías aplicados a las diversas muestras de *Lavandula lusieri*.

### 6.1.- Tamizado

El tamizado se realizó con la finalidad de obtener una muestra representativa tanto de hojas como de flores de *Lavandula lusieri*, con un tamaño de partícula óptimo (0,3 mm). Tamaños inferiores a 0,3 mm podría suponer la pérdida de compuestos volátiles y para tamaños superiores a 0,3 mm se obtendrían rendimientos en las maceraciones más bajos. Para ello se prepararon 2 muestras diferentes.

En (Tabla 6) se muestra el resultado de la molienda y tamizado del material vegetal de partida. Este procedimiento nos provee de una forma sistemática para la preparación de muestras para extracción, de forma homogénea.

**Tabla 6.** Resultados de la molienda y el tamizado de todo el material vegetal de partida.

Tamiz	Ø (mm)	Masa Flores (g)	Masa Hojas(g)
1	0,074	2,35	0,50
2	0,150	3,00	3,50
3	0,246	4,00	5,60
4	0,400	4,20	6,00
5	0,495	3,25	2,40
6	0,589	1,20	1,00
7	0,710	1,00	0,50
8	0,900	1,00	0,50
<b>Masa Total (g)</b>		20,00	20,00

Para el cálculo del diámetro medio de las partículas se utilizó el método normalizado ASAE S 319.4 mediante la siguiente expresión:

$$d_m = \log^{-1} \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (m_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n m_i} \right]$$

Donde:

$$\bar{d}_i = (d_i \times d_{i+1})^{0.5}$$

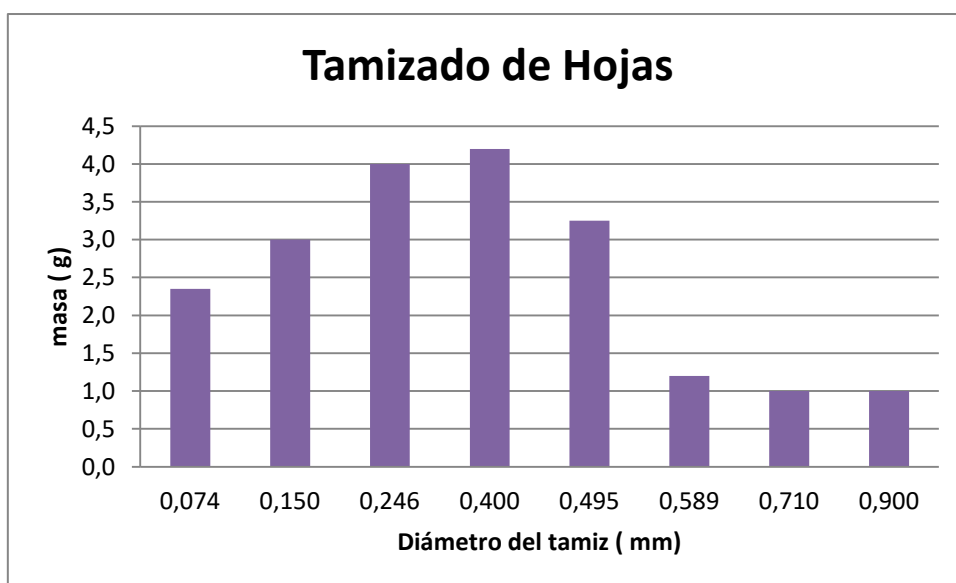
$m_i$ : Masa recogida sobre el tamiz  $i$ ;  $d_i$  y  $d_{i+1}$ : Diámetros de la luz de malla de los tamices  $i$  e  $i+1$ .

El diámetro medio de partícula obtenido fue el siguiente:

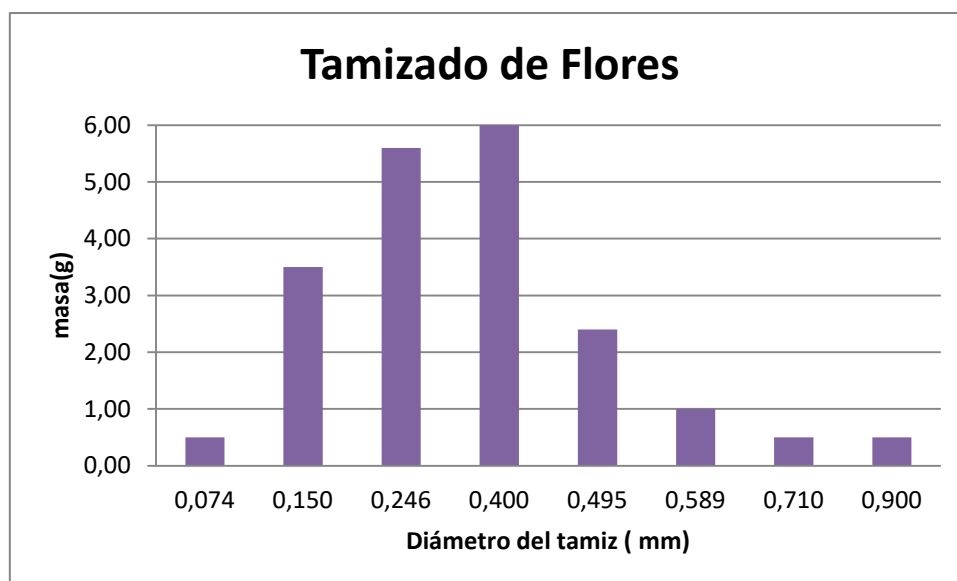
**Tabla 7.** Diámetro de partícula medio obtenido de flores y hojas.

Ø Flores (mm)	Ø Hojas(mm)
0,335	0,363

En (Figuras 45 y 46) se muestran de forma gráfica los diferentes tamaños de partículas tanto de hojas como de flores tras el tamizado.



**Figura 45.** Representación de las diferentes masas de hojas en cada tamiz.



**Figura 46.** Representación de las diferentes masas de flores en cada tamiz

Como se observa en el gráfico la máxima cantidad de masa tomada ha sido en el tamiz comprendido entre 0,246 -0,400 mm de diámetro, donde se encuentra el tamaño de partícula óptimo que se pretende conseguir.

## 6.2.- Grado de humedad

Se realizaron 5 medidas sucesivas para cuantificar la cantidad de agua presente en el material vegetal pretratado tanto en hojas como en flores. En (Tablas 8 y 9) se muestran los resultados obtenidos de la determinación de humedad por termogravimetría tanto en hojas como en flores.

**Tabla 8.** Resultados tras la determinación de humedad en hojas por termogravimetría en *L. luisieri*.

Medida	$m_{inicial}$ (g)	$m_{final}$ (g)	$M_{perdida}$ (g)	Humedad (%)
1	1,015	0,85	0,16	15,9
2	1	0,84	0,16	16,1
3	1	0,85	0,15	15,4
4	1,006	0,85	0,16	15,3
5	1,003	0,86	0,14	14,8
			<b>Media</b>	<b>15,5</b>
			<b><math>\sigma</math></b>	<b>0,5</b>

**Tabla 9.** Resultados tras la determinación de humedad en flores por termogravimetría en *L. luisieri*.

Medida	$m_{inicial}$ (g)	$m_{final}$ (g)	$M_{perdida}$ (g)	Humedad (%)
1	1	0,86	0,14	14,9
2	1,005	0,87	0,13	14,1
3	1	0,90	0,10	14,7
4	1,02	0,86	0,16	13,4
5	1,007	0,86	0,15	15,1
			<b>Media</b>	<b>14,4</b>
			<b><math>\sigma</math></b>	<b>0,7</b>

Los valores obtenidos de humedad entran dentro de los valores esperados.

### 6.3.- Extracciones

En (Tablas 10 y 11) mostradas a continuación, se encuentran los resultados obtenidos de rendimiento en las extracciones en hexano y en etanol tanto en hojas como en flores.

Para una mayor fiabilidad de los resultados obtenidos y evitar errores, todas las pruebas se han realizado por triplicado.

El rendimiento obtenido se ha calculado con la siguiente expresión:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Masa extracto obtenido}}{\text{Masa material vegetal inicial}} \times 100$$

**Tabla 10.** Rendimientos de las extracciones de hojas de *L. luisieri*.

EXTRACCIÓN DE HOJAS	Botella	Masa Planta (g)	Masa extracto (g)	Rendimiento (%)
	1	20,00	0,68	3,40
<b>HEXANO</b>	2	20,00	0,52	2,62
	3	20,00	0,40	2,02
	<b>Media</b>			<b>2,68</b>
	1	19,11	4,04	21,13
<b>ETANOL</b>	2	19,37	4,43	22,87
	3	19,57	4,45	22,74
	<b>Media</b>			<b>22,25</b>

**Tabla 11.** Rendimientos de las extracciones de flores de *L. luisieri*.

EXTRACCIÓN DE FLORES	Botella	Masa Planta (g)	Masa extracto (g)	Rendimiento (%)
<b>HEXANO</b>	1	20,00	0,26	1,29
	2	20,00	0,31	1,53
	3	20,00	0,34	1,70
	<b>Media</b>			<b>1,51</b>
<b>ETANOL</b>	1	19,74	1,41	7,15
	2	19,65	1,53	7,79
	3	19,34	1,38	6,89
	<b>Media</b>			<b>7,28</b>

Al analizar los resultados lo primero que se observa es que la extracción con etanol ofrece mayores rendimientos que la de hexano. El resultado obtenido es el esperado, ya que el etanol tiene una mayor capacidad. Esto suele ser frecuente en el tratamiento de hojas y flores de plantas aromáticas y medicinales (Martín Navarro, 2012). Además, se observa también que el rendimiento de hojas es mayor que el de flores.

#### 6.4.- Resultados de la actividad antioxidante en los extractos de *L.luisieri*

##### 6.4.1.- Obtención de las rectas de calibrado de DPPH.

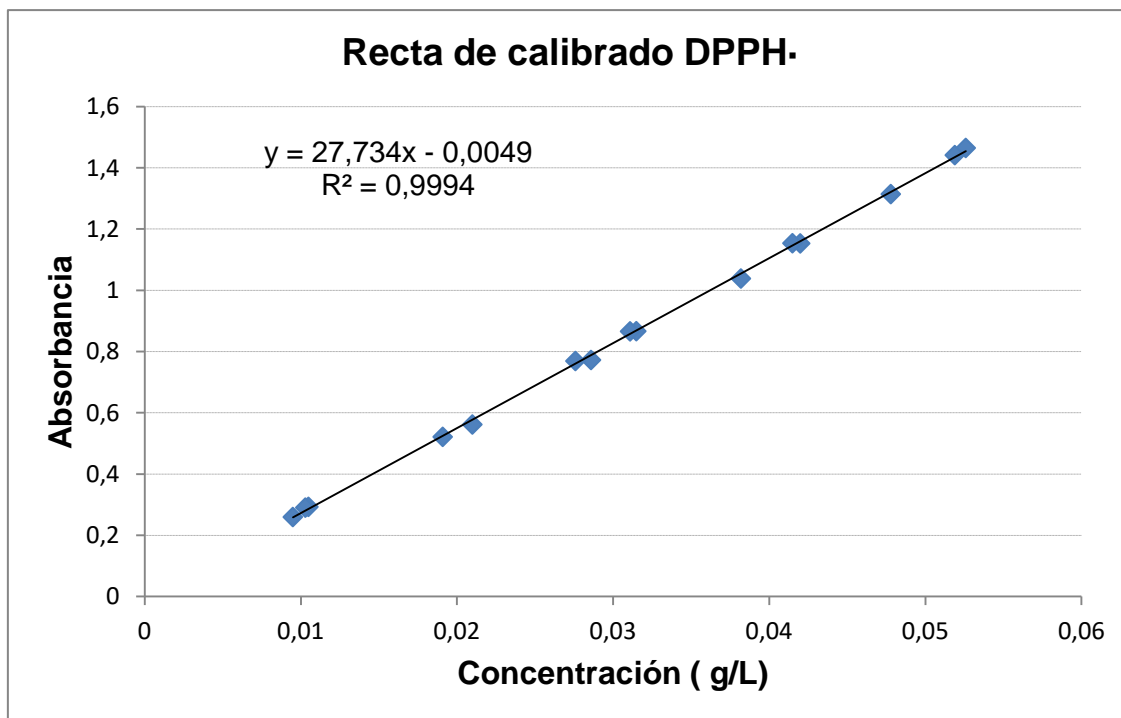
Para obtener las rectas de calibrado, se preparó una disolución madre de DPPH· de aproximadamente 0,05 g/L, a partir de ésta se prepararon cuatro disoluciones seriadas. En (Tabla 12) se muestran las concentraciones de las disoluciones empleadas para cada recta y sus absorbancias.

**Tabla 12.** Datos calibración DPPH· para todas las rectas.

RECTA	C (g/L)	Abs.	RECTA	C (g/L)	Abs.	RECTA	C (g/L)	Abs.
<b>1</b>			<b>2</b>			<b>3</b>		
<b>1</b>	0,009	0,260	<b>1</b>	0,010	0,293	<b>1</b>	0,010	0,290
<b>2</b>	0,019	0,521	<b>2</b>	0,021	0,562	<b>2</b>	0,027	0,769
<b>3</b>	0,028	0,772	<b>3</b>	0,031	0,867	<b>3</b>	0,031	0,866
<b>4</b>	0,038	1,038	<b>4</b>	0,042	1,153	<b>4</b>	0,041	1,154
<b>5*</b>	0,047	1,314	<b>5*</b>	0,052	1,465	<b>5*</b>	0,051	1,441

\*Disolución madre; C: Concentración; Abs: Absorbancia

Una vez obtenidos los resultados de las 3 rectas de calibrado, se calculó la ecuación recta de calibrado del DPPH· común, la cual se muestra en (Figura 47) la recta de calibrado y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ).



**Figura 47.** Recta de calibrado del DPPH·.

#### 6.4.2.- Validación del método experimental con Trolox™

Para la validación del método con Trolox™, se prepararon cinco disoluciones a partir de una disolución madre de Trolox™ de concentración 1g/L. Por otro lado, se preparó una disolución de DPPH· cuya concentración es de 0,3g/L. La validación del método se realizó por triplicado, para ello siempre se utilizaron nuevas disoluciones.

En (Tabla 13) se muestran las concentraciones de Trolox™, relación Trolox™ / DPPH·, absorbancia final y concentración remanente relativa de DPPH·.

**Tabla 13.** Concentraciones de Trolox™ de las disoluciones de partida, ratio Trolox™ / DPPH·, absorbancia final y concentración remanente de DPPH·.

Experimento	C Trolox™ (mol/L)	Mol Trolox™ /mol DPPH·	Abs final	[DPPH·] Remanente (%)
SERIE 1				
1	$2,001 \cdot 10^{-4}$	0,0520	0,7231	86,59
2	$4,003 \cdot 10^{-4}$	0,1029	0,6342	75,02
3	$8,006 \cdot 10^{-4}$	0,2062	0,4511	53,69
4	$1,201 \cdot 10^{-3}$	0,3123	0,2633	31,89
5	$1,601 \cdot 10^{-3}$	0,4164	0,1008	12,57

$[DPPH·]_0 = 0,0302 \text{ g/L} = 7,658 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$  ;  $\langle Abs_0 \rangle = 0,8361$

Experimento	C Trolox <sup>TM</sup> (mol/L)	Mol Trolox <sup>TM</sup> /mol DPPH·	Abs final	[DPPH·] Remanente (%)
SERIE 2				
1	2,005*10 <sup>-4</sup>	0,0504	0,7624	88,16
2	4,011*10 <sup>-4</sup>	0,0968	0,7470	83,00
3	8,022*10 <sup>-4</sup>	0,2000	0,5449	62,69
4	1,202*10 <sup>-3</sup>	0,2999	0,5156	40,37
5	1,604*10 <sup>-3</sup>	0,4018	0,1613	19,02

[DPPH·]<sub>0</sub>=0,0315 g/L=7,988\*10<sup>-5</sup> mol/L; <Abs<sub>0</sub>>= 0,8687

Experimento	C Trolox <sup>TM</sup> (mol/L)	Mol Trolox <sup>TM</sup> /mol DPPH·	Abs final	[DPPH·] Remanente (%)
SERIE 3				
1	1,997*10 <sup>-4</sup>	0,0511	0,7318	86,30
2	3,995*10 <sup>-4</sup>	0,1039	0,6262	75,10
3	7,990*10 <sup>-4</sup>	0,2088	0,5144	62,04
4	1,202*10 <sup>-3</sup>	0,3145	0,2902	35,29
5	1,602*10 <sup>-3</sup>	0,4190	0,1501	18,54

[DPPH·]<sub>0</sub>=0,0301 g/L= 7,633\*10<sup>-5</sup> mol/L ; <Abs<sub>0</sub>>= 0,8313

Para calcular el EC<sub>50</sub> utilizamos las rectas resultantes de la representación de CR<sub>DPPH·</sub> frente a mol Trolox<sup>TM</sup> / mol DPPH· (Anexo pag. 84) .Los resultados obtenidos de EC<sub>50</sub> se muestran en (Tabla 14).

**Tabla 14.** Valores de EC<sub>50</sub> obtenidos para el Trolox<sup>TM</sup>, media y desviación estándar de los mismos.

SERIE	EC <sub>50</sub> (mol Trolox <sup>TM</sup> / mol DPPH·)
1	0,23
2	0,25
3	0,25
<b>MEDIA</b>	<b>0,24</b>
<b>σ</b>	0,01

Los valores de EC<sub>50</sub> obtenidos, entran dentro del intervalo de valores consultados de algunos autores como: (Bortolomeazzi, et al., 2007) 26 ±0,01 mol Trolox/mol DPPH, 0,24 (Gordon, et al., 2001) y 0,21 (Nenadis, et al., 2003).

Por lo tanto, el funcionamiento del espectrofotómetro para las medidas y el método aplicado para la determinación del poder antioxidante son correctos.

### 6.4.3.- Cálculo de la actividad antioxidante de los extractos

#### 6.4.3.1.- Cálculo de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de flores y hojas

Tras constatar a través del método experimental del Trolox™, que la metodología empleada era la correcta, se determinó la actividad antioxidante de los extractos hojas y flores de *Lavandula luisieri*.

Se realizaron análisis de las tres botellas de extracto etanólico. Se prepararon diferentes diluciones de la disolución madre, ésta tenía aproximadamente una concentración de 5g/L de la cual se tomaron, 1,5, 4, 7 y 10 mL y se introdujeron en matraces de 10mL los cuales se enrasaron con etanol.

En (Tabla 15) se recogen los siguientes datos: concentraciones (g/L),  $g_{\text{extracto}}/g_{\text{DPPH}}$ , absorbancia final y remanente de DPPH en porcentaje. Todo esto, para el cálculo de la actividad antioxidante.

**Tabla 15.** Concentración de extracto inicial (g/L), relación entre los gramos de extracto y los de DPPH ( $g_{\text{extracto}}/g_{\text{DPPH}}$ ), valores de absorbancia tras la reacción y porcentaje remanente de radical DPPH.

Experimento	C (g/L)	g extracto/g DPPH	Abs final	[DPPH·] Remanente (%)
SERIE 1				
1	0,704	0,462	0,5477	65,97
2	0,470	0,308	0,6477	77,60
3	1,408	0,923	0,3386	41,19
4	4,692	1,517	0,0490	6,42

$[DPPH\cdot]_0=0,0305 \text{ g/L}= 7,73 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$  ;  $\langle Abs_0 \rangle = 0,8344$

Experimento	C (g/L)	g extracto/g DPPH	Abs final	[DPPH·] Remanente (%)
SERIE 2				
1	0,457	0,296	0,6986	79,51
2	0,685	0,443	0,6162	70,65
3	1,371	0,887	0,4247	48,95
4	2,285	1,168	0,3009	34,46

$[DPPH\cdot]_0=0,0309 \text{ g/L}= 7,83 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$  ;  $\langle Abs_0 \rangle = 0,8825$



Experimento	C (g/L)	g extracto/g DPPH.	Abs final	[DPPH.] Remanente (%)
SERIE 3				
1	0,582	0,373	0,7237	81,53
2	0,873	0,560	0,5815	65,70
3	1,747	1,120	0,3394	38,59
4	2,911	1,563	0,1136	13,24

$[DPPH.]_0 = 0,0312 \text{ g/L} = 7,91 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ ;  $\langle Abs_0 \rangle = 0,8903$

Para calcular el  $EC_{50}$  utilizamos las rectas resultantes de la representación de  $CR_{DPPH.}$  frente a los  $g_{extracto}/g_{DPPH.}$  (Anexo pag.85) . Los resultados obtenidos de  $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$  y AAI para las flores se muestran en (Tabla 16).

**Tabla 16.** Valores  $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$ , AAI de los extractos etanólicos procedentes de las flores.

SERIE	$EC_{50}(g_{extracto}/g_{DPPH.})$	$IC_{50}(\mu/ml)$	AAI
1	0,76	24,30	1,26
2	0,86	30,39	1,01
3	0,90	30,21	1,03
<b>MEDIA</b>	<b>0,84</b>	<b>28,30</b>	<b>1,10</b>
$\sigma$	0,070	3,465	0,133

El mismo procedimiento se realizó para el cálculo de la actividad antioxidante de extracto etanólico de flores, se emplea para el cálculo en las hojas.

**Tabla 17.** Concentración de extracto inicial (g/L), relación entre los gramos de extracto y los de DPPH. ( $g_{extracto}/g_{DPPH.}$ ), valores de absorbancia tras la reacción y porcentaje remanente de radical DPPH.

Experimento	C (g/L)	g extracto/g DPPH.	Abs final	[DPPH.] Remanente (%)
SERIE 1				
1	0,756	0,540	0,8355	83,71
2	2,016	1,440	0,6269	63,41
3	3,528	2,520	0,4015	40,73
4	5,040	3,600	0,1913	19,72

$[DPPH.]_0 = 0,0280 \text{ g/L} = 7,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ ;  $\langle Abs_0 \rangle = 0,9990$

Experimento	C (g/L)	g extracto/g DPPH.	Abs final	[DPPH.] Remanente (%)
SERIE 2				
1	0,764	0,488	0,7519	85,82
2	2,036	1,301	0,5431	62,49
3	3,563	2,277	0,3905	45,18
4	5,090	3,252	0,1353	15,81

$[DPPH.]_0 = 0,0313 \text{ g/L} = 7,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ ;  $\langle Abs_0 \rangle = 0,8820$

Experimento	C (g/L)	g extracto/g DPPH.	Abs final	[DPPH.] Remanente (%)
SERIE 3				
1	0,764	0,502	0,7123	84,23
2	2,036	1,338	0,5637	66,88
3	3,563	2,342	0,3900	46,78
4	5,090	3,346	0,2649	31,69

$[DPPH.]_0 = 0,0301 \text{ g/L} = 7,63 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ ;  $\langle Abs_0 \rangle = 0,8466$

Para calcular el  $EC_{50}$  utilizamos las rectas resultantes de la representación de  $CR_{DPPH.}$  frente a los  $g_{extracto}/g_{DPPH.}$  (Anexo pag. 86). Los resultados obtenidos de  $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$  (Anexo pag.92) y AAI para las flores se muestran en (Tabla 18).

**Tabla 18.** Valores  $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$ , AAI de los extractos etanólicos procedentes de las hojas.

SERIE	$EC_{50}(g_{extracto}/g_{DPPH.})$	$IC_{50}(\mu/ml)$	AAI
1	2,10	58,91	0,48
2	1,92	59,85	0,52
3	2,28	68,09	0,44
<b>MEDIA</b>	<b>2,10</b>	<b>62,28</b>	<b>0,48</b>
$\sigma$	0,177	5,051	0,040

#### 6.4.3.2.- Cálculo de la actividad antioxidante del extracto etanólico de flores y hojas sometido a SAF

En (Tabla 19 y 20) se muestran los valores obtenidos para el cálculo de  $EC_{50}$  Rectas de concentración remanente de DPPH. /vs/ correlación del ratio  $g_{extracto}/g_{DPPH.}$  (Anexo páginas 87-90),  $IC_{50}$  y AAI para flores y hojas.

**Tabla 19.** Valores  $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$ , AAI de La fracción obtenida en cámara y colector de extractos procedentes de las flores de *L. luisieri*.

CÁMARA FLOR	$EC_{50}(g_{extracto}/g_{DPPH.})$	$IC_{50}(\mu/ml)$	AAI
1	0,83	24,23	1,28
2	0,72	22,31	1,38
<b>MEDIA</b>	<b>0,78</b>	<b>23,27</b>	<b>1,34</b>
$\sigma$	0,077	1,357	0,071
ESPURGO FLOR	$EC_{50}(g_{extracto}/g_{DPPH.})$	$IC_{50}(\mu/ml)$	AAI
1	32,15	1067,78	0,03
2	32,09	1046,94	0,03
<b>MEDIA</b>	<b>32,12</b>	<b>1057,36</b>	<b>0,03</b>
$\sigma$	0,048	14,736	0,0004

**Tabla 20.** Valores EC<sub>50</sub> IC<sub>50</sub>, AAI de La fracción obtenida en cámara y colector de extractos procedentes de las hojas de *L. luisieri*.

<b>CÁMARA HOJAS</b>	<b>EC<sub>50</sub>(g<sub>extracto</sub>/g<sub>DPPH.</sub>)</b>	<b>IC<sub>50</sub>(μ/ml)</b>	<b>AAI</b>
<b>1</b>	0,65	22,93	1,44
<b>2</b>	0,84	26,72	1,20
<b>MEDIA</b>	<b>0,75</b>	<b>24,83</b>	<b>1,32</b>
<b>σ</b>	0,135	2,680	0,171
<b>ESPURGO HOJAS</b>	<b>EC<sub>50</sub>(g<sub>extracto</sub>/g<sub>DPPH.</sub>)</b>	<b>IC<sub>50</sub>(μ/ml)</b>	<b>AAI</b>
<b>1</b>	83,98	2444,75	0,02
<b>2</b>	81,14	2424,33	0,01
<b>MEDIA</b>	<b>82,56</b>	<b>2434,54</b>	<b>0,02</b>
<b>σ</b>	2,0056	14,439	0,0003

Observando los resultados obtenidos en (Tablas 19 y 20), podemos decir que la actividad antioxidante de la *Lavandula luisieri* tanto en extracto etanólico de las flores como en la fracción en cámara de flores y hojas es alta ( $1 < AAI < 2$ ) en cambio la actividad antioxidante en el extracto etanólico de hojas y espurgo de flores y hojas presenta un bajo poder antioxidante ( $AAI < 0.5$ ).

Podemos concluir con que la mayor parte de los compuestos que poseen capacidad antioxidante se han concentrado en la cámara.

En el trabajo de Gallán Alonso, (2016) se mide la actividad antioxidante de *Lavandula luisiri* (Toledo) dando como resultado para el extracto etanólico de las hojas un EC<sub>50</sub> (g<sub>extracto</sub> /g<sub>DPPH.</sub>) de 2.81, y un AAI de 0.36. Respecto al extracto etanólico de flores obtiene un valor de EC<sub>50</sub> de 0.82 y AAI de 1.31. En el caso de los resultados obtenidos para hojas en cámara obtiene unos resultados de EC<sub>50</sub> de 1.18 y AAI de 0.85. Respecto a los resultados obtenidos en hojas espurgo obtiene un valor de EC<sub>50</sub> de 112.52 y AAI de 0.01. En el caso de los resultados obtenidos para flores en cámara obtiene unos resultados de EC<sub>50</sub> de 0.65 y AAI de 1.52. Respecto a los resultados obtenidos en flores espurgo obtiene un valor de EC<sub>50</sub> de 27.26 y AAI de 0.04.

Comparando estos resultados con los valores obtenidos en el presente trabajo tanto el extracto etanólico de hojas como SAF hojas cámara y espurgo, son ligeramente mayores para *Lavandula luisieri* (Portugal). Por el contrario, en el caso de las flores, los valores obtenidos para el índice AAI en el presente trabajo son ligeramente menores que los obtenidos por Gallán Alonso, (2016)

### 6.5.- Contenido de polifenoles totales en los extractos de *L.luisieri*.

Cada uno de los extractos ha sido analizado por triplicado. En (Tabla 21) se muestra los resultados obtenidos, en microgramos equivalentes de ácido gálico por gramo disolución ( $\mu\text{g EAG/g}_{\text{disolución}}$ ) y en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto ( $\text{mg EAG/g}_{\text{extracto}}$ ). En (Tabla 22) se muestra la media de los resultados obtenidos además de la desviación estándar total ( $\sigma$ ).

Recta de absorbancia /vs/ concentración de polifenoles (Anexo pag.97)

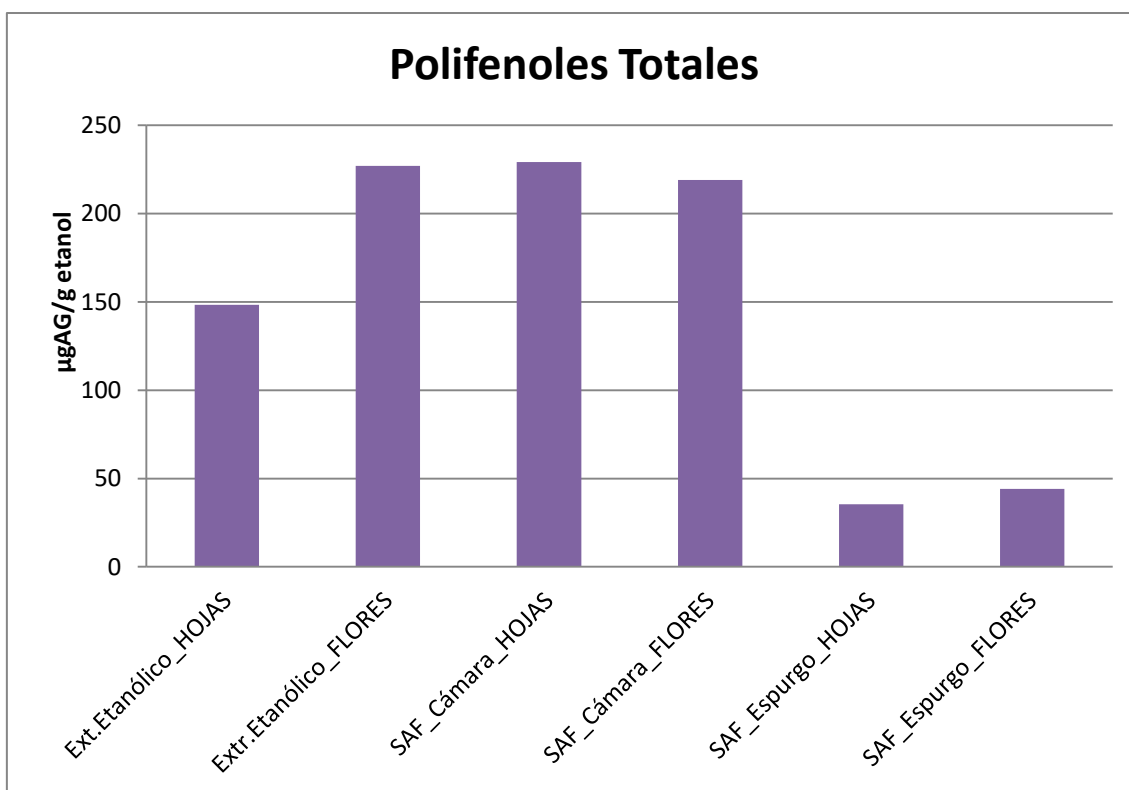
**Tabla 21.** Concentración media de polifenoles totales (PFT) en los extractos *L.luisieri*.

SERIE	TIPO DE EXTRACTO	CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES ( $\mu\text{gEAG/g}_{\text{disolución}}$ )	CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES ( $\text{mgEAG/g}_{\text{extracto}}$ )
1	Extr,Etanólico_HOJAS	135,20	1768,89
	Extr,Etanólico_FLORES	227,12	2511,07
	SAF_Cámara_HOJAS	231,61	3032,69
	SAF_Cámara_FLORES	235,30	3078,54
	SAF_Espurgo_HOJAS	33,06	427,77
	SAF_Espurgo_FLORES	29,28	423,50
2	Extr,Etanólico_HOJAS	155,05	1924,84
	Extr,Etanólico_FLORES	210,80	2452,12
	SAF_Cámara_HOJAS	228,83	2951,49
	SAF_Cámara_FLORES	202,62	3168,35
	SAF_Espurgo_HOJAS	32,69	351,18
	SAF_Espurgo_FLORES	52,18	754,94
3	Extr,Etanólico_HOJAS	154,45	1907,84
	Extr,Etanólico_FLORES	242,92	2755,61
	SAF_Cámara_HOJAS	227,09	2911,64
	SAF_Cámara_FLORES	218,92	6274,23
	SAF_Espurgo_HOJAS	40,62	524,18
	SAF_Espurgo_FLORES	50,82	735,09

**Tabla 22.** Medias de los diferentes extractos y series de polifenoles totales y desviación estándar.

TIPO DE EXTRACTO	MEDIA( $\text{mg EAG/g}_{\text{disolución}}$ )	$\sigma$
Ext,Etanólico_HOJAS	0,15	0,011
Extr,Etanólico_FLORES	0,27	0,016
SAF_Cámara_HOJAS	0,23	0,002
SAF_Cámara_FLORES	0,22	0,016
SAF_Espurgo_HOJAS	0,04	0,004
SAF_Espurgo_FLORES	0,04	0,012

Para poder ver la variabilidad de los resultados de una forma más visual, en (Figura 48) se muestran gráficamente los resultados obtenidos.



**Figura 48.** Gráfico del contenido de polifenoles totales ( $\mu\text{g EAG/g}$ ) en los extractos de *L.luisieri*.

Al analizar la (Figura 48), se observa que la concentración de polifenoles en el extracto etanólico de las flores es mayor que en el extracto etanólico de las hojas, en cambio la concentración en SAF cámara hojas, es ligeramente mayor que en SAF cámara flores, lo contrario sucede al comparar la concentración en SAF espurgo flores en SAF espurgo hojas, siendo ligeramente mayor en espurgo flores.

Al cotejar los resultados obtenidos mediante la técnica SAF la diferencia entre espurgo y cámara es muy alta, por lo que es evidente una concentración de polifenoles en cámara tras el fraccionamiento.

No se ha podido realizar comparativas con otros trabajos de *L. luisieri*, puesto que ninguno de ellos se ha realizado con las mismas condiciones que el presente trabajo, ya que, en vez de utilizar etanol, han utilizado metanol, éste presenta mayor polaridad y arroja valores superiores. Algunos de los artículos consultados son: (Nunes, et al., 2017), (Pombal, et al., 2016) y (Pereira, et al. 2015). Se decidió trabajar con etanol, debido a que es menos tóxico y entra dentro del campo de la “química verde”; además para evitar la pérdida de sustancias termolábiles de carácter antioxidante se trabajó a temperatura ambiente.

6.6.- Contenido de flavonoides totales en los extractos de *L.luisieri*.

Cada uno de los extractos ha sido analizado por triplicado. En (Tabla 23) se muestran los resultados obtenidos, en miligramos equivalentes de quercitina por mililitro (mg EQ/ml) y miligramos equivalentes de quercitina por gramo de extracto (mg EQ/g<sub>extracto</sub>) para cada uno de los extractos. En (Tabla 24) se muestra la media de los resultados obtenidos además de la desviación estándar total ( $\sigma$ ).

Recta de absorbancia /vs/ concentración de flavonoides (Anexo pag.97).

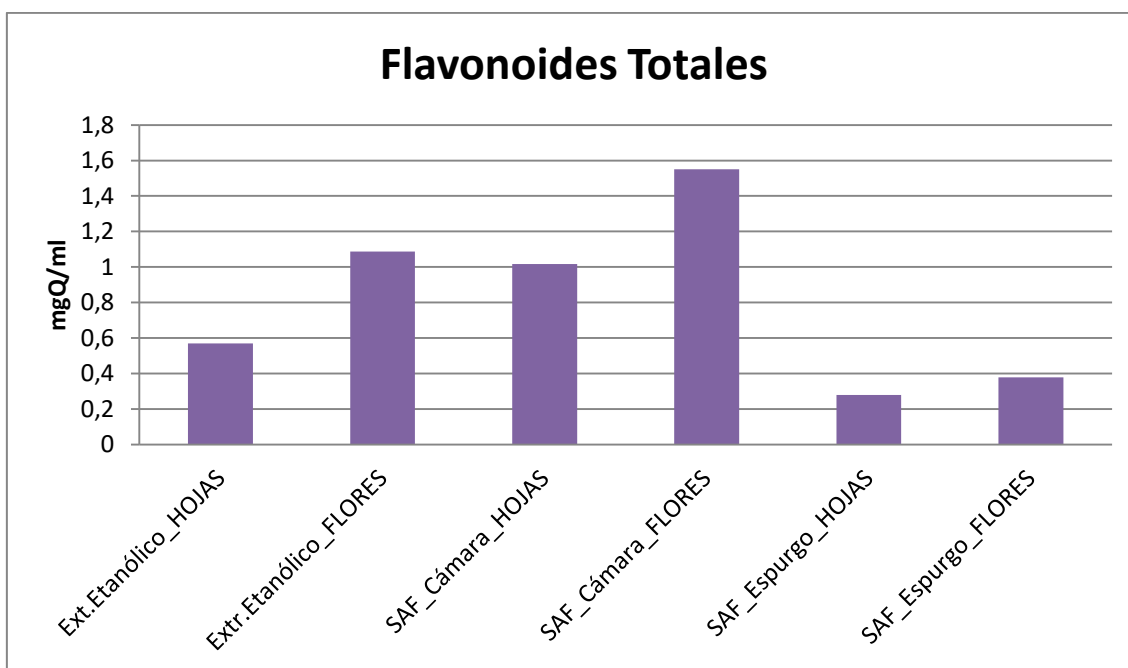
**Tabla 23.** Concentración media de flavonoides totales (FT) en los extractos *L.luisieri*.

SERIE	TIPO DE EXTRACTO	CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES (mg EQ/ml)	CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES (mg EQ/ g <sub>extracto</sub> )
1	Extr,Etanólico_HOJAS	0,54	9481,74
	Extr,Etanólico_FLORES	1,14	17605,13
	SAF_Cámara_HOJAS	1,09	17972,45
	SAF_Cámara_FLORES	2,20	19612,02
	SAF_Espurgo_HOJAS	0,31	82,33
	SAF_Espurgo_FLORES	0,31	92,18
2	Extr,Etanólico_HOJAS	0,68	11142,08
	Extr,Etanólico_FLORES	1,24	18938,23
	SAF_Cámara_HOJAS	1,02	2679,07
	SAF_Cámara_FLORES	0,90	17982,67
	SAF_Espurgo_HOJAS	0,32	83,68
	SAF_Espurgo_FLORES	0,43	125,20
3	Extr,Etanólico_HOJAS	0,49	7940,86
	Extr,Etanólico_FLORES	0,88	13348,49
	SAF_Cámara_HOJAS	0,94	2461,78
	SAF_Cámara_FLORES	1,55	38286,48
	SAF_Espurgo_HOJAS	0,21	55,06
	SAF_Espurgo_FLORES	0,40	117,83

**Tabla 24.** Medias de los diferentes extractos y series de flavonoides totales y desviación estándar.

TIPO DE EXTRACTO	MEDIA(mg EQ/ml)	$\sigma$
Ext,Etanólico_HOJAS	0,57	0,098
Extr,Etanólico_FLORES	1,09	0,185
SAS_Cámara_HOJAS	1,02	0,073
SAS_Cámara_FLORES	1,55	0,647
SAS_Espurgo_HOJAS	0,28	0,061
SAS_Espurgo_FLORES	0,38	0,059

Para poder ver la variabilidad de los resultados de una forma más visual, en (Figura 49) se muestran gráficamente los resultados obtenidos.



**Figura 49.** Gráfico del contenido de flavonoides totales (mg EQ /ml) en los extractos de *L.luisieri*

Como se aprecia en (Figura 49), la concentración de flavonoides en extracto etanólico para flores es mayor que en el extracto etanólico de las hojas. Respecto a los extractos obtenidos mediante la técnica SAF, en cámara se observa que el contenido de flavonoides es mayor en flores que en hojas, respecto al espurgo, el contenido de flavonoides en espurgo flores, es ligeramente mayor que el obtenido en espurgo hojas.

Al cotejar los resultados obtenidos mediante la técnica SAF la diferencia entre espurgo y cámara es muy alta, por lo que es evidente una concentración de flavonoides en cámara tras el fraccionamiento.

Al igual que lo sucedido en el caso de polifenoles, no se encontraron en bibliografía estudios realizados en las mismas condiciones que el presente trabajo (Nunes, et al., 2017), (Pombal, et al., 2016) y (Pereira, et al. 2015), por lo que no ha sido posible realizar una comparativa.

En (Tabla 25) se muestran los resultados medios obtenidos tanto de polifenoles (mg EAG/ g<sub>extracto</sub>) como de flavonoides (mg EQ /g<sub>extracto</sub>).

**Tabla 25.** Resultados medios de capacidad antioxidante, en polifenoles y flavonoides totales en los extracto de *L. luisieri*.

TIPO DE EXTRACTO	MEDIA POLIFENOLES mg EAG/g <sub>extracto</sub>	MEDIA FLAVONOIDES mg EQ/g <sub>extracto</sub>
Ext,Etanólico_HOJAS	1867,19	9521,56
Extr,Etanólico_FLORES	2572,93	16630,62
SAF_Cámara_HOJAS	2965,27	6526,32
SAF_Cámara_FLORES	4173,71	20507,92
SAF_Espurgo_HOJAS	434,38	73,69
SAF_Espurgo_FLORES	637,85	111,73

Al comparar los datos numéricos se observa que hay una evidente correlación entre el contenido de polifenoles y flavonoides totales.

Al analizar los resultados de hojas y flores de forma general, podemos concluir que el mayor contenido tanto de polifenoles como de flavonoides se encuentra en las flores. La diferencia entre el contenido de polifenoles y flavonoides totales en espurgo indica que en esta fracción es mayor el contenido de compuestos fenólicos de naturaleza no flavonoide.

A la vista de los resultados obtenidos la aplicación de la técnica de fraccionamiento con fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>) ha logrado concentrar en cámara tanto los compuestos polifenólicos como los flavonoides. Siendo más evidente en el caso de los flavonoides.



## CONCLUSIONES

## 7.- CONCLUSIONES

- ❖ Respecto a los rendimientos en extracciones, la extracción con etanol ofrece mayores rendimientos que la de hexano, por lo que la mayoría de los compuestos que hay son polares. Además, se observa también que el rendimiento etanólico en hojas es mayor que en flores.
- ❖ La concordancia de los valores de  $EC_{50}$  entre la bibliografía y los obtenidos en el caso del Trolox<sup>TM</sup> demuestran que el funcionamiento del espectrofotómetro para las medidas y el método aplicado para la determinación del poder antioxidante son correctos.
- ❖ El extracto etanólico de las flores presentan un mayor AAI que las hojas, por lo tanto mayor capacidad antioxidante.
- ❖ La técnica SAF indica que la capacidad antioxidante de las fracciones de extracto obtenidas en cámara tanto de flores como de hojas es mayor que las fracciones de extracto obtenidas en espurgo. No apreciándose gran diferencia entre el AAI de flores y hojas.
- ❖ El mayor contenido de polifenoles se encuentra en cámara flores, expresado en mg EAG /g<sub>extracto</sub>. En cámara se produce un enriquecimiento de polifenoles en comparación con el extracto etanólico.
- ❖ El mayor contenido de flavonoides se encuentra en cámara flores, expresado en mg EQ / g<sub>extracto</sub>. En cámara se produce un enriquecimiento de flavonoides en comparación con el extracto etanólico.
- ❖ La gran diferencia entre el contenido de polifenoles y flavonoides totales en espurgo es un indicativo de que en esta fracción es mayor el contenido de compuestos fenólicos no flavonoides.
- ❖ Tanto por el adecuado rendimiento obtenido en los extractos como el alto poder antioxidante que presenta *L. luisieri* junto a su adaptabilidad al terreno y escasa demanda hídrica hacen que el cultivo sea una alternativa a la agricultura intensiva insostenible.
- ❖ Como actividad futura cabría considerar el profundizar en la identificación de los diferentes tipos de polifenoles y flavonoides que posee *L. luisieri*. Además del estudio de posibles bioactividades: biocida, antibacteriana, fungicida, acaricida...

## BIBLIOGRAFÍA

## 8.- BIBLIOGRAFÍA

Agudo, L. (2002). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. *Autodidacta*, 27–34.

Andrews, Espinosa, H., Márquez García, E., Martínez Gastélum, E. (2016). “Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción” Herrera Castillo, G.A., “Extracción con fluidos supercríticos” .108-11.

ANSI/ASAE S319.4. (4FEB2008). Method of determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*..

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., y Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198. doi:10.1039/b009171p.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul. M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini N. A. N y Omar, A. K. M. et al. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426–436.

Baptista, R., Madureira, A. M., Jorge, R., Adão, R., Duarte, A., Duarte, N., Teixeira, G. (2015). Antioxidant and antimycotic activities of two native *Lavandula* species from Portugal. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Benzie, I. y Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

Bhimanagouda Patil, S., Brodbelt Jennifer, S., Miller Edward, G., y Turner Nancy, D. (2006). “Potential Health Benefits of Citrus: An Overview Potential Health Benefits of Citrus” Vol. 936, pp. 1-16: *American Chemical Society*.

Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., y Pizzariello, A. (2007). Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH· radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry*, 100(4), 1481–1489.

- Brahmi, F., Mechri, B., Dabbou, S., Dhibi, M., Hammami, M., (2012). "The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variation". *Industrial crops and products*. 38, 146-152.
- Brand-Williams, Cuvelier, M. E., y Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Journal of Food Science and Technology*. 28, 25–30.
- Cerón-Carrilo, T.G., Palou, E., López-Malo, A. (2010). "Pulsos eléctricos. Fundamentos y aplicaciones en alimentos" 9-26.
- Chang C., Yang M., Wen H., y Chern J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Confederación hidrográfica del Ebro. (16/04/2018) "Evolución de la reserva hidráulica". CSIC: "Nuevos compuestos de antioxidantes. Polifenoles derivados de amidas/ureas".
- Delgado F. (2010) Conservação e Valorização de *Asphodelus bento-rainhae* P. Silva e *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivaz-Martínez da Beira Interior. Tese de doutoramento. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. Instituto Superior de Agronomía. 1322 p., 9f.
- [www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos\\_mo.php?it=1311](http://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=1311)
- Fernández, L. (2004). Los Súper Antioxidantes. Málaga: Editorial Sirio.
- [www.floravascular.com](http://www.floravascular.com). Imagen de Inflorescencia, Autor: Maite Santisteban Rivero
- Gallán Alonso, M.J., (2016). "Actividad antioxidante de extractos de *Lavandula luisieri* obtenidos mediante maceración y fraccionamiento antidisolvente con carbónico a presión", 70.
- García-Vallejo, M, I. (1992). Aceites esenciales de las lavándulas ibéricas ensayo de la quimiotaxonomía. *Tesis doctoral*. Facultad de biología. Universidad complutense de Madrid, 305.
- Gaviria Montoya, C., Ochoa Ospina, C., Sánchez Mesa, N., Medina Cano, C., Lobo Arias, M., Galeano García, P., Rojano, B. (2009). Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 8(6), 519–528.
- Gimenez-Rota, Carlota (2015) Fraccionamiento y caracterización de extractos de flores de *Lavandula luisieri*. Diploma de especialización en investigación en áreas científicas. Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza.

González-Coloma, A., Delgado, F., Rodilla, J. M., Silva, L., Sanz, J., y Burillo, J. (2011). Chemical and biological profiles of *Lavandula luisieri* essential oils from western Iberia Peninsula populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(1), 1–8.

González-Coloma, A., Martín-Benito, D., Mohamed, N., García-Vallejo, M. C., y Soria, A. C. (2006). Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(8), 609–616.

Gordon, M. H., Paiva-Martins, F., Almeida, M. (2001) Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 2480-2485.

Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M.A., Ponce-Pardo, J., Zarzosa-Norabuena, E. (2015). "Evaluación de la técnica 2,2 Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH·) para determinar capacidad antioxidante".

Gutierrez Durán, M.C., Basante Pol, R. (1984) "Datos históricos y bibliográficos del género *Lavandula*". 120.

Gülçin, I.(2006) " Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid)". 217, 213–20. 22.

[www.hielscher.com/es/ultrasonically-assisted-saffron-extraction.html](http://www.hielscher.com/es/ultrasonically-assisted-saffron-extraction.html)

Julio, L. F., Barrero, A. F., Herrador Del Pino, M. M., Arteaga, J. F., Burillo, J., Andres, M. F., González-Coloma, A. (2016). Phytotoxic and Nematicidal Components of *Lavandula luisieri*. *Journal of Natural Products*, 79(2), 261–266.

Julio, L. F., Martín, L., Muñoz, R., Mainar, A. M., Urieta, J. S., Sanz, J., González-Coloma, A. (2014). Comparative chemistry and insect antifeedant effects of conventional (Clevenger and Soxhlet) and supercritical extracts (CO<sub>2</sub>) of two *Lavandula luisieri* populations. *Industrial Crops and Products*, 58, 25–30.

Kedare, S. B., y Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH· method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., y Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 24(4), 691–693.

López Corona, M.G.B (2013). Identificación y cuantificación del ácido clorogénico y de flavonoides presentes en hojas y frutos de *Crataegus gracilior* PHIPPS. (Tesis doctoral

no publicada). Universidad autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro.

López-Gutiérrez, B., Pérez-Escandón, B., y Villavicencio, M. (2014). Aprovechamiento sostenible y conservación de las plantas medicinales en Cantarranas, Huehuetla, Hidalgo, México, como un medio para mejorar la calidad de vida en la comunidad. *Botanical Sciences*, 92(3), 389-404.

Maghalaes, L.M., Almeida, S.G.I.M., Barreiros, L., Reis, S., Segundo, A.M., (2012) "Automatic Aluminium Chloride Method for routine estimation of total flavonoids in red wines and teas ". *Food Anal. Methods* (2012) 5:530–539 DOI 10.1007/s12161-011-9278-1

MAGRAMA, 2016. Impactos del Cambio Climático en los procesos de desertificación de España.

Martín Navarro, L. (2012). "Aplicación de procesos de separación con CO<sub>2</sub> supercrítico a la producción y optimización de bioplaguicidas (Tesis doctoral). Universidad de Zaragoza, Aragón.

Martínez-Valverde, I., Periago, M. J.; Ros, G. (2000) "Nutritional importance of phenolic compounds in the diet". 50, 5–18.

Matos, F., Miguel, M. G., Duarte, J., Venancio, F., Moiteiro, C., Correia, A. I. D y Pedro, L. G. (2009). Antioxidant capacity of the essential oils from *Lavandula luisieri*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica* x *L. luisieri* and *L. viridis* grown in Algarve (Portugal). *Journal of Essential Oil Research*, 21(August 2007), 327–337.

Morales, R. (2004). Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. 37. *Lavandula L.\**, 573 (1753).

Molyneux, P. (2004). The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. Songklanakarin *Journal of Science and Technology*, 26 , 211–219.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Manuel Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., Carlos Parajó, J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171. doi:10.1016/S0308-8146(00)00223-5.

Muñoz Juárez, M. A., y Gutierrez, D. M. (2004). Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana Glauca*. Songklanakarin *Journal of Science and Technology*, 26(2), 1–4.

- Nenadis, N., Boyle, S., Bakalbassis, E. G., y Tsimidou, M. (2003) Structure-property approach to structure-activity relationships of caffeic and dihydrocaffeic acids and related monophenols. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 80 (5): 451-458.
- Nunes, R., Pasko, P., Tyszka-Czochara, M., Szewczyk, A., Szlosarczyk, M., Carvalho, I.S.(2017). Antibacterial, antioxidant and anti-proliferative properties and zinc content of five south Portugal herbs. *Pharm Biol*. 2017 Dec;55(1):114-123. Epub 2016 Sep 22
- Palacio, L. (2000). Las plantas medicinales y aromáticas. Una alternativa de futuro para el desarrollo rural. *Boletín Económico De ICE*, 2652(1), 29-39.
- Pereira, F., Baptista, R., LAdeiras, D., Madureira, A.M., Teixeira, G., Rosado, C., Fernandes, A.S., Ascensão, L., Oliveira Silva, C., PintoReis, C., Rijo, P (2015). Production and characterization of nanoparticles containing methanol extracts of Portuguese Lavenders.
- Pombal, S., Rodrigues, C.F., Araújo, J.P., Rocha, P.M., Rodilla, J.M., Diez, D., Granja, A.P., Gomes, A.C., Silva, L.A. (2016). Antibacterial and antioxidant activity of Portuguese *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas-Martinez and its relation with their chemical composition. *SpringerPlus* (2016) 5:1711 DOI 10.1186/s40064-016-3415-7
- Pontis, J. A., da Costa, L. A. M. A., da Silva, S. J. R., y Flach, A. (2014). Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from roraima, brazil. *Food Science and Technology*, 34(1), 69-73. doi:10.1590/S0101-20612014005000015.
- Rodriguez, S. (2008). Antioxidantes naturales. Cómo reducir el riesgo de cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares. Madrid: Ediciones Nowtilus.
- Rostagno, M.A., Prado, J.M (2013). Natural Product extraction. Principles and applications. 29-30.
- Sanz, J., Soria, A. C., y García-Vallejo, M. C. (2004). Analysis of volatile components of *Lavandula luisieri* L. by direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1024(1–2), 139–146.
- Scherer, R., y Texeira Godoy, H. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, 654–658.
- Shah, M. A., Bosco, S. J. D., y Mir, S. A. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*.98 (1), 21-33.doi:10.1016/j.meatsci.2014.03.020.
- Sharma, O. P., y Bhat, T. K. (2009). DPPH· antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202–1205.



Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós R.M., (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidant by Means of Folin-Ciocalteu Reagent.

Suárez-Cervera, M, Seoane Camba, J.A. (1986). Taxonomía numérica de algunas especies de *Lavandula L.* basada en caracteres morfológicos, cariológicos y palinológicos. 396 (42,2).

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246. doi:10.3390/nu2121231.

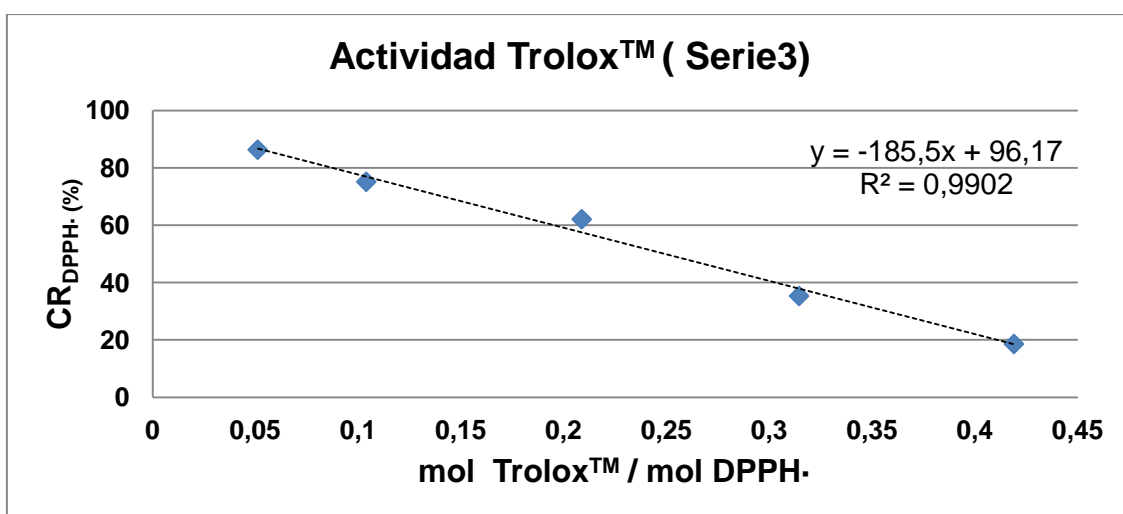
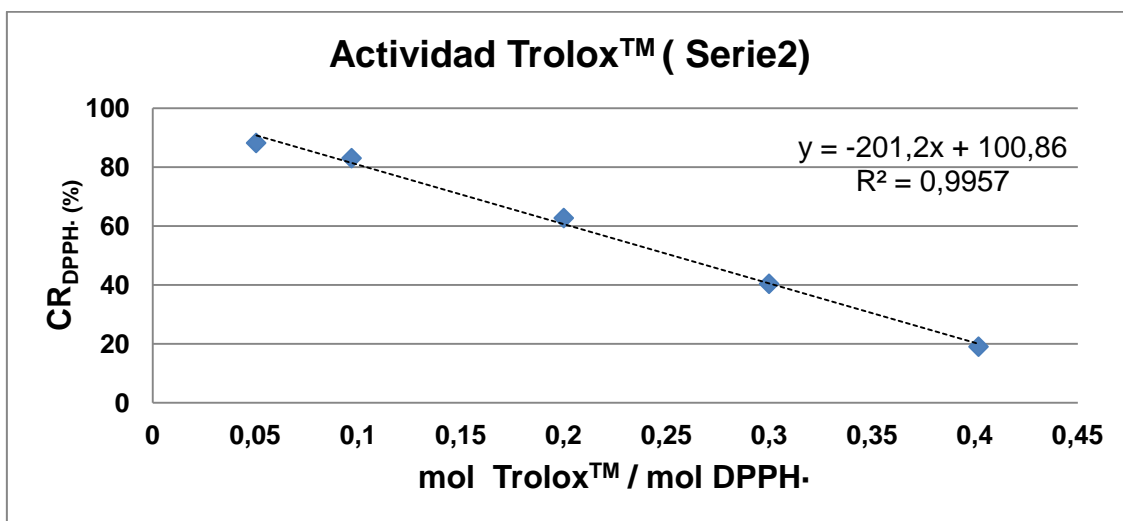
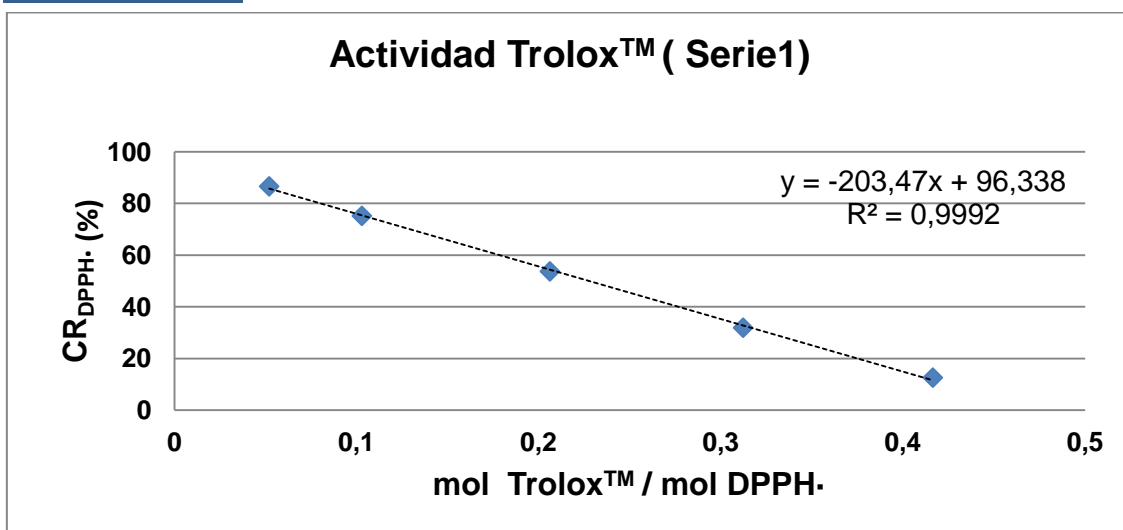
Otalora Vera, I. (2012). "Extracción por arrastre con vapor. Importancia y aplicación."

Zulueta, A., Esteve, M. J., y Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316.

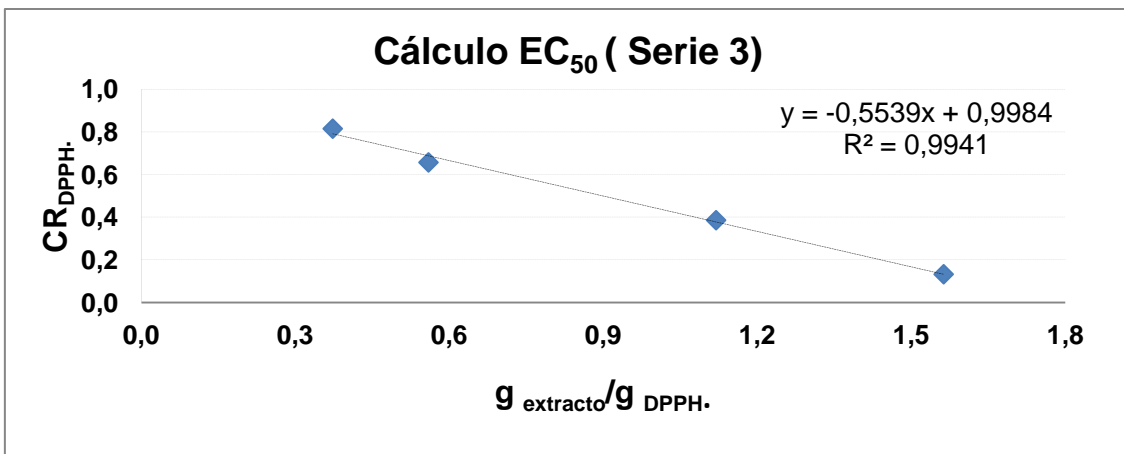
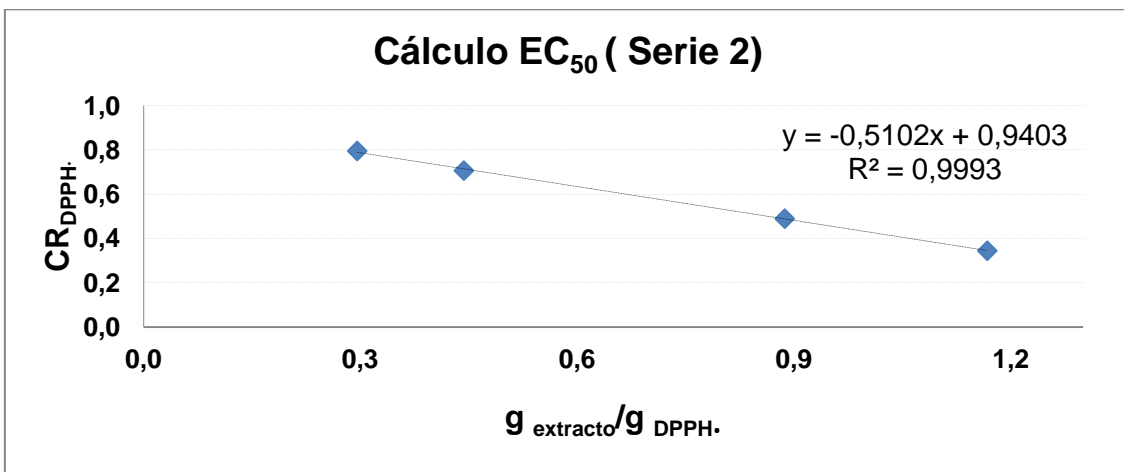
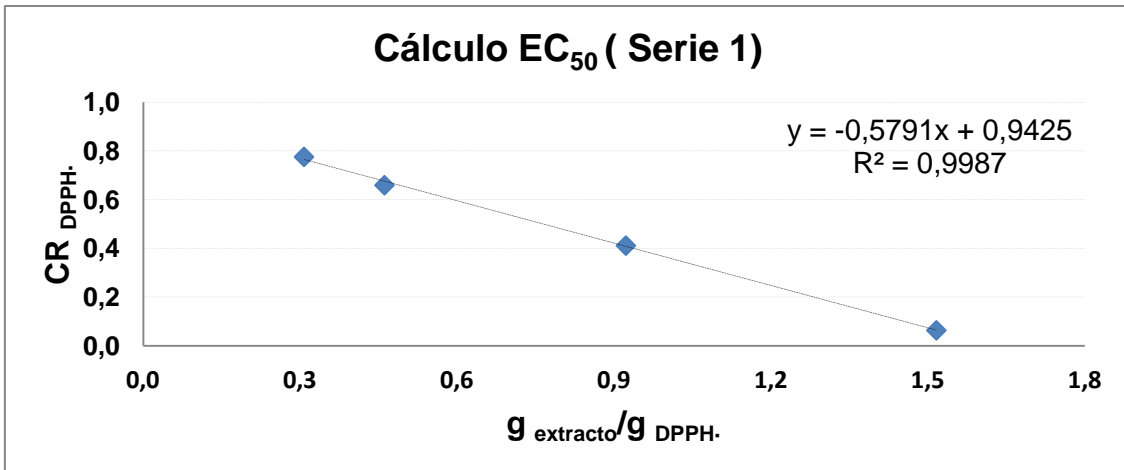
Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vaz, S., Salgueiro, L. (2012). *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. *Food Chemistry*, 135(3), 1505–1510.

ANEXOS

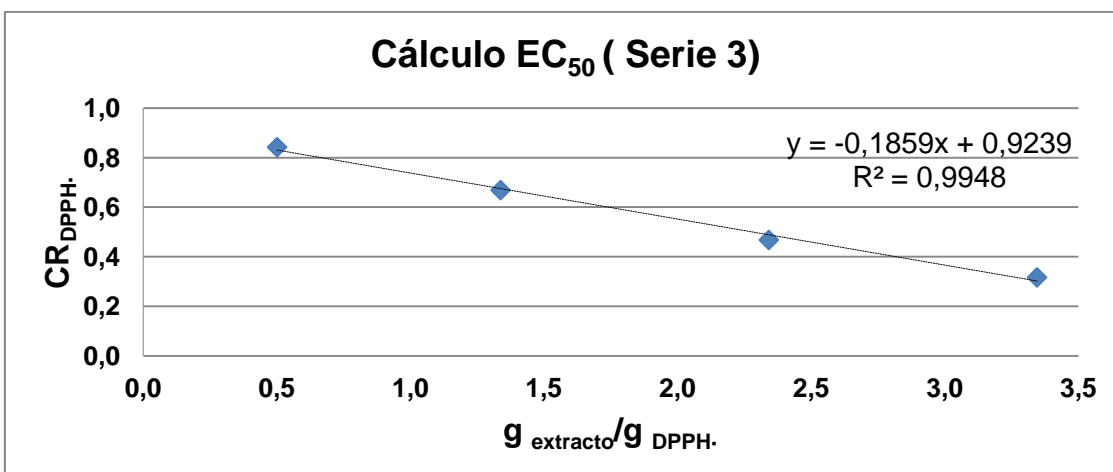
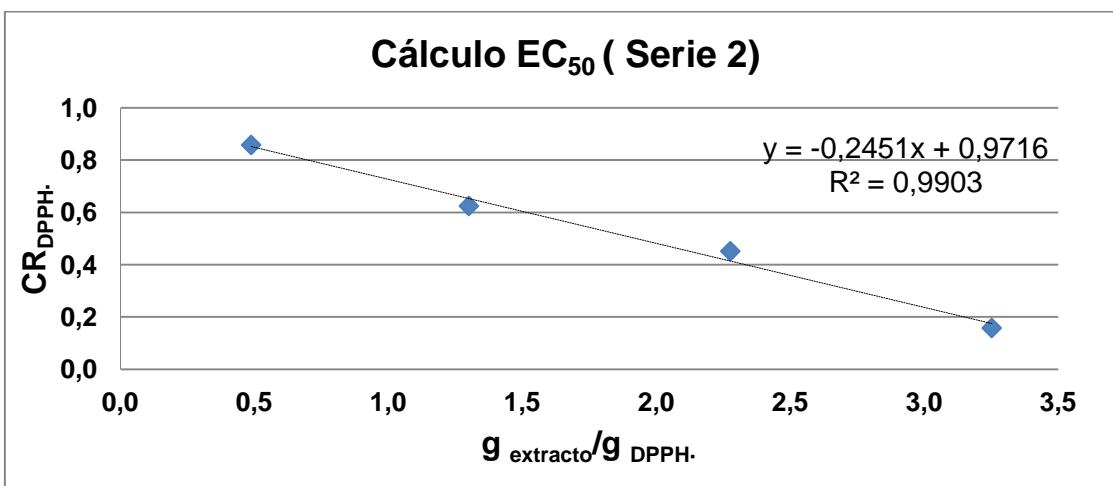
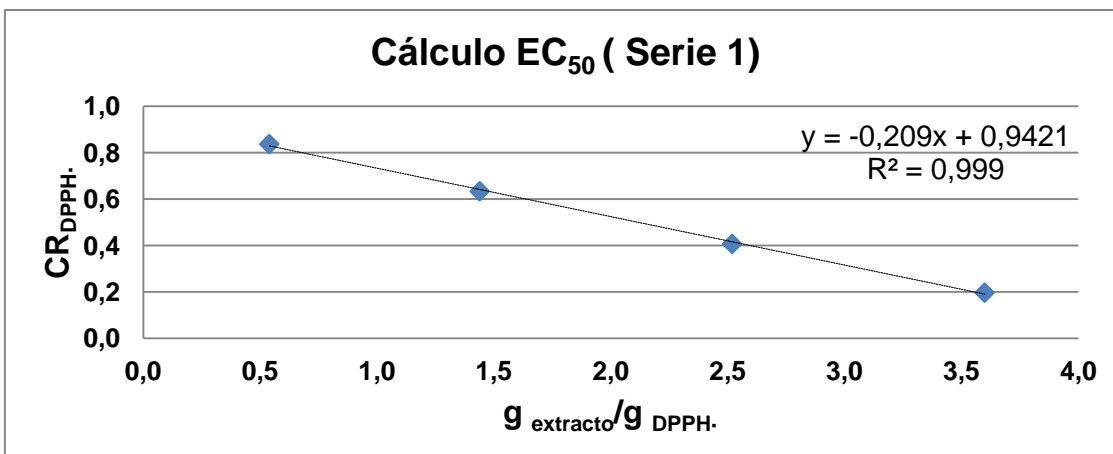
## 9.- ANEXOS



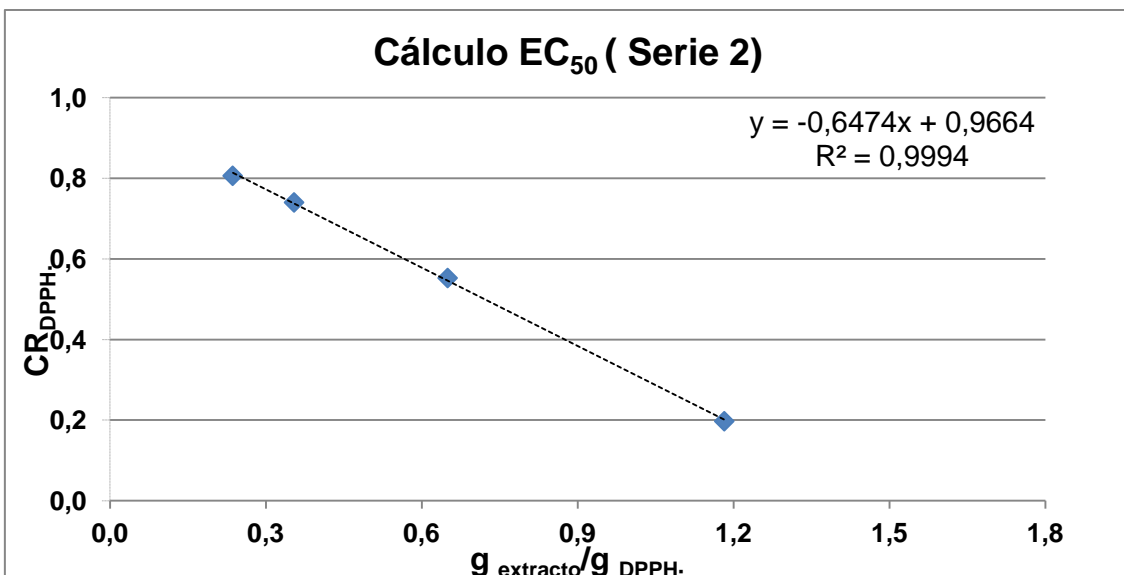
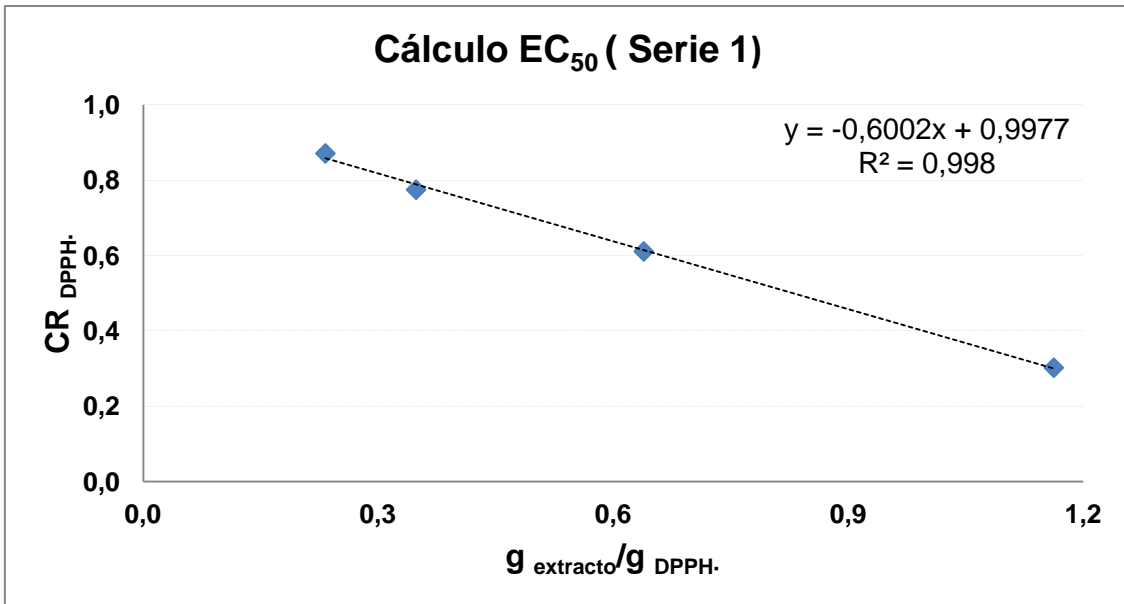
Rectas de correlación de la concentración remanente de DPPH· frente a la concentración final en la cubeta de Trolox™.



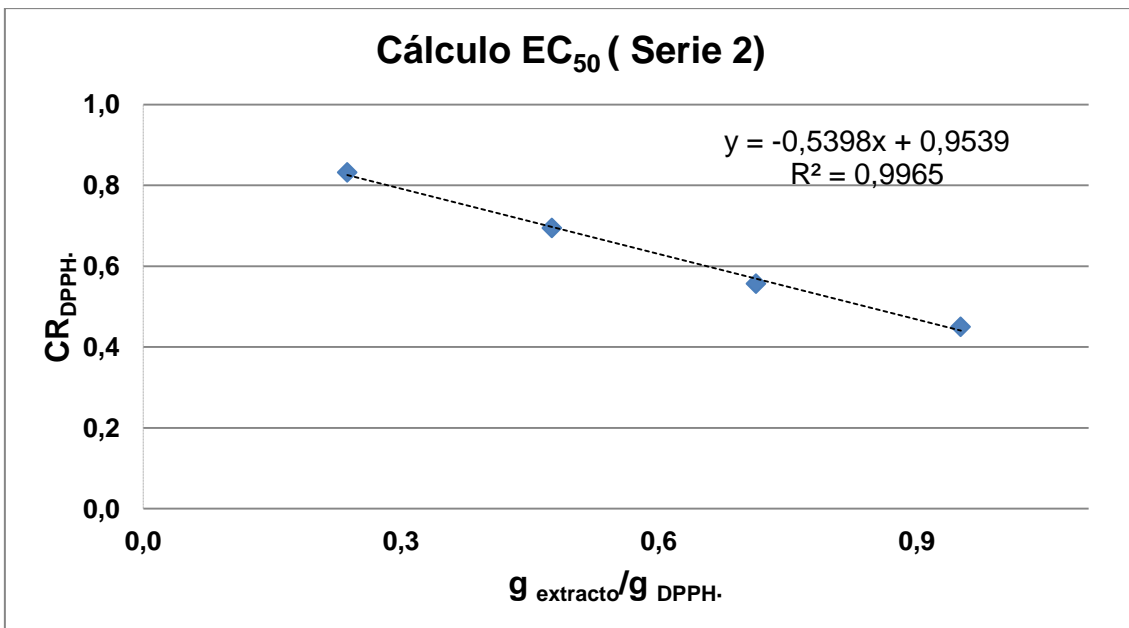
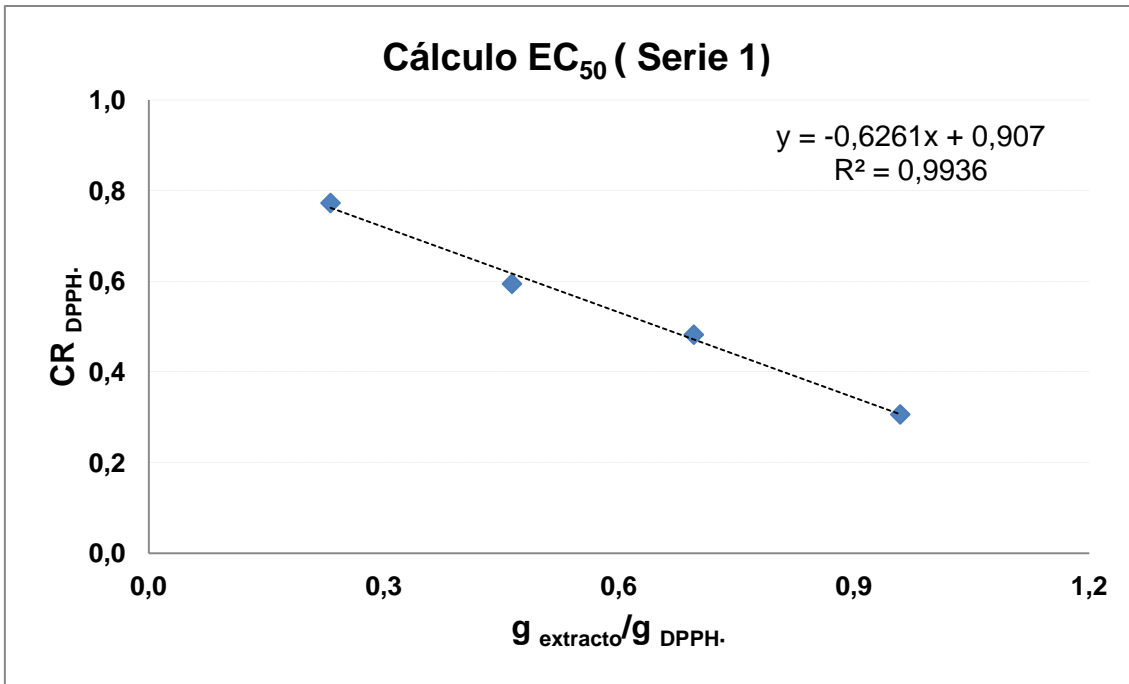
Rectas de concentración remanente de DPPH. /vs/ correlación del ratio  $g_{\text{extracto}}/g_{\text{DPPH}}$ . Se muestra el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Cubeta de extracto etanólico de flores.



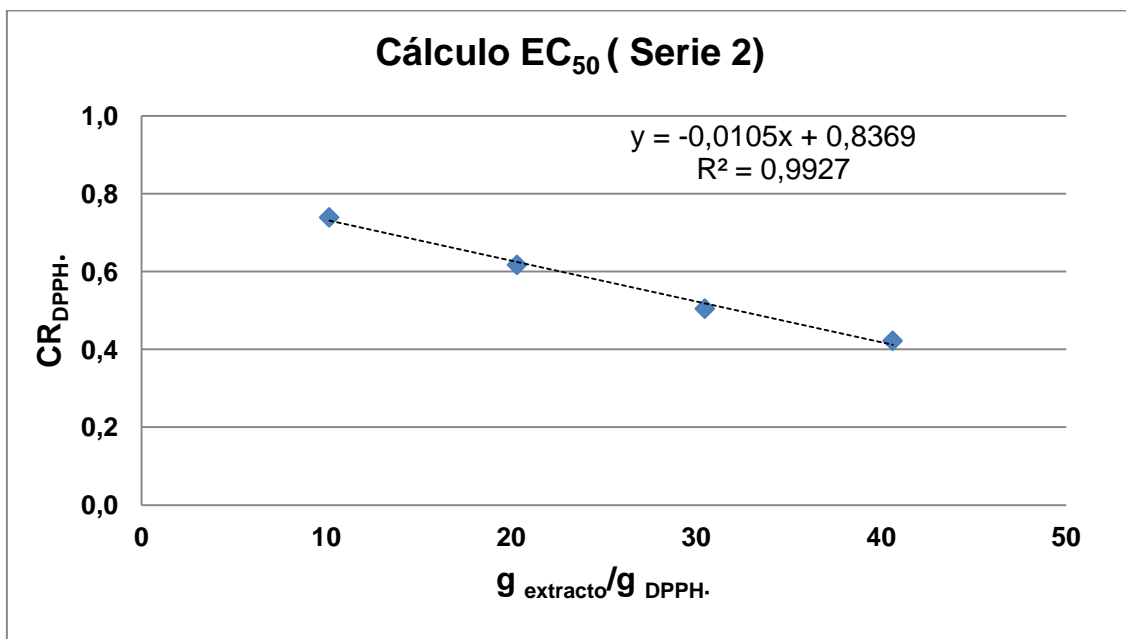
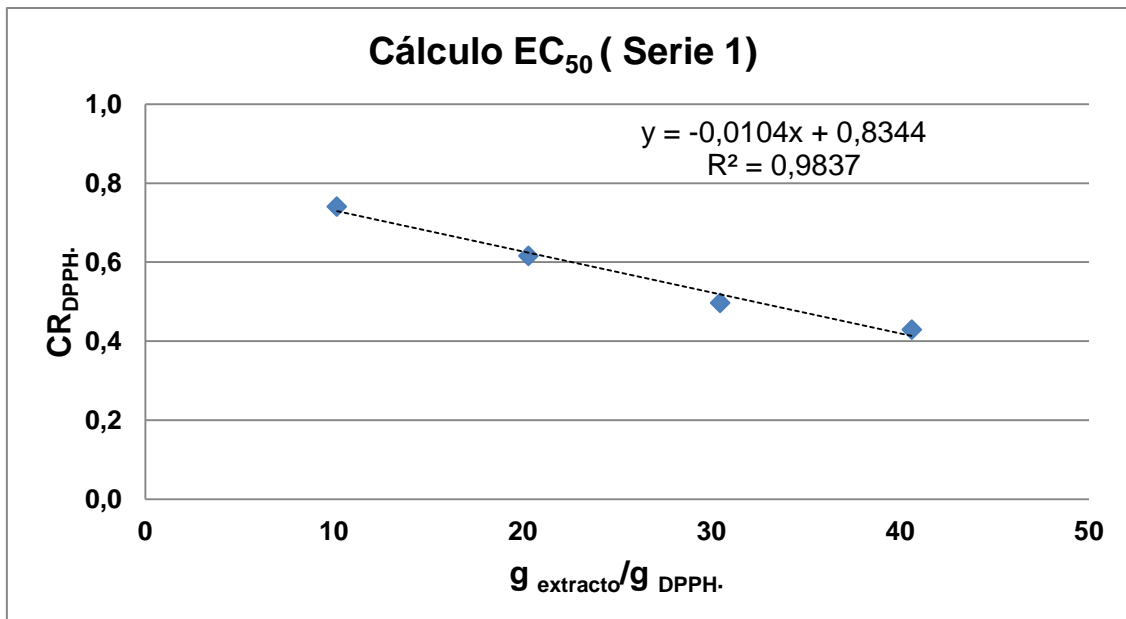
Rectas de concentración remanente de DPPH. /vs/ correlación del ratio  $g_{\text{extracto}}/g_{\text{DPPH}}$ . Se muestra el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Cubeta de extracto etanólico de hojas.



Rectas de concentración remanente de DPPH· /vs/ correlación del ratio  $g_{\text{extracto}}/g_{\text{DPPH}}$ . Se muestra el coeficiente de correlación (  $R^2$ ). Cubeta de SAS CÁMARA FLOR.

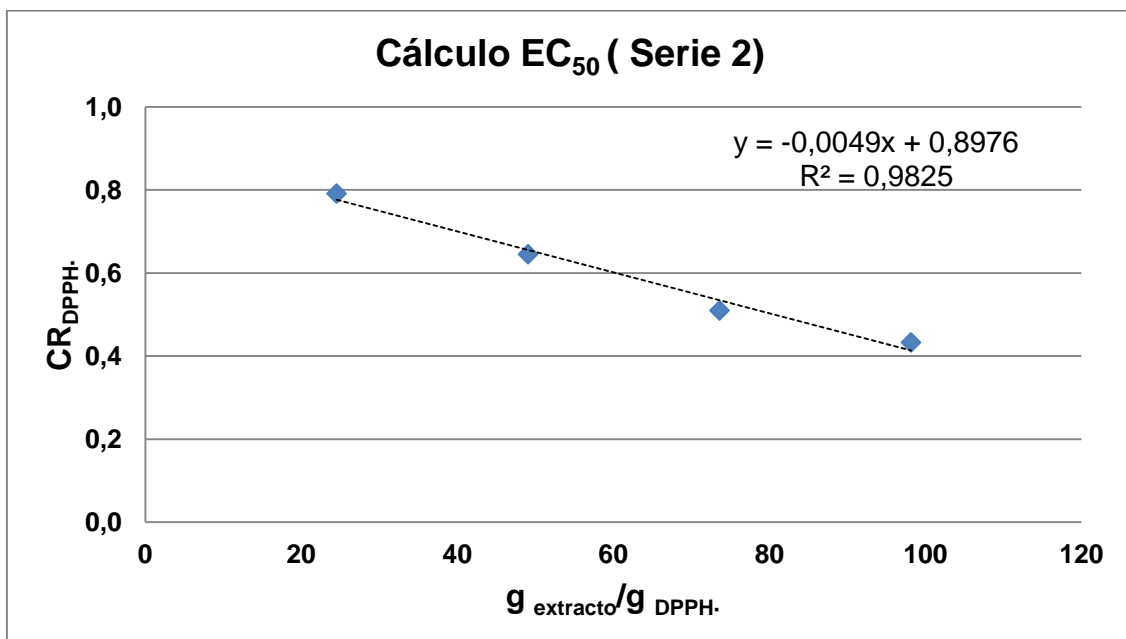
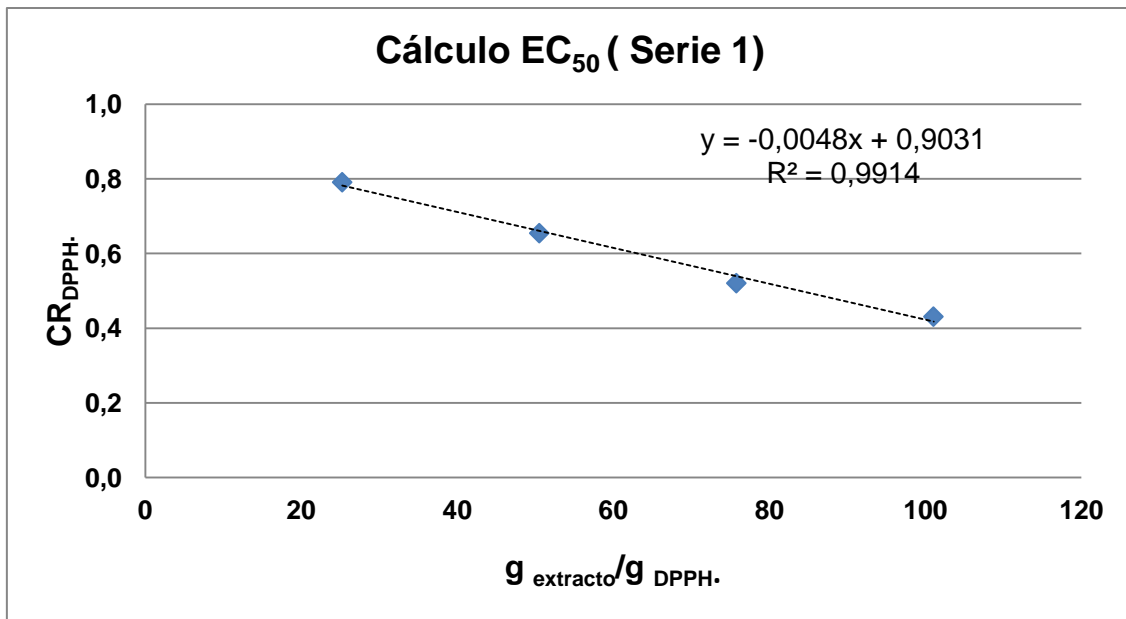


Rectas de concentración remanente de DPPH. /vs/ correlación del ratio  $g_{\text{extracto}}/g_{\text{DPPH}}$ . Se muestra el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Cubeta de SAS CÁMARA HOJAS.

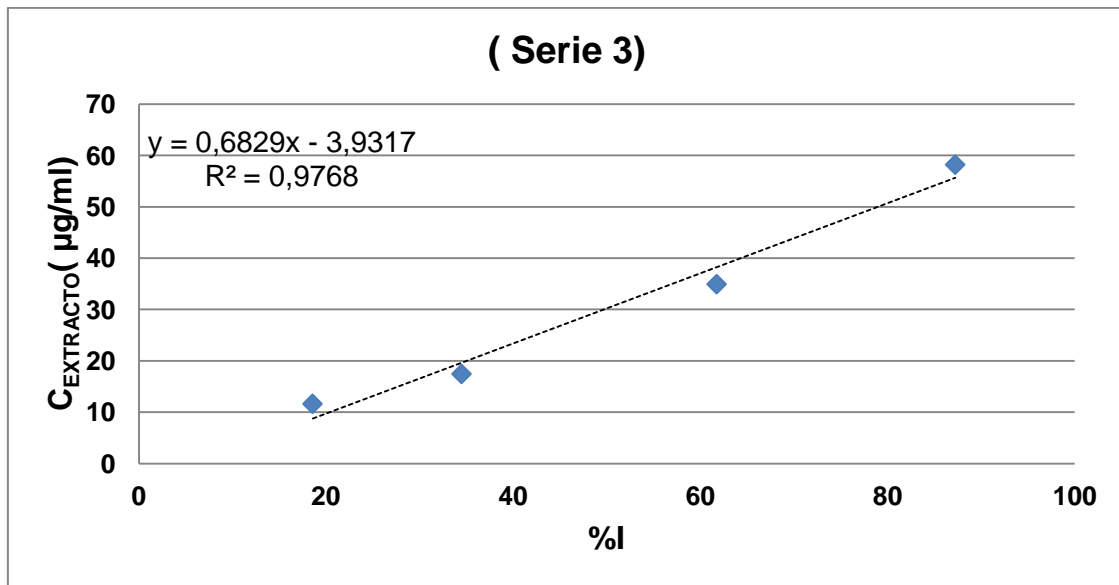
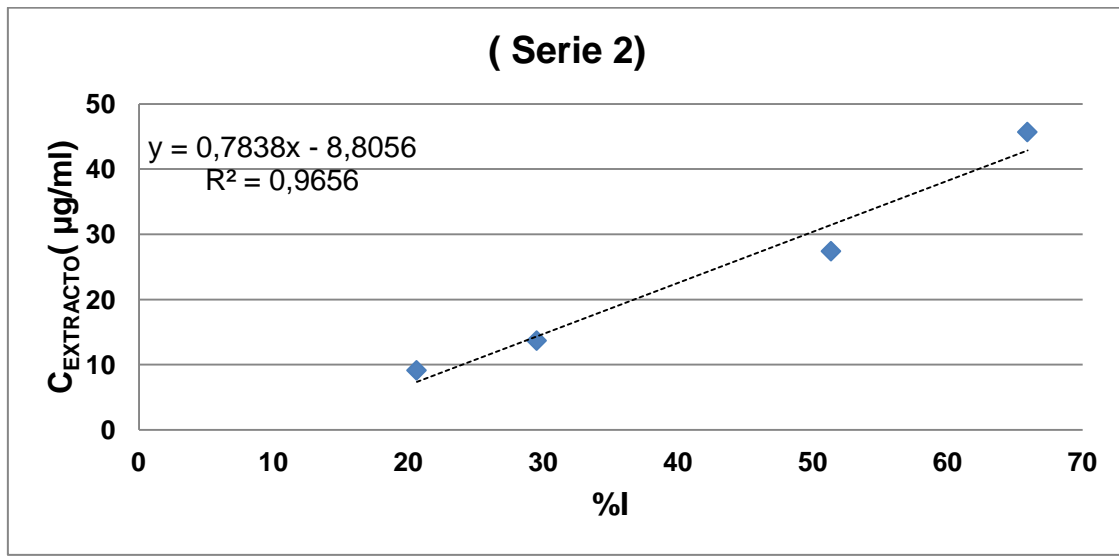
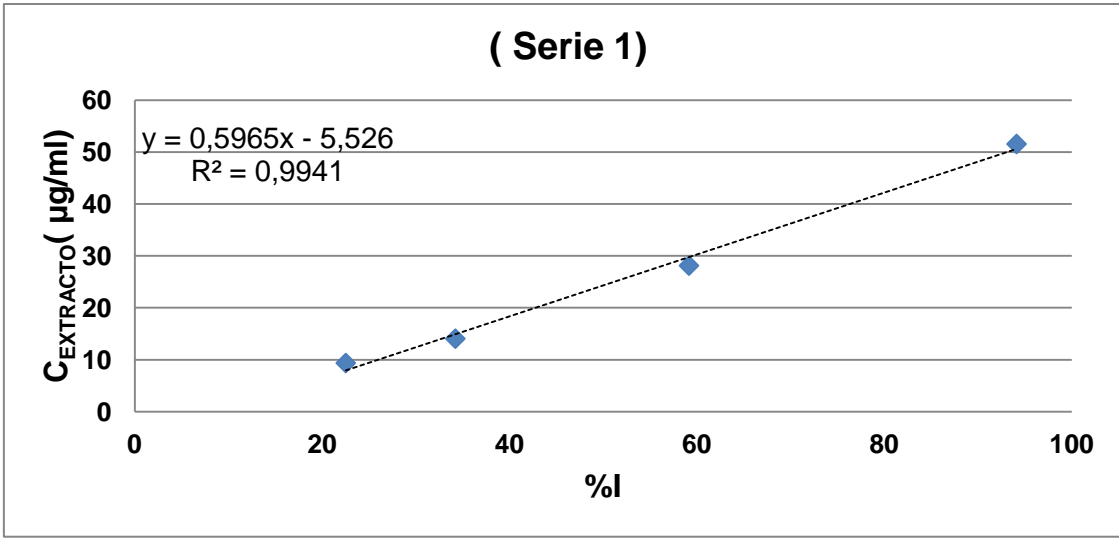


Rectas de concentración remanente de DPPH. /vs/ correlación del ratio  $g_{\text{extracto}}/g_{\text{DPPH}}$ . Se muestra el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Cubeta de SAS ESPURGO FLOR.

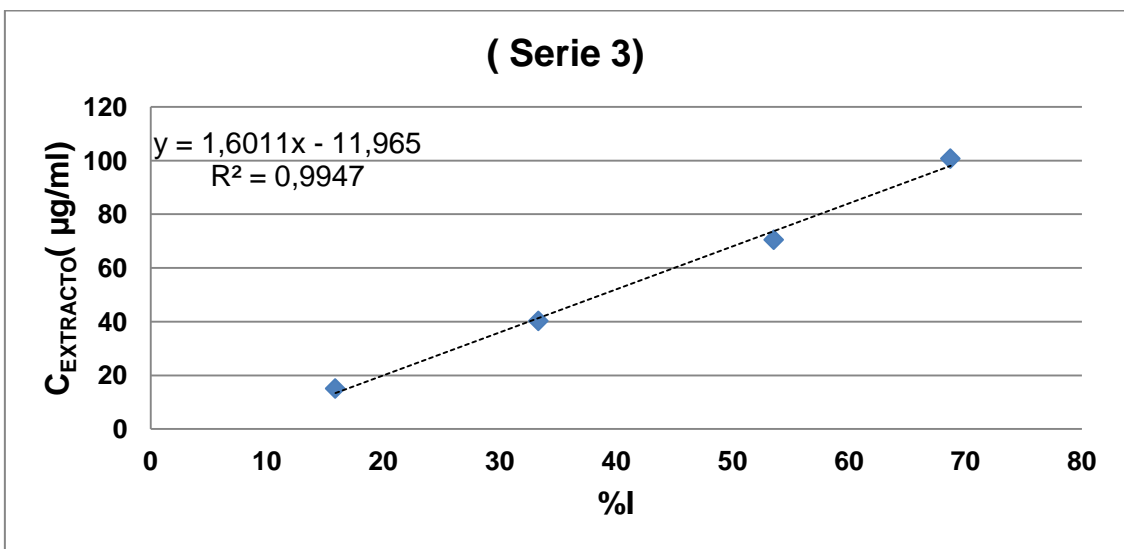
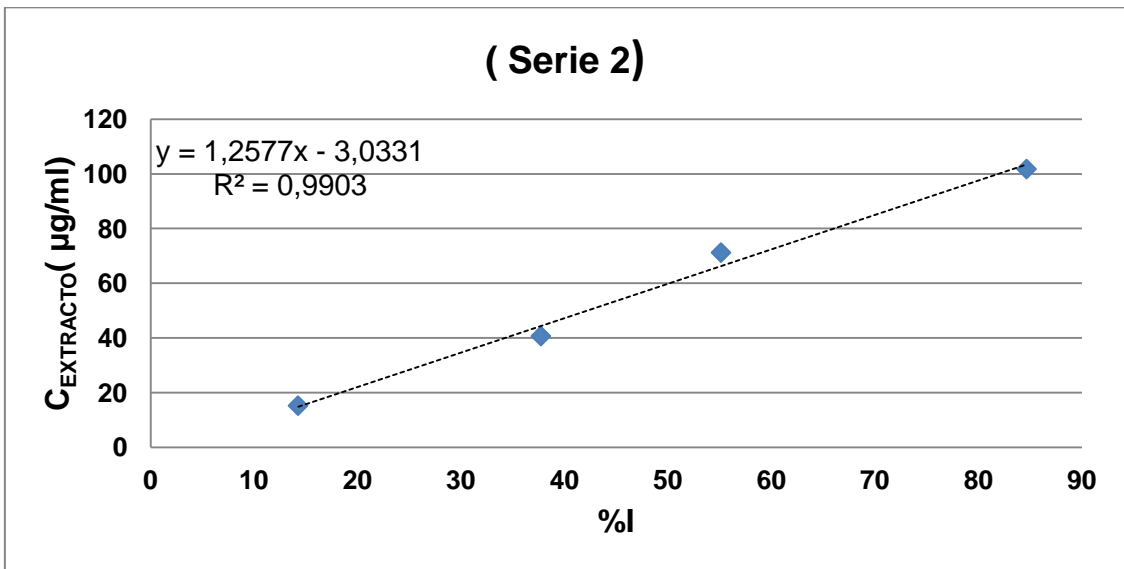
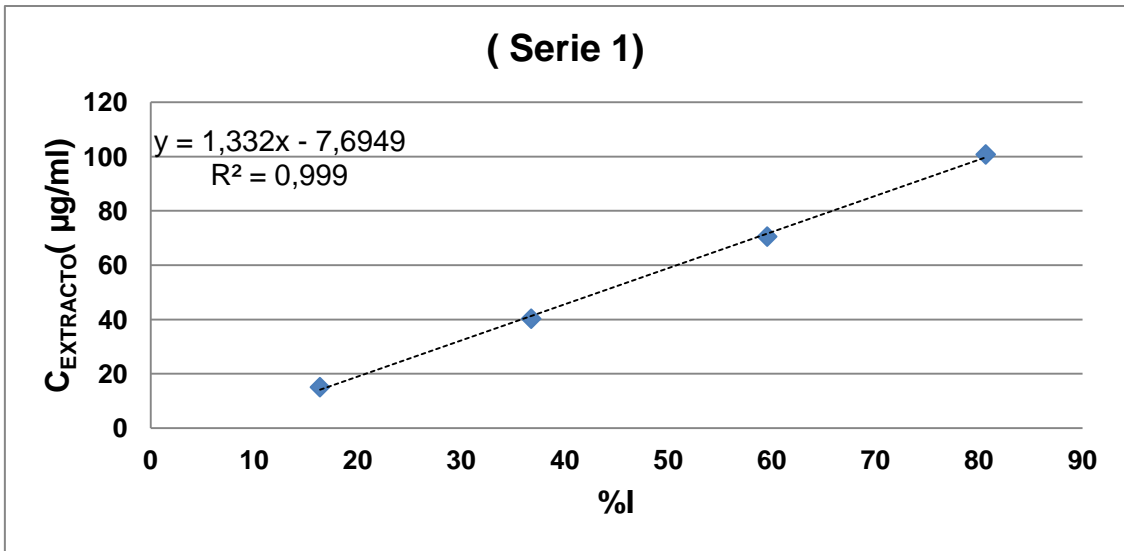




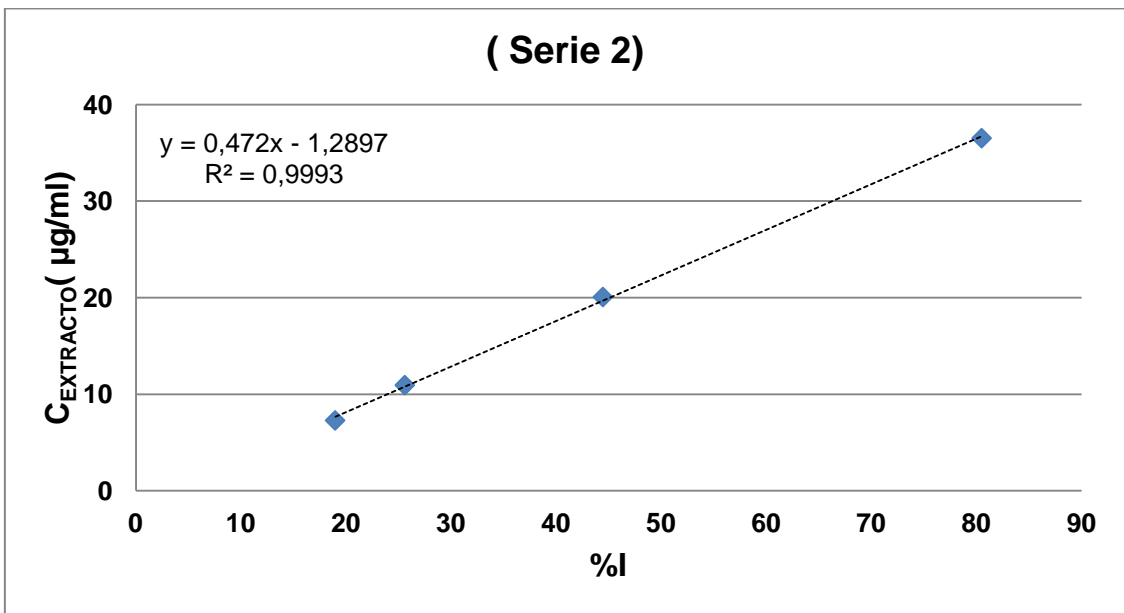
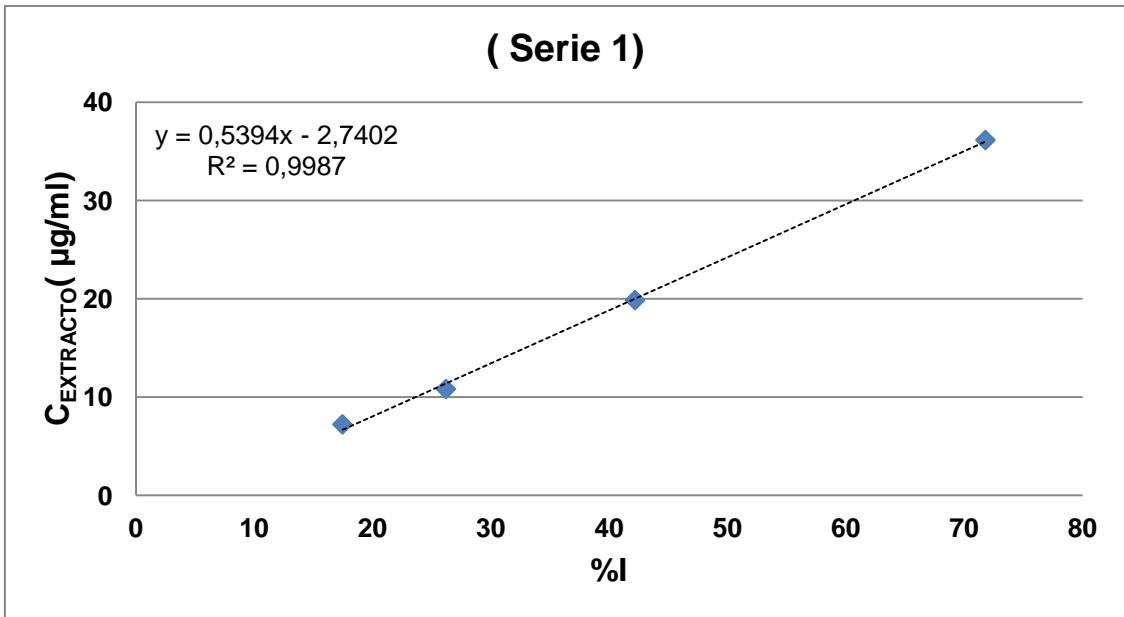
Rectas de concentración remanente de DPPH· /vs/ correlación del ratio  $g_{\text{extracto}}/g_{\text{DPPH}}$   
Se muestra el coeficiente de correlación (  $R^2$ ). Cubeta de SAS ESPURGO HOJAS.



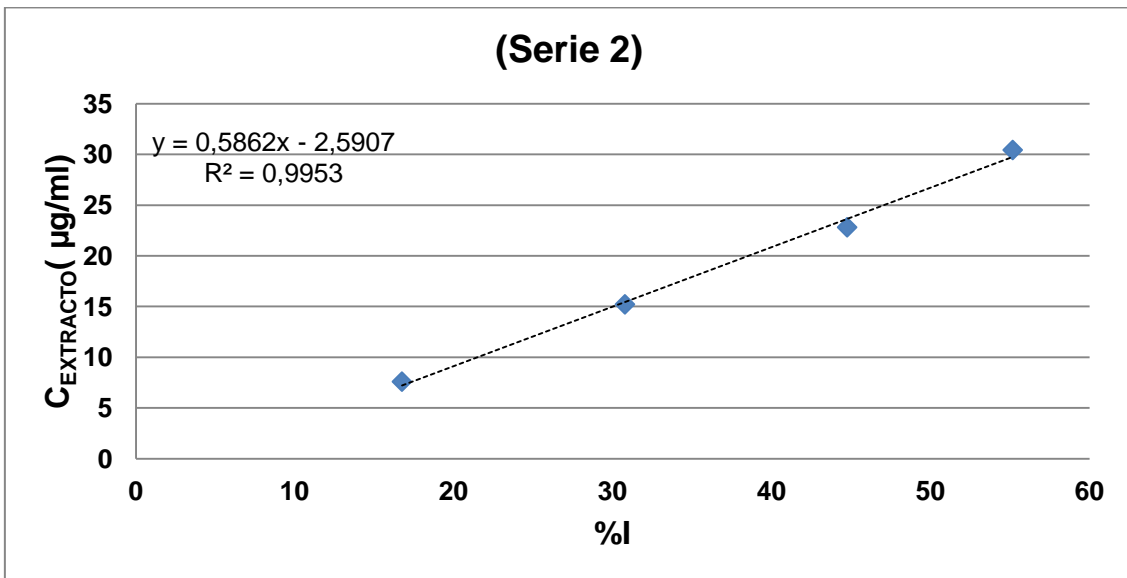
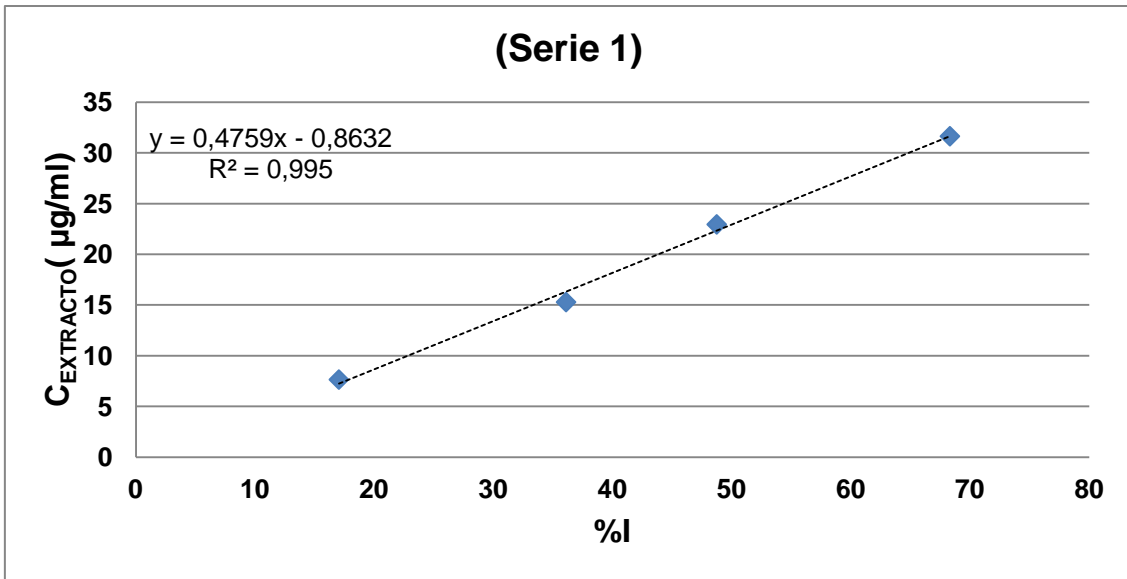
Rectas de concentración de extracto /vs/ porcentaje de Inhibición. Cubeta de extracto etanólico de flores.



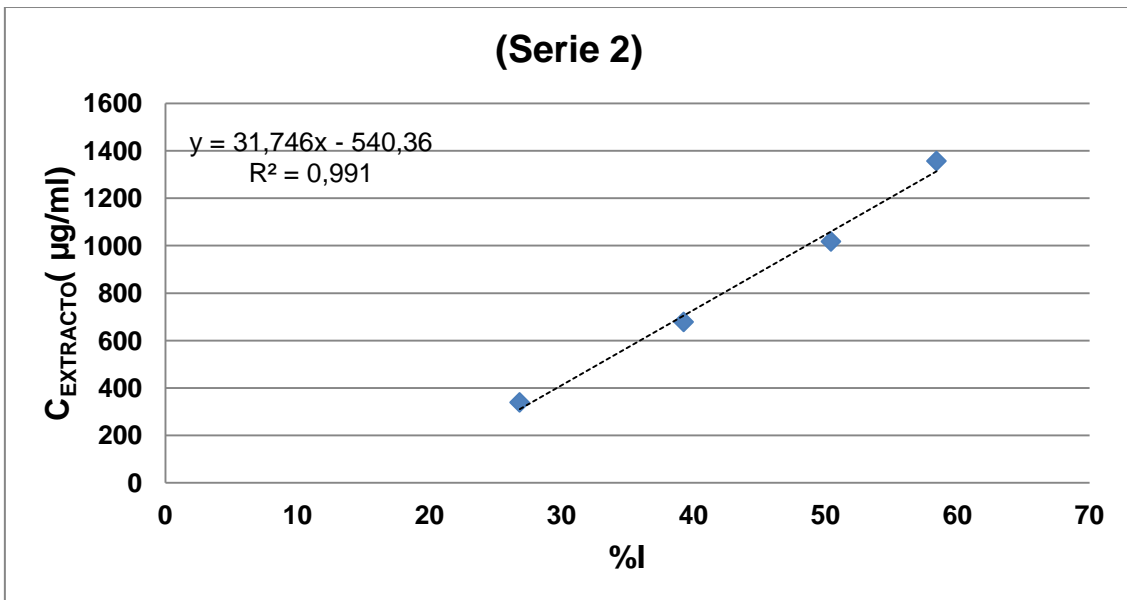
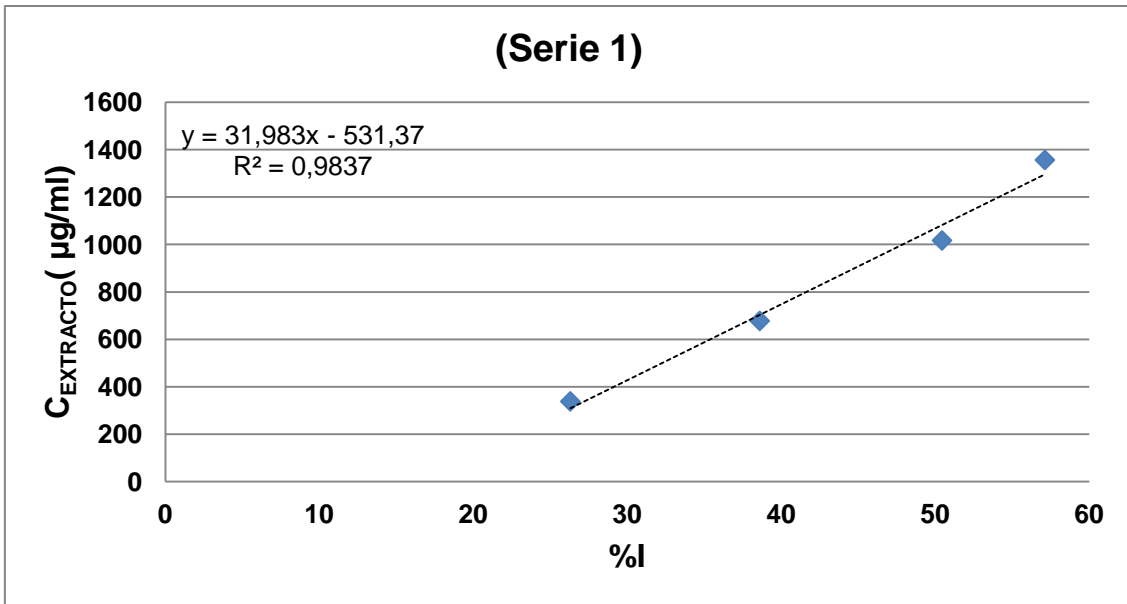
Rectas de concentración de extracto /vs/ porcentaje de Inhibición. Se muestra el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Cubeta de extracto etanólico de hojas.



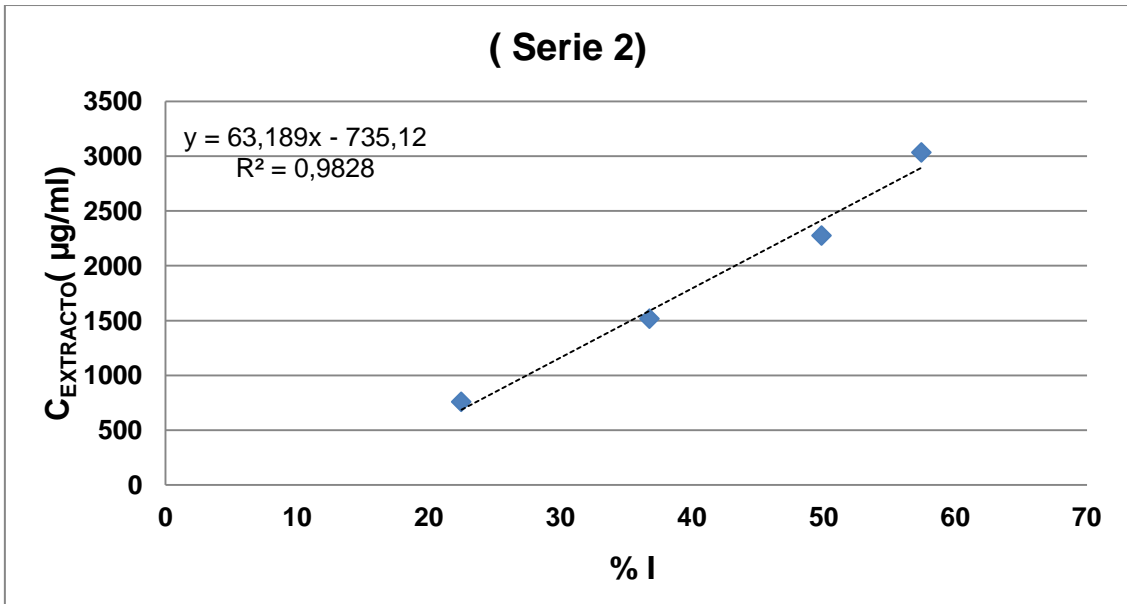
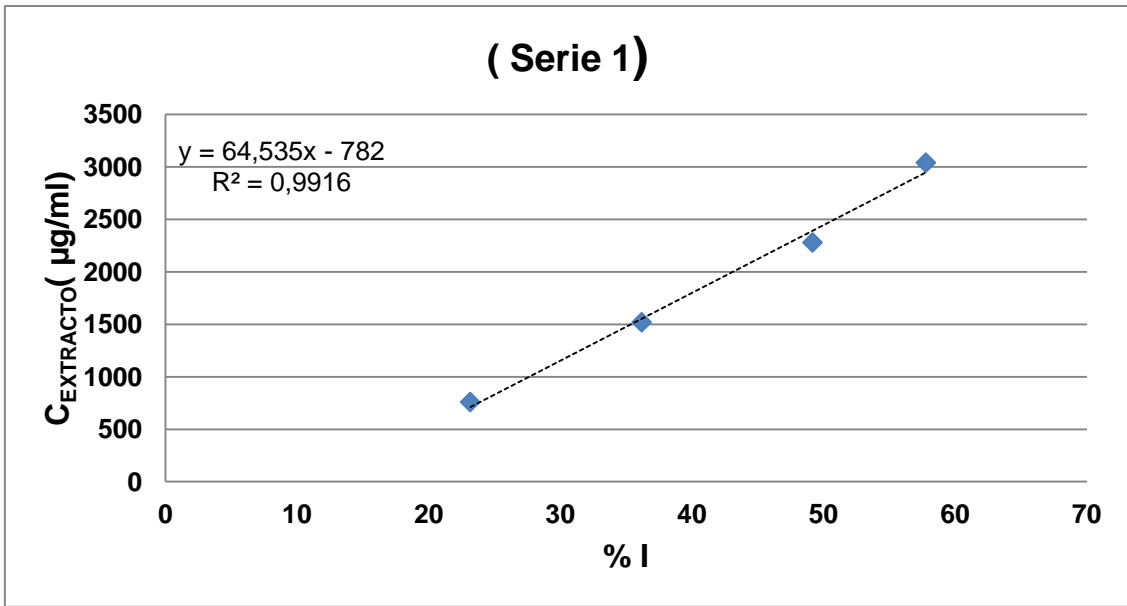
Rectas de concentración de extracto /vs/ porcentaje de Inhibición. Se muestra el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Cubeta de SAS CÁMARA FLOR.



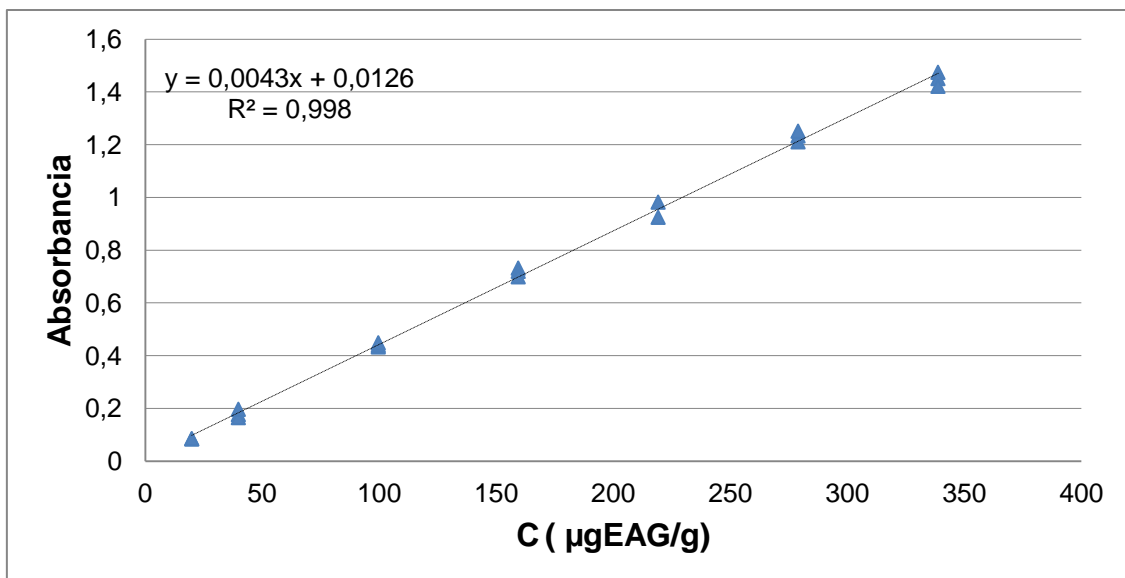
Rectas de concentración de extracto /vs/ porcentaje de Inhibición. Se muestra el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Cubeta de SAS CÁMARA HOJAS.



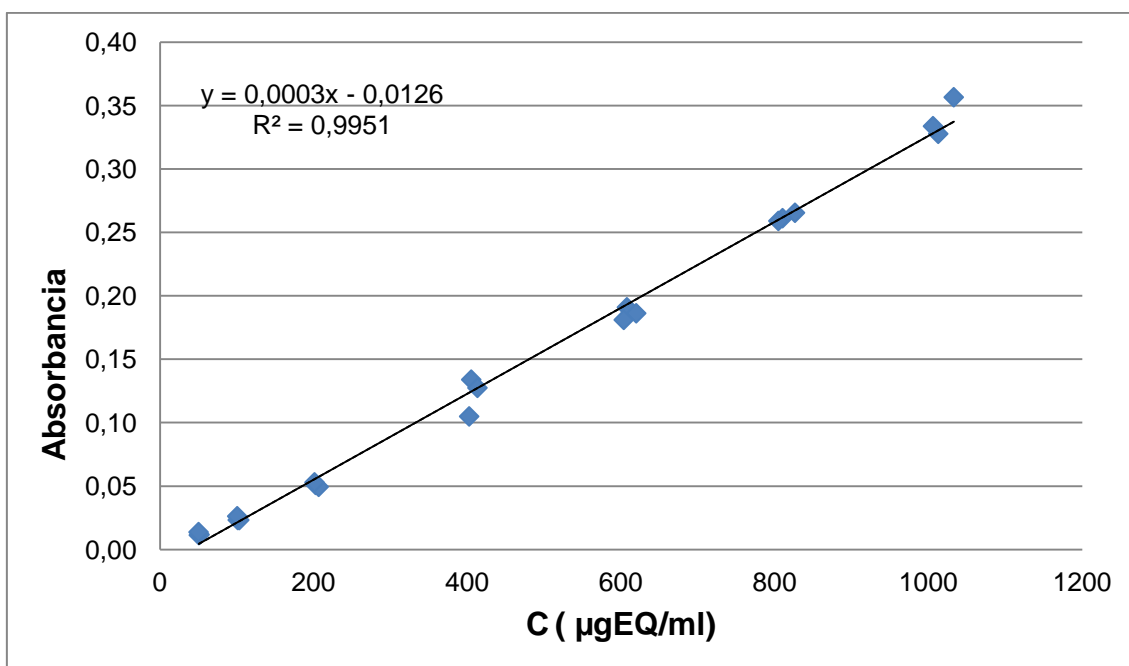
Rectas de concentración de extracto /vs/ porcentaje de Inhibición. Se muestra el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Cubeta de SAS ESPURGO FLOR.



Rectas de concentración de extracto /vs/ porcentaje de Inhibición. Se muestra el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Cubeta de SAS ESPURGO HOJAS.

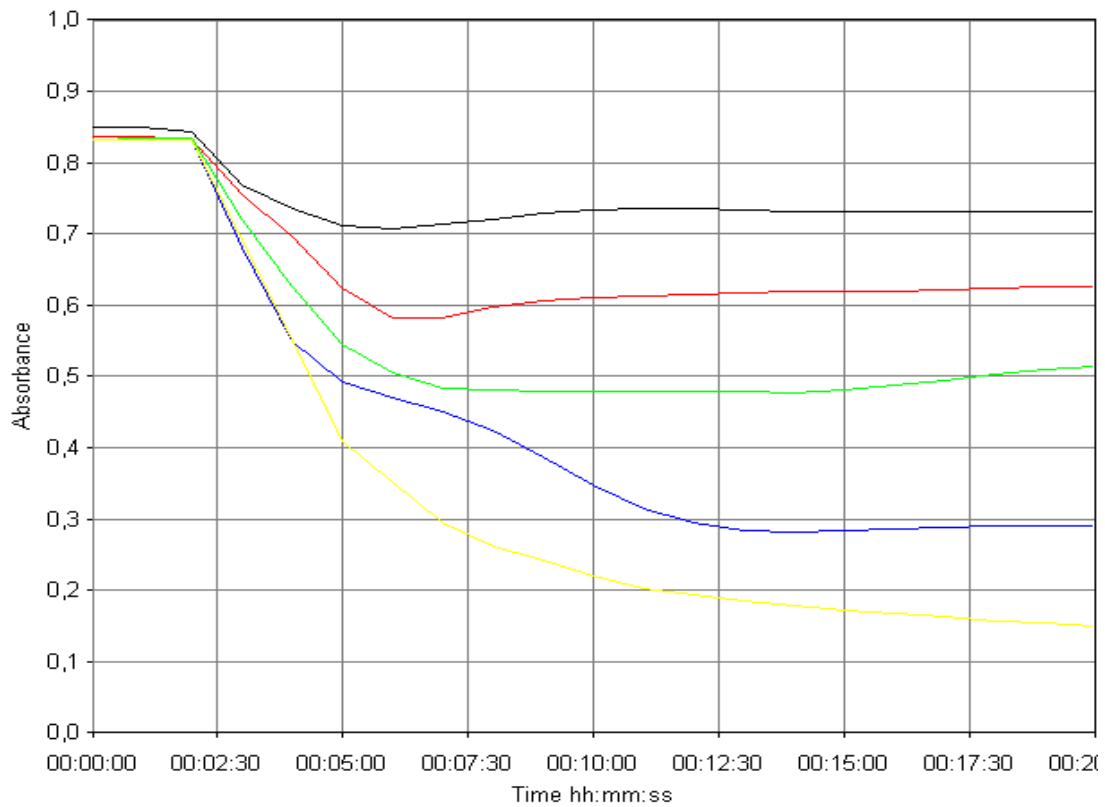


Recta de absorbancia /vs/ concentración de polifenoles. Se muestra el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Recta de calibrado de POLIFENOLES.

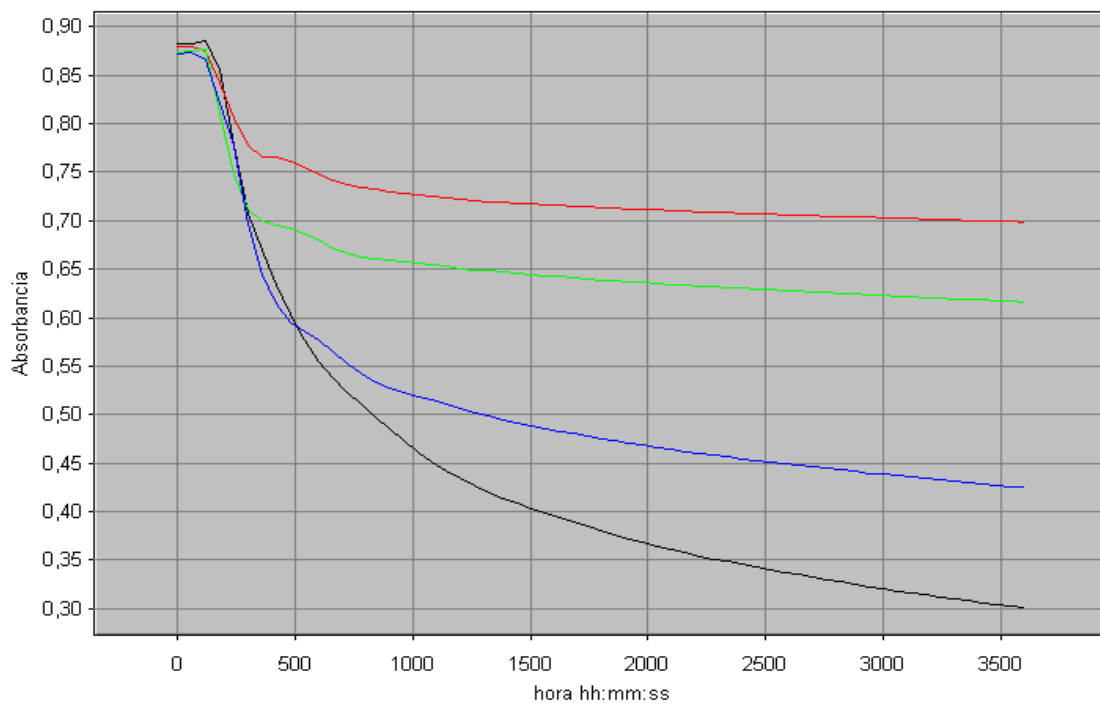


Recta de absorbancia /vs/ concentración de flavonoides. Se muestra el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Recta de calibrado de FLAVONOIDES.

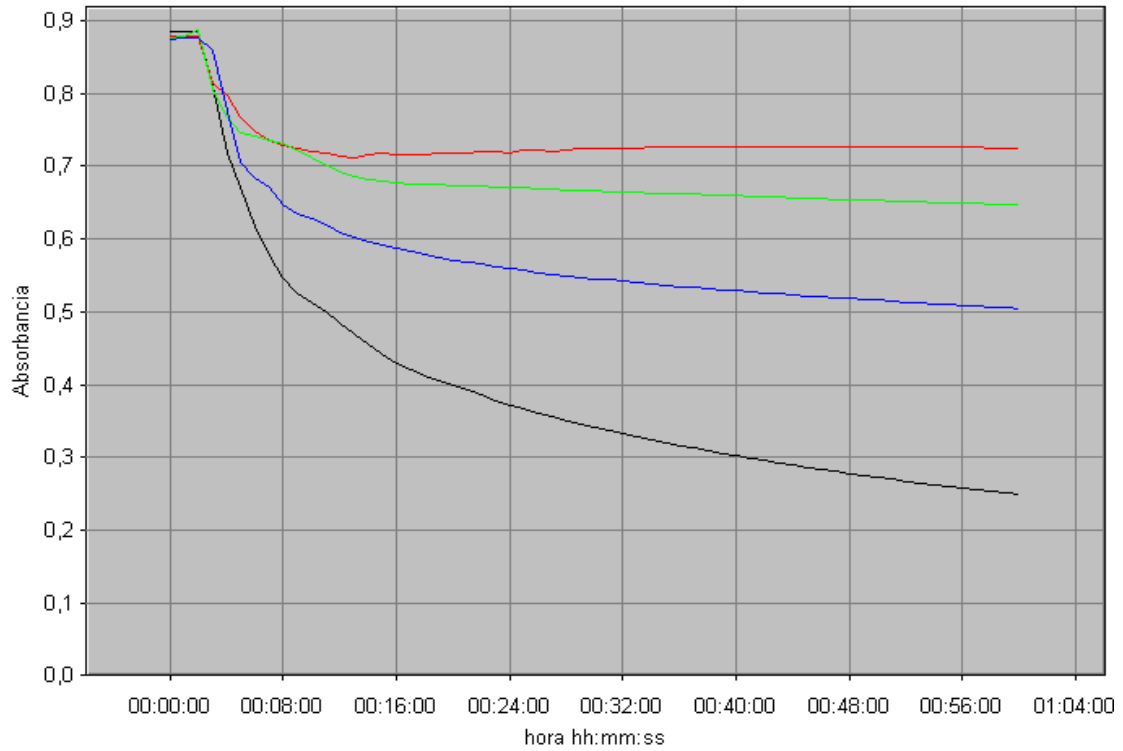




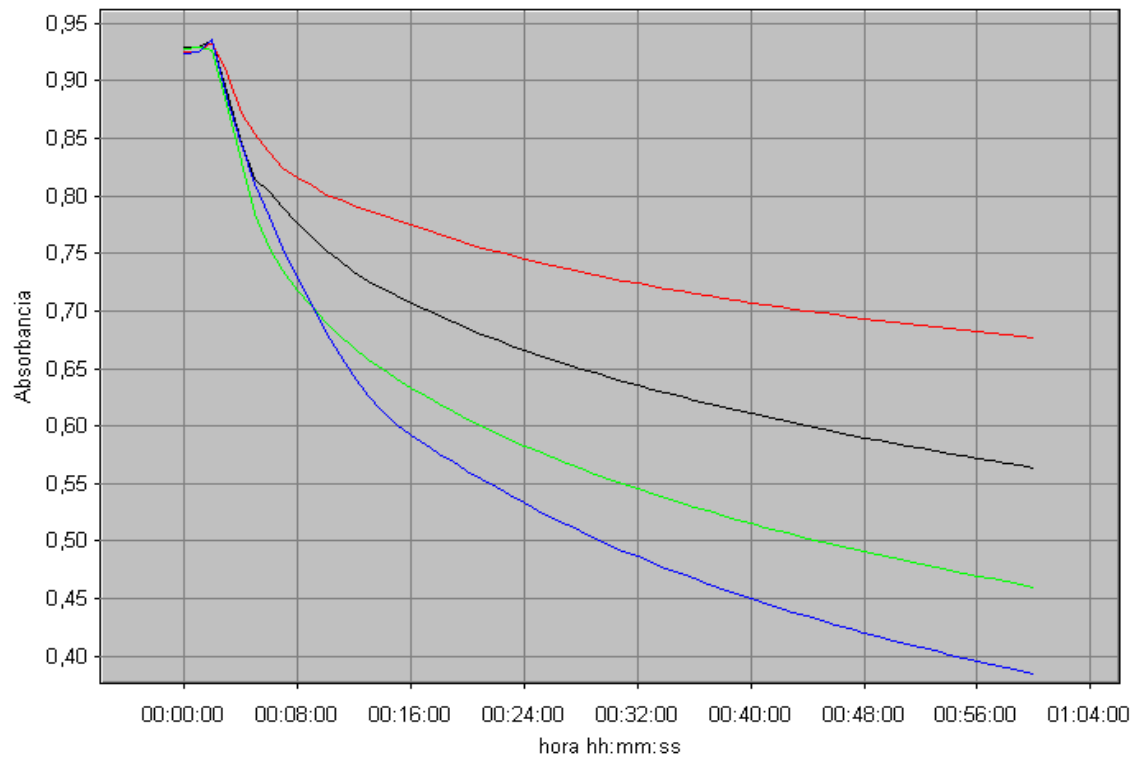
Representación de la evolución de la absorbancia con el tiempo por acción del antioxidante Trolox™ sobre el radical DPPH·.



Representación de la evolución de la absorbancia con el tiempo por acción del extracto sobre el radical DPPH·. Extracto etanólico flores



Representación de la evolución de la absorbancia con el tiempo por acción del extracto de cámara sobre el radical DPPH·. SAF CÁMARA FLOR.



Representación de la evolución de la absorbancia con el tiempo por acción del extracto de espurgo sobre el radical DPPH·. SAF ESPURGO FLOR.

