



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Metabólica de Aceites Esenciales de Mejoranas,
Romeros y Salvias con Aplicaciones Biotecnológicas.

Dña. Ana Belén Cutillas Gomariz
2017



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por el proyecto de investigación (19545/PI/14, *Enzimas y biomoléculas con aplicaciones biotecnológicas de plantas labiadas de la Región de Murcia*) financiado por la Fundación Séneca – Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, en el marco del PCTIRM 2011-2014. Investigador Principal Dr. José Tudela Serrano e Investigadora Colaboradora Dra. Virginia Tomás Martínez, GENZ-Grupo de investigación *Enzimología*, Universidad de Murcia.

La autora de esta Memoria ha disfrutado de las siguientes ayudas:

1. Contrato predoctoral expedido por la Universidad de Murcia. Duración: 9 meses (2014).

2. Contrato predoctoral expedido por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU 13/04013). Duración: 39 meses (2014-2017).

3. Ayuda de movilidad FPU EST15/00777 expedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, para estancia de investigación en el Departamento de Agricultura y Ciencias Alimentarias del Campus de Cesena (Universidad de Bolonia), tutorizado por el Prof. Leonardo Nanni Costa y la Prof. Rosalba Lanciotti. Duración: 3 meses (2016).

En Murcia, a 5 de Mayo de 2017.

Fdo.: **Dña. Ana Belén Cutillas Gomariz**
Alumna de doctorado
Depto. de Bioquímica y Biología Molecular-A
Facultad de Biología
Universidad de Murcia

Fdo.: **Dr. José Tudela Serrano**
Investigador principal de los proyectos
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Biología
Universidad de Murcia

Agradecimientos

Durante la elaboración de esta tesis, he recibido asesoramiento, atención, ayuda y apoyo que no puedo evitar agradecer. Esta Tesis no es sólo mía, sino de muchas otras personas que han colaborado para hacerla posible.

Agradecer a mis tutores José Tudela y Virginia Tomas, por su confianza en mí, su apoyo, su profesionalidad y todos los conocimientos que me han transmitido durante este tiempo. A Francisco García, José Neptuno y al resto de profesores del departamento con los que he compartido todos estos años. In addition, I would like to thank Dr. Rosalba Lanciotti for allowing me to stay under her supervision in the Department of Agricultural and Food Sciences and for her kind pieces of advice, trying to make me feel at home. I also want to thank Francesca, Lorenzo, Vincenzo, Diana, Giulia, Chiara, Giorgia and Giacomo, who shared their knowledge and their time with me in those three months.

A todos los compañeros del laboratorio que conocí durante la realización de este trabajo y que me animaron a seguir adelante en todo momento. A Delma, mi compañera del máster, de experimentos y de comidas, por ser tan valiente y luchadora. A Magda y Jesús, con los que he compartido buenos momentos durante el “té” e incluso horas de trabajo y de ocio fuera de la universidad. A Mar, por su alegría y su predisposición y a Rafa por su conocimiento, optimismo y ánimo para perseguir sueños. También tengo que agradecer a los investigadores con los que he coincidido durante estos años, Fernanda, Rebeca, Mar, Marisa, Jose Luis, Bea, María Piedad, Manel y Wun y con los que pasé grandes momentos en nuestras comidas pre-vacacionales y a los estudiantes de grado o máster Jonathan, Fátima y Mario por su trabajo y su buen hacer. Quiero agradecer a Antonio, con el que compartí años de carrera y al que tuve el placer de conocer más durante mis años en el departamento, con su humor, sus experiencias y los mensajes ocultos que dejaba en las cajas de puntas de pipetas. No puedo terminar este párrafo de agradecimientos sin hacer una mención especial a Alex y Vanessa, porque su ayuda desde el principio hasta el final de esta Tesis ha sido indispensable para conseguir este resultado, y no sólo a nivel de trabajo en el laboratorio donde aprendí muchísimo de ellos y siempre estuvieron dispuestos a ayudarme cuando “tenía una pregunta para ellos”, sino

también por todos los momentos de risas, las experiencias compartidas, las charlas durante la hora de la comida y muchas cosas más. Esos momentos no los olvidaré nunca.

A todos mis amigos, porque siempre han estado y sé que estarán ahí para escucharme, darme buenos consejos e incluso para intentar sacarme de casa cuando consideraban que necesitaba “despejarme un rato”.

A toda mi familia por confiar en mí, por verme siempre capaz de hacer todo lo que me proponga en la vida y por tenerlos siempre a mi lado. En particular tengo que agradecer a mis padres, porque sin ellos nada habría sido posible, por su grandísimo apoyo, por sus ánimos cuando no todo salía como esperaba y por su amor incondicional. Mi hermana, a la que tengo que agradecer tanto, por escucharme, aconsejarme, ayudarme y por ser un gran modelo a seguir. A Roque, por el apoyo infinito que recibo siempre de él, por ayudarme en todo lo posible y por sacarme una sonrisa, sobre todo cuando más lo necesito.

A todos, GRACIAS.

Publicaciones

Artículos de investigación

Cutillas, A.B., Carrasco, A., Martínez-Gutierrez, R., Tomas, V., and Tudela, J. (2017). *Thymus mastichina* L. essential oils from Murcia (Spain): composition and antioxidant, antienzymatic and antimicrobial bioactivities (En revisión).

Cutillas, A.B., Carrasco, A., Martínez-Gutierrez, R., Tomas, V., and Tudela, J. (2017). *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Spain: composition, antioxidant capacity, lipoxygenase and acetylcholinesterase inhibitions and antimicrobial activities (En elaboración).

Cutillas, A.B., Carrasco, A., Martínez-Gutierrez, R., Tomas, V., and Tudela, J. (2017). Composition and antioxidant, antienzymatic and antimicrobial activities of volatile molecules of *Salvia lavandulifolia* (Vahl) essential oil from Spain (En revisión).

Cutillas, A.B., Carrasco, A., Martínez-Gutierrez, R., Tomas, V., and Tudela, J. (2017). *Salvia officinalis* L. Essential Oil from Spain: Determination of Composition, Antioxidant Capacity, Antienzymatic and Antimicrobial Bioactivities. Chemistry and Biodiversity (Aceptado).

Cutillas, A.B., Carrasco, A., Martínez-Gutierrez, R., Tomas, V., and Tudela, J. (2017). Thyme essential oil from Spain: aromatic profile by GC-MS, antioxidant, lipoxygenase inhibition and antimicrobial activities (En revisión).

Comunicaciones a congresos

Cutillas, A.B., Carrasco, A., Martínez-Gutierrez, R., Tomas, V., Tudela, J. (2016). *Thymus mastichina* from Spain: aromatic profile and enantioselective gas chromatography-mass spectrometry. Congreso anual de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Salamanca, Spain).

Cutillas, A.B., Carrasco, A., Martínez-Gutierrez, R., Martínez, F.J., Sanchez, M., Tomas, V., and Tudela, J. (2014). *Rosmarinus officinalis* from Spain: aromatic profile by enantioselective gas chromatography-mass spectrometry. ANQUE-ICCE-BIOTEC-14 (Madrid, Spain).

Cutillas, A.B., Carrasco, A., Ortiz, V., Martínez-Gutierrez, R., Martínez, F.J., Sanchez, M., Tomas, V., and Tudela, J. (2013). *Salvia lavandulifolia* from Spain: aromatic profile by enantioselective gas chromatography-mass spectrometry. Eurobiotech 2013 (Krakow, Poland).

Cutillas, A.B., Carrasco, A., Ortiz, V., Martínez-Gutierrez, R., Martínez, F.J., Sanchez, M., Tomas, V., and Tudela, J. (2013). *Salvia officinalis* from Spain: aromatic profile by enantioselective gas chromatography-mass spectrometry. MicroBiotech 2013 (Aveiro, Portugal).

Abreviaturas

AA o AH₂ – Ácido ascórbico

AAPH – 2,2'-Azobis(2-metilpropionamida) dihidrocloruro

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AC – Área bajo la curva

AChE – Acetilcolinesterasa

ACP (PCA english version) – Análisis de componentes principales

AE (EO english version) – Aceite esencial

AERCa – Aceite esencial de *R. officinalis* bioquimiotipo alcanfor

AERCi – Aceite esencial de *R. officinalis* bioquimiotipo 1,8-cineol

AESI – Aceite esencial de *S. lavandulifolia*

AESo – Aceite esencial de *S. officinalis*

AETm – Aceite esencial de *T. mastichina*

AJC (AHC english version) – Análisis jerárquico de conglomerados

BHT – Butilhidroxitolueno

CG – Cromatografía de gases

CGEs – Cromatografía de gases enantioselectiva

CGR – Cromatografía de gases rápida

CLSI – Clinical Laboratory Standard Institute

CMB (MBC english versión) – Concentración mínima bactericida

CMF (MFC english versión) – Concentración mínima fungicida

CMI – Concentración mínima inhibitoria

CP – Componente principal

DER – Desviación estándar relativa

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

DTNB – Ácido 5,5' ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)

EAA (AAE english version) – Equivalentes de ácido ascórbico

EBHT (BHTE english version)– Equivalentes de BHT

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

EEDTA (EDTAE english version)– Equivalentes de EDTA

EM – espectrometría de masas

ET (TE english version)– Equivalentes de trolox

FerroZine – Hidrato de la sal monosódica del ácido 3-(2-piridyl)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p,p'-disulfónico

GI – Grado de inhibición

HETP – Altura equivalente de placa teórica

HPETE – Hidroperoxieicosatetranoico

IE – Impacto electrónico

IRL – Índice de retención lineal

ISO – Organización internacional de normalización

IUPAC – Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

LC – Límite de cuantificación

LD – Límite de detección

LOX – Lipoxigenasa

MDA – Malondialdehído

MHA – Agar Mueller-Hinton

MHB – Caldo Mueller-Hinton

MI – Método de identificación

MRS – Agar de Man, Rogosa y Sharpe

NDGA – Ácido nordihidroguaiaretico

ORAC – Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

PCA – Recuento en placa Agar

PQ (ChP english version)– Potencia quelatante

PR (RP english version)– Potencia reductora

PRIMA – Peptido de anclaje a membrana rico en prolina

RPMI-1640 – Medio Roswell Park Memorial Institute-1640

SDA – Agar Sabouraud dextrosa

SDS – Dodecilsulfato sódico

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico

TEAC – Capacidad antioxidante equivalente a Trolox

Trolox – ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

TSB – Caldo triptona de soja

UFC – Unidades formadoras de colonias

UFR – Unidades de fluorescencia relativas

VRBA – Agar bilis y rojo violeta

YPD – Caldo dextrosa-peptona-extracto de levadura

Tzt – *T. zygis* bioquimiotipo timol

Tzl – *T. zygis* bioquimiotipo linalol

Th – *T. hyemalis*

Contenido

Summary	1
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Plantas aromáticas como fuente de aceites esenciales.	9
1.1.1. Mejorana española (<i>Thymus mastichina</i> L.)	13
1.1.2. Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	14
1.1.3. Salvia española (<i>Salvia lavandulifolia</i> VAHL)	15
1.1.4. Salvia común o dalmata (<i>Salvia officinalis</i> L.)	16
1.1.5. Otros AEs	17
1.2. Cromatografía de gases (CG)	19
1.2.1. Conceptos generales	19
1.2.2. Cromatografía de gases enantioselectiva (CGEs)	27
1.3. Capacidad antioxidante	29
1.3.1. ORAC	31
1.3.2. DPPH	32
1.3.3. ABTS	33
1.3.4. TBARS	33
1.3.5. Potencia reductora (PR)	33
1.3.6. Potencia quelatante (PQ)	34
1.4. Inhibición enzimática	35
1.4.1. LOX	35
1.4.2. AChE	38
1.5. Inhibición microbiana	40
1.5.1. Estudios <i>in vitro</i>	41
1.5.2. Ensayos aplicados a la conservación de alimentos	44
2. OBJETIVOS	49
2.1. Objetivos	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1. Aceites esenciales	53
3.2. Reactivos	54
3.3. Cromatografía de gases rápida-Espectrometría de masas (CGR-IE/EM)	54
3.4. Cromatografía de gases enantioselectiva-Espectrometría de masas (CGEs/EM)	60
3.5. Bioactividad antioxidante	61
3.5.1. Método ORAC	61
3.5.2. Método DPPH	62
3.5.3. Método ABTS	62
3.5.4. Método TBARS	63
3.5.5. Método de la potencia reductora (PR)	63
3.5.6. Método de la potencia quelatante (PQ)	64
3.6. Bioactividad antienzimática	64
3.6.1. LOX	64
3.6.2. AChE	65
3.7. Bioactividad antimicrobiana	66
3.7.1. Microorganismos y condiciones de cultivo	66
3.7.2. Determinación de la CMI y CMB o CMF	66
3.8. Inhibición microbiana en alimentos	67
3.8.1. Proceso de cortado, pesado y lavado en el tratamiento con agua clorada.	67
3.8.2. Proceso de cortado, pesado y lavado en el tratamiento con AEs	68
3.8.3. Medida de la atmósfera en el interior de los recipientes y del pH de los extractos.	69

3.8.4. Recuento de la carga microbiana del producto. _____	70
3.9. Análisis estadístico _____	70
4. Estudio sobre aceites esenciales de <i>Thymus mastichina</i> (AETm) _____	75
4.1. Determinación de la composición mediante CGR-IE/EM _____	75
4.1.1. Composición de AEs de <i>T. mastichina</i> cultivada en Murcia _____	75
4.1.2. Comparativa con AEs de <i>T. mastichina</i> de otras regiones y países _____	80
4.1.3. Comparación con la normativa ISO _____	81
4.2. Cromatografía de gases enantioselectiva-espectrometría de masas _____	82
4.3. Bioactividad antioxidante _____	83
4.3.1. ORAC _____	83
4.3.2. DPPH _____	83
4.3.3. ABTS _____	83
4.3.4. TBARS _____	84
4.3.5. PQ _____	84
4.4. Inhibición enzimática _____	85
4.4.1. Inhibición de LOX _____	85
4.4.2. Inhibición de AChE _____	86
4.5. Conclusiones _____	86
4.6. Bibliografía _____	87
5. Estudio sobre aceites esenciales de <i>Rosmarinus officinalis</i> (AERo) _____	89
5.1. Determinación de la composición mediante CGR-IE/EM _____	89
5.1.1. Composición de AEs de <i>R. officinalis</i> cultivada en Murcia _____	89
5.1.2. Comparativa con AEs de <i>R. officinalis</i> de otras regiones y países _____	90
5.1.3. Comparación con la normativa ISO _____	98
5.2. Cromatografía de gases enantioselectiva-espectrometría de masas _____	98
5.3. Bioactividad antioxidante _____	99
5.3.1. ORAC _____	99
5.3.2. DPPH _____	99
5.3.3. ABTS _____	100
5.3.4. TBARS _____	100
5.3.5. PQ _____	100
5.4. Inhibición enzimática _____	101
5.4.1. Inhibición de LOX _____	101
5.4.2. Inhibición de AChE _____	102
5.5. Conclusiones _____	102
5.6. Bibliografía _____	103
6. Estudio sobre aceites esenciales de <i>Salvia lavandulifolia</i> _____	107
6.1. Determinación de la composición mediante CGR-IE/EM _____	107
6.1.1. Composición de AEs de <i>S. lavandulifolia</i> cultivada en Murcia _____	107
6.1.2. Comparativa con AEs de <i>S. lavandulifolia</i> de otras regiones y países _____	112
6.1.3. Comparación con la normativa ISO _____	113
6.2. Cromatografía de gases enantioselectiva-espectrometría de masas _____	114
6.3. Bioactividad antioxidante _____	115
6.3.1. ORAC _____	115
6.3.2. DPPH _____	116
6.3.3. ABTS _____	116
6.3.4. PR _____	116
6.3.5. PQ _____	116
6.4. Inhibición enzimática _____	117
6.4.1. Inhibición de LOX _____	117

6.4.2. Inhibición de AChE _____	118
6.5. Conclusiones _____	118
6.6. Bibliografía _____	119
7. Estudio sobre aceites esenciales de <i>Salvia officinalis</i> _____	121
7.1. Determinación de la composición mediante CGR-IE/EM _____	121
7.1.1. Composición de AEs de <i>S. officinalis</i> cultivada en Murcia _____	121
7.1.2. Comparativa con AEs de <i>S. officinalis</i> de otras regiones y países _____	127
7.1.3. Comparación con la normativa ISO _____	129
7.2. Cromatografía de gases enantioselectiva-espectrometría de masas. _____	130
7.3. Bioactividad antioxidante _____	131
7.3.1. ORAC _____	131
7.3.2. DPPH _____	132
7.3.3. ABTS _____	132
7.3.4. TBARS _____	132
7.3.5. PR _____	132
7.3.6. PQ _____	133
7.4. Inhibición enzimática _____	133
7.4.1. Inhibición de LOX _____	133
7.4.2. Inhibición de AChE _____	134
7.5. Conclusiones _____	135
7.6. Bibliografía _____	136
8. Estudio sobre bioactividad antimicrobiana de AEs de salvias, romeros, mejoranas y tomillos _____	139
8.1. Bioactividad antimicrobiana de AEs de <i>T. mastichina</i> _____	139
8.2. Bioactividad antimicrobiana de AEs de <i>R. officinalis</i> _____	139
8.3. Bioactividad antimicrobiana de AEs de <i>S. lavandulifolia</i> _____	141
8.4. Bioactividad antimicrobiana de AEs de <i>S. officinalis</i> _____	141
8.5. Bioactividad antimicrobiana de AEs de <i>Thymus zygis</i> y <i>Thymus hyemalis</i> _____	142
8.6. Bioactividad antimicrobiana de las biomoléculas presentes en los AEs analizados _____	143
8.7. Conclusiones _____	144
8.8. Bibliografía _____	145
9. Ensayos microbiológicos en frutas y verduras _____	149
9.1. Composición de los AEs utilizados _____	149
9.2. Evolución del pH y de la atmósfera interna _____	149
9.3. Efecto de los AEs en la conservación de las distintas formulaciones. _____	154
9.3.1. Formulación verde _____	154
9.3.2. Formulación blanca _____	155
9.3.3. Formulación naranja _____	156
9.3.4. Formulación roja _____	157
9.3.5. Formulación violeta _____	158
9.4. Conclusiones _____	160
9.5. Bibliografía _____	160
10. CONCLUSIONES _____	165
10.1. Conclusiones _____	165
10.2. Conclusions _____	171
11. Bibliografía _____	179

Summary

The current study shows the detailed compositions of essential oils (EOs) obtained from four Lamiaceae species. These plants were cultivated in the northwest of Murcia, Spain. The EOs were obtained by hydrodistillation. The oil yields of aerial parts were from 0.8 to 2.6%. The volatile compositions were expressed in percentage of total area (relative concentration) and in mM (absolute concentration). Moreover, up to six antioxidant methods were used to determine the antioxidant capacities of the EOs. The inhibitions of two enzymes, lipoxygenase (LOX) and acetylcholinesterase (AChE), and four microorganisms (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*) were also tested. Finally, the preservative capacities of some EOs were investigated using mixtures of fruits and vegetables minimally processed.

The EOs used in this study were: four EOs from *Thymus mastichina* L., four EOs from *R. officinalis* L. biochemotype camphor, two EOs from *R. officinalis* L. biochemotype 1,8-cineole, four EOs from *Salvia lavandulifolia* VAHL and four EOs from *S. officinalis* L. Moreover, the antimicrobial activities of these EOs were compared to that from *Thymus zygis* Loefl. ex L. and *Thymus hyemalis* LANGE EOs, also cultivated and obtained in the Region of Murcia. The antimicrobial activity during elaboration and storage of food products was measured, using EOs from *T. zygis* and *S. officinalis* cultivated in Murcia, together with EOs from *Mentha piperita* L. and *Citrus medica* L. acquired from Flora S.R.L. (Pisa, Italia).

The composition of each EO was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The identification of biomolecules was done using the retention index, the mass spectrum of commercially available pure compounds, and the data available in NIST-08, WILEY-7 and in-lab data bases. To calculate the relative concentration, all peaks were manually integrated. Calibration curves with pure compounds were elaborated, to determine the absolute concentrations of main compounds.

By means of enantioselective gas chromatography, enantiomeric ratios of main chiral biomolecules of EOs were analyzed. The (+) and (-) enantiomers were

identified, comparing the retention time and mass spectrum with pure commercial enantiomers.

Several antioxidant methods were assayed to determine the antioxidant capacity of the EOs and their constituents: ORAC (Ou *et al.*, 2001), DPPH (Brandwilliams *et al.*, 1995), ABTS (Re *et al.*, 1999), TBARS (Dorman *et al.*, 1995), reducing power (Oyaizu, 1986) and chelating power (Miguel *et al.*, 2010).

The inhibitions of two enzymes, which are related to several illnesses, inflammatory process and neurotransmission, were studied. LOX catalyzes the conversion of arachidonic acid or linoleic acid to leukotrienes, which are signals to attract neutrophils, dendritic cells and T-cells and to increase the permeability of close capillaries (Radmark *et al.*, 2015). The overreaction of this enzyme can cause several illnesses, such as cancer, Alzheimer's disease, asthma or arthritis (Chu and Pratico, 2016; Joshi *et al.*, 2015; Kupczyk *et al.*, 2011; Moore and Pidgeon, 2017; Roos *et al.*, 2016; Shimizu, 2009). AChE carries out the breakdown of acetylcholine to choline and acetic acid. Acetylcholine is a neurotransmitter released by the presynaptic neuron. The hydrolysis of this neurotransmitter by acetylcholinesterase, terminates synaptic transmission. The inhibition of this enzyme have high interest to treat Alzheimer's disease (Deshmukh *et al.*, 2016; Farag *et al.*, 2016; Goozee *et al.*, 2016; Hajlaoui *et al.*, 2016; Kuppusamy *et al.*, 2017; Ng *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016).

The growth of spoilage and pathogenic microorganisms is an important problem in food, cosmetic and pharmaceutical industries. The use of synthetic antioxidant and antimicrobial compounds is being reduced due to the high demand for natural ingredients (Burt, 2004). The potential antioxidant and antimicrobial effects of EOs for their use as preservatives have been reported previously (Dorman and Deans, 2000; Gayan *et al.*, 2012; Lanciotti *et al.*, 2004; Patrignani *et al.*, 2015; Vergis *et al.*, 2015).

Thymus mastichina is an endemic species of the Iberian Peninsula, commonly known as Spanish marjoram. Four EOs from *T. mastichina* were studied (AETm-1, AETm-2, AETm-3 and AETm-4). The principal component analysis (PCA) and agglomerative hierarchical clustering (AHC) showed that AETm-1 and AETm-3 are the most similar EOs and AETm-4 the most different one. The main biomolecules of these EOs are α -pinene, β -pinene, 1,8-cineole,

linalool and α -terpineol. Some studies have reported the composition of EOs from *T. mastichina* grown in other regions of Spain (Delgado *et al.*, 2014), or in other countries (Bentes *et al.*, 2009; Miguel *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2007; Miguel *et al.*, 2005; Moldao-Martins *et al.*, 2004; Salgueiro *et al.*, 1997). Great differences in composition can be observed, for example, the presence of thymol and carvacrol (Miguel *et al.*, 2015). The enantiomeric analysis showed that (-)-linalool, (+)- α -terpineol and (+)- α -pinene are the most abundant enantiomers. The antioxidant capacities of all the EOs and their biomolecules were tested. Linalool, linalyl acetate, α -terpinene and γ -terpinene showed high antioxidant activities when they were assayed individually. However, some synergistic or antagonistic effects can happen in the EO. These EOs could inhibit both LOX and AChE activities. Bornyl acetate and limonene showed the strongest LOX inhibition, but linalool could be the responsible for the LOX inhibitory activity of AETm-4, due to its high concentration. Among all the biomolecules tested, 1,8-cineole is the best AChE inhibitor, therefore, AETm-1, -2 and -3 showed higher anticholinesterase activity than AETm-4.

Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) is an aromatic plant widely used in medicinal and culinary arts. The main compounds of the EOs were 1,8-cineole, camphor, α -pinene and camphene, although β -pinene, myrcene, p-cymene, limonene and borneol were also in relative high concentrations. The compositions of EOs from *R. officinalis* grown in several countries have been previously studied, and they vary depending on the genotypes, culture conditions and phenological stages (Jordan *et al.*, 2011; Lakusic *et al.*, 2013; Ojeda-Sana *et al.*, 2013; Salas *et al.*, 2012; Singh and Guleria, 2013; Yesil-Celiktas *et al.*, 2007; Zaouali *et al.*, 2010). The main difference between the two biochemotypes analyzed in this study was the content of camphor and 1,8-cineol. The PCA and AHC analysis showed three clusters: 1 (AERCa-1/AERCa-3/AERCa-2), 2 (AERCa-4) and 3 (AERCi-1/AERCi-2). *R. officinalis* biochemotype camphor had slightly higher amounts of hydrocarbons than oxygenated terpenes, whereas *R. officinalis* biochemotype 1,8-cineol had higher percentage of oxygenated terpenes. Regarding to enantiomeric characterization, α -pinene, terpinen-4-ol and α -terpineol were biomolecules with the predominance of (+)-enantiomer, contrary to what happened with camphene, β -pinene, linalool, bornyl acetate,

borneol and β -caryophyllene. This is the first study which reports the absolute concentration and chiral characterization of volatile compounds of *R. officinalis* EO. Main compounds of these EOs did not show antioxidant capacities when they were tested individually; therefore, the EO antioxidant capacity was due to minor compounds and synergies or antagonisms between them. The slope of the initial linear portion of LOX reaction was reduced with the six *R. officinalis* EOs. 1,8-Cineole is not the best LOX inhibitor, but its high proportion in AERCi may cause higher anti-LOX activity than AERCa. In relation to the inhibition of AChE, most biomolecules did not show inhibitory activity. 1,8-Cineole and 3-carene were strong inhibitors, therefore AERCi showed the highest inhibitory activity.

Spanish sage (*Salvia lavandulifolia* Vahl.) is native to the Iberian Peninsula and spreads from Southeast of Morocco to the Mediterranean area of France. As well as the EOs from other species, its EO can vary depending on genotypic and environmental factors (Ben Farhat *et al.*, 2009; Panagiotopoulos *et al.*, 2000; Santos-Gomes and Fernandes-Ferreira, 2001; Usano-Alemany *et al.*, 2012). The EOs analyzed have α -pinene, camphene, 1,8-cineole and camphor in concentrations higher than 5%. Sabinene, β -pinene, myrcene and limonene showed concentrations higher than 1%. Oxygenated monoterpenes are the predominant volatile group. The PCA and AHC showed that AESI-1, -2 and -4 were the most similar ones. The chiral characterization showed that (+)-enantiomer prevailed in the case of limonene, sabinene hydrate, camphor, terpinen-4-ol, α -terpineol and terpinyl acetate, while the (-)-enantiomer was the most abundant in camphene, β -pinene, linalool, bornyl acetate and β -caryophyllene. The antioxidant capacities of these EOs were moderate, because major compounds did not show high activity in any tested method. However, EOs are complex mixtures of biomolecules, which can interact and produce different results that expect with individual compounds. The results of LOX inhibition were expressed in degree of inhibition (%) at 150 μ g/ml, because higher concentrations produced high turbidity. AESI-4, -2 and -1, the most similar EOs, showed higher LOX inhibitory activity than AESI-3, may be due to their higher concentrations of limonene and linalool. All EOs were able to inhibit AChE activity with similar results between AESI-4, -1, -2, which have similar compositions.

Common or Dalmatian sage (*Salvia officinalis*) is a perennial, evergreen sub-shrub, cultivated in several countries and used in food and medicinal preparations (Baricevic *et al.*, 2001; Ben Farhat *et al.*, 2009; Eidi and Eidi, 2009; Lu and Yeap Foo, 2001; Piccaglia, 1998). Their EOs are of interest due to their cytotoxic, antimutagenic and anti-inflammatory effects, among others (Bouaziz *et al.*, 2009; Ehrnhoefer-Ressler *et al.*, 2013; Loizzo *et al.*, 2007; Longaray Delamare *et al.*, 2007). Main biomolecules of these EOs were α -thujone, camphor, β -thujone and 1,8-cineole. Also, α -humulene, α -pinene, camphene and limonene were biomolecules in relative high concentrations in all the EOs from *S. officinalis*. The PCA using three principal components showed that AESo-2 and -4 were the most similar ones. The loading plots were used to establish the reason of these differences between the EOs, in relation to relative composition. The AHC showed three clusters: 1 (AESo-2/AESo-4), 2 (AESo-3) and 3 (AESo-1). There are studies carried out in other regions of Spain (Arraiza *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2012) and in other countries (Abu-Darwish *et al.*, 2013; Baj *et al.*, 2013; Bernotiene *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2007; Porte *et al.*, 2013; Radulescu *et al.*, 2004; Santos-Gomes and Fernandes-Ferreira, 2001; Verma *et al.*, 2015), which detail the relative composition variability of EOs from *S. officinalis*. The chiral analysis showed that (+)-enantiomer was the predominant in the case of camphor, bornyl acetate and borneol, while the (-)-enantiomer was the most abundant for camphene, β -pinene, α -phellandrene, α -thujone, linalool and β -caryophyllene. The enantiomeric distributions of other biomolecules were different between the EOs; therefore, they can be used as biomolecular markers. All *S. officinalis* EOs showed antioxidant activity, being AESo-1 the EO with the highest antioxidant capacity in ORAC, DPPH, ABTS and TBARS methods, mainly due to linalool, α -terpinene, γ -terpinene, β -caryophyllene and α -humulene. α -Thujone may have influenced in the results of chelating power method. The degree of LOX inhibition using 150 μ g/ml of EOs were between 42 to 53%. Although α -thujone was not the best inhibitor, its high concentration in AESo-4 and -2 could be the responsible for the results obtained. AESo-3 and -1 exhibited the highest anticholinesterase activities. The results showed that higher concentration of 1,8-cineole, higher anticholinesterase activity, because it is very effective and abundant.

The antimicrobial activities of all EOs were measured using the microdilution method (CLSI, 2008, 2015). Generally, Gram-negative bacteria are more resistant than Gram-positive bacteria, because the outer membrane of Gram-negative bacteria acts as barrier against macromolecules and hydrophobic compounds (Bozin *et al.*, 2007). *P. aeruginosa* could not be inhibited by the EOs at the highest tested concentration. *T. mastichina* EOs were the most effective against *E. coli* and *C. albicans*, and *S. officinalis* EOs were the best inhibitors of the growth of *S. aureus*. Moreover, the antimicrobial effects of EOs from *T. zygis* and *T. hyemalis* were tested to compare the results with those from the previous species described. All species belong to the Lamiaceae family, but they have totally different compositions (Carrasco, 2015). The lowest minimum inhibitory concentrations and minimum bactericidal or fungicidal concentrations were shown by *T. zygis* EOs, mainly due to their high concentrations of thymol.

Food industries are looking for natural preservatives, because synthetic preservatives are being refused by consumers. In particular, the use of chlorinated water could not eliminate some microorganisms, due to the development of pathogen resistances, and also, it could produce safety hazards (Lopez-Galvez *et al.*, 2009). EOs have been investigated to preserve food products (Burt, 2004; Lanciotti *et al.*, 2004; Patrignani *et al.*, 2015). In this study we compared the shelf-life of fruit and vegetable mixtures washed with chlorinated water, or water with a mixture of EOs (EOs from *Citrus medica*, *Mentha piperita*, *Salvia officinalis* and *Thymus zygis*). Two formulations would need an optimization step, but three of five formulations could be preserved, with the concentration and mixture of EOs used in this study, obtaining the same or higher shelf-life than using chlorinated water. These results are interesting because they show that some food products could be conserved with the use of EO mixtures, without changing the organoleptic properties of final products.

To conclude, the studies carried out during this PhD Thesis deepen the knowledge about EOs obtained from plants grown in Murcia. They have potential applicability as natural antioxidants, enzyme inhibitors and antimicrobials in food, cosmetic and pharmaceutical industries.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Plantas aromáticas como fuente de aceites esenciales

Las plantas aromáticas producen mezclas de monoterpenoides y sesquiterpenoides volátiles (terpenos hidrocarbonados u oxigenados), llamadas aceites esenciales (AEs). Estos metabolitos secundarios son producidos en diversas partes de la planta (semillas, flores, frutos, raíces, hojas y corteza). La composición de los AEs dependerá de la planta de origen (factores genéticos) y de factores exógenos como el clima, el tipo de suelo y las técnicas de cultivo. Los AEs cumplen diversas funciones en la naturaleza como son, la atracción de insectos polinizadores, efectos antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y herbicidas (Bakkali *et al.*, 2008; Miguel, 2010). Algunos metabolitos como el ácido abscísico, giberelinas, esteroides, carotenoides y sus derivados, son también biomoléculas del grupo de los terpenos con gran importancia biológica en las plantas.

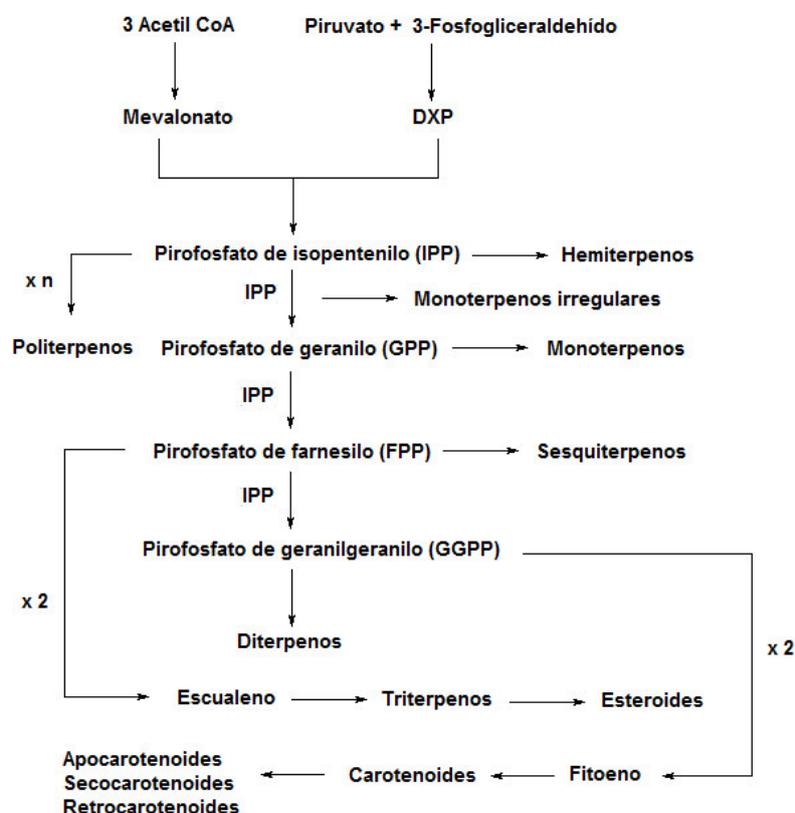


Figura 1.1. Ruta de biosíntesis de terpenos a partir de Acetil CoA, piruvato y 3-fosfogliceraldehído (Imagen libre de copyright: commons.wikimedia.org).

Los terpenos (Figura 1.1) se forman a partir de acetil coenzima-A por la ruta del ácido mevalónico, o a partir de piruvato y 3-fosfogliceraldehído a través de la ruta de la 5-fosfono-1-desoxi-D-xilulosa. Mediante estas dos vías se forman unidades de pirofosfato de isopentenilo y su isómero, el pirofosfato de dimetilalilo. Los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos están formados por la unión de dos, tres y cuatro moléculas de isopreno, respectivamente (Sadgrove and Jones, 2015).

La formación de AEs en las plantas es muy variada y suele realizarse en estructuras especializadas, como son los tricomas glandulares o las cavidades secretoras en las hojas (Figura 1.2).

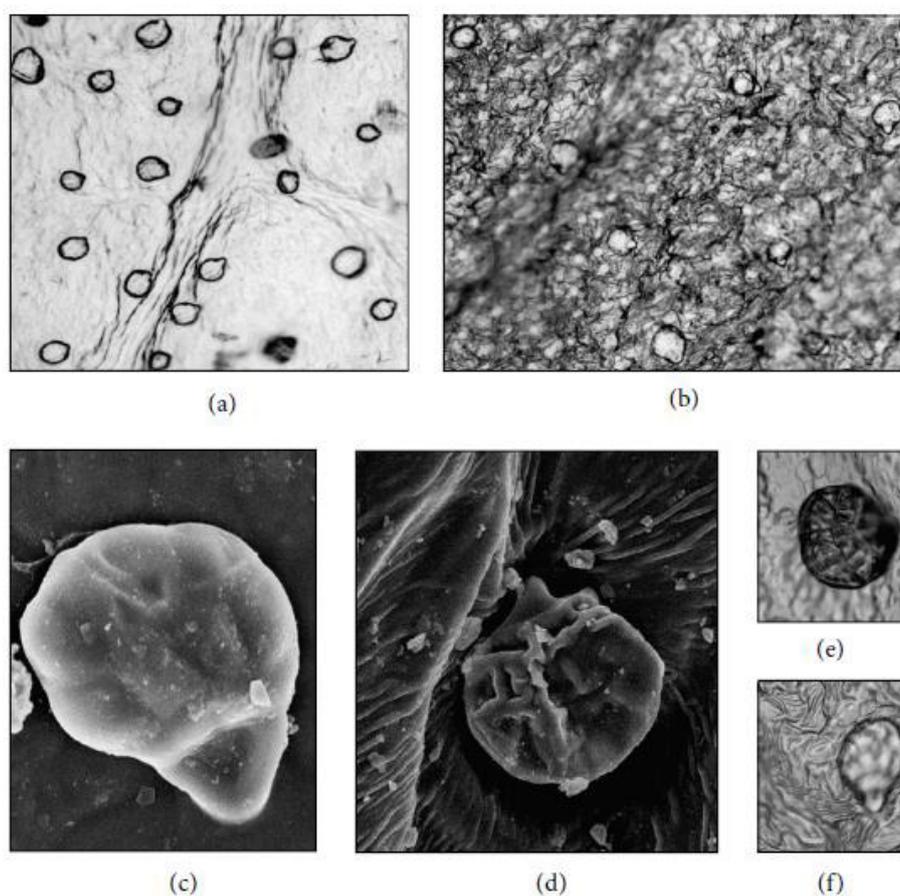


Figura 1.2. AE en tricomas glandulares (Odimegwu *et al.*, 2013).

La extracción de los AEs se puede realizar mediante diferentes técnicas (Waseem and Low, 2015). La hidrodestilación es un proceso en el cual el agua está permanentemente en contacto con el material vegetal, provocando su fragmentación por choque osmótico. El calentamiento del agua permite además que el vapor penetre en los tejidos de la planta y rompa, aún más, las estructuras

glandulares que contienen los AEs. El vapor de agua y el AE evaporado llegan a un condensador, donde pasarán a estado líquido, siendo posteriormente recogidos en un separador de fases o vaso florentino. El AE, por su menor densidad que el agua, queda en la parte superior, pudiendo ser entonces separadas la fracción oleosa (AE) de la acuosa (hidrolato o agua floral). La hidrodestilación es la técnica más utilizada para la extracción de AEs a escala de laboratorio, y a escala industrial para AEs de semillas de plantas aromáticas (Figura 1.3). La destilación por arrastre con vapor utiliza vapor de agua como elemento penetrante en la materia vegetal. En este caso, el material vegetal se coloca sobre una malla a cierta distancia del agua, que se encuentra en el fondo del destilador o en una caldera previa. Tras el calentamiento del agua se genera vapor de agua que atravesará el material vegetal, extrayendo el AE. Al igual que en la hidrodestilación, el vapor de agua y el AE se condensan y se separan por diferencias de densidad. Este método es el más utilizado a escala industrial, puesto que permite procesar toneladas de plantas aromáticas en un mismo ciclo de extracción. La extracción con fluido supercrítico emplea dióxido de carbono (CO_2) en condiciones de alta presión (> 70 bar) y temperatura ($\geq 40^\circ\text{C}$), provocando que este gas se encuentre en estado supercrítico, en el cual tiene propiedades físicas intermedias entre un gas y un líquido. Con la modulación de la presión se generan diferentes densidades, que pueden ser utilizadas para una extracción eficaz del AE. Este método es muy costoso en instrumentación y mantenimiento y es de aplicabilidad limitada a AEs altamente hidrofóbicos, debido a la apolaridad del CO_2 . Otros métodos de obtención de AEs emplean microondas y ultrasonidos para el calentamiento y la extracción de AEs, en los disolventes utilizados, que posteriormente deben evaporarse antes que el propio AE. Son métodos sencillos, rápidos y con altos rendimientos en procesos optimizados, a escala de laboratorio (Xu *et al.*, 2017). En estos estudios, la hidrodestilación fue el método empleado para la obtención de los AEs.

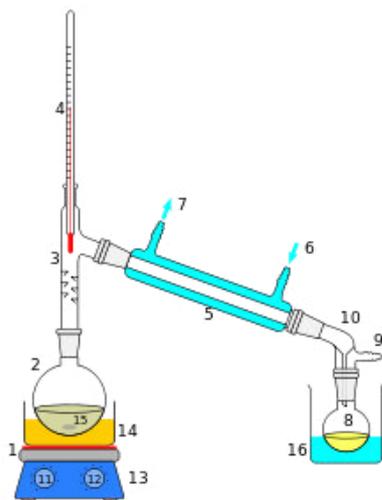


Figura 1.3. Hidroddestilación. 1, fuente de calor; 2, destilador o alambique; 3, parte superior del destilador; 4, termómetro; 5, condensador; 6 y 7, conductos de entrada y salida del líquido refrigerante; 8, matraz de recogida; 9, entrada para bomba de vacío; 10, receptor del destilado; 11, 12 y 13, placa calefactora/agitadora con dos controles; 14, baño calefactor; 15, agua y material vegetal; 16, baño refrigerante.

Desde tiempos remotos, se ha descrito la utilización de plantas aromáticas o bien de sus extractos o AEs, por sus características aromáticas y medicinales. En la actualidad, el interés por conocer y mejorar la aplicabilidad de los AEs en múltiples industrias, está siendo cada vez más elevado, ya que existe un rechazo generalizado al uso de compuestos sintéticos. Múltiples investigaciones se están llevando a cabo para aumentar el rendimiento de obtención de los AEs, seleccionando los mejores cultivares, bioquimiotipos y ecotipos, además de intentar aumentar la producción de AE mediante modificaciones fisiológicas (Sangwan *et al.*, 2001).

Los AEs tienen propiedades medicinales (Gautam *et al.*, 2014; Horvath and Acs, 2015; Maggio *et al.*, 2016), antimicrobianas (Lang and Buchbauer, 2012; Pandey *et al.*, 2017; Seow *et al.*, 2014), antioxidantes (Amorati *et al.*, 2013; Miguel, 2010), repelentes de insectos y artrópodos (Isman, 2000; Nerio *et al.*, 2010), así como aromatizantes y conservantes en industrias cosméticas (Carvalho *et al.*, 2016; Forlot and Pevet, 2012; Ghayempour and Montazer, 2016; Herman *et al.*, 2013) y alimentarias (Cabarkapa *et al.*, 2016; de Souza *et al.*, 2016; Jayasena and Jo, 2014; Sivakumar and Bautista-Banos, 2014; Vergis *et al.*, 2015).

En estos estudios analizaremos la composición detallada y las bioactividades antioxidantes, inhibidoras de enzimas y antimicrobianas, que muestran cuatro especies de la familia de las labiadas, como son la mejorana española, el romero, la salvia española y la salvia común, cultivadas en el noroeste de Murcia, una de las regiones de España con mayor biodiversidad en plantas aromáticas y medicinales.

1.1.1. Mejorana española (*Thymus mastichina* L.)

T. mastichina es una labiada endémica de la península ibérica, conocida comúnmente como mejorana española. Tiene hojas pequeñas, simples y opuestas, y flores blancas zigomorfas bilabiadas formando glomérulos. Su cáliz contiene cilios que le proporcionan un aspecto plumoso (Figura 1.4). Esta especie crece generalmente sobre suelos silíceos o calizos.

Existen dos subespecies de *T. mastichina*: subespecie *mastichina*, caracterizada por poseer un cáliz de más de 5 mm e inflorescencias de más de 10 mm de diámetro y la subespecie *donyanae* R. Morales, con cáliz e inflorescencias de menor tamaño. Esta última subespecie sólo se encuentra en Huelva, Sevilla (Suroeste de España) y el Algarve (Sur de Portugal) (Morales, 2010).



Figura 1.4. Imágenes del arbusto de *T. mastichina* (Real jardín botánico: <http://www.floraiberica.es>) y la inflorescencia (Imagen libre de copyright: commons.wikimedia.org).

La composición química del AE de esta especie, expresada en concentración relativa, ha sido estudiada previamente en Castilla y León (España) (Delgado *et al.*, 2014) y en Portugal (Bentes *et al.*, 2009; Fraternali *et*

al., 2003; Galego *et al.*, 2008; Miguel *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2007; Miguel *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2015; Moldao-Martins *et al.*, 2004; Salgueiro *et al.*, 1997). Estos estudios indican que la biomolécula mayoritaria en estos AEs es el 1,8-cineol o el linalol, resaltando la existencia de dos bioquimiotipos.

1.1.2. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

El romero también pertenece a la familia de las labiadas. Es un arbusto leñoso que crece en el área Mediterránea, con hojas perennes, pequeñas y abundantes. Las flores (aproximadamente 5 mm de largo) tienen una corola bilabiada de color rosa, blanco o ligeramente violeta (Figura 1.5). Crece en todo tipo de suelos, sobre todo en los arenosos y permeables.

Es una planta aromática ampliamente usada en medicina, cosmética y alimentación. Es una de las plantas más importantes económicamente, ya que es cultivada en todo el mundo por sus múltiples aplicaciones. Tanto la hoja fresca, como la hoja seca, se utilizan como aromatizantes o para la elaboración de té. Además, los extractos de estas plantas poseen altas capacidades antioxidantes, que pueden ser utilizadas para la conservación de alimentos (Habtemariam, 2016).



Figura 1.5. Imágenes del arbusto de *R. officinalis* (Imagen libre de copyright: commons.wikimedia.org) y la flor (Real jardín botánico: www.anthos.es).

En concreto, el AE de esta planta tiene diversas aplicaciones terapéuticas (Hanson, 2016; Ribeiro-Santos *et al.*, 2015). Algunas de ellas son: antitumoral (Wang *et al.*, 2012), anti-inflamatorio (de Melo *et al.*, 2011), antioxidante (Ozogul *et al.*, 2017; Sirocchi *et al.*, 2017), potenciador de la memoria (Ben Jemia *et al.*, 2015) y antimicrobiano (Barbosa *et al.*, 2016; Bogavac *et al.*, 2017).

La composición del AE presenta variaciones dependiendo del genotipo (Ojeda-Sana *et al.*, 2013; Zaouali *et al.*, 2010), pero también de las condiciones de cultivo (Jordan *et al.*, 2011) y del desarrollo fenológico de la planta (Lakusic *et al.*, 2013; Salas *et al.*, 2012; Singh and Guleria, 2013; Yesil-Celiktas *et al.*, 2007). En este estudio hemos analizado la composición y las bioactividades de dos bioquimiotipos de romero, el bioquimiotipo alcanfor y el 1,8-cineol, de origen español y marroquí, respectivamente.

1.1.3. Salvia española (*Salvia lavandulifolia* VAHL)

Esta especie pertenece también a la familia de las labiadas. Es nativa de la península ibérica y se encuentra distribuida desde el sureste de Marruecos hasta la región mediterránea de Francia. Es un arbusto leñoso, perenne, que puede medir desde 17 a 100 cm de altura, con hojas pecioladas con forma elíptica o lanceolada, y flores de color ligeramente violeta situadas en grandes inflorescencias (Figura 1.6). Suele crecer en suelos rocosos.



Figura 1.6. Imágenes del arbusto de *S. lavandulifolia* (Imagen libre de copyright: commons.wikimedia.org) y la flor (Real jardín botánico: www.anthos.es).

El AE obtenido a partir de esta planta presenta numerosas aplicaciones como potenciador de la memoria, por lo que podría ser útil en el tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer (Kennedy *et al.*, 2011; Perry *et al.*, 2003; Savelev *et al.*, 2003; Tildesley *et al.*, 2003). Además, este AE ha sido descrito como espasmolítico (Crespo *et al.*, 1986), estrogénico (Perry *et al.*, 2001) y antimicrobiano (Jirovetz *et al.*, 2006).

Algunos estudios previos han determinado la composición de los AEs de esta especie a nivel de concentración relativa, obtenidos a partir de plantas cultivadas en otras regiones de España (Herraiz-Penalver *et al.*, 2010; Perry *et al.*, 2003; Porres-Martinez *et al.*, 2013; Porres-Martinez *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2012; Usano-Alemanly *et al.*, 2014) y en otros países, como Polonia (Sajewicz *et al.*, 2009), Alemania (Jirovetz *et al.*, 2006) y Brasil (Mossi *et al.*, 2011; Pierozan *et al.*, 2009).

1.1.4. Salvia común o dalmata (*Salvia officinalis* L.)

La salvia dalmata es una planta leñosa, perenne, de hasta 70 cm de altura. Las hojas son pecioladas, oblongas y ovales. Las flores son blancas o violáceas, con el labio superior de la corola plano. Las flores se encuentran agrupadas en espigas terminales (Figura 1.7). Suele crecer en terrenos rocosos y secos.

Esta planta es utilizada como ingrediente alimentario desde hace mucho tiempo (Piccaglia, 1998). Además, tiene propiedades medicinales como antioxidante (Ben Farhat *et al.*, 2009; Lu and Yeap Foo, 2001), anti-inflamatorio (Baricevic *et al.*, 2001) y antidiabético (Eidi and Eidi, 2009), entre otras.



Figura 1.7. Imágenes del arbusto y la flor de *S. officinalis* (Imágenes libres de copyright: commons.wikimedia.org).

El AE de esta especie es utilizado en la fabricación de perfumes y como terapia natural debido a sus efectos antibacterianos, fungicidas, citotóxicos y antimutagénicos (Bouaziz *et al.*, 2009; Longaray Delamare *et al.*, 2007). Además, existen estudios previos en la literatura que demuestran la capacidad

anticancerígena (Loizzo *et al.*, 2007), anti-inflamatoria (Ehrnhoefer-Ressler *et al.*, 2013) y anti-Alzheimer (Perry *et al.*, 1999a) de estos productos naturales.

Existen varios estudios que muestran las composiciones relativas de AEs de *S. officinalis* de otras regiones de España (Arraiza *et al.*, 2012; Mates *et al.*, 2011) y de otros países como Italia (Marino *et al.*, 2001), Hungría (Boszormenyi *et al.*, 2009), Lituania (Bernotiene *et al.*, 2007), Túnez (Hayouni *et al.*, 2008), Jordania (Abu-Darwish *et al.*, 2013), Irán (Mirjalili *et al.*, 2006), India (Raina *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2015), Brasil (Pierozan *et al.*, 2009) y Nueva Zelanda (Perry *et al.*, 1999b). Las diferencias en la composición están determinadas por factores genéticos y ambientales (Bernotiene *et al.*, 2007; Maksimovic *et al.*, 2007; Mirjalili *et al.*, 2006; Perry *et al.*, 1999b).

1.1.5. Otros AEs

Durante este estudio, se han utilizado otros AEs a nivel comparativo para los ensayos antimicrobianos *in vitro* y aplicados a alimentos.

El tomillo rojo (*Thymus zygis* Loefl. ex L.) es una planta endémica de la península ibérica (Jordan *et al.*, 2009) perteneciente a la familia de las labiadas. Esta planta es perenne, leñosa, mide entre 10 y 20 cm de altura, con hojas lineares de hasta 7 cm de largo y flores blancas en verticilos (Figura 1.8). Crece en todo tipo de sustratos, siempre en lugares abiertos y no encharcados. La composición de su AE puede variar dependiendo del origen y de los factores climáticos (Blanco Salas *et al.*, 2012; Perez-Sanchez *et al.*, 2012; Saez, 1995).



Figura 1.8. Imágenes del arbusto de *T. zygis* (Real jardín botánico: www.anthos.es)

El tomillo de invierno (*Thymus hyemalis* LANGE) es un pequeño arbusto con hojas lineares o lanceoladas, opuestas y con cilios en la base inferior. Flores violáceas con el labio inferior tridentado y el

superior ligeramente escotado (Figura 1.9). Crece en terrenos pedregosos y secos, y es endémica de las provincias de Alicante, Murcia, Granada y Almería. La variabilidad en la composición de estos AEs ha sido previamente descrita (Jordan *et al.*, 2006; Loayza-Davila *et al.*, 2010; Rota *et al.*, 2008; Tepe *et al.*, 2011).



Figura 1.9. Imágenes del arbusto de *T. hyemalis* (Real jardín botánico: www.anthos.es)

La menta piperita (*Mentha piperita* L.) también es una planta perteneciente a la familia



Figura 1.10. Imágenes del arbusto de *Mentha piperita* (www.botanical-online.com)

de las labiadas, perenne, de hasta 90 cm de altura, muy ramificada y con tallos de sección cuadrangular. Es un híbrido entre la menta acuática (*Mentha aquatica*) y la hierbabuena (*Mentha spicata*). Sus hojas son pecioladas, ovaladas, con los bordes dentados. Las flores son terminales, agrupadas en verticilos, con la corola de unos 5 cm de un color rosa violáceo (Figura 1.10). Esta planta crece en una gran variedad de ambientes, en suelos húmedos no encharcados. Las condiciones del cultivo afectan a la composición de su AE (Mousavinik *et al.*, 2016).

Varios estudios han descrito la composición del AE obtenido a partir de esta planta, y las actividades antimicrobianas *in vitro* o aplicadas a ciertos alimentos (Guedes *et al.*, 2016; Smaoui *et al.*, 2016; Valente *et al.*, 2016).

El citrón (*Citrus medica* L.) pertenece a la familia de las rutáceas. Esta especie ha sido cultivada desde la antigüedad y se encuentra ampliamente extendida. Es un árbol pequeño o arbusto, perenne, con hojas pecioladas, alternas, elípticas o lanceoladas, con espinas en las axilas foliares. Las flores son blancas o violáceas con 4 o 5 pétalos y organizadas en pequeños racimos (Figura



Figura 1.11. Imágenes del árbol de *Citrus medica* (Imagen libre de copyright: commons.wikimedia.org)

1.11). La corteza de los frutos tiene un gran interés debido su alto contenido en AE, el cual se obtiene mediante prensado en frío, como en otras frutas cítricas. Al igual que ocurre en el resto de especies mencionadas anteriormente, existe variedad en la composición de su AE (Luro *et al.*, 2012; Luro *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2013). Se ha descrito que este AE posee cualidades como anti-inflamatorio, citotóxico, antioxidante, antimicrobiano e inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, entre otras (Aliberti *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013; Menichini *et al.*, 2009; Nardoni *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2013).

1.2. Cromatografía de gases (CG)

1.2.1. Conceptos generales

La CG, acoplada a un detector de ionización de llama o de espectrometría de masas (EM), es la técnica más utilizada para la determinación de los componentes volátiles en mezclas complejas, como es el caso de los AEs. La CG se basa en la separación de los componentes de una mezcla según sus puntos de ebullición y la afinidad que presenten por la fase estacionaria. Para obtener una óptima separación de los compuestos, varios factores han de tenerse en cuenta: la naturaleza de la fase móvil utilizada, la velocidad de flujo de la misma, las características de la columna cromatográfica, el tipo de inyección y el programa de temperaturas del horno.

Las fases móviles comúnmente utilizadas en la CG son tres, N_2 , He o H_2 , de alta pureza, sin trazas de O_2 y H_2O . Para la elección de la fase móvil más adecuada hay que tener en cuenta las curvas de Van Deemter, que muestran la relación entre la altura de placa teórica y la velocidad de flujo de la fase móvil (Figura 1.12). El N_2 muestra el óptimo de separación a bajas velocidades de flujo, lo que determinaría que, para conseguir una buena separación, el tiempo de cromatograma debe ser largo. Además, si la cromatografía se realiza con columnas capilares, el frente de N_2 que se genera presenta una forma parabólica debido a su gran tamaño molecular, lo que disminuye aún más su resolución. Entre las dos fases móviles restantes, la más comúnmente utilizada ha sido el He por ser más inerte y aportar una buena resolución y seguridad en el manejo. Sin embargo, el precio del He está en aumento debido al agotamiento progresivo de las fuentes de obtención. El H_2 aporta mejores capacidades resolutivas que el He a velocidades altas y, por tanto, su utilización, empleando las precauciones necesarias, es recomendada para la realización de cromatografías de gases rápidas (CGR) con columnas capilares.

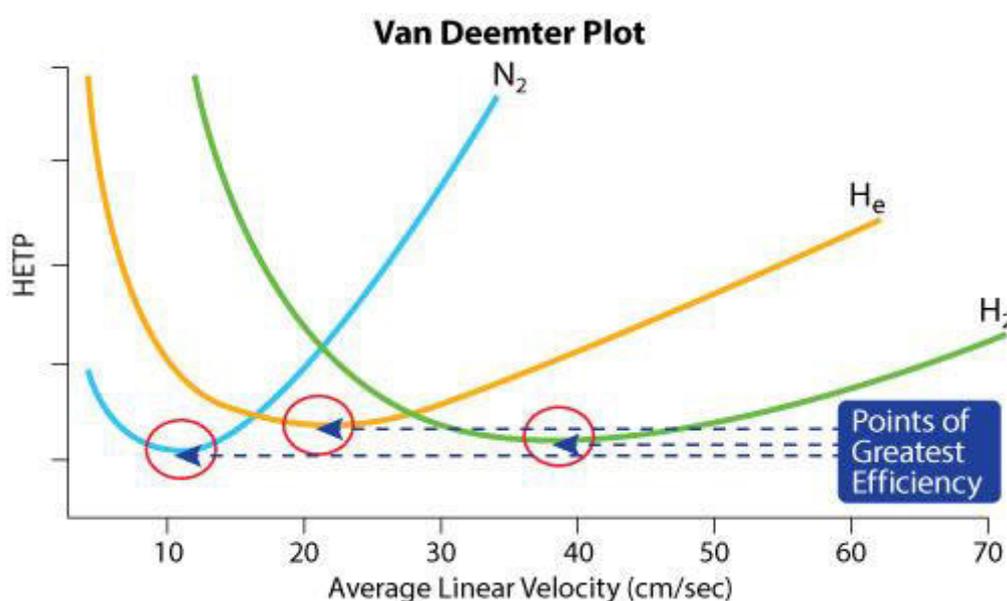


Figura 1.12. Curvas de Van Deemter (www.restek.com).

Si se selecciona H_2 como fase móvil, éste puede ser comprado y almacenado en balas con H_2 a alta presión, siendo peligroso su almacenamiento o posibles fugas, ya que se trata de un gas explosivo. La generación de H_2 a demanda mediante la electrólisis de H_2O supone una mayor seguridad en el uso de esta fase móvil, ya que el H_2 no se almacena en grandes cantidades, sino

que se genera de forma continua con alta pureza. Además, el generador es capaz de dejar de producir H_2 si el cromatógrafo detecta que hay una bajada de presión en la cabeza de columna, síntoma de que existe alguna fuga.

La velocidad del flujo de la fase móvil va a depender de las dimensiones de la columna utilizada (a menor diámetro de la columna, mayor contrapresión). Con la utilización de columnas capilares, H_2 como fase móvil y altas velocidades de flujo (sin superar el límite máximo de presión soportada por la columna), obtendremos cromatogramas con buena resolución en poco tiempo.

Para la CG, existen diferentes tipos de columnas y distintas fases estacionarias dentro de las mismas. Dependiendo de la finalidad de cada análisis y del tipo de muestra a analizar, será más apropiado utilizar una columna u otra. Las columnas empaquetadas son aquellas que poseen un diámetro entre 2 y 5 mm y se encuentran rellenas con la fase estacionaria líquida. En cambio, las columnas capilares tienen diámetros entre 0.1 y 0.5 mm, estando huecas con la fase estacionaria adherida a la pared de la columna, cuyos espesores miden entre 0.1 y 0.5 μm . Las columnas empaquetadas permiten la inyección de una mayor cantidad de muestra, pero la fase estacionaria, al ocupar todo el interior de la columna, ofrece altas resistencias al paso de la fase móvil que se traducen en altas presiones. En cambio, las columnas capilares, a pesar de su menor diámetro, permiten una mejor difusión del gas en su interior, por lo que se puede aumentar la longitud de la columna (10-60 m), sin generar presiones excesivamente altas. En la actualidad, las columnas capilares son las más comunes ya que permiten obtener cromatogramas muy resolutivos en menos tiempo.

Existen varios tipos de fases estacionarias, siendo la más común la formada por polisiloxanos, columnas apolares con alta estabilidad térmica y variabilidad estructural. Las columnas con polietilenglicoles como fase estacionaria, son columnas polares, con menor estabilidad térmica que las anteriores, pero mejor resolución para la separación de compuestos polares. Otro tipo de fase estacionaria es la formada por derivados de ciclodextrinas, detallada más adelante.

Existen distintos tipos de inyección de muestra. La inyección en columnas empaquetadas se realiza mediante una jeringa que depositará un volumen de

muestra determinado en el puerto de inyección. En esta cámara, que se encuentra a alta temperatura, la muestra será vaporizada y arrastrada por el flujo de fase móvil hacia la cabeza de columna. En el caso de columnas capilares, el volumen de muestra que entra en la columna es mucho menor, por lo que a menudo se requieren sistemas que permitan la entrada a la columna de una parte del volumen inyectado. Este tipo de inyección se denomina inyección con división o *split*. En ellas el flujo de gas portador que entra en la cámara de mezcla y la muestra vaporizada se dividen en dos, una parte que será introducida a la columna y otra que se evacúa (Figura 1.13). La relación de *split* puede ser modificada, así, un *split* 100:1 pasará a la columna un 1% del total de muestra inyectada. Este tipo de inyecciones permite hacer “diluciones” de la muestra *in situ*, sin necesidad de utilizar una gran cantidad de disolvente que podría enmascarar los compuestos con alta volatilidad. El inconveniente de estas inyecciones es que el límite de detección aumenta, por lo que no es recomendada para la detección de trazas.

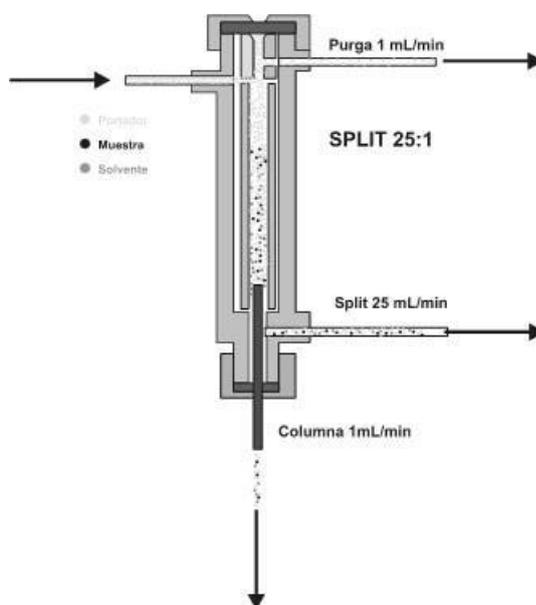


Figura 1.13. Inyección *split* 25:1. Imagen de Cromlab SL Blog de Cromatografía.

Este tipo de inyector permite realizar también inyecciones *splitless* y *on-column*. En ambos casos, toda la muestra será introducida en la columna, pero en el primer caso, es el gas portador el que arrastra la muestra hacia la columna, y en el segundo caso, la jeringa inyecta la muestra en la cabeza de columna directamente. Para la inyección *on-column*, la columna debe tener mayor diámetro interno, lo cual conlleva menor resolución.

Existen otro tipo de inyecciones utilizadas cuando la muestra a analizar se encuentra en estado gaseoso, como son las válvulas de inyección de gases, la inyección de espacio de cabeza o la microextracción en fase sólida. Estas técnicas permiten el análisis de los compuestos volátiles presentes en las muestras sin utilizar disolventes y sin el riesgo de ensuciar el inyector o la propia columna con compuestos no volátiles.

Tanto las temperaturas del inyector, de la columna y de la interfase que conecta con el detector, deben ser seleccionadas dependiendo de la muestra a analizar. En las especificaciones de cada columna se detallan los máximos de presión y temperatura que es capaz de soportar. Además, también hay que tener en cuenta la termoestabilidad de las muestras a analizar. La temperatura inicial del horno será de unos 20°C menos que la temperatura de ebullición de la molécula más volátil de la muestra, que generalmente será el disolvente utilizado para la dilución. La selección del programa de temperaturas óptimo, para conseguir la mejor separación de los compuestos en el menor tiempo posible de cromatograma, se debe realizar mediante varios ensayos, modificando las velocidades de subida de temperatura hasta alcanzar una buena resolución de todos los compuestos, habitualmente con gradientes térmicos escalonados.

En cuanto a la detección, existen distintos tipos de detectores que pueden ser acoplados a un cromatógrafo de gases, como son los detectores de ionización de llama, espectrometría de masas, conductividad térmica, termoiónico de llama, captura de electrones y emisión atómica, entre otros. El detector de ionización de llama ha sido el más ampliamente utilizado debido a la versatilidad, la alta sensibilidad y el gran intervalo de respuesta que muestra. Las desventajas son que la muestra es destruida tras su paso por el detector, y que no aporta información estructural sobre los compuestos detectados.

En estos estudios, el detector utilizado fue un detector de espectrometría de masas (DEM), con ionización por impacto electrónico y analizador de cuadrupolo simple (Figura 1.14). La ionización se realiza a 70 eV, energía que producirá fragmentos de los compuestos con distinta relación m/z que serán canalizados y separados mediante un analizador de cuadrupolo de cuarzo monolítico hiperbólico recubierto de oro. Para detectar los iones se utiliza un multiplicador de electrones, basado en la producción de una cascada de

electrones, que será desencadenada cuando un determinado ión impacte en el detector. El DEM tiene que encontrarse en todo momento en condiciones de alto vacío (aproximadamente 10^{-5} Torr). Además, para alargar su vida útil, éste no se enciende al inicio del cromatograma, sino tras un tiempo de retardo, que evitará su saturación por el disolvente que estemos utilizando, antes de iniciar el programa de temperaturas.

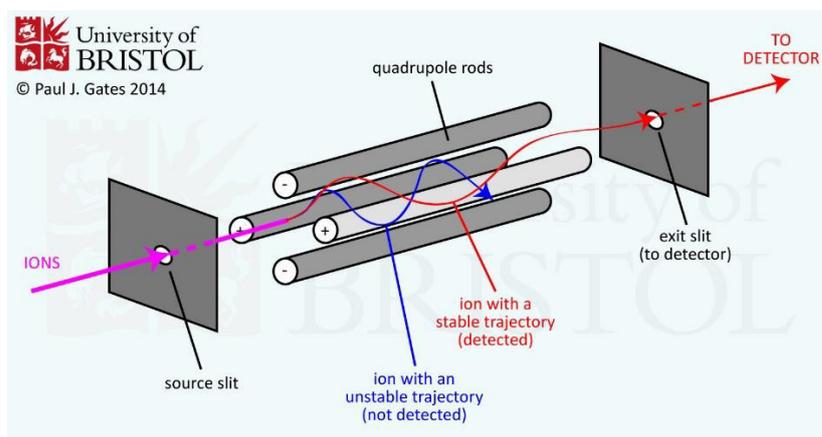


Figura 1.14. DEM con cuadrupolo simple (imagen de la escuela de química de la Universidad de Bristol: <http://www.chm.bris.ac.uk>).

Dependiendo de los compuestos a analizar se selecciona el intervalo de masas que queremos detectar. Cuanto mayor sea el intervalo, menor número de barridos de masa por segundo serán registrados. Para poder realizar un análisis cualitativo de los compuestos detectados en el cromatograma, se requiere un mínimo de 10 barridos en el pico más estrecho, y para cuantificar es necesario un mínimo 15 barridos.

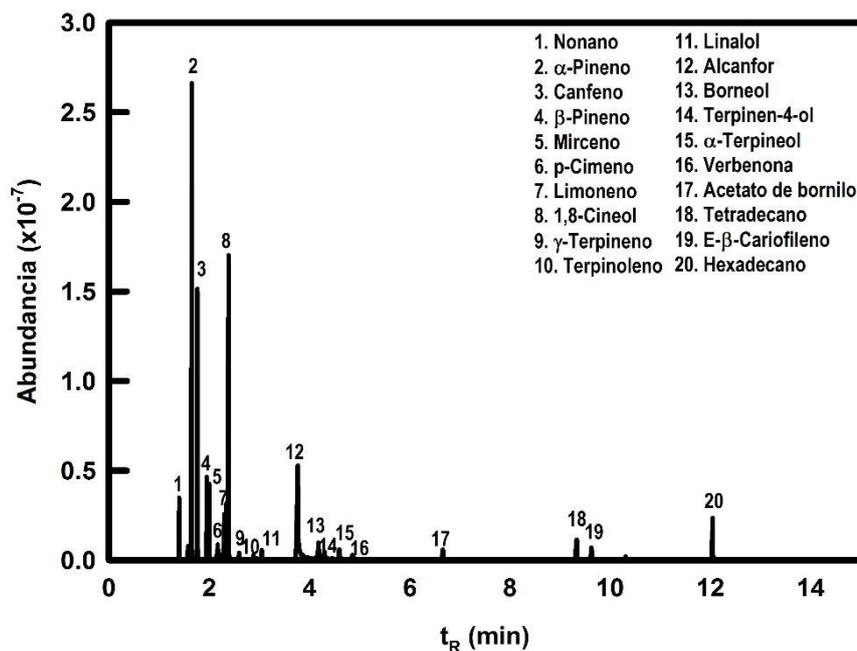


Figura 1.15. Cromatograma de *R. officinalis* con las principales biomoléculas identificadas.

La identificación de los compuestos se realiza mediante la comparación de los índices de retención lineal (IRL) de las biomoléculas a identificar, respecto a los de patrones comerciales y los disponibles en las bases de datos NIST-08, WILEY-7 y la elaborada en el laboratorio (Figura 1.15). El IRL se calcula por comparación con los tiempos de retención de una serie comercial de n-alcenos homólogos, siguiendo las recomendaciones de la IUPAC (IUPAC, 1997). Este IRL permite la comparación con los IRL obtenidos con otras columnas de polaridad similar. Se calcula mediante la Ecuación 1.1:

$$I = 100 \cdot \left[\frac{t_{Ri} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} + z \right] \quad (1.1)$$

donde t_{Ri} es el tiempo de retención del compuesto sin identificar (i), t_{Rz} y $t_{R(z+1)}$ son los tiempos de retención del alcano que eluye antes y después de i , respectivamente, y z es el número de carbonos del alcano anterior a la elución de i .

Debido a que la detección se realiza mediante un DEM, el detector proporciona los espectros masas de cada compuesto, pudiendo ser comparados con los espectros de las bases de datos NIST-08, WILEY-7, y la elaborada en el laboratorio mediante la inyección de patrones comerciales. Los datos de comparación y porcentajes de semejanza son proporcionados por el programa

NIST MS Search 2.0 (NIST, Gaithersburg, MD). En la Figura 1.16 se muestran superpuestos los espectros de masas del alcanfor comercial y del identificado en los AEs.

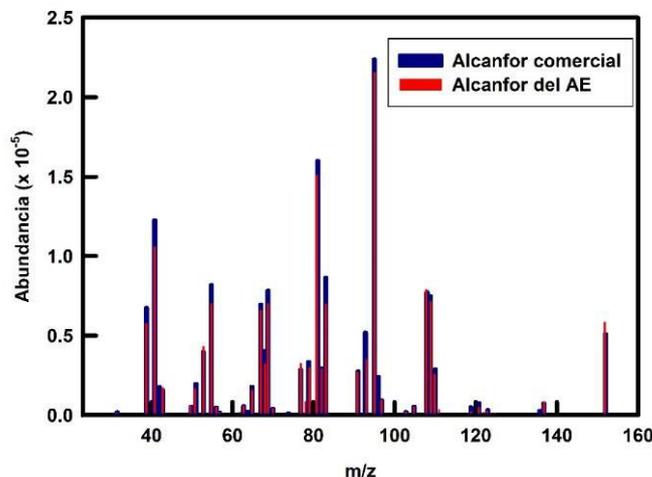


Figura 1.16. Espectro de masas del alcanfor comparado con el compuesto comercial.

La Organización Internacional para la Estandarización (International Organization for Standardization, ISO), es una organización independiente y no-gubernamental que establece estándares industriales, con el fin de proporcionar información acerca de la fiabilidad y calidad de ciertos productos comerciales. En cuanto a AEs, establece los intervalos de concentración relativa de las principales biomoléculas características, considerando como tales las apropiadas para diferenciar los AEs de distintos bioquimiotipos y/o plantas aromáticas. Con la información obtenida en los análisis de CG, se puede comparar los resultados de este estudio con los descritos por estas normativas.

La cuantificación relativa de las moléculas aporta una valiosa información acerca de las biomoléculas mayoritarias y minoritarias que se encuentran en cada AE. Sin embargo, para conocer con exactitud la concentración de estas biomoléculas, se deben determinar sus concentraciones absolutas, ya que dos AEs pueden tener similares concentraciones relativas de sus biomoléculas, pero distintas concentraciones absolutas. El AE con mayores concentraciones absolutas tendrá mayor valor para su posterior utilización.

Para el cálculo de las concentraciones absolutas es necesario la elaboración de rectas de calibrado, utilizando distintas concentraciones de los

compuestos puros a cuantificar. Para ello, se genera una mezcla con los compuestos comerciales que se quieran cuantificar en el AE, siempre que éstos presenten distinto t_R con el método empleado (para que la integración de cada pico pueda realizarse de forma exacta). A partir de esta mezcla, se generan 9 diluciones de la misma, controlando que todas las biomoléculas se encuentren dentro del límite de detección del equipo, y que la relación señal/ruido del pico de menor concentración sea superior a 10 (European-Pharmacopoeia, 2011). Para poder cuantificar las biomoléculas de un AE, el área de las mismas debe encontrarse dentro de sus respectivas rectas de calibrado, por lo que varias diluciones del AE tendrán que ser probadas, para conseguir la cuantificación de todas las biomoléculas mayoritarias disponibles comercialmente.

1.2.2. Cromatografía de gases enantioselectiva (CGEs)

Las moléculas quirales son aquellas cuya imagen especular no es superponible. La quiralidad se debe a la presencia de al menos un centro quiral, generalmente un carbono con los cuatro sustituyentes distintos. El número de enantiómeros de un compuesto puede calcularse como 2^n , donde n es el número de centros quirales que posee el compuesto (Ali *et al.*, 2003). Estas moléculas tienen la capacidad de desviar el plano de luz polarizada. Un enantiómero es dextrógiro si gira el plano de luz hacia la derecha y levógiro si lo hace hacia la izquierda.

La CGEs es una técnica que permite la separación de los enantiómeros de una molécula quiral, por su diferencia de unión a la fase estacionaria de la columna. Hace aproximadamente cinco décadas comenzó la búsqueda de fases estacionarias que permitieran la separación de enantiómeros mediante CG (Gilav, 1975). La demanda de enantiómeros puros conlleva a una investigación sobre metodologías rápidas y de bajo coste, que consigan obtener una buena separación de las moléculas quirales (Xie and Yuan, 2017).

Las fases estacionarias más ampliamente utilizadas son las que enlazan ciclodextrinas como selectores quirales, debido a su estabilidad térmica y al amplio número de enantiómeros que son capaces de separar. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos formados por 6 (α -ciclodextrinas), 7 (β -ciclodextrinas) u 8 (γ -ciclodextrinas) glucosas unidas por enlace α -1,4, con diferentes radicales unidos a las posiciones 2, 3 y 6 de las glucosas, lo que les confiere diferencias

de polaridad y por tanto de separación de compuestos (Figura 1.17). Estas estructuras presentan una cavidad central hidrofóbica, con la que interactuarán más o menos los enantiómeros de cada molécula, detectándose distintos tiempos de retención.

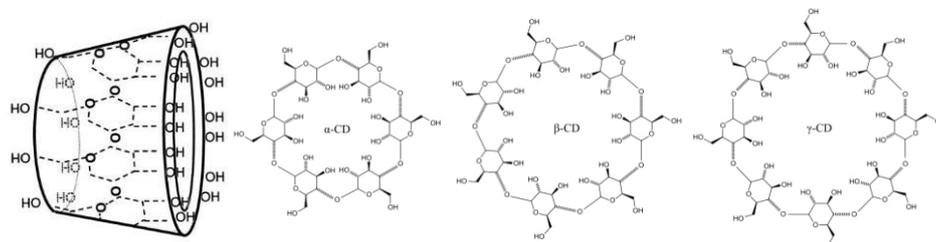


Figura 1.17. Sección longitudinal y transversal de ciclodextrinas.

Los enantiómeros de los compuestos volátiles quirales pueden mostrar diferentes efectos fisiológicos y terapéuticos (Mori, 2011; Staniatopoulos *et al.*, 2016). Además, la determinación de la quiralidad de las biomoléculas en los AEs permite detectar adulteraciones, por adición de mezclas racémicas de compuestos puros sintéticos, y pueden ser un indicador del origen de las plantas a partir de las cuales se han obtenido los AEs (Krupcik *et al.*, 2016; Satyal *et al.*, 2016). En la Figura 1.18 se muestra el cromatograma quiral obtenido con el AE de *S. lavandulifolia*.

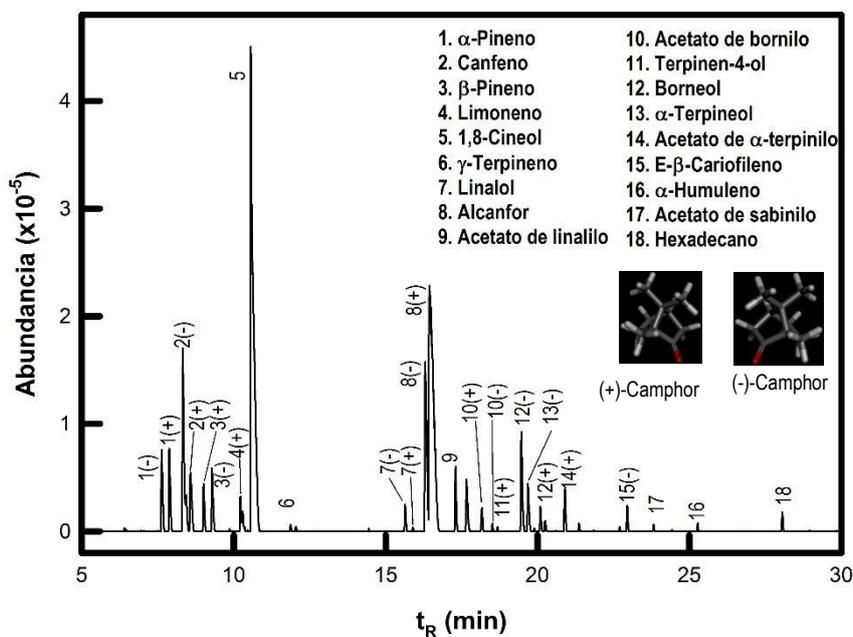


Figura 1.18. Cromatograma de *S. lavandulifolia* con columna quiral.

1.3. Capacidad antioxidante

Los procesos oxidativos están involucrados en una amplia variedad de procesos biológicos. Ciertas enfermedades como el cáncer, alteraciones del sistema inmunitario, procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, o problemas de corazón o hígado, pueden estar relacionadas con la sobreproducción de radicales libres en nuestro cuerpo, generando daño en el ADN y oxidación de proteínas y lípidos (Aruoma, 1998; Li *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2017). Algunos hábitos de vida como el consumo de alcohol, tabaco, y la exposición a la contaminación medioambiental y a la radiación UV, aumentan la producción de radicales libres en nuestro cuerpo (Wu *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2016).

Los procesos inflamatorios están mediados o desencadenados por radicales libres. Las células implicadas en los procesos inflamatorios (macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos) producen una alta cantidad de aniones superóxido (O_2^-), los cuales son convertidos por la enzima superóxido dismutasa en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a partir del cual se pueden generar radicales hidroxilo (OH^\bullet) (Figura 1.19). Este radical es altamente reactivo y puede oxidar los ácidos grasos insaturados a radicales peroxilo (ROO^\bullet). Todos estos radicales se denominan especies reactivas de oxígeno (Chen and Schopfer, 1999; Fridovich, 1997; Quinn and Gauss, 2004). También existen otros tipos de oxidantes, como las especies reactivas de nitrógeno. Entre ellas, el anión peroxinitrito ($ONOO^-$), y el óxido nítrico (NO^\bullet) generados por las enzimas óxido nítrico sintasas a partir del aminoácido arginina (Kostka, 1995; Miyasaka and Hirata, 1997).

Los agentes antioxidantes pueden actuar a distintos niveles. Pueden inhibir la actuación de factores exógenos y de enzimas que promueven la generación de radicales libres, por ejemplo, absorbiendo la luz UV o inhibiendo enzimas como la peroxidasa o la NADH oxidasa. Además, algunos compuestos antioxidantes son capaces de donar radicales de hidrógeno (H^\bullet) a un radical libre altamente reactivo, eliminándolo mediante la generación radicales libres del antioxidante que son fácilmente autoeliminables, habitualmente mediante desproporción o dimerización hasta especies no reactivas. La acción de agentes quelatantes de iones metálicos también inhibe procesos oxidativos, ya que estos

iones metálicos son catalizadores de reacciones de oxidación (Singh and Singh, 2008).

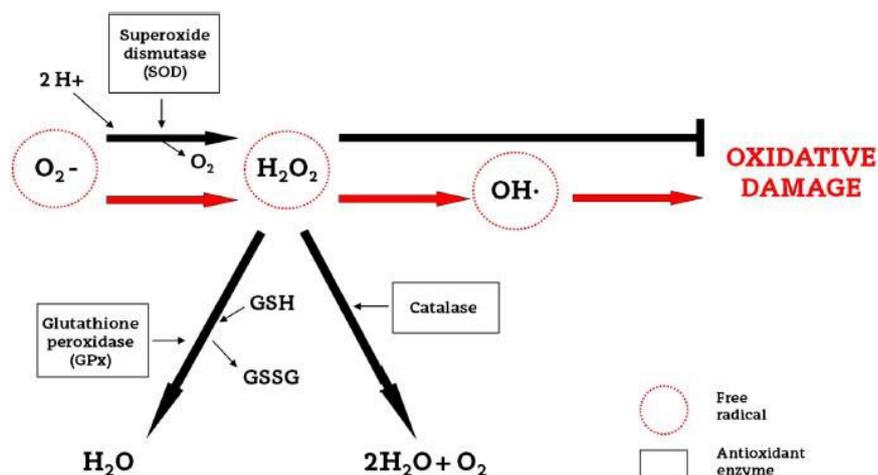


Figura 1.19. Especies reactivas de oxígeno y enzimas antioxidantes (Arteaga *et al.*, 2017).

En la industria alimentaria, el deterioro de los alimentos durante su procesado y almacenamiento se debe en gran medida a los procesos oxidativos que se producen en ellos. Esta oxidación reduce la calidad del producto final y acorta su vida útil, debido a los cambios de color y olor que se producen y a los riesgos para la salud del consumidor (Naveena *et al.*, 2008). La utilización de antioxidantes sintéticos en alimentos, cosméticos y fármacos, está siendo cada vez más cuestionada por los efectos teratogénicos y carcinogénicos que éstos pueden producir (Caleja *et al.*, 2017). Por ello, muchas investigaciones están enfocadas en el descubrimiento de nuevos agentes antioxidantes naturales, que puedan sustituir a los sintéticos utilizados hasta ahora (Kumar *et al.*, 2015). Se han realizado varias investigaciones que demuestran la capacidad antioxidante de algunos AEs, para evitar o retardar la oxidación de alimentos (Dannenber *et al.*, 2016; Rodriguez-Garcia *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2016).

Existen una amplia variedad de métodos *in vitro* que permiten determinar, de forma complementaria y preliminar, la posible aplicación de compuestos o mezclas de los mismos, como antioxidantes en industrias farmacéuticas o alimentarias. Deben utilizarse varios métodos *in vitro* para evaluar y caracterizar la capacidad antioxidante de muestras complejas (Alam *et al.*, 2013).

1.3.1. ORAC

Este método mide la capacidad antioxidante mediante la fluorescencia que emite la fluoresceína (Ou *et al.*, 2001). La fluoresceína deja de emitir fluorescencia cuando es oxidada por el radical peroxilo, formado por la oxidación térmica del 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) dihidrocloruro (AAPH) (Figura 1.20). Esto se observa como una curva de descenso de fluorescencia cuando se mide la reacción de forma continua. Si el medio de ensayo contiene alguna molécula antioxidante capaz de reducir el radical peroxilo, la pérdida de la emisión de fluorescencia por parte de la fluoresceína se verá retrasada.

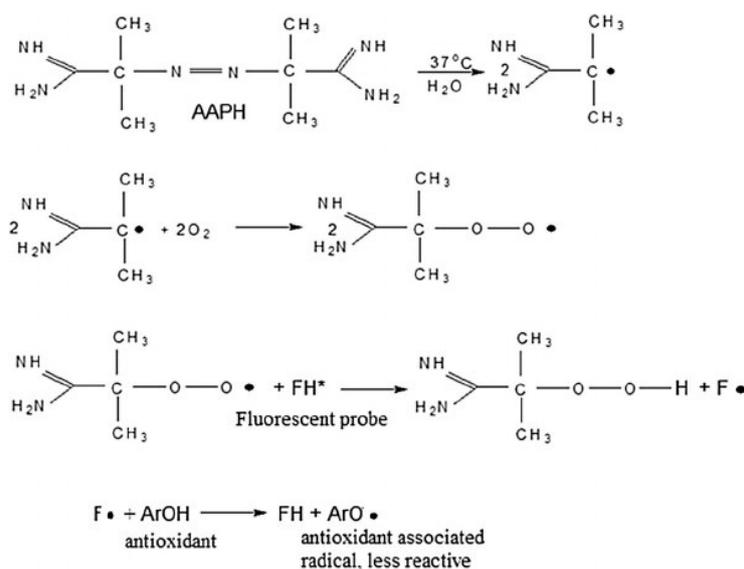


Figura 1.20. Reacción de oxidación de la fluoresceína (Litescu *et al.*, 2014).

Las medidas de capacidad antioxidante mediante este método se comparan con la capacidad antioxidante de trolox (análogo de la vitamina E), para expresar los resultados en valores TEAC (capacidad antioxidante equivalente a trolox). Varias concentraciones de trolox y de los AEs serán probadas para obtener las curvas que muestran el descenso de fluorescencia respecto al tiempo de ensayo (Figura 1.21). Para la comparación de las capacidades antioxidantes de los AEs y sus biomoléculas con las del trolox, se realizan rectas en las que se representa el área bajo la curva (AC) de fluorescencia, respecto a las distintas concentraciones de antioxidantes (Figura 1.21).

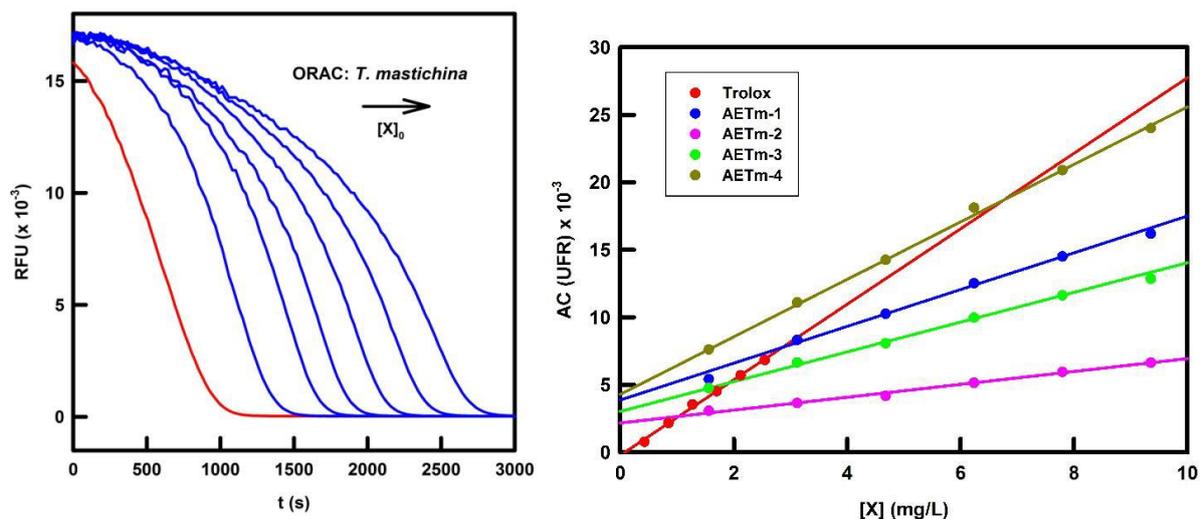


Figura 1.21. Registros cinéticos en ensayos ORAC (izquierda) y rectas de área bajo la curva (AC) respecto a concentración de trolox y AEs de *T. mastichina* (mg/L) (derecha).

1.3.2. DPPH

Este método es el más utilizado para la medida de la capacidad antioxidante, por su facilidad de manejo y su bajo coste. El compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) es un radical nitrogenado estable. Este radical presenta un color violeta oscuro, que absorbe a 517 nm. Si a la disolución de radical DPPH se adiciona un agente antioxidante, este último cederá un H al radical DPPH, transformándolo en su forma reducida amarilla (Figura 1.22). La capacidad antioxidante se mide por la disminución de la absorbancia a 517 nm (Brandwilliams *et al.*, 1995).

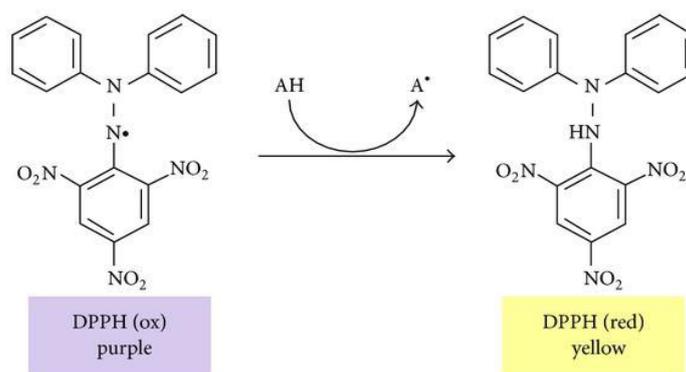


Figura 1.22. Reacción de DPPH con un agente antioxidante (AH) (Teixeira *et al.*, 2013).

1.3.3. ABTS

El ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico) (ABTS) muestra un color verde azulado cuando se encuentra en forma de radical libre. Este radical libre se forma por la oxidación producida por persulfato (Figura 1.23). Al reducirse, pierde el color y por tanto, la monitorización espectrofotométrica de la absorbancia muestra la capacidad antioxidante de las sustancias problema (Re *et al.*, 1999). Este radical libre presenta dos picos de absorbancia, uno mayor a 420nm y otro menor a 734nm. En los métodos de capacidad antioxidante se usa la longitud de onda de 734nm, para evitar la saturación del detector, así como la interferencia de antioxidantes y muestras coloreadas con absorbancias a menores longitudes de onda.

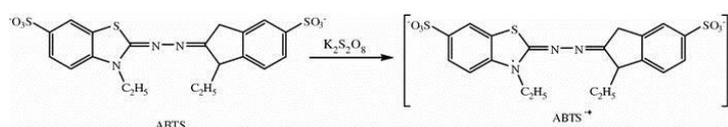


Figura 1.23. Oxidación de ABTS por persulfato potásico (Gulcin, 2012).

1.3.4. TBARS

Este método evalúa la capacidad antioxidante mediante la disminución de la oxidación de las grasas utilizadas en este ensayo. Los ácidos grasos poliinsaturados pueden oxidarse produciendo malondialdehído (MDA) mediante calor y en presencia de oxígeno. El MDA puede reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) formando un aducto MDA-TBA₂ (Figura 1.24) de color rojo que absorbe a 532 nm (Dorman *et al.*, 1995). Si la muestra problema tiene capacidad antioxidante, se generará menor concentración del producto de oxidación MDA y, por tanto, la absorbancia a 532 nm será menor.

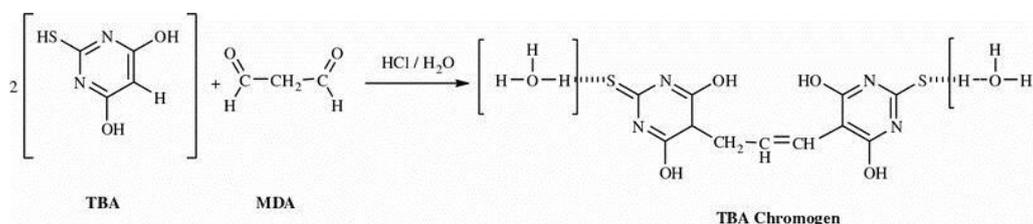


Figura 1.24. Formación del aducto MDA-TBA₂ (Gulcin, 2012).

1.3.5. Potencia reductora (PR)

A diferencia de los métodos de medida de la capacidad antioxidante vistos anteriormente, este método mide aparición de color cuando una sustancia

antioxidante se encuentra en el medio de ensayo. Se basa en la capacidad de reducción del Fe^{III} del ferricianuro potásico (Oyaizu, 1986). Para ello se requiere un medio ligeramente ácido y calor. Tras la incubación, se añade ácido tricloroacético para acidificar más el medio y cloruro férrico. El Fe^{3+} reaccionará con el ferrocianuro potásico (Fe^{II}), generando un complejo soluble denominado azul de Prusia (Figura 1.25), que absorbe a 700 nm.

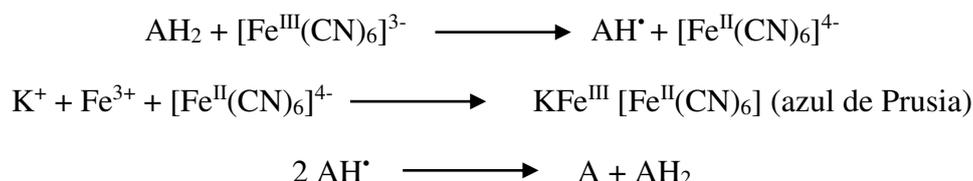


Figura 1.25. Formación de azul de Prusia por un antioxidante reductor como el ácido ascórbico (AH_2), que se oxida hasta su radical (AH^\bullet). Dos moléculas de éste desproporcionan formando ácido deshidroascórbico (A) y ácido ascórbico (AH_2).

1.3.6. Potencia quelatante (PQ)

Mediante este método se mide la capacidad quelatante de Fe^{2+} de la muestra. La FerroZina es un compuesto capaz de quelatar el Fe^{2+} y formar un complejo de color rojo que absorbe a 562 nm (Figura 1.26). En presencia de otro compuesto con capacidad quelatante, el complejo FerroZina- Fe^{2+} será menos abundante, lo que se traduce en un color rojo menos intenso (Miguel *et al.*, 2010).

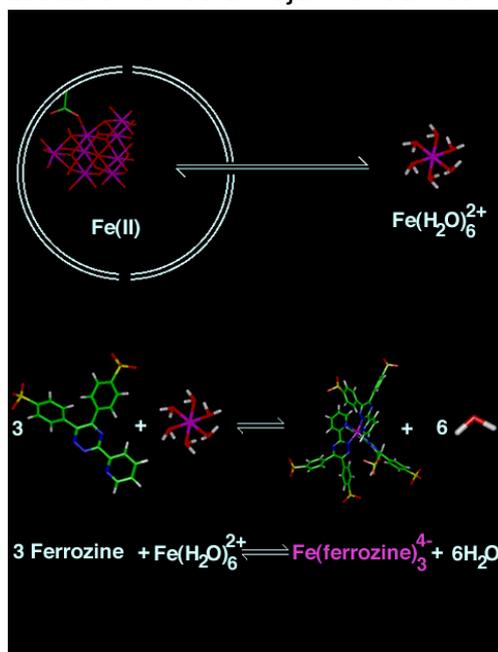


Figura 1.26. Complejo de unión FerroZina- Fe^{2+} (<http://www.chemistry.wustl.edu>).

1.4. Inhibición enzimática

La investigación sobre procesos de inhibición enzimática puede tener diversas finalidades como, por ejemplo, eliminar a un organismo patógeno o modular procesos biológicos. Los inhibidores pueden unirse a las enzimas de forma competitiva o no competitiva con el sustrato, reversible o irreversible y de unión a la enzima o al complejo enzima-sustrato.

Los inhibidores enzimáticos pueden ser de distinta naturaleza. Varios estudios previos han probado inhibiciones enzimáticas producidas por los AEs, debido a que son productos naturales con carácter lipofílico, lo que les confiere la posibilidad de atravesar las membranas lipídicas (Videira *et al.*, 2013; Villaruano *et al.*, 2015; Vitali *et al.*, 2016). Los ensayos *in vitro* deben adaptarse a la baja solubilidad de los AEs en medio hidrofílicos, incorporando pequeñas proporciones de codisolventes orgánicos que no afecten a la actividad enzimática.

Durante este estudio se ha investigado la capacidad de los AEs para la inhibición enzimática de lipoxigenasa (LOX) y acetilcolinesterasa (AChE), dos enzimas de gran interés por sus implicaciones en la salud.

1.4.1. LOX

Las enzimas LOX están implicadas en la generación de señales lipídicas a partir del ácido araquidónico o del ácido linoléico, siendo cada una de ellas específica en la oxigenación de un átomo de carbono del sustrato (Brash *et al.*, 2012; Mortimer *et al.*, 2006). Estas enzimas se encuentran sobre todo en animales, plantas y hongos, siendo bastante raras en organismos procariontes (Ivanov *et al.*, 2010).

El hierro no hemo de la enzima es el que comienza la reacción, atrayendo a un H del pentadieno y oxidando a un carbono de la cara opuesta, es decir, si el hierro atrae el H en posición R, oxidará el C en posición S. Además, también existe especificidad de unión según la posición cabeza-cola del ácido graso (Figura 1.27) (Newcomer and Brash, 2015).

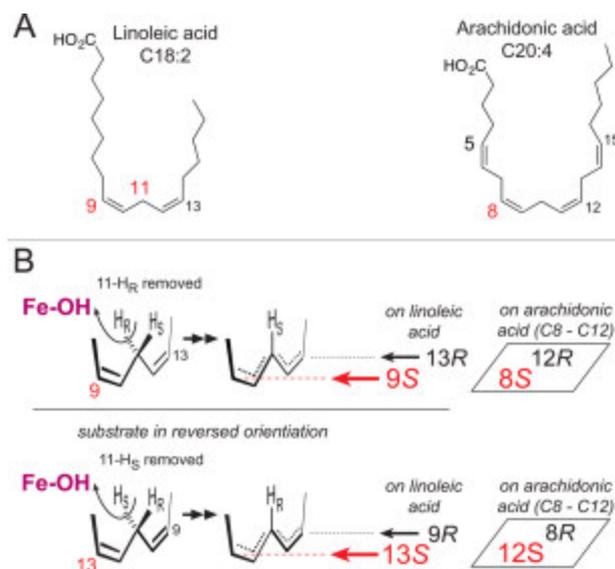


Figura 1.27. Especificidad de posición y estereoconformación en la unión y oxidación mediante LOX de los ácidos linoléico y araquidónico (Newcomer and Brash, 2015).

En humanos se han encontrado 6 genes que codifican para 6 LOX en distintos tejidos (eosinófilos, leucocitos, macrófagos, plaquetas y piel, entre otros) (Kuhn *et al.*, 2015). En concreto, la 5-LOX está implicada en la formación de leucotrienos mediante dos funciones catalíticas. Primero oxida el carbono 5 del ácido araquidónico, generando el ácido 5-hidroperoxieicosatetranoico (5-HPETE), por la eliminación del H de la posición S del carbono 7 y la inserción de oxígeno en el carbono 5 (Radmark, 2002). La actividad sintasa LTA₄ elimina el átomo de H (S) del carbono 10 del 5(S)-HPETE, formando un epóxido inestable con un sistema trieno conjugado (Figura 1.28). Por otro lado, la glutathion peroxidasa puede reducir el 5(S)-HPETE en 5(S)-HETE (Radmark *et al.*, 2015). Los leucotrienos formados por la 5-LOX, son moléculas señalizadoras de la inflamación que se acumulan en los lugares donde se produce la inflamación, atrayendo a los neutrófilos, células dendríticas y células-T, y aumentando la permeabilidad de los capilares de la zona. Por otro lado, la 5-LOX también está relacionada con la biosíntesis de biomoléculas anti-inflamatorias como son las lipoxinas (Serhan, 2007).

La sobreexpresión o sobreactividad de las LOX ha sido relacionada con numerosas enfermedades donde intervienen procesos inflamatorios, como el cáncer (Moore and Pidgeon, 2017; Roos *et al.*, 2016), la enfermedad de Alzheimer (Chu and Pratico, 2016; Joshi *et al.*, 2015), el asma y la artritis (Kupczyk *et al.*, 2011; Shimizu, 2009).

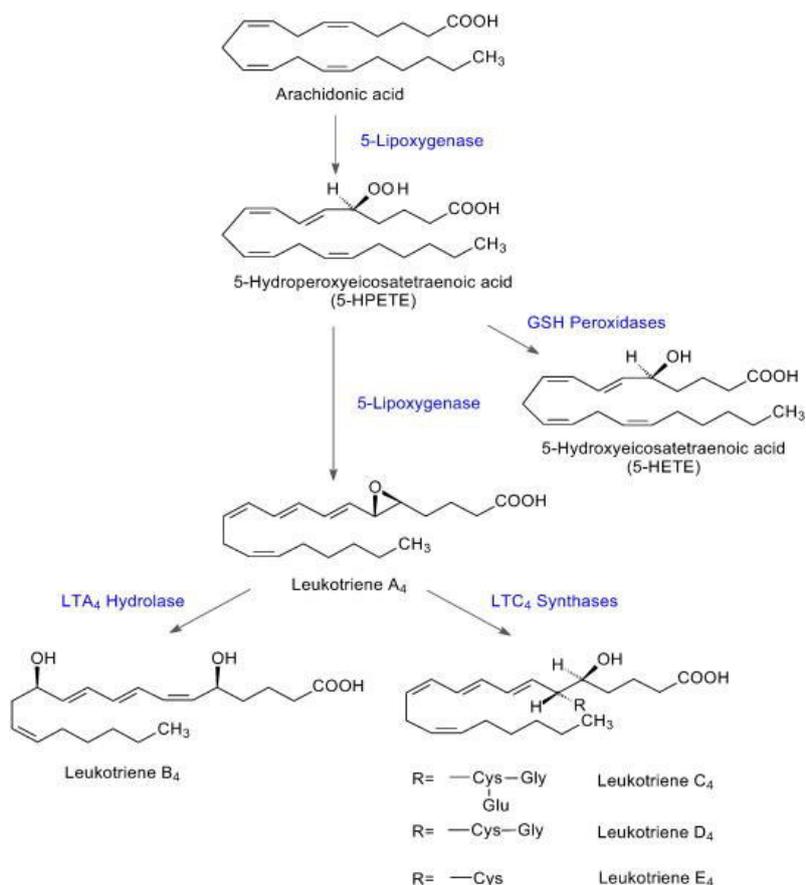


Figura 1.28. Formación de leucotrienos a partir del ácido araquidónico (Radmark *et al.*, 2015).

La primera estructura cristalizada de la LOX de soja, utilizada en estos ensayos, fue descrita por Boyington *et al.* (1997). Las LOX de plantas son más grandes que las de animales, pero contienen ciertas regiones muy conservadas. Ambas poseen un grupo PLAT amino terminal y 4 hélices alfa que rodean el hierro del centro activo. En una de las hélices alfa se genera una curvatura, conservada en todas las estructuras de LOX descritas hasta la fecha, proporcionándole una forma característica al sitio activo (Figura 1.29). Las semejanzas encontradas entre la LOX-1 de soja y las LOX de humanos hace posible su uso como modelo para los ensayos de inhibición *in vitro*.

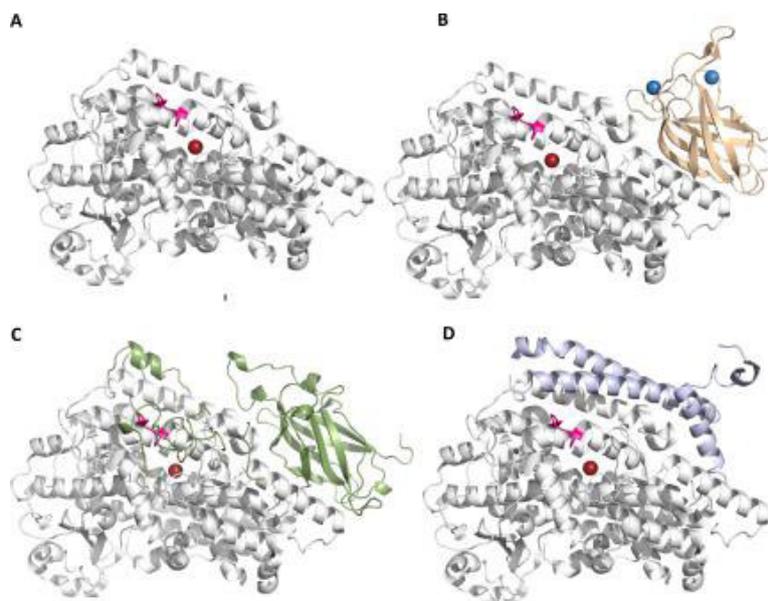


Figura 1.29. Estructura de LOX. (A) sitio activo rodeado de hélices alfa con el dominio arqueado en rosa. (B) LOX de animales con el dominio PLAT (marrón). (C) LOX de plantas con el dominio PLAT (verde). (D) LOX bacteriana sin el dominio PLAT, con hélices alfa adicionales (violeta) (Newcomer and Brash, 2015).

1.4.2. AChE

Esta enzima pertenece a la familia de las α/β serina hidrolasas, con el sitio catalítico formado por los aminoácidos Ser200-His440-Glu327, situados al fondo de una estrecha y profunda abertura (aproximadamente 20Å de profundidad) que posee la enzima (Figuras 1.30 y 1.31). En ese sitio se produce la hidrólisis de acetilcolina en colina y acetato. El sitio activo está rodeado de 14 residuos aromáticos, que se unen a la acetilcolina promoviendo que ésta alcance el sitio activo. Estos residuos aromáticos son cruciales para la rapidez de reacción de esta enzima, ya que la butirilcolinesterasa, que no muestra 6 de los residuos aromáticos conservados en todas las acetilcolinesterasas, tiene una velocidad de reacción menor con acetilcolina como sustrato (Kaplan *et al.*, 2001). En este sentido, los inhibidores pueden impedir la unión de acetilcolina al sitio activo, interfiriendo en la unión a estos residuos aromáticos. La butirilcolinesterasa se encuentra sobre todo en el hígado, y es capaz de hidrolizar a mayor velocidad butirilcolina que acetilcolina. Esta enzima también se encuentra en células gliales donde tiene capacidad de hidrolizar la acetilcolina (Kuppusamy *et al.*, 2017).

En mamíferos, la enzima AChE está codificada por un único gen situado en el cromosoma 7. Esta proteína puede sufrir varias modificaciones

postraduccionales: mediante la unión de un glicosil-fosfatidilinositol se puede anclar externamente a la membrana de los eritrocitos, mediante el péptido de anclaje rico en prolina (PRIMA) a la membrana sináptica, o puede permanecer soluble (Stasiuk *et al.*, 2014).

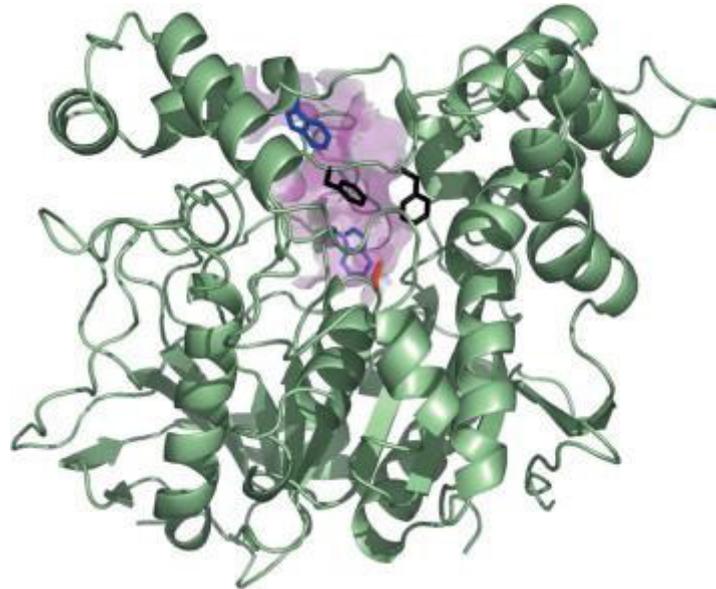


Figura 1.30. Estructura de la AChE de *Torpedo californica*. En azul, los aminoácidos Trp84 y Trp279 como residuos claves para la unión de acetilcolina, en negro la Phe288 y Phe290 importantes para el posicionamiento correcto de la acetilcolina y en rojo la Ser200 del sitio activo y (Silman and Sussman, 2005).

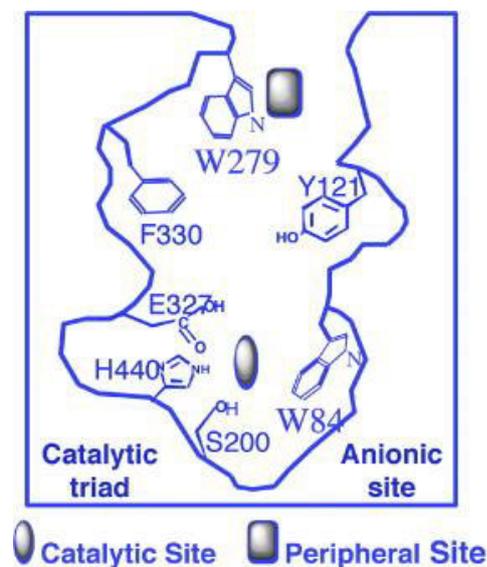


Figura 1.31. Sección transversal del centro activo de la AChE de *Torpedo californica* (Silman and Sussman, 2008).

La AChE es una enzima de importante actividad biológica, ya que es la responsable de terminar la función de neurotransmisión en el sistema colinérgico

central, ganglios y uniones neuromusculares, mediante la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, además de participar en otros procesos celulares, como la formación de placas amiloides en la enfermedad de Alzheimer (Greenfield, 1984; Silman and Sussman, 2005, 2008; Soreq and Seidman, 2001). Su inhibición, enfocada sobre todo en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, ha sido previamente estudiada (Kuppusamy *et al.*, 2017). Los alcaloides obtenidos de plantas, como son la galantamina y la fisostigmina, fueron los primeros inhibidores investigados (Ng *et al.*, 2015). Otros productos naturales obtenidos a partir de plantas también han mostrado un potencial uso como tratamiento para esta enfermedad (Deshmukh *et al.*, 2016; Goozee *et al.*, 2016), entre ellos algunos AEs (Farag *et al.*, 2016; Hajlaoui *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016).

1.5. Inhibición microbiana

El crecimiento microbiano es una de las principales causas que provocan el deterioro de productos cosméticos, farmacéuticos y alimenticios, lo que conlleva a cambios en las cualidades organolépticas y a un riesgo en la salud del consumidor (Concina *et al.*, 2009).

Hoy en día, la necesidad de desarrollar metodologías de análisis exactas, rápidas y no destructivas está en aumento. Es necesario asegurar la calidad del producto a lo largo de toda la vida útil del mismo, intentando que ésta sea lo más larga posible. El método comúnmente utilizado para detectar contaminación microbiana ha sido y es el cultivo de los microorganismos presentes en placa. Esta técnica permite la observación e identificación de los microorganismos responsables del deterioro. Sin embargo, estas técnicas son laboriosas y conllevan largos tiempos de realización. Es por ello, que en la actualidad se están desarrollando nuevos métodos de detección, como ensayos inmunológicos para detectar ciertas toxinas por interacciones antígeno-anticuerpo (Chen and Ding, 2004), y ensayos mediante la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para detectar los genes que codifican ciertas toxinas (Martinez-Blanch *et al.*, 2009). Estas técnicas novedosas por lo general requieren inversiones en equipamiento y presentan una mayor dificultad para la interpretación de los resultados (Rahman *et al.*, 2016). También se están desarrollando técnicas espectroscópicas de visible/infrarrojo, fluorescencia o

imágenes hiperespectrales para la detección de los microorganismos de forma rápida, no destructiva y con un mínimo procesado de la muestra (He and Sun, 2015).

1.5.1. Estudios *in vitro*

Existen diferentes métodos de medida de la inhibición microbiana entre los que se encuentran:

- Difusión en disco: Este método mide la capacidad inhibidora de una sustancia mediante la observación del halo de inhibición, que se genera alrededor del disco donde se aplica dicha sustancia. Este disco es colocado en una placa Petri, con medio de cultivo sólido inoculado con un microorganismo. Cuanto mayor es el diámetro del halo de inhibición, mayor es la capacidad inhibidora (Donato *et al.*, 2015). Los resultados de este método pueden variar dependiendo de la capacidad de difusión del antimicrobiano a través del medio de cultivo. Por esta razón, la medida de la inhibición de los AEs (sustancias hidrofóbicas), puede verse impedida por su escasa difusión y solubilización en el medio (de carácter hidrofílico).

Un método similar al anterior es el de difusión en agar, que se basa en la aplicación de una pequeña cantidad del antimicrobiano a probar, en pocillos generados en placas de agar inoculadas. En este método, el antimicrobiano también tiene que difundir por el agar y los resultados son expresados como diámetro del halo de inhibición (Dorman and Deans, 2000).

- Microatmósfera: Este método mide la capacidad inhibidora de sustancias volátiles. Para ello, un disco impregnado con el antimicrobiano a probar es colocado en el centro de la tapa superior de una placa Petri inoculada con un microorganismo. Este disco no está en contacto directo con agar, por lo que el poder inhibitorio dependerá de la naturaleza de los compuestos y de su capacidad de volatilización.

- Macro o microdilución: Estos ensayos miden la capacidad inhibidora de sustancias en medio líquido. Se preparan varias diluciones de los antimicrobianos en tubos (macrodilución) o en placas multipocillo (microdilución), y a todas ellas se adiciona un volumen fijo de un cultivo microbiano, con una concentración de unidades formadoras de colonias (UFC)/ml previamente

establecida. La menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento se denomina "concentración mínima inhibitoria (CMI)". Cuanto menor sea la CMI, mayor es la capacidad inhibitoria del compuesto probado. Este método tiene la limitación de que las sustancias hidrofóbicas, como los AEs, pueden presentar problemas para permanecer disueltas en el medio de cultivo (hidrofílico). Para solventar este problema, se puede adicionar una pequeña proporción de un agente emulsionante, previa comprobación de que el mismo no interfiere en el crecimiento microbiano. Un volumen determinado de los pocillos que no muestran crecimiento, se traslada a una placa Petri con medio sólido libre de antimicrobianos, para observar si con esas concentraciones de antimicrobiano en medio líquido, se produce la muerte de los microorganismos o sólo se inhibe su crecimiento. La menor concentración que inhibe el crecimiento en medio líquido y luego no se recupera en agar, es definida como la concentración mínima bactericida o fungicida (CMB o CMF, respectivamente).

La detección de crecimiento en estos ensayos se puede hacer mediante distintas técnicas: observación directa, densidad óptica, absorbancia, colorimetría, conductancia y recuento de viables (Burt, 2004).

- Otros: Ensayos que miden las curvas de supervivencia o la observación mediante el microscopio electrónico, son otros métodos que pueden ser utilizados para observar el efecto de agentes antimicrobianos (Burt and Reinders, 2003).

En estos estudios, el método seleccionado para la determinación de la actividad antimicrobiana de los AEs fue el de microdilución. Los microorganismos patógenos probados fueron *Pseudomonas aeruginosa* (bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar, productora de pigmentos fluorescentes y no esporulada) (Figura 1.32), *Escherichia coli* (bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa, inmóvil o con flagelos periféricos y no esporulada) (Figura 1.33), *Staphylococcus aureus* (bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, inmóvil y no esporulada) (Figura 1.34) y *Candida albicans* (hongo diploide asexual, en forma de levadura y saprófito) (Figura 1.35).



Figura 1.32. *Pseudomonas aeruginosa* (imagen al microscopio electrónico y crecimiento en medio agar nutritivo).

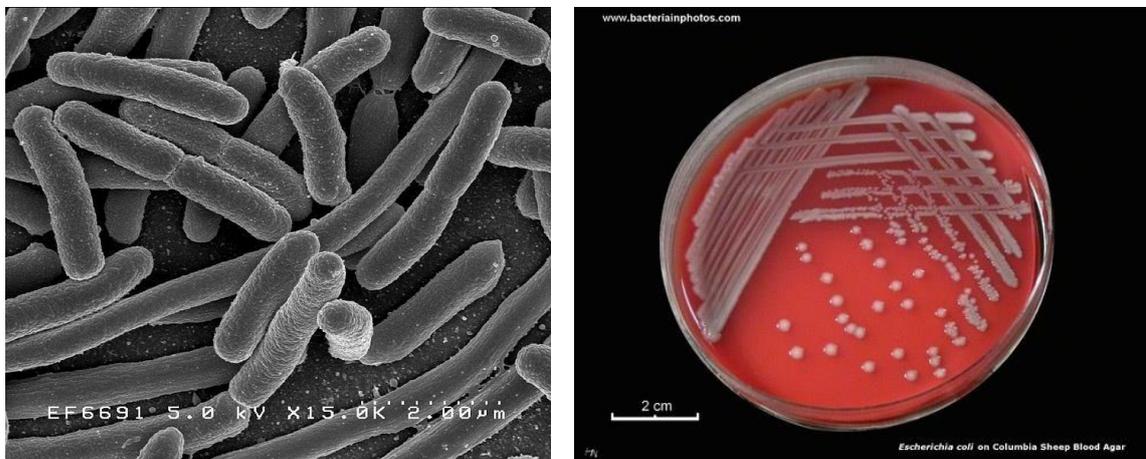


Figura 1.33. *Escherichia coli* (imagen al microscopio electrónico y crecimiento en medio agar sangre).

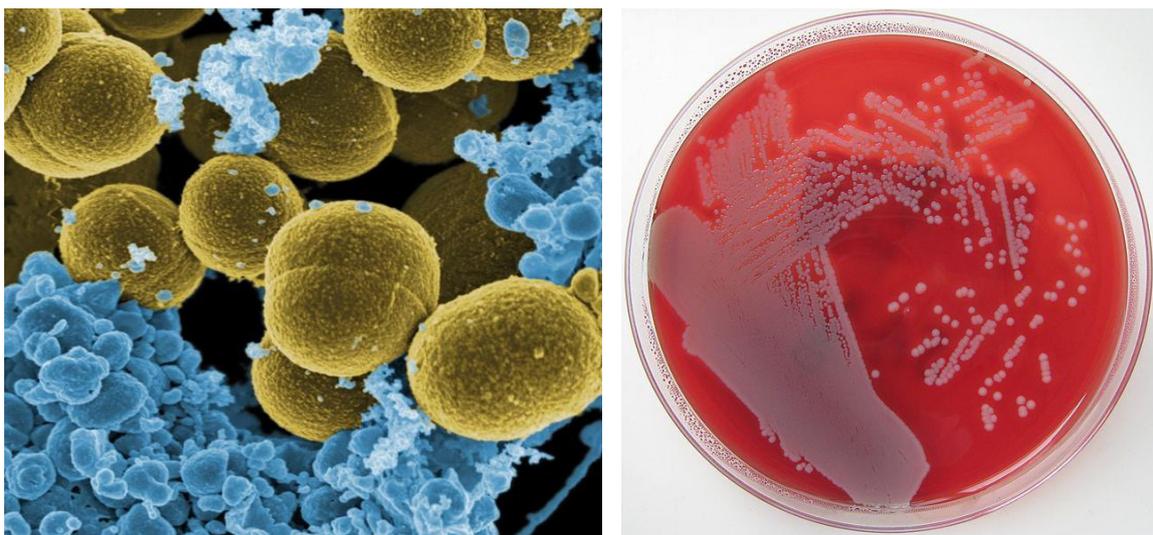


Figura 1.34. *Staphylococcus aureus* (imagen al microscopio electrónico y crecimiento en medio agar sangre).

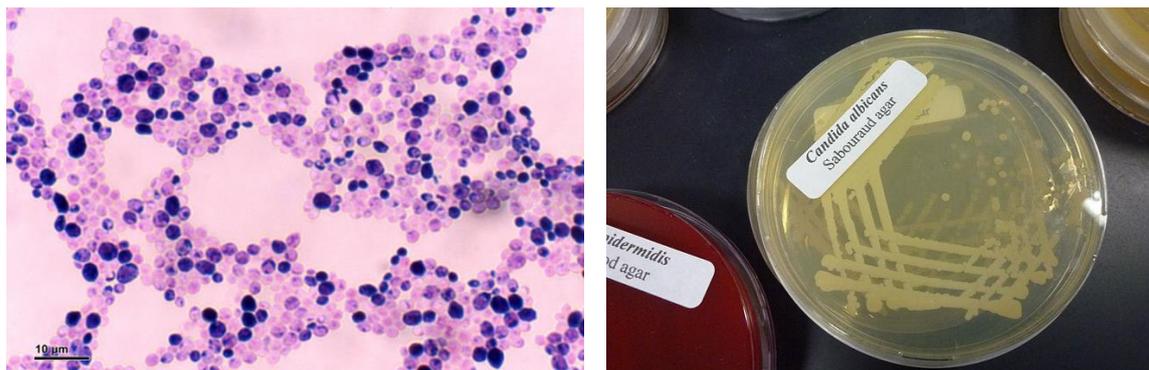


Figura 1.35. *Candida albicans* (imagen al microscopio óptico y crecimiento en medio agar Sabouraud).

1.5.2. Ensayos aplicados a la conservación de alimentos

En la industria alimentaria, el control de la oxidación y del crecimiento microbiano son dos factores cruciales para la comercialización de productos. La carga microbiana de los alimentos tiene que encontrarse por debajo de unos máximos establecidos, para evitar el deterioro de los mismos o problemas de salud en el consumidor. Reducir la carga microbiana inicial y mantener la cadena de frío durante el transporte y el almacenamiento, son dos factores determinantes para asegurar la calidad de los alimentos durante su periodo de vida útil. Sin embargo, esto no es suficiente, ya que ciertos microorganismos patógenos pueden crecer a bajas temperaturas (psicrótrofos) como son *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Aeromonas hydrophila* (Taormina, 2010, 2011). Otro factor importante a tener en cuenta en la elaboración de productos alimenticios, es la composición de la atmósfera en el interior del envase, ya que el uso de atmósferas modificadas puede impedir el crecimiento de ciertos microorganismos (Sankar *et al.*, 2008).

La utilización de compuestos sintéticos como conservantes ha sido una estrategia ampliamente utilizada, pero su posible efecto perjudicial para la salud ha hecho que los consumidores rechacen este tipo de compuestos en los alimentos (Dastmalchi *et al.*, 2016). Además, un elevado consumo de sal sódica, empleada en muchos alimentos como conservante (Taormina, 2010), aumenta el riesgo de hipertensión y problemas cardiovasculares (WHO, 2002). Por estos motivos, se requiere la búsqueda de otras alternativas antimicrobianas para las

industrias alimentarias, que no produzcan riesgos en la salud de los consumidores (Burt, 2004).

Los AEs han sido probados para la conservación de algunos alimentos debido a sus capacidades antimicrobianas (Burt, 2004; Dorman and Deans, 2000; Gayan *et al.*, 2012; Lanciotti *et al.*, 2004; Patrignani *et al.*, 2015; Vergis *et al.*, 2015). La aplicación de los AEs en alimentación tiene como limitación la baja concentración en la que tienen que ser usados, para no proporcionar aromas y/o sabores que pueden ser rechazados por los consumidores (Calo *et al.*, 2015; Martinez-Gracia *et al.*, 2015). El uso de combinaciones de AEs o de sus biomoléculas individuales puede producir efectos sinérgicos, que reducen la concentración de AE necesaria para la inhibición microbiana. Además, la incorporación de estos AEs en plásticos envolventes que permitan la liberación continua de los mismos, puede aumentar la capacidad antimicrobiana, controlando la carga de microorganismos tanto en el alimento como en la atmósfera que lo rodea (Krepker *et al.*, 2017).

En este estudio analizaremos la carga microbiana de bacterias mesófilas, bacterias psicrótrofas, bacterias del ácido láctico, coliformes, hongos y levaduras. El recuento de bacterias mesófilas indica la contaminación inicial del producto, y si el tratamiento de descontaminación ha sido adecuado. Además, un gran aumento en el número de estas bacterias a lo largo de la vida útil del producto, puede indicar que las condiciones de tiempo y temperatura no son adecuadas. Las bacterias potencialmente patógenas crecen bien a temperaturas de 25°C. El recuento de bacterias psicrótrofas es necesario para la determinación de la vida útil de productos que van a ser conservados a temperaturas iguales o inferiores a 5°C. Las bacterias del ácido láctico son bacterias Gram-positivas, inmóviles y no esporuladas, que pueden producir el deterioro de ciertos productos alimenticios (Stohr *et al.*, 2001). Los coliformes son bacterias Gram-negativas, entre las que se encuentran bacterias del género *Salmonella*, que pueden producir enfermedades en el consumidor, y *Escherichia coli*, un indicador de contaminación fecal. Los hongos y levaduras son necesarios para la producción de ciertos alimentos, pero pueden causar la descomposición de muchos otros. Estos microorganismos pueden producir toxinas (micotoxinas),

alterar las características físicas de los alimentos, y producir olores y sabores desagradables.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos

El objetivo general de este estudio es la realización de una profunda caracterización bioquímica de los AEs de cuatro especies de plantas aromáticas cultivadas en la Región de Murcia, pertenecientes a la familia de las labiadas: *Thymus mastichina*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia lavandulifolia* y *Salvia officinalis*. Se investigarán sus composiciones y sus bioactividades antioxidantes y antienzimáticas. Además, se determinarán las bioactividades antimicrobianas *in vitro* de los AEs mencionados previamente, y de los AEs de otras dos especies de la misma familia, *Thymus zygis* y *Thymus hyemalis*, y se realizará un estudio sobre conservación de mezclas de frutas y verduras con cuatro AEs seleccionados.

Para la consecución del objetivo general, es necesario llevar a cabo una amplia variedad de estudios:

- ❖ Optimización del procedimiento de CG con detección por EM, para la determinación de la concentración de los compuestos volátiles presentes en los AEs utilizados en este estudio. La concentración de los mismos será expresada en términos de concentración relativa, mediante la integración manual de los picos obtenidos, y absoluta, mediante la elaboración de rectas de calibrado con compuestos puros comerciales.

- ❖ Comparación de las composiciones de los AEs con las establecidas por la normativa ISO para el comercio internacional.

- ❖ Determinación de las distribuciones enantioméricas de los principales compuestos quirales. La composición enantiomérica aporta información acerca del origen y de la autenticidad de los AEs comerciales, así como la utilización de los mismos como fuente de enantiómeros puros.

- ❖ Análisis de las capacidades antioxidantes de los AEs mediante diferentes métodos *in vitro*.

- ❖ Evaluación de las posibles inhibiciones de las reacciones enzimáticas llevadas a cabo por las enzimas LOX y AChE, de gran importancia en procesos inflamatorios y en ciertas enfermedades como el Alzheimer.

- ❖ Determinación de las posibles capacidades inhibitoras de estos AEs

contra el crecimiento de microorganismos patógenos, y comparación con las posibles inhibiciones mostradas por los AEs de *Thymus zygis* y *Thymus hyemalis*, dos especies pertenecientes también a la familia de las labiadas.

❖ Diseño y realización de un ensayo de inhibición microbiana sobre mezclas de frutas y verduras mínimamente procesadas, para determinar la capacidad conservante de AEs de la familia de las labiadas (*Mentha piperita*, *Salvia officinalis* y *Thymus zygis*), junto con un AE de la familia de las rutáceas (*Citrus medica*).

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aceites esenciales

Los AEs fueron obtenidos a partir de plantas cultivadas en campos de cultivo ecológico dedicados al uso industrial, en tres zonas bioclimáticas con diferentes características (Tabla 3.1) (Rivas-Martínez, 1987).

Tabla 3.1. Termicidad y pluviosidad de las zonas bioclimáticas.

Zona bioclimática	Índice de termicidad* (°C)	Pluviosidad (mm/año)
Bajo Meso-Mediterránea	301 - 305	350 - 600
Alto Meso-Mediterránea	211 - 300	>600
Supra-Mediterránea	61 - 210	>600

*Índice de termicidad = $10 \times (T + M + m)$, donde T es la temperatura anual media, M es la media de las temperaturas más altas del mes más frío y m es la media de las temperaturas más bajas del mes más frío.

En la zona Bajo Meso-Mediterránea se cultivaron las plantas que fueron destiladas para obtener los siguientes AEs: los AEs 1 y 4 de *S. lavandulifolia* (AESI-1 y -4), los AEs 2 y 4 de *S. officinalis* (AESo-2 y -4), los AEs 1 y 3 de *R. officinalis* bioquimiotipo alcanfor (AERCa-1 y -3), el AE 1 de *R. officinalis* bioquimiotipo 1,8-cineol (AERCi-1), el AE 2 de *T. mastichina* (AETm- 2), los AEs 1 y 4 de *T. zygis* bioquimiotipo timol (Tzt-1 y -4). En la zona Alto Meso-Mediterránea se cultivaron las plantas de las que se obtuvieron el AE 2 de *S. lavandulifolia* (AESI-2), los AEs 1 y 3 de *S. officinalis* (AESo-1 y -3), el AE 2 de *R. officinalis* bioquimiotipo alcanfor (AERCa-2), el AE 2 de *R. officinalis* bioquimiotipo 1,8-cineol (AERCi-2), los AEs 1 y 3 de *T. mastichina* (AETm-1 y -3), el AE 3 *T. zygis* bioquimiotipo timol (Tzt-3), el AE 1 *T. zygis* bioquimiotipo linalol (Tzl-1) y el AE 2 de *T. hyemalis* (Th-2). En la zona Supra-Mediterránea se cultivaron las plantas del AE 3 de *S. lavandulifolia* (AESI-3), el AE 4 de *R. officinalis* bioquimiotipo alcanfor (AERCa-4), el AE 4 de *T. mastichina* (AETm-4), el AE 2 de *T. zygis* bioquimiotipo timol (Tzt-2), el AE 2 de *T. zygis* bioquimiotipo linalol (Tzl-2) y el AE 1 de *T. hyemalis* (Th-1).

La extracción de los AEs se realizó mediante hidrodestilación del material vegetal fresco (300 g) en un dispositivo Clevenger durante 3 horas. El AE fue secado con sulfato sódico anhidro y almacenado a 4°C hasta su uso.

Los AEs de *Citrus medica* L. y *Mentha piperita* L. utilizados en los ensayos de actividad antimicrobiana en alimentos fueron adquiridos a Flora S.R.L. (Pisa, Italia).

3.2. Reactivos

Compuestos puros (>95%) presentes en los AEs (utilizados para la identificación y cuantificación por cromatografía de gases y para los ensayos de bioactividad), lipoxigenasa obtenida de *Glycine max* (soja), acetilcolinesterasa tipo VI-S de *Electrophorus electricus*, ácido linoleico (pureza 99.0% por CG), DTNB [ácido 5,5' ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)], ioduro de acetiltiocolina, fluoresceína, AAPH [2,2'-azobis(2-metilpropionamida) dihidrocloruro], DPPH [2,2-difenil-1-picrilhidracilo], ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], lecitina de soja, TBA, dodecilsulfato sódico (SDS), n-butanol, ferricianuro potásico, ácido tricloroacético, cloruro de hierro (III), FerroZine [hidrato de sal monosódica del ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p,p'-disulfónico], cloruro de hierro (II), trolox [ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico] (pureza 99.3% por valoración con NaOH), butilhidroxitolueno (BHT, pureza 99.9% por CG), sulfato de estreptomina (766 UI/mg) y fluconazol (pureza 99.6% por HPLC), fueron adquiridos a Sigma-Aldrich. La enzima lacasa fue donada por Novozymes. El ácido ascórbico (AA, pureza 99.7% por ensayo acidimétrico) y el ácido cítrico (99.5% por valoración con NaOH) fueron proporcionados por Scharlau, mientras que el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, pureza 99% por valoración complejométrica) fue suministrado por Carl Roth. El ácido nordihidroguaiaretico (NDGA, pureza 95% por HPLC) fue comprado a Acros Organics. El hidrobromuro de galantamina (pureza 99.4% por HPLC) fue proporcionado por TCI. Los disolventes de grado analítico y los tampones fueron adquiridos a Merck. El agua de laboratorio tipo I (18 MΩ·cm) fue desionizada con un equipo MilliQ-Reference de Millipore.

3.3. Cromatografía de gases rápida-Espectrometría de masas (CGR-IE/EM)

La composición de los AEs fue determinada por CGR en un cromatógrafo Agilent GC7890 acoplado a un DEM Agilent MS 5975 de cuadrupolo simple e ionización por impacto electrónico (IE). Las inyecciones se realizaron con un

automuestreador Gerstel MPS-2XT equipado con una jeringa Gerstel de 10 μl . Este automuestreador permitió realizar las inyecciones tipo sándwich (0.2 μl de aire, 0.2 μl de isooctano, 0.2 μl de aire, 0.3 μl de muestra y 0.2 μl de aire, descritos desde el émbolo hasta el extremo de la aguja) aumentando de este modo la reproducibilidad y precisión entre las distintas muestras. Después de cada toma e inyección de muestra, la jeringa del automuestreador se limpió automáticamente haciendo varios lavados en dos disolventes distintos, isooctano y acetona, para evitar contaminaciones entre muestras sucesivas. El gas impulsor de la cromatografía fue hidrógeno, producido por un generador electrolítico Parker-Domnick-Hunter.



Figura 3.1. Cromatógrafo de gases Agilent GC7890 y detector de espectrometría de masas Agilent MS 5975.

Para el análisis de AEs, debido a la complejidad y riqueza de estas muestras, la inyección más apropiada es la inyección en modo división o *split*. Para realizar este tipo de inyección, el caudal del gas portador varía en función del *split* seleccionado, siendo el caudal máximo de generación de hidrógeno 80ml/min a una presión de 6 bar. Por esta razón, el caudal de hidrógeno generado limita el *split* a un máximo de 300:1. Con los diferentes *split* posibles entre el 1:1 y el 300:1, se han realizado diversas pruebas con varias diluciones de los AEs, seleccionando el *split* 100:1 por ser el que mejor permite la

observación de las biomoléculas minoritarias sin superar el intervalo de respuesta del detector.

La temperatura del inyector fue de 300 °C, donde se efectúa una purga de septum de 3 ml/min. Con el *split* 100:1 la purga de *split* libera 80 ml/min de hidrógeno durante la inyección. A los dos minutos, se activa el sistema de ahorro reduciéndose el flujo de la válvula de *split* a 20 ml/min. De este modo, y teniendo en cuenta que el flujo de hidrógeno en la columna se ha ajustado a 0.8 ml/min, durante la inyección el flujo total es de 83.8 ml/min y 23.8 ml/min a partir de los dos minutos.

Los AEs se diluyeron de 10 a 1000 veces según cada caso, con la finalidad de poder analizar, integrar e identificar sus componentes. Con las diluciones menores se consigue la observación e identificación de los picos minoritarios, pero se requieren diluciones mayores para conseguir una buena separación y no superar el límite de detección del DEM.

Para los ensayos descritos en los Capítulos 4, 5, 6 y 7 de esta Tesis, el cromatógrafo de gases estaba equipado con una columna capilar de sílice fundida SLB-5MS de Supelco, (15 m de longitud x 0.1 mm de diámetro interno x 0.1 µm de espesor de la fase estacionaria). El flujo de hidrógeno empleado (0.8 ml/min) generaba una velocidad de 80 cm/s y una presión de cabeza de columna de 46 psi, la cual está limitada por las características del cromatógrafo, de la columna y la capacidad de generación de hidrógeno. Este flujo se mantiene constante durante todo el programa, optimizando con ello el rendimiento de la separación. La fase estacionaria de esta columna es silfenilén polímero, de bajo sangrado y con una polaridad similar al poli (5% difenil/95% metil siloxano). Los valores bajos de diámetro interno y de espesor, junto con la pequeña longitud de columna, permiten obtener cromatogramas de alta resolución en poco tiempo.

La temperatura inicial del horno fue de 60 °C. El aumento de la temperatura del horno a lo largo del cromatograma, se programó para conseguir la mejor separación posible de todos los picos presentes en las muestras a analizar. La temperatura máxima del programa se estableció en 300 °C, sin alcanzar el límite máximo establecido por la columna (350 °C). El horno permite una velocidad máxima de aumento de temperatura de 60 °C/min. El programa de temperaturas, tras la optimización, fue el descrito en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Programa de temperaturas del horno del cromatógrafo.

Velocidad de calentamiento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)	Tiempo (min)
	60	0.0	0.0
15	92	0.0	2.1
1	96	0.0	6.6
20	108	0.5	7.2
5	120	0.0	9.6
20	160	0.0	11.6
5	170	0.0	13.6
30	300	0.5	18.5

La línea de transferencia que conecta el horno con el DEM estuvo permanentemente a 280 °C, para homogeneizar la entrada de biomoléculas al DEM. En el interior del DEM se estableció un vacío de 2×10^{-5} torr gracias a dos bombas, una bomba de vacío previa y una bomba turbomolecular de 25000 rps. La ionización de las biomoléculas en el detector se realizó por IE a 70 eV, seguida por un analizador de cuadrupolo simple. Para alargar el tiempo de vida útil del detector, la adquisición de datos comenzó después de la salida del disolvente de la columna, en este caso, el isooctano condujo a un tiempo de espera de 0.7 min. Las temperaturas de la fuente de iones y del cuadrupolo se mantuvieron constantes a 230 °C y 150 °C, respectivamente. El voltaje del electromultiplicador fue de 1129 V, y el intervalo de masas registradas por el detector se ajustó entre 30 y 300 m/z. Los límites de detección de masa se han establecido por encima de 30 m/z para no detectar un gran número de iones que contribuyen al ruido, más que a la identificación de la sustancia, y por debajo de 300 m/z, ya que los terpenos de más de 300 uma no son volátiles a 300 °C. De esta forma, en modo barrido se realizan 21.035 barridos/s, garantizando que picos muy pequeños, de hasta 0.72 s, tengan al menos 15 puntos. Además, todos los cromatogramas se han realizado con la función detección de iones traza activada, lo cual reduce el límite de detección, y mejora la forma y la identificación de los picos. El modo de monitorización selectiva de iones se ha utilizado cuando la concentración de la biomolécula es muy baja, ya que aumenta unas diez veces la sensibilidad del detector.

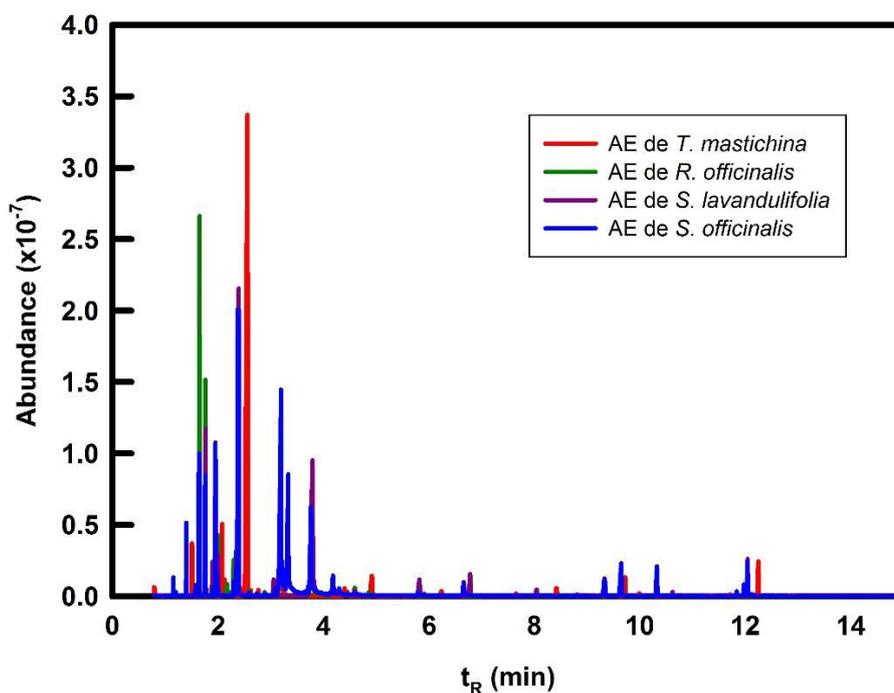


Figura 3.2. Cromatogramas de 4 AEs estudiados con *split* 100:1 y dilución 1:20.

Este equipo compuesto por 4 módulos fue controlado mediante el programa MSD ChemStation Data Analysis, MS-Search y AMDIS. Para la identificación de los picos, se comparó el Índice de Retención Lineal (IRL) descrito en la bibliografía con columnas de polaridad similar con el IRL experimental. El IRL experimental se obtuvo comparando el tiempo de retención de cada biomolécula con el de una serie de alcanos patrón (C7 – C30) homólogos de Supelco, siguiendo las recomendaciones de la IUPAC para los IRL (IUPAC, 1997). La comparación de los espectros de masas se realizó con las bases de datos espectrales NIST-08, Wiley-7 y la base de datos elaborada en el laboratorio con compuestos comerciales puros.

En los cromatogramas de cada AE, se calcularon los porcentajes de área de cada biomolécula respecto al área total (concentración relativa) y las concentraciones absolutas de las biomoléculas disponibles comercialmente expresadas en mM. Para esto último se inyectaron 9 diluciones de los compuestos puros, para elaborar una recta de calibrado con cada uno de ellos. Estos niveles de concentración se prepararon, inyectaron y analizaron por triplicado. Para la realización de las rectas se utilizaron tres patrones internos: nonano (EM 43, 57, 71, 85) para moléculas de volatilidad alta, tetradecano (EM

43, **57**, 71, 85) para moléculas de volatilidad intermedia y hexadecano (EM 41, 43, **57**, 71) para moléculas de volatilidad baja. Para cada biomolécula se eligieron 4 iones representativos y abundantes, uno para cuantificar (marcado en negrita) y los otros 3 para verificar que están en las proporciones adecuadas y que por tanto se trata de esa biomolécula. Cada biomolécula se relacionó con el patrón interno más similar en términos de volatilidad. Las rectas de calibrado obtenidas fueron expresadas como la relación de respuesta (respuesta de la biomolécula/respuesta del patrón interno), respecto a la relación de concentración (concentración de la biomolécula/concentración del patrón interno); de esta manera, el factor de corrección de cada biomolécula está incluido en la recta de calibrado. La desviación estándar relativa (DER) se calculó en base a la repetibilidad de 5 inyecciones de 2.5 mM de cada compuesto. Además, el límite de detección (LD) de cada biomolécula fue calculado como la concentración a la cual la relación señal/ruido es 3, y el límite de cuantificación (LC) como la concentración a la cual la relación señal/ruido es 10 (European-Pharmacopoeia, 2011). Para poder cuantificar una biomolécula, su relación señal/ruido tiene que estar por encima del LC y su área de pico dentro de la recta de calibrado. Por este motivo, se probaron varias diluciones de los AEs (entre 1:10 y la 1:1000) para poder cuantificar todas las biomoléculas.

Para la determinación de la composición de los AEs utilizados en el estudio de conservación de alimentos, la cromatografía se llevó a cabo en el equipo descrito anteriormente, acoplado a una columna capilar SupelcoWaxTM 10 (15 m de longitud x 0.1 mm de diámetro interno x 0.1 µm espesor de la fase estacionaria) de polietilenglicol con bajo sangrado. En este caso, el gas portador fue hidrógeno a un flujo de 0.6 ml/min, generando una presión en la cabeza de columna de 38 psi. La purga del septum y el *split* utilizado fueron los mismos que en el método anterior. La temperatura del inyector y la de la línea de transferencia al detector fue de 260 °C en este caso, ya que la temperatura máxima de la columna es de 280 °C. Durante el cromatograma, el horno comenzó a una temperatura de 60 °C durante 1 minuto y aumentó a 30 °C/min hasta alcanzar los 260 °C donde se mantuvo durante 1 min. El tiempo total del cromatograma fue de 8.67 min. Los parámetros de detección fueron similares a los descritos anteriormente, excepto que, en este caso, el comienzo de adquisición de datos

se realizó pasado 1 min desde la inyección. Una vez obtenidos los cromatogramas, se calcularon las áreas relativas de todas las biomoléculas presentes en los AEs analizados por triplicado.

3.4. Cromatografía de gases enantioselectiva-Espectrometría de masas (CGEs/EM)

Esta cromatografía permite la separación de los dos enantiómeros de las principales biomoléculas quirales presentes en los AEs. Para ello se realizaron cromatogramas con el cromatógrafo descrito en el apartado anterior, utilizando una columna Astec ChiralDEX B-DM de Supelco (30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.12 μm de espesor de la fase estacionaria). La fase estacionaria de esta columna está formada por 2,3-di-O-metil-6-t-butilsilil β -ciclodextrina, no unida covalentemente a la columna. Estas columnas son más sensibles a la presión y a los cambios bruscos de temperatura, por eso, se debe limitar la presión en la cabeza de la columna, así como la velocidad de subida y bajada de temperatura a un máximo de 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, siendo la temperatura máxima alcanzable 200 $^{\circ}\text{C}$.

El flujo de hidrógeno utilizado con esta columna fue de 2.5 ml/min, superior al utilizado con las columnas apolar y polar anteriormente detalladas, debido a que el diámetro interno de esta columna es mayor. La inyección se realizó en modo *split* 100:1, con inyección tipo sándwich y los siguientes volúmenes: 0.2 μL de aire, 0.2 μL de acetona, 0.2 μL de aire, 0.5 μL de muestra y 0.2 μL de aire, indicados desde el émbolo hasta el final de la aguja. La presión en la cabeza de columna con este flujo de hidrógeno fue de 8 psi, mientras que las temperaturas del inyector y de la línea de transferencia fueron ajustadas a 200 $^{\circ}\text{C}$. En esta cromatografía la temperatura inicial se ajustó a 35 $^{\circ}\text{C}$ llegando hasta los 170 $^{\circ}\text{C}$ a 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. El descenso de temperatura hasta los 35 $^{\circ}\text{C}$ iniciales se realizó a 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Los parámetros de detección fueron similares a los descritos en las cromatografías anteriores, siendo en este caso el retraso del disolvente de 1.4 min tras la inyección.

La determinación de las biomoléculas quirales se llevó a cabo por comparación con los tiempos de retención y los espectros de masas de

enantiómeros puros disponibles comercialmente y los de la base de datos espectral NIST-08 y Wiley-7. La preparación, inyección y análisis de las muestras se realizaron por triplicado, calculando con ello las distribuciones de los enantiómeros levorotatorio (-) y dextrorotatorio (+) en porcentaje.

3.5. Bioactividad antioxidante

En los distintos ensayos que se detallan a continuación fue necesaria la utilización de un espectrofotómetro de doble haz Perkin Elmer Lambda 35, controlado con el software UV-WinLab para los ensayos cinéticos en cubeta. Otros ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos utilizando, en estos casos, los lectores de placas Molecular Devices, SpectraMax 340PC y Gemini XPS para lecturas en el espectro visible y en el de fluorescencia, respectivamente. El calentamiento de las muestras en microtubos o en placas multipocillo se realizó en un agitador termostatzado Thermomixer Comfort de Eppendorf. Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga 5415D de Eppendorf.

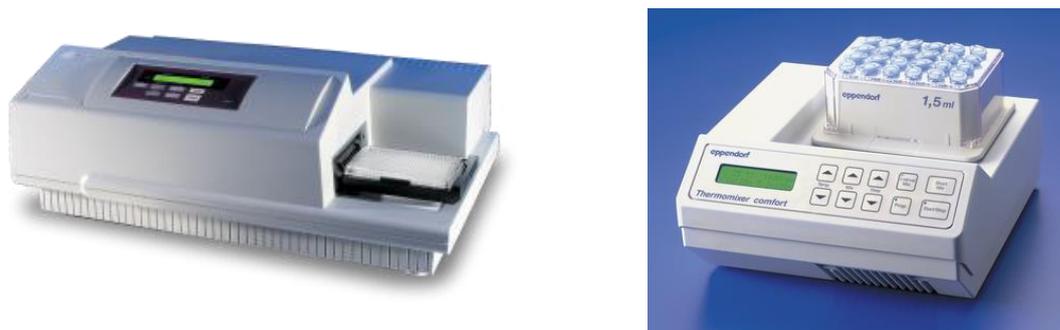


Figura 3.3. Lector de placas SpectraMax 340PC (izquierda) (www.moleculardevices.com) y Thermomixer comfort (derecha) (www.fishersci.co.uk)

Durante el desarrollo de esta tesis se han utilizado varios métodos complementarios para analizar en su conjunto la actividad antioxidante de los AEs analizados.

3.5.1. Método ORAC

Este método se llevó a cabo en placas de 96 pocillos negras opacas diseñadas para la lectura de fluorescencia. Cada pocillo contenía tampón fosfato 10 mM, pH 7.5, AAPH 200 mM, 1 μ M de fluoresceína y distintas concentraciones de AEs. Para la solubilización de los AEs se añadió 1% de etanol en todos los ensayos. Cada muestra fue evaluada por triplicado excitando a 485 nm y midiendo la emisión a 530 nm durante 60 min a 37 °C (Ou *et al.*, 2001; Ou *et al.*,

2002). Las concentraciones de stock de los AEs utilizadas fueron 1:10000 para salvias y romeros y 1:20000 para mejoranas.

Trolox fue usado como antioxidante de referencia, y los resultados fueron expresados en valores de capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) (mg equivalente de trolox (ET)/ g AE) según la Ecuación 3.1:

$$\text{ORAC} = \frac{AC_{\text{muestra}}^1 - AC^0}{AC_{\text{trolox}}^1 - AC^0} \times \frac{[\text{trolox}]}{[\text{muestra}]} \quad (3.1)$$

donde AC_{muestra}^1 y AC_{trolox}^1 es el área bajo la curva de fluorescencia en los pocillos con muestra y con trolox, respectivamente, siendo AC^0 el área bajo la curva del blanco (sin antioxidante).

3.5.2. Método DPPH

Las muestras de AEs a distintas concentraciones disueltas en metanol fueron añadidas en proporción 1:2 (v/v) a una disolución metanólica de DPPH• 100 μM (Brandwilliams *et al.*, 1995). Los ensayos fueron preparados en placa de 96 pocillos, e incubados durante 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras ese tiempo, la absorbancia fue medida a 517 nm.

La actividad reductora de los AEs contra el radical DPPH• se calculó mediante la siguiente Ecuación 3.2:

$$\text{Capacidad antioxidante} = \frac{A_{517}^0 - A_{517}^1}{A_{517}^0} \times 100 \quad (3.2)$$

donde A^0 y A^1 son las absorbancias de los pocillos control (conteniendo todos los reactivos excepto los antioxidantes) y de los que contienen los antioxidantes, respectivamente. De manera similar al método previamente descrito, los resultados fueron expresados en valores TEAC (mg ET/g AE).

3.5.3. Método ABTS

Para generar el ABTS•+ se utilizó persulfato potásico 2.5 mM. A un volumen de este persulfato se adicionó el mismo volumen de ABTS 7 mM, dejando transcurrir la reacción durante 12-16 h antes de su uso a temperatura ambiente. El ABTS•+ generado se diluyó en etanol hasta 0.035 mM que proporcionó una absorbancia aproximada de 0.7 mUA a 734 nm y 30 °C. Siete concentraciones de los AEs y del antioxidante de referencia (trolox) fueron

añadidos en relación 1:2 (v/v) a la disolución de ABTS^{•+} en una placa de 96 pocillos. La placa se incubó durante 6 min en oscuridad. La disminución de absorbancia producida por la capacidad antioxidante de los AEs fue medida a 734 nm (Re *et al.*, 1999). La capacidad antioxidante fue calculada siguiendo la Ecuación 3.2, y los resultados fueron expresados en valores TEAC (mg ET/g AE).

3.5.4. Método TBARS

En este método, la lecitina al 10% (m/v) en KCl (1.15% m/v) fue utilizada como medio rico en lípidos (Dorman *et al.*, 1995). La homogenización se realizó por agitación y ultrasonicación durante 5 min en baño y frío. El ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: en tubos se mezclaron 500 µl de la preparación de lecitina, 100 µl de los AEs a distinta concentración en metanol y 400 µl de agua. Después se añadieron 1.5 ml de ácido acético al 20% (v/v) en agua y 1.5 ml de TBA 0.8% (m/v) disuelto en SDS 1.1% (m/v). La reacción se llevó a cabo durante 60 min a 95 °C. Después de este periodo, se dejaron enfriar las muestras y se añadieron 5 ml de n-butanol. Se agitaron y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min para conseguir la separación de dos fases. La absorbancia del sobrenadante fue medida a 532 nm. La capacidad antioxidante (%) se calculó como se ha detallado previamente en la Ecuación 3.2, utilizando BHT como antioxidante de referencia, y expresando los resultados en mg de equivalentes de BHT (EBHT)/g AE.

3.5.5. Método de la potencia reductora (PR)

La medida de la capacidad de los AEs y sus biomoléculas para reducir el hierro (III) fue llevada a cabo por el método descrito por Oyaizu (1986): 0.3 ml de distintas concentraciones de AE fueron mezclados con 2.5 ml de tampón fosfato de sodio 200 mM pH 6.6 y 2.5 ml de ferricianuro potásico 1% m/v. La mezcla se incubó durante 20 min a 50 °C Después se añadieron 2.5 ml de ácido tricloroacético 10% m/v en agua para acidificar fuertemente el medio. Esta mezcla se centrifugó durante 10 min a 5000g. Después, 2.5 ml del sobrenadante se mezclaron con 2.5 ml de agua destilada y 0.5 ml de cloruro de hierro (III). Los AEs con potencia reductora forman ferrocianuro potásico, que reacciona con el hierro (III) formando el complejo azul de Prusia, el cual absorbe a 700 nm. El AA

se utilizó como referencia y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de AA (EAA)/kg de AE, siguiendo el procedimiento descrito en el método DPPH (Ecuación 3.2).

3.5.6. Método de la potencia quelatante (PQ)

Este método mide la PQ de los AEs sobre el ion Fe^{2+} (Miguel *et al.*, 2010). Los AEs preparados a distintas concentraciones fueron incubados en relación 1:1 con 2 mM de $FeCl_2$. La adición del mismo volumen de ferroZina 5 mM inició la reacción. Tras 10 min, el complejo formado entre el ion ferroso y ferroZina fue medido a 562 nm. EDTA se utilizó como control positivo, expresando los resultados como mg de equivalentes de EDTA (EEDTA)/g AE, siguiendo la Ecuación 3.2.

3.6. Bioactividad antienzimática

3.6.1. LOX

LOX o lipoxidasa de *Glycine max* (soja) fue adquirida a Sigma-Aldrich. Esta enzima es un homodímero de 108 kDa con pl de 5.65. El método utilizado en los ensayos enzimáticos fue descrito por Christopher *et al.* (1970). Las medidas de los ensayos de inhibición se llevaron a cabo en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 de doble haz a 25°C, controlado con el programa UV-Winlab. Las medidas espectrofotométricas se realizaron con dos cubetas de cuarzo de calidad QS, transparentes para longitudes de onda mayores de 195 nm, con recorrido óptico de 10 mm y un volumen total de 1 ml. Una cubeta con todos los componentes del medio de ensayo menos el sustrato y los inhibidores se utilizó como referencia, para substraer de forma automática las lecturas de la cubeta con los inhibidores. Las medidas se realizaron, como mínimo, por triplicado. Los AEs se probaron a 150 μ g/ml, ya que su baja solubilidad en el medio de reacción no permitió ensayar concentraciones superiores. Respecto a las biomoléculas individuales estudiadas, algunas de ellas como el 1,8-cineol, α -tuyona y borneol, se probaron a la concentración máxima que permitía la solubilidad, para calcular con ello el grado de inhibición (GI) (Ecuación 3.3).

$$GI(\%) = \frac{v_0 - v_1}{v_0} \times 100 \quad (3.3)$$

donde v_0 y v_1 son las velocidades en la porción lineal (velocidad del estado estacionario), en ausencia y en presencia de los inhibidores, respectivamente.

Las biomoléculas con mayor solubilidad o mayor capacidad inhibidora se ensayaron a 8 concentraciones distintas, para calcular con ellas el valor de concentración que proporciona un 50% de inhibición (IC_{50}). Los GI obtenidos se representaron frente a las concentraciones usadas en cada caso, para ajustarlas por regresión no lineal a una hipérbola rectangular de dos parámetros con la Ecuación 3.4:

$$GI(\%) = \frac{ID_{max} [I]_0}{IC_{50} + [I]_0} \quad (3.4)$$

El medio de reacción estaba compuesto por tampón borato 40 mM a pH 9.0, NaOH 4 mM, distintas concentraciones de inhibidor disuelto en acetonitrilo 10% (v/v) y ácido linoleico 20 μ M. El acetonitrilo se utilizó como codisolvente de gradiente cromatográfico-210, ya que no interfiere en la medida a 234 nm, y tampoco en la reacción enzimática a la concentración usada para los ensayos. La concentración de LOX usada fue 6.24 mU/mL, siendo una unidad (U) de actividad enzimática, la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de ácido linoleico por minuto. La K_M obtenida para esta enzima con ácido linoleico como sustrato fue de $40 \pm 6 \mu$ M. El NDGA fue utilizado como control positivo ($IC_{50} = 339.4 \pm 9.4 \mu$ M), el cual proporcionó una inhibición similar a la de estudios previos de otros autores (Kurihara *et al.*, 2014).

3.6.2. AChE

La AChE tipo-VI-S de *Electrophorus electricus* fue adquirida a Sigma-Aldrich. Esta enzima es un tetrámero compuesto por subunidades de 70 kDa, con pI de 5.5. Las medidas de actividad acetilcolinesterasa se realizaron en una placa de 96 pocillos a 25 °C, según el método descrito por Ellman *et al.* (1961).

Cada pocillo contenía tampón fosfato 50 mM a pH 8.0, distintas concentraciones de inhibidores disueltos en 5% de etanol, DTNB 0.3 mM, AChE 33.3 mU/ml disuelta en tampón Tris-clorhídrico 20 mM pH 7.5 (siendo una U la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de acetilcolina a colina y acetato por minuto con pH 8.0 a 37 °C). La reacción comienza al adicionar yoduro de acetiltiocolina (85 μ M en pocillo). La absorbancia se midió durante 10 min a 412

nm y 25 °C. Los ensayos de inhibición se realizaron a Km/2 (la Km calculada fue 0.17 mM), para permitir que los inhibidores accedieran al sitio activo de la enzima.

El hidrobromuro de galantamina se utilizó como inhibidor de referencia (IC₅₀ = 0.16 ± 0.02 µM). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Los valores de GI e IC₅₀ se calcularon según las ecuaciones anteriormente descritas para el ensayo de LOX (Ecuaciones 3.3 y 3.4).

3.7. Bioactividad antimicrobiana

3.7.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Los microorganismos utilizados para los ensayos de inhibición fueron adquiridos a Sigma-Aldrich: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Candida albicans* ATCC 10231. Como medios de cultivo se emplearon agar Mueller-Hinton (MHA), caldo Mueller-Hinton (MHB), el medio Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640), agar Sabouraud dextrosa (SDA), caldo triptona de soja (TSB) y caldo dextrosa-peptona-extracto de levadura (YPD). Los cultivos fueron almacenados a -80°C en TSB o YPD con 15% de glicerol, para bacterias y *Candida*, respectivamente. A partir de placas incubadas durante 18 - 24 horas, se seleccionaron colonias aisladas y se transfirieron a MHB para bacterias y RPMI-1640 para *C. albicans*, a fin de obtener la suspensión necesaria para los ensayos. Estas investigaciones se realizaron al menos por triplicado.

3.7.2. Determinación de la CMI y CMB o CMF

Los ensayos de bioactividad antimicrobiana se realizaron mediante los métodos de microdilución en placa de 96 pocillos descritos por el "Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)": M07-A10 (CLSI, 2015) para bacterias y M27-A3 (CLSI, 2008) para *Candida*. Diluciones seriadas fueron preparadas en placas de 96 pocillos, en un intervalo de concentraciones entre 0.08 y 20 µl/ml con 0.5% de tween 80 y 2.5% de DMSO. Las principales biomoléculas presentes en los AEs también se probaron individualmente mediante este método. El intervalo de concentración utilizado fue de 0.12 a 15 mM. Los cultivos microbianos se ajustaron a una concentración final de 2-8 x 10⁵ UFC/ml en MHB para bacterias y 0.5x10³ – 2.5x10³ UFC/ml en RPMI-1640 para levaduras. Las

placas multipocillo con los inhibidores (AEs o biomoléculas individuales), se incubaron durante 24 h para bacterias y 48 h para *Candida*, en ambos casos a 35 ± 1 °C, manteniendo condiciones aeróbicas y agitación a 100 rpm. Como antibacteriano y antifúngico de referencia se utilizaron estreptomycin (0.06-8 µg/ml) y fluconazol (0.13-16 µg/ml), respectivamente. Como control negativo, se incubaron por triplicado el disolvente de los inhibidores y los medios de cultivo sin inocular, para comprobar la esterilidad de los mismos. El control positivo se llevó a cabo mediante la incubación de los cultivos microbianos sin adicionar los inhibidores, para comprobar que se produce un adecuado crecimiento con la proporción de tween y DMSO utilizada para solubilizar los AEs y las biomoléculas. La CMI es la menor concentración de inhibidor a la cual no se observa crecimiento microbiano, después del periodo de incubación. Para calcular la CMB y CMF, 100 µl de cada pocillo sin crecimiento, obtenido en el ensayo de CMI, se inocularon por extensión en placas de MHA para bacterias o SDA para *Candida*. Estas placas se incubaron a 35 ± 1 °C durante 24 horas. La CMB y CMF es la concentración mínima de inhibidor que impide el crecimiento de los microorganismos en cultivo, y que no permite el crecimiento al pasarlos a placas de agar libres de inhibidores.

3.8. Inhibición microbiana en alimentos

3.8.1. Proceso de cortado, pesado y lavado en el tratamiento con agua clorada

Todas las frutas y verduras utilizadas en estos ensayos fueron adquiridas a un vendedor local el día de realización de los ensayos.

Se realizaron cinco formulaciones con mezcla de frutas y verduras:

- Formulación verde: kiwi, manzana, limón, espinacas, hinojo, menta, melisa y albahaca (44% fruta y 66% verdura).
- Formulación blanca: uva, manzana, limón, apio, hinojo, menta, melisa y jengibre fresco (50 % fruta y verdura).
- Formulación naranja: manzana, limón, zanahoria, tupinambo, hinojo, hierba luisa, estevia, cúrcuma y jengibre fresco (60% fruta y 40% verdura).

- Formulación roja: fresa, manzana, remolacha, tupinambo, zanahoria, hinojo y melisa (64% fruta y 36% verdura).

- Formulación violeta: arándanos, manzana, limón, lombarda, zanahoria violeta, remolacha, hinojo, melisa y jengibre fresco (67% fruta y 33% verdura).

Algunos de los ingredientes usados en estas formulaciones (cúrcuma, jengibre, tupinambo, apio, remolacha y espinacas), fueron prelavados en agua corriente durante 1 min, para eliminar restos de materia orgánica que impida el funcionamiento de los agentes antimicrobianos. Éstos y los demás ingredientes de las formulaciones fueron lavados en agua con 120 ppm de hipoclorito sódico durante 1 minuto, o con 0.5% ácido cítrico y 0.5% de ácido ascórbico durante 5 min. La temperatura del agua en ambos casos se ajustó a 6 - 8°C y con una relación 1:4 de producto en agua. Los alimentos tratados con agua clorada fueron las fresas, la remolacha (pelada y cortada), la lombarda (cortada), la zanahoria violeta (cortada), el apio (pelado y cortado), las espinacas, la melisa, la albahaca, la menta, la estevia y la hierba luisa. Los alimentos tratados con ácido cítrico y ascórbico fueron las manzanas (cortadas, sin el centro), el tupinambo (cortado), la zanahoria (cortada), el hinojo (cortado, sin el centro), la uva, el jengibre (cortado) y la cúrcuma (cortada). El kiwi se lavó con una disolución de lactato de calcio al 2% (m/v) durante 2 min para mantener la consistencia, el limón con agua corriente durante 2 min antes de cortarlo, y los arándanos no fueron tratados ya que se compraron como producto de IV gama.

Después de estos lavados, los alimentos fueron secados y las formulaciones confeccionadas con un total de 180 g en un contenedor de 300ml, cerrados con un film de propileno microperforado (15 μm de espesor, permeabilidad al O_2 2700 $\text{cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}$ / y al CO_2 8100 $\text{cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}$ / a presión atmosférica), y almacenados a 5 °C hasta su uso.

3.8.2. Proceso de cortado, pesado y lavado en el tratamiento con AEs

Las formulaciones de frutas y verduras descritas previamente se volvieron a elaborar sustituyendo, en este caso, el lavado con agua clorada por lavado con AEs. La elección de los AEs que se utilizaron para el lavado de cada alimento se realizó en base a las características organolépticas del producto final, utilizando etanol al 1% para conseguir la solubilización de los aceites en el agua de lavado.

La relación producto:agua fue la misma que en el apartado anterior. Los tratamientos de lavado se detallan a continuación:

- Manzana, fresas, uva y jengibre: lavado durante 5 min en agua con 0.5% ácido ascórbico, 0.5% ácido cítrico, 75 ppm citral y 75 ppm de AE de *C. medica*.

- Tupinambo, zanahoria, apio, hinojo (de las formulaciones blanca, naranja, roja y violeta) y cúrcuma: lavado durante 5 min con 0.5% ácido ascórbico, 0.5% ácido cítrico, 75 ppm de AE de *T. zygis* y 75 ppm de AE de *S. officinalis*.

- Remolacha y melisa (ambos de la formulación roja): lavado durante 1 min con 75 ppm de AE de *T. zygis* y 75 ppm de AE de *S. officinalis*.

- Espinacas, albahaca, menta, melisa (de las formulaciones verde, blanca y violeta): lavado durante 1 min en agua con 75 ppm de AE de *S. officinalis* y 75 ppm de AE de *M. piperita*.

- Hinojo (de la formulación verde): lavado durante 5 min en agua con 0.5% ácido ascórbico, 0.5% de ácido cítrico, 75 ppm de AE de *S. officinalis* y 75 ppm de AE de *M. piperita*.

- Hierba luisa y estevia: lavado durante 1 min en agua con 75 ppm de citral y 75 ppm de AE de *C. medica*.

- Lombarda y remolacha (de la formulación violeta): lavado durante 5 min en agua con 75 ppm de AE de *T. zygis* y 75 ppm de AE de *S. officinalis*.

- Kiwi: lavado durante 2 min en agua con 2% lactato de calcio, 75 ppm de citral y 75 ppm de AE de *C. medica*.

La distribución de los alimentos en los recipientes y el almacenado de los mismos se hizo siguiendo el mismo procedimiento que en la Sección 3.8.1.

3.8.3. Medida de la atmósfera en el interior de los recipientes y del pH de los extractos

Durante los días de ensayo, las concentraciones de O₂ y CO₂ en la atmósfera interna de los recipientes fueron medidas usando un medidor de gases YSI. Estas medidas proporcionaron información útil acerca de la respiración de

los frutos climatéricos, el crecimiento microbiano, la permeabilidad del film y la temperatura de almacenamiento.

Además, el pH de las preparaciones, después de haber sido trituradas, fue medido en un pH-metro Basic 20 (Crison Instruments, Barcelona, Spain). Esta medida proporcionó información acerca de qué microorganismos podían crecer en ese medio.

3.8.4. Recuento de la carga microbiana del producto

Mediante recuento en placa, durante los días de vida útil del producto, se determinaron las cargas microbianas de bacterias mesófilas totales, bacterias psicrótrofas, bacterias del ácido láctico, coliformes, levaduras y hongos. Para ello, el contenido de cada recipiente se vertió en una bolsa estéril, añadiendo agua fisiológica estéril (0.9% m/v NaCl) en relación 1:1 p/p. La muestra era machacada en un triturador (Stomacher 400) durante 120 s. Se realizaron diluciones seriadas de la muestra obtenida en el interior de cada bolsa, para cultivarlas en placas de agar con distintos medios de cultivo según el microorganismo a detectar. Para el recuento de bacterias mesófilas y psicrótrofas totales se utilizó el medio Recuento en Placa Agar (PCA) mediante siembra en superficie, con la diferencia de que las bacterias mesófilas se cultivaron durante 48 h a 25°C y las bacterias psicrótrofas durante 8 días a 10°C. Las levaduras y los hongos se sembraron de la misma forma, sobre extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD) durante 48 horas a 30°C. Las bacterias del ácido láctico se cultivaron en agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) durante 48 horas a 37°C y los coliformes totales en agar bilis y rojo violeta (VRBA) durante 24-48 horas a 37°C, ambos mediante la técnica de siembra en doble capa. Los medios de cultivo fueron adquiridos a Oxoid, y los ensayos microbiológicos se llevaron a cabo por triplicado.

3.9. Análisis estadístico

Los datos de media \pm desviación estándar de al menos tres réplicas, se analizaron mediante métodos estadísticos univariable y multivariable (Merthler and Reinhart, 2017). Los errores de las operaciones aritméticas fueron amplificados mediante las reglas de propagación de errores. Las cifras 0.0 presentes en las tablas representan valores menores de 0.05 unidades. Los

datos fueron analizados por ANOVA y las medias contrastadas mediante el test de Tukey HSD, considerando diferencias significativas para $p < 0.05$. En las tablas y en el texto, las diferencias significativas entre medias fueron representadas con diferentes letras, al lado del valor numérico. Mediante el análisis de componentes principales (ACP) y el análisis jerárquico de conglomerados (AJC) basado en la distancia euclídea, los AEs fueron agrupados por similitud de composición. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa Statistica (software.dell.com).

Resultados y Discusión

4. Estudio sobre aceites esenciales de *Thymus mastichina* (AETm)

4.1. Determinación de la composición mediante CGR-IE/EM

4.1.1. Composición de AEs de *T. mastichina* cultivada en Murcia

Los AEs fueron obtenidos mediante hidrodestilación, con porcentajes de rendimiento entre 1.8 y 2.6% (v/p). La concentración de las biomoléculas identificadas fue expresada en porcentaje de área total (identificado más del 98% del área total del cromatograma) y en concentración absoluta (superior al 95% del área total del cromatograma). El cálculo de concentración absoluta se realizó mediante rectas de calibrado, elaboradas con los compuestos comercialmente disponibles. Los parámetros específicos de cada recta de calibrado se encuentran detallados en la Tabla 4.1.

Todos los AEs de *T. mastichina* estudiados en esta tesis presentan dos biomoléculas principales, 1,8-cineol (38.8-74.0% del área total) y linalol (2.2-42.7% del área total). Los AETm-1, -2 y -3 presentan 1,8-cineol como biomolécula principal, mientras que el AETm-4 contiene alta concentración de linalol. Biomoléculas que se encuentran en todos los AEs a concentraciones relativamente altas son α -pineno, β -pineno y α -terpineol. Debido a la alta concentración de 1,8-cineol y linalol, los monoterpenos oxigenados son el grupo más abundante en estos AEs, de forma similar a otros estudios descritos anteriormente con AEs de *T. mastichina* de otros países (Fraternale *et al.*, 2003; Galego *et al.*, 2008; Miguel *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2007; Miguel *et al.*, 2005; Moldao-Martins *et al.*, 2004; Salgueiro *et al.*, 1997).

Para analizar semejanzas y diferencias entre los AEs y sus biomoléculas características, se muestran los resultados del ACP (Figuras 4.1 y 4.2). Los componentes principales (CP) 1, 2 y 3 representan un 64.73, 25.21 y 10.06% del total de la varianza, respectivamente. La gráfica de puntuación del CP 2 respecto al CP 1 (Figura 4.1(A)) muestra 3 conglomerados, siendo los AETm-1 y -3 clasificados en el mismo conglomerado. Cuando se añade el CP 3 respecto a los otros dos CPs (Figura 4.1(B)) se muestra mayor diferencia entre los AETm-1 y -3.

Tabla 4.1. Rectas de calibrado para el cálculo de las concentraciones absolutas de los compuestos comercialmente disponibles presentes en los AEs de *T. mastichina*.

Biomolécula	Rectas de calibrado ^a	R ²	Intervalo de calibrado (mM)	DER (%)	LD (mM)	LC (mM)	Proveedor	Referencia
Nonano	Patrón interno						SAFC	442694
(-)α-Pineno	y=1.241x-0.010	0.999	16.76-0.25	0.25	0.025	0.076	Fluka	80599
(+)Canfeno	y=0.587x-0.002	0.999	18.49-0.28	1.15	0.054	0.165	SAFC	w222909
Sabineno	y=-0.869x+0.027	0.999	16.31-0.61	2.73	0.091	0.277	Extrasynthese	5062 S
(-)β-Pineno	y=0.980x-0.013	0.999	17.16-0.26	0.88	0.026	0.078	ALDRICH	112089
Mirceno	y=0.5940x-0.0307	0.998	14.94-0.22	3.25	0.018	0.056	Fluka	64643
(-)Felandreno	y=0.395x-0.008	0.999	15.87-0.60	2.10	0.002	0.322	ALDRICH	77429
α-Terpineno	y=0.573x-0.018	0.999	15.75-0.59	1.72	0.002	0.453	ALDRICH	86473
p-Cimeno	y=2.580e-0.039	0.999	16.59-0.25	0.08	0.000	0.030	Aldrich	c121452
(+)Limoneno	y=0.716x-0.018	0.999	15.92-0.24	1.65	0.002	0.120	Fluka	62118
1,8-Cineol	y=0.356x+0.009	0.999	15.92-0.60	2.70	0.003	0.497	SAFC	w246506
γ-Terpineno	y=0.976x-0.026	0.999	16.46-0.25	0.72	0.001	0.062	Aldrich	223190
Hidrato de sabineno	y=0.558x-0.024	0.998	16.10-0.60	0.23	0.000	0.309	FLUKA	96573
Terpinoleno	y=0.644x-0.009	1.000	15.34-0.92	1.22	0.001	0.699	SAFC	W304603
(-)Linalol	y=0.4378x-0.026	0.997	14.66-0.55	1.53	0.002	0.309	Fluka	74856
Tetradecano	Patrón interno						SAFC	442708
(+)Alcanfor	y=0.2375ex-0.038	0.997	16.06-0.96	2.17	0.241	0.733	Alfa Aesar	A10708
(-)Borneol	y=0.3820-0.056	0.993	14.99-0.90	1.51	0.196	0.595	Alfa Aesar	A12684
(-)Terpinen-4-ol	y=0.3517x-0.012	1.000	15.95-0.96	1.47	0.239	0.727	Aldrich	11584
(+)α-Terpineol	y=0.218x+0.001	1.000	16.45-0.99	3.59	0.247	0.750	Fluka	83073
R(-)-Mirtenol	y=0.235x+0.005	1.000	16.87-2.53	1.97	0.440	1.337	SAFC	S37589-149
Acetato de linalilo	y=0.263x-0.013	0.998	11.97-1.80	3.03	0.449	1.365	SAFC	w263605
Geraniol	y=0.376x-0.023	0.999	15.04-0.90	1.85	0.295	0.896	SAFC	w250716
(-)Acetato de bornilo	y=0.380x+0.005	0.999	13.59-0.82	3.25	0.204	0.620	FLUKA	45855
(+)Acetato de α-terpinilo	y=0.369x-0.009	1.000	11.95-1.79	2.37	0.243	0.740	Aldrich	86487
Hexadecano	Patrón interno						Fluka	52209
(-)E-β-Cariofileno	y=0.048x+0.002	0.998	7.25-1.09	6.07	0.360	1.093	Aldrich	22075
α-Humuleno	y=0.731x-0.043	0.999	10.58-0.63	2.32	0.154	0.469	Aldrich	53675
Viridifloreno	y=0.034x-0.001	0.999	11.53-1.73	5.07	0.501	1.522	Aldrich	61770

^aRelación de respuesta vs. relación de concentración. El factor de corrección con el patrón interno está aplicado en cada recta. Cada patrón interno sirve de referencia para las biomoléculas descritas debajo del mismo.

Tabla 4.2. CGR para determinar la composición de AEs de *T. mastichina*.

N ^a	IRL ^b	IRL ^c	Biomolécula	Iones ^d (m/z)	[AETm-1]		[AETm-2]		[AETm-3]		[AETm-4]		MI
					(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	
1	928	927	α-Tuyeno	77, 91, 93, 136		0.1f ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1g ± 0.0	1,2,3
2	930	936	α-Pineno	77, 91, 93 , 121	109.4c ± 0.2	2.3g ± 0.0	128.0a ± 0.3	2.9e ± 0.0	112.5b ± 0.8	2.6f ± 0.0	65.6d ± 0.5	1.4h ± 0.0	1,2,3
3	943	954	Canfeno	79, 93 , 121, 136	42.0a ± 0.4	0.6f ± 0.0	31.2c ± 0.2	0.5g ± 0.0	40.7b ± 0.7	0.6e ± 0.0	10.3d ± 0.2	0.1h ± 0.0	1,2,3
4	964	975	Sabineno	77, 91, 93 , 136	103.8c ± 0.4	1.6g ± 0.0	117.4a ± 0.7	1.9e ± 0.0	105.1b ± 0.3	1.8f ± 0.0	50.0d ± 0.3	0.7h ± 0.0	1,2,3
5	970	983	β-Pineno	69, 79, 91, 93	169.4c ± 1.3	2.9g ± 0.0	205.6a ± 0.8	3.6e ± 0.0	176.5b ± 2.6	3.2f ± 0.0	104.2d ± 0.5	1.7h ± 0.0	1,2,3
6	979	989	Mirceno	41, 69 , 93, 121	63.4a ± 1.5	0.8e ± 0.0	62.7a ± 0.2	0.9e ± 0.0	54.5b ± 0.6	0.8f ± 0.0	35.4c ± 0.5	0.4g ± 0.0	1,2,3
7	999	1008	Felandreno	77, 93 , 119, 136	6.2b ± 0.2	tr	7.3a ± 0.6	tr	6.6ab ± 0.3	tr	2.3c ± 0.1	tr	1,2,3
8	1008	1017	α-Terpineno	91, 93 , 119, 121	20.5a ± 0.4	0.3e ± 0.0	12.9b ± 0.4	0.2f ± 0.0	12.4b ± 0.5	0.2f ± 0.0	5.0c ± 0.1	0.1g ± 0.0	1,2,3
9	1011	1024	p-Cimeno	91, 117, 119 , 121	15.4d ± 0.3	0.4g ± 0.0	23.3a ± 0.5	0.7e ± 0.0	18.9c ± 0.4	0.6f ± 0.0	20.9b ± 0.1	0.6f ± 0.0	1,2,3
10	1020	1030	Limoneno	67, 68 , 79, 93	110.0b ± 1.3	2.2e ± 0.0	220.1a ± 9.3	1.5g ± 0.2	228.7a ± 5.2	1.9f ± 0.1	47.7c ± 0.4	0.9h ± 0.0	1,2,3
11	1023	1035	1,8-Cineol	43, 81, 93 , 108	2297.4c ± 41.1	55.7g ± 0.2	2742.8a ± 39.0	74.0e ± 0.2	2585.8b ± 2.2	61.6f ± 0.0	1631.1d ± 29.2	38.8h ± 0.1	1,2,3
12	1034	1042	E-β-Ocimeno	79, 91, 93, 121,		1.4e ± 0.0		0.3h ± 0.0		1.1f ± 0.0		0.4g ± 0.0	1,2
13	1053	1056	γ-Terpineno	77, 91, 93 , 119	32.9a ± 0.4	0.5e ± 0.0	19.5b ± 0.5	0.4f ± 0.0	19.5b ± 0.3	0.4f ± 0.0	9.6c ± 0.0	0.2g ± 0.0	1,2,3
14	1070	1070	Hidrato de sabineno	77, 91, 93 , 121	10.0c ± 0.3	0.2f ± 0.0	12.2b ± 0.6	0.1g ± 0.0	12.8b ± 0.4	0.2f ± 0.0	21.5a ± 0.7	0.6e ± 0.0	1,2,3
15	1080	1087	Terpinoleno	91, 93 , 121, 136	10.8a ± 0.2	0.1e ± 0.0	8.2b ± 0.3	0.1f ± 0.0	8.6b ± 0.2	0.1ef ± 0.0	5.0c ± 0.0	0.1g ± 0.0	1,2,3
16	1081	1103	Linalol	41, 67, 69 , 93	1168.3b ± 34.6	18.5f ± 0.1	137.5d ± 4.1	2.2h ± 0.0	901.4c ± 22.2	13.3g ± 0.0	2357.9a ± 36.4	42.7e ± 0.1	1,2,3
17	1089	1105	Hotrienol	71, 82, 91, 119		0.5f ± 0.0		0.1h ± 0.0		0.3g ± 0.0		1.1e ± 0.1	1,2
18	1148	1145	Alcanfor	81, 95 , 108, 152	32.3a ± 0.2	0.2e ± 0.0	18.1b ± 0.6	0.1f ± 0.0	31.2a ± 0.3	0.2e ± 0.0	9.4c ± 0.7	tr	1,2,3
19	1162	1168	δ-Terpineol	41, 59, 79, 93		0.9f ± 0.0		1.0e ± 0.0		0.9g ± 0.0		0.8h ± 0.0	1,2
20	1174	1171	Borneol	79, 93, 95 , 110	51.9a ± 1.3	0.9e ± 0.0	40.2c ± 0.4	0.6f ± 0.0	48.7b ± 1.1	0.8e ± 0.0	14.0c ± 0.3	0.1g ± 0.0	1,2,3
21	1161	1179	Terpinen-4-ol	71, 86, 93 , 111	45.1a ± 0.4	0.9e ± 0.0	39.0b ± 1.0	0.8f ± 0.0	40.5b ± 1.0	0.9f ± 0.0	35.7c ± 0.5	0.7g ± 0.0	1,2,3
22	1192	1197	α-Terpineol	59, 67, 93 , 121	181.7a ± 2.5	3.1e ± 0.0	170.2b ± 0.8	3.1e ± 0.0	155.1c ± 2.7	2.8f ± 0.0	182.9a ± 1.6	3.1e ± 0.0	1,2,3
23	1215	1227	Nerol	41, 69, 79, 93		0.1f ± 0.0		0.1f ± 0.0		tr		0.1e ± 0.0	1,2
24	1237	1253	Acetato de linalilo	41, 69, 93 , 80	59.2b ± 0.6	1.0f ± 0.0	46.5c ± 0.6	0.8g ± 0.0	43.4d ± 0.5	0.7h ± 0.0	104.0a ± 0.9	1.7e ± 0.0	1,2,3
25	1238	1256	Geraniol	41, 69, 93, 121	14.0b ± 0.7	0.2f ± 0.0	9.2c ± 0.6	0.1g ± 0.0	9.7c ± 0.4	0.1g ± 0.0	20.0a ± 0.4	0.3e ± 0.0	1,2,3
26	1285	1284	Acetato de bornilo	79, 93 , 95, 121	13.9a ± 0.4	0.2e ± 0.0	8.9c ± 0.2	0.1f ± 0.0	13.2b ± 0.3	0.2e ± 0.0	1.7d ± 0.0	tr	1,2,3
27	1342	1312	Acetato de nerilo	79, 93, 107, 136		0.2g ± 0.0		0.4e ± 0.0		0.3f ± 0.0			1,2
28	1350	1345	Acetato de α-terpinilo	67, 68, 93 , 121	47.0a ± 0.1	0.8g ± 0.0	43.2b ± 0.5	1.2e ± 0.0	38.1c ± 0.5	1.1f ± 0.0	4.5d ± 0.0	0.1h ± 0.0	1,2,3
29	1360	1378	Acetato de geraniol	41, 69, 93, 121		0.3e ± 0.0		0.1g ± 0.0		0.2f ± 0.0		0.2f ± 0.0	1,2
30	1412	1403	α-Gurjuneno	105, 119, 161, 204		tr		tr		0.1e ± 0.0		tr	1,2

N ^a	IRL ^b	IRL ^c	Biomolécula	Iones ^d (m/z)	[AETm-1]		[AETm-2]		[AETm-3]		[AETm-4]		MI
					(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	
31	1421	1419	E-β-Cariofileno	41 , 91, 93, 133	108.7a ± 1.5	0.8f ± 0.0	51.9c ± 0.2	0.3h ± 0.0	111.0a ± 2.2	0.8e ± 0.0	97.3b ± 2.2	0.7g ± 0.0	1,2,3
32	1454	1459	α-Humuleno	80, 93 , 121, 204	2.1b ± 0.0	tr			2.3a ± 0.0	0.1e ± 0.0	1.9c ± 0.1	tr	1,2,3
33	1459	1463	Aromadendreno	91, 105, 161, 189		0.1e ± 0.0		0.1f ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1f ± 0.0	1,2
34	1471	1481	γ-Muuroleno	105, 119, 161, 204		0.1e ± 0.0		tr				0.1f ± 0.0	1,2
35	1473	1490	Viridifloreno	91, 105 , 107, 161	13.0a ± 0.9	tr	9.4b ± 0.3	0.1e ± 0.0	10.5ab ± 0.6	tr	11.4ab ± 1.7	0.1e ± 0.0	1,2,3
36	1476	1494	γ-Gurjuneno	91, 105, 161, 204		0.3e ± 0.0		0.1f ± 0.0		0.2e ± 0.0		0.1f ± 0.0	1,2
37	1494	1497	α-Muuroleno	91, 93, 119, 161		tr		tr		tr		tr	1,2
38	1500	1508	β-Bisaboleno	41, 69, 93, 204		tr		tr		tr		tr	1,2
39	1507	1511	γ-Cadineno	91, 105, 119, 161		0.1e ± 0.0		tr		0.1e ± 0.0		tr	1,2
40	1514	1517	δ-Cadineno	91, 119, 134, 161		0.1e ± 0.0		0.1f ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1f ± 0.0	1,2
41	1559	1556	Butirato de geranilo	69, 93, 121, 136		tr		tr		tr		tr	1,2
42	1569	1575	Espatuleno	119, 131, 159, 187		0.1g ± 0.0		tr		0.1f ± 0.0		0.1e ± 0.0	1,2
43	1575	1581	Óxido de cariofileno	41, 79, 91 , 109		0.1fg ± 0.0		tr		0.1f ± 0.0		0.1e ± 0.0	1,2
44	1594	1594	Viridiflorol	43, 109, 161, 204		0.1ef ± 0.0		0.1ef ± 0.0		0.1f ± 0.0		0.1e ± 0.0	1,2
Terpenos oxigenados:													
			Alcoholes			25.48		8.18		19.57		49.70	
			Cetonas			0.17		0.10		0.18		0.00	
			Aldehídos			0.00		0.00		0.00		0.00	
			Peróxidos			0.00		0.00		0.00		0.00	
			Ésteres			2.66		2.65		2.61		2.10	
			Éteres			55.72		73.25		61.65		38.87	
			Monoterpenos hidrocarbonados			13.31		13.05		13.39		6.71	
			Monoterpenos oxigenados			83.71		83.88		83.69		90.23	
			Sesquiterpenos hidrocarbonados			1.52		1.75		1.55		1.12	
			Sesquiterpenos oxigenados			0.32		0.29		0.32		0.44	
			Total terpenos hidrocarbonados			14.83		14.79		14.94		7.83	
			Total terpenos oxigenados			84.03		84.17		84.01		90.67	
			Biomoléculas no isoprenoides			0.00		0.00		0.00		0.00	

N^a = Número de referencia para el ACP. IRL^b = Índice de retención lineal obtenido a partir de las bases de datos NIST-08 y Wiley-7. IRL^c = Índice de retención lineal calculado a partir de una serie de n-alcános (C7-C30). ^d Los iones cuantificadores están marcados en negrita. MI = Método de identificación: 1 = mediante IRL, 2 = mediante comparación de espectros con NIST-08 y Wiley-7, 3 = mediante comparación con compuestos puros comerciales. tr = trazas (<0.1%).

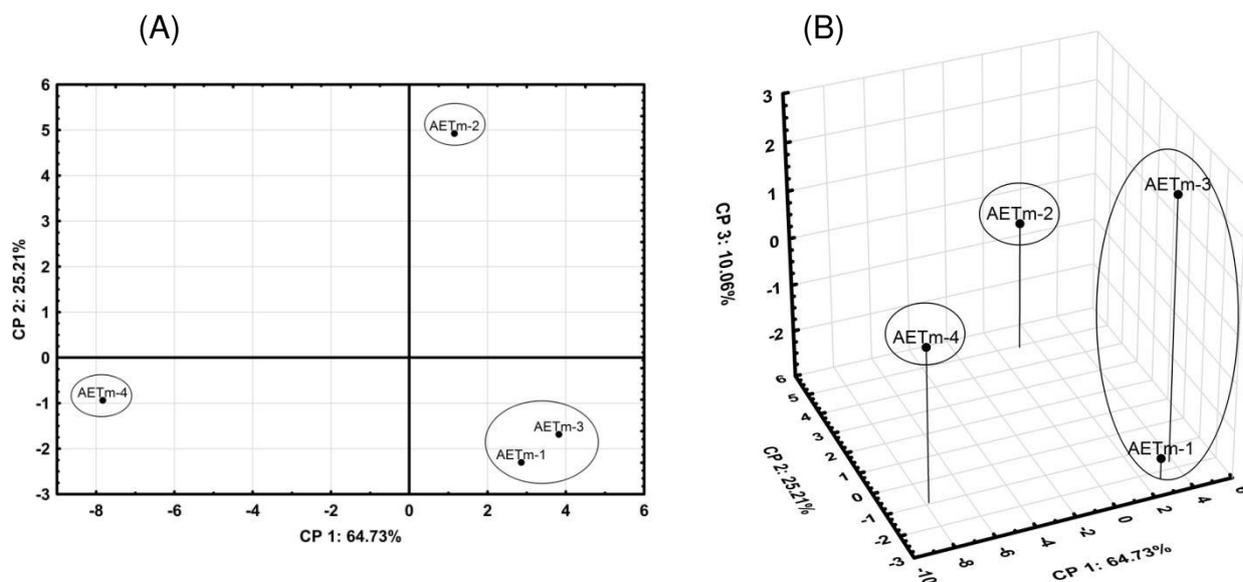


Figura 4.1. Gráficas de puntuación para los AEs de *T. mastichina*. (A) Gráfica de puntuación del CP 2 vs. CP1. (B) Gráfica de puntuación del CP 3 vs. CP 2 y CP 1.

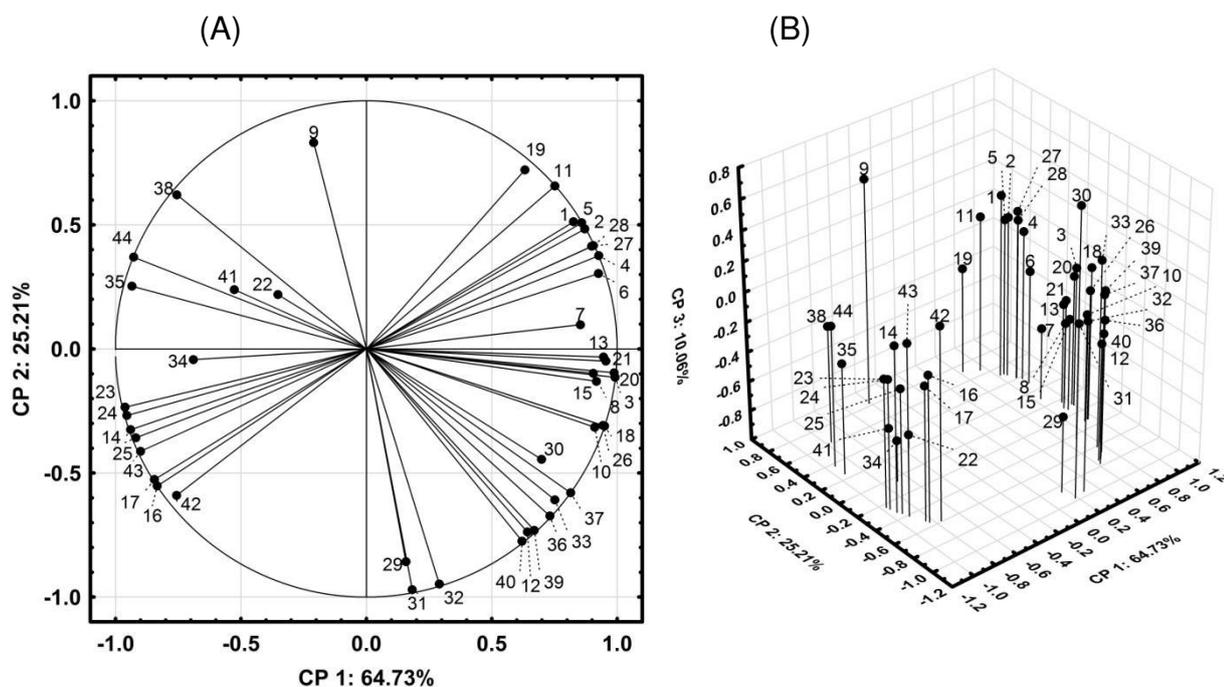


Figura 4.2. Gráficas de cargas para los AEs de *T. mastichina*. (A) Gráfica de cargas del CP 2 vs. CP 1. (B) Gráfica de cargas del CP 3 vs. CP 2 y CP 1.

La gráfica de cargas del CP2 vs. CP1 y la del CP3 vs. CP2 y CP1, muestran las biomoléculas características de cada conglomerado. Las cargas de las biomoléculas están estandarizadas. La carga alta en una biomolécula indica que dicha biomolécula es característica de un conglomerado, ya sea porque la concentración es superior que la que se encuentra en los AEs de otros conglomerados o porque la biomolécula no está presente en los otros AEs. Los

AETm-1 y -3 tienen una alta proporción de 1,8-cineol (11) y concentración media de linalol (16). Estos AEs muestran mayor concentración de β -ocimeno (12), E- β -cariofileno (31), γ -gurjuneno (36) y γ -cadineno (39) que los demás AEs de *T. mastichina*. El AETm-2 muestra concentraciones superiores de 1,8-cineol (11), β -pineno (5) y δ -terpineol (19) que el resto de AEs. El AETm-4 contiene alta proporción de linalol (16), hotrienol, (17) acetato de linalilo (24) y óxido de cariofileno (43).

Tras este análisis, se realiza el AJC con la totalidad de los datos de concentración relativa. En el dendrograma que deriva del análisis se muestran las similitudes entre los AEs, expresadas en porcentaje (Figura 4.3). Los AETm-1 y -3 tienen un porcentaje de similitud del 85.2%; este conglomerado presenta un 69.0% de similitud con el AETm-2 y un 44.9% de similitud con el AETm-4. Este análisis proporciona datos cuantitativos y nos permite determinar que estas muestras pueden agruparse en tres conglomerados: conglomerado 1 formado por los AETm-1 y -3, conglomerado 2 formado por el AETm-2 y el conglomerado 3 en el que se sitúa el AETm-4. Estos resultados coinciden con los descritos anteriormente en el ACP.

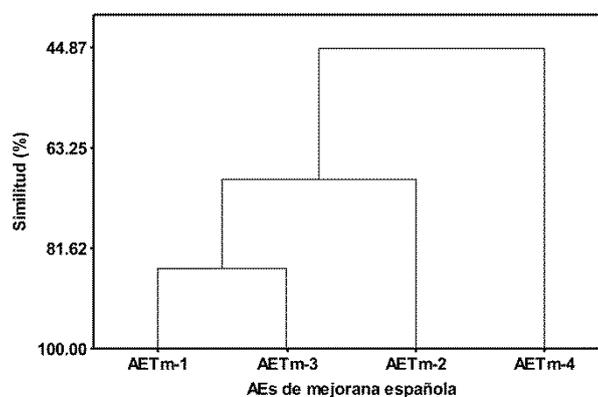


Figura 4.3. Dendrograma del AJC para los AEs de *T. mastichina*.

4.1.2. Comparativa con AEs de *T. mastichina* de otras regiones y países

Tras la revisión bibliográfica realizada, sólo se ha encontrado un estudio llevado a cabo con AEs de *T. mastichina* obtenidos a partir de plantas cultivadas en Castilla y León (España) (Delgado *et al.*, 2014). En este estudio, 1,8-cineol fue la biomolécula mayoritaria en los AEs de *T. mastichina*, constituyendo un 56.80 - 69.60% del área total del cromatograma. Comparando estos resultados con nuestro estudio, la concentración de 1,8-cineol en nuestros AEs de Murcia

presentan mayor variabilidad (Tabla 4.2). Al igual que en nuestro estudio, los porcentajes de α -pineno, β -pineno y α -terpineol fueron elevados en prácticamente todos los AEs estudiados. El máximo porcentaje de linalol alcanzado en este estudio fue 15.7%, inferior a los encontrados en los AETm-1 y -4 (Tabla 4.2).

Existen otros estudios llevados a cabo en Portugal (Bentes *et al.*, 2009; Miguel *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2007; Miguel *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2015; Moldao-Martins *et al.*, 2004; Salgueiro *et al.*, 1997) que muestran ciertas diferencias respecto a lo encontrado en los AEs de *T. mastichina* de Murcia. Un estudio (Bentes *et al.*, 2009) describe un AE de *T. mastichina* con 44% de 1,8-cineol y mayores concentraciones de alcanfor, borneol, canfeno, α -pineno y α -terpineol que en nuestros AEs. Otros autores (Miguel *et al.*, 2007; Salgueiro *et al.*, 1997) describieron AEs de *T. mastichina* con altos porcentajes de 1,8-cineol, aunque en algunos casos, este porcentaje fue inferior al de linalol y a los encontrados en nuestros AEs. Uno de los estudios realizado en Portugal (Miguel *et al.*, 2015) mostró altas concentraciones de p-cimeno, γ -terpineno, timol y carvacrol. Este estudio es el único que hemos encontrado en la bibliografía que describe timol y carvacrol en los AEs de esta especie.

Un AE de *T. mastichina* obtenido en Italia (Fraternale *et al.*, 2003) mostró concentraciones similares a las de este estudio, es decir, alta concentración de 1,8-cineol y linalol, seguida de α -pineno, β -pineno y α -terpineol.

4.1.3. Comparación con la normativa ISO

La organización internacional para la estandarización (ISO) establece el intervalo de concentraciones de las principales biomoléculas presentes en los AEs de *T. mastichina* (ISO, 2003) (Tabla 4.3). Comparando la composición de los AEs de este estudio con la normativa ISO, se puede observar que la composición de estos AEs se encuentra dentro de los intervalos establecidos, excepto en el caso de AETm-2, donde la concentración de linalol y β -cariofileno se encuentra ligeramente por debajo del intervalo, y la de 1,8-cineol por encima del mismo.

Tabla 4.3. Comparación de las composiciones de los AEs de *T. mastichina* con los intervalos establecidos por ISO.

Biomolécula	ISO-4728 ^a	AETm-1	AETm-2	AETm-3	AETm-4
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
α -Pinoeno	1.0 - 4.5	2.3	2.8	2.6	1.4
β -Pinoeno	2.0 - 5.0	2.9	3.6	3.2	1.7
Limoneno	1.0 - 6.0	2.2	1.6	1.9	0.9
1,8-Cineol	30.0 - 68.0	55.7	73.2	61.6	38.8
Linalol	3.0 - 48.0	18.5	2.1	13.3	42.7
Alcanfor	0.1 - 2.0	0.2	0.1	0.2	tr
δ -Terpineol	0.2 - 2.0	0.9	0.9	0.9	0.8
Borneol	0.1 - 1.8	0.9	0.6	0.8	0.1
Terpinen-4-ol	0.2 - 1.2	0.9	0.8	0.9	0.7
Acetato de linalilo	0.2 - 4.0	1.0	0.8	0.7	1.7
β -Cariofileno	0.5 - 1.5	0.8	0.3	0.8	0.7
α -Terpineol	1.0 - 5.0	3.1	3.1	2.8	3.1

^aEstándar ISO 4728 para mejorana española (*Thymus mastichina*) (ISO, 2003)

4.2. Cromatografía de gases enantioselectiva-espectrometría de masas

Durante este estudio se han analizado las distribuciones enantioméricas de los cuatro AEs de *T. mastichina* analizados (Tabla 4.4). El enantiómero (+) es el más abundante de las biomoléculas α -pinoeno, limoneno, hidrato de sabineno, terpinen-4-ol, α -terpineol, acetato de α -terpinilo y aromadendreno. El enantiómero (-) predomina en el caso de canfeno, linalol, acetato de bornilo, borneol y β -cariofileno. Todas las biomoléculas muestran la misma distribución enantiomérica excepto el (-)-linalol, mucho más abundante en los AETm-1 y -3 que en los AETm-2 y -4. Este es el primer estudio que proporciona una amplia determinación de los enantiómeros presentes en los AEs de esta especie.

Tabla 4.4. Distribución enantiomérica de las biomoléculas presentes en AEs de *T. mastichina* comercialmente disponibles.

t_R (min)		Biomolécula ^a	AETm-1		AETm-2		AETm-3		AETm-4	
(+)	(-)		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
7.58	7.36	α -Pinoeno	83.7	16.3	87.1	12.9	85.0	15.0	87.1	12.9
8.47	8.24	Canfeno	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0
8.687	8.934	β -Pinoeno	50.0	50.0	49.9	50.1	50.0	50.0	49.9	50.1
10.27	9.86	Limoneno	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0
14.11	14.36	Hidrato de sabineno	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0
15.6	15.33	Linalol	6.2	93.8	47.4	52.6	6.8	93.2	47.3	52.7
16.26	16.10	Alcanfor	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0
17.55	17.80	Acetato de bornilo	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0
18.13	18.29	Terpinen-4-ol	71.2	28.8	72.5	27.5	71.2	28.8	72.5	27.5
19.76	19.31	Borneol	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0
19.85	19.49	α -Terpineol	65.5	34.5	67.4	32.6	67.7	32.3	67.4	32.6
20.91	22.35	Acetato de α -terpinilo	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0

t _R (min)		Biomolécula ^a	AETm-1		AETm-2		AETm-3		AETm-4	
(+)	(-)		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
23.72	23.53	Aromadendreno	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0
-	22.56	β-Cariofileno	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0

^aLos resultados están expresados en %, siendo la desviación estándar menor del 5% en todos los casos.

4.3. Bioactividad antioxidante

4.3.1. ORAC

Las capacidades antioxidantes de los AEs se ordenan de mayor a menor como sigue (Tabla 4.5): AETm-4^{ORAC} > AETm-1^{ORAC} > AETm-3^{ORAC} > AETm-2^{ORAC}. Las bioactividades antioxidantes de las biomoléculas individuales fueron también determinadas, para intentar justificar las diferencias encontradas en los AEs, en base a sus diferencias de composición. Según los resultados, linalol, terpinen-4-ol, α-terpineol, acetato de linalilo y β-cariofileno son los que muestran mayor capacidad antioxidante en este método. Por tanto, en estos aceites, la diferencia de capacidad antioxidante se puede justificar por las diferencias de concentración de linalol y acetato de linalilo.

4.3.2. DPPH

Los resultados de la actividad contra el radical nitrogenado DPPH se muestran en la Tabla 4.5: AETm-4^{DPPH} > AETm-3^{DPPH} ≈ AETm-2^{DPPH} > AETm-1^{DPPH}. Las dos únicas biomoléculas que mostraron capacidad contra el radical DPPH fueron α-terpineno y γ-terpineno. Sin embargo, el AETm-4 tiene mayor capacidad antioxidante que el resto, lo que muestra que deben existir algunos efectos sinérgicos o antagonistas entre los componentes del AE.

Los resultados obtenidos para este método fueron mayores que los descritos previamente para AEs de *T. mastichina* de otras regiones de España (Delgado *et al.*, 2014) o de Portugal (Bentes *et al.*, 2009; Galego *et al.*, 2008).

4.3.3. ABTS

Los resultados obtenidos en este método se encuentran recogidos en la Tabla 4.5: AETm-1^{ABTS} > AETm-3^{ABTS} ≥ AETm-2^{ABTS} ≥ AETm-4^{ABTS}. De las biomoléculas individuales probadas, α-terpineno y γ-terpineno fueron las que presentaron una mayor capacidad antioxidante en este método (Tabla 4.5), lo que podría justificar la mayor actividad antioxidante del AETm-1.

4.3.4. TBARS

Los resultados obtenidos con este método fueron los siguientes (Tabla 4.5): $AETm-3^{TBARS} \approx AETm-1^{TBARS} \approx AETm-4^{TBARS} \approx AETm-2^{TBARS}$. Las actividades antioxidantes de todos los AEs de *T. mastichina* probados fueron similares, ya que no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. En este método de medida contra la oxidación lipídica, varias biomoléculas individuales mostraron actividad.

Estudios previos con AEs de Portugal (Bentes *et al.*, 2009; Galego *et al.*, 2008; Miguel *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2007) mostraron un 5-30% mayor capacidad antioxidante que los AEs de *T. mastichina* estudiados durante esta Tesis. Estos AEs, que no presentan compuestos fenólicos como timol y carvacrol, muestran menor capacidad antioxidante que aquellos en los que estos compuestos forman parte de su composición, como son los AEs de *Origanum vulgare* y *Thymbra capitata* (Galego *et al.*, 2008).

4.3.5. PQ

Los AEs de *T. mastichina* muestran las siguientes capacidades quelatantes de hierro (II) (Tabla 4.5): $AETm-2^{ChP} > AETm-4^{ChP} > AETm-3^{ChP} > AETm-1^{ChP}$. Son varias las biomoléculas individuales que presentan capacidad quelatante, entre las que destacan α -terpineno y linalol. En cambio, al considerar los AEs en su conjunto, algunos efectos sinérgicos o antagonistas pueden ocurrir, impidiendo la correlación directa entre mayor concentración de biomoléculas con capacidad quelatante y mayor actividad de los AEs.

Nuestros resultados son similares a los descritos previamente con AEs de *T. mastichina* cultivada en Portugal (Galego *et al.*, 2008). En cambio, otra investigación con AEs de *T. mastichina* de Portugal (Bentes *et al.*, 2009) no mostró actividad quelatante, empleando concentraciones de AEs similares a las de nuestro estudio.

Tabla 4.5. Bioactividad antioxidante de los AEs de *T. mastichina*.

AETm ^a /Biomolécula ^b	ORAC	DPPH	ABTS	TBARS	ChP
AETm-1	485.1b ± 23.8	0.1c ± 0.0	4.3a ± 0.1	1.2a ± 0.2	0.6d ± 0.0
AETm-2	163.5d ± 8.8	0.1b ± 0.0	0.9bc ± 0.0	0.9a ± 0.2	1.6a ± 0.1
AETm-3	371.8c ± 15.1	0.1b ± 0.0	1.0b ± 0.0	1.2a ± 0.2	0.8c ± 0.0
AETm-4	735.1a ± 35.4	0.1a ± 0.0	0.8c ± 0.1	1.0a ± 0.2	1.0b ± 0.0

AETm ^a /Biomolécula ^b	ORAC	DPPH	ABTS	TBARS	ChP
α -Pinoeno	N/D	N/D	N/D	2.6 \pm 0.1	16.6 \pm 1.1
Canfeno	N/D	N/D	0.1 \pm 0.0	N/D	1.6 \pm 0.1
β -Pinoeno	26.6 \pm 1.6	N/D	0.1 \pm 0.0	4.5 \pm 0.3	1.8 \pm 0.1
Mirceno	N/D	N/D	N/D	N/D	2.5 \pm 0.2
α -Terpinoeno	N/D \pm	0.3 \pm 0.0	4.0 \pm 0.2	N/D	62.2 \pm 4.7
p-Cimeno	N/D	N/D	0.1 \pm 0.0	N/D	20.1 \pm 1.6
Limoneno	128.0 \pm 10.8	N/D	0.6 \pm 0.0	N/D	5.9 \pm 0.4
1,8-Cineol	N/D	N/D	N/D	N/D	1.1 \pm 0.1
γ -Terpinoeno	171.4 \pm 10.3	0.3 \pm 0.0	2.5 \pm 0.1	43.8 \pm 3.9	0.3 \pm 0.0
Hidrato de sabineno	N/D \pm	N/D	0.5 \pm 0.0	14.6 \pm 0.6	6.7 \pm 0.6
Linalol	341.9 \pm 18.5	N/D	0.1 \pm 0.0	N/D	96.9 \pm 5.8
Alcanfor	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Borneol	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Terpinen-4-ol	356.0 \pm 13.6	N/D	0.3 \pm 0.0	8.3 \pm 1.8	1.7 \pm 0.1
α -Terpineol	310.0 \pm 16.6	N/D	0.2 \pm 0.0	2.6 \pm 0.1	4.9 \pm 0.3
Acetato de linalilo	207.1 \pm 13.2	N/D	0.1 \pm 0.0	4.3 \pm 0.1	27.4 \pm 2.1
Acetato de bornilo	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
β -Cariofileno	394.7 \pm 14.5	N/D	N/D	17.3 \pm 0.8	7.1 \pm 0.5

^aLos resultados de los AEs están expresados en las siguientes unidades: ORAC, DPPH Y ABTS (mg ET/g AETm), TBARS (mg EBHT/g AETm), PQ (mg EEDTA/g AETm). ^bLos resultados de las biomoléculas individuales están expresados en: ORAC, DPPH y ABTS (μ mol ET/mmol comp), TBARS (μ mol EBHT/mmol comp), PQ (μ mol EEDTA/mmol comp). N/D = Actividad antioxidante inferior a 0.05 unidades de las biomoléculas individuales, ensayadas a concentración máxima de 100 mM.

4.4. Inhibición enzimática

4.4.1. Inhibición de LOX

Los cuatro AEs de *T. mastichina* estudiados mostraron capacidad de inhibición de LOX. Debido a que en algunos casos no fue posible alcanzar más del 50% de inhibición, por problemas de solubilidad de los AEs en el medio de reacción, los resultados fueron expresados como GI (%) a 150 μ g/ml: AETm-1 (56.7 \pm 1.6%)^a > AETm-4 (47.6 \pm 1.5%)^b \approx AETm-2 (46.3 \pm 1.0%)^b > AETm-3 (40.8 \pm 1.0%)^c.

Al igual que en los ensayos de bioactividad antioxidante, en este caso también se probó la inhibición de las biomoléculas mayoritarias de forma individual. Las IC₅₀ obtenidas fueron: acetato de bornilo (379.6 \pm 14.4 μ M), limoneno (852.3 \pm 24.2 μ M), alcanfor (2743.4 \pm 85.1 μ M) y linalol (3345.5 \pm 44.2 μ M). Las biomoléculas que no alcanzaron 50% de inhibición, se describieron mediante el GI a una misma concentración (3333.3 μ M): 1,8-cineol (30.9 \pm 1.1%), terpinen-4-ol (29.6 \pm 1.0%) y α -terpineol (17.4 \pm 0.2%).

En estos aceites, aunque linalol no es el inhibidor más potente, es probable que la elevada concentración del mismo en el AETm-4, confiera a este AE alta capacidad inhibidora.

Los resultados de GI con AEs de *T. mastichina* de Murcia (España) son mayores que los descritos previamente para AEs de *T. mastichina* de Portugal (Aazza *et al.*, 2016; Albano *et al.*, 2012).

4.4.2. Inhibición de AChE

La inhibición de AChE fue descrita en términos de IC₅₀ (µg/ml) obteniendo los siguientes resultados: AETm-1 (57.5 ± 2.8)^c < AETm-2 (71.1 ± 3.1)^b ≈ AETm-3 (72.3 ± 2.0)^b < AETm-4 (117.2 ± 5.6)^a.

Además, como en los casos anteriores, la inhibición de los AEs se comparó con la de sus biomoléculas individuales. De todas las biomoléculas probadas, 1,8-cineol fue el inhibidor más potente (IC₅₀ = 228.3 ± 9.9 µM). α-Pineno mostró menor inhibición (IC₅₀ = 3274.5 ± 58.2 µM), mientras que las inhibiciones de canfeno y terpinen-4-ol tuvieron que ser descritas como concentración de compuesto que produce 15% GI (311.2 ± 27.3 µM para canfeno y 3776.0 ± 247.1 µM para terpinen-4-ol). Los AETm-1, -2 y -3 contienen mayor concentración de 1,8-cineol que el AETm-4, lo que les confiere mayor capacidad inhibidora.

La IC₅₀ descrita por algunos autores para AEs de *T. mastichina* cultivada en Portugal (Aazza *et al.*, 2016; Albano *et al.*, 2012), fue similar a la encontrada en los AEs de nuestra investigación.

4.5. Conclusiones

Este estudio proporciona un mayor conocimiento sobre la composición, la distribución enantiomérica de las biomoléculas volátiles principales, así como las bioactividades antioxidantes, antienzimáticas y antimicrobianas de AEs de *T. mastichina* cultivados en la Región de Murcia.

Los cuatro AEs de *T. mastichina* analizados poseen 1,8-cineol o linalol como biomolécula más abundante (los AETm-1, -2, y -3 tienen 1,8-cineol como biomolécula mayoritaria y el AETm-4, linalol principalmente). Los monoterpenos oxigenados son los compuestos predominantes en estos AEs, debido al alto

porcentaje que representan las biomoléculas 1,8-cineol y linalol. Otros compuestos que se encuentran en altas proporciones en todos los AEs son α -pineno, β -pineno y α -terpineol. El ACP y el AJC establecen tres conglomerados, basados en las composiciones relativas de estos AEs: (1) formado por AETm-1 y -3; (2) formado por AETm-2; (3) formado por el AETm-4.

No se han encontrado estudios previos que analicen la distribución enantiomérica de los principales compuestos presentes en los AEs de esta especie. Las biomoléculas α -pineno, limoneno, hidrato de sabineno, terpinen-4-ol, α -terpineol, acetato de α -terpinilo y aromadendreno, se encontraron en su mayoría en forma de enantiómero dextrógiro (+), al contrario que las biomoléculas canfeno, linalol, alcanfor, acetato de bornilo, borneol y β -cariofileno.

Todos los AEs de *T. mastichina* mostraron bioactividad antioxidante en los métodos ensayados, siendo las biomoléculas linalol, acetato de linalilo, α -terpineno y γ -terpineno, las responsables de la mayoría de las actividades antioxidantes encontradas, aunque en los métodos DPPH y PQ se evidenciaron la existencia de algunos efectos sinérgicos o antagonistas.

En cuanto a las bioactividades de inhibición enzimática, todos los AEs mostraron inhibición de LOX y AChE. En el ensayo de inhibición de LOX, los compuestos acetato de bornilo y limoneno mostraron una potente inhibición de LOX. Sin embargo, linalol, aunque es menos activo, puede ser determinante para la capacidad inhibidora del AETm-4 debido a su alta concentración. En cuanto a la inhibición de AChE, la biomolécula individual con mayor capacidad inhibidora de todas las ensayadas fue el 1,8-cineol, por lo que los AETm-1, -2 y -3 son los que mostraron mayor capacidad inhibidora.

4.6. Bibliografía

- Aazza, S., El-Guendouz, S., Miguel, M.G., Antunes, M.D., Faleiro, M.L., Correia, A.I., and Figueiredo, A.C. (2016). Antioxidant, anti-inflammatory and anti-hyperglycaemic activities of essential oils from *Thymbra capitata*, *Thymus albicans*, *Thymus caespitius*, *Thymus carnosus*, *Thymus lotocephalus* and *Thymus mastichina* from Portugal. *Natural Product Communications* 11, 1029-1038.
- Albano, S.M., Lima, A.S., Miguel, M.G., Pedro, L.G., Barroso, J.G., and Figueiredo, A.C. (2012). Antioxidant, anti-5-lipoxygenase and antiacetylcholinesterase activities of essential oils and decoction waters of

- some aromatic plants. *Records of Natural Products* 6, 35-48.
- Bentes, J., Miguel, M.G., Monteiro, I., Costa, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., and Pedro, L.G. (2009). Antioxidant activities of the essential oils and extracts of portuguese *Thymbra capitata* and *Thymus mastichina*. *Italian Journal of Food Science* 21, 183-195.
- Delgado, T., Marinero, P., Asensio-S-Manzanera, M.C., Asensio, C., Herrero, B., Pereira, J.A., and Ramalhosa, E. (2014). Antioxidant activity of twenty wild Spanish *Thymus mastichina* L. populations and its relation with their chemical composition. *Lwt-Food Science and Technology* 57, 412-418.
- Fraternale, D., Giamperi, L., and Ricci, D. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil obtained from *in vitro* plants of *Thymus mastichina* L. *Journal of Essential Oil Research* 15, 278-281.
- Galego, L., Almeida, V., Gonçalves, V., Costa, M., Monteiro, I., and Matos, F. (2008). Antioxidant activity of the essential oils of *Thymbra capitata*, *Origanum vulgare*, *Thymus mastichina*, and *Calamintha baetica* (International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium).
- ISO (2003). Oil of Spanish wild marjoran (*Thymus mastichina* L.). International Organization for Standardization *ISO 4728:2003*.
- Miguel, G., Simoes, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., and Carvalho, L. (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry* 86, 183-188.
- Miguel, M.G., Costa, L.A., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., and Pedro, L.G. (2007). Assessment of the antioxidant ability of *Thymus albicans*, *T. mastichina*, *T. camphoratus* and *T. carnosus* essential oils by TBARS and micellar model systems. *Natural Product Communications* 2, 399-406.
- Miguel, M.G., Falcato-Simoes, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.M.G., Pedro, L.G., and Carvalho, L.M. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of *Thymbra capitata*, *Thymus mastichina* and *Thymus camphoratus* essential oils. *Journal of Food Lipids* 12, 181-197.
- Miguel, M.G., Gago, C., Antunes, M.D., Megias, C., Cortes-Giraldo, I., Vioque, J., Lima, A.S., and Figueiredo, A.C. (2015). Antioxidant and antiproliferative activities of the essential oils from *Thymbra capitata* and *Thymus* species grown in Portugal. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 851721..
- Moldao-Martins, M., Beirao-da-Costa, S., Neves, C., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., and Beirao-da-Costa, M.L. (2004). Olive oil flavoured by the essential oils of *Mentha x piperita* and *Thymus mastichina* L. *Food Quality and Preference* 15, 447-452.
- Salgueiro, L.R., Vila, R., Tomas, X., Canigual, S., DaCunha, A.P., and Adzet, T. (1997). Composition and variability of the essential oils of *Thymus* species from section *Mastichina* from Portugal. *Biochemical Systematics and Ecology* 25, 659-672.

5. Estudio sobre aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (AERo)

5.1. Determinación de la composición mediante CGR-IE/EM

5.1.1. Composición de AEs de *R. officinalis* cultivada en Murcia

El rendimiento de destilación obtenido a partir de plantas de *R. officinalis* fue de 0.8 - 1.1 % (v/p). Las composiciones de los AEs de *R. officinalis* estudiados mediante CG/EM se expresaron como concentración absoluta, calculada mediante rectas de calibrado con los compuestos principales comercialmente disponibles (Tabla 5.1), y concentración relativa calculada como porcentaje de área del cromatograma. Los resultados se detallan en la Tabla 5.2. Todas las biomoléculas identificadas superaron el 99% de área total del cromatograma, de los cuales más del 97% fueron, además, expresadas como concentración absoluta. Los resultados mostraron que el 1,8-cineol es la biomolécula mayoritaria en todos los aceites, seguido de alcanfor, α -pineno y canfeno. Otras biomoléculas (β -pineno, mirceno, p-cimeno, limoneno y borneol) también se encuentran en concentraciones relativamente altas, pero inferiores a las de las biomoléculas detalladas previamente.

Mediante el ACP se determina la similitud existente entre los distintos AEs de *R. officinalis* y sus biomoléculas. Los tres componentes principales que se obtienen en el análisis (CP 1, CP 2 y CP 3) recogen el 52.98%, 20.64% y 9.92% de la varianza total, respectivamente, siendo la varianza acumulada del 83.54%. En la Figura 5.1(A) la gráfica de puntuación muestra tres posibles conglomerados (AERCa-1/AERCa-3/AERCa-2, AERCa-4 y AERCi-1/AERCi-2). Estos conglomerados se observan también en el gráfico tridimensional, cuando se incluye el CP 3 en el eje Z. Estos conglomerados poseen diferentes concentraciones de algunas biomoléculas "características" que permiten establecer las diferencias entre ellos. Utilizando los resultados que se muestran en la gráfica de cargas estandarizadas (Figura 5.2) y los datos de composición mostrados en la Tabla 5.2, se determina que el primer conglomerado, formado por los AEs AERCa-1/AERCa-2/AERCa-3, posee altas proporciones de canfeno (4) y bajos porcentajes de 3-careno (12) y α ,p-dimetilestireno (21). El AERCa-4

se clasifica en un segundo conglomerado por contener concentraciones medias de γ -terpineno (17), terpinen-4-ol (25), verbenona (28) y α -humuleno (33), así como bajo porcentaje de fenchona (20). Los AEs que se encuentran en estos dos conglomerados contienen hasta el doble de porcentaje de alcanfor que los restantes AEs (AERCi-1/AERCi-2), por ello, estos AEs se encuentran clasificados dentro del bioquimiotipo alcanfor (AERCa). El tercer conglomerado formado por los AERCi-1/AERCi-2 se caracteriza, sobre todo, por contener hasta el doble de porcentaje de 1,8-cineol (16) que los otros 4 AEs, además de altas concentraciones de β -cariofileno (32) y alo-aromadendreno (34).

Mediante el AJC se obtienen valores cuantitativos de similitud utilizando todos los datos de composición de los AEs (Tabla 5.2). Los resultados se encuentran representados en forma de dendrograma (Figura 5.3). Los AERCa-1 y -3 son los más similares (94.2%) seguidos de AERCa-2 (85.2%), sugiriendo que el primer conglomerado está formado por AERCa-1/AERCa-2/AERCa-3, similar a lo obtenido en el ACP (Figura 5.1). El segundo conglomerado que consta de un AE (AERCa-4) muestra una similitud del 76.6% respecto a los tres AEs anteriores. Considerando su composición (Tabla 5.2), estos cuatro AEs se encuentran englobados dentro del bioquimiotipo alcanfor, y muestran una gran diferencia de composición respecto a los dos AEs restantes (12.7%). Los AERCi-1 y -2 son muy similares entre sí (87.4%) y constituyen el tercer conglomerado, cuya composición (Tabla 5.2) indica que corresponde al bioquimiotipo 1,8-cineol.

5.1.2. Comparativa con AEs de *R. officinalis* de otras regiones y países

Varios estudios previos han descrito la composición de AEs de *R. officinalis* obtenidos en diferentes países. Algunos autores describieron las composiciones de AEs de *R. officinalis* cultivados en otras regiones de España, con porcentajes de α -pineno, 1,8-cineol y alcanfor similares a los encontrados en los AEs analizados en este estudio (Jordan *et al.*, 2013; Laborda *et al.*, 2013). Las concentraciones de estas biomoléculas también fueron similares a las de otros AEs de *R. officinalis* de otros países (Prakash *et al.*, 2015; Roldan *et al.*, 2010). Los AEs de *R. officinalis* de Marruecos y Túnez contienen un alto porcentaje de 1,8-cineol (Hosni *et al.*, 2013; Tahri *et al.*, 2014). Este bioquimiotipo fue también descrito por otros autores con AEs de Grecia (Papageorgiou *et al.*, 2008), Turquía (Orhan *et al.*, 2008), Serbia (Raskovic *et al.*, 2014) y Brasil (da

Silva Bomfim *et al.*, 2015). Altos porcentajes de α -pineno fueron descritos en AEs de *R. officinalis* cultivados en Italia (Beretta *et al.*, 2011), Etiopía (Mekonnen *et al.*, 2016) y Argelia (Bousbia *et al.*, 2009), mientras que dos estudios con AEs de Italia (Angioni *et al.*, 2004; Pintore *et al.*, 2002) mostraron altas concentraciones de borneol y acetato de bornilo. El estudio de Napoli *et al.* (2010) describió AEs de *R. officinalis* de Sicilia encuadrados en otro bioquimiotipo distinto, caracterizado por un alto contenido en verbenona.

Los AEs de *R. officinalis* pertenecientes al bioquimiotipo alcanfor muestran un porcentaje de terpenos hidrocarbonados ligeramente superior que el de terpenos oxigenados (excepto el AERCa-4). Sin embargo, los AERCi-1 y AERCi-2 muestran mayor concentración de terpenos oxigenados, debido al elevado porcentaje de 1,8-cineol que contienen. En estudios previos sobre AEs de otros países, existe variabilidad al respecto. Los monoterpenos oxigenados fueron el grupo más abundante en algunos estudios (Ben Jemia *et al.*, 2015; Guerra-Boone *et al.*, 2015; Tuttolomondo *et al.*, 2015), mientras que los monoterpenos hidrocarbonados fueron los más abundantes en otros (Beretta *et al.*, 2011; Mekonnen *et al.*, 2016).

Según la búsqueda bibliográfica realizada sobre AEs de *R. officinalis*, este es el primer estudio que detalla la composición absoluta (expresada en mM) de los principales compuestos comercialmente disponibles. El porcentaje de área es una medida relativa, depende del resto de biomoléculas, por lo que una concentración relativa puede corresponder a una mayor o menor concentración absoluta dependiendo del área del resto de biomoléculas. En este estudio, algunos AEs que muestran mayores concentraciones relativas de α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol y alcanfor, poseen menores concentraciones absolutas de los mismos. Por esto, es necesario conocer la concentración absoluta de las biomoléculas principales de los AEs, para asegurar su calidad en futuras aplicaciones.

Tabla 5.1. Rectas de calibrado para el cálculo de las concentraciones absolutas de los compuestos comerciales de los AEs de *R. officinalis*.

Biomolécula	Rectas de calibrado ^a	R ²	Intervalo de calibrado (mM)	DER (%)	LD (mM)	LC (mM)	Proveedor	Referencia
Nonano	Patrón interno						SAFC	442694
(-)- α -Pino	$y=1.272x-0.008$	0.999	10.06-0.25	0.97	0.025	0.076	Fluka	80599
(+)-Canfeno	$y=0.728x+0.001$	0.999	11.09-0.28	0.56	0.054	0.165	SAFC	w222909
Sabineno	$y=-0.796x+0.022$	0.999	9.78-0.61	1.08	0.091	0.277	Extrasynthese	5062 S
(-)- β -Pino	$y=1.053x-0.010$	1.000	10.29-0.26	1.26	0.026	0.078	Fluka	80609
Mirceno	$y=0.675x-0.011$	0.999	8.97-0.22	1.41	0.018	0.056	Fluka	64643
(-)-Felandreno	$y=0.528x-0.008$	0.999	9.52-0.60	1.60	0.106	0.322	ALDRICH	bcb8659
α -Terpineno	$y=0.591x-0.024$	0.999	15.75-0.59	1.27	0.149	0.453	ALDRICH	86473
p-Cimeno	$y=2.709x-0.003$	0.999	9.95-0.25	1.08	0.010	0.030	Aldrich	c121452
(+)-Limoneno	$y=1.308x-0.026$	0.999	9.55-0.24	0.98	0.039	0.120	Fluka	62118
1,8-Cineol	$y=0.523x-0.008$	1.000	9.55-0.60	1.55	0.164	0.497	SAFC	w246506
γ -Terpineno	$y=0.906x-0.018$	0.999	9.87-0.25	1.04	0.020	0.062	Aldrich	223190
Hidrato de sabineno	$y=0.562x-0.013$	0.999	9.66-0.60	3.17	0.102	0.309	FLUKA	96573
Terpinoleno	$y=0.618x-0.021$	0.999	15.34-0.92	0.69	0.230	0.699	SAFC	W304603
(-)-Linalol	$y=0.471x-0.009$	0.999	8.80-0.55	3.13	0.102	0.309	Fluka	74856
Tetradecano	Patrón interno						SAFC	442708
(+)-Alcanfor	$y=0.090x-0.007$	0.999	9.64-0.96	0.86	0.241	0.733	Alfa Aesar	A10708
(-)-Borneol	$y=0.154x-0.002$	0.999	8.99-0.90	1.93	0.196	0.595	Alfa Aesar	A12684
(-)-Terpinen-4-ol	$y=0.285x-0.009$	0.999	9.57-0.96	3.59	0.239	0.727	Aldrich	11584
(+)- α -Terpineol	$y=0.169x$	0.998	9.87-0.99	1.97	0.247	0.750	Fluka	83073
Verbenona	$y=0.112x+0.003$	0.999	9.88-2.47	7.99	0.749	2.276	Aldrich	218251
(-)-Acetato de bornilo	$y=0.355x-0.001$	0.999	13.59-0.82	1.65	0.204	0.620	FLUKA	45855
(-)-E- β -Cariofileno	$y=0.094x+0.003$	0.999	6.35-1.09	2.49	0.360	1.093	Sigma	22075
α -Humuleno	$y=0.416x-0.011$	0.999	6.35-0.63	1.85	0.154	0.469	ALDRICH	53675
Hexadecano	Patrón interno						Fluka	52209
Óxido de cariofileno	$y=0.067x+0.008$	0.999	17.66-6.62	2.23	1.855	5.638	SAFC	w509647

^a Relación de respuesta vs. relación de concentración. El factor de corrección con el patrón interno está aplicado en cada recta. Cada patrón interno sirve de referencia para las biomoléculas descritas debajo del mismo. DER = Desviación estándar relativa. LD = límite de detección. LC = límite de cuantificación.

Tabla 5.2(A). CGR para determinar la composición de AEs de *R. officinalis* bioquimiotipo alcanfor.

N ^a	IRL ^b	IRL ^c	Biomolécula	Iones ^d (m/z)	[AERCa-1]		[AERCa-2]		[AERCa-3]		[AERCa-4]		MI
					(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	
1	928	926	α-Tuveno	77, 91, 93, 136		0.5f ± 0.0		0.5g ± 0.0		0.6e ± 0.0		0.5f ± 0.0	1,2
2	930	936	α-Pineno	77, 91, 93 , 121	1500.0a ± 17.3	25.1g ± 0.1	1494.3a ± 56.9	28.2e ± 0.2	1396.9b ± 13.3	25.9f ± 0.2	1044.7c ± 15.5	19.5h ± 0.2	1,2,3
3	940	950	α-Fencheno	79, 93, 121, 136		0.1e ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1f ± 0.0	1,2
4	943	953	Canfeno	79, 93 , 121, 136	771.4b ± 17.1	11.2f ± 0.0	732.3b ± 26.3	10.7g ± 0.0	850.6a ± 24.5	12e ± 0.1	672.3c ± 13.1	9.3h ± 0.1	1,2,3
5	957	956	MMBH	65, 91, 92, 119		0.3f ± 0.0		0.3h ± 0.0		0.3g ± 0.0		0.4e ± 0.0	1,2
6	964	974	Sabineno	77, 91, 93 , 136	1.9b ± 0.1	tr	1.7b ± 0.1	tr	2.9a ± 0.2	tr	2.8a ± 0.1	tr	1,2,3
7	970	982	β-Pineno	69, 79, 91, 93	197.0a ± 5.0	2.4g ± 0.0	102.6d ± 1.6	1.9h ± 0.0	182.8b ± 1.9	3.3e ± 0.0	151.2c ± 0.6	2.7f ± 0.1	1,2,3
8	979	984	3-Octanona	43, 57, 72, 99		0.1fg ± 0.0		0.3e ± 0.1		0.1g ± 0.0		0.2f ± 0.0	1,2
9	979	989	Mirceno	41, 69 , 93, 121	232.7a ± 6.1	3e ± 0.1	97.1d ± 3.0	1.5g ± 0.1	195.7b ± 2.7	3.0e ± 0.0	125.4c ± 0.5	1.9f ± 0.0	1,2,3
10	985	999	3-Octanol	41, 55, 59, 83		tr		tr				tr	1,2
11	999	1008	Felandreno	77, 93 , 119, 136	38.3a ± 1.1	0.4e ± 0.0	10.4d ± 0.6	0.1g ± 0.0	19.1c ± 0.7	0.2f ± 0.0	23.2b ± 0.4	0.2f ± 0.0	1,2,3
12	1000	1010	3-Careno	77, 91, 93, 121		0.6e ± 0.0		0.5g ± 0.0		0.6f ± 0.0		0.2h ± 0.0	1,2
13	1008	1017	α-Terpineno	91, 93 , 119, 121	30.6a ± 0.9	0.5e ± 0.0	8.7d ± 0.4	0.1h ± 0.0	13.6c ± 0.5	0.2g ± 0.0	27.6b ± 0.2	0.4f ± 0.0	1,2,3
14	1011	1024	p-Cimeno	91, 117, 119 , 121	90.2d ± 1.9	2.3h ± 0.0	127.9b ± 1.0	3.0f ± 0.0	107.3c ± 1.0	2.7g ± 0.0	152.2a ± 0.1	3.6e ± 0.0	1,2,3
15	1020	1028	Limoneno	67, 68 , 79, 93	239.1a ± 6.0	4.7e ± 0.1	132.0b ± 0.6	4.3g ± 0.1	132.3b ± 3.0	4.6f ± 0.0	123.8b ± 0.4	4.0h ± 0.0	1,2,3
16	1023	1032	1,8-Cineol	43, 81, 93 , 108	984.6b ± 45.4	21.5g ± 0.2	1070.4a ± 10.0	24.7e ± 0.2	976.4b ± 7.8	21.4g ± 0.0	1086.5a ± 23.6	23.3f ± 0.3	1,2,3
17	1053	1055	γ-Terpineno	77, 91, 93 , 119	38.0b ± 0.6	0.7f ± 0.0	9.8d ± 0.4	0.2h ± 0.0	18.4c ± 0.7	0.3g ± 0.0	53.3a ± 0.5	1.0e ± 0.0	1,2,3
18	1070	1071	Hidrato de sabineno	77, 91, 93 , 121	1.7c ± 0.2	tr			2.1b ± 0.1	tr	2.5a ± 0.1	tr	1,2,3
19	1080	1086	Terpinoleno	91, 93 , 121, 136	33.0a ± 0.3	0.5e ± 0.0	12.2c ± 0.6	0.2h ± 0.0	17.8b ± 0.2	0.3g ± 0.0	32.0a ± 0.7	0.5f ± 0.0	1,2,3
20	1083	1092	Fenchona	69, 81, 109, 152								0.3 ± 0.0	1,2
21	1081	1092	α,4-Dimetilestireno	91, 115, 117, 132		0.1e ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1e ± 0.0			1,2
22	1081	1105	Linalol	41, 67, 69 , 93	45.4b ± 1.2	0.8ef ± 0.0	51.1a ± 0.4	0.8e ± 0.0	45.6b ± 0.2	0.8f ± 0.0	39.2c ± 1.0	0.6g ± 0.0	1,2,3
23	1148	1147	Alcanfor	81, 95 , 108, 152	1214.9b ± 84.2	16.0f ± 0.4	2329.7a ± 95.5	15.0f ± 0.5	1092.8b ± 52.5	15.3f ± 0.0	1247.3b ± 136.0	19.8e ± 0.7	1,2,3
24	1174	1173	Borneol	79, 93, 95 , 110	221.7a ± 9.2	2.5e ± 0.1	202.0b ± 5.2	2.1f ± 0.1	182.0c ± 2.7	2.0f ± 0.2	214.1ab ± 11.1	2.0f ± 0.1	1,2,3
25	1161	1180	Terpinen-4-ol	71, 86, 93 , 111	39.0c ± 1.4	0.8f ± 0.0	48.0b ± 2.0	0.7g ± 0.0	40.1c ± 0.9	0.7g ± 0.0	55.5a ± 2.7	1.0e ± 0.0	1,2,3
26	1190	1191	trans-Dihidrocarveol	93, 107, 121, 136		0.1e ± 0.0				0.1e ± 0.0		0.1e ± 0.0	1,2
27	1192	1198	α-Terpineol	59, 67, 93 , 121	94.7b ± 2.3	1.4e ± 0.0	101.1b ± 4.2	1.3f ± 0.0	92.7b ± 2.3	1.1g ± 0.0	115.5a ± 6.3	1.5e ± 0.0	1,2,3
28	1204	1210	Verbenona	91 , 107, 135, 150	81.5b ± 5.0	1.1f ± 0.0	94.4b ± 8.6	0.8g ± 0.1	105.9b ± 6.3	0.8f ± 0.0	206.9a ± 16.3	1.9e ± 0.1	1,2,3
29	1285	1285	Acetato de bornilo	79, 93 , 95, 121	27.7c ± 0.9	0.6f ± 0.0	27.3c ± 0.1	0.5g ± 0.0	61.1b ± 0.6	1.2e ± 0.0	64.5a ± 0.7	1.2e ± 0.0	1,2,3
30	1360	1364	α-Ylangeno	93, 105, 119, 161		0.1f ± 0.0		0.1g ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1h ± 0.0	1,2
31	1376	1370	α-Copaeno	91, 105, 119, 161		tr		0.1 ± 0.0		tr		tr	1,2

N ^a	IRL ^b	IRL ^c	Biomolécula	Iones ^d (m/z)	[AERCa-1]		[AERCa-2]		[AERCa-3]		[AERCa-4]		MI
					(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	
32	1421	1417	E-β-Cariofileno	41, 91, 93, 133	79.7c ± 5.9	1.6f ± 0.0	77.2c ± 2.5	1.3g ± 0.0	90.1b ± 1.4	1.6f ± 0.0	102.3a ± 2.0	1.8e ± 0.1	1,2,3
33	1454	1457	α-Humuleno	80, 93, 107, 204	13.8b ± 0.2	0.5f ± 0.0	12.9b ± 0.2	0.4fg ± 0.0	13.2b ± 1.1	0.3g ± 0.0	41.4a ± 0.5	1.6e ± 0.1	1,2,3
34	1455	1477	Alo-Aromadendreno	91, 105, 161, 189		tr		tr		tr		tr	1,2
35	1494	1480	α-Muuroleno	91, 93, 119, 161		0.1e ± 0.0		tr		0.1e ± 0.0		tr	1,2
36	1500	1505	β-Bisaboleno	41, 69, 93, 204		0.1e ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1e ± 0.0	1,2
37	1507	1510	γ-Cadineno	91, 105, 119, 161		tr		tr				tr	1,2
38	1514	1517	δ-Cadineno	91, 119, 134, 161		0.1e ± 0.0		0.1ef ± 0.0		tr		0.1ef ± 0.0	1,2
40	1544	1541	α-Calacoreno	115, 142, 157, 200		tr							1,2
41	1575	1579	Óxido de cariofileno	41, 79, 91, 109	4.6c ± 0.4	0.1g ± 0.0	6.4b ± 0.3	0.1fg ± 0.0	7.4a ± 0.3	0.1ef ± 0.0	6.6ab ± 0.6	0.1e ± 0.0	1,2,3
Terpenos oxigenados:													
			Alcoholes			5.6		4.8		4.7		5.2	
			Cetonas			17.0		15.8		16.1		22.0	
			Aldehídos			0.0		0.0		0.0		0.0	
			Peróxidos			0.0		0.0		0.0		0.0	
			Ésteres			0.6		0.5		1.2		1.2	
			Éteres			21.5		24.8		21.5		23.3	
			Monoterpenos hidrocarbonados			52.6		51.9		54.2		44.4	
			Monoterpenos oxigenados			44.8		45.8		43.4		51.7	
			Sesquiterpenos hidrocarbonados			2.5		2.1		2.3		3.7	
			Sesquiterpenos oxigenados			0.1		0.1		0.1		0.1	
			Total terpenos hidrocarbonados			55.1		54.0		56.5		48.1	
			Total terpenos oxigenados			44.8		45.8		43.5		51.8	

N^a = Número de referencia para el ACP. IRL^b = Índice de retención lineal obtenido a partir de las bases de datos NIST-08 y Wiley-7. IRL^c = Índice de retención lineal calculado a partir de una serie de n-alcenos (C7-C30). ^d Los iones cuantificadores están marcados en negrita. MI = Método de identificación: 1 = mediante IRL, 2 = mediante comparación de espectros con NIST-08 y Wiley-7, 3 = mediante comparación con compuestos puros comerciales. tr = trazas (<0.1%). MMBH: 4-Metileno-1-(1-metiletil) biciclo [3.1.0]hex-2-eno.

Tabla 5.2(B). CGR para determinar la composición de AEs de *R. officinalis* bioquimiotipo 1,8-cineol.

N ^a	IRL ^b	IRL ^c	Biomolécula	Iones ^d (m/z)	[AERCi-1]		[AERCi-2]		MI
					(mM)	(%)	(mM)	(%)	
1	928	926	α-Tuyeno	77, 91, 93, 136		0.3d ± 0.0		0.4c ± 0.0	1,2,3
2	930	936	α-Pineno	77, 91, 93 , 121	872.4a ± 28.1	14.9c ± 0.4	548.5b ± 4.9	13.1d ± 0.1	1,2,3
3	940	950	α-Fencheno	79, 93, 121, 136		0.1d ± 0.0		0.1c ± 0.0	1,2
4	943	953	Canfeno	79, 93 , 121, 136	396.6a ± 10.8	5.1c ± 0.1	319.6b ± 7.5	4.8d ± 0.0	1,2,3
5	957	956	MMBH	65, 91, 92, 119		0.1c ± 0.0		0.1d ± 0.0	1,2
6	964	974	Sabineno	77, 91, 93 , 136	3.7b ± 0.0	tr	6.4a ± 0.1	tr	1,2,3
7	970	982	β-Pineno	69, 79, 91, 93	202.9b ± 5.6	3.8d ± 0.1	380.8a ± 5.5	6.5c ± 0.0	1,2,3
9	979	989	Mirceno	41, 69 , 93, 121	73.1a ± 2.3	1.2c ± 0.0	71.0a ± 1.3	0.9d ± 0.0	1,2,3
11	999	1008	Felandreno	77, 93 , 119, 136	14.6a ± 0.1	0.1c ± 0.0	6.9b ± 0.3	0.1d ± 0.0	1,2,3
12	1000	1010	3-Careno	77, 91, 93, 121		0.1d ± 0.0		0.1c ± 0.0	1,2,
13	1008	1017	α-Terpineno	91, 93, 119 , 121	16b ± 0.1	0.2d ± 0.0	20.6a ± 0.9	0.3c ± 0.0	1,2,3
14	1011	1024	p-Cimeno	91, 117, 119, 121	83.2a ± 2.1	2.3c ± 0.1	56.4b ± 0.4	1.5d ± 0.0	1,2,3
15	1020	1028	Limoneno	67, 68 , 79, 93	178.7b ± 6.6	1.9d ± 0.2	280.7a ± 9.0	3.6c ± 0.1	1,2,3
16	1023	1032	1,8-Cineol	43, 81, 93 , 108	2369.0a ± 101.2	49.2d ± 0.2	1802.7a ± 19.2	49.9c ± 0.1	1,2,3
17	1053	1055	γ-Terpineno	77, 91, 93 , 119	19.5b ± 0.5	0.4d ± 0.0	22.0a ± 0.5	0.4c ± 0.0	1,2,3
18	1070	1071	Hidrato de sabineno	77, 91, 93 , 121	3.7a ± 0.2	tr	3.3b ± 0.1	tr	1,2,3
19	1080	1086	Terpinoleno	91, 93 , 121, 136	11.5b ± 0.1	0.2c ± 0.0	14.2a ± 0.1	0.2c ± 0.0	1,2,3
21	1081	1092	α,4-Dimetilestireno	91, 115, 117, 132		tr		tr	1,2
22	1081	1105	Linalol	41, 67, 69 , 93	49.5a ± 3.2	0.9c ± 0.1	42.6b ± 0.9	0.6d ± 0.0	1,2,3
23	1148	1147	Alcanfor	81, 95 , 108, 152	785.8b ± 18.2	10.4c ± 0.5	898.6a ± 5.5	10.0c ± 0.1	1,2,3
24	1174	1173	Borneol	79, 93, 95 , 110	110.9a ± 7.1	1.2d ± 0.1	104.9a ± 0.2	1.6c ± 0.1	1,2,3
25	1161	1180	Terpinen-4-ol	71, 86, 93 , 111	30.6a ± 2.1	0.5c ± 0.0	23.3b ± 1.3	0.4d ± 0.0	1,2,3
27	1192	1198	α-Terpineol	59, 67, 93 , 121	86.5a ± 5.3	1.4c ± 0.1	80.6a ± 1.4	1.3d ± 0.0	1,2,3
28	1204	1210	Verbenona	91, 107, 135, 150	11.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0			1,2,3
29	1285	1285	Acetato de bornilo	79, 93 , 95, 121	17.5b ± 0.1	0.4d ± 0.0	28.8a ± 0.4	0.7c ± 0.0	1,2,3
30	1360	1364	α-Ylangeno	93, 105, 119, 161		0.1c ± 0.0		0.1d ± 0.0	1,2
31	1376	1370	α-Copaeno	91, 105, 119, 161		0.2c ± 0.0		0.1d ± 0.0	1,2
32	1421	1417	E-β-Cariofileno	41 , 91, 93, 133	168.5a ± 1.9	3.6c ± 0.2	106.9b ± 5.2	2.3d ± 0.0	1,2,3
33	1454	1457	α-Humuleno	80, 93 , 107, 204	11.4a ± 0.2	0.3c ± 0.0	8.7b ± 0.0	0.2d ± 0.0	1,2,3

N ^a	IRL ^b	IRL ^c	Biomolécula	Iones ^d (m/z)	[AERCi-1]		[AERCi-2]		MI
					(mM)	(%)	(mM)	(%)	
34	1455	1477	Alo-Aromadendreno	91, 105, 161, 189		0.1c ± 0.0		0.1d ± 0.0	1,2
35	1494	1480	α-Muuroleno	91, 93, 119, 161		tr		tr	1,2
36	1500	1505	β-Bisaboleno	41, 69, 93, 204		tr		tr	1,2
37	1507	1510	γ-Cadineno	91, 105, 119, 161		0.1c ± 0.0		tr	1,2
38	1514	1517	δ-Cadineno	91, 119, 134, 161		0.1c ± 0.0		0.1d ± 0.0	1,2
39	1521	1519	E-Calameneno	144, 159, 160, 183		tr		tr	1,2
41	1575	1579	Óxido de cariofileno	41, 79, 91 , 109	8.0a ± 0.3	0.1c ± 0.0	5.7b ± 0.5	0.1d ± 0.0	1,2,3
Terpenos oxigenados:									
						4.1		3.9	
						10.5		10.0	
						0.0		0.0	
						0.0		0.0	
						0.4		0.7	
						49.3		49.9	
						30.9		32.2	
						64.1		64.5	
						4.6		2.9	
						0.1		0.1	
						35.5		35.1	
						64.2		64.6	

N^a = Número de referencia para el ACP. IRL^b = Índice de retención lineal obtenido a partir de las bases de datos NIST-08 y Wiley-7. IRL^c = Índice de retención lineal calculado a partir de una serie de n-alcenos (C7-C30). ^d Los iones cuantificadores están marcados en negrita. MI = Método de identificación: 1 = mediante IRL, 2 = mediante comparación de espectros con NIST-08 y Wiley-7, 3 = mediante comparación con compuestos puros comerciales. tr = trazas (<0.1%). MMBH: 4-Metileno-1-(1-metiletil) biciclo [3.1.0]hex-2-eno.

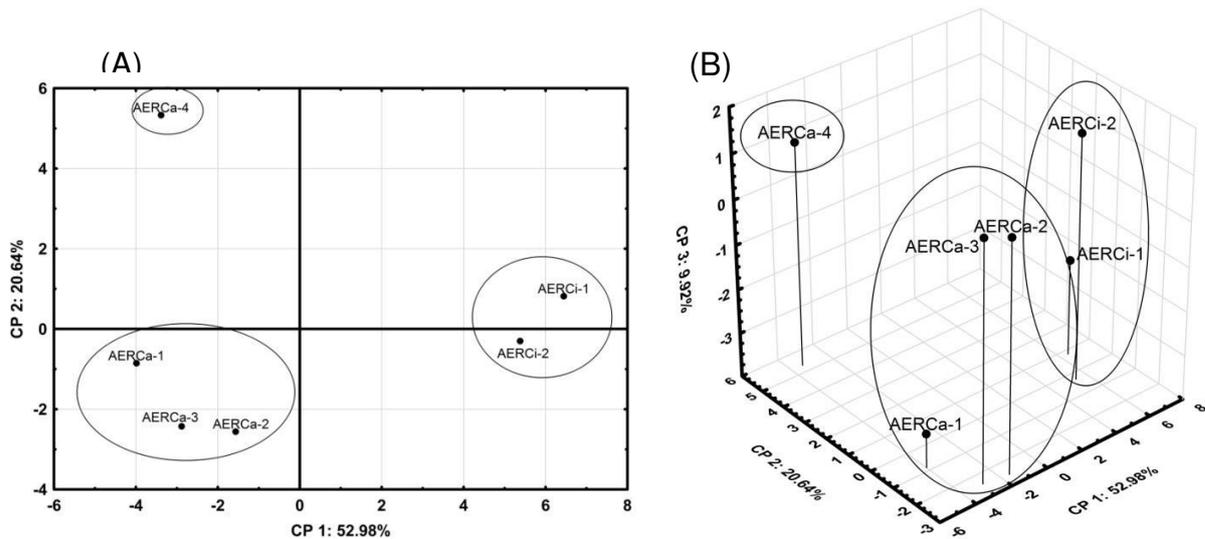


Figura 5.1. Gráficas de puntuación para los AEs de *R. officinalis*. (A) Gráfica de puntuación del CP 2 vs. CP1. (B) Gráfica de puntuación del CP 3 vs. CP 2 y CP 1.

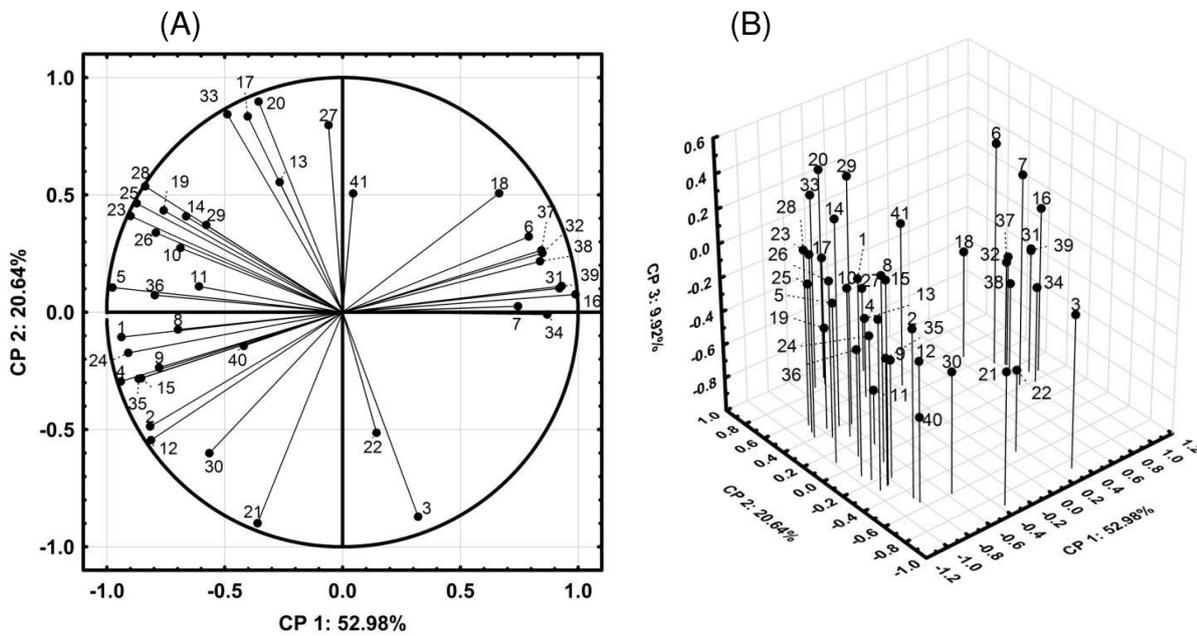


Figura 5.2. Gráfica de cargas para los AEs de *R. officinalis*. (A) Gráfica de cargas del CP 2 vs. CP 1. (B) Gráfica de cargas del CP 3 vs. CP 2 y CP 1.

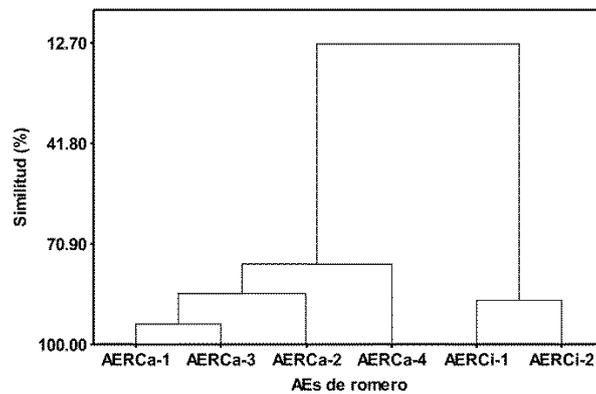


Figura 5.3. Dendrograma del AJC para los AEs de *R. officinalis*.

5.1.3. Comparación con la normativa ISO

La Tabla 5.3 muestra la comparación entre las concentraciones de los AEs analizados y los intervalos establecidos por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO, 2012) para AEs bioquimiotipo alcanfor y la Farmacopea Europea (European-Pharmacopoeia, 2008) para AEs bioquimiotipo 1,8-cineol. En términos generales, las composiciones de estos AEs se encuentran dentro de los intervalos establecidos por estas dos normativas, aunque algunos AEs muestran porcentajes ligeramente superiores de α -pineno y 1,8-cineol. AERCa-2 y -4 muestran cantidades ligeramente inferiores de mirceno. Los AEs de *R. officinalis* descritos en estos estudios, podrían comercializarse internacionalmente.

Tabla 5.3. Comparación de las composiciones de los AEs de *R. officinalis* con los intervalos establecidos por ISO.

Biomolécula	ISO-1342 ^a (%)	AERCa-1 (%)	AERCa-2 (%)	AERCa-3 (%)	AERCa-4 (%)	EP-1846 ^b (%)	AERCi-1 (%)	AERCi-2 (%)
α -Pineno	18.0-26.0	27,5	30,5	28,1	22,0	9.0-14.0	16,2	13,9
Canfeno	7.0-13.0	12,3	11,6	13,0	10,5	2.6-6.0	5,6	5,2
β -Pineno	2.0-5.0	2,6	2,0	3,6	3,0	4.0-9.0	4,2	7,0
Mirceno	2.5-4.5	3,2	1,6	3,3	2,1	1.0-2.0	1,4	1,0
Limoneno	2.5-5.5	5,2	4,7	5,0	4,5	1.5-4.0	2,1	3,9
1,8-cineol	16.0-23.0	23,6	26,8	23,3	26,2	38.0-55.0	53,4	53,1
p-Cimeno						0.8-2.5	2,5	1,6
Alcanfor	12.5-22.0	17,5	16,3	16,7	22,4	5.0-15.0	11,3	10,7
Linalol	0.5-2.5	0,9	0,9	0,8	0,7			
Acetato de bornilo	0.5-2.5	0,7	0,5	1,3	1,3	0.1-1.5	0,4	0,7
Terpinen-4-ol	0.4-1.5	0,9	0,7	0,7	1,1			
Borneol	1.0-4.5	2,7	2,2	2,2	2,2	1.5-5.0	1,3	1,7
α -Terpineol	1.0-4.0	1,6	1,4	1,2	1,7	1.0-2.6	1,5	1,4
Verbenona	0.7-2.5	1,2	0,8	0,9	2,2	0-0.4	0,1	

^aEstándar ISO para AEs de *R. officinalis* de España (ISO, 2012). ^bEstándar de Farmacopea Europea para AEs de *R. officinalis* de Marruecos y Túnez (European-Pharmacopoeia, 2008).

5.2. Cromatografía de gases enantioselectiva-espectrometría de masas

En la Tabla 5.4 se describen las distribuciones enantioméricas identificadas en estos AEs mediante cromatografía de gases enantioselectiva. El enantiómero (+) predomina en el caso de α -pineno, terpinen-4-ol y α -terpineol, mientras que el enantiómero (-) es el más abundante en el caso de canfeno, β -pineno, linalol, acetato de bornilo, borneol y β -cariofileno. El borneol mostró diferente distribución enantiomérica en los AEs de *R. officinalis* bioquimiotipo

alcanfor respecto a los de bioquimiotipo 1,8-cineol. Además, las distribuciones enantioméricas de limoneno y alcanfor fueron distintas entre los AEs. El conocer la distribución enantiomérica que predomina en AEs de plantas cultivadas en diferentes áreas, puede ser de utilidad para la identificación del origen de los mismos.

Tabla 5.4. Distribución enantiomérica de las biomoléculas presentes en AEs de *R. officinalis* comercialmente disponibles.

t_R (min)		Biomolécula	AERCa-1		AERCa-2		AERCa-3		AERCa-4		AERCi-1		AERCi-2	
(+)	(-)		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
7.79	7.52	α -Pino	65.5	34.5	68.5	31.5	62.4	37.6	66.6	33.4	54.5	45.5	52.2	47.8
8.47	8.24	Canfeno	9.9	90.1	15.4	84.6	14.4	85.6	17.0	83.0	12.6	87.4	16.8	83.2
8.89	9.16	β -Pino	22.0	78.0	23.5	76.5	13.9	86.1	29.9	70.1	25.9	74.1	13.2	86.8
10.52	10.00	Limoneno	53.4 ^b	46.6 ^b	45.4	54.6	77.0 ^b	23.0 ^b	44.7	55.3	37.3	62.7	21.8	78.2
15.73	15.57	Linalol	39.5	60.5	37.6	62.4	28.5	71.5	15.1	84.9	11.1	88.9	19.8	80.2
16.72	16.46	Alcanfor	45.2	54.8	50.4	49.6	45.1	54.9	65.3	34.7	74.3 ^b	25.7 ^b	77.7 ^b	22.3 ^b
18.02	18.18	Acetato de bornilo	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0
18.32	18.51	Terpinen-4-ol	65.3	34.7	71.1	28.9	63.6	36.4	77.0	23.0	84.0	16.0	60.0	40.0
20.10	19.76	α -Terpineol	71.0	29.0	80.5	19.5	80.7	19.3	80.6	19.4	78.7	21.3	56.5	43.5
20.15	19.58	Borneol	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	31.8 ^b	68.2 ^b	30.4 ^b	69.6 ^b
23.92	22.81	E- β -Cariofileno	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0

^aLos resultados están expresados en %, siendo la desviación estándar menor del 5% en todos los casos. ^bMarcador biomolecular del AE.

5.3. Bioactividad antioxidante

5.3.1. ORAC

En la Tabla 5.5 se describen las actividades antioxidantes frente al radical AAPH, obtenidas para los seis AEs analizados. El orden de mayor a menor capacidad antioxidante en este método fue el siguiente: AERCa-1^{ORAC} \approx AERCa-4^{ORAC} \approx AERCa-2^{ORAC} > AERCi-1^{ORAC} > AERCa-3^{ORAC} \approx AERCi-2^{ORAC}. Las principales biomoléculas de estos AEs no mostraron actividad antioxidante ante este radical. Por lo tanto, la capacidad antioxidante de estos AEs se debe a biomoléculas minoritarias como β -pino, limoneno, γ -terpineno, linalol, terpinen-4-ol, α -terpineol y β -cariofileno (Tabla 5.5).

5.3.2. DPPH

La capacidad para neutralizar radicales nitrogenados de los AEs es la siguiente (Tabla 5.5): AERCa-1^{DPPH} > AERCa-4^{DPPH} \approx AERCa-2^{DPPH} \approx AERCa-3^{DPPH} > AERCi-1^{DPPH} > AERCi-2^{DPPH}. Los terpenos presentes en estos AEs no mostraron capacidad antioxidante ante este radical, a excepción de α -terpineno y γ -terpineno (Tabla 5.5). Considerando la capacidad antioxidante del AE en su

conjunto, algunos efectos sinérgicos o antagonistas pueden ocurrir entre sus componentes.

5.3.3. ABTS

Los resultados de la capacidad antioxidante de los AEs y de sus biomoléculas individuales, respecto al radical ABTS, también se encuentran recogidos en la Tabla 5.5. Los AEs mostraron actividades antioxidantes ordenadas de manera decreciente como sigue: AERCa-1 > AERCa-4^{ABTS} > AERCa-3^{ABTS} > AERCa-2^{ABTS} ≥ AERCi-1^{ABTS} ≥ AERCi-2^{ABTS}. El mayor porcentaje de α -terpineno y γ -terpineno en los AERCa-1 y -4 podría justificar la mayor capacidad antioxidante de los mismos.

5.3.4. TBARS

Mediante este método se obtuvieron los resultados descritos en la Tabla 5.5: AERCa-2^{TBARS} > AERCa-3^{TBARS} ≥ AERCa-4^{TBARS} ≈ AERCi-1^{TBARS} ≈ AERCa-1^{TBARS} ≥ AERCi-2^{TBARS}. AERCa-2 mostró la mayor capacidad antioxidante en este método. Las capacidades antioxidantes de las biomoléculas individuales se analizaron, concluyendo que algunos efectos sinérgicos o antagonistas deben ocurrir al utilizar los AEs en conjunto.

5.3.5. PQ

Los resultados de este método fueron los siguientes (Tabla 5.5): AERCa-1^{PQ} > AERCi-2^{PQ} ≈ AERCa-2^{PQ} > AERCa-4^{PQ} ≈ AERCi-1^{PQ} ≈ AERCa-3^{PQ}. Linalol fue la biomolécula con mayor capacidad quelatante de entre todas las biomoléculas investigadas. Además, tres biomoléculas mayoritarias de estos AEs, α -pineno, canfeno y 1,8-cineol, mostraron capacidad quelatante. El poder quelatante de los AEs se debe a la contribución de las biomoléculas individuales, además de efectos sinérgicos y antagonistas que pueden producirse entre ellas.

Tabla 5.5. Bioactividad antioxidante de los AEs de *R. officinalis* mediante distintos métodos.

AERo ^a /Biomolécula ^b	ORAC	DPPH	ABTS	TBARS	PQ
AERCa-1	226.1a ± 13.3	0.1a ± 0.0	2.9a ± 0.1	0.4bc ± 0.0	3.1a ± 0.2
AERCa-2	217.1a ± 9.5	0.1b ± 0.0	1.5d ± 0.1	0.7a ± 0.1	2.1b ± 0.1
AERCa-3	94.7c ± 3.3	0.1b ± 0.0	2.0c ± 0.1	0.5b ± 0.1	1.2c ± 0.1
AERCa-4	217.2a ± 11.5	0.1b ± 0.0	2.6b ± 0.2	0.4bc ± 0.0	1.4c ± 0.1
AERCi-1	176.9b ± 9.2	0.1c ± 0.0	1.2de ± 0.1	0.4bc ± 0.0	1.3c ± 0.1

AERo ^a /Biomolécula ^b	ORAC	DPPH	ABTS	TBARS	PQ
AERCi-2	88.3c ± 10.9	0.0d ± 0.0	1.0e ± 0.0	0.3c ± 0.0	2.4b ± 0.1
α-Pineno	N/D	N/D	N/D	2.6 ± 0.1	16.6 ± 1.1
Canfeno	N/D	N/D	0.1 ± 0.0	N/D	1.6 ± 0.1
β-Pineno	26.6 ± 1.6	N/D	0.1 ± 0.0	4.5 ± 0.3	1.8 ± 0.1
Mirceno	N/D	N/D	N/D	N/D	2.5 ± 0.2
α-Terpineno	N/D	0.3 ± 0.0	4.0 ± 0.2	N/D	62.2 ± 4.7
p-Cimeno	N/D	N/D	0.1 ± 0.0	N/D	20.1 ± 1.6
Limoneno	128.0 ± 10.8	N/D	0.6 ± 0.0	N/D	5.9 ± 0.4
1,8-Cineol	N/D	N/D	N/D	N/D	1.1 ± 0.1
γ-Terpineno	171.4 ± 10.3	0.3 ± 0.0	2.5 ± 0.1	43.8 ± 3.9	0.3 ± 0.0
Linalol	341.9 ± 18.5	N/D	0.1 ± 0.0	N/D	96.9 ± 5.8
Alcanfor	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Borneol	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Terpinen-4-ol	356.0 ± 13.6	N/D	0.3 ± 0.0	8.3 ± 1.8	1.7 ± 0.1
α-Terpineol	310.0 ± 16.6	N/D	0.2 ± 0.0	2.6 ± 0.1	4.9 ± 0.3
Acetato de bornilo	N/D	N/D	N/D	N/D	0.0 ± 0.0
β-Cariofileno	394.7 ± 14.5	N/D	N/D	17.3 ± 0.8	7.1 ± 0.5
α-Humuleno	N/D	N/D	0.3 ± 0.0	13.1 ± 0.5	N/D

^aLos resultados de los AEs están expresados en las siguientes unidades: ORAC, DPPH y ABTS (mg ET/g AERo), TBARS (mg EBHT/g AERo), PQ (mg EEDTA/g AERo). ^bLos resultados de las biomoléculas individuales están expresados en: ORAC, DPPH y ABTS (μmol ET/mmol comp), TBARS (μmol EBHT/mmol comp), PQ (μmol EEDTA/mmol comp). N/D = Actividad antioxidante inferior a 0.05 unidades de las biomoléculas individuales, ensayadas a concentración máxima de 100 mM.

5.4. Inhibición enzimática

5.4.1. Inhibición de LOX

La inhibición de LOX producida por los seis AEs de *R. officinalis* fue estudiada mediante el método descrito en la Sección 3.6.1. Los GI (%) producidos por 150 μg/ml de cada uno de los AEs fueron los siguientes: AERCi-1 (40.8 ± 0.8)^a > AERCa-4 (38.4 ± 1.4)^b ≥ AERCa-2 (36.5 ± 0.7)^{bc} ≥ AERCi-2 (34.4 ± 0.8)^{cd} ≥ AERCa-3 (33.9 ± 0.5)^d ≈ AERCa-1 (33.6 ± 0.7)^d.

Al igual que con los métodos antioxidantes, la inhibición de LOX se probó también con las principales biomoléculas individuales. Las biomoléculas más activas fueron acetato de bornilo (379.6 ± 14.4 μM), limoneno (852.3 ± 24.2 μM), alcanfor (2743.4 ± 85.1 μM) y linalol (3345.5 ± 44.2 μM). Los resultados de otras biomoléculas fueron descritos como GI a 3333.3 μM: 1,8-cineol (30.9 ± 1.1%), terpinen-4-ol (29.6 ± 1.0%) y α-terpineol (17.4 ± 0.2%). El 1,8-cineol no fue la biomolécula que mostró mayor inhibición, pero debido a su alta concentración, sobre todo en los AEs de *R. officinalis* bioquimiotipo 1,8-cineol, ésta pudo tener

una gran influencia en el resultado final. De los cuatro AEs de *R. officinalis* bioquimiotipo alcanfor, AERCa-4 mostró la mayor capacidad inhibidora de LOX, pudiendo justificarse esta diferencia por la mayor concentración de acetato de bornilo, alcanfor y terpinen-4-ol que se encuentra en este AE.

5.4.2. Inhibición de AChE

La inhibición de AChE por los AEs de *R. officinalis* fue expresada en términos de IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$): AERCi-2 (68.4 ± 1.0)^c \approx AERCi-1 (76.9 ± 2.1)^c < AERCa-4 (149.9 ± 8.4)^b \leq AERCa-2 (164.6 ± 17.7)^{ab} \leq AERCa-1 (191.4 ± 18.6)^a \approx AERCa-3 (199.7 ± 18.0)^a.

Entre todas las biomoléculas individuales estudiadas, 3-careno ($IC_{50}^{AChE} = 220.6 \pm 3.4 \mu\text{M}$) y 1,8-cineol ($IC_{50}^{AChE} = 228.27 \pm 9.92 \mu\text{M}$) fueron los inhibidores más potentes. Los resultados de inhibición obtenidos por los AEs, demuestran que los AEs de *R. officinalis* bioquimiotipo 1,8-cineol son inhibidores más potentes que los de bioquimiotipo alcanfor, debido a que la concentración de 1,8-cineol es muy superior. Sin embargo, aunque en menor grado, otras biomoléculas fueron capaces de inhibir esta enzima: α -pineno ($IC_{50}^{AChE} = 3274.54 \pm 58.21 \mu\text{M}$), canfeno (15% inhibición a $311.22 \pm 27.30 \mu\text{M}$) y terpinen-4-ol (15% inhibición a $3776.01 \pm 247.07 \mu\text{M}$). La inhibición expresada por estos AEs fue superior a la descrita por Orhan *et al.* (2008) con AEs de *R. officinalis* de Turquía, y similar a la descrita por Ben Jemia *et al.* (2015) con AEs de Túnez.

5.5. Conclusiones

Las principales biomoléculas descritas en los AEs de *R. officinalis* fueron α -pineno, canfeno, 1,8-cineol y alcanfor. Los AEs de *R. officinalis* provenientes de semillas de Marruecos contienen una mayor concentración de 1,8-cineol que los AEs de *R. officinalis* de España. Según los ACP y AJC, los AERCa-1 y -3 son los más similares, entre los tres conglomerados y los dos bioquimiotipos identificados.

La distribución enantiomérica de las principales biomoléculas quirales de los AEs de *R. officinalis* fueron similares en todos los AEs analizados, a excepción del alcanfor, limoneno y borneol. La concentración de (+)-limoneno fue superior en los AERCa-1 y -3; en cuanto al alcanfor y al borneol, los AEs del

bioquimiotipo 1,8-cineol mostraron menos porcentaje de los enantiómeros levógiros que de los enantiómeros dextrógiros.

En relación a la bioactividad antioxidante, el AERCa-1 mostró las mayores intensidades en los métodos DPPH, ABTS y PQ, mientras que el AERCa-2 mostró el mejor valor en el método TBARS.

Además, estos AEs fueron capaces de inhibir a las enzimas LOX y AChE. Entre los AEs del bioquimiotipo alcanfor, los AERCa-4 y -2 son los que mostraron las mayores bioactividades inhibitoras de enzimas. Los AEs del bioquimiotipo 1,8-cineol fueron los mejores inhibidores de AChE, debido a la mayor concentración de 1,8-cineol que contienen estos AEs.

5.6. Bibliografía

- Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J.D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., and Cabras, P. (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3530-3535.
- Ben Jemia, M., Tundis, R., Pugliese, A., Menichini, F., Senatore, F., Bruno, M., Kchouk, M.E., and Loizzo, M.R. (2015). Effect of bioclimatic area on the composition and bioactivity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Natural Product Research* 29, 213-222.
- Beretta, G., Artali, R., Facino, R.M., and Gelmini, F. (2011). An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55, 1255-1264.
- Bousbia, N., Vian, M.A., Ferhat, M.A., Petitcolas, E., Meklati, B.Y., and Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry* 114, 355-362.
- da Silva Bomfim, N., Nakassugi, L.P., Faggion Pinheiro Oliveira, J., Kohiyama, C.Y., Mossini, S.A.G., Grespan, R., Nerilo, S.B., Mallmann, C.A., Alves Abreu Filho, B., and Machinski, M., Jr. (2015). Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food chemistry* 166, 330-336.
- European-Pharmacopoeia (2008). Rosemary oil (Rosmarini aetheroleum), Vol 01/2008:1846 (Francia: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare).
- Guerra-Boone, L., Alvarez-Roman, R., Salazar-Aranda, R., Torres-Cirio, A., Rivas-Galindo, V.M., de Torres, N.W., Gonzalez, G., and Perez-Lopez, L.A. (2015). Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern Mexico. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 28, 363-369.
- Hosni, K., Hassen, I., Chaabane, H., Jemli, M., Dallali, S., Sebei, H., and

- Casabianca, H. (2013). Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products* 47, 291-299.
- ISO (2012). Essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). International Organization for Standardization *ISO 1342:2012*.
- Jordan, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Loran, S., and Sotomayor, J.A. (2013). Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial Crops and Products* 48, 144-152.
- Laborda, R., Manzano, I., Gamon, M., Gavidiac, I., Perez-Bermudez, P., and Boluda, R. (2013). Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* essential oils on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Industrial Crops and Products* 48, 106-110.
- Mekonnen, A., Yitayew, B., Tesema, A., and Taddese, S. (2016). *In vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Microbiology* 2016, 8.
- Napoli, E.M., Curcuruto, G., and Ruberto, G. (2010). Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 659-670.
- Orhan, I., Aslan, S., Kartal, M., Sener, B., and Baser, K.H.C. (2008). Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chemistry* 108, 663-668.
- Papageorgiou, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou, M., and Komaitis, M. (2008). Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7254-7264.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., and Casanova, J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* 17, 15-19.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dwivedy, A.K., and Dubey, N.K. (2015). Assessment of chemically characterised *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its major compounds as plant-based preservative in food system based on their efficacy against food-borne moulds and aflatoxin secretion and as antioxidant. *International Journal of Food Science and Technology* 50, 1792-1798.
- Raskovic, A., Milanovic, I., Pavlovic, N., Cebovic, T., Vukmirovic, S., and Mikov, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *Bmc Complementary and Alternative Medicine* 14.
- Roldan, L.P., Diaz, G.J., and Durringer, J.M. (2010). Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the *Lamiaceae* family against pathogenic and beneficial bacteria. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias* 23, 451-461.
- Tahri, M., Imelouane, B., Aouinti, F., Amhamdi, H., and Elbachiri, A. (2014). The organic and mineral compounds of the medicinal aromatics, *Rosmarinus tournefortii* and *Rosmarinus officinalis*, growing in eastern Morocco. *Research on Chemical Intermediates* 40, 2651-2658.

Tuttolomondo, T., Dugo, G., Ruberto, G., Leto, C., Napoli, E.M., Cicero, N., Gervasi, T., Virga, G., Leone, R., Licata, M., *et al.* (2015). Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian *Rosmarinus officinalis* L. *Natural Product Research* 29, 1928-1934.

6. Estudio sobre aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia* (AESI)

6.1. Determinación de la composición mediante CGR-IE/EM

6.1.1. Composición de AEs de *S. lavandulifolia* cultivada en Murcia

La obtención de AEs mediante hidrodestilación obtuvo rendimientos entre 0.8 y 1.2% (v/p). Las composiciones de los AEs de *S. lavandulifolia* se describen como concentración absoluta (más del 94% del área total del cromatograma) y relativa (superior al 99% del área total del cromatograma). La concentración absoluta se calculó realizando rectas de calibrado con los compuestos comercialmente disponibles (Tabla 6.1). Esto es útil para detectar adulteraciones de AEs comerciales con disolventes orgánicos, y para asegurar la calidad del AE. En la bibliografía no se han encontrado estudios previos que describan la concentración absoluta de las biomoléculas presentes en los AEs de *S. lavandulifolia*.

En la Tabla 6.2 se detallan los resultados obtenidos con los cuatro AEs de *S. lavandulifolia* estudiados. Todos estos AEs muestran las mismas biomoléculas principales: alcanfor, 1,8-cineol, canfeno y α -pineno. Además, contienen concentraciones relativamente altas de otras biomoléculas como β -pineno, limoneno, mirceno y sabineno.

Para analizar las diferencias y semejanzas entre los cuatro AEs se realizaron el ACP y el AJC. El ACP muestra tres CPs, CP 1 (73.81% de la varianza total), CP 2 (13.36% de la varianza total) y CP 3 (12.83% de la varianza total). Los AESI-1, -2 y -4 muestran valores similares en relación al CP 1, el componente que más contribuye a la varianza total (Figura 6.1(A)). El gráfico tridimensional añadiendo el CP 3, muestra una mayor similitud aparente entre el AESI-2 y el -4, que entre el AESI-1 y el -4 (Figura 6.1(B)).

Tabla 6.1. Rectas de calibrado para el cálculo de las concentraciones absolutas de los compuestos comerciales de los AEs de *S. lavandulifolia*.

Biomolécula	Rectas de calibrado ^a	R ²	Intervalo de calibrado (mM)	DER (%)	LD (mM)	LC (mM)	Proveedor	Referencia
Nonano	Patrón interno						SAFC	442694
(-) α -Pino	$y=1.272x-0.008$	0.999	10.06-0.25	0.97	0.025	0.076	Fluka	80599
(+)Canfeno	$y=0.728x+0.001$	0.999	11.09-0.28	0.56	0.054	0.165	SAFC	w222909
Sabineno	$y=-0.796x+0.022$	0.999	9.78-0.61	1.08	0.091	0.277	Extrasynthese	5062 S
(-) β -Pino	$y=1.053x-0.010$	1.000	10.29-0.26	1.26	0.026	0.078	Fluka	80609
Mirceno	$y=0.675x-0.011$	0.999	8.97-0.22	1.41	0.018	0.056	Fluka	64643
(-)Felandreno	$y=0.528x-0.008$	0.999	9.52-0.60	1.60	0.106	0.322	Aldrich	bcb8659
α -Terpineno	$y=0.591x-0.024$	0.999	15.75-0.59	1.27	0.149	0.453	Aldrich	86473
p-Cimeno	$y=2.709x-0.003$	0.999	9.95-0.25	1.08	0.010	0.030	Aldrich	c121452
(+)Limoneno	$y=1.308x-0.026$	0.999	9.55-0.24	0.98	0.039	0.120	Fluka	62118
1,8-Cineol	$y=0.523x-0.008$	1.000	9.55-0.60	1.55	0.164	0.497	SAFC	w246506
γ -Terpineno	$y=0.906x-0.018$	0.999	9.87-0.25	1.04	0.020	0.062	Aldrich	223190
Hidrato de sabineno	$y=0.562x-0.013$	0.999	9.66-0.60	3.17	0.102	0.309	FLUKA	96573
Terpinoleno	$y=0.618x-0.021$	0.999	15.34-0.92	0.69	0.230	0.699	SAFC	W304603
(-)Linalol	$y=0.471x-0.009$	0.999	8.80-0.55	3.13	0.102	0.309	Fluka	74856
Tetradecano	Patrón interno						SAFC	442708
(+)Alcanfor	$y=0.090x-0.007$	0.999	9.64-0.96	0.86	0.241	0.733	Alfa Aesar	A10708
(-)Borneol	$y=0.154x-0.002$	0.999	8.99-0.90	1.93	0.196	0.595	Alfa Aesar	A12684
(-)Terpinen-4-ol	$y=0.285x-0.009$	0.999	9.57-0.96	3.59	0.239	0.727	Aldrich	11584
(+) α -Terpineol	$y=0.169x$	0.998	9.87-0.99	1.97	0.247	0.750	Fluka	83073
R(-)-Mirtenol	$y=0.183x+0.002$	0.999	16.87-2.53	2.62	0.440	1.337	SAFC	S37589-149
Acetato de linalilo	$y=0.179x+0.005$	0.993	11.97-1.80	1.93	0.449	1.365	SAFC	w263605
Geraniol	$y=0.221x-0.006$	1.000	15.04-0.90	0.61	0.295	0.896	SAFC	w250716
(-)Acetato de bornilo	$y=0.355x-0.001$	0.999	13.59-0.82	1.65	0.204	0.620	FLUKA	45855
(+)Acetato de α -terpinilo	$y=0.296x$	1.000	11.95-1.79	0.99	0.243	0.740	Aldrich	1439212
Acetato de geraniol	$y=0.391x-0.006$	0.999	12.37-0.46	0.17	0.116	0.353	Aldrich	173495
(-) E - β -Cariofileno	$y=0.094x+0.003$	0.999	6.35-1.09	2.49	0.360	1.093	Sigma	22075
α -Humuleno	$y=0.416x-0.011$	0.999	6.35-0.63	1.85	0.154	0.469	Aldrich	53675
Hexadecano	Patrón interno						Fluka	52209
Óxido de cariofileno	$y=0.067x+0.008$	0.999	17.66-6.62	2.23	1.855	5.638	SAFC	w509647

^a Relación de respuesta vs. relación de concentración. El factor de corrección con el patrón interno está incluido en cada recta. Cada patrón interno sirve de referencia para las biomoléculas descritas debajo del mismo. DER = Desviación estándar relativa. LD = límite de detección. LC = límite de cuantificación

Tabla 6.2. CGR para determinar la composición de AEs de *S. lavandulifolia*.

N ^a	IRL ^b	IRL ^c	Biomolécula	Iones ^d (m/z)	[AESI-1]		[AESI-2]		[AESI-3]		[AESI-4]		MI
					(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	
1	922	923	Triciclono	79, 93, 121, 136		0.1ef ± 0.0		0.1f ± 0.0		0.1g ± 0.0		0.1e ± 0.0	1,2
2	928	926	α-Tuyeno	77, 91, 93, 136		0.5f ± 0.0		0.5g ± 0.0		0.6e ± 0.0		0.5fg ± 0.0	1,2,3
3	930	936	α-Pineno	77, 91, 93 , 121	347.0b ± 7.6	5.7e ± 0.0	297.2c ± 3.4	5.1g ± 0.0	382.8a ± 9.3	5.6e ± 0.0	322.7bc ± 15.4	5.2f ± 0.0	1,2,3
4	943	953	Canfeno	79, 93 , 121, 136	582.1b ± 9.9	7.9f ± 0.0	491.0c ± 3.3	7.2h ± 0.0	759.3a ± 21.1	9.4e ± 0.0	559.2b ± 42.4	7.5g ± 0.0	1,2,3
5	964	974	Sabineno	77, 91, 93 , 136	100.0c ± 1.7	1.4f ± 0.0	105.0b ± 0.9	1.4f ± 0.0	130.4a ± 1.1	1.8e ± 0.0	92.6d ± 2.0	1.3g ± 0.0	1,2,3
6	970	982	β-Pineno	69, 79, 91, 93	267.7c ± 2.8	4.2f ± 0.0	281.4b ± 2.3	4.2f ± 0.0	416.4a ± 2.8	5.5e ± 0.0	249.1d ± 3.8	4.0g ± 0.0	1,2,3
7	979	989	Mirceno	41, 69 , 93, 121	115.0c ± 1.2	1.7f ± 0.0	120.6b ± 1.0	1.7f ± 0.0	135.5a ± 0.6	2.0e ± 0.0	104.4d ± 2.5	1.5g ± 0.0	1,2,3
8	999	1008	Felandreno	77, 93 , 119, 136	2.7a ± 0.1	tr	1.7c ± 0.0	tr	2.0b ± 0.2	tr			1,2,3
9	1008	1017	α-Terpineno	91, 93 , 119, 121	5.6a ± 0.2	0.1 ± 0.0	3.4b ± 0.0	tr	3.1c ± 0.1	tr	2.8c ± 0.1	tr	1,2,3
10	1011	1024	p-Cimeno	91, 117, 119 , 121	31.4b ± 0.3	0.8f ± 0.0	32.0b ± 0.4	0.8f ± 0.0	28.5c ± 0.2	0.7g ± 0.0	33.3a ± 0.7	0.8e ± 0.0	1,2,3
11	1020	1028	Limoneno	67, 68 , 79, 93	162.6a ± 4.1	5.0e ± 0.0	162.5a ± 1.6	4.8f ± 0.0	106.7c ± 1.4	3.3h ± 0.0	144.3b ± 2.6	4.6g ± 0.0	1,2,3
12	1023	1032	1,8-Cineol	43, 81, 93 , 108	1303.6a ± 55.6	27.0g ± 0.1	1362.6a ± 35.2	28.7e ± 0.1	1326.1a ± 20.5	24.2h ± 0.1	1375.2a ± 207.8	27.9f ± 0.0	1,2,3
13	1053	1055	γ-Terpineno	77, 91, 93 , 119	14.3a ± 0.5	0.2e ± 0.0	6.7c ± 0.1	0.1g ± 0.0	8.1b ± 0.4	0.2f ± 0.0	5.8c ± 0.1	0.1g ± 0.0	1,2,3
14	1070	1071	Hidrato de sabineno	77, 91, 93 , 121	14.9c ± 0.6	0.2g ± 0.0	14.4c ± 0.5	0.2g ± 0.0	30.7a ± 0.5	0.4e ± 0.0	18.9b ± 0.7	0.2f ± 0.0	1,2,3
15	1080	1086	Terpinoleno	91, 93 , 121, 136	10.8a ± 0.3	0.2f ± 0.0	7.9b ± 0.4	0.1g ± 0.0	11.2a ± 0.3	0.2e ± 0.0	6.5c ± 0.4	0.1h ± 0.0	1,2,3
16	1081	1105	Linalol	41, 67, 69 , 93	71.1c ± 1.1	1.1f ± 0.0	97.7a ± 2.1	1.5e ± 0.0	10.0d ± 0.3	0.2g ± 0.0	90.0b ± 4.0	1.5h ± 0.0	1,2,3
17	1133	1143	1,3,8-p-Mentatrieno	91, 105, 119, 134		1.7e ± 0.0		1.1g ± 0.1				1.6f ± 0.1	1,2
18	1148	1147	Alcanfor	81, 95 , 108, 152	1961.3b ± 121.6	30.0fg ± 0.2	1715.1b ± 2.3	29.5g ± 0.4	2599.8a ± 59.8	36.1e ± 0.3	1899.0b ± 399.2	30.3f ± 0.2	1,2,3
19	1174	1173	Borneol	79, 93, 95 , 110	166.1b ± 2.2	1.5f ± 0.0	171.7b ± 7.6	1.6f ± 0.1	279.7a ± 9.6	2.8e ± 0.1	164.1b ± 4.6	1.6f ± 0.0	1,2,3
20	1161	1180	Terpinen-4-ol	71, 86, 93 , 111	35.8a ± 1.7	0.5ef ± 0.0	32.6ab ± 2.4	0.5ef ± 0.1	28.9b ± 2.2	0.4f ± 0.0	37.0a ± 2.3	0.5e ± 0.0	1,2,3
21	1192	1198	α-Terpineol	59, 67, 93 , 121	44.2a ± 4.9	0.5f ± 0.0	43.3a ± 2.5	0.6e ± 0.0	13.9b ± 0.7	0.2g ± 0.0	51.0a ± 2.7	0.6e ± 0.0	1,2,3
22	1191	1201	R-Mirtenol	79, 91 , 93, 119					8.3 ± 0.4	0.1 ± 0.0			1,2,3
23	1223	1238	Z-Citral	79, 91, 119, 134						0.1 ± 0.0			1,2
24	1236	1249	Acetato de linalilo	41, 69, 93 , 80	123.5c ± 3.5	1.9g ± 0.0	175.8a ± 1.9	2.5e ± 0.0			149.8b ± 1.4	2.3f ± 0.1	1,2,3
25	1232	1255	Geraniol	41, 69 , 93, 123	27.7a ± 1.1	0.3e ± 0.0	24.5a ± 2.3	0.3e ± 0.1	25.6a ± 0.4	0.3e ± 0.0	19.6a ± 5.9	0.3e ± 0.0	1,2,3
26	1285	1285	Acetato de bornilo	79, 93 , 95, 121	40.3b ± 1.1	0.8g ± 0.0	50.6a ± 0.9	0.9e ± 0.0	50.7a ± 1.5	0.9f ± 0.0	39.0b ± 0.7	0.8g ± 0.0	1,2,3
27	1299	1290	Acetato de sabinilo	77, 91, 119, 134		3.1e ± 0.1		2.8f ± 0.1		0.1g ± 0.0		2.8f ± 0.0	1,2
28	1322	1344	Acetato de α-terpinilo	67, 68, 93 , 121	60.9b ± 0.5	1.3f ± 0.1	41.4c ± 0.2	0.9g ± 0.0	4.4d ± 0.3	0.1h ± 0.0	74.4a ± 0.2	1.6e ± 0.0	1,2,3
29	1360	1377	Acetato de geraniol	41, 67, 69 , 93	9.7a ± 0.2	0.2f ± 0.0	9.3a ± 0.3	0.2f ± 0.0	8.6b ± 0.1	0.3e ± 0.0	9.1ab ± 0.2	0.2f ± 0.0	1,2,3

N ^a	IRL ^b	IRL ^c	Biomolécula	Iones ^d (m/z)	[AESI-1]		[AESI-2]		[AESI-3]		[AESI-4]		MI
					(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	
30	1421	1419	E-β-Cariofileno	41 , 91, 93, 133	54.7c ± 0.9	0.9g ± 0.0	59.3b ± 1.7	1.0f ± 0.0	144.7a ± 0.5	2.5e ± 0.0	43.6d ± 1.2	0.7h ± 0.0	1,2,3
31	1454	1459	α-Humuleno	80, 93 , 107, 204	10.1c ± 0.2	0.3g ± 0.0	11.9b ± 0.4	0.4f ± 0.0	23.2a ± 0.4	0.8e ± 0.0	8.9d ± 0.1	0.3h ± 0.0	1,2,3
32	1455	1462	Aromadendreno	91, 105, 161, 189						tr			1,2
33	1454	1476	E-β-Farneseno	41, 69, 93, 120		0.3f ± 0.0		0.4e ± 0.0		tr		0.3f ± 0.0	1,2
34	1472	1482	α-Curcumeno	105, 119, 132, 145		tr		tr		0.2 ± 0.0		tr	1,2
35	1476	1487	γ-Gurjuneno	41, 91, 105, 161						tr			1,2
36	1492	1493	Valenceno	105, 119, 161, 204		tr		0.1e ± 0.0		0.1ef ± 0.0		tr	1,2
37	1494	1496	α-Muuroloeno	91, 93, 119, 161		tr		tr		tr			1,2
38	1507	1510	γ-Cadineno	91, 105, 119, 161		tr		0.1f ± 0.0		0.1e ± 0.0		tr	1,2
39	1514	1517	δ-Cadineno	91, 119, 134, 161		0.1f ± 0.0		0.1f ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1g ± 0.0	1,2
40	1575	1579	Óxido de cariofileno	41, 79, 91 , 109	8.9b ± 0.8	0.1g ± 0.0	9.5b ± 0.3	0.1fg ± 0.0	17.2a ± 2.0	0.2e ± 0.0	10.3b ± 1.1	0.1f ± 0.0	1,2,3
41	1594	1593	Viridiflorol	43, 109, 161, 204		0.1g ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1e ± 0.0		0.1f ± 0.0	1,2
42	1661	1607	cis-Farnesol	93, 119, 161, 204				tr		0.1 ± 0.0		tr	1,2
Terpenos oxigenados:													
Alcoholes						4.3		5.0		4.6		4.9	
Cetonas						30.0		29.5		36.1		30.3	
Aldehídos						0.00		0.0		0.1		0.0	
Ésteres						7.4		7.5		1.6		7.9	
Éteres						27.2		28.9		24.4		28.1	
Monoterpenos hidrocarbonados						29.4		27.2		29.3		27.4	
Monoterpenos oxigenados						68.6		70.4		66.2		70.8	
Sesquiterpenos hidrocarbonados						2.8		3.1		6.4		2.3	
Sesquiterpenos oxigenados						0.2		0.3		0.4		0.3	
Total terpenos hidrocarbonados						31.2		29.3		33.2		29.0	
Total terpenos oxigenados						68.8		70.7		66.6		71.0	

N^a = Número de referencia para el ACP. IRL^b = Índice de retención lineal obtenido a partir de las bases de datos NIST-08 y Wiley-7. IRL^c = Índice de retención lineal calculado a partir de una serie de n-alcacos (C7-C30). ^d Los iones cuantificadores están marcados en negrita. MI = Método de identificación: 1 = mediante IRL, 2 = mediante comparación de espectros con NIST-08 y Wiley-7, 3 = mediante comparación con compuestos puros comerciales. tr = trazas (<0.1%).

Para conocer qué compuestos son los responsables de las diferencias entre los cuatro AEs se realiza el gráfico de cargas (Figura 6.2). Las cargas de las biomoléculas están normalizadas. Los AESI-1, -2 y -4 tienen concentraciones similares de linalol (16), 1,3,8-p-mentatrieno (17), α -terpineol (21), acetato de linalilo (24) y acetato de sabinilo (27), entre otros. Por el contrario, el AESI-3 presenta una composición muy diferente, con mayores concentraciones de alcanfor (18), borneol (19), β -cariofileno (30), α -humuleno (31) y α -curcumeno (34), así como la presencia en exclusividad de R-mirtenol (22), Z-citral (23), aromadendreno (32) y α -gurjuneno (35).

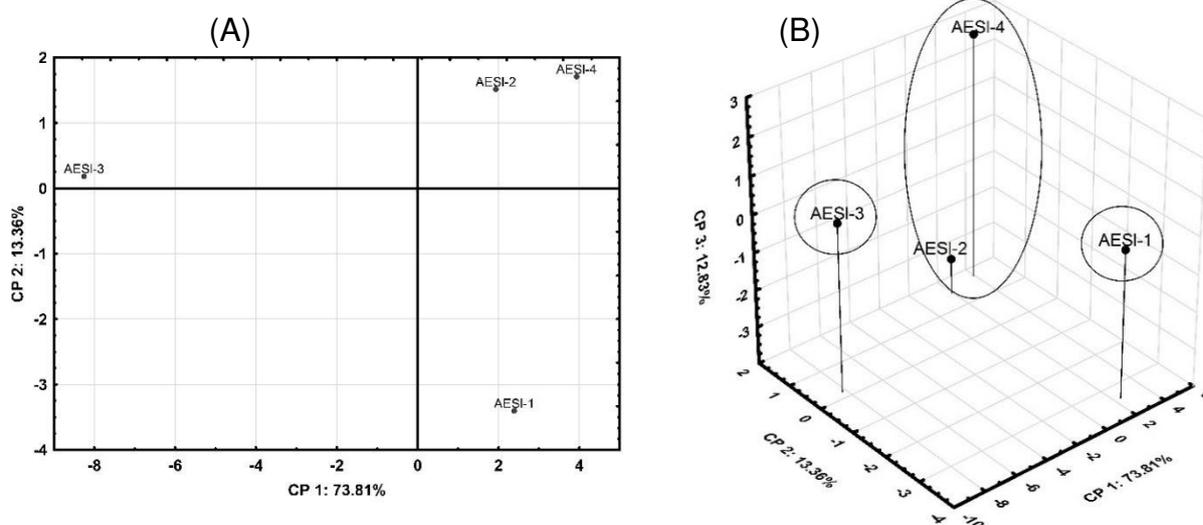


Figura 6.1. Gráficas de puntuación para los AEs de *S. lavandulifolia*. (A) Gráfica de puntuación del CP 2 vs. CP1. (B) Gráfica de puntuación del CP 3 vs. CP 2 y CP 1.

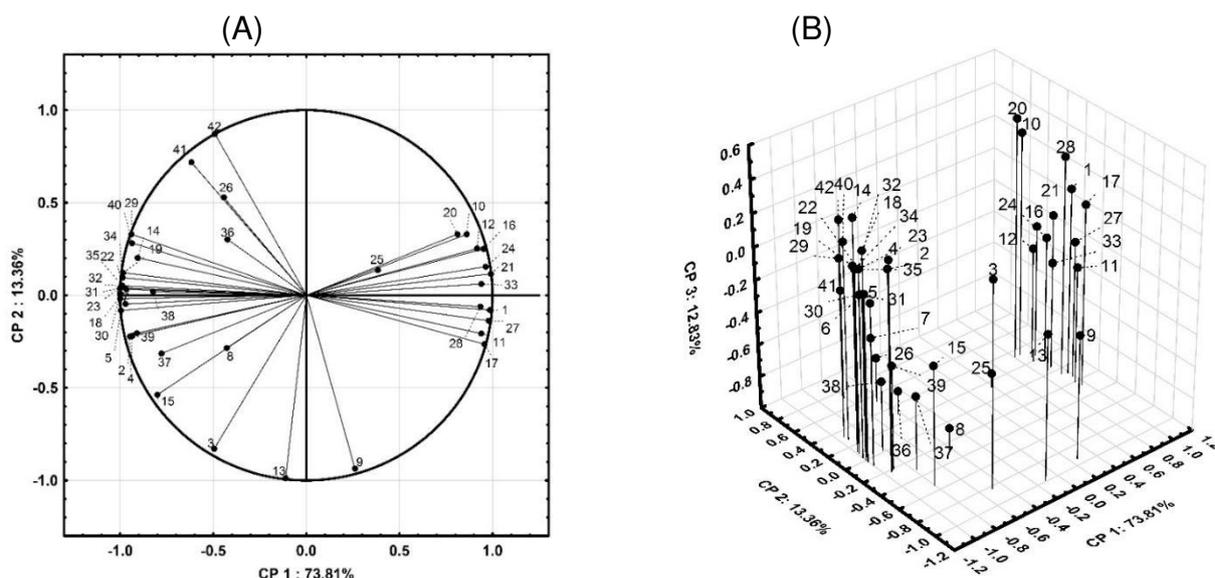


Figura 6.2. Gráfica de cargas para los AEs de *S. lavandulifolia*. (A) Gráfica de cargas del CP 2 vs. CP 1. (B) Gráfica de cargas del CP 3 vs. CP 2 y CP 1.

Empleando la totalidad de los datos de composición relativa de estos AEs (Tabla 6.2), se representaron los resultados del AJC en un dendrograma (Figura 6.3). Los AESI-1 y -4 mostraron el mayor porcentaje de similitud (85.3%), seguidos del AESI-2 con 83.6% de semejanza. Esta gran similitud entre los AESI-1, AESI-4 y AESI-2, indica que pueden agruparse en un mismo conglomerado, que a su vez se diferencia considerablemente del AESI-3, debido al escaso 11.9% de similitud entre ambos conglomerados.

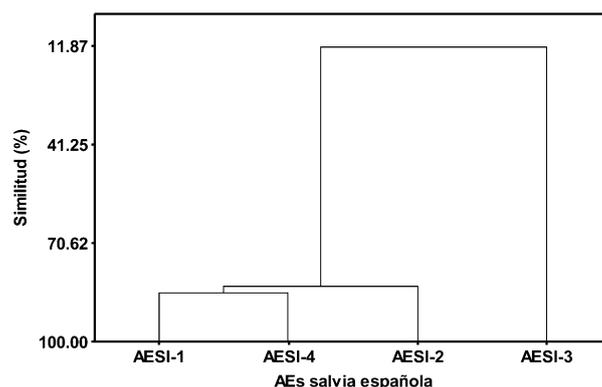


Figura 6.3. Dendrograma del AJC para los AEs de *S. lavandulifolia*.

6.1.2. Comparativa con AEs de *S. lavandulifolia* de otras regiones y países

Existen algunos estudios llevados a cabo sobre AEs de *S. lavandulifolia* de otras regiones de España, que muestran composiciones distintas a las descritas en este estudio. Por ejemplo, 1,8-cineol en los AEs de *S. lavandulifolia* de Murcia aquí analizados, alcanza un máximo de concentración del 15.6%, mientras que un estudio realizado en regiones del centro de España mostró hasta un 54.7% de esta biomolécula (Usano-Aleman, Pala-Paul, & Herraiz-Penalver, 2016). Con las concentraciones de alcanfor descritas en la bibliografía ocurre algo similar, puede encontrarse una alta variabilidad, desde el 0% hasta el 29% de concentración (Herraiz-Penalver, *et al.*, 2010; Perry, Bollen, Perry, & Ballard, 2003).

La mayoría de estudios sobre AEs de *S. lavandulifolia* se han llevado a cabo con plantas cultivadas en España. A pesar de esto, se pueden encontrar grandes variaciones en la composición de estos AEs que dependerá de factores externos (Porres-Martinez, Gonzalez-Burgos, Accame, & Gomez-Serranillos, 2013; Porres-Martinez, Gonzalez-Burgos, Carretero, & Gomez-Serranillos, 2014; Usano-Aleman, Pala-Paul, & Herraiz-Penalver, 2014; Usano-Aleman, *et al.*,

2016). Las dos biomoléculas principales, 1,8-cineol y alcanfor, son abundantes en todos los estudios previos con AEs de otras regiones de España, mientras que α -pineno, β -pineno, limoneno y linalol fueron descritos como componentes principales sólo en algunos de ellos (Herraiz-Penalver, *et al.*, 2010; Porres-Martinez, *et al.*, 2014; Santana, *et al.*, 2012). Los AEs de este estudio y los previamente descritos (a excepción del análisis realizado por Porres-Martinez, *et al.* (2013)) contienen β -mirceno en concentraciones variables. Esta biomolécula puede ser considerada biomarcadora de esta especie, ya que es relativamente escasa en otras especies de *Salvia* (Rzepa, *et al.*, 2009). A diferencia de lo encontrado en estos AEs de Murcia, otros estudios previos detectaron la presencia de β -felandreno (Porres-Martinez, *et al.*, 2013) y espatulenol (Herraiz-Penalver, *et al.*, 2010; Usano-Aleman, *et al.*, 2016), en AEs de *S. lavandulifolia* provenientes de otras regiones, por lo que podrían ser usados como biomarcadores de dichas zonas de cultivo.

Los monoterpenos oxigenados son los más abundantes en estos AEs (> 65% del área total), mientras que los sesquiterpenos oxigenados son el grupo menos abundante (< 0.5% del área total). En cuanto a los grupos funcionales oxigenados, cetonas (29.5-36.1% del área total) y éteres (24.4-28.9% del área total) son los más abundantes. Estos resultados son similares a los encontrados en estudios previos (Porres-Martinez, *et al.*, 2013; Porres-Martinez, *et al.*, 2014; Santana, *et al.*, 2012). Sin embargo, Herraiz-Penalver, *et al.* (2010) en un estudio con 20 AEs de *S. lavandulifolia* cultivadas en la región central de España, describieron a los monoterpenos hidrocarbonados como más abundantes respecto a los oxigenados.

6.1.3. Comparación con la normativa ISO

La organización internacional para la estandarización (ISO) describe los intervalos de concentración relativa de las biomoléculas principales presentes en los AEs de *S. lavandulifolia* (ISO, 2005). La mayoría de nuestros resultados se encuentran dentro del intervalo establecido por la ISO, aunque el AESI-3 muestra concentraciones ligeramente inferiores de linalol, acetato de linalilo, acetato de α -terpinilo y acetato de sabinilo. Las concentraciones de 1,8-cineol y alcanfor en todos los AEs de *S. lavandulifolia* de este estudio fueron superiores a las descritas en la norma ISO (Tabla 6.3). Algunos AEs descritos en otras regiones

de España se encuentran por debajo del intervalo establecido para limoneno (Porres-Martinez, *et al.*, 2014), alcanfor (Herraiz-Penalver, *et al.*, 2010; Usano-Aleman, *et al.*, 2014), borneol (Porres-Martinez, *et al.*, 2013) y acetato de sabinilo (Herraiz-Penalver, *et al.*, 2010; Porres-Martinez, *et al.*, 2013; Santana, *et al.*, 2012; Usano-Aleman, *et al.*, 2014), o por encima para α -pineno (Herraiz-Penalver, *et al.*, 2010), 1,8-cineol (Herraiz-Penalver, *et al.*, 2010; Usano-Aleman, *et al.*, 2014), linalol (Santana, *et al.*, 2012) y borneol (Perry, *et al.*, 2003).

Tabla 6.3. Comparación de las composiciones de los AEs de *S. lavandulifolia* con los intervalos establecidos por ISO.

Biomolécula	ISO-3526 ^a (%)	AESI-1 (%)	AESI-2 (%)	AESI-3 (%)	AESI-4 (%)
α -Pineno	4.0 - 11.0	7,3	6,5	7,6	6,6
Sabineno	0.1 - 3.5	1,8	1,7	2,3	1,6
Limoneno	2.0 - 6.0	6,3	6,1	4,4	5,7
1,8-Cineol	10.0 - 30.0	34,4	36,2	32,4	35,0
Linalol	0.3 - 4.0	1,4	1,9	0,2	1,8
Alcanfor	11.0 - 36.0	38,2	37,1	48,4	38,0
Borneol	1.0 - 7.0	2,0	2,1	3,8	2,1
Terpinen-4-ol	0 - 2.0	0,6	0,6	0,6	0,7
Acetato de linalilo	0.1 - 5.0	2,5	3,2	0,0	2,9
Acetato de α -terpinilo	0.5 - 9.0	1,6	1,1	0,2	2,0
Acetato de sabinilo	0.5 - 9.0	3,9	3,6	0,1	3,5

^aEstándar ISO 3526 for *S. lavandulifolia* (ISO, 2005)

6.2. Cromatografía de gases enantioselectiva-espectrometría de masas

En la Tabla 6.4 están recogidos los resultados de las distribuciones enantioméricas de las biomoléculas quirales comercialmente disponibles. En estos AEs, el enantiómero (+) predomina en el caso de limoneno, hidrato de sabineno, alcanfor, terpinen-4-ol, α -terpineol y acetato de α -terpinilo. El enantiómero (-) predomina en el caso de canfeno, β -pineno, linalol, acetato de bornilo y β -cariofileno. La proporción de los dos enantiómeros puede variar dependiendo del AE analizado; en concreto, las biomoléculas linalol y α -terpineol en el AESI-1 y limoneno, terpinen-4-ol y borneol en el AESI-3 muestran distinta distribución enantiomérica que la del resto de AEs analizados. En general, existe mayor similitud entre las distribuciones enantioméricas dentro del Conglomerado-1 (AESI-1/AESI-4/AESI-2), respecto al Conglomerado-2 (AESI-3), confirmando las agrupaciones de AEs sugeridas tras la aplicación de los

análisis estadísticos multivariantes ACP y AJC (Sección 6.1.1). La distribución enantiomérica de las biomoléculas proporciona información acerca de las propiedades organolépticas, el origen y la autenticidad de los AEs. La revisión bibliográfica realizada muestra que este estudio es el primero que caracteriza de manera extensa la distribución enantiomérica de las biomoléculas presentes en AEs de *S. lavandulifolia*.

Tabla 6.4. Distribución enantiomérica de las biomoléculas presentes en AEs de *S. lavandulifolia* comercialmente disponibles.

t_R (min)		Biomolécula ^a	AESI-1		AESI-2		AESI-3		AESI-4	
(+)	(-)		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
7.79	7.52	α -Pinoeno	51.5	48.5	53.3	46.7	46.0	54.0	53.0	47.0
8.47	8.24	Canfeno	26.3	73.7	27.0	73.0	32.5	67.5	39.0	61.0
8.89	9.16	β -Pinoeno	41.7	58.3	40.9	59.1	26.7	73.3	38.5	61.5
10.52	10.00	Limoneno	81.4	18.6	85.9	14.1	63.3	36.7	86.8	13.2
14.28	14.51	Hidrato de sabineno	>95	<5	>95	<5	>95	<5	>95	<5
15.73	15.57	Linalol	10.8	89.2	5.5	94.5	<5	>95	5.3	94.7
16.72	16.46	Alcanfor	75.6	24.4	80.4	19.6	78.8	21.2	77.4	22.6
18.02	18.18	Acetato de bornilo	<5	>95	<5	>95	<5	>95	<5	>95
18.32	18.51	Terpinen-4-ol	69.4	30.6	80.9	19.2	51.0	49.0	80.5	19.5
20.10	19.76	α -Terpineol	85.1	14.9	>95	<5	>95	<5	>95	<5
20.15	19.58	Borneol	30.7	69.3	36.2	63.8	75.6	24.4	28.7	71.3
20.91	22.35	Acetato de α -terpinilo	>95	<5	>95	<5	ND	ND	>95	<5
23.92	22.81	E- β -Cariofileno	<5	>95	<5	>95	<5	>95	<5	>95

^aLos resultados están expresados en %, siendo la desviación estándar menor del 5% en todos los casos.

6.3. Bioactividad antioxidante

6.3.1. ORAC

Los resultados obtenidos, mediante este método, para los distintos AEs de *S. lavandulifolia* se encuentran detallados en la Tabla 6.5, siendo de mayor a menor: $AESI-3^{ORAC} > AESI-2^{ORAC} \approx AESI-4^{ORAC} > AESI-1^{ORAC}$.

Como se observa en la Tabla 6.5, las dos biomoléculas mayoritarias de estos AEs, alcanfor y 1,8-cineol, no presentan capacidad antioxidante en este método, por lo que la actividad de los AEs se debe a otras biomoléculas minoritarias. El AESI-3 tiene mayor concentración de β -cariofileno que el resto, una biomolécula que presenta alta capacidad antioxidante. Linalol y acetato de linalilo también mostraron capacidad antioxidante; el AESI-1 presenta menor concentración de estas dos biomoléculas que los AESI-2 y -4, lo que podría justificar la diferencia de capacidades antioxidantes entre estos AEs.

6.3.2 DPPH

Las actividades antioxidantes de los AEs de *S. lavandulifolia* fueron las siguientes (Tabla 6.5): $\text{AESI-3}^{\text{DPPH}} > \text{AESI-4}^{\text{DPPH}} \geq \text{AESI-2}^{\text{DPPH}} \geq \text{AESI-1}^{\text{DPPH}}$. En este método, todos los AEs mostraron moderada capacidad antioxidante ya que sólo dos biomoléculas individuales fueron activas, α -terpineno y γ -terpineno.

6.3.3. ABTS

Las capacidades antioxidantes mostradas por los AEs contra el radical ABTS se encuentran recogidas en la Tabla 6.5: $\text{AESI-4}^{\text{ABTS}} \approx \text{AESI-3}^{\text{ABTS}} > \text{AESI-1}^{\text{ABTS}} \approx \text{AESI-2}^{\text{ABTS}}$.

De forma similar al método DPPH, α -terpineno y γ -terpineno fueron las biomoléculas individuales que mostraron mayor capacidad antioxidante. A pesar de que el AESI-1 contiene mayor concentración de estas dos biomoléculas, los AESI-4 y -3 mostraron mayor capacidad antioxidante. Esto es posible debido a que en el AE se pueden producir sinergias o antagonismos entre sus componentes, dando lugar a una mayor o menor capacidad antioxidante que la esperada con la suma de las capacidades antioxidantes individuales.

6.3.4. PR

Las capacidades reductoras de hierro (III) mostradas por los AEs (Tabla 6.5) pueden ordenarse de la siguiente forma: $\text{AESI-3}^{\text{PR}} > \text{AESI-2}^{\text{PR}} > \text{AESI-1}^{\text{PR}} > \text{AESI-4}^{\text{PR}}$. La mayor actividad mostrada por el AESI-3 puede ser justificada por su mayor contenido en canfeno; por el contrario, la menor capacidad reductora del AESI-4 puede deberse a la menor concentración de α -terpineno y γ -terpineno en este AE.

6.3.5. PQ

La potencia quelatante de los AEs de *S. lavandulifolia* estudiados se muestra en la Tabla 6.5: $\text{AESI-1}^{\text{PQ}} > \text{AESI-4}^{\text{PQ}} \geq \text{AESI-3}^{\text{PQ}} \geq \text{AESI-2}^{\text{PQ}}$. Al igual que en el método ABTS, se pone de manifiesto la existencia de efectos sinérgicos o antagonistas entre las biomoléculas presentes en los AEs, ya que el AESI-2, a pesar de tener la mayor concentración de linalol y acetato de linalilo, mostró la menor potencia quelatante.

Tabla 6.5. Bioactividad antioxidante de los AEs de *S. lavandulifolia* mediante distintos métodos.

AESI ^a /Biomolécula ^b	ORAC		DPPH		ABTS		PR		PQ	
AESI-1	101.1c	± 5.3	0.0c	± 0.0	0.3b	± 0.0	1.2c	± 0.1	3.9a	± 0.2
AESI-2	136.1b	± 6.3	0.0bc	± 0.0	0.3b	± 0.0	1.7b	± 0.1	2.1c	± 0.1
AESI-3	207.4a	± 10.0	0.1a	± 0.0	0.4a	± 0.0	1.9a	± 0.0	2.4bc	± 0.1
AESI-4	125.0b	± 4.6	0.1b	± 0.0	0.5a	± 0.0	0.9d	± 0.0	2.6b	± 0.1
α-Pineno	N/D		N/D		N/D		N/D		16.6 ± 1.1	
Canfeno	N/D		N/D		0.1 ± 0.0		0.5 ± 0.0		1.6 ± 0.1	
β-Pineno	26.6	± 1.6	N/D		0.1 ± 0.0		N/D		1.8 ± 0.1	
Mirceno	N/D		N/D		N/D		N/D		2.5 ± 0.2	
α-Terpineno	N/D		0.3 ± 0.0		4.0 ± 0.2		1.9 ± 0.1		62.2 ± 4.7	
p-Cimeno	N/D		N/D		0.1 ± 0.0		N/D		20.1 ± 1.6	
Limoneno	128.0	± 10.8	N/D		0.6 ± 0.0		N/D		5.9 ± 0.4	
1,8-Cineol	N/D		N/D		N/D		N/D		1.1 ± 0.1	
γ-Terpineno	171.4	± 10.3	0.3 ± 0.0		2.5 ± 0.1		0.3 ± 0.0		0.3 ± 0.0	
Hidrato de sabineno	N/D		N/D		0.5 ± 0.0		N/D		6.7 ± 0.6	
Linalol	341.9	± 18.5	N/D		0.1 ± 0.0		N/D		96.9 ± 5.8	
Alcanfor	N/D		N/D		N/D		N/D		N/D	
Borneol	N/D		N/D		N/D		N/D		N/D	
Terpinen-4-ol	356.0	± 13.6	N/D		0.3 ± 0.0		N/D		1.7 ± 0.1	
α-Terpineol	310.0	± 16.6	N/D		0.2 ± 0.0		N/D		4.9 ± 0.3	
Acetato de linalilo	207.1	± 13.2	N/D		0.1 ± 0.0		N/D		27.4 ± 2.1	
Acetato de bornilo	N/D		N/D		N/D		N/D		N/D	
β-Cariofileno	394.7	± 14.5	N/D		N/D		N/D		7.1 ± 0.5	

^aLos resultados de los AEs están expresados en las siguientes unidades: ORAC, ABTS y DPPH (mg ET/g AESI), PR (mg EAA/kg AESI), PQ (mg EEDTA/g AESI). ^bLos resultados de las biomoléculas individuales están expresados en: ORAC, DPPH y ABTS (μmol ET/mmol comp), PR (μmol EAA/mmol comp), PQ (μmol EEDTA/mmol comp). N/D = Actividad antioxidante inferior a 0.05 unidades de las biomoléculas individuales, ensayados a concentración máxima de 100 mM.

6.4. Inhibición enzimática

6.4.1. Inhibición de LOX

Mediante el método descrito en la Sección 3.6.1 se determinaron los GI (%) de todos los AEs de *S. lavandulifolia*, investigados a 150 μg/ml: AESI-4^{LOX} (42.4 ± 0.7%)^a > AESI-2^{LOX} (40.4 ± 0.8%)^b > AESI-1^{LOX} (36.6 ± 0.5%)^c > AESI-3^{LOX} (34.2 ± 0.7%)^d.

Al igual que se hizo con los métodos antioxidantes, también se han analizado las biomoléculas individuales para determinar cuáles inhiben eficazmente esta enzima, y a qué se debe la inhibición de los AEs en su conjunto.

Se obtuvieron las IC_{50} de acetato de bornilo ($379.6 \pm 14.4 \mu\text{M}$), limoneno ($852.3 \pm 24.2 \mu\text{M}$), alcanfor ($2743.4 \pm 85.1 \mu\text{M}$) y linalol ($3345.5 \pm 44.2 \mu\text{M}$). Acetato de bornilo y limoneno son las biomoléculas con mayor capacidad inhibidora de LOX. Otras biomoléculas fueron descritas por el GI a $3333.3 \mu\text{M}$: 1,8-cineol ($30.9 \pm 1.1\%$), terpinen-4-ol ($29.6 \pm 1.0\%$) y α -terpineol ($17.4 \pm 0.2\%$). Los tres aceites con mayor similitud (Conglomerado-1), muestran mayor actividad inhibidora de LOX. En su composición, estos AEs contienen mayor cantidad de limoneno y linalol que el AESI-3, dos biomoléculas capaces de inhibir LOX.

6.4.2. Inhibición de AChE

Los datos obtenidos de IC_{50} para los distintos aceites expresados en $\mu\text{g/ml}$ fueron los siguientes: AESI-4^{AChE} (108.0 ± 4.2)^b \approx AESI-1^{AChE} (108.9 ± 3.5)^b \approx AESI-2^{AChE} (119.3 ± 10.4)^b < AESI-3^{AChE} (142.4 ± 6.1)^a.

Respecto a todas las biomoléculas individuales probadas, 1,8-cineol ($IC_{50}^{\text{AChE}} = 228.3 \pm 9.9 \mu\text{M}$) fue el inhibidor más potente. Otras biomoléculas como α -pineno ($IC_{50}^{\text{AChE}} = 3274.5 \pm 58.2 \mu\text{M}$), canfeno (15% de inhibición a $311.2 \pm 27.3 \mu\text{M}$) y terpinen-4-ol (15% inhibición a $3776.0 \pm 247.1 \mu\text{M}$), también mostraron capacidad inhibidora de AChE. El resto de biomoléculas no mostraron capacidad inhibidora, a las máximas concentraciones de ensayo que permiten su solubilización en el medio de reacción. La concentración de 1,8-cineol es similar en todos los AEs de *S. lavandulifolia* estudiados. Debido a que esta biomolécula es la que muestra una menor IC_{50} de todas las biomoléculas estudiadas, y a que se encuentra en elevada concentración en todos los AEs, es la principal biomolécula por la cual los AEs muestran capacidad inhibidora.

6.5. Conclusiones

Todos los AEs de este estudio tienen alta concentración de α -pineno, canfeno, 1,8-cineol y alcanfor. Además, β -pineno, sabineno, mirceno, limoneno y borneol también se encuentran en concentraciones relativamente altas. El ACP y el AJC muestra que los AESI-1, -2 y -4 poseen concentraciones similares de linalol (16), 1,3,8-p-mentatrieno (17), acetato de linalilo (24) y acetato de sabinilo (27). En cambio, el AESI-3 tiene mayores concentraciones de alcanfor (18), borneol (19), R-mirtenol (22) y Z-citral (23), entre otros.

En cuanto al análisis de las biomoléculas quirales, la distribución de los enantiómeros del hidrato de sabineno, alcanfor, acetato de bornilo y β -cariofileno fueron similares en todos los AEs, por lo que pueden ser usados como biomarcadores de estos AEs.

El AESI-3 fue el que mostró una mayor capacidad antioxidante en los métodos ORAC, DPPH, ABTS y PR. Estas diferencias pueden ser explicadas por las capacidades antioxidantes de las biomoléculas constituyentes de los AEs, y por sinérgias o antagonismos entre ellos.

Todos los AEs de *S. lavandulifolia* mostraron inhibición de LOX a la concentración utilizada (150 μ g/ml). Aunque acetato de bornilo y limoneno fueron las biomoléculas más activas contra la actividad de LOX, las dos biomoléculas principales (alcanfor y 1,8-cineol) fueron también capaces de reducir la actividad de esta enzima. Además, estos AEs también fueron capaces de inhibir la actividad de AChE debido a la alta concentración de 1,8-cineol.

Este estudio es útil para conocer las aplicaciones potenciales de estos AEs en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.

6.6. Bibliografía

- Herraiz-Penalver, D., Usano-Aleman, J., Cuadrado, J., Jordan, M.J., Lax, V., Sotomayor, J.A., and Pala-Paul, J. (2010). Essential oil composition of wild populations of *Salvia lavandulifolia* Vahl. from Castilla-La Mancha (Spain). *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 1224-1230.
- ISO (2005). Oil of sage, Spanish (*Salvia lavandulifolia* Vahl). International Organization for Standardization ISO 3526:2005 (E).
- Perry, N.S.L., Bollen, C., Perry, E.K., and Ballard, C. (2003). *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75, 651-659.
- Porres-Martinez, M., Gonzalez-Burgos, E., Accame, M.E.C., and Gomez-Serranillos, M.P. (2013). Phytochemical composition, antioxidant and cytoprotective activities of essential oil of *Salvia lavandulifolia* Vahl. *Food Research International* 54, 523-531.
- Porres-Martinez, M., Gonzalez-Burgos, E., Carretero, M.E., and Gomez-Serranillos, M.P. (2014). Influence of phenological stage on chemical composition and antioxidant activity of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oils. *Industrial Crops and Products* 53, 71-77.
- Rzepa, J., Wojtal, L., Staszek, D., Grygierczyk, G., Labe, K., Hajnos, M., Kowalska, T., and Waksmondzka-Hajnos, M. (2009). Fingerprint of selected *Salvia* species by HS-GC-MS analysis of their volatile fraction. *Journal of Chromatographic Science* 47, 575-580.
- Santana, O., Cabrera, R., Gimenez, C., Gonzalez-Coloma, A., Sanchez-Vioque, R., de los Mozos-Pascual, M., Rodriguez-Conde, M.F., Laserna-Ruiz, I.,

- Usano-Aleman, J., and Herraiz, D. (2012). Chemical and biological profiles of the essential oils from aromatic plants of agro industrial interest in Castilla-La Mancha (Spain). *Grasas Y Aceites* 63, 214-222.
- Usano-Aleman, J., Pala-Paul, J., and Herraiz-Penalver, D. (2014). Temperature stress causes different profiles of volatile compounds in two chemotypes of *Salvia lavandulifolia* Vahl. *Biochemical Systematics and Ecology* 54, 166-171.
- Usano-Aleman, J., Pala-Paul, J., and Herraiz-Penalver, D. (2016). Essential oil yields and qualities of different clonal lines of *Salvia lavandulifolia* monitored in Spain over four years of cultivation. *Industrial Crops and Products* 80, 251-261.

7. Estudio sobre aceites esenciales de *Salvia officinalis* (AESo)

7.1. Determinación de la composición mediante CGR-IE/EM

7.1.1. Composición de AEs de *S. officinalis* cultivada en Murcia

Los rendimientos obtenidos mediante hidrodestilación fueron 0.8 – 1.5% (v/p). 46 biomoléculas fueron descritas en estos AEs, mediante sus espectros de masas, sus índices de retención y sus tiempos de retención comparándolos con compuestos puros, o con las bases de datos NIST-08 y Wiley-7. Las composiciones de los distintos AEs de *S. officinalis* se han descrito en concentración absoluta (mM) y en concentración relativa (% de área). La concentración absoluta se ha calculado para más del 82% del área total del cromatograma, mediante la construcción de rectas de calibrado, empleando compuestos puros comercialmente disponibles (Tabla 7.1). La totalidad de las biomoléculas identificadas supone más del 98% del área global del cromatograma (Tabla 7.2).

Los cuatro AEs de *S. officinalis* contienen las mismas biomoléculas principales: α -tuyona, alcanfor, β -tuyona y 1,8-cineol. α -Humuleno, α -pineno, canfeno y limoneno, se encuentran también en estos AEs en cantidades relativamente altas.

El análisis de componentes principales (ACP), basado en la matriz de covarianza de las combinaciones lineales de las variables experimentales (Tabla 7.2), muestra las relaciones que existen entre los distintos AEs de *S. officinalis* y sus composiciones. Los tres componentes principales (CP 1, CP 2 y CP 3) suponen el 50.66%, 34.93% y 14.41% del total de la varianza, respectivamente.

La gráfica de puntuación que representa el CP 2 respecto al CP 1 (Figura 7.1(A)), muestra que el AESo-1 es el que presenta mayor diferencia en cuanto a composición respecto a los otros tres AEs. Con esta gráfica, se obtiene una idea aproximada de los posibles agrupamientos de las muestras en distintos conglomerados, siendo difícil discernir si el AESo-3 y el -4 o el AESo-2 y el -4 pueden formar parte de un mismo conglomerado. Al añadir el CP 3 en el eje Z

(Figura 7.1(B)) se observa una mayor diferencia entre el AESo-3 y el -4 que entre el AESo-2 y -4, pudiendo agrupar éstos dos últimos en el mismo conglomerado.

Mediante la gráfica de cargas (Figura 7.2), se puede determinar qué biomoléculas son “características” de cada AE de *S. officinalis*. Las cargas de las biomoléculas están estandarizadas. Como biomolécula “característica” se define como aquella biomolécula que se encuentra en exclusividad o en mayor proporción en un AE respecto a los demás. Biomoléculas características del AESo-1 son terpinoleno (20), linalol (21) y viridiflorol (45), por estar presentes en mayor concentración en este AE que en los otros, y ascaridol (30) por estar únicamente en este AE. El AESo-2 presenta mayor concentración de sabineno (8), y la presencia en exclusividad de 3-careno (13) y acetato de α -terpinilo (33). Además, este AE junto al AESo-4 presentan alta concentración de α -pineno (5), limoneno (16) y α -tuyona (22). El AESo-3 muestra una alta concentración de β -pineno (9) y presencia en exclusividad de acetato de mirtenilo (32). Los AESo-1 y -3 muestran mayores concentraciones de 1,8-cineol (17), borneol (25) y β -cariofileno (37) que los AESo-2 y -4.

Tabla 7.1. Rectas de calibrado para el cálculo de las concentraciones absolutas de los compuestos comercialmente disponibles presentes en los AEs de *S. officinalis*.

Biomolécula	Rectas de calibrado ^a	R ²	Intervalo de calibrado (mM)	DER (%)	LD (mM)	LC (mM)	Proveedor	Referencia
Nonano	Patrón interno						SAFC	442694
(-) α -Pinoeno	$y=1.272x-0.008$	0.999	10.06-0.25	1.0	0.03	0.08	Fluka	80599
(+)Canfeno	$y=0.728x+0.001$	0.999	11.09-0.28	0.6	0.05	0.16	SAFC	w222909
Sabineno	$y=-0.796x+0.022$	0.999	9.78-0.61	1.1	0.09	0.28	Extrasynthese	5062 S
(-) β -Pinoeno	$y=1.053x-0.010$	1.000	10.29-0.26	1.3	0.03	0.08	Fluka	80609
Mirceno	$y=0.675x-0.011$	0.999	8.97-0.22	1.4	0.02	0.06	Fluka	64643
S(+)-3-Octanol	$y=0.263x-0.007$	0.999	16.55-0.99	5.8	0.30	0.91	Aldrich	666718
(-)Felandreno	$y=0.528x-0.008$	0.999	9.52-0.60	1.6	0.11	0.32	Aldrich	77429
α -Terpineno	$y=0.591x-0.024$	0.999	15.75-0.59	1.3	0.15	0.45	Aldrich	86473
p-Cimeno	$y=2.709x-0.003$	0.999	9.95-0.25	1.1	0.01	0.03	Aldrich	c121452
(+)Limoneno	$y=1.308x-0.026$	0.999	9.55-0.24	1.0	0.04	0.12	Fluka	62118
1,8-Cineol	$y=0.523x-0.008$	1.000	9.55-0.60	1.5	0.16	0.50	SAFC	w246506
γ -Terpineno	$y=0.906x-0.018$	0.999	9.87-0.25	1.0	0.02	0.06	Aldrich	223190
Hidrato de sabineno	$y=0.562x-0.013$	0.999	9.66-0.60	3.2	0.10	0.31	Fluka	96573
Terpinoleno	$y=0.618x-0.021$	0.999	15.34-0.92	0.7	0.23	0.70	SAFC	W304603
(-)Linalol	$y=0.471x-0.009$	0.999	8.80-0.55	3.1	0.10	0.31	Fluka	74856
α -Tuyona	$y=0.244x-0.006$	0.999	14.63-2.20	3.6	0.47	1.44	Aldrich	89231
Tetradecano	Patrón interno						SAFC	442708
(+)Alcanfor	$y=0.090x-0.007$	0.999	9.64-0.96	0.9	0.24	0.73	Alfa Aesar	A10708
(-)Borneol	$y=0.154x-0.002$	0.999	8.99-0.90	1.9	0.20	0.60	Alfa Aesar	A12684
(-)Terpinen-4-ol	$y=0.285x-0.009$	0.999	9.57-0.96	3.6	0.24	0.73	Aldrich	11584
(+) α -Terpineol	$y=0.169x$	0.998	9.87-0.99	2.0	0.25	0.75	Fluka	83073
R(-)-Mirtenol	$y=0.183x+0.002$	0.999	16.87-2.53	2.6	0.44	1.34	SAFC	W343900K
Acetato de linalilo	$y=0.179x+0.005$	0.993	11.97-1.80	1.9	0.45	1.36	SAFC	w263605
(-)Acetato de bornilo	$y=0.355x-0.001$	0.999	13.59-0.82	1.6	0.20	0.62	Fluka	45855
(+)Acetato de α -terpinilo	$y=0.296x$	1.000	11.95-1.79	1.0	0.24	0.74	Aldrich	86487
(-)E- β -Cariofileno	$y=0.094x+0.003$	0.999	6.35-1.09	2.5	0.36	1.09	Sigma	22075
α -Humuleno	$y=0.416x-0.011$	0.999	6.35-0.63	1.9	0.15	0.47	Aldrich	53675
Hexadecano	Patrón interno						Fluka	52209
(+)-Ledeno	$y=0.045x-0.001$	0.999	11.53-1.73	1.8	0.50	1.52	Aldrich	61770
Óxido de cariofileno	$y=0.067x+0.008$	0.999	17.66-6.62	2.2	1.85	5.64	SAFC	w509647

^aRelación de respuesta vs. relación de concentración. El factor de corrección con el patrón interno está incluido en cada recta. Cada patrón sirve de referencia para las biomoléculas descritas debajo del mismo. DER = Desviación estándar relativa. LD = límite de detección. LC = límite de cuantificación

Tabla 7.2. CGR para determinar la composición de AEs de *S. officinalis*.

N ^a	IRL ^b	IRL ^c	Biomolécula	Iones ^d (m/z)	[AESo-1]		[AESo-2]		[AESo-3]		[AESo-4]		MI
					(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	
1	824	842	2-Metilbutanoato de etilo	41, 57, 85, 102					tr				1,2
2	856	845	(Z) Salveno	67, 81, 109, 124		0.3g ± 0.0		0.1h ± 0.0		0.4f ± 0.0		1.0e ± 0.0	1,2
3	873	856	(E) Salveno	67, 81, 109, 124		0.1g ± 0.0		tr		0.1f ± 0.0		0.2e ± 0.0	1,2
4	928	926	α-Tuyeno	77, 91, 93, 136		0.3h ± 0.0		0.4f ± 0.0		0.4g ± 0.0		0.5h ± 0.0	1,2,3
5	930	936	α-Pineno	77, 91, 93 , 121	179.4c ± 2.1	3.6h ± 0.0	241.3b ± 8.4	4.6f ± 0.2	218.3b ± 12.0	4.1g ± 0.2	279.8a ± 17.8	5.1e ± 0.1	1,2,3
6	940	950	α-Fencheno	79, 93, 121, 136				0.4e ± 0.0		tr			1,2
7	943	953	Canfeno	79, 93 , 121, 136	312.4a ± 15.2	5.6f ± 0.1	311.6a ± 11.6	6.0e ± 0.1	232.3b ± 9.5	3.7h ± 0.2	276.9a ± 1.4	4.9g ± 0.0	1,2,3
8	964	974	Sabineno	77, 91, 93 , 136	7.5c ± 0.2	0.1g ± 0.0	187.6a ± 11.2	2.9e ± 0.1	19.4bc ± 0.7	0.3fg ± 0.0	23.2b ± 2.4	0.3f ± 0.0	1,2,3
9	970	982	β-Pineno	69, 79, 91, 93	77.6c ± 0.8	1.5g ± 0.0	38.9d ± 2.9	0.8h ± 0.0	304.9a ± 20.3	5.3e ± 0.2	127.2b ± 0.6	2.2f ± 0.0	1,2,3
10	979	989	Mirceno	41, 69 , 93, 121	48.8ab ± 0.6	0.8ef ± 0.0	56.9a ± 4.2	0.9e ± 0.1	44.3b ± 3.2	0.7fg ± 0.0	46.3b ± 0.8	0.7g ± 0.0	1,2,3
11	985	999	3-Octanol	41, 55, 59 , 83	6.5 ± 1.0	tr							1,2,3
12	999	1008	Felandreno	77, 93 , 119, 136	6.4a ± 0.2	0.1e ± 0.0	2.6b ± 0.2	tr	1.8c ± 0.1	tr			1,2,3
13	1000	1010	3-Careno	77, 91, 93, 121				0.2 ± 0.0					1,2
14	1008	1017	α-Terpineno	91, 93 , 119, 121	16.2a ± 0.3	0.2e ± 0.0	11.7b ± 0.4	0.1f ± 0.0	3.5c ± 0.1	tr			1,2,3
15	1011	1024	p-Cimeno	91, 117, 119 , 121	44.7a ± 0.9	1.2e ± 0.0	42.2a ± 1.8	1.2e ± 0.0	22.5b ± 2.2	0.6g ± 0.0	45.4a ± 2.7	1.0f ± 0.0	1,2,3
16	1020	1028	Limoneno	67, 68 , 79, 93	71.9c ± 0.7	2.6g ± 0.0	130b ± 5.0	4.3e ± 0.0	44.5d ± 3.3	1.5h ± 0.1	145.6a ± 8.7	4.2f ± 0.0	1,2,3
17	1023	1032	1,8-Cineol	43, 81, 93 , 108	445.5b ± 23.6	10.6f ± 0.1	209.9d ± 7.5	4.7h ± 0.0	631.1a ± 3.3	15.6e ± 0.7	349.0c ± 21.5	7.1g ± 0.0	1,2,3
18	1053	1055	γ-Terpineno	77, 91, 93 , 119	22.9a ± 0.5	0.5e ± 0.0	16.3b ± 1.0	0.3f ± 0.0	9c ± 0.3	0.1g ± 0.0	2.9d ± 0.2	0.1h ± 0.0	1,2,3
19	1070	1071	Hidrato de sabineno	77, 91, 93 , 121			9.7b ± 0.3	0.1f ± 0.0	12.4a ± 0.3	0.2e ± 0.0	7.5c ± 0.4	0.1g ± 0.0	1,2,3
20	1080	1086	Terpinoleno	91, 93 , 121, 136	15.5a ± 0.4	0.3e ± 0.0	9.9b ± 1.3	0.1f ± 0.0	8c ± 0.4	0.1f ± 0.0	3.4d ± 0.0	0.1g ± 0.0	1,2,3
21	1081	1105	Linalol	41, 67, 69 , 93	117.4a ± 2.1	2.1e ± 0.1	16c ± 0.4	0.2g ± 0.0	33.8b ± 0.4	0.6f ± 0.0	15.6c ± 1.3	0.2g ± 0.0	1,2,3
22	1113	1111	α-Tuyona	67, 81 , 95, 118	1479.1b ± 50.8	22.8g ± 0.3	2419.9a ± 98.0	41.7e ± 1.5	1620.8b ± 93.4	25.5f ± 0.8	2381.5a ± 135.6	42.9e ± 0.1	1,2,3
23	1123	1118	β-Tuyona	41, 81, 95, 110		6.1g ± 0.7		7.8f ± 0.6		15.6e ± 0.6		7.5f ± 0.0	1,2
24	1148	1147	Alcanfor	81, 95 , 108, 152	1037.2a ± 41.2	19.8e ± 0.2	995.2a ± 193.5	16.0f ± 1.1	775.4a ± 103.6	10.7h ± 0.5	853.9a ± 47.1	14.2g ± 0.1	1,2,3
25	1174	1173	Borneol	79, 93, 95 , 110	148.3ab ± 11.8	1.7f ± 0.1	90.6b ± 10.4	0.7h ± 0.1	208.3a ± 49.6	2.1e ± 0.2	115.8b ± 8.6	1.2g ± 0.1	1,2,3
26	1161	1180	Terpinen-4-ol	71, 86, 93 , 111	32b ± 4.8	0.5f ± 0.1	73.8a ± 8.6	0.9e ± 0.2	29.7b ± 5.5	0.5f ± 0.1	32.7b ± 2.9	0.4f ± 0.0	1,2,3
27	1192	1198	α-Terpineol	59, 67, 93 , 121	15.8a ± 3.6	0.2e ± 0.0	11.3a ± 0.8	0.1f ± 0.0	14.2a ± 2.2	0.2e ± 0.0	10.3a ± 1.9	0.1f ± 0.0	1,2,3
28	1191	1201	R-Mirtenol	79, 91 , 93, 119	6.7bc ± 0.6	0.1f ± 0.0	11.6a ± 0.7	0.2e ± 0.0	8.0b ± 0.5	0.1f ± 0.0	5.2c ± 0.7	0.1f ± 0.0	1,2,3
29	1237	1249	Acetato de linalilo	41, 69, 93 , 80			2.1b ± 0.2	tr	23.7a ± 0.7	0.3e ± 0.0			1,2,3
30	1273	1251	Ascaridol	41, 55, 69, 79		0.2 ± 0.0							1,2
31	1285	1285	Acetato de bornilo	79, 93 , 95, 121	89.7a ± 0.8	1.9e ± 0.0	44.6b ± 0.5	0.6g ± 0.0	75.7a ± 21.5	1.2f ± 0.2	23.6b ± 1.6	0.5g ± 0.0	1,2,3
32	1306	1321	Acetato de mirtenilo	79, 91, 92, 119						0.1 ± 0.0			1,2
33	1322	1344	Acetato de α-terpinilo	67, 68, 93 , 121			6.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0					1,2,3

N ^a	IRL ^b	IRL ^c	Biomolécula	Iones ^d (m/z)	[AESo-1]		[AESo-2]		[AESo-3]		[AESo-4]		MI
					(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	
34	1376	1370	α -Copaeno	91, 105, 119, 161		0.1e ± 0.0		tr		tr			1,2
35	1383	1377	α -Bourboneno	80, 81, 123, 161		0.1e ± 0.0		tr		tr			1,2
36	1387	1385	β -Elemeno	67, 81, 93, 189		0.1e ± 0.0		tr					1,2
37	1421	1419	<i>E</i> - β -Cariofileno	41 , 91, 93, 133	253.7a ± 3.8	5.1e ± 0.1	64.4b ± 18.7	0.9f ± 0.0	276.2a ± 34.8	4.7e ± 0.8	78.2b ± 5.1	1.5f ± 0.0	1,2,3
38	1454	1459	α -Humuleno	80, 93 , 107, 204	196.4a ± 1.4	6.2e ± 0.3	53.9c ± 7.9	1.6g ± 0.3	93.6b ± 13.1	3.1f ± 0.5	64.5c ± 3.8	2.2g ± 0.0	1,2,3
39	1455	1462	Aromadendreno	91, 105, 161, 189		0.2e ± 0.0		0.1f ± 0.0		0.1f ± 0.0		0.1f ± 0.0	1,2
40	1473	1490	Ledeno	91, 105 , 107, 161	38.5a ± 0.4	0.3e ± 0.0	10.1b ± 0.2	0.1f ± 0.0	4.5d ± 0.3	tr	5.5c ± 0.2	tr	1,2,3
41	1494	1496	α -Muuroleno	91, 93, 119, 161		tr		tr					1,2
42	1507	1510	γ -Cadineno	91, 105, 119, 161		0.1e ± 0.0		tr		tr			1,2
43	1514	1517	δ -Cadineno	91, 119, 134, 161		0.2e ± 0.0		0.1f ± 0.0		tr			1,2
44	1575	1579	Óxido de cariofileno	41, 79, 91 , 109	13.3c ± 2.5	0.2fg ± 0.0	10.2c ± 0.4	0.1g ± 0.0	40.1a ± 2.6	0.4e ± 0.1	27.6b ± 2.7	0.3ef ± 0.0	1,2,3
45	1594	1594	Viridiflorol	43, 109, 161, 204		2.7e ± 0.1		0.9f ± 0.1		0.8f ± 0.1		0.9f ± 0.0	1,2
46	2046	2065	Manool	81, 95, 137, 257		0.4e ± 0.0		0.1g ± 0.0		0.1g ± 0.0		0.2f ± 0.0	1,2
Terpenos oxigenados:													
Alcoholes						7.8		3.2		4.5		3.3	
Cetonas						48.7		65.5		51.8		64.5	
Aldehídos						0.0		0.0		0.0		0.0	
Peróxidos						0.2		0.0		0.0		0.0	
Ésteres						1.9		0.7		1.6		0.5	
Éteres						10.8		4.8		16.1		7.4	
Monoterpenos hidrocarbonados						16.8		22.4		17.1		18.9	
Monoterpenos oxigenados						66.1		73.2		72.6		74.2	
Sesquiterpenos hidrocarbonados						12.3		2.9		8.0		3.8	
Sesquiterpenos oxigenados						3.3		1.1		1.4		1.4	
Diterpenos hidrocarbonados						0.0		0.0		0.0		0.0	
Diterpenos oxigenados						0.4		0.1		0.1		0.2	
Total terpenos hidrocarbonados						29.1		25.3		25.1		22.7	
Total terpenos oxigenados						69.3		74.3		74.0		75.7	
Biomoléculas no isoprenoides						1.5		0.4		0.9		1.6	

N^a = Número de referencia para el ACP. IRL^b = Índice de retención lineal obtenido a partir de las bases de datos NIST-08 y Wiley-7. IRL^c = Índice de retención lineal calculado a partir de una serie de n-alcenos (C7-C30). ^d Los iones cuantificadores están marcados en negrita. MI = Método de identificación: 1 = mediante IRL, 2 = mediante comparación de espectros con NIST-08 y Wiley-7, 3 = mediante comparación con compuestos puros comerciales. tr = trazas (<0.1%).

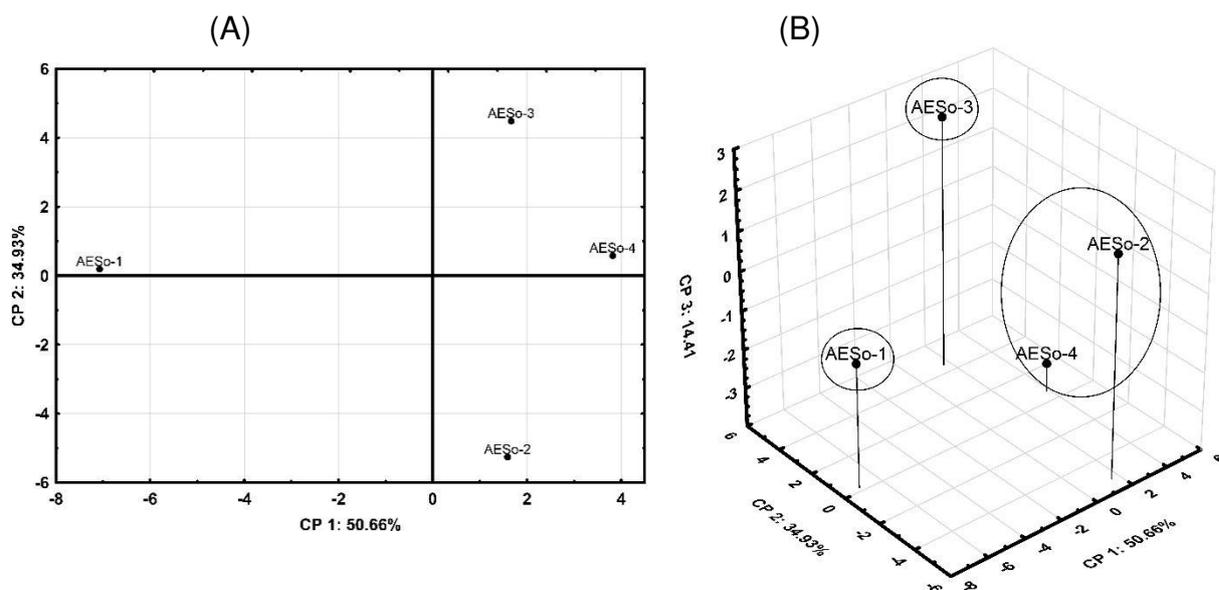


Figura 7.1. Gráficas de puntuación para los AEs de *S. officinalis*. (A) Gráfica de puntuación del CP 2 vs. CP1. (B) Gráfica de puntuación del CP 3 vs. CP 2 y CP 1.

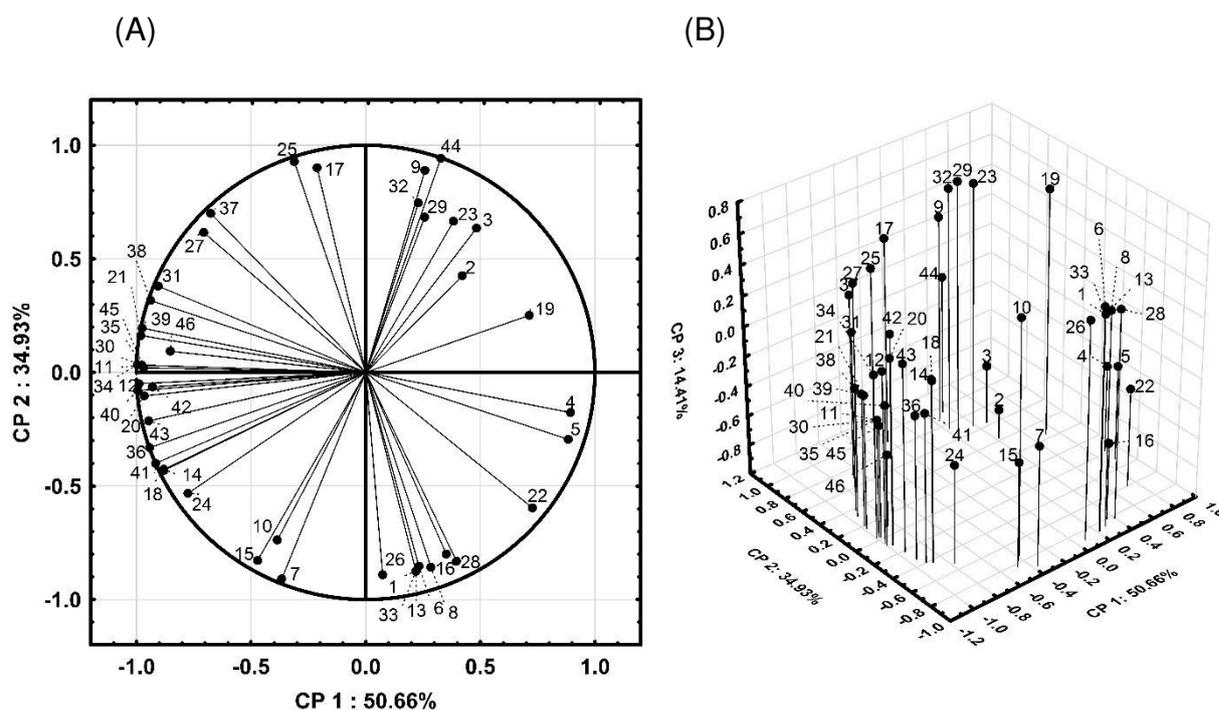


Figura 7.2. Gráficas de cargas para los AEs de *S. officinalis*. (A) Gráfica de cargas del CP 2 vs. CP 1. (B) Gráfica de cargas del CP 3 vs. CP 2 y CP 1.

Con la totalidad de las áreas relativas de todas las biomoléculas identificadas, se realizó el AJC, mostrando que los AESo-2 y -4 son los más similares, con un 79.2% de similitud. Los AESo-1 y -3 mostraron una similitud del 32.4%. La similitud entre ambos grupos es del 6.1%. Este método proporciona datos cuantitativos de las semejanzas existentes entre los AEs,

demostrando que los AEs de *S. officinalis* estudiados pueden ser agrupados en tres conglomerados: el conglomerado 1, compuesto por los AEs-2 y -4, el conglomerado 2 por el AEs-3 y el conglomerado 3 por el AEs-1.

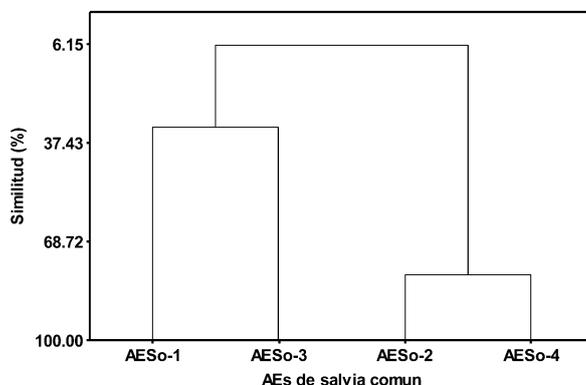


Figura 7.3. Dendrograma del AJC para los AEs de *S. officinalis*.

7.1.2. Comparativa con AEs de *S. officinalis* de otras regiones y países

Los estudios previos realizados sobre AEs de *S. officinalis* describen la composición relativa de los mismos, expresada como porcentaje de área total del cromatograma. Estos estudios muestran una alta variabilidad, incluso en relación a las moléculas principales, por ejemplo, α -tuyona (3.0-57.0%) o alcanfor (3.3-37.7%) (Bernotiene *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2004; Maksimovic *et al.*, 2007; Raina *et al.*, 2013).

De los estudios realizados previamente sobre AEs de *S. officinalis*, sólo dos fueron llevados a cabo con AEs de plantas cultivadas en España (Arraiza *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2012). 1,8-Cineol, α -tuyona, y alcanfor son las biomoléculas mayoritarias, al igual que en los AEs de *S. officinalis* de Murcia. En cambio, ciertas diferencias, tales como un menor porcentaje de tuyona y un mayor porcentaje de α -pineno y linalol, fueron encontradas en el estudio sobre AEs de *S. officinalis* de Cuenca (Santana *et al.*, 2012). Los AEs obtenidos a partir de plantas cultivadas en Guadalajara (Arraiza *et al.*, 2012) mostraron un alto contenido en viridiflorol y α -tuyona.

Comparando la composición de los AEs de *S. officinalis* de Murcia con las de otros obtenidos a partir de plantas cultivadas en distintos países de Europa, se encuentran ciertas similitudes. Santos-Gomes and Fernandes-Ferreira (2001), Lima *et al.* (2004) y Pinto *et al.* (2007) estudiaron AEs de *S. officinalis*

cultivada en Portugal y describieron las mismas biomoléculas principales que en nuestro estudio, aunque en ciertos casos, el contenido en α -tuyona fue inferior al de nuestros AEs. Los resultados obtenidos por Marino *et al.* (2001) y Baj *et al.* (2013), con AEs de Italia y Polonia, respectivamente, fueron similares a los encontrados en AEs de Murcia, excepto en relación a la concentración de viridiflorol y manool, no detectada en los AEs de Italia y detectada en mayores cantidades en los AEs de Polonia. AEs de *S. officinalis* obtenidos en Lituania (Bernotiene *et al.*, 2007) mostraron las mayores concentraciones de viridiflorol y manool descritas en los AEs de esta especie. Jug-Dujakovic *et al.* (2012) describieron una alta variabilidad de concentraciones relativas de las biomoléculas principales en sus AEs, debido únicamente a diferencias genéticas. Radulescu *et al.* (2004) y Pinto *et al.* (2007) describieron el 1-octen-3-ol como biomolécula presente en AEs de *S. officinalis*, a diferencia de los AEs estudiados en este trabajo, siendo muy elevado el porcentaje de área descrito para esta biomolécula por los primeros autores. La ausencia de esta biomolécula se considera un aspecto positivo ya que está asociada al olor producido por contaminación fúngica. Cvetkovikj *et al.* (2015) también encontraron una alta variabilidad de composición entre AEs de *S. officinalis* provenientes del sureste de Europa.

Otros estudios llevados a cabo en India (Raina *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2015) y Túnez (Ben Farhat *et al.*, 2009), mostraron las mismas biomoléculas principales para AEs obtenidos a partir de plantas de *S. officinalis*, con diferencias en las concentraciones de viridiflorol, humuleno y epóxido de humuleno-II. La mayoría de estudios muestran que los AEs de *S. officinalis* tienen un mayor porcentaje de α -tuyona que de β -tuyona, excepto el estudio de Hayouni *et al.* (2008b) con AEs de Túnez. Una composición totalmente distinta fue la detallada en el estudio de Abu-Darwish *et al.* (2013) con AEs de *S. officinalis* cultivada en Jordania, ya que describe un mayor porcentaje de 1,8-cineol (hasta un 50.3%) que de tuyona. Además, estudios llevados a cabo con AEs de Brasil (Delamare *et al.*, 2007; Pierozan *et al.*, 2009; Porte *et al.*, 2013) describen α -tuyona, 1,8-cineol y alcanfor como biomoléculas principales, sin la presencia de manool y viridiflorol.

Los monoterpenos oxigenados son las biomoléculas más abundantes en los AEs de *S. officinalis* de Murcia, de forma similar a lo que ocurre en estudios previos de otros orígenes (Abu-Darwish *et al.*, 2013; Bouaziz *et al.*, 2009; Hayouni *et al.*, 2008a; Lima *et al.*, 2004; Maksimovic *et al.*, 2007; Mirjalili *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2007; Raina *et al.*, 2013; Santana *et al.*, 2012; Santos-Gomes and Fernandes-Ferreira, 2001). En cuanto a los grupos funcionales, las biomoléculas con un grupo cetónico son las más abundantes, seguidos por las que poseen un grupo éter. En nuestro estudio, y en otros previamente descritos con AEs de esta planta obtenidos en otras regiones o países (Abu-Darwish *et al.*, 2013; Bouaziz *et al.*, 2009; Mirjalili *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2007; Raina *et al.*, 2013; Santana *et al.*, 2012; Santos-Gomes and Fernandes-Ferreira, 2001), el porcentaje de monoterpenos hidrocarbonados es superior al de sesquiterpenos hidrocarbonados.

Según la revisión bibliográfica realizada sobre *S. officinalis*, sólo dos estudios llevados a cabo con AEs de Portugal (Lima *et al.*, 2004; Santos-Gomes and Fernandes-Ferreira, 2001), describieron la concentración absoluta de las biomoléculas presentes en los AEs, expresada en $\mu\text{g/g}$ de biomasa seca. La determinación de la concentración absoluta de las biomoléculas es importante para detectar adulteraciones con disolventes orgánicos y para asegurar su calidad en diferentes aplicaciones biotecnológicas. En ocasiones, una mayor concentración relativa no determina una mayor concentración absoluta, ya que las concentraciones relativas dependen de la concentración del resto de componentes del AE. Por ejemplo, AESo-1 muestra mayor porcentaje de β -cariofileno que el AESo-3, sin embargo, la concentración absoluta de esta biomolécula en el primer AE es menor. Lo mismo ocurre con el limoneno entre los AESo-2 y -4. Las concentraciones de 1,8-cineol descritas en estudios previos llevados a cabo con AEs de Portugal (Lima *et al.*, 2004; Santos-Gomes and Fernandes-Ferreira, 2001) fueron superiores a las de este estudio, mientras que las concentraciones de α -tuyona y alcanfor fueron inferiores (el alcanfor es el que muestra una mayor diferencia).

7.1.3. Comparación con la normativa ISO

En general, la composición descrita para los AEs de *S. officinalis* estudiados, se encuentra dentro de los intervalos de concentración establecidos

por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) (ISO, 1997) (Tabla 7.3). Las concentraciones de limoneno y α -tuyona de los AESo-2 y -4 y las de 1,8-cineol y β -tuyona en el AESo-3, son superiores a las establecidas en la normativa ISO. Algunas biomoléculas de AEs de *S. officinalis* de Europa presentaron valores de concentración por debajo del intervalo descrito en la ISO, por ejemplo, α -tuyona (Bernotiene *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2012), α -pineno (Jug-Dujakovic *et al.*, 2012; Maksimovic *et al.*, 2007; Radulescu *et al.*, 2004) o alcanfor (Lima *et al.*, 2004; Maksimovic *et al.*, 2007). En cambio, algunos superan el intervalo establecido para 1,8-cineol (Santana *et al.*, 2012) o β -tuyona (Baj *et al.*, 2013; Jug-Dujakovic *et al.*, 2012; Maksimovic *et al.*, 2007).

Tabla 7.3. Comparación de las composiciones de los AEs de *S. officinalis* con los intervalos establecidos por ISO.

Biomolécula	ISO 9909 ^a (%)	AESo-1 (%)	AESo-2 (%)	AESo-3 (%)	AESo-4 (%)
α -Pineno	1.0 - 6.5	4.7	5.6	5.3	5.8
Canfeno	1.5 - 7.0	7.2	7.1	4.7	5.5
Limoneno	0.5 - 3.0	3.4	5.1	1.9	4.7
1,8-Cineol	5.5 - 13.0	13.5	5.6	20.1	8.0
α -Tuyona	18.0 - 43.0	29.6	49.7	32.6	48.3
β -Tuyona	3.0 - 8.5	3.8	5.3	14.8	8.5
Alcanfor	4.5 - 24.5	25.4	18.8	14.0	16.0
Linalol + acetato de linalilo	0 - 1.0	2.7	0.3	1.1	0.3
Acetato de bornilo	0 - 2.5	2.4	0.7	1.6	0.5
α -Humuleno	0 - 12.0	7.3	1.8	3.9	2.5

^a Estándar ISO 9909 para *S. officinalis* (ISO, 1997).

7.2. Cromatografía de gases enantioselectiva-espectrometría de masas

La Tabla 7.4 detalla la distribución enantiomérica de las biomoléculas de los AEs de *S. officinalis* comercialmente disponibles. El enantiómero dextrógiro predomina en el caso de alcanfor, acetato de bornilo y borneol, mientras que el enantiómero levógiro es el más abundante en el caso canfeno, β -pineno, α -felandreno, α -tuyona, linalol y β -cariofileno. Las distribuciones enantioméricas de limoneno, terpinen-4-ol y α -terpineol pueden ser útiles para la caracterización de cada AE, ya que presentan diferencias entre ellos (marcadores biomoleculares). De la composición del AESo-1 se pueden distinguir como marcadores β -pineno, limoneno, linalol, terpinen-4-ol y α -terpineol, del AESo-2, las biomoléculas β -pineno, limoneno, terpinen-4-ol, borneol y acetato de α -terpinilo, del AESo-3 las

biomoléculas α -tuyona, terpinen-4-ol, α -terpineol y borneol, y del AESo-4 las biomoléculas α -tuyona y terpinen-4-ol.

Según la revisión bibliográfica realizada, este es el primer estudio que detalla la caracterización quiral de los AEs de *S. officinalis* de España. El porcentaje de (+)-alcanfor encontrado en estos AEs fue similar al descrito en AEs de Francia (Tateo *et al.*, 1999). Un estudio realizado con AEs de *S. officinalis* de Israel mostró dos AEs con alto contenido en (S)(-)-alcanfor y otros dos con alto contenido en (R)(+)-alcanfor. Demirci *et al.* (2002) estudiaron varios AEs obtenidos a partir de plantas del género *Salvia* crecidas en Turquía, siendo (-)-alcanfor, (+)-borneol, (-)-linalol, (+)-limoneno y (-)- β -pineno los enantiómeros más abundantes.

Tabla 7.4. Distribución enantiomérica de las biomoléculas presentes en AEs de *S. officinalis* comercialmente disponibles.

t_R (min)		Biomolécula ^a	AESo-1		AESo-2		AESo-3		AESo-4	
(+)	(-)		(+)	(-)]	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
7.79	7.52	α -Pino	40.6	59.4	70.9	29.1	49.4	50.6	70.4	29.6
8.47	8.24	Canfeno	42.5	57.5	36.9	63.1	20.6	79.4	37.5	62.5
8.89	9.16	β -Pino	40.5	59.5	<5.0	>95.0	15.4	84.6	24.8	75.2
10.36	9.40	α -Felandreno	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0		
10.52	10.00	Limoneno	52.2	47.8	>95.0	<10.0	21.7	78.3	25.5	74.5
15.40	15.31	α -Tuyona	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	33.8	66.2	21.6	78.4
15.73	15.57	Linalol	61.3	38.7	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0
16.72	16.46	Alcanfor	89.7	10.3	62.3	37.7	73.7	26.3	75.9	24.1
18.02	18.18	Acetato de bonilo	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0
18.32	18.51	Terpinen-4-ol	50.0	50.0	>95.0	<5.0	30.0	70.0	60.0	40.0
20.10	19.76	α -Terpineol	<5.0	>95.0	>95.0	<5.0	44.4	55.6	>95.0	<5.0
20.15	19.58	Borneol	67.3	32.7	>95.0	<5.0	43.8	56.2	69.4	30.6
20.91	22.35	Acetato de α -terpinilo			95.0	5.0				
23.92	22.81	E- β -Cariofileno	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0	<5.0	>95.0

^aLos resultados están expresados en %, siendo la desviación estándar menor del 5% en todos los casos.

7.3. Bioactividad antioxidante

7.3.1. ORAC

Las bioactividades antioxidantes, según el método ORAC, de los cuatro AEs de *S. officinalis* (Tabla 7.5) fueron las siguientes, en orden decreciente: AESo-1^{ORAC} \approx AESo3^{ORAC} > AESO-2^{ORAC} \approx AESo-4^{ORAC}.

Con el objetivo de relacionar las diferentes capacidades antioxidantes de los AEs y sus composiciones, se determinaron las capacidades antioxidantes de las principales biomoléculas individualmente. Los AESo-1 y -3 presentan mayor

concentración de linalol y β -cariofileno que los otros dos AEs. Estas dos biomoléculas con actividad antioxidante frente a radicales libres oxigenados, pueden ser las responsables de la mayor capacidad antioxidante de los AESo-1 y -3.

7.3.2. DPPH

Los AEs de *S. officinalis* estudiados mostraron actividad antioxidante en este método (Tabla 7.5): AESo-1^{DPPH} > AESo-4^{DPPH} > AESo-2^{DPPH} \approx AESo-3^{DPPH}.

Muchas de las biomoléculas presentes en estos AEs no presentan actividad en este método (Tabla 7.5), por lo que la actividad antioxidante del AE se debe a biomoléculas minoritarias, y a sinergias o antagonismos que se producen entre ellos (Kelen and Tepe, 2008). El AESo-1 presenta mayor concentración de α -terpineno y γ -terpineno, biomoléculas que le proporcionan mayor capacidad antioxidante.

7.3.3. ABTS

Los resultados de este método se encuentran detallados en la Tabla 7.5 y pueden ser ordenados de la siguiente forma: AESo-1^{ABTS} > AESo-2^{ABTS} > AESo-3^{ABTS} \approx AESo-4^{ABTS}. En este método, las biomoléculas analizadas individualmente con mayor capacidad antioxidante, fueron α -terpineno y γ -terpineno (Tabla 7.5), justificando la mayor capacidad antioxidante de los AESo-1 y -2.

7.3.4. TBARS

Los AEs ensayados con este método mostraron los siguientes resultados (Tabla 7.5): AESo-1^{TBARS} > AESo-2^{TBARS} \approx AESo-4^{TBARS} \approx AESo-3^{TBARS}. El AESo-1 mostró mayor capacidad antioxidante que el resto; en este caso, puede ser debida a la mayor concentración de γ -terpineno, β -cariofileno y α -humuleno, biomoléculas capaces de inhibir la oxidación lipídica.

7.3.5. PR

Todos los AEs fueron capaces de reducir iones de hierro (III) (Tabla 7.5), siendo de mayor a menor: AESo-3^{PR} \approx AESo-4^{PR} > AESo-1^{PR} > AESo-2^{PR}. Al igual que con el resto de métodos, las principales biomoléculas de estos AEs

fueron probadas de forma individual, revelando que los resultados de los AEs son producto de efectos sinérgicos o antagonistas entre sus componentes.

7.3.6. PQ

Los AEs proporcionaron los siguientes resultados para este método (Tabla 7.5): AESo-4^{PQ} > AESo-2^{PQ} > AESo-1^{PQ} > AESo-3^{PQ}. En este método, expresaron actividad muchas de las biomoléculas individuales investigadas (Tabla 7.5). Debido a que la concentración de α -tuyona es muy superior en los AESo-4 y -2 respecto a los AESo-1 y -3, aunque no es la más activa dentro de las biomoléculas ensayadas, puede ser elevada su contribución a las distintas capacidades quelatantes de los AEs en su conjunto. Los átomos de oxígeno de los grupos alcohol, cetona y éter contienen pares de electrones libres, que podrían conferir potencia quelatante a la molécula que los contiene (Carrasco *et al.*, 2016).

7.4. Inhibición enzimática

7.4.1. Inhibición de LOX

Los AEs de *S. officinalis* mostraron actividad inhibidora de LOX en los experimentos *in vitro*. Todos los AEs fueron ensayados a 150 $\mu\text{g/ml}$, obteniendo el GI (%) a esta concentración. En estos análisis no se pudieron calcular los valores de IC₅₀, puesto que no fue posible disolver los AEs a mayor concentración, debido a sus bajos límites de solubilidad. Los resultados fueron los siguientes: AESo-4^{LOX} (52.8 \pm 1.2)^a > AESo-2^{LOX} (45.5 \pm 1.5)^b \geq AESo-1^{LOX} (44.3 \pm 1.3)^{bc} \geq AESo-3^{LOX} (42.0 \pm 0.9)^c. Al igual que con los métodos antioxidantes, las inhibiciones enzimáticas también se evaluaron individualmente con las principales biomoléculas presentes en los AEs de *S. officinalis* de este estudio. Con algunas biomoléculas fue posible determinar el valor de IC₅₀: acetato de bornilo (379.6 \pm 14.4 μM), limoneno (852.3 \pm 24.2 μM), alcanfor (2743.4 \pm 85.1 μM) y linalol (3345.5 \pm 44.2 μM). Las inhibiciones de otras biomoléculas fueron descritas como GI (%) a una concentración concreta (3333.3 μM), por sus límites de solubilidad en el medio de ensayo o por sus moderadas capacidades para inhibir LOX: 1,8-cineol (30.9 \pm 1.1%), terpinen-4-ol (29.6 \pm 1.0%), α -tuyona (17.8 \pm 0.5%) y α -terpineol (17.4 \pm 0.2%). A pesar de que la α -tuyona no es el inhibidor más potente de LOX entre todos los

ensayados, su concentración es muy elevada en los AESo-2 y -4, pudiéndoles conferir, junto con la aportación del limoneno, las mayores capacidades de inhibición de LOX. AEs de *S. officinalis* cultivada en Portugal (Albano *et al.*, 2012), mostraron menor inhibición de LOX que la obtenida en este estudio.

Tabla 7.5. Bioactividad antioxidante de los AEs de *S. officinalis* mediante distintos métodos.

AESo ^a /Biomolécula ^b	ORAC	DPPH	ABTS	TBARS	PR	PQ
AESo-1	154.9a ± 4.7	0.1a ± 0.0	10.9a ± 0.6	4.2a ± 0.5	2.2b ± 0.1	1.6c ± 0.1
AESo-2	99.1b ± 3.6	0.1c ± 0.0	2.8b ± 0.1	2.0b ± 0.2	1.5c ± 0.1	1.9b ± 0.1
AESo-3	145.9a ± 5.7	0.1c ± 0.0	0.6c ± 0.0	1.7b ± 0.2	3.3a ± 0.1	1.4d ± 0.1
AESo-4	98.8b ± 3.4	0.1b ± 0.0	1.1c ± 0.1	1.8b ± 0.2	3.0a ± 0.1	2.1a ± 0.1
α-Pineno	N/D	N/D	N/D	2.6 ± 0.1	N/D	16.6 ± 1.1
Canfeno	N/D	N/D	0.1 ± 0.0	N/D	0.5 ± 0.0	1.6 ± 0.1
β-Pineno	26.6 ± 1.6	N/D	0.1 ± 0.0	4.5 ± 0.3	N/D	1.8 ± 0.1
Mirceno	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	2.5 ± 0.2
α-Terpineno	N/D	0.3 ± 0.0	4.0 ± 0.2	N/D	1.9 ± 0.1	62.2 ± 4.7
p-Cimeno	N/D	N/D	0.1 ± 0.0	N/D	N/D	20.1 ± 1.6
Limoneno	128.0 ± 10.8	N/D	0.6 ± 0.0	N/D	N/D	5.9 ± 0.4
1,8-Cineol	N/D	N/D	0.0 ± 0.0	N/D	N/D	1.1 ± 0.1
γ-Terpineno	171.4 ± 10.3	0.3 ± 0.0	2.5 ± 0.1	43.8 ± 3.9	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Hidrato de sabineno	N/D	N/D	0.5 ± 0.0	14.6 ± 0.6	N/D	6.7 ± 0.6
Linalol	341.9 ± 18.5	N/D	0.1 ± 0.0	N/D	N/D	96.9 ± 5.8
α-Tuyona	N/D	N/D	0.8 ± 0.0	N/D	N/D	19.0 ± 1.2
Alcanfor	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Borneol	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Terpinen-4-ol	356.0 ± 13.6	N/D	0.3 ± 0.0	8.3 ± 1.8	N/D	1.7 ± 0.1
α-Terpineol	310.0 ± 16.6	N/D	0.2 ± 0.0	2.6 ± 0.1	N/D	4.9 ± 0.3
Acetato de linalilo	0.2 ± 0.0	N/D	0.1 ± 0.0	4.3 ± 0.1	N/D	27.4 ± 2.1
Acetato de bornilo	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.0 ± 0.0
β-Cariofileno	394.7 ± 14.5	N/D	N/D	17.3 ± 0.8	N/D	7.1 ± 0.5
α-Humuleno	N/D	N/D	0.3 ± 0.0	13.1 ± 0.5	N/D	N/D

^aLos resultados de los AEs están expresados en las siguientes unidades: ORAC, ABTS y DPPH (mg ET/g AESo), TBARS (mg EBHT/g AESo), PR (mg EAA/kg AESo), PQ (mg EEDTA/g AESo).

^b Los resultados de las biomoléculas individuales están expresados en: ORAC, DPPH y ABTS (μmol ET/mmol comp), TBARS (μmol EBHT/mmol comp), PR (μmol EAA/mmol comp), PQ (μmol EEDTA/mmol comp). N/D = Actividad antioxidante inferior a 0.05 unidades de las biomoléculas individuales, ensayadas a concentración máxima de 100 mM.

7.4.2. Inhibición de AChE

Los AEs de *S. officinalis* mostraron capacidad de inhibición de AChE. En este ensayo se obtuvieron los siguientes resultados de IC₅₀ expresados en μg/ml: AESo-3^{AChE} (326.7 ± 24.8)^c ≤ AESo-1^{AChE} (338.1 ± 13.8)^{bc} ≤ AESo-4^{AChE} (450.0

± 25.6)^b < AESo-2^{AChE} (867.4 ± 82.3)^a. Además, se realizaron ensayos de inhibición con las principales biomoléculas individuales, obteniendo que los inhibidores más potentes son 3-careno ($IC_{50} = 220.6 \pm 3.4 \mu\text{M}$) y 1,8-cineol ($IC_{50} = 228.3 \pm 9.9 \mu\text{M}$). Otras biomoléculas también mostraron inhibición: α -pineno ($IC_{50} = 3274.5 \pm 58.2 \mu\text{M}$), canfeno (15% inhibición a $311.2 \pm 27.3 \mu\text{M}$) y terpinen-4-ol (15% inhibición a $3776.0 \pm 247.1 \mu\text{M}$). El resto de biomoléculas no presentaron inhibición, o no pudieron ser ensayadas por problemas de solubilidad. En el AE, efectos sinérgicos o antagonistas pueden producir distintos GI, que los que producirían la suma de las inhibiciones de las biomoléculas por separado (Dohi *et al.*, 2009). Según estos resultados, 1,8-cineol es la biomolécula más influyente en los resultados obtenidos con los AEs en su conjunto, ya que se encuentra en alta concentración y es muy efectiva inhibiendo esta enzima. Un AE de *S. officinalis* de Portugal (Albano *et al.*, 2012) mostró menor valor de IC_{50} , debido a que contenía una concentración mucho más elevada de 1,8-cineol. Sin embargo, un estudio llevado a cabo con AEs de Turquía (Orhan *et al.*, 2008) describieron valores similares a los de este estudio. Dohi *et al.* (2009) comunicaron menores valores de IC_{50} para 1,8-cineol y α -pineno que los descritos en nuestro estudio.

7.5. Conclusiones

Los cuatro AEs de *S. officinalis* contienen α -tuyona, alcanfor, β -tuyona y 1,8-cineol como biomoléculas mayoritarias. Además, todos contienen cantidades relativamente altas de otras biomoléculas como α -humuleno, α -pineno, canfeno y limoneno. A pesar de que todas las plantas fueron cultivadas en la Región de Murcia, existen algunas diferencias de composición entre ellas. El ACP y el AJC muestran tres conglomerados, uno formado por los AESo-2 y -4 con un 79.2% de similitud, otro formado por el AESo-3 y otro en el que se sitúa el AESo-1. Los AESo-3 y -1 muestran un 32.4% de similitud entre ellos y un 6.2% de similitud con los AESo-2 y -4. Las biomoléculas de los AEs están presentes en concentraciones iguales o superiores a las establecidas por la normativa ISO para AEs de esta especie.

Este estudio es el primero que determina la distribución enantiomérica de las principales biomoléculas quirales de estos AEs. Esta caracterización es útil

para establecer biomarcadores del origen de los AEs y comprobar su autenticidad. También pueden ser usados como fuente de enantiómeros puros.

En cuanto a los ensayos de bioactividad, estos AEs muestran moderada capacidad antioxidante, ya que las biomoléculas mayoritarias no presentan actividad. Sí que lo hacen otras biomoléculas como α -pineno, limoneno, terpineno y linalol. Todos los AEs de *S. officinalis* mostraron potenciales capacidades antiinflamatorias, insecticidas y anti-Alzheimer, ya que su alto contenido en α -tuyona, 1,8-cineol y otras biomoléculas minoritarias, permiten la inhibición de las enzimas LOX y AChE. El amplio estudio llevado a cabo muestra que los AEs de *S. officinalis* pueden ser utilizados en industrias biotecnológicas para múltiples propósitos.

7.6. Bibliografía

- Abu-Darwish, M.S., Cabral, C., Ferreira, I.V., Goncalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Al-bdour, T.H., and Salgueiro, L. (2013). Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *Biomed Research International*, 9.
- Albano, S.M., Lima, A.S., Miguel, M.G., Pedro, L.G., Barroso, J.G., and Figueiredo, A.C. (2012). Antioxidant, anti-5-lipoxygenase and antiacetylcholinesterase activities of essential oils and decoction waters of some aromatic plants. *Records of Natural Products* 6, 35-48.
- Arraiza, M.P., Arrabal, C., and Lopez, J.V. (2012). Seasonal variation of essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) grown in Castilla - La Mancha (Central Spain). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40, 106-108.
- Baj, T., Ludwiczuk, A., Sieniawska, E., Skalicka-Wozniak, K., Widelski, J., Zieba, K., and Glowniak, K. (2013). GC-MS analysis of essential oils from *Salvia officinalis* L.: comparison of extraction methods of the volatile components. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 70, 35-40.
- Ben Farhat, M., Jordan, M.J., Chaouech-Hamada, R., Landoulsi, A., and Sotomayor, J.A. (2009). Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of Tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10349-10356.
- Bernotiene, G., Nivinskiene, O., Butkiene, R., and Mockute, D. (2007). Essential oil composition variability in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemija* 18, 38-43.
- Bouaziz, M., Yangui, T., Sayadi, S., and Dhouib, A. (2009). Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* 47, 2755-2760.
- Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., and Tudela, J. (2016). Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) essential oil from Spain: determination of aromatic profile by gas chromatography-mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. *Natural Product Research* 30, 1123-1130.

- Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Karapandzova, M., Kulevanova, S., and Satovic, Z. (2015). Essential oils and chemical diversity of southeast European populations of *Salvia officinalis* L. *Chemistry & Biodiversity* 12, 1025-1039.
- Delamare, A.P.L., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., and Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry* 100, 603-608.
- Demirci, B., Tabanca, N., and Baser, K.H.C. (2002). Enantiomeric distribution of some monoterpenes in the essential oils of some *Salvia* species. *Flavour and Fragrance Journal* 17, 54-58.
- Dohi, S., Terasaki, M., and Makino, M. (2009). Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4313-4318.
- Hayouni, E.A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.-Y., Mohammed, H., and Hamdi, M. (2008a). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 125, 242-251.
- Hayouni, E.A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.Y., Mohammed, H., and Hamdi, M. (2008b). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 125, 242-251.
- ISO (1997). Oil of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). International Organization for Standardization *ISO 9909:1997 (E)*.
- Jug-Dujakovic, M., Ristic, M., Pljevljakusic, D., Dajic-Stevanovic, Z., Liber, Z., Hancevic, K., Radic, T., and Satovic, Z. (2012). High diversity of indigenous populations of dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) in essential-oil composition. *Chemistry & Biodiversity* 9, 2309-2323.
- Kelen, M., and Tepe, B. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology* 99, 4096-4104.
- Kurihara, H., Kagawa, Y., Konno, R., Kim, S.M., and Takahashi, K. (2014). Lipoxigenase inhibitors derived from marine macroalgae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24, 1383-1385.
- Lima, C.F., Carvalho, F., Fernandes, E., Bastos, M.L., Santos-Gomes, P.C., Fernandes-Ferreira, M., and Pereira-Wilson, C. (2004). Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 18, 457-465.
- Maksimovic, M., Vidic, D., Milos, M., Solic, M.E., Abadzic, S., and Sijak-Yakovlev, S. (2007). Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 473-478.
- Marino, M., Bersani, C., and Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology* 67, 187-195.
- Mirjalili, M.H., Salehi, P., Sonboli, A., and Vala, M.M. (2006). Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle. *Chemistry of Natural Compounds* 42, 19-23.
- Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y., and Sener, B. (2008). Activity of essential oils and

- individual components against acetyl and butyrylcholinesterase. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences* 63, 547-553.
- Pierozan, M.K., Pauletti, G.F., Rota, L., dos Santos, A.C.A., Lerin, L.A., Di Luccio, M., Mossi, A.J., Atti-Serafini, L., Cansian, R.L., and Oliveira, J.V. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia L.* species. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos* 29, 764-770.
- Pinto, E., Salgueiro, L.R., Cavaleiro, C., Palmeira, A., and Goncalves, M.J. (2007). *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products* 26, 135-141.
- Porte, A., Godoy, R.L.O., and Maia-Porte, L.H. (2013). Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 15, 438-441.
- Radulescu, V., Chiliment, S., and Oprea, E. (2004). Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A* 1027, 121-126.
- Raina, A.P., Negi, K., and Dutta, M. (2013). Variability in essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) grown under North Western Himalayan Region of India. *Journal of Medicinal Plants Research* 7, 683-688.
- Santana, O., Cabrera, R., Gimenez, C., Gonzalez-Coloma, A., Sanchez-Vioque, R., de los Mozos-Pascual, M., Rodriguez-Conde, M.F., Laserna-Ruiz, I., Usano-Aleman, J., and Herraiz, D. (2012). Chemical and biological profiles of the essential oils from aromatic plants of agro industrial interest in Castilla-La Mancha (Spain). *Grasas Y Aceites* 63, 214-222.
- Santos-Gomes, P.C., and Fernandes-Ferreira, M. (2001). Organ- and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2908-2916.
- Tateo, F., Bononi, M., De Dominicis, E., and Fumagalli, V. (1999). Update on enantiomeric composition of (1R)-(+)- and (1S)-(-)-camphor in essential oils by enantioselective gas chromatography. *Analytical Communications* 36, 149-151.
- Verma, R.S., Padalia, R.C., and Chauhan, A. (2015). Harvesting season and plant part dependent variations in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. grown in northern India. *Journal of Herbal Medicine* 5, 165-171.

8. Estudio sobre bioactividad antimicrobiana de AEs de salvias, romeros, mejoranas y tomillos

8.1. Bioactividad antimicrobiana de AEs de *T. mastichina*

Las actividades antimicrobianas de los cuatro AEs de *T. mastichina* de Murcia (España) fueron investigadas frente a tres bacterias (*P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus*) y una levadura (*C. albicans*), utilizando la metodología detallada en la Sección 3.7 de esta Tesis. Las concentraciones ensayadas se encuentran en el intervalo entre 20-0.16 µl/ml. *P. aeruginosa* no fue inhibida con la mayor concentración de AE de *T. mastichina* que se pudo probar, debido a los límites de solubilidad. Los resultados obtenidos con los restantes tres microorganismos se detallan en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1. Bioactividad antimicrobiana de AEs de *T. mastichina*.

AETm ^a	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMF
AETm-1	5.0	5.0	2.5	5.0	5.0	5.0
AETm-2	10.0	10.0	5.0	5.0	5.0	5.0
AETm-3	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
AETm-4	2.5	2.5	5.0	5.0	2.5	2.5

^aCMI, CMB y CMF están expresadas en µl/ml.

Los AETm-4 y -2 mostraron la mayor y menor inhibición de *E. coli*, respectivamente. La CMI obtenida con un AE de *T. mastichina* comercial frente a *E. coli* (Peñalver *et al.*, 2005), fue superior a las descritas en esta Tesis. Comparando las inhibiciones obtenidas con los AEs, con las de las biomoléculas individuales, linalol posiblemente sea la biomolécula que más influye en los resultados, ya que se encuentra en alta concentración en el AETm-4. En el caso de la inhibición de *S. aureus* y *C. albicans*, se encuentran menos diferencias entre los AEs de *T. mastichina* investigados. AETm-4 mostró mayor inhibición de *C. albicans* que el resto de AEs, debido a la mayor concentración de linalol en este AE.

8.2. Bioactividad antimicrobiana de AEs de *R. officinalis*

Las bioactividades antimicrobianas de los AEs de los dos bioquimiotipos de *R. officinalis* estudiados se detallan en la Tabla 8.2. En estos ensayos, la

mayor concentración de AE utilizada fue 20 $\mu\text{l/ml}$. Al igual que ocurre con el resto de AEs, esta concentración no fue suficiente para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*. Los otros tres microorganismos probados fueron inhibidos a distintas concentraciones de AE (Tabla 8.2). Las biomoléculas presentes en los AEs fueron probadas de forma individual, para calcular sus correspondientes CMI y CMB o CMF (Tabla 8.6). Cuando estas biomoléculas se encuentran en el AE, el efecto global puede ser diferente al esperado por la suma de las contribuciones individuales de las biomoléculas, ya que se pueden producir sinergias o antagonismos entre ellos.

Comparando nuestros resultados con los previamente descritos en la bibliografía para AEs de *R. officinalis* de otras regiones o países, se encuentran grandes diferencias, que pueden ser debidas a las diferentes cepas utilizadas en los ensayos y/o a las distintas composiciones de los AEs probados. Algunos estudios con AEs de *R. officinalis* de otros países muestran valores de CMI similares a los descritos en esta Tesis (Ojeda-Sana *et al.*, 2013; Okoh *et al.*, 2010; Pintore *et al.*, 2002; van Vuuren *et al.*, 2009; Yesil-Celiktas *et al.*, 2007), o menores que los descritos en nuestro estudio (Jordan *et al.*, 2013; Santoyo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012). Santoyo *et al.* (2005) estudió la inhibición de algunas biomoléculas presentes en los AEs de *R. officinalis* de forma individual. Comparando sus resultados con los obtenidos en nuestras investigaciones, alcanfor mostró mayor actividad y α -pineno menor que en nuestros resultados. En cambio, según Ojeda-Sana *et al.* (2013) α -pineno y alcanfor fueron más efectivos contra *S. aureus* que lo obtenido en nuestros ensayos, mientras que borneol y α -pineno fueron peores inhibidores del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente, que lo encontrado en nuestros experimentos.

Tabla 8.2. Bioactividad antimicrobiana de AEs de *R. officinalis*.

AERo ^a	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMF
AERCa-1	10.0	10.0	5.0	10.0	2.5	5.0
AERCa-2	5.0	10.0	5.0	10.0	10.0	10.0
AERCa-3	10.0	10.0	5.0	10.0	5.0	5.0
AERCa-4	5.0	10.0	5.0	10.0	5.0	5.0
AERCi-1	10.0	10.0	5.0	10.0	10.0	10.0
AERCi-2	5.0	10.0	5.0	10.0	5.0	5.0

^aCMI, CMB y CMF están expresadas en $\mu\text{l/ml}$.

8.3. Bioactividad antimicrobiana de AEs de *S. lavandulifolia*

Los AEs de *S. lavandulifolia* fueron preparados en placas de 96-pocillos a concentraciones entre 20-0.16 $\mu\text{l/ml}$. El crecimiento de *P. aeruginosa* no pudo ser inhibido con la mayor concentración de AE utilizada durante estos ensayos. Los resultados (Tabla 8.3) muestran que las bacterias Gram-positivas son más sensibles a los AEs que las bacterias Gram-negativas, en concordancia con estudios de otros autores sobre AEs de otras regiones de España (Usano-Aleman *et al.*, 2012). Acerca de las biomoléculas individuales, α -pineno y p-cimeno fueron más efectivos contra *E. coli* que contra *S. aureus*; por el contrario, limoneno, linalol, borneol, terpinen-4-ol y α -terpineol fueron más activos contra *S. aureus*. Las biomoléculas α -pineno, p-cimeno, limoneno y borneol mostraron inhibición de *C. albicans*, cuando se probaron de forma individual. Las inhibiciones microbianas producidas por estos AEs de *S. lavandulifolia* fueron similares entre ellas, ya que todos los AEs contienen concentraciones similares de las biomoléculas activas. En el caso de AESI-3, aunque la concentración de limoneno y linalol es menor, la concentración de borneol es superior, lo que puede justificar que la CMI y CMB sea igual que el resto de AEs.

Estos AEs muestran actividad bactericida ya que la relación CMB/CMI es menor de 4, como describen otros estudios realizados con AEs de otras especies (Adrar *et al.*, 2016; Traoré *et al.*, 2012).

Tabla 8.3. Bioactividad antimicrobiana de AEs de *S. lavandulifolia*.

AESI ^a	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMF
AESI-1	10.0	10.0	5.0	5.0	2.5	5.0
AESI-2	10.0	10.0	5.0	5.0	2.5	5.0
AESI-3	10.0	10.0	5.0	5.0	2.5	5.0
AESI-4	10.0	10.0	5.0	5.0	2.5	5.0

^aCMI, CMB y CMF están expresadas en $\mu\text{l/ml}$.

8.4. Bioactividad antimicrobiana de AEs de *S. officinalis*

Los AEs de *S. officinalis* fueron probados en concentraciones entre 20-0.16 $\mu\text{l/ml}$. *P. aeruginosa* presentó crecimiento incluso con la máxima concentración de AE probada. En estos ensayos, no se pudieron alcanzar concentraciones superiores, debido a los límites de solubilidad de los AEs en este medio. En este estudio y en otros previamente descritos con AEs de otras

especies, se muestra que las bacterias Gram-negativas son en general más resistentes a los AEs que las Gram-positivas (Bozin *et al.*, 2007). De los cuatro microorganismos probados, *C. albicans* fue el que mostró mayor sensibilidad a estos AEs. Según un estudio previo (Hammer *et al.*, 1999) en el que se muestra la actividad antimicrobiana de varios AEs, *P. aeruginosa* fue la bacteria más difícil de inhibir y *S. aureus* y *C. albicans* los microorganismos más sensibles.

Prácticamente todos los AEs de *S. officinalis* mostraron los mismos valores de inhibición microbiana (Tabla 8.4). En cuanto a las bacterias, los valores de CMI y CMB obtenidos en este estudio fueron más altos en el caso de *E. coli* y *P. aeruginosa* y más bajos para *S. aureus*, que los descritos por otros autores previamente para AEs de *S. officinalis* de Brasil y Túnez (Hayouni *et al.*, 2008; Pierozan *et al.*, 2009). Los valores de CMB con AEs de Brasil, obtenidos por Longaray Delamare *et al.* (2007) fueron superiores a los descritos para *E. coli* y *S. aureus* en nuestro estudio. En el caso de la levadura *C. albicans*, nuestros valores de CMI y CMF fueron menores que los descritos previamente para AEs de *S. officinalis* de Túnez. Resultados previos con AEs de *S. officinalis* de Portugal y Jordania (Abu-Darwish *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2007), mostraron valores similares de inhibición de esta levadura a los obtenidos en esta Tesis.

Tabla 8.4. Bioactividad antimicrobiana de AEs de *S. officinalis*.

AESo ^a	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMF
AESo-1	10.0	10.0	1.3	1.3	2.5	5.0
AESo-2	10.0	10.0	1.3	1.3	2.5	5.0
AESo-3	10.0	10.0	0.6	0.6	2.5	5.0
AESo-4	10.0	10.0	1.3	1.3	2.5	5.0

^aCMI, CMB y CMF están expresadas en µl/ml.

8.5. Bioactividad antimicrobiana de AEs de *Thymus zygis* y *Thymus hyemalis*

AEs de dos especies de *Thymus* fueron probados ante *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* (Tabla 8.5) Las composiciones de estos AEs fueron descritas previamente (Carrasco, 2015). Los AEs de *T. zygis* bioquimiotipo timol (Tzt-1, Tzt-2, Tzt-3 y Tzt-4), son más efectivos contra *S. aureus* que contra *E. coli* y *C. albicans*. *P. aeruginosa* no pudo ser inhibida con la concentración máxima de los AEs analizados. Estos resultados son similares a los descritos

previamente, para AEs de *Thymus saturejoides* (Kasrati *et al.*, 2014) y *Etlingera fimbriobracteata* (Ud-Daula *et al.*, 2016).

Timol y carvacrol son dos biomoléculas con alta capacidad inhibidora de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* (Tabla 8.6). Por esta razón, los valores de CMI para los AEs obtenidos a partir de plantas de la especie *T. zygis* son menores que los descritos en esta Tesis para otras especies de labiadas. Los AEs de *T. zygis* bioquimiotipo linalol (Tzl-1 y Tzl-2) son efectivos contra estos microorganismos, debido a la alta concentración de linalol, así como al aporte de otras biomoléculas minoritarias como α -pineno, limoneno y borneol (Tabla 8.6). Entre los dos AEs de *T. hyemalis*, Th-1 es más efectivo, debido a la mayor concentración de timol y p-cimeno. Th-2 mostró la menor inhibición de los seis AEs de *Thymus* probados, debido a la ausencia de timol y carvacrol y a la baja concentración de linalol. Todos estos AEs mostraron capacidad microbicida, porque la relación CMB/CMI es menor de 4 (Traoré *et al.*, 2012), similar a la descrita por otros autores para *Thymus numidicus* (Adrar *et al.*, 2016).

Tabla 8.5. Bioactividad antimicrobiana de AEs de *Thymus*.

AE ^a	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMF
Tzt-1	1.25	1.25	0.16	0.16	1.25	1.25
Tzt-2	1.25	1.25	0.31	0.31	1.25	2.50
Tzt-3	1.25	2.50	0.31	0.31	1.25	1.25
Tzt-4	1.25	1.25	0.31	0.31	1.25	1.25
Tzl-1	2.50	2.50	1.25	2.50	2.50	5.00
Tzl-2	2.50	2.50	1.25	2.50	2.50	5.00
Th-1	2.50	2.50	0.63	1.25	1.25	1.25
Th-2	5.00	5.00	5.00	5.00	2.50	5.00

^aCMI, CMB y CMF están expresadas en μ l/ml.

8.6. Bioactividad antimicrobiana de las biomoléculas presentes en los AEs analizados

Las bioactividades antimicrobianas de los principales terpenos que se encuentran en los AEs fueron analizadas, para intentar correlacionar la composición de los AEs con la inhibición de sus biomoléculas. Las biomoléculas fueron ensayadas a concentraciones entre 15.0-0.1 mM y los resultados se encuentran detallados en la Tabla 8.6.

Los compuestos fenólicos, timol y carvacrol, son los que presentan mayor inhibición microbiana. En términos generales, *S. aureus* fue el microorganismo más sensible a los terpenos que mostraron actividad microbicida: limoneno, linalol, borneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, timol, carvacrol, α -humuleno y ledeno. α -Pinenos y p-cimeno, en cambio, mostraron mayor inhibición frente a *E. coli* y *C. albicans* que ante *S. aureus*.

Tabla 8.6. Bioactividad antimicrobiana de las principales biomoléculas presentes en los AEs.

Compuesto ^a	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMF
α -Pinenos	3.8	7.5	15.0	>15.0	3.8	3.8
Canfeno	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0
Sabineno	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0
β -Pinenos	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0
Mirceno	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0
α -Terpineno	>15.00	>15.00	15.00	>15.00	>15.00	>15.00
p-Cimeno	7.5	15.0	>15.0	>15.0	3.8	3.8
Limoneno	15.0	15.0	1.9	1.9	7.5	7.5
1,8-Cineol	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0
γ -Terpineno	>15.00	>15.00	>15.00	>15.00	>15.00	>15.00
Hidrato de sabineno	>15.00	>15.00	15.00	15.00	>15.00	>15.00
Linalol	7.5	15.0	3.8	7.5	15.0	15.0
α -Tuyona	>15	>15	15	>15	>15	>15
Alcanfor	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0
Borneol	7.5	7.5	1.9	1.9	3.8	3.8
Terpinen-4-ol	15.0	15.0	7.5	15.0	>15.0	>15.0
α -Terpineol	15.0	15.0	3.8	7.5	>15.0	>15.0
Acetato de linalilo	>15.0	>15.0	15.0	>15.0	>15.0	>15.0
Acetato de bornilo	>15.0	>15.0	15.0	>15.0	>15.0	>15.0
Timol	3.75	3.75	0.94	0.94	3.75	7.50
Carvacrol	7.50	7.50	0.47	0.94	3.75	3.75
β -Cariofileno	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0	>15.0
α -Humuleno	>15.0	>15.0	7.5	15.0	>15.0	>15.0
Ledenos	>15.00	>15.00	7.50	7.50	>15.00	>15.00

^aCMI, CMB y CMF están expresadas en mM.

8.7. Conclusiones

Todos los AEs probados durante esta Tesis mostraron capacidad para inhibir el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, en concentraciones iguales o inferiores a 10 μ l/ml. Sin embargo, la CMI de estos AEs necesaria para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* fue superior a la concentración máxima

investigada en todos los casos (20 µl/ml). Entre los cuatro microorganismos probados, *S. aureus* fue, en términos generales, el microorganismo más sensible, seguido de *C. albicans*. Comparando las cuatro especies que han sido estudiadas ampliamente durante esta Tesis (*S. officinalis*, *S. lavandulifolia*, *R. officinalis* y *T. mastichina*) los AEs de *T. mastichina* fueron los más efectivos contra *E. coli* y *C. albicans* y los AEs de *S. officinalis* fueron los más efectivos contra *S. aureus*. Comparando la inhibición de estos AEs con la producida por AEs de las especies *Thymus zygis* y *T. hyemalis*, pertenecientes también a la familia de las labiadas, se observa que estos últimos AEs muestran mayor capacidad inhibidora, debido a que contienen en su composición compuestos fenólicos como el timol y carvacrol (Carrasco, 2015). Estos estudios apoyan la utilización de AEs en la formulación de alimentos, cosméticos o productos farmacéuticos, con el objetivo de evitar el crecimiento microbiano en ellos, sin tener que utilizar conservantes sintéticos.

8.8. Bibliografía

- Abu-Darwish, M.S., Cabral, C., Ferreira, I.V., Goncalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Al-bdour, T.H., and Salgueiro, L. (2013). Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *BioMed research international* 2013, 538940.
- Adrar, N., Oukil, N., and Bedjou, F. (2016). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products* 88, 112-119.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., and Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7879-7885.
- Carrasco, A. (2015). PhD Thesis: Characterisation and antioxidant and antienzymatic bioactivities of essential oils of lavender, thyme and oregano from Murcia. In *Biochemistry and Molecular Biology-A* (Murcia, Spain: University of Murcia), pp. 214.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., and Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86, 985-990.
- Hayouni, E.A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.-Y., Mohammed, H., and Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 125, 242-251.
- Jordan, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Loran, S., and Sotomayor, J.A. (2013). Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its

- polyphenolic extract. *Industrial Crops and Products* **48**, 144-152.
- Kasrati, A., Alaoui Jamali, C., Fadli, M., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., Leach, D., and Abbad, A. (2014). Antioxidative activity and synergistic effect of *Thymus saturejoides* Coss. essential oils with cefixime against selected food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products* **61**, 338-344.
- Longaray Delamare, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., and Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry* **100**, 603-608.
- Ojeda-Sana, A.M., van Baren, C.M., Elechosa, M.A., Juarez, M.A., and Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* **31**, 189-195.
- Okoh, O.O., Sadimenko, A.P., and Afolayan, A.J. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry* **120**, 308-312.
- Peñalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., and Perea, A. (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *Apmis* **113**, 1-6.
- Pierozan, M.K., Pauletti, G.F., Rota, L., Atti dos Santos, A.C., Lerin, L.A., Di Luccio, M., Mossi, A.J., Atti-Serafini, L., Cansian, R.L., and Oliveira, J.V. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos* **29**, 764-770.
- Pinto, E., Salgueiro, L.R., Cavaleiro, C., Palmeira, A., and Goncalves, M.J. (2007). *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products* **26**, 135-141.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., and Casanova, J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* **17**, 15-19.
- Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F.J., and Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection* **68**, 790-795.
- Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I., and Coulibaly, A. (2012). Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers.(Annonaceae). *Journal of Applied biosciences* **58**, 4234-4242.
- Ud-Daula, A.F.M.S., Demirci, F., Abu Salim, K., Demirci, B., Lim, L.B.L., Baser, K.H.C., and Ahmad, N. (2016). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from leaves, aerial stems, basal stems, and rhizomes of *Etlingera fimbriobracteata* (K.Schum.) R.M.Sm. *Industrial Crops and Products* **84**, 189-198.
- Usano-Aleman, J., Herraiz-Penalver, D., Cuadrado, J., Diaz, S., Santa-Cruz, M., and Pala-Paul, J. (2012). Seasonal variation of the essential oils of *Salvia lavandulifolia*: antibacterial activity. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **15**, 195-203.
- van Vuuren, S.F., Suliman, S., and Viljoen, A.M. (2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional

- antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology* *48*, 440-446.
- Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., and Efferth, T. (2012). Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules* *17*, 2704-2713.
- Yesil-Celiktas, O., Kocabas, E.E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T., and Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* *100*, 553-559.

9. Ensayos microbiológicos en frutas y verduras

9.1. Composición de los AEs utilizados

Durante estos ensayos se utilizaron cuatro AEs organolépticamente compatibles con los productos finales, tres pertenecientes a la familia de las labiadas (*Mentha piperita* L., *Salvia officinalis* L. y *Thymus zygis* L. bioquimiotipo timol), y una de la familia de las rutáceas (*Citrus medica* L.). La composición de estos AEs fue estudiada mediante cromatografía de gases con columna polar y detección por espectrometría de masas (Sección 3.3). Las cantidades de las biomoléculas identificadas (> 98% del área total) expresados en concentraciones relativas se encuentran descritas en la Tabla 9.1.

Las principales biomoléculas (aquellas con concentraciones superiores al 5%) del AE de *C. medica* son β -pineno, limoneno y geranial, las del AE de *M. piperita* son mentona, isomentona y mentol, las del AE de *S. officinalis* son 1,8-cineol, α -tuyona, β -tuyona y alcanfor, y las del AE de *T. zygis* son γ -terpineno, p-cimeno y timol. La gran variabilidad existente entre estos AEs puede dar lugar a una mayor actividad cuando se utilizan en conjunto, debido a que se pueden producir sinergias entre sus componentes (de Azeredo *et al.*, 2011).

9.2. Evolución del pH y de la atmósfera interna

Las medidas de pH de los extractos y de la atmósfera interna de los recipientes proporcionan información acerca de qué microorganismos son susceptibles de crecer en ese medio, y de la evolución de los mismos con el almacenamiento (Tabla 9.2). En términos generales, las frutas suelen producir un valor de pH más bajo que las verduras, pero también mayor contenido en azúcares. Por este hecho, las frutas promueven el crecimiento de levaduras, hongos y bacterias del ácido láctico, mientras que las verduras están a menudo asociadas al crecimiento de bacterias del género *Bacillus* spp. o de la familia *Pseudomonadaceae*.

Tabla 9.1. Cromatografía de gases rápida para determinar la composición de los cuatro AEs investigados.

IRL ^a	IRL ^b	Biomolécula	<i>Citrus medica</i>		<i>Mentha piperita</i>		<i>Salvia officinalis</i>		<i>Thymus zygis</i>		MI				
			(%)		(%)		(%)		(%)						
1012	1001	Triciclono					0.1	±	0.0		1,2				
1025	1015	α-Pineno	1.1	±	0.0	0.4	±	0.0	3.8	±	0.0	1,2,3			
1027	1018	α-Tuyeno	0.1	±	0.0			0.1	±	0.0	0.6	±	0.0	1,2,3	
1068	1056	Canfeno						3.4	±	0.0	0.6	±	0.0	1,2,3	
1110	1099	β-Pineno	5.1	±	0.1	0.1	±	0.0	4.6	±	0.0	0.2	±	0.0	1,2,3
1122	1111	Sabineno	0.9	±	0.0	tr		0.2	±	0.0	tr			1,2,3	
1131	1123	Verbeneno									tr			1,2	
1147	1140	3-Careno	tr								0.1	±	0.0	1,2	
1161	1151	β-Mirceno	1.1	±	0.0	tr		0.4	±	0.0	1.5	±	0.0	1,2,3	
1168	1156	α-Felandreno									0.1	±	0.0	1,2,3	
1177	1168	α-Terpineno	0.1	±	0.0			tr			1.6	±	0.0	1,2,3	
1198	1187	Limoneno	70.7	±	0.3	0.6	±	0.0	1.2	±	0.0	0.6	±	0.0	1,2,3
1209	1198	β-Felandreno	0.3	±	0.0									1,2	
1211	1199	1,8-Cineol				2.1	±	0.0	13.9	±	0.0	0.8	±	0.0	1,2,3
1235	1221	cis-Ocimeno	tr					0.1	±	0.0	tr			1,2,3	
1245	1233	γ-Terpineno	4.4	±	0.0	tr		0.1	±	0.0	6.7	±	0.0	1,2,3	
1250	1238	(E)-Ocimeno	0.1	±	0.0			tr			tr			1,2	
1255	1244	3-Octanona									tr			1,2	
1270	1259	p-Cimeno	0.6	±	0.0	0.1	±	0.0	0.6	±	0.0	21.7	±	0.0	1,2,3
1282	1269	Terpinoleno	0.2	±	0.0			0.1	±	0.0	0.2	±	0.0	1,2,3	
1392	1375	3-Octanol				tr					tr			1,2,3	
1423	1422	α-Tuyona						28.4	±	0.1				1,2,3	
1433	1427	α,p-Dimetilestireno									0.1	±	0.0	1,2	
1439	1440	β-Tuyona						13.2	±	0.0				1,2	

IRL ^a	IRL ^b	Biomolécula	<i>Citrus medica</i> (%)	<i>Mentha piperita</i> (%)	<i>Salvia officinalis</i> (%)	<i>Thymus zygis</i> (%)	MI
1450	1439	(Z)-Óxido de limoneno	0.1 ± 0.0				1,2,3
1460	1451	(Z)-Hidrato de sabineno			0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1,2,3
1462	1451	(E)-Óxido de limoneno	0.1 ± 0.0				1,2,3
1454	1461	(E)-Óxido de linalol				0.1 ± 0.0	1,2
1465	1465	Mentona		23.2 ± 0.2			1,2,3
1491	1490	α-Copaeno			tr		1,2
1484	1492	Isomentona		9.9 ± 0.0			1,2
1515	1519	Alcanfor		0.1 ± 0.0	12.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1,2,3
1543	1530	Linalol	1.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.0	4.0 ± 0.0	1,2,3
1554	1545	Acetato de linalilo	3.9 ± 0.1		0.3 ± 0.0		1,2,3
1555	1558	Acetato de mirtenilo		4.0 ± 0.0			1,2,3
1564	1566	Isopulegol		0.6 ± 0.0			1,2
1579	1576	Acetato de bornilo			1.6 ± 0.0	0.1 ± 0.1	1,2,3
1576	1580	(E)-α-Bergamoteno	0.2 ± 0.0				1,2
1578	1587	Neomentol		3.6 ± 0.0			1,2,3
1601	1594	Terpinen-4-ol	tr	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1,2,3
1598	1600	(E)-Cariofileno	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	4.8 ± 0.0	1.5 ± 0.1	1,2,3
1620	1608	Aromadendreno				0.2 ± 0.0	1,2,3
1622	1619	Neoisomentol		0.3 ± 0.0			1,2
1630	1636	Mentol		53.0 ± 0.2			1,2,3
1649	1647	Alo-aromadendreno				tr	1,2,3
1654	1650	Pulegona		0.4 ± 0.0			1,2,3
	1662	Geranial dietil acetal	0.2 ± 0.0				2
1661	1670	(E)-Pinocarveol				tr	1,2,3
1667	1674	α-Humuleno			3.2 ± 0.0	tr	1,2,3
1678	1680	Neral	2.8 ± 0.1			tr	1,2

IRL ^a	IRL ^b	Biomolécula	<i>Citrus medica</i> (%)	<i>Mentha piperita</i> (%)	<i>Salvia officinalis</i> (%)	<i>Thymus zygis</i> (%)	MI
1692	1683	Acetato de mirtenilo			0.1 ± 0.0		1,2,3
1694	1687	α-Terpineol	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1,2,3
1700	1695	Borneol			3.3 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1,2,3
1708	1712	Germacreno D			tr		1,2
1718	1716	Acetato de nerilo	0.3 ± 0.0				1,2,3
1720	1717	Verbenona				0.3 ± 0.0	1,2,3
1727	1722	β-Bisaboleno	0.4 ± 0.0				1,2
1725	1731	Geranial	5.3 ± 0.2			0.1 ± 0.0	1,2,3
1730	1734	Piperitona		0.1 ± 0.0			1,2
1751	1744	Acetato de geranilo	0.2 ± 0.0				1,2,3
1756	1753	δ-Cadineno			tr	0.1 ± 0.0	1,2
1763	1759	γ-Cadineno				tr	1,2
1790	1785	Mirtenol			0.1 ± 0.0		1,2,3
1794	1786	Nerol	tr				1,2,3
1839	1831	Geraniol	tr			0.1 ± 0.0	1,2,3
1848	1840	p-Cimen-8-ol			tr	0.1 ± 0.0	1,2
1986	1998	Óxido de cariofileno			0.6 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1,2,3
2090	2089	Viridiflorol			0.8 ± 0.0		1,2,3
2127	2129	Espatulanol				0.1 ± 0.0	1,2
2164	2177	Timol				48.5 ± 0.2	1,2,3
2211	2206	Carvacrol				3.3 ± 0.0	1,2,3
2628	2676	Manool			0.1 ± 0.0		1,2

IRL^a = Índice de retención lineal obtenido a partir de las bases de datos NIST-08 y Wiley-7. IRL^b = Índice de retención lineal calculado a partir de una serie de n-alcenos (C7-C30). MI = Método de identificación: 1 = mediante IRL, 2 = mediante NIST 08 y Wiley 7, 3 = mediante compuestos puros comerciales. tr = trazas (<0.1%).

Durante el almacenamiento, el porcentaje de O₂ disminuye y el de CO₂ aumenta, debido a la respiración de los frutos climatéricos, al crecimiento de levaduras y bacterias del ácido láctico, así como a la permeabilidad del plástico utilizado para sellar los recipientes (Figuras 9.1 y 9.2). Durante los 6-7 días de almacenamiento, el porcentaje de O₂ de los recipientes es prácticamente 0, por lo que se impide el crecimiento de microorganismos aeróbicos estrictos.

Tabla 9.2. Evolución del pH durante los días de almacenamiento.

Formulación	Días										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Verde	3.89	3.41	3.54	3.34	3.63		3.56	4.07			
Blanca	3.41	3.40	3.67	3.60	3.34		3.39	3.53			
Naranja	3.45	3.06	3.16	3.48	3.30		3.55	3.65			
Roja	4.07	3.75	3.68	3.64	3.65		3.76	3.85			
Violeta	3.38	3.33	3.27	3.28	3.27		3.35	3.41			
Verde (AE)	3.53	3.64	3.39	3.49		3.69	3.76	3.74	4.05		
Blanca (AE)	3.48	3.66	3.22		3.28	3.57	3.31	3.35	3.47		3.43
Naranja (AE)	3.52	3.06	3.16	3.48	3.30		3.55	3.65			
Roja (AE)	3.53	3.51	3.62	3.72		3.61	3.84	3.63	3.95		
Violeta (AE)	3.38	3.33	3.27	3.28	3.27		3.35	3.41			

(AE) = Formulaciones lavadas con agua y AEs siguiendo el método descrito en la Sección 3.8.2. La desviación estándar es menor del 4% en todos los casos.

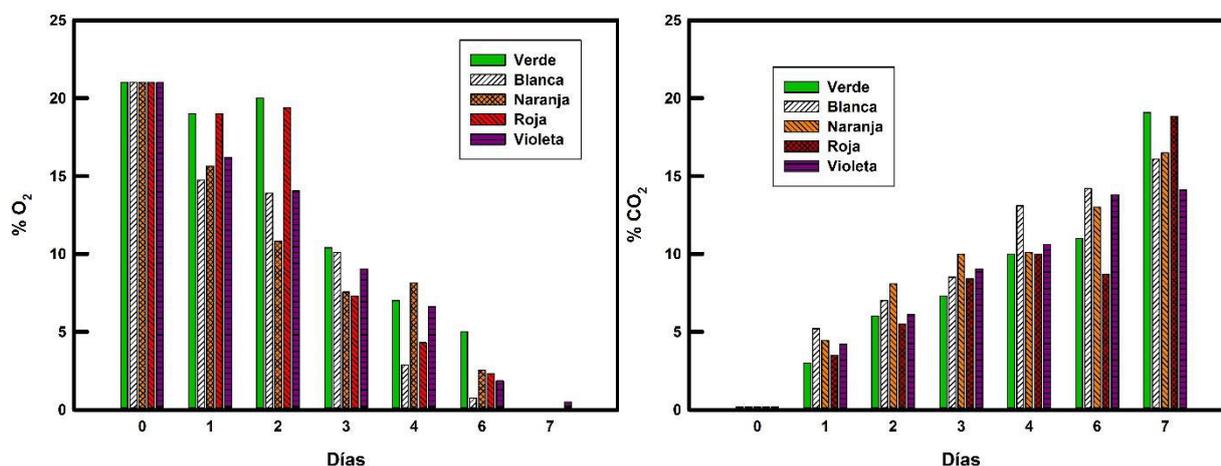


Figura 9.1. Evolución de la concentración de O₂ y CO₂ en las formulaciones lavadas con agua clorada.

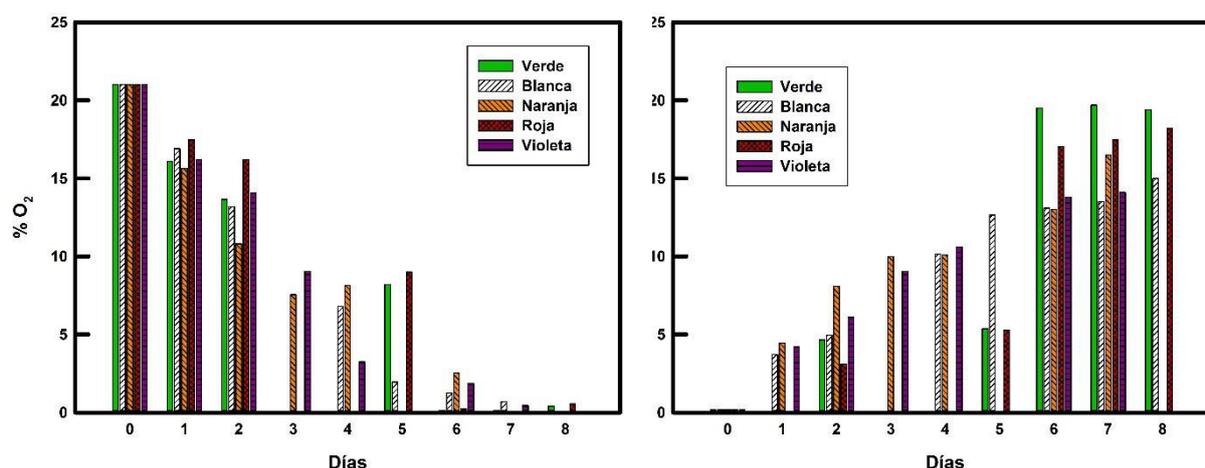


Figura 9.2. Evolución de la concentración de O₂ y CO₂ en las formulaciones lavadas con AEs.

9.3. Efecto de los AEs en la conservación de las distintas formulaciones

Mediante este estudio, se sustituyó el lavado con agua clorada, por lavado con AEs (Sección 3.8), para observar si es posible alcanzar o mejorar la vida media de alimentos mínimamente procesados, manteniendo las cualidades organolépticas y visuales.

Además, el tratamiento con ácido cítrico y ascórbico se utilizó para reducir el pardeamiento y la modificación del aspecto, ya que durante el proceso de pelado y cortado, las frutas y verduras liberan compuestos fenólicos, que son sustratos de enzimas como polifenoxidasas y peroxidasas, que producen el pardeamiento de los alimentos. Los AEs también pueden intervenir en esta función por su capacidad antioxidante.

Es difícil establecer el límite de carga microbiana máxima para considerar un alimento apto para el consumo humano. Este límite se ha establecido en 6 log UFC/g de producto para los mesófilos aerobios totales (Patrignani *et al.*, 2010), siempre que el número de coliformes totales no supere 3 log UFC/g de producto (Comisión-Europea, 2005).

9.3.1. Formulación verde

En la formulación lavada con agua clorada, el nivel de bacterias psicrótrofas inicial fue elevado, pero no se describió un gran aumento durante los siguientes 6 días (Figura 9.3). Las bacterias mesófilas totales se encontraron cerca del umbral máximo (6 log UFC/g) al final del estudio. La vida media de este

producto es de 6 días, debido a que el número máximo de coliformes para aceptar el producto para consumo humano (3 log UFC/g) se alcanza durante ese tiempo. Observando los resultados de la formulación lavada con AEs, la vida media fue ligeramente inferior ya que, durante el 5º día de estudio, el número de coliformes excede el límite máximo establecido. Entre todas las frutas y verduras que constituyen esta formulación, el kiwi fue el que presentó una mayor modificación de aspecto durante el almacenamiento.

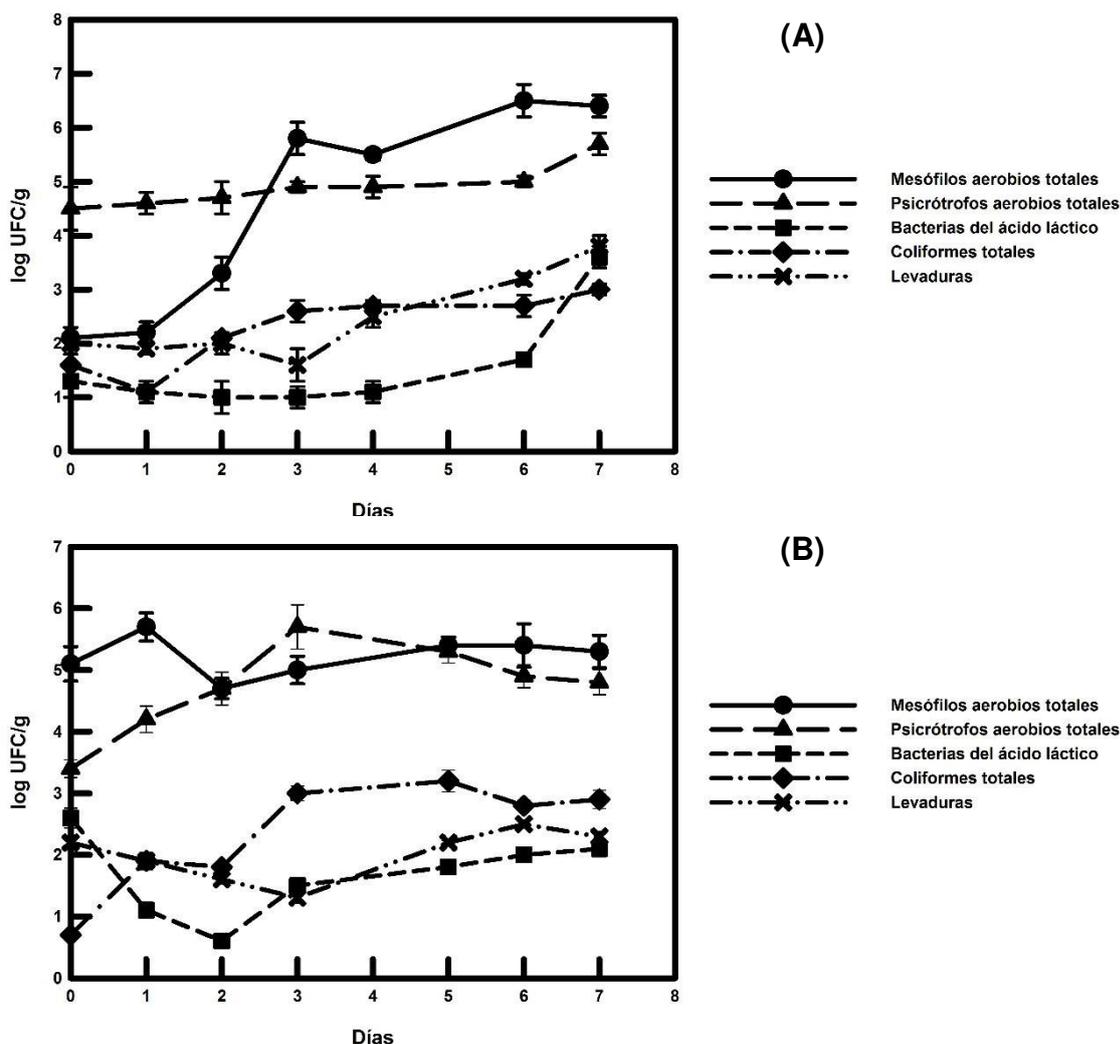


Figura 9.3. Análisis microbiológico de la formulación verde lavada con (A) agua clorada, (B) AEs.

9.3.2. Formulación blanca

Esta formulación obtuvo los mejores resultados en términos de durabilidad (Figura 9.4). La formulación tratada con agua clorada mostró un alto valor de coliformes al 8º día de estudio, por lo que la vida media de este producto sería de 8 días. En cambio, la formulación en la que se utilizaron AEs mostró menor valor de coliformes totales. Al alcanzar el 10º día, el valor de levaduras

encontrado en estos productos fue elevado, por lo que la vida media máxima se establece en 9 días tras el envasado. El alimento que mostró una mayor modificación visual fue el apio. En este caso, la utilización de AEs mostró un buen resultado para la conservación de estos alimentos.

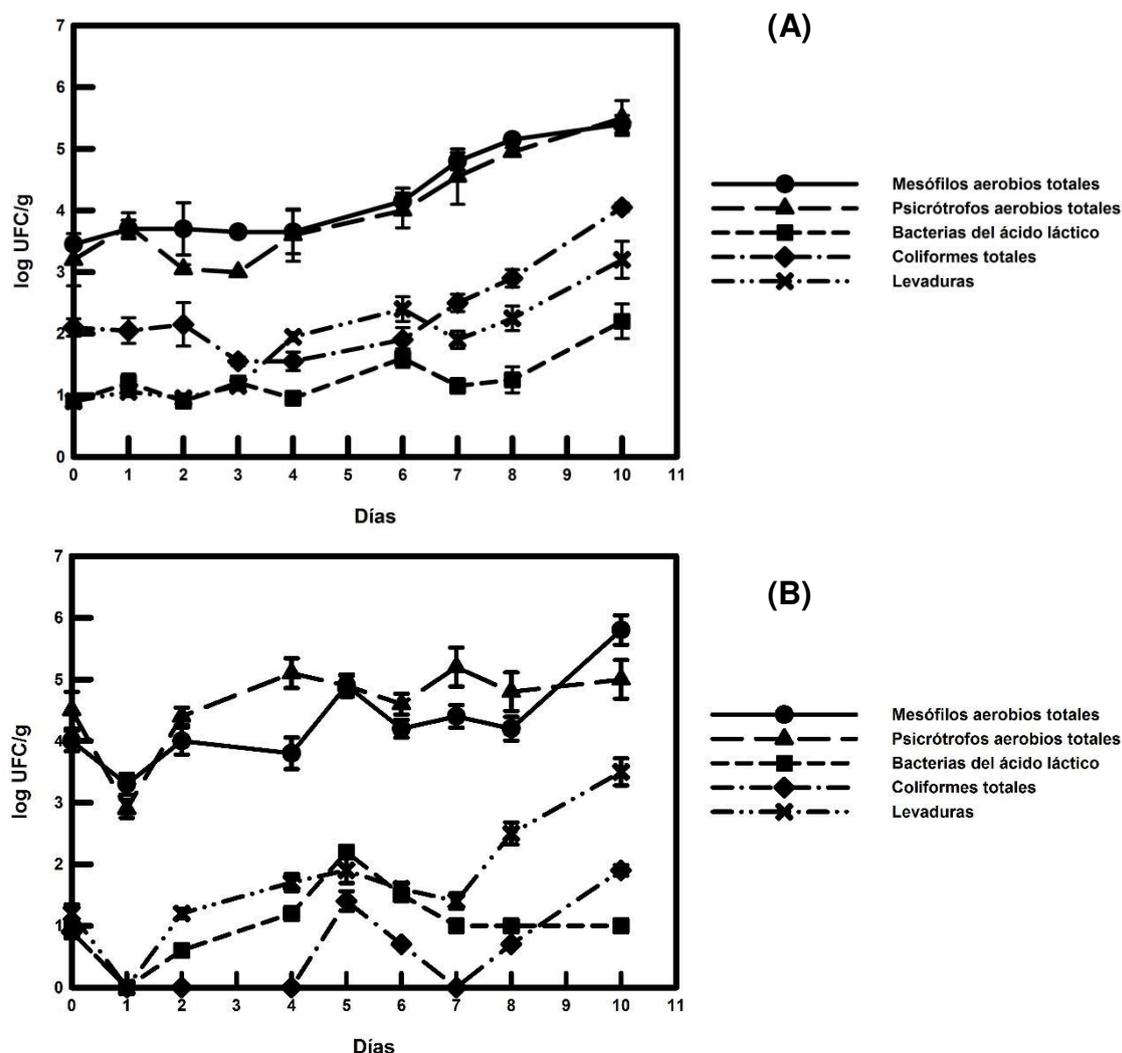


Figura 9.4. Análisis microbiológico de la formulación blanca lavada con (A) agua clorada, (B) AEs.

9.3.3. Formulación naranja

Esta formulación mostró una alta presencia de hongos durante los muestreos, debido a que esta formulación contiene gran cantidad de raíces que aportan mayor carga microbiana (Figura 9.5). Con el paso del tiempo, el número de hongos tiende a descender, probablemente debido al aumento de CO_2 y disminución del O_2 . La concentración de coliformes máxima establecida se alcanza en el 6º día de almacenamiento, por lo que la vida media establecida es de 5-6 días. Esta formulación, con el lavado con AEs, alcanza la concentración

máxima de coliformes durante el 5º día, por lo que la vida útil del producto es ligeramente menor utilizando el tratamiento con AEs.

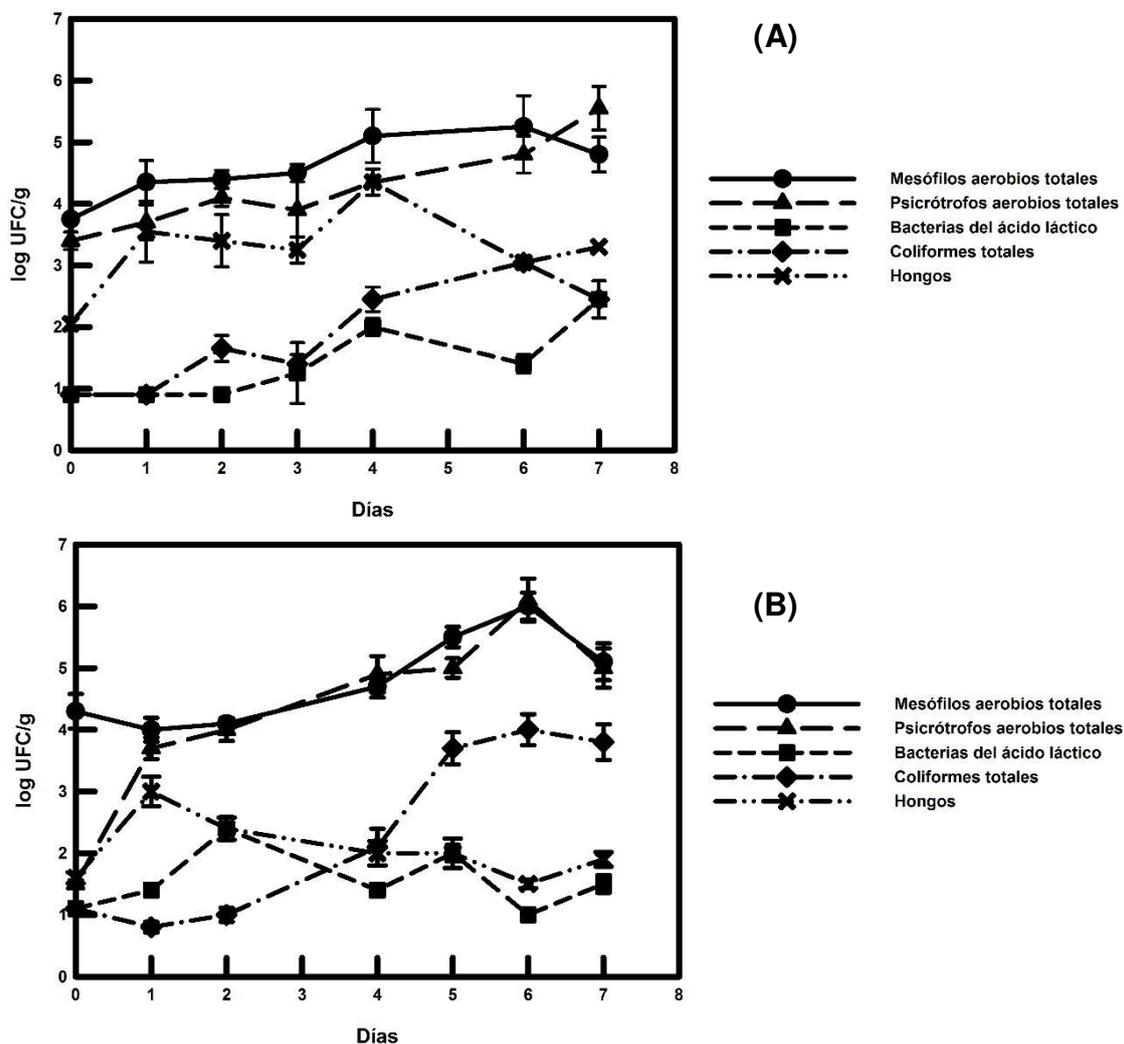


Figura 9.5. Análisis microbiológico de la formulación naranja lavada con (A) agua clorada, (B) AEs.

9.3.4 Formulación roja

Esta formulación presentó una baja carga microbiana inicial (Figura 9.6), aunque el crecimiento de coliformes en las muestras fue rápido, alcanzándose el límite máximo en el día 4 (la vida útil establecida es de 3-4 días). Los resultados fueron similares para las muestras con AEs, por lo que en este caso los AEs no prolongan la vida útil, pero sí muestran similares resultados a los descritos con el lavado con agua clorada, de modo que podrían sustituirlo evitando los efectos secundarios del cloro.

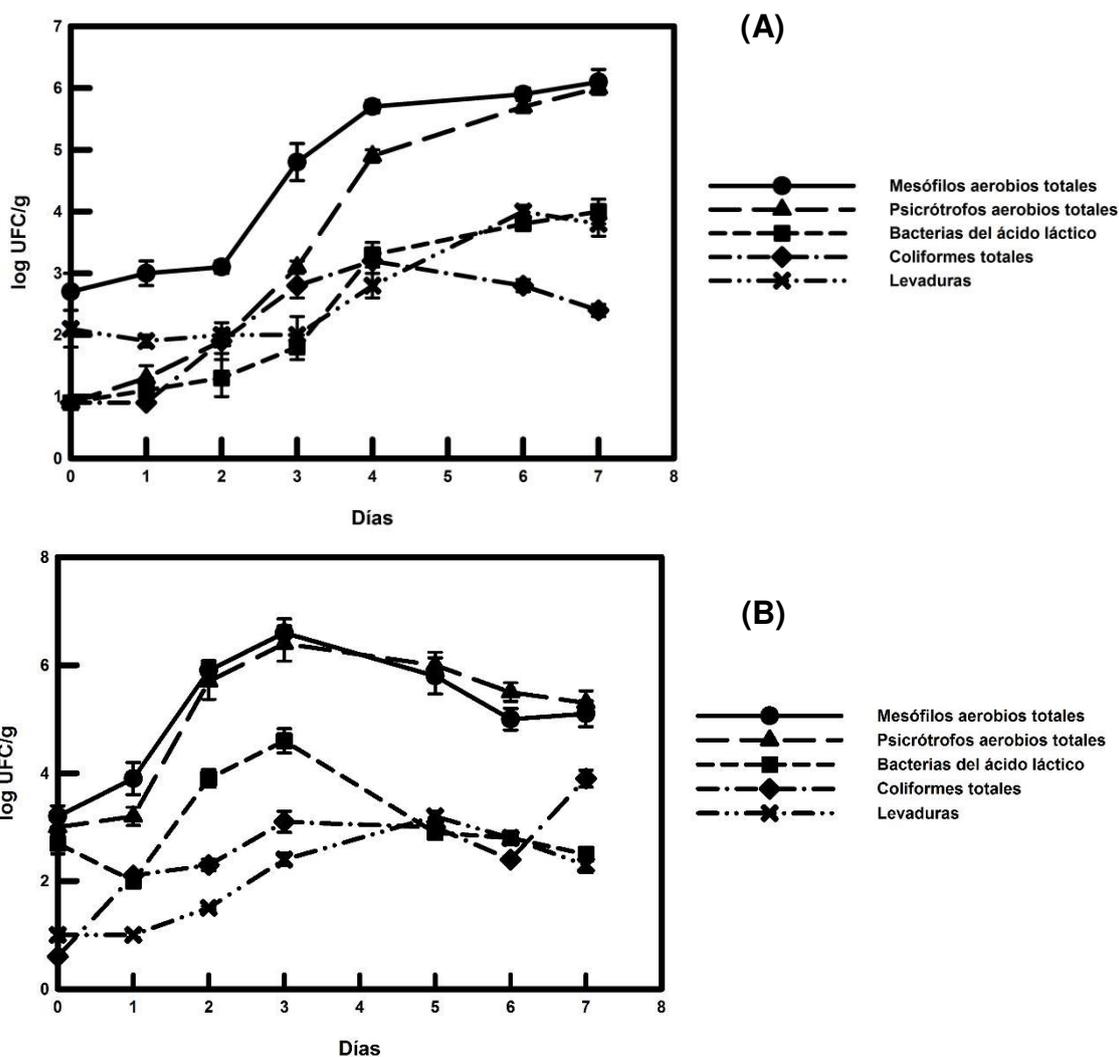


Figura 9.6. Análisis microbiológico de la formulación roja lavada con (A) agua clorada, (B) AEs.

9.3.5. Formulación violeta

Esta formulación, con ambos tratamientos, muestra una mayor carga de levaduras que el resto de formulaciones (Figura 9.7). Esto puede ser debido a la mayor concentración de carbohidratos, que proporciona la mayor cantidad de manzana utilizada en esta formulación (Jacxsens *et al.*, 2003). Durante el 4º día, la formulación lavada con agua clorada presenta altos niveles de levaduras y coliformes, por lo que la vida útil de este producto quedaría establecida en 4 días. La zanahoria fue el alimento que mayor modificación visual mostró durante el estudio. En cambio, en la formulación con AEs la vida media del producto aumenta a 6 días, ya que hasta ese momento no se alcanza la concentración máxima de coliformes permitida.

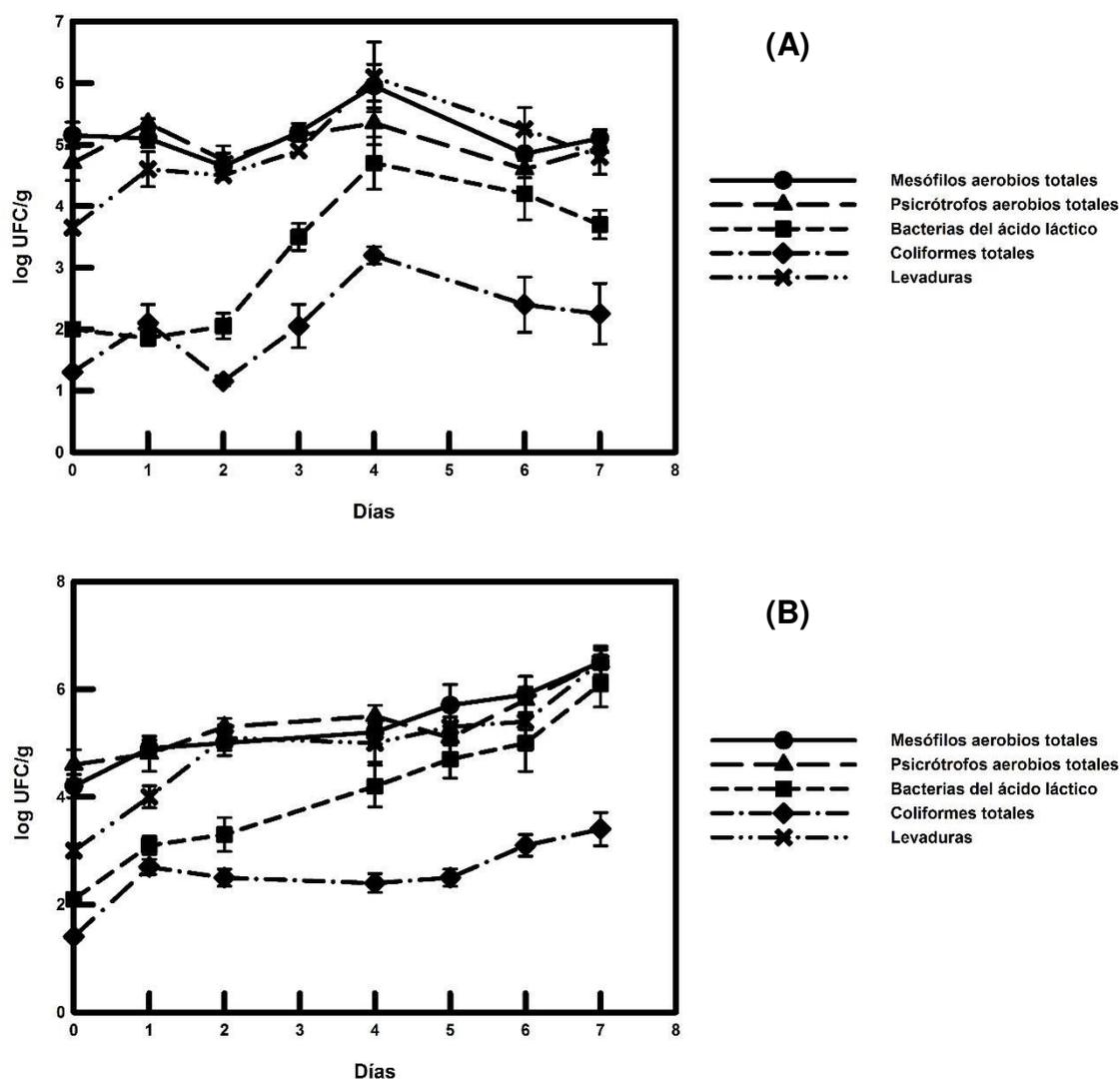


Figura 9.7. Análisis microbiológico de la formulación violeta lavada con (A) agua clorada, (B) AEs.

Los cuatro AEs utilizados en este estudio muestran actividad antimicrobiana *in vitro* (Aliberti *et al.*, 2016; da Silva Ramos *et al.*, 2017; Ilie *et al.*, 2016; López-De Ávila *et al.*, 2013; Rota *et al.*, 2008). Existen algunos estudios descritos previamente, donde se analiza la utilización de AEs o de sus biomoléculas volátiles en alimentos, por sus cualidades antioxidantes y antimicrobianas. Varios estudios han descrito la utilización de una mezcla de AEs en concentraciones subletales para los microorganismos, con el fin de producir inhibición antimicrobiana en alimentos gracias a efectos sinérgicos entre los AEs (de Azeredo *et al.*, 2011; Frankova *et al.*, 2016; Gutierrez *et al.*, 2008). La utilización de citral junto con el AE de citrón llevada a cabo en este estudio, se basa en estudios previos que muestran la efectividad de esta mezcla para aumentar la vida media de alimentos basados en frutas (Belletti *et al.*, 2007; Belletti *et al.*, 2008). El AE de menta fue utilizado para la conservación de zumos

(Guedes *et al.*, 2016) y tomates (Guerra *et al.*, 2015), entre otros. El AE de salvia fue empleado en la conservación de alimentos cárnicos (Hayouni *et al.*, 2008; Taylorova *et al.*, 2007). El AE de tomillo fue aplicado en estudios previos a varios alimentos como pez espada (Kykkidou *et al.*, 2009), carne (Possas *et al.*, 2017) o verduras como lechuga y zanahoria (Singh *et al.*, 2002).

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, este es el primer estudio en el que se aplican AEs a mezclas complejas de alimentos, con frutas y verduras en distintos porcentajes.

9.4. Conclusiones

Para la elaboración de productos mínimamente procesados que vayan a ser almacenados durante cierto tiempo, es muy importante tratar de mantener al mínimo la carga microbiana inicial, utilizando frutas y verduras en un grado bajo de madurez, empleando buenas prácticas de fabricación y realizando adecuados lavados manteniendo la temperatura del agua en torno a 6-8 °C.

Estos resultados demuestran que la utilización de AEs, en tres de las cinco formulaciones llevadas a cabo, puede ser empleada para sustituir el lavado con agua clorada, ya que la vida media del producto se mantiene igual o se ve ligeramente aumentada. En el caso de las formulaciones verde y naranja, es necesaria la optimización del proceso, mediante la utilización de otros AEs o de mayor concentración de los mismos, siempre y cuando las condiciones organolépticas de los productos finales no se vean alteradas.

9.5. Bibliografía

- Aliberti, L., Caputo, L., De Feo, V., De Martino, L., Nazzaro, F., and Souza, L.F. (2016). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, cytotoxic, and central nervous system activities of the essential oils of *Citrus medica* L. cv. 'liscia' and *C. medica* cv. 'rugosa' cultivated in Southern Italy. *Molecules* (Basel, Switzerland) 21.
- Belletti, N., Kamdem, S.S., Patrignani, F., Lanciotti, R., Covelli, A., and Gardini, F. (2007). Antimicrobial activity of aroma compounds against *Saccharomyces cerevisiae* and improvement of microbiological stability of soft drinks as assessed by logistic regression. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5580-5586.
- Belletti, N., Lanciotti, R., Patrignani, F., and Gardini, F. (2008). Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads. *Journal of Food Science* 73, M331-M338.

- Comisión-Europea (2005). REGLAMENTO (CE) No 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- da Silva Ramos, R., Rodrigues, A.B.L., Farias, A.L.F., Simoes, R.C., Pinheiro, M.T., Ferreira, R.M.D.A., Costa Barbosa, L.M., Picanco Souto, R.N., Fernandes, J.B., Santos, L.d.S., *et al.* (2017). Chemical composition and in vitro antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae). *TheScientificWorldJournal* 2017, 4927214.
- de Azeredo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Neto, N.J.G., de Oliveira, M.E.C., and de Souza, E.L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International* 44, 1541-1548.
- Frankova, A., Smid, J., Bernardos, A., Finkousova, A., Marsik, P., Novotny, D., Legarova, V., Pulkrabek, J., and Kloucek, P. (2016). The antifungal activity of essential oils in combination with warm air flow against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Food Control* 68, 62-68.
- Guedes, J.P.D., Medeiros, J.A.D., Silva, R., de Sousa, J.M.B., da Conceicao, M.L., and de Souza, E.L. (2016). The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *International Journal of Food Microbiology* 238, 183-192.
- Guerra, I.C.D., de Oliveira, P.D.L., Pontes, A.L.D., Lucio, A., Tavares, J.F., Barbosa, J.M., Madruga, M.S., and de Souza, E.L. (2015). Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha x villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology* 214, 168-178.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., and Bourke, R. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* 124, 91-97.
- Hayouni, E.A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.Y., Mohammed, H., and Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 125, 242-251.
- Ilie, C., Golet, I., Craciunescu, M., Hoge, E., Popescu, R., and Horhat, F.G. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Western Romanian *Salvia officinalis*. *Revista De Chimie* 67, 131-133.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Ragaert, P., Vanneste, E., and Debevere, J. (2003). Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology* 83, 263-280.
- Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A., Kontominas, M.G., and Savvaidis, I.N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 degrees C. *Food Chemistry* 115, 169-175.
- López-De Ávila, L.M., Castaño-Peláez, H.I., and Mejía-Gómez, C.E. (2013). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre

- microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. *Actualidades Biológicas* 35, 77-83.
- Patrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S.L.S., Lanciotti, R., and Guerzoni, M.E. (2010). Potentialities of high-pressure homogenization to inactivate *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices. *Journal of Food Science* 75, M116-M120.
- Possas, A., Posada-Izquierdo, G.D., Perez-Rodriguez, F., Valero, A., Garcia-Gimeno, R.M., and Duarte, M.C.T. (2017). Application of predictive models to assess the influence of thyme essential oil on *Salmonella enteritidis* behaviour during shelf life of ready-to-eat turkey products. *International Journal of Food Microbiology* 240, 40-46.
- Rota, M.C., Herrera, A., Martinez, R.M., Sotomayor, J.A., and Jordan, M.J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19, 681-687.
- Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K., and Strohshine, R.L. (2002). Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157 : H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* 35, 720-729.
- Taylorova, B., Poracova, J., Salamon, I., and Blascakova, M. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil from *Salvia officinalis* L. against selected pathogenic microorganisms in piglets. *Planta Medica* 73, 920-920.

Conclusiones

10. CONCLUSIONES

10.1. Conclusiones

Las conclusiones específicas deducidas a partir de los ensayos realizados, con cada uno de los AEs obtenidos de las diferentes especies de plantas analizadas, han sido descritas en sus respectivos capítulos. En este capítulo final se detallarán las conclusiones generales establecidas en esta Tesis Doctoral, sobre AEs de plantas labiadas cultivadas en la Región de Murcia.

❖ Mediante la realización de cromatografías de gases rápidas se han descrito las composiciones de todos los AEs estudiados durante esta Tesis. El método de separación se optimizó para conseguir la mejor separación posible de todos los picos presentes en estos AEs, en el menor tiempo de análisis. Este nuevo procedimiento ha superado ampliamente en eficacia, a los métodos previamente utilizados por otros autores, para la caracterización bioquímica de otros AEs.

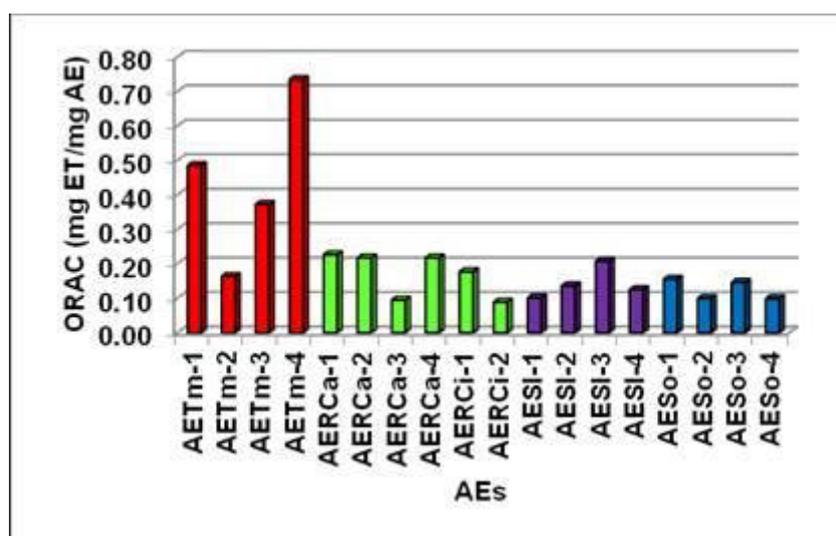
❖ Las concentraciones relativas de las biomoléculas de cada AE, fueron determinadas mediante la integración manual de todos los picos observados en sus respectivos cromatogramas. Los compuestos principales son: α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, linalol y α -terpineol en AEs de *T. mastichina*; α -pineno, canfeno, 1,8-cineol y alcanfor en AEs de *R. officinalis*; α -pineno, canfeno, 1,8-cineol y alcanfor en AEs de *S. lavandulifolia*; 1,8-cineol, α -tuyona, β -tuyona y alcanfor en los AEs de *S. officinalis*. Todos estos AEs tienen en común una alta proporción de 1,8-cineol, siendo los AEs de *T. mastichina* los más ricos en este éter monoterpenoide.

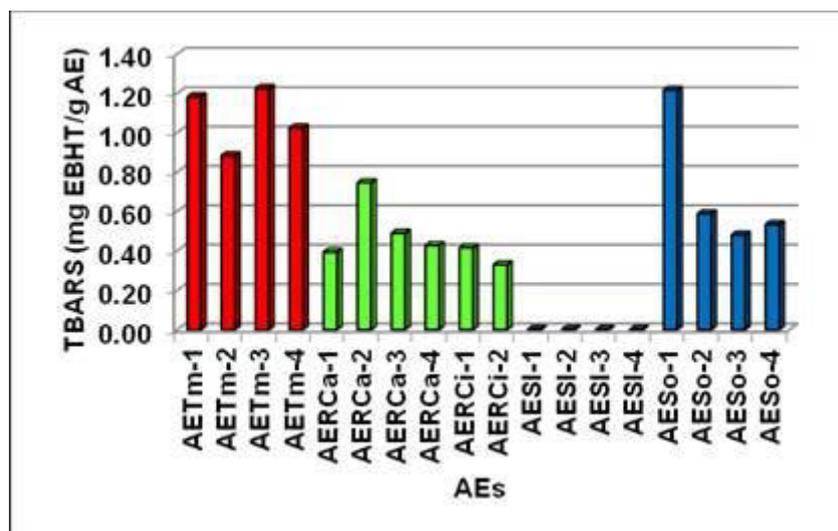
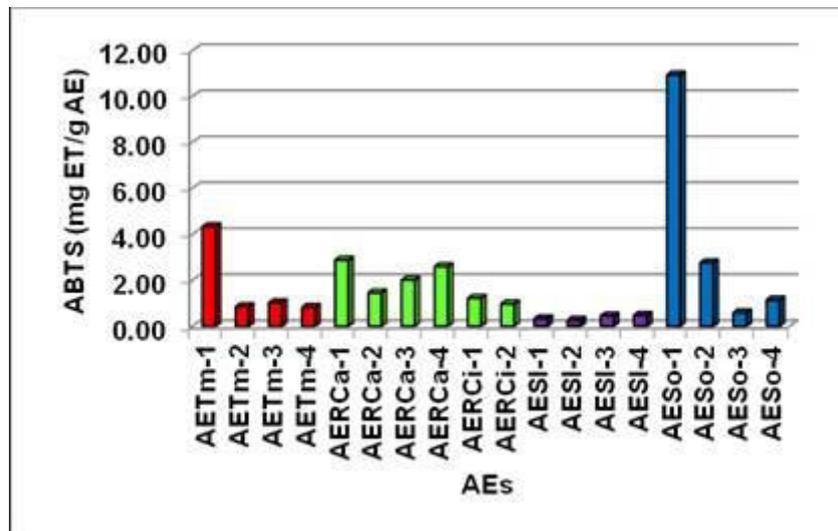
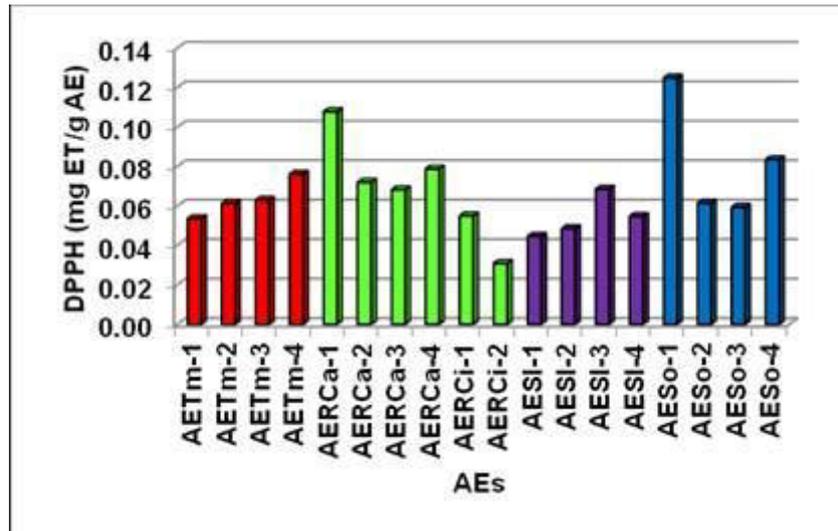
❖ Las concentraciones relativas de la mayoría de las biomoléculas presentes en los AEs analizados, se encuentran dentro de los estándares establecidos por las normativas ISO, por lo que podrían ser comercializados internacionalmente.

❖ La caracterización enantiomérica de las principales biomoléculas quirales se llevó a cabo con todos los AEs, determinándose que ciertos enantiómeros predominan en casi todos los AEs analizados: (-)-canfeno, (+)-hidrato de sabineno, (+)-terpinen-4-ol, (-)-linalol, (+)-acetato de α -terpinilo y (-)- β -

cariofileno. El (-)-alcanfor es el enantiómero predominante en los AEs de *T. mastichina*, mientras que en los de *Salvia* predomina el (+)-alcanfor. El (-)-acetato de bornilo es el predominante en los AEs de *T. mastichina*, *R. officinalis* y *S. lavandulifolia*, mientras que el (+)-acetato de bornilo predomina en *S. officinalis*. Estas caracterizaciones son útiles para determinar la autenticidad de los AEs y su origen.

❖ Los AEs investigados revelan similar bioactividad antioxidante según los métodos utilizados (Figura 10.1). En el método ORAC se observa la mayor diferencia, ya que los AEs de *T. mastichina* expresan mayor capacidad que el resto. La capacidad antioxidante apreciada en el resto de métodos es moderada en todos los casos, siendo menor que la mostrada por los antioxidantes de referencia. En el método DPPH no se observan grandes variaciones entre los AEs probados. En el método ABTS, los AEs de romero son, en general, los que presentan mayores capacidades antioxidantes, aunque, en particular, los AESo-1 y AETm-1 tienen mayores capacidades antioxidantes que el resto de AEs analizados. En el método TBARS, los resultados obtenidos con los AEs de mejoranas son ligeramente superiores al resto. Los AEs de *Salvia* fueron los únicos que mostraron potencia reductora. En cuanto a la potencia quelatante, en términos generales, los AEs de *R. officinalis* y *S. lavandulifolia* mostraron resultados ligeramente superiores que el resto.





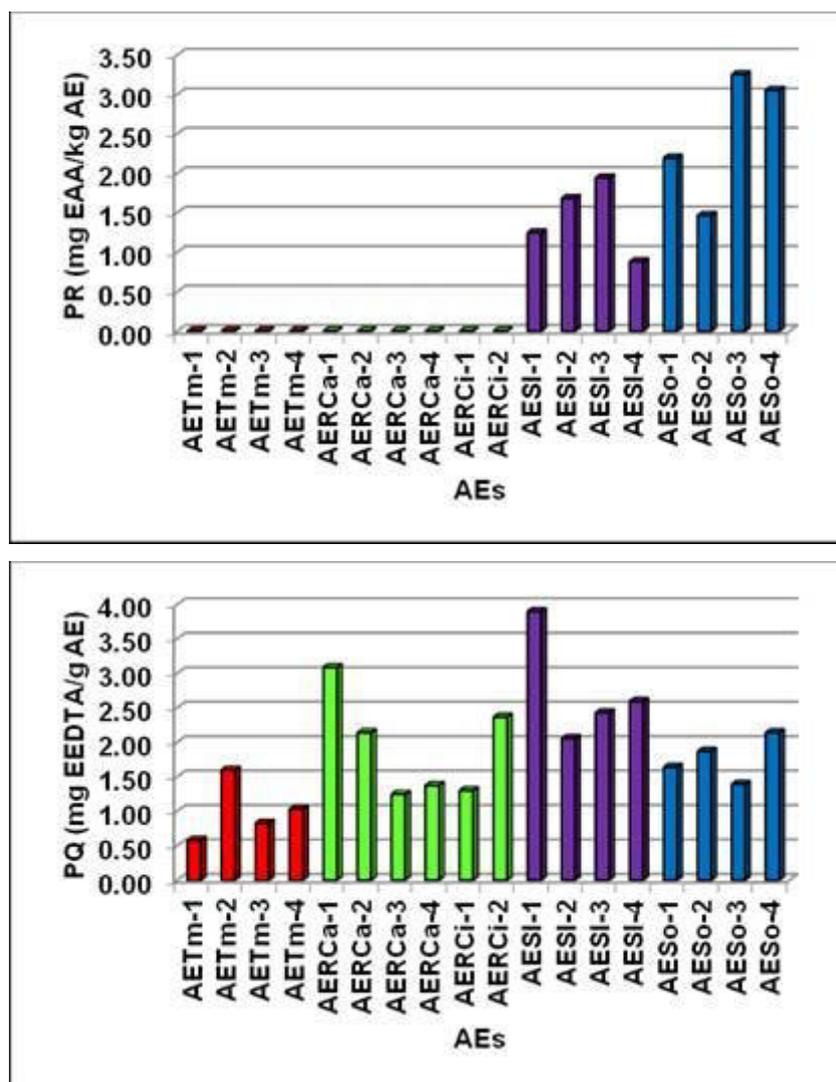


Figura 10.1. Comparación de los resultados de las capacidades antioxidantes de todos los AEs probados.

- ❖ Se determinaron los GI de LOX con 150 µg/ml de cada uno de los AEs (Figura 10.2). Todos los AEs mostraron similares GI principalmente debidos a su contenido en biomoléculas como acetato de bornilo, limoneno y linalol.

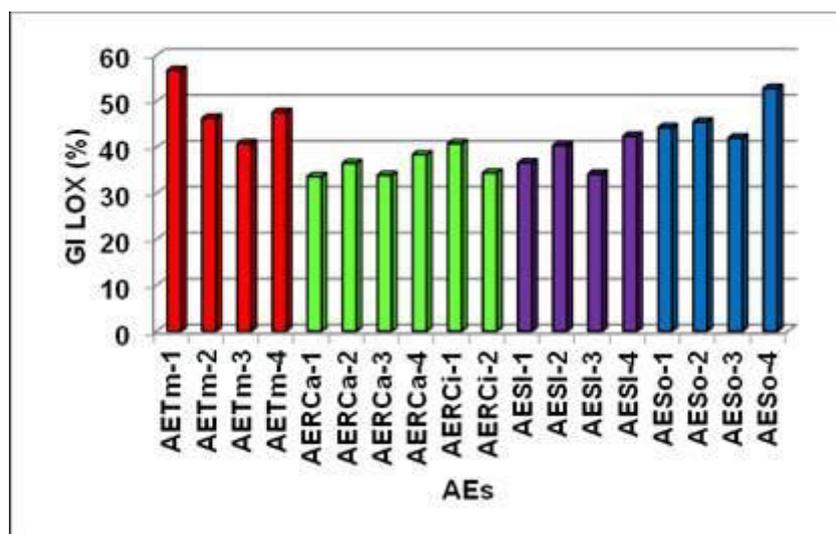


Figura 10.2. Comparación de la inhibición de LOX con todos los AEs probados.

❖ La actividad AChE pudo ser inhibida con todos los AEs, obteniendo los resultados en términos de IC_{50} (Figura 10.3). La mayor inhibición de esta enzima (menor valor de IC_{50}) fue llevada a cabo por los AEs de *T. mastichina* y los AEs de *R. officinalis* bioquimiotipo 1,8-cineol, debido a que éstos contienen mayor concentración de 1,8-cineol que el resto.

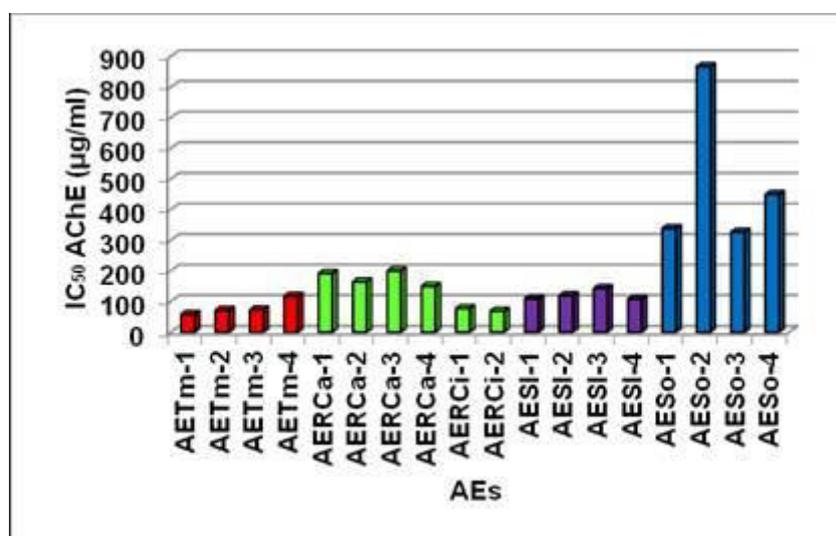


Figura 10.3. Comparación de la inhibición de AChE con todos los AEs estudiados.

❖ La máxima concentración de los AEs probada no fue suficiente para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*. Los tres restantes microorganismos sí fueron inhibidos con concentraciones iguales o inferiores a 10 µg/ml, siendo *S. aureus* y *C. albicans* los microorganismos más sensibles y los AEs de *T. zygis* los más inhibidores (Figura 10.4). Entre las principales biomoléculas de estos AEs que

causaron inhibición microbiana destacan α -pineno, p-cimeno, limoneno, linalol, borneol, timol y carvacrol.

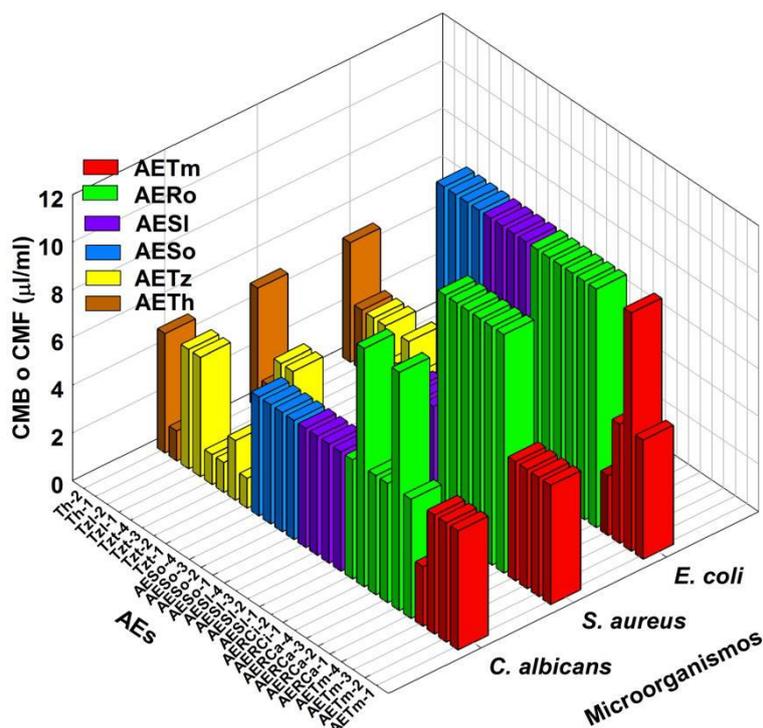


Figura 10.4. Inhibición microbiana de todos los AEs estudiados.

- ❖ En tres de las cinco formulaciones elaboradas para la determinación de la capacidad antimicrobiana de los AEs en alimentos, se consiguieron resultados positivos para la utilización de un conjunto de AEs como sustituyentes del agua clorada, en la conservación de alimentos mínimamente procesados constituidos por mezclas de frutas y verduras.
- ❖ Los AEs de las plantas labiadas cultivadas en la Región de Murcia, investigados en esta Tesis Doctoral, tienen relevantes propiedades bioquímicas, además de bioactividades antioxidantes, antienzimáticas y antimicrobianas, que favorecen su competitividad internacional, a través de sus potenciales aplicaciones biotecnológicas como ingredientes naturales, en industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas.

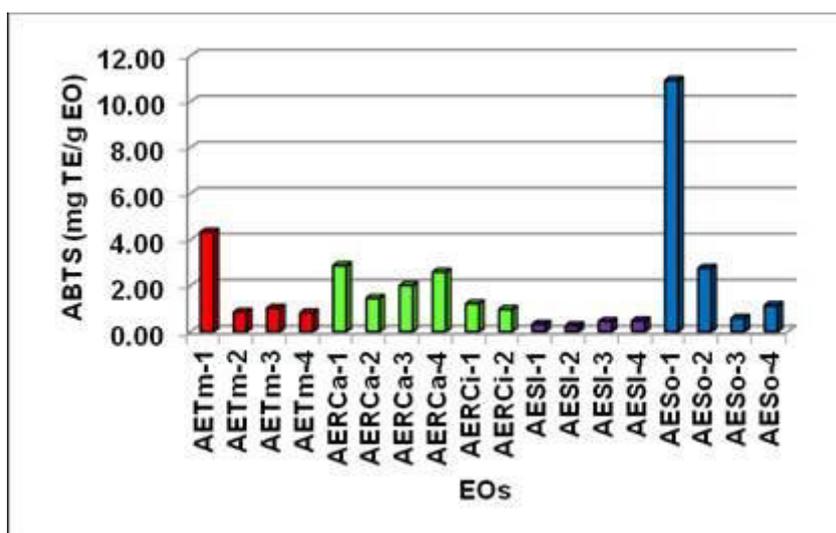
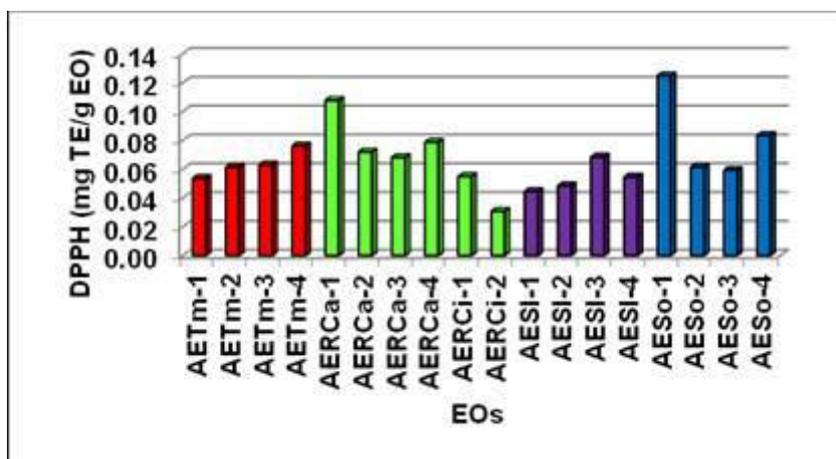
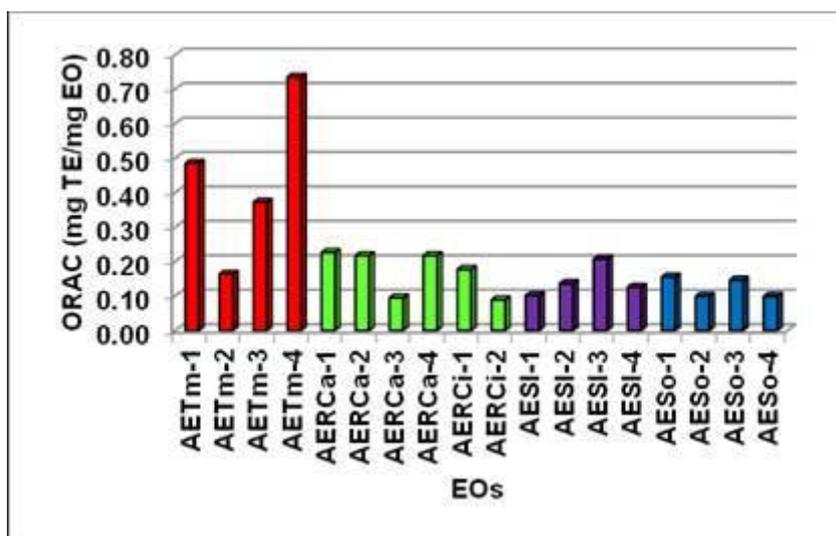
En consecuencia, se han alcanzado satisfactoriamente los objetivos propuestos al comienzo de esta Tesis Doctoral.

10.2. Conclusions

Specific conclusions of each chapter were detailed previously, at the end of Chapter 4, 5, 6, 7, 8 and 9. General conclusions about all analyzed EOs grown in Murcia (province of Spain) can be stated.

- ❖ Using fast gas chromatography, the detailed compositions of EOs from four species of Lamiaceae family were described. The separation method of all compounds was optimized to get the best resolution in the shortest chromatogram time. This procedure is more efficient than the previously methods reported by other authors for characterizations of different EOs.
- ❖ Relative concentrations of EO compounds were calculated by means of manual integrations of all chromatogram peaks. Main compounds were: α -pinene, β -pinene, 1,8-cineole, linalool and α -terpineol in the EOs from *T. mastichina*; α -pinene, camphene, 1,8-cineole and camphor in the EOs from *R. officinalis*; α -pinene, camphene, 1,8-cineole and camphor in the EOs from *S. lavandulifolia*; 1,8-cineole, α -thujone, β -thujone and camphor in the EOs from *S. officinalis*. All EOs showed high concentration of 1,8-cineole, especially the EOs from *T. mastichina*.
- ❖ Most relative concentrations of all EOs match the requirements of the International Organization for Standardization (ISO), which indicate that these EOs could be sold internationally.
- ❖ The enantiomeric characterizations of principal chiral compounds were carried out with the EOs, where some enantiomers are the predominant in all EOs analyzed: (-)-camphene, (+)-sabinene hydrate, (+)-terpinen-4-ol, (-)-linalool, (+)-terpinyl acetate and (-)- β -caryophyllene. (-)-Camphor is the most abundant enantiomer in the EOs from *T. mastichina*, whereas EOs from *Salvia* has mainly (+)-camphor. (-)-Bornyl acetate is the major enantiomer in EOs from *T. mastichina*, *R. officinalis* and *S. lavandulifolia*, however, EO from *S. officinalis* has higher concentration of (+)-bornyl acetate. These properties are useful to determine the authenticity and origin of EOs.
- ❖ The EOs reveal similar antioxidant capacities with all methods used (Figura 10.5). The ORAC method showed the highest difference, being the EOs from *T. mastichina* the most active. The antioxidant activity is moderate in all methods, lower than the reference compounds. The activity against DPPH radical

is similar in all the EOs analyzed.



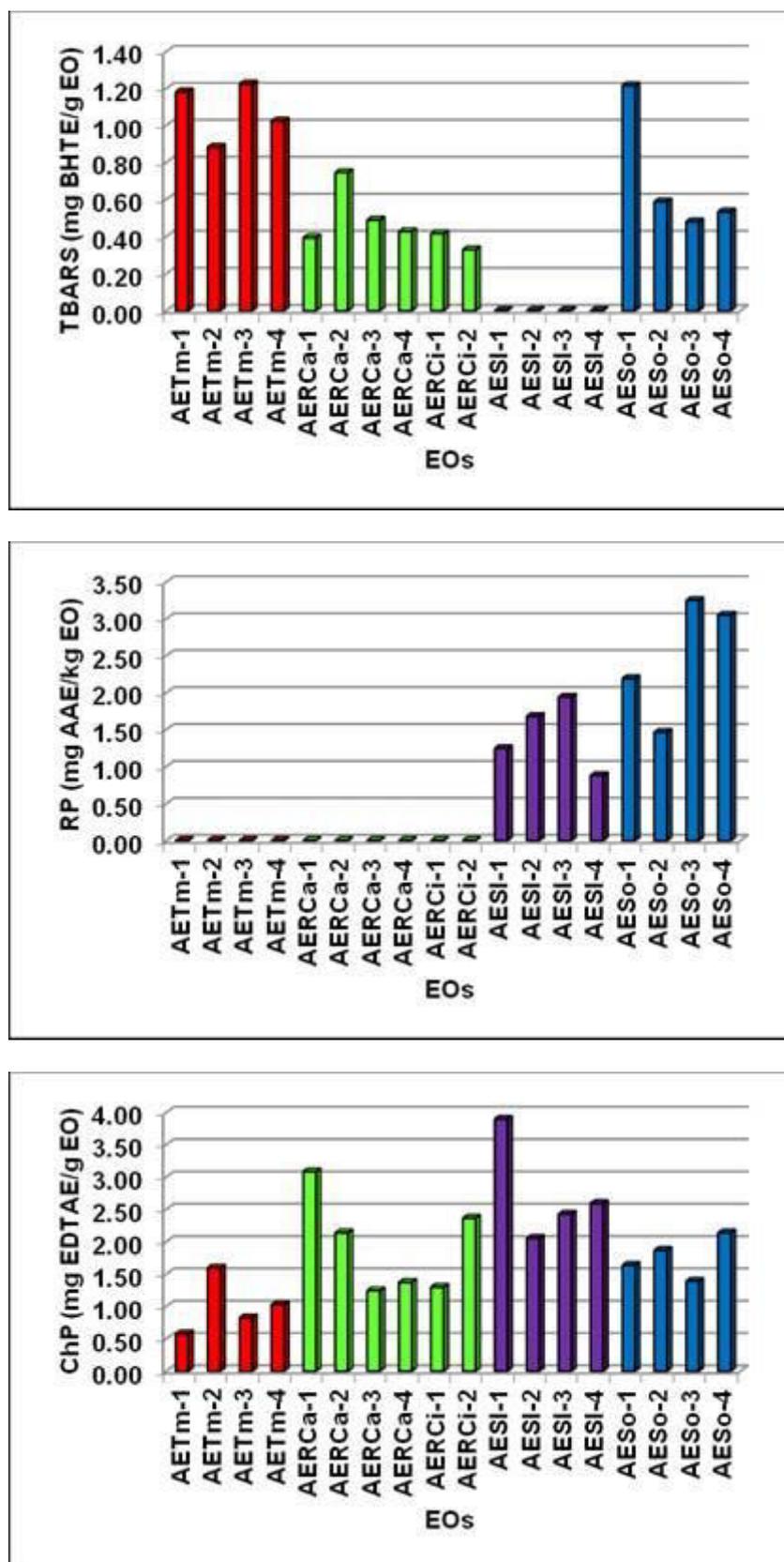


Figure 10.5. Comparison of antioxidant capacities of all EOs.

EOs from rosemary are generally, the most active in the ABTS method, although AESo-1 and AETm-1 have higher antioxidant capacities than the other EOs.

Using the TBARS method, *T. mastichina* EOs have slightly higher antioxidant effect. Only the EOs from *Salvia* showed reducing capacity. In relation to the chelating power, EOs from *R. officinalis* and *S. lavandulifolia* showed slightly higher chelating activity than the others.

❖ The inhibition of LOX using 150 µg/ml of each EO was calculated (Figure 10.6). All EOs were able to decrease the activity of this enzyme, mainly due to their contents of bornyl acetate, limonene and linalool.

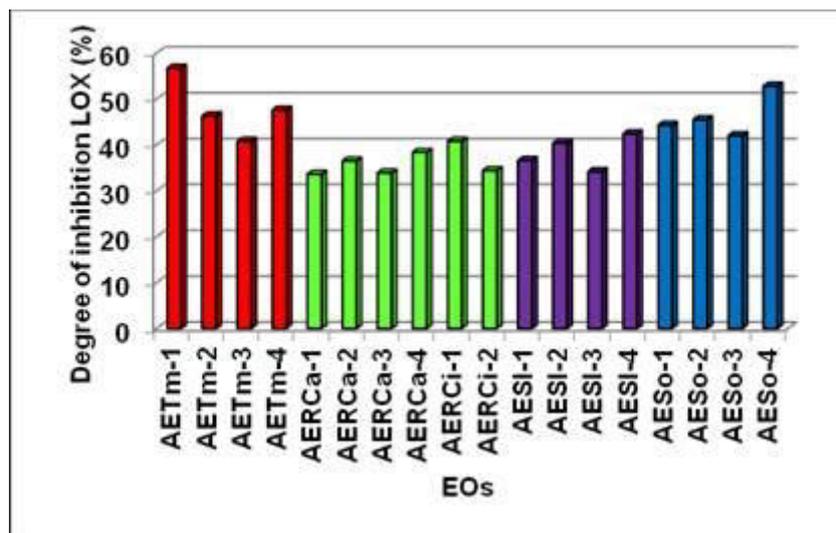


Figura 10.6. Comparison of LOX inhibition of all EOs.

❖ The AChE activity could be reduced using all the EOs investigated in this PhD Thesis. The IC₅₀ values are presented in the Figure 10.7. The EOs from *T. mastichina* were the best inhibitors, because they contained the highest 1,8-cineole concentration.

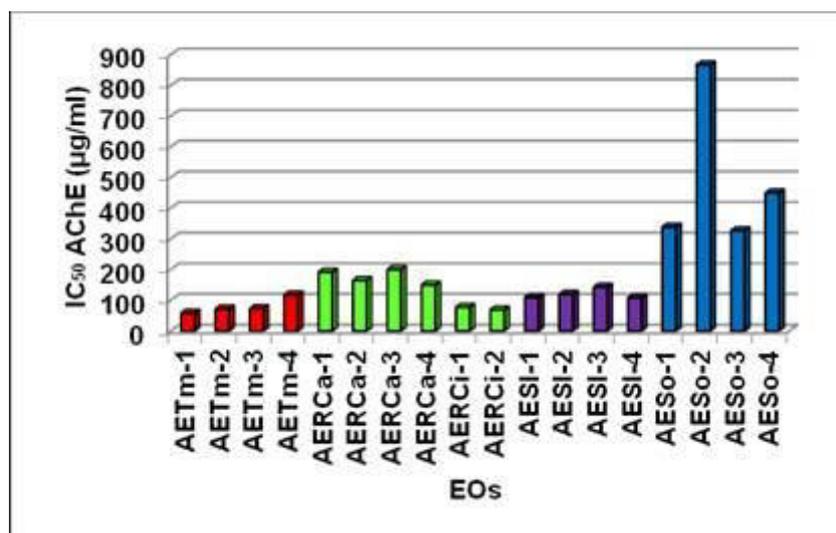


Figura 10.7. Comparison of AChE inhibition of all EOs.

Bibliografía

11. Bibliografía

- Abu-Darwish, M.S., Cabral, C., Ferreira, I.V., Goncalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Al-bdour, T.H., and Salgueiro, L. (2013). Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *Biomed Research International* 2013, 538940-538940.
- Alam, M.N., Bristi, N.J., and Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, 143-152.
- Ali, I., Gupta, V.K., and Aboul-Enein, H.Y. (2003). Chirality: A challenge for the environmental scientists. *Current Science* 84, 152-156.
- Aliberti, L., Caputo, L., De Feo, V., De Martino, L., Nazzaro, F., and Souza, L.F. (2016). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, cytotoxic, and central nervous system activities of the essential oils of *Citrus medica* L. cv. "Liscia" and *C. medica* cv. "Rugosa" cultivated in Southern Italy. *Molecules* 21, 14.
- Amorati, R., Foti, M.C., and Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 10835-10847.
- Arraiza, M.P., Arrabal, C., and Lopez, J.V. (2012). Seasonal variation of essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) grown in Castilla - La Mancha (Central Spain). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40, 106-108.
- Arteaga, O., Alvarez, A., Revuelta, M., Santaolalla, F., Urtasun, A., and Hilario, E. (2017). Role of antioxidants in neonatal hypoxic-ischemic brain injury: new therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences* 18.
- Aruoma, O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists Society* 75, 199-212.
- Baj, T., Ludwiczuk, A., Sieniawska, E., Skalicka-Wozniak, K., Widelski, J., Zieba, K., and Glowniak, K. (2013). GC-MS analysis of essential oils from *Salvia officinalis* L.: comparison of extraction methods of the volatile components. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 70, 35-40.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Waomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475.
- Barbosa, I.D., Medeiros, J.A.D., de Oliveira, K.A.R., Gomes-Neto, N.J., Tavares, J.F., Magnani, M., and de Souza, E.L. (2016). Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. *Food Control* 59, 468-477.
- Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., and Zupancic, A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 75, 125-132.
- Ben Farhat, M., Jordan, M.J., Chaouech-Hamada, R., Landoulsi, A., and Sotomayor, J.A. (2009). Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of Tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10349-10356.
- Ben Jemia, M., Tundis, R., Pugliese, A., Menichini, F., Senatore, F., Bruno, M., Kchouk, M.E., and Loizzo, M.R. (2015). Effect of bioclimatic area on the

- composition and bioactivity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Natural Product Research* *29*, 213-222.
- Bentes, J., Miguel, M.G., Monteiro, I., Costa, M., Figueired, A.C., Barroso, J.G., and Pedro, L.G. (2009). Antioxidant activities of the essential oils and extracts of portuguese *Thymbra capitata* and *Thymus mastichina*. *Italian Journal of Food Science* *21*, 183-195.
- Bernotiene, G., Nivinskiene, O., Butkiene, R., and Mockute, D. (2007). Essential oil composition variability in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemija* *18*, 38-43.
- Blanco Salas, J., Ruiz Tellez, T., Vazquez Pardo, F.M., Cases Capdevila, M.A., Perez-Alonso, M.J., and Gervasini Rodriguez, C. (2012). Influence of phenological stage on the antioxidant activity of *Thymus zygis*. *Spanish Journal of Agricultural Research* *10*, 461-465.
- Bogavac, M.A., Karaman, M.A., Sudi, J.J., Radovanovic, B.B., Janjusevic, L.N., Cetkovic, N.B., and Tesanovic, K.D. (2017). Antimicrobial potential of *Rosmarinus officinalis* commercial essential oil in the treatment of vaginal infections in pregnant women. *Natural Product Communications* *12*, 127-130.
- Boszormenyi, A., Hethelyi, E., Farkas, A., Horvath, G., Papp, N., Lemberkovics, E., and Szoke, E. (2009). Chemical and genetic relationships among sage (*Salvia officinalis* L.) cultivars and Judean sage (*Salvia judaica* Boiss.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *57*, 4663-4667.
- Bouaziz, M., Yangui, T., Sayadi, S., and Dhouib, A. (2009). Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* *47*, 2755-2760.
- Boyington, J.C., Gaffney, B.J., and Amzel, L.M. (1997). The three-dimensional structure of soybean lipoxygenase-1: An arachidonic acid 15-lipoxygenase. In *Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury* 2, Pts a and B, K.V. Honn, S. Nigam, and L.J. Marnett, eds. (New York: Plenum Press Div Plenum Publishing Corp), pp. 133-138.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., and Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *55*, 7879-7885.
- Brandwilliams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995). Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* *28*, 25-30.
- Brash, A.R., Schneider, C., and Hamberg, M. (2012). Applications of stereospecifically-labeled fatty acids in oxygenase and desaturase biochemistry. *lipids* *47*, 101-116.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* *94*, 223-253.
- Burt, S.A., and Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157 : H7. *Letters in Applied Microbiology* *36*, 162-167.
- Cabarkapa, I.S., Duragic, O.M., and Kostadinovic, L.M. (2016). Essential oils: mode of antimicrobial activity and potential application in food systems. *Agro Food Industry Hi-Tech* *27*, 61-64.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A.L., Oliveira, M., and Ferreira, I. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of

- their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry* *216*, 342-346.
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., and Ricke, S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control* *54*, 111-119.
- Carrasco, A. (2015). Characterisation and antioxidant and antienzymatic bioactivities of essential oils of lavender, thyme and oregano from Murcia. In *Biochemistry and Molecular Biology-A* (Murcia, Spain: University of Murcia), pp. 214.
- Carvalho, I.T., Estevinho, B.N., and Santos, L. (2016). Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - a review. *International Journal of Cosmetic Science* *38*, 109-119.
- CLSI (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard-third edition. CLSI document M27-A3. In *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Wayne, PA).
- CLSI (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-tenth edition. CLSI document M07-A10. In *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Wayne, PA).
- Concina, I., Falasconi, M., Gobbi, E., Bianchi, F., Musci, M., Mattarozzi, M., Pardo, M., Mangia, A., Careri, M., and Sberveglieri, G. (2009). Early detection of microbial contamination in processed tomatoes by electronic nose. *Food Control* *20*, 873-880.
- Crespo, M.E., Jimenez, J., Navarro, C., and Zarzuelo, A. (1986). The essential oil of *Salvia lavandulifolia* subspecies oxyodon - A study of its vegetative cycle. *Planta Medica* *52*, 367-369.
- Chen, C.H., and Ding, H.C. (2004). A colony blot immunoassay for the rapid identification of *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* *67*, 387-390.
- Chen, S.X., and Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions - A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry* *260*, 726-735.
- Christopher, J., Pistorius, E., and Axelrod, B. (1970). Isolation of an isozyme of soybean lipoxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* *198*, 12-19.
- Chu, J., and Pratico, D. (2016). The 5-Lipoxygenase as modulator of Alzheimer's gamma-secretase and therapeutic target. *Brain Research Bulletin* *126*, 207-212.
- Dannenbergh, G.D., Funck, G.D., Mattei, F.J., da Silva, W.P., and Fiorentini, A.M. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) *in vitro* and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* *36*, 120-127.
- Dastmalchi, K., Wang, I., and Stark, R.E. (2016). Potato wound-healing tissues: A rich source of natural antioxidant molecules with potential for food preservation. *Food Chemistry* *210*, 473-480.
- de Melo, G.A.N., Grespan, R., Fonseca, J.P., Farinha, T.O., Silva, E.L., Romero, A.L., Bersani-Amado, C.A., and Cuman, R.K.N. (2011). *Rosmarinus officinalis* L. essential oil inhibits *in vivo* and *in vitro* leukocyte migration. *Journal of Medicinal Food* *14*, 944-949.
- de Souza, E.L., Almeida, E.T.D., and Guedes, J.P.D. (2016). The potential of the incorporation of essential oils and their individual constituents to improve

- microbial safety in juices: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15, 753-772.
- Delgado, T., Marinero, P., Asensio-S-Manzanera, M.C., Asensio, C., Herrero, B., Pereira, J.A., and Ramalhosa, E. (2014). Antioxidant activity of twenty wild Spanish *Thymus mastichina* L. populations and its relation with their chemical composition. *Lwt-Food Science and Technology* 57, 412-418.
- Deshmukh, R., Kaundal, M., Bansal, V., and Samardeep (2016). Caffeic acid attenuates oxidative stress, learning and memory deficit in intra-cerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 81, 56-62.
- Donato, R., Santomauro, F., Bilia, A.R., Flamini, G., and Sacco, C. (2015). Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some foodborne pathogens. *Lwt-Food Science and Technology* 64, 1251-1254.
- Dorman, H.J.D., and Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308-316.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Noble, R.C., and Surai, P. (1995). Evaluation *in vitro* of plant essential oils as natural antioxidants. *Journal of Essential Oil Research* 7, 645-651.
- Ehrnhoefer-Ressler, M.M., Fricke, K., Pignitter, M., Walker, J.M., Walker, J., Rychlik, M., and Somoza, V. (2013). Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 3451-3459.
- Eidi, A., and Eidi, M. (2009). Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 3, 40-44.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., and Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
- European-Pharmacopoeia (2011). Technical guide for the elaboration of monograph. 6th ed. (Francia: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare).
- Farag, M.A., Ezzat, S.M., Salama, M.M., Tadros, M.G., and Serya, R.A.T. (2016). Anti-acetylcholinesterase activity of essential oils and their major constituents from four *Ocimum* species. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences* 71, 393-402.
- Forlot, P., and Pevet, P. (2012). Bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) essential oil: biological properties, cosmetic and medical use. A review. *Journal of Essential Oil Research* 24, 195-201.
- Fraternale, D., Giamperi, L., and Ricci, D. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil obtained from *in vitro* plants of *Thymus mastichina* L. *Journal of Essential Oil Research* 15, 278-281.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O⁻² radical anion), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry* 272, 18515-18517.
- Galego, L., Almeida, V., Gonçalves, V., Costa, M., Monteiro, I., and Matos, F. (2008). Antioxidant activity of the essential oils of *Thymbra capitata*, *Origanum*

- vulgare*, *Thymus mastichina*, and *Calamintha baetica* (International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium).
- Gautam, N., Mantha, A.K., and Mittal, S. (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *Biomed Research International*, 23.
- Gayán, E., Torres, J.A., and Paredes-Sabja, D. (2012). Hurdle approach to increase the microbial inactivation by high pressure processing: effect of essential oils. *Food Engineering Reviews* 4, 141-148.
- Ghayempour, S., and Montazer, M. (2016). Micro/nanoencapsulation of essential oils and fragrances: focus on perfumed, antimicrobial, mosquito-repellent and medical textiles. *Journal of Microencapsulation* 33, 497-510.
- Gilav, E. (1975). Present status of enantiomeric analysis by gas-chromatography. *Journal of Molecular Evolution* 6, 131-144.
- Goozee, K.G., Shah, T.M., Sohrabi, H.R., Rainey-Smith, S.R., Brown, B., Verdile, G., and Martins, R.N. (2016). Examining the potential clinical value of curcumin in the prevention and diagnosis of Alzheimer's disease. *British Journal of Nutrition* 115, 449-465.
- Greenfield, S. (1984). Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. *Trends in Neurosciences* 7, 364-368.
- Guedes, J.P.D., Medeiros, J.A.D., Silva, R., de Sousa, J.M.B., da Conceicao, M.L., and de Souza, E.L. (2016). The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *International Journal of Food Microbiology* 238, 183-192.
- Gulcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology* 86, 345-391.
- Habtemariam, S. (2016). The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 14.
- Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N., and Kadri, A. (2016). Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. *Microbial Pathogenesis* 95, 86-94.
- Hanson, J.R. (2016). Rosemary, the beneficial chemistry of a garden herb. *Science Progress* 99, 83-91.
- Hayouni, E.A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.-Y., Mohammed, H., and Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 125, 242-251.
- He, H.J., and Sun, D.W. (2015). Microbial evaluation of raw and processed food products by Visible/Infrared, Raman and Fluorescence spectroscopy. *Trends in Food Science & Technology* 46, 199-210.
- Herman, A., Herman, A.P., Domagalska, B.W., and Mlynarczyk, A. (2013). Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion. *Indian Journal of Microbiology* 53, 232-237.
- Herraiz-Penalver, D., Usano-Aleman, J., Cuadrado, J., Jordan, M.J., Lax, V., Sotomayor, J.A., and Pala-Paul, J. (2010). Essential oil composition of wild populations of *Salvia lavandulifolia* Vahl. from Castilla-La Mancha (Spain). *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 1224-1230.

- Horvath, G., and Acs, K. (2015). Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: a review. *Flavour and Fragrance Journal* *30*, 331-341.
- Isman, M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* *19*, 603-608.
- IUPAC (1997). *Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book")*. 2nd ed. (Oxford: Blackwell Scientific Publications).
- Ivanov, I., Heydeck, D., Hofheinz, K., Roffeis, J., O'Donnell, V.B., Kuhn, H., and Walther, M. (2010). Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *503*, 161-174.
- Jayasena, D.D., and Jo, C. (2014). Potential application of essential oils as natural antioxidants in meat and meat products: a review. *Food Reviews International* *30*, 71-90.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Denkova, Z., Slavchev, A., Stoyanova, A., and Schmidt, E. (2006). Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of various *Salvia* sp. and *Thuja* sp. essential oils. *Nutrition* *30*, 152-159.
- Jordan, M.J., Lax, V., Martinez, C., Aouissat, M., and Sotomayor, J.A. (2011). Chemical intraspecific variability and chemotype determination of *Rosmarinus officinalis* L. in the Region of Murcia. In *Xxviii International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People*, A. Mathe, A.M. Barata, C. Carlen, and L. Craker, eds. (Leuven 1: Int Soc Horticultural Science), pp. 109-114.
- Jordan, M.J., Martinez, R.M., Goodner, K.L., Baldwin, E.A., and Sotomayor, J.A. (2006). Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products* *24*, 253-263.
- Jordan, M.J., Martinez, R.M., Martinez, C., Monino, I., and Sotomayor, J.A. (2009). Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels. *Industrial Crops and Products* *29*, 145-153.
- Joshi, Y.B., Giannopoulos, P.F., and Pratico, D. (2015). The 12/15-lipoxygenase as an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* *36*, 181-186.
- Kaplan, D., Ordentlich, A., Barak, D., Ariel, N., Kronman, C., Velan, B., and Shafferman, A. (2001). Does "butyrylization" of acetylcholinesterase through substitution of the six divergent aromatic amino acids in the active center gorge generate an enzyme mimic of butyrylcholinesterase? *Biochemistry* *40*, 7433-7445.
- Kennedy, D.O., Dodd, F.L., Robertson, B.C., Okello, E.J., Reay, J.L., Scholey, A.B., and Haskell, C.F. (2011). Monoterpenoid extract of sage (*Salvia lavandulaefolia*) with cholinesterase inhibiting properties improves cognitive performance and mood in healthy adults. *Journal of Psychopharmacology* *25*, 1088-1100.
- Kim, K.N., Ko, Y.J., Yang, H.M., Ham, Y.M., Roh, S.W., Jeon, Y.J., Ahn, G., Kang, M.C., Yoon, W.J., Kim, D., *et al.* (2013). Anti-inflammatory effect of essential oil and its constituents from fingered citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) through blocking JNK, ERK and NF-kappa B signaling pathways in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Food and Chemical Toxicology* *57*, 126-131.

- Kostka, P. (1995). Free-radicals (nitric-oxide). *Analytical Chemistry* 67, R411-R416.
- Krepker, M., Shemesh, R., Poleg, Y.D., Kashi, Y., Vaxman, A., and Segal, E. (2017). Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity. *Food Control* 76, 117-126.
- Krupcik, J., Gorovenko, R., Spanik, I., Armstrong, D.W., and Sandra, P. (2016). Enantioselective comprehensive two-dimensional gas chromatography of lavender essential oil. *Journal of Separation Science* 39, 4765-4772.
- Kuhn, H., Banthiya, S., and van Leyen, K. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 308-330.
- Kumar, Y., Yadav, D.N., Ahmad, T., and Narsaiah, K. (2015). Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14, 796-812.
- Kupczyk, M., Dahlen, B., and Dahlen, S.E. (2011). Which anti-inflammatory drug should we use in asthma? *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej-Polish Archives of Internal Medicine* 121, 456-459.
- Kuppusamy, A., Arumugam, M., and George, S. (2017). Combining *in silico* and *in vitro* approaches to evaluate the acetylcholinesterase inhibitory profile of some commercially available flavonoids in the management of Alzheimer's disease. *International Journal of Biological Macromolecules* 95, 199-203.
- Kurihara, H., Kagawa, Y., Konno, R., Kim, S.M., and Takahashi, K. (2014). Lipoxygenase inhibitors derived from marine macroalgae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24, 1383-1385.
- Lakusic, D., Ristic, M., Slavkovska, V., and Lakusic, B. (2013). Seasonal variations in the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae). *Natural Product Communications* 8, 131-134.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M.E., and Gardini, F. (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science & Technology* 15, 201-208.
- Lang, G.R., and Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *A review. Flavour and Fragrance Journal* 27, 13-39.
- Li, S., Tan, H.Y., Wang, N., Zhang, Z.J., Lao, L.X., Wong, C.W., and Feng, Y.B. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 26087-26124.
- Litescu, S.C., Eremia, S.A.V., Tache, A., Vasilescu, I., and Radu, G. (2014). The use of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assays in the assessment of beverages' antioxidant properties. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, V. Preedy, ed. (Amsterdam: Academic Press), pp. 245-251.
- Loayza-Davila, F.E., Plotto, A., Mahattanatawee, K., Goodner, K., and Jordan, M.J. (2010). A study on aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils at five physiological stages. *Hortscience* 45, 497-498.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A.M., Statti, G.A., and Menichini, F. (2007). Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against *in vitro* human tumor models. *Anticancer Res* 27, 3293-3299.
- Longaray Delamare, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., and Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of

- Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. Food Chemistry 100, 603-608.
- Lopez-Galvez, F., Allende, A., Selma, M.V., and Gil, M.I. (2009). Prevention of *Escherichia coli* cross-contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce. International Journal of Food Microbiology 133, 167-171.
- Lu, Y., and Yeap Foo, L. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). Food Chemistry 75, 197-202.
- Luro, F., Venturini, N., Costantino, G., Paolini, J., Ollitrault, P., and Costa, J. (2012). Genetic and chemical diversity of citron (*Citrus medica* L.) based on nuclear and cytoplasmic markers and leaf essential oil composition. Phytochemistry 77, 186-196.
- Luro, F., Venturini, N., Costantino, G., Tur, I., Paolini, J., Ollitrault, P., and Costa, J. (2015). Diversity of citron (*Citrus medica*) and phylogenetic analysis of related citron hybrids using molecular markers and essential oil composition. In Xii International Citrus Congress - International Society of Citriculture, B. SabaterMunoz, P. Moreno, L. Pena, and L. Navarro, eds. (Leuven 1: Int Soc Horticultural Science), pp. 125-133.
- Maggio, A., Rosselli, S., and Bruno, M. (2016). Essential oils and pure volatile compounds as potential drugs in Alzheimer's disease therapy: an updated review of the literature. Current Pharmaceutical Design 22, 4011-4027.
- Maksimovic, M., Vidic, D., Milos, M., Solic, M.E., Abadzic, S., and Sijak-Yakovlev, S. (2007). Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. Biochemical Systematics and Ecology 35, 473-478.
- Marino, M., Bersani, C., and Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology 67, 187-195.
- Martinez-Blanch, J.F., Sanchez, G., Garay, E., and Aznar, R. (2009). Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. International Journal of Food Microbiology 135, 15-21.
- Martinez-Gracia, C., Gonzalez-Bermudez, C.A., Cabellero-Valcarcel, A.M., Santaella-Pascual, M., and Frontela-Saseta, C. (2015). Use of herbs and spices for food preservation: advantages and limitations. Current Opinion in Food Science 6, 38-43.
- Mates, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., and Marquez, J. (2011). Anticancer antioxidant regulatory functions of phytochemicals. Current Medicinal Chemistry 18, 2315-2338.
- Menichini, F., Tundis, R., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Conforti, F., Statti, G.A., Intrigliolo, F., De Cindio, B., Conti, A., and Menichini, F. (2009). Chemical composition and *in vitro* anticholinesterase inhibitory activity of *Citrus medica* L. cv. Diamante essential oil. Planta Medica 75, 1030-1030.
- Merthler, C.A., and Reinhart, R.V. (2017). Advanced and multivariate statistical methods: practical application and interpretation, 6th edn (New York: Routledge).
- Miguel, G., Simoes, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., and Carvalho, L. (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. Food Chemistry 86, 183-188.

- Miguel, M.G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules* *15*, 9252-9287.
- Miguel, M.G., Costa, L.A., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., and Pedro, L.G. (2007). Assessment of the antioxidant ability of *Thymus albicans*, *T. mastichina*, *T. camphoratus* and *T. carnosus* essential oils by TBARS and micellar model systems. *Natural Product Communications* *2*, 399-406.
- Miguel, M.G., Cruz, C., Faleiro, L., Simoes, M.T.F., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., and Pedro, L.G. (2010). *Foeniculum vulgare* essential oils: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Communications* *5*, 319-328.
- Miguel, M.G., Falcato-Simoes, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.M.G., Pedro, L.G., and Carvalho, L.M. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of *Thymbra capitata*, *Thymus mastichina* and *Thymus camphoratus* essential oils. *Journal of Food Lipids* *12*, 181-197.
- Miguel, M.G., Gago, C., Antunes, M.D., Megias, C., Cortes-Giraldo, I., Vioque, J., Lima, A.S., and Figueiredo, A.C. (2015). Antioxidant and antiproliferative activities of the essential oils from *Thymbra capitata* and *Thymus* species grown in Portugal. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Mirjalili, M.H., Salehi, P., Sonboli, A., and Vala, M.M. (2006). Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle. *Chemistry of Natural Compounds* *42*, 19-23.
- Miyasaka, N., and Hirata, Y. (1997). Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sciences* *61*, 2073-2081.
- Moldao-Martins, M., Beirao-da-Costa, S., Neves, C., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., and Beirao-da-Costa, M.L. (2004). Olive oil flavoured by the essential oils of *Mentha x piperita* and *Thymus mastichina* L. *Food Quality and Preference* *15*, 447-452.
- Moore, G.Y., and Pidgeon, G.P. (2017). Cross-talk between cancer cells and the tumour microenvironment: the role of the 5-lipoxygenase pathway. *International Journal of Molecular Sciences* *18*.
- Morales, R. (2010). Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. In *Verbenaceae-Labiatae-Callitrichaceae* R. Morales, A. Quintanar, C.F. J., P.A. J., and C. S., eds. (Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC), pp. 349-409.
- Mori, K. (2011). Bioactive natural products and chirality. *Chirality* *23*, 449-462.
- Mortimer, M., Jarving, R., Brash, A.R., Samel, N., and Jarving, I. (2006). Identification and characterization of an arachidonate 11R-lipoxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *445*, 147-155.
- Mossi, A.J., Cansian, R.L., Paroul, N., Toniazzo, G., Oliveira, J.V., Pierozan, M.K., Pauletti, G., Rota, L., Santos, A.C.A., and Serafini, L.A. (2011). Morphological characterisation and agronomical parameters of different species of *Salvia sp* (Lamiaceae). *Brazilian Journal of Biology* *71*, 121-129.
- Mousavinik, S.M., Asgharipour, M.R., and Sardashti, S. (2016). Manure and light intensity affect growth characteristics and essential oil of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* *19*, 2029-2036.
- Nardoni, S., Giovanelli, S., Pistelli, L., Mugnaini, L., Profili, G., Pisseri, F., and Mancianti, F. (2015). *In vitro* activity of twenty commercially available, plant-derived essential oils against selected dermatophyte species. *Natural Product Communications* *10*, 1473-1478.

- Naveena, B.M., Sen, A.R., Vaithyanathan, S., Babji, Y., and Kondaiah, N. (2008). Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science* *80*, 1304-1308.
- Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., and Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology* *101*, 372-378.
- Newcomer, M.E., and Brash, A.R. (2015). The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Science* *24*, 298-309.
- Ng, Y.P., Or, T.C.T., and Ip, N.Y. (2015). Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* *89*, 260-270.
- Odimegwu, J.I., Odukoya, O., Yadav, R.K., Chanotiya, C.S., Ogbonnia, S., and Sangwan, N.S. (2013). A new source of elemol rich essential oil and existence of multicellular oil glands in leaves of the *Dioscorea* species. *Scientific World Journal*, 6.
- Ojeda-Sana, A.M., van Baren, C.M., Elechosa, M.A., Juarez, M.A., and Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* *31*, 189-195.
- Ou, B.X., Hampsch-Woodill, M., and Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *49*, 4619-4626.
- Ou, B.X., Huang, D.J., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., and Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *50*, 3122-3128.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* *44*, 307-315.
- Ozogul, Y., Yuvka, I., Ucar, Y., Durmus, M., Kosker, A.R., Oz, M., and Ozogul, F. (2017). Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. *Lwt-Food Science and Technology* *75*, 677-684.
- Panagiotopoulos, E., Kapetanios, C., Skapeti, M., Cholevas, C., Drossopoulos, J., Loukas, M., and Kintzios, S.E. (2000). The ecophysiology of *Salvia*: disorders and adaptation. In *Sage The Genus Salvia*, S.E. Kintzios, ed. (Amsterdam: Harwood Academic Publisher), pp. 125-133.
- Pandey, A.K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N.N., and Bajpai, V.K. (2017). Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in Microbiology* *7*, 14.
- Park, C.G., Jang, M., Yoon, K.A., and Kim, J. (2016). Insecticidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Lamiaceae plant essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Industrial Crops and Products* *89*, 507-513.
- Patrignani, F., Siroli, L., Serrazanetti, D.I., Gardini, F., and Lanciotti, R. (2015). Innovative strategies based on the use of essential oils and their components to improve safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology* *46*, 311-319.

- Perez-Sanchez, R., Galvez, C., and Ubera, J.L. (2012). Bioclimatic influence on essential oil composition in South Iberian Peninsular populations of *Thymus zygis*. *Journal of Essential Oil Research* 24, 71-81.
- Perry, E.K., Pickering, A.T., Wang, W.W., Houghton, P.J., and Perry, N.S.L. (1999a). Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51, 527-534.
- Perry, N.B., Anderson, R.E., Brennan, N.J., Douglas, M.H., Heaney, A.J., McGimpsey, J.A., and Smallfield, B.M. (1999b). Essential oils from dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2048-2054.
- Perry, N.S.L., Bollen, C., Perry, E.K., and Ballard, C. (2003). *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75, 651-659.
- Perry, N.S.L., Houghton, P.J., Sampson, J., Theobald, A.E., Hart, S., Lis-Balchin, M., Hoult, J.R.S., Evans, P., Jenner, P., Milligan, S., et al. (2001). *In vitro* activity of *S. lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53, 1347-1356.
- Piccaglia, R. (1998). Aromatic plants: a world of flavouring compounds. *Agro Food Industry Hi-Tech* 9, 12-15.
- Pierozan, M.K., Pauletti, G.F., Rota, L., dos Santos, A.C.A., Lerin, L.A., Di Luccio, M., Mossi, A.J., Atti-Serafini, L., Cansian, R.L., and Oliveira, J.V. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia L.* species. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos* 29, 764-770.
- Pinto, E., Salgueiro, L.R., Cavaleiro, C., Palmeira, A., and Goncalves, M.J. (2007). *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products* 26, 135-141.
- Porres-Martinez, M., Gonzalez-Burgos, E., Accame, M.E.C., and Gomez-Serranillos, M.P. (2013). Phytochemical composition, antioxidant and cytoprotective activities of essential oil of *Salvia lavandulifolia* Vahl. *Food Research International* 54, 523-531.
- Porres-Martinez, M., Gonzalez-Burgos, E., Carretero, M.E., and Gomez-Serranillos, M.P. (2014). Influence of phenological stage on chemical composition and antioxidant activity of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oils. *Industrial Crops and Products* 53, 71-77.
- Porte, A., Godoy, R.L.O., and Maia-Porte, L.H. (2013). Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 15, 438-441.
- Quinn, M.T., and Gauss, K.A. (2004). Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of Leukocyte Biology* 76, 760-781.
- Radmark, O. (2002). Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-9, 211-234.
- Radmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., and Samuelsson, B. (2015). 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 331-339.
- Radulescu, V., Chiliment, S., and Oprea, E. (2004). Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A* 1027, 121-126.

- Rahman, U.U., Shahzad, T., Sahar, A., Ishaq, A., Khan, M.I., Zahoor, T., and Aslam, S. (2016). Recapitulating the competence of novel & rapid monitoring tools for microbial documentation in food systems. *Lwt-Food Science and Technology* 67, 62-66.
- Raina, A.P., Negi, K., and Dutta, M. (2013). Variability in essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) grown under North Western Himalayan Region of India. *Journal of Medicinal Plants Research* 7, 683-688.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237.
- Reddy, V.P., Zhu, X.W., Perry, G., and Smith, M.A. (2009). Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease* 16, 763-774.
- Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H.S., Albuquerque, T.G., Castilho, M.C., Ramos, F., Melo, N.R., and Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology* 45, 355-368.
- Rivas-Martínez, S. (1987). Nociones sobre fitosociología, biogeografía y bioclimatología en la vegetación de España. (Notions about phytosociology, biogeography and bioclimatology in the plants of Spain) (Madrid: University of Alcalá).
- Rodríguez-García, I., Cruz-Valenzuela, M.R., Silva-Espinoza, B.A., González-Aguilar, G.A., Moctezuma, E., Gutiérrez-Pacheco, M.M., Tapia-Rodríguez, M.R., Ortega-Ramírez, L.A., and Ayala-Zavala, J.F. (2016). Oregano (*Lippia graveolens*) essential oil added within pectin edible coatings prevents fungal decay and increases the antioxidant capacity of treated tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96, 3772-3778.
- Roos, J., Grosch, S., Werz, O., Schroder, P., Ziegler, S., Fulda, S., Paulus, P., Urbschat, A., Kuhn, B., Maucher, I., *et al.* (2016). Regulation of tumorigenic Wnt signaling by cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase and their pharmacological inhibitors: a basis for novel drugs targeting cancer cells? *Pharmacology & Therapeutics* 157, 43-64.
- Rota, M.C., Herrera, A., Martínez, R.M., Sotomayor, J.A., and Jordan, M.J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19, 681-687.
- Sadgrove, N., and Jones, G. (2015). A contemporary introduction to essential oils: chemistry, bioactivity and prospects for Australian agriculture. *Agriculture-Basel* 5, 48-102.
- Saez, F. (1995). Essential oil variability of *Thymus zygis* growing wild in Southeastern Spain. *Phytochemistry* 40, 819-825.
- Sajewicz, M., Rzepa, J., Hajnos, M., Wojtal, L., Staszek, D., Kowalska, T., and Waksmundzka-Hajnos, M. (2009). GC-MS study of the performance of different techniques for isolating the volatile fraction from sage (*Salvia* L.) species, and comparison of seasonal differences in the composition of this fraction. *Acta Chromatographica* 21, 453-471.
- Salas, J.B., Tellez, T.R., Pardo, F.M.V., Capdevila, M.A.C., Pérez-Alonso, M.J., and Rodríguez, C.G. (2012). Short communication. Influence of phenological stage on the antioxidant activity of *Thymus zygis* s. 1. essential oil. *Spanish Journal of Agricultural Research* 10, 461-465.
- Salgueiro, L.R., Vila, R., Tomas, X., Canigüeral, S., DaCunha, A.P., and Adzet, T. (1997). Composition and variability of the essential oils of *Thymus* species

- from section *Mastichina* from Portugal. *Biochemical Systematics and Ecology* **25**, 659-672.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F., and Sangwan, R.S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* **34**, 3-21.
- Sankar, C.N.R., Lalitha, K.V., Jose, L., Manju, S., and Gopal, T.K.S. (2008). Effect of packaging atmosphere on the microbial attributes of pearlsport (*Etroplus suratensis* Bloch) stored at 0-2 degrees C. *Food Microbiology* **25**, 518-528.
- Santana, O., Cabrera, R., Gimenez, C., Gonzalez-Coloma, A., Sanchez-Vioque, R., de los Mozos-Pascual, M., Rodriguez-Conde, M.F., Laserna-Ruiz, I., Usano-Aleman, J., and Herraiz, D. (2012). Chemical and biological profiles of the essential oils from aromatic plants of agro industrial interest in Castilla-La Mancha (Spain). *Grasas Y Aceites* **63**, 214-222.
- Santos-Gomes, P.C., and Fernandes-Ferreira, M. (2001). Organ- and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 2908-2916.
- Satyal, P., Murray, B.L., McFeeters, R.L., and Setzer, W.N. (2016). Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods* **5**, 12.
- Savelev, S., Okello, E., Perry, N.S.L., Wilkins, R.M., and Perry, E.K. (2003). Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **75**, 661-668.
- Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H.L., and Yuk, H.G. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **54**, 625-644.
- Serhan, C.N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. In *Annual Review of Immunology* (Palo Alto: Annual Reviews), pp. 101-137.
- Shimizu, T. (2009). Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **49**, 123-150.
- Silman, I., and Sussman, J.L. (2005). Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* **5**, 293-302.
- Silman, I., and Sussman, J.L. (2008). Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chemico-Biological Interactions* **175**, 3-10.
- Singh, M., and Guleria, N. (2013). Influence of harvesting stage and inorganic and organic fertilizers on yield and oil composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in a semi-arid tropical climate. *Industrial Crops and Products* **42**, 37-40.
- Singh, S., and Singh, R.P. (2008). *In vitro* methods of assay of antioxidants: an overview. *Food Reviews International* **24**, 392-415.
- Sirocchi, V., Devlieghere, F., Peelman, N., Sagratini, G., Maggi, F., Vittori, S., and Ragaert, P. (2017). Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil combined with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. *Food Chemistry* **221**, 1069-1076.

- Sivakumar, D., and Bautista-Banos, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection* 64, 27-37.
- Smaoui, S., Ben Hsouna, A., Lahmar, A., Ennouri, K., Mtibaa-Chakchouk, A., Sellem, I., Najah, S., Bouaziz, M., and Mellouli, L. (2016). Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic *Mentha piperita* used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat. *Meat Science* 117, 196-204.
- Soreq, H., and Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 294-302.
- Staniatopoulos, P., Brohan, E., Prevost, C., Siebert, T.E., Herderich, M., and Darriet, P. (2016). Influence of chirality of lactones on the perception of some typical fruity notes through perceptual interaction phenomena in Bordeaux dessert wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 8160-8167.
- Stasiuk, M., Janiszewska, A., and Kozubek, A. (2014). Phenolic lipids affect the activity and conformation of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (electric eel). *Nutrients* 6, 1823-1831.
- Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M., and Leroi, F. (2001). Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* 34, 797-806.
- Taormina, P.J. (2010). Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50, 209-227.
- Taormina, P.J. (2011). Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety (vol 50, pg 209, 2010). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51, 477-477.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J., and Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *Biomed Research International*.
- Tepe, B., Sarikurkcu, C., Berk, S., Alim, A., and Akpulat, H.A. (2011). Chemical composition, radical scavenging and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus boveii* and *Thymus hyemalis*. *Records of Natural Products* 5, 208-220.
- Tildesley, N.T.J., Kennedy, D.O., Perry, E.K., Ballard, C.G., Savelev, S., Wesnes, K.A., and Scholey, A.B. (2003). *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75, 669-674.
- Usano-Aleman, J., Herraiz-Penalver, D., Cuadrado, J., Diaz, S., Santa-Cruz, M., and Pala-Paul, J. (2012). Seasonal variation of the essential oils of *Salvia lavandulifolia*: antibacterial activity. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 15, 195-203.
- Usano-Aleman, J., Pala-Paul, J., and Herraiz-Penalver, D. (2014). Temperature stress causes different profiles of volatile compounds in two chemotypes of *Salvia lavandulifolia* Vahl. *Biochemical Systematics and Ecology* 54, 166-171.
- Valente, J.D.S., Fonseca, A.D.D., Denardi, L.B., Dal Ben, V.S., Maia, F.D., Baptista, C.T., Braga, C.Q., Zambrano, C.G., Alves, S.H., Botton, S.D., *et al.* (2016). *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils combinations. *Mycopathologia* 181, 617-622.

- Vergis, J., Gokulakrishnan, P., Agarwal, R.K., and Kumar, A. (2015). Essential oils as natural food antimicrobial agents: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55, 1320-1323.
- Verma, R.S., Padalia, R.C., and Chauhan, A. (2015). Harvesting season and plant part dependent variations in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. grown in northern India. *Journal of Herbal Medicine* 5, 165-171.
- Videira, R., Castanheira, P., Graos, M., Salgueiro, L., Faro, C., and Cavaleiro, C. (2013). A necrodane monoterpene from *Lavandula luisieri* essential oil as a cell-permeable inhibitor of BACE-1, the beta-secretase in Alzheimer's disease. *Flavour and Fragrance Journal* 28, 380-388.
- Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernandez, Y., Rubio-Rosas, E., Lozoya-Gloria, E., Mosso-Gonzalez, C., Ramon-Canul, L.G., and Cruz-Duran, R. (2015). Essential oil composition and biological/pharmacological properties of *Salmea scandens* (L.) DC. *Food Control* 57, 177-184.
- Vitali, L.A., Beghelli, D., Nya, P.C.B., Bistoni, O., Cappellacci, L., Damiano, S., Lupidi, G., Maggi, F., Orsomando, G., Papa, F., *et al.* (2016). Diverse biological effects of the essential oil from Iranian *Trachyspermum ammi*. *Arabian Journal of Chemistry* 9, 775-786.
- Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., and Efferth, T. (2012). Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules* 17, 2704-2713.
- Waseem, R., and Low, K.H. (2015). Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 38, 483-501.
- WHO (2002). The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life, W.H. Organization, ed. (Geneva), pp. 248.
- Wu, R., Feng, J.F., Yang, Y.W., Dai, C.M., Lu, A.Y., Li, J., Liao, Y., Xiang, M., Huang, Q.M., Wang, D., *et al.* (2017). Significance of serum total oxidant/antioxidant status in patients with colorectal cancer. *Plos One* 12.
- Wu, Z., Li, H., Yang, Y., Zhan, Y., and Tu, D.W. (2013). Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity. *Industrial Crops and Products* 46, 311-316.
- Xie, S.M., and Yuan, L.M. (2017). Recent progress of chiral stationary phases for separation of enantiomers in gas chromatography. *Journal of Separation Science* 40, 124-137.
- Xu, D.P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J.J., and Li, H.B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences* 18.
- Yesil-Celiktas, O., Kocabas, E.E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T., and Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* 100, 553-559.
- Yu, D.W., Xu, Y.S., Jiang, Q.X., and Xia, W.S. (2017). Effects of chitosan coating combined with essential oils on quality and antioxidant enzyme activities of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Science and Technology* 52, 404-412.

- Yuan, G.F., Chen, X.E., and Li, D. (2016). Chitosan films and coatings containing essential oils: the antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Research International* *89*, 117-128.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T., and Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology* *48*, 3144-3152.
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, S., Zhou, T., Zhang, P., and Li, H.B. (2016). Alcoholic beverage consumption and chronic diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health* *13*, 522-549.